



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

Variación genética del color del iris en la población bonaerense

Tesista: Hohl, Diana María

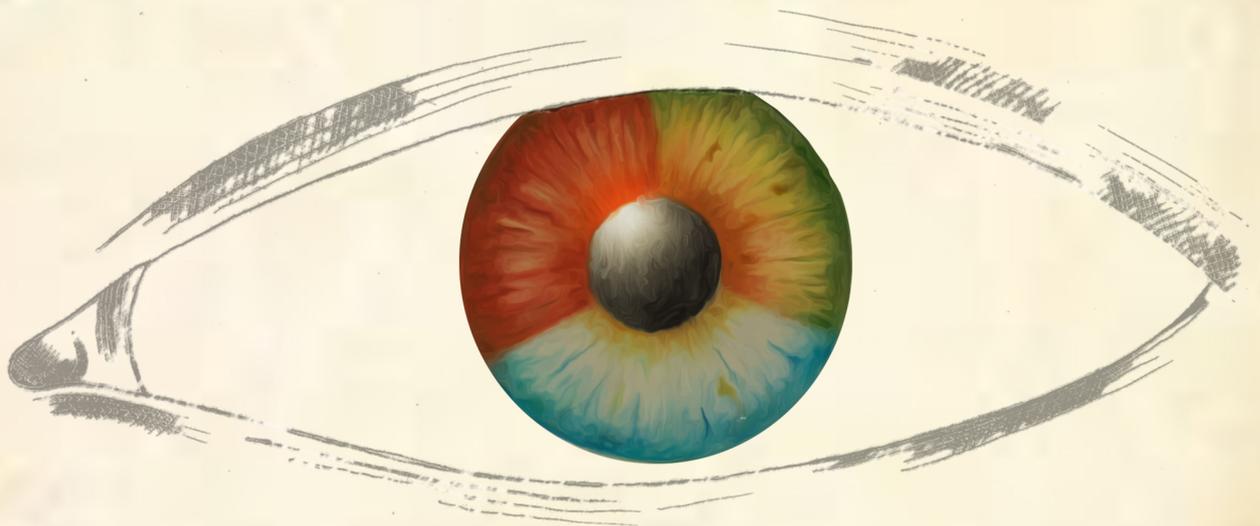
Directora: Catanesi, Cecilia Inés

Codirector: López Camelo, Jorge Santiago

Año: 2023



Variación genética del color del iris en la población bonaerense



Lic. Diana María Hohl

Directora: Dra. Cecilia Inés Catanesi

Codirector: Dr. Jorge Santiago López Camelo

Este trabajo de Tesis se presenta para optar por el grado académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, Área Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de La Plata. Se realizó en el Laboratorio de Diversidad Genética del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular IMBICE (CONICET-UNLP-CIC) de la ciudad de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Cecilia Inés Catanesi y la codirección del Dr. Jorge Santiago López Camelo.

Ilustración y diseño de tapa: Laura Blanco, ilustradora científica.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de La Plata, por su educación pública, gratuita y de calidad, sin la cual no me hubiese sido posible formarme como profesional ni realizar esta tesis doctoral. En particular a la Facultad de Ciencias Exactas, por su formación, por la calidez de sus docentes y por haberme recibido con las puertas abiertas durante tantos años.

A mi directora Ceci, por todos estos años de trabajo (desde la tesina!), por la confianza y la paciencia. Por corregir mis trabajos hasta cualquier hora de la madrugada. Por ayudarme a simplificar las cosas cuando todo parecía volverse caótico.

A mi codirector Jorge, por la paciencia y buena predisposición para responder a todas mis dudas y consultas (incluso las más básicas!). Por ser el referente de la Estadística utilizada en este trabajo.

A Marita, que se puso al hombro un muestreo que parecía imposible, con una admirable energía y pasión por la investigación.

A Majó y Nico por su ayuda con el procesamiento de las imágenes digitales.

A Jessi y a Sergio por su gran ayuda con los AIMS.

A las y los integrantes del IMBICE, principalmente a becarios y personal de apoyo con quienes compartí la mesada de trabajo todo este tiempo.

A la CICPBA y al CONICET por el apoyo económico para realizar esta tesis.

Al jurado que aceptó evaluar este trabajo.

A mi familia:

A mamá, por su eterna paciencia, coraje y apoyo incondicional; por su «el “no” ya lo tenés, ahora andá por el “sí”».

A mi hermano Claus, por ser guía y compañero desde siempre; mi ejemplo a seguir.

A mis sobrinos Eli, Maxi y Santi, el amor en su más puro estado.

A papá, que me regaló la curiosidad y el asombro por las cosas simples, las ganas de aprender y de saber, de buscar hasta entender... al fin nos vamos a doctorar, pá!.

A Mary, mi madrina, por estar siempre presente.

A Dante, por su cariño y compañía, por los viajes que hicimos y los que no hicimos porque “a esta tesis la tengo que terminar”. Por escucharme y darme siempre un punto de vista más lógico y racional, por fuera del caos. Por arreglar mi computadora cuando ya no daba para más. Por ser co-adoptante de Irene, que nos cambió la vida.

A mis amigas y amigos, que me acompañaron en este largo trayecto y que entendieron mis ausencias, que están y estuvieron siempre cerca: Nachi, Nat, Nadiu, Diegui, Coki, Meli, Chola, Marti, Core, Rebe, Ester y Tomi.

A Lau Blanco, que además de regalarme su amistad me regaló su trabajo: la hermosa tapa de esta tesis.

A mis compañeras del laboratorio, por el apoyo y la ayuda frente a todos los contratiempos y dificultades: Rebe, Maga, Estefi, Meli A., Pau y Sil.

Al Taekwon-do, el arte marcial que me inculcó sus principios, en especial la perseverancia sin la cual esta tesis no hubiese llegado a su fin. A mi Sabum-Nim Fernando y a mis compañeros de práctica.

A Nacho y Vero, mis colegas farmacéuticos.

A Emi, que formó parte del último trayecto de este trabajo, junto con las prácticas farmacéuticas.

A Un Dinamo por la música de todos los días; por el Rock, el Heavy Metal y las anécdotas imprecisas.

A El Universo del HM, por la música que acompañó las largas noches de trabajo en la computadora.

A las y los donantes voluntarios que aportaron su muestra para este proyecto.

A quienes colaboraron con este trabajo y aportaron de una u otra manera para hacerlo posible.

RESUMEN

El color de los ojos es un carácter fenotípico conspicuo de los seres humanos, siendo sus distintas variantes útiles en la descripción de los individuos. Es un carácter cuantitativo complejo, de herencia poligénica.

Como todo rasgo genético cuantitativo, puede sufrir variaciones en las poblaciones donde ocurre mezcla de diferente ancestría, dado que las poblaciones de distintas procedencias pueden portar diferentes variantes o frecuencias alélicas en genes que influyen en la determinación del color del iris. Actualmente, la información sobre estos genes en poblaciones con ancestría mixta y, particularmente en la población de nuestro país, es escasa.

Debido a que este carácter es determinado genéticamente, su análisis contribuye a la identificación de individuos en el ámbito de la Genética Forense. Existen sistemas de predicción desarrollados y estandarizados a partir de información genética de poblaciones europeas; sin embargo, para usar un sistema de predicción, éste debe estar validado en la población a analizar.

Este trabajo trata el análisis de la determinación genética del color de los ojos en la población argentina, teniendo en cuenta su historia migratoria, para una futura aplicación en pruebas de identificación de personas.

Se analizaron fotografías digitales y muestras de ADN de individuos donantes voluntarios de la población bonaerense. La información genética estudiada comprendió marcadores determinantes del color del iris, como también marcadores de ancestría.

En la población estudiada los sistemas de predicción actualmente disponibles no resultaron totalmente satisfactorios dado que, en particular, los colores intermedios (verdes) fueron los más difíciles de predecir, y a su vez los más frecuentes en nuestra población.

Esto en parte podría explicarse por la ancestría mixta, ya que se determinó una relación entre la ancestría y el color, y entre la ancestría y las predicciones erróneas de uno de los sistemas. Posiblemente, el aporte nativo, poco estudiado actualmente respecto al color del iris, estaría influenciando estos resultados.

ÍNDICE

Agradecimientos	3
Resumen.....	5
Glosario.....	10
CAPÍTULO 1: Introducción	13
1.1 INTRODUCCIÓN	14
1.1.1 Color del iris.....	14
1.1.1.1 Anatomía e histología del iris.....	14
1.1.1.2 Superficie del iris.....	16
1.1.1.3 Melanina	16
1.1.1.4 Percepción del color del iris	20
1.1.1.5 Cambio del color con la edad, patologías y fármacos	20
1.1.1.6 Sexo y color de iris	21
1.1.2 Genética del color del iris.....	21
1.1.2.1 Predicción genética del color del iris.....	22
1.1.2.2 Genes y marcadores analizados	25
<i>HERC2 (HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2)</i>	25
<i>OCA2 (oculocutaneous albinism 2)</i>	26
<i>IRF4 (interferon regulatory factor 4)</i>	27
<i>LOC105370627: gen upstream del gen SLC24A4 (solute carrier family 24 - sodium/potassium/calcium exchanger-, member 4)</i>	27
<i>SLC45A2 (solute carrier family 45, member 2)</i>	28
<i>TYR (tirosinase)</i>	28
1.1.3 Aspectos poblacionales	29
1.1.4 Aplicación Forense.....	31
1.1.5 Clasificación y cuantificación del color	32
1.1.6 Población argentina	34
1.1.6.1 Población bonaerense	34
1.2 HIPÓTESIS.....	35
1.3 OBJETIVOS	36
Objetivo general.....	36
Objetivos específicos	36
CAPÍTULO 2: Materiales y métodos	37
2.1 Muestras.....	38

2.2 Fotografías de iris	38
2.2.1 Clasificación en grupos de color	38
2.2.2 Cuantificación del color	39
2.3 Extracción de ADN.....	40
2.4 Genotipificación.....	40
2.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	40
2.4.2 Secuenciación.....	41
2.4.3 PCR alelo-específica	46
2.4.4 <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP).....	46
2.4.5 Electroforesis en geles de agarosa.....	46
2.4.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	46
2.5 Marcadores.....	47
2.5.1 Relacionados al color del iris	47
2.5.2 Relacionados a la ancestría o AIMs	51
2.6 Análisis estadístico.....	56
2.6.1 Grupos de color	56
2.6.1.1 Asociación entre color de iris y sexo.....	56
2.6.1.2 Comparación entre cuantificación y grupos de color	56
2.6.2 Marcadores relacionados al color del iris.....	56
2.6.2.1 Variabilidad poblacional.....	56
2.6.2.1.1 Frecuencias alélicas	56
2.6.2.1.2 Frecuencias genotípicas	56
2.6.2.1.3 Equilibrio de Hardy-Weinberg	57
2.6.2.1.4 Asociación entre color de iris y SNPs	57
2.6.2.1.5 Asociación entre la cuantificación del color y SNPs.....	57
2.6.2.1.6 Desequilibrio de ligamiento.....	57
2.6.2.1.7 Haplotipos.....	58
2.6.2.1.8 Asociación entre color de iris y haplotipos	58
2.6.2.1.9 Comparación con otras poblaciones según los SNPs de color	58
2.6.2.3 AIMs.....	58
2.6.2.3.1 Variabilidad poblacional.....	58
2.6.2.3.2 Estructura poblacional	59
2.6.2.3.2.1 Estimación de ancestría y composición poblacional	60
2.6.2.3.2.1.1 Comparación de los grupos de color según la ancestría	60
2.6.2.3.2.1.2 Asociación entre color de iris y ancestría	60

2.6.3.2.2 Subestructura y estratificación.....	60
2.6.3.2.3 Análisis de la varianza molecular (AMOVA).....	60
2.6.3.2.4 <i>Fst</i>	60
2.6.4 Análisis general: color de iris, SNPs, ancestría y sexo	61
2.7 Predicción del color de iris	61
2.7.1 IrisPlex	61
2.7.2 Snipper	61
2.7.3 Evaluación de los métodos de predicción de color	61
2.7.4 Asociación entre predicción y ancestría.....	62
CAPÍTULO 3: Resultados	63
3.1 Color	64
3.1.1 Clasificación en grupos de color	64
3.1.2 Asociación entre color de iris y sexo	65
3.1.3 Cuantificación del color	65
3.1.4 Comparación entre cuantificación y grupos de color.....	67
3.2 SNPs relacionados al color de iris	69
3.2.1 Frecuencias alélicas, genotípicas y equilibrio de Hardy-Weinberg	69
3.2.2 Asociación entre el color del iris y SNPs.....	81
3.2.3 Asociación entre la cuantificación del color y SNPs	103
3.2.4 Desequilibrio de ligamiento y haplotipos.....	103
3.2.5 Asociación entre color de iris y haplotipos	105
3.2.6 Comparación con otras poblaciones según los SNPs de color.....	107
3.3 AIMs	108
3.3.1 Variabilidad poblacional	108
3.3.1.1 Frecuencias alélicas, genotípicas y equilibrio de Hardy-Weinberg	108
3.3.2 Estructura poblacional.....	114
3.3.2.1 Ancestría estimada.....	114
3.3.2.1.1 Comparación de los grupos de color según la ancestría.....	118
3.3.2.1.2 Asociación entre color de iris y ancestría	120
3.3.2.2 Subestructura y estratificación.....	121
3.3.2.3 Análisis de la varianza molecular (AMOVA).....	121
3.3.2.4 <i>Fst</i>	122
3.4 Análisis general: color de iris, SNPs, ancestría y sexo	122
3.5 Evaluación de los métodos de predicción de color.....	128
3.5.1 Asociación entre predicción y ancestría.....	134

CAPÍTULO 4: Discusión.....	135
CAPÍTULO 5: Conclusiones	143
Bibliografía	145
Anexo	163
Ética	164
Tablas.....	167
Reactivos.....	180

GLOSARIO

1KG	1000 <i>Genomes</i>
A	Azul
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIM	Marcadores informativos de ancestría (<i>Ancestry Informative Markers</i>)
ALFRED	<i>Allele Frequency Database</i>
AMBA	Área metropolitana de Buenos Aires
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AMOVA	Análisis de la varianza molecular
ANOVA	Análisis de la varianza (<i>Analysis of variance</i>)
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AUC	Área bajo la curva (<i>Area under the curve</i>)
CANDELA	Consortio para el Análisis de la Diversidad y Evolución de Latinoamérica
CIE	<i>Commission International d'Eclairage</i>
CR2	Formato de imagen crudo de Canon (Canon RAW 2)
d.s.	Desvío estándar
DL	Desequilibrio de ligamiento
DPP	<i>Digital Photo Professional</i>
E	Especificidad
EHW	Equilibrio de Hardy-Weinberg
EVC	Característica externa visible (<i>Externally visible characteristic</i>)
FDP	Fenotipado forense basado en ADN (<i>Forensic DNA Phenotyping</i>)
GLM	Modelo lineal generalizado (<i>Generalized linear model</i>)
GWAS	Estudio de asociación del genoma completo (<i>Genome-wide association study</i>)
HGDP	Proyecto de Diversidad del Genoma Humano (<i>Human Genome Diversity Project</i>)
I	Intermedio
IC	Intervalo de confianza
ICC	Coefficiente de correlación intraclase (<i>Intraclass correlation coefficient</i>)
INDEC	Instituto Nacional de Estadísticas y Censos
IPE	Epitelio pigmentario del iris (Iris pigment epithelium)

M	Marrón
NPV	Valor predictivo negativo (<i>Negative predictive value</i>)
OR	Razón de probabilidades (<i>Odds ratio</i>)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PPV	Valor predictivo positivo (<i>Positive predictive value</i>)
QT	Carácter cuantitativo (<i>Quantitative trait</i>)
QTL	Loci de carácter cuantitativo (<i>Quantitative trait loci</i>)
RAW	Crudo (formato de imagen)
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RLM	Regresión logística multinomial
ROC	Característica operativa del receptor (<i>Receiver operating characteristic</i>)
RRR	Razón de riesgo relativo (<i>relative risk ratio</i>)
S	Sensibilidad
SNP	Polimorfismo de nucleótido único (<i>Single nucleotide polymorphisms</i>)
STR	Repetición corta en tándem (<i>Short tandem repeat</i>)
TIFF	Formato de archivo de imágenes con etiquetas (<i>Tagged Image File Format</i>)
ΔE	Delta E

CAPÍTULO 1

Introducción



1.1 INTRODUCCIÓN

El color de los ojos es un carácter fenotípico conspicuo de los seres humanos y su variación es una de las manifestaciones más relevantes del aspecto físico entre los individuos, siendo por ello importante en la descripción de las personas. La gran influencia genética en la determinación de este carácter explica su utilidad para la identificación de personas en el campo de la Genética Forense. Por otro lado, las poblaciones de distintas procedencias pueden portar diferentes variantes o frecuencias alélicas en genes que influyen en la determinación del color del iris. Teniendo en cuenta la historia migratoria de la población argentina y que los estudios de la genética del color del iris se han realizado principalmente en poblaciones europeas, este trabajo se enfoca en el análisis de la genética del color de los ojos en nuestra población, para su futura aplicación en la identificación de personas.

1.1.1 Color del iris

1.1.1.1 Anatomía e histología del iris

El iris es una estructura con forma de disco incluida en la parte anterior del ojo. Se ubica en el plano frontal, por delante del cristalino, donde separa las cámaras posterior y anterior (figura 1.1).

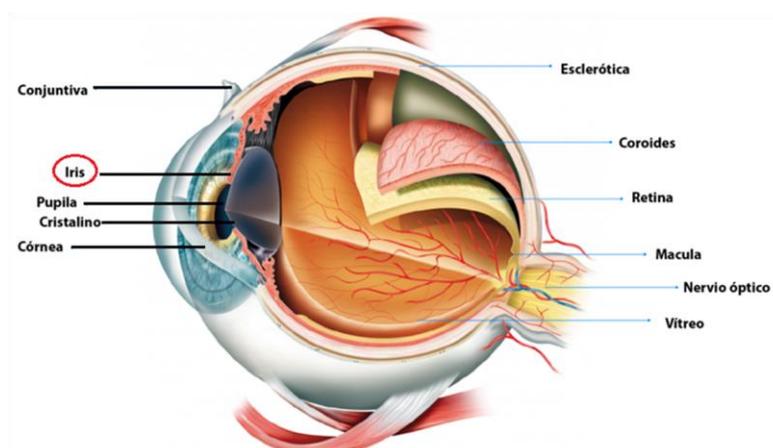


Figura 1.1. Anatomía del ojo humano. Imagen tomada de www.brillpharma.com

El iris actúa como diafragma del ojo, variando el diámetro de la pupila debido a la contracción de los músculos del esfínter de la pupila y el dilatador de la pupila. La superficie anterior del iris está dividida en dos zonas por una línea circular irregular y zigzagueante (el collar o collarote del iris, producto de la reabsorción de la membrana pupilar que ocurre durante el desarrollo -Oyster, 1999-) (figura 1.2) que se localiza a unos 1,5 mm del margen pupilar, separando la zona pupilar (interna) de la zona ciliar (externa) (Geneser, 2000).

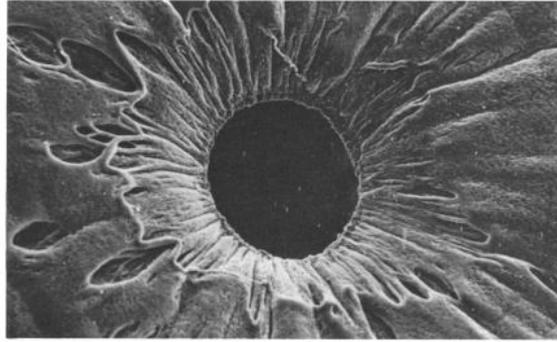


Figura 1.2. Detalle de parte de la superficie del iris, denotando el collarate. Imagen tomada de Eagle, 1988.

Desde el punto de vista histológico, el iris está incluido en las tunicas vascular o úvea (que alberga al estroma del iris) e interna (en lo que refiere al epitelio). El iris se compone de las siguientes capas (figura 1.3):

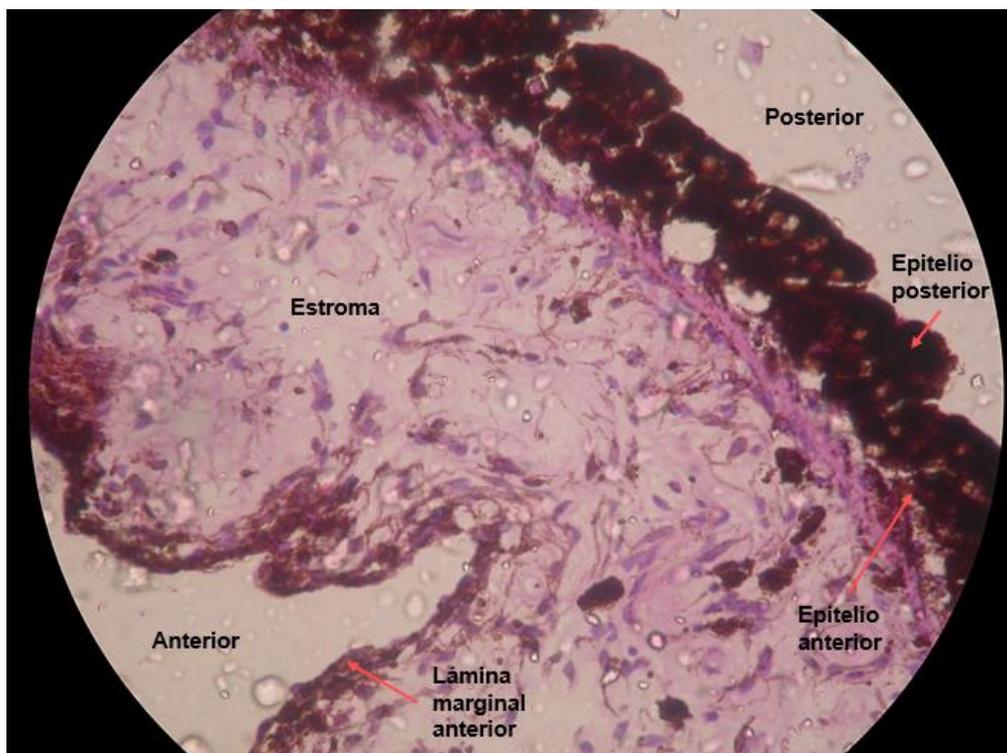


Figura 1.3. Histología del iris. Cátedra de Anatomía e Histología, FCEX, UNLP.

-Lámina marginal anterior: Esta capa cubre la superficie anterior del iris, desde el margen pupilar (interno) hasta su raíz (margen externo). Se compone de una capa continua de fibroblastos y una capa de pequeños melanocitos ovoides paralelos a la superficie del iris, ambos tipos de células con un entramado de prolongaciones ramificadas que comunican hacia el estroma del iris (Geneser, 2000; Remington, 2012; Prota *et al.*, 1998).

-Estroma del iris: se compone de tejido conectivo laxo que contiene dos tipos de células pigmentadas, además de fibroblastos, linfocitos, mastocitos y macrófagos. Las células pigmentadas son unas pocas *clump cells* (macrófagos con pigmento fagocitado) en la porción

pupilar del estroma, y melanocitos en la parte anterior, subyacentes a la capa de fibroblastos, formando la lámina marginal anterior (Remington, 2012; Sturm y Frudakis, 2004; Prota *et al.*, 1998).

Epitelio pigmentario del iris (IPE, por sus siglas en inglés): es posterior al estroma. Está compuesto por dos capas (Prota *et al.*, 1998) o una sola capa plegada sobre sí misma, con la cara apical de sus células enfrentadas y unidas por desmosomas (Remington, 2012). Ambas poseen melanosomas alargados con abundante melanina (principalmente eumelanina), y se postula que la función de estas capas es la absorción de la luz para proteger la retina (Prota *et al.*, 1998; Wilkerson *et al.*, 1996):

-Epitelio pigmentario anterior: está formado por un epitelio simple de células cúbicas a cilíndricas, muy polarizadas. Contienen gran cantidad de gránulos de pigmento (melanosomas) (Geneser 2000).

-Epitelio pigmentario posterior: se compone de una única capa de células cilíndricas, cuyo citoplasma está ocupado casi en su totalidad por gránulos de melanina. En la parte periférica del iris se observa una disminución gradual del contenido de gránulos de pigmento, hasta desaparecer por completo y continuar en el epitelio ciliar no pigmentado. Hacia el centro del iris, el pliegue por el cual se continúan las dos capas del IPE conforma el margen pupilar (Geneser, 2000; Remington, 2012).

1.1.1.2 Superficie del iris

Además de su color, las texturas y otras características de la superficie del iris son consideradas en la caracterización de los mismos (Melgosa *et al.*, 2000). En los iris color marrón, altamente pigmentados, la superficie anterior tiene apariencia suave y aterciopelada, mientras que en los iris claros (azul y verde) las trabéculas de colágeno son más evidentes (Remington, 2012).

Además, hay muchos elementos texturales que pueden encontrarse en el ojo humano, como son las criptas de Fuchs, los nódulos de Wolfflin, puntos de Brushfield, puntos de pigmentación (pecas o nevi), surcos de contracción, entre otros (Purtscher, 1965; Eagle, 1998; Larsson y Pedersen, 2004; Edwards *et al.* 2016b).

1.1.1.3 Melanina

El color del iris depende de la presencia de melanina, la molécula responsable de la pigmentación. Posee un amplio espectro de absorción y un alto índice refractivo óptico, lo que le proporciona diversas propiedades biológicas como la absorción y la dispersión de la luz (Remington, 2012; D'Alba y Shawkey, 2019). La melanina es un biopolímero inerte producido por los melanocitos, y que queda retenido en el iris dentro de los melanosomas de dichas células (Sturm y Frudakis, 2004).

La melanina presenta dos variantes que comparten las primeras reacciones de su biosíntesis: eumelanina, un pigmento marrón a negro que está empaquetado en eumelanosomas ovoides y estriados, y feomelanina, un pigmento amarillo a rojo producido en feomelanosomas granulares inmaduros (Sturm y Frudakis, 2004. Figura 1.4).

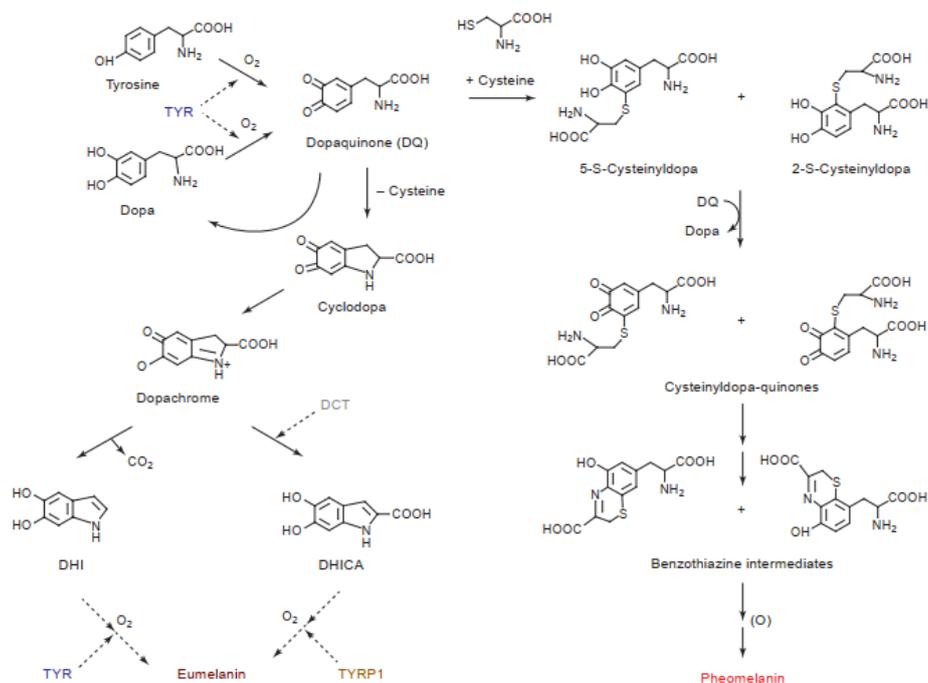


Figura 1.4. Biosíntesis de melanina. Imagen tomada de Sturm y Frudakis, 2014.

La enzima limitante de la velocidad en la síntesis de melanina es la tirosinasa (TYR), que actúa en el primer paso de la melanogénesis. Dicha enzima requiere estrictamente de un pH neutro para su actividad, el cual se mantiene por una combinación de distintos transportadores iónicos ubicados en la membrana de los melanosomas (Wiriyaerkmul *et al.*, 2020).

La actividad de TYR es controlada a nivel de la expresión de ARNm o de la función de la proteína. La expresión es regulada por medio de la vía de señalización de la adenosina monofosfato cíclica (AMPc) (Wiriyaerkmul *et al.*, 2020).

Según la disponibilidad de L-cisteína y la función de las enzimas que actúan en los pasos posteriores, se producen distintos tipos de melanina. La producción de feomelanina se ve favorecida por sobre la producción de eumelanina siempre que la concentración de cisteína sea mayor a 1 M (Ito, 2003; Ito y Wakamatsu, 2006). Cabe destacar que en un mismo melanocito puede ocurrir melanogénesis mixta debido al agotamiento de la cisteína.

Los melanosomas (o eumelanosomas) son organelas relacionadas con los lisosomas. Su biogénesis, desarrollo y maduración consta de 4 etapas (figura 1.5): Los premelanosomas (etapas I y II) no tienen melanina pero sí forman fibrillas amiloides compuestas por la proteína PMEL (Raposo y Marks, 2007; Watt *et al.*, 2013). En la fase III, ciertas enzimas (TYR, TYRP1 y TYRP2) y transportadores iónicos (ATP7A, OCA2, SLC45A2 y TPC2) son llevados desde el trans-Golgi hacia los melanosomas para comenzar la melanogénesis (Bellono y Oancea, 2014; Raposo *et al.*, 2001). La melanina sintetizada se deposita sobre la matriz formada por las fibrillas (Raposo y Marks, 2007; Watt *et al.*, 2013).

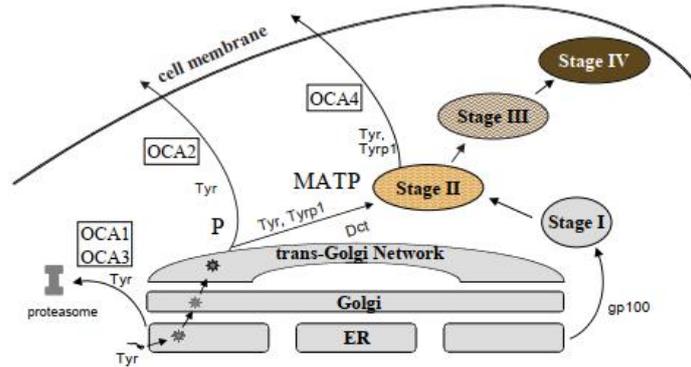


Figura 1.5. Síntesis de melanina en el melanosoma. Imagen tomada de Costin *et al.*, 2003

El mecanismo de regulación del pH dentro del melanosoma no es muy claro, pero la función de las proteínas transportadoras es cambiar el pH ácido de los premelanosomas a un pH neutro en las fases III–IV de los melanosomas. Para modular el pH, OCA2, SLC45A2 y TPC2 trabajarían en conjunto (figura 1.6), siendo claves para el pasaje de los melanosomas de la fase II a la III. En esta última, un pH neutro promueve el comienzo de la función de TYR. Adicionalmente, el pH parece ser crítico en el tráfico de TYR y TYRPs (Wiriyasermkul *et al.*, 2020).

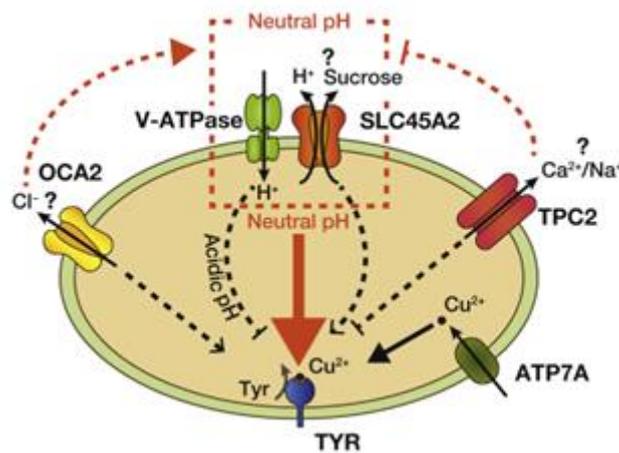


Figura 1.6. Transporte iónico en el melanosoma. Imagen tomada de Wiriyasermkul *et al.*, 2020.

Como la homeostasis iónica es crucial para la melanogénesis, los defectos o variantes en los transportadores (además de otras variantes en las enzimas) causan diversos fenotipos pigmentarios, encontrándose tanto variantes patogénicas como no patogénicas (Sturm y Frudakis, 2004).

Distintos autores proponen un proceso de melanogénesis mixta, en el cual se produce una cantidad baja pero constante de feomelanina en un primer paso, y luego progresivamente se sintetiza eumelanina, que se deposita sobre la feomelanina preformada, según la actividad de la tirosinasa (Bush *et al.*, 2006; Ito y Wakamatsu, 2006). Así, se sugiere que este *core* de feomelanina está visible en ojos claros pero enmascarado por eumelanina en ojos oscuros (Wakamatsu *et al.* 2009).

Hay tres tipos de células que poseen melanina en el iris: las células epiteliales, los melanocitos y las *clump cells* del estroma; estas últimas están pigmentadas debido a la fagocitosis, a diferencia de las dos primeras que sintetizan el pigmento (Anderson *et al.*, 2008). Las células epiteliales son las que forman el IPE y se encuentran siempre muy pigmentadas, principalmente con eumelanina (Prota *et al.*, 1998; Sturm y Larsson, 2009), excepto en el caso de individuos con albinismo (Sturm y Frudakis 2004). Por ello, las dos capas responsables de la mayoría de la variación de color entre individuos son la lámina marginal anterior y el estroma. En ellas el número de melanocitos parece no variar entre los distintos colores de ojos (Eagle, 1988; Prota *et al.*, 1998).

Los factores que aportan a la variabilidad del color del iris son:

- el número de melanosomas en la lámina marginal anterior y el estroma del iris, y el tipo de melanina presente en ellos (Eagle, 1988; Imesch *et al.*, 1997; Prota *et al.*, 1998; Remington, 2012).
- el tamaño de los melanosomas (los iris más pigmentados presentan un diámetro mayor de los melanosomas) (Eagle, 1988; Remington, 2012), y el grosor de la capa de eumelanina sobre el *core* de feomelanina (Peles *et al.*, 2009).
- la cantidad relativa y absoluta de cada tipo de melanina: a más eumelanina respecto a la feomelanina, mayor pigmentación (Prota *et al.*, 1998; Sturm y Frudakis, 2004; entre otros).
- las propiedades de absorción y dispersión de la luz dadas por componentes extracelulares en el estroma (Eagle, 1988; Imesch *et al.*, 1997; Prota *et al.*, 1998; Remington, 2012).
- la diferencia de grosor entre las zonas ciliar y pupilar (Edwards 2016a). No parece haber diferencias en la cantidad de melanosomas entre ambas zonas en iris que presentan heterocromía central (Eagle 1988, Imesch *et al.*, 1997).

Además, los diferentes tonos dentro de un mismo color son el resultado de diversas combinaciones de estos factores (Sturm y Frudakis, 2004).

Los iris marrones muestran alta cantidad de eumelanina y de feomelanina, los verdes poseen más feomelanina que eumelanina (se verían de este color por una combinación del azul con el amarillo -Holmes y Loomis, 1909-), y los azules presentan baja cantidad de ambos. Además, en los iris azules se observan pocos melanosomas (figuras 1.7 y 1.8) y no totalmente maduros, mientras que en los marrones hay más y éstos son de grado III-IV (Eagle, 1988; Prota *et al.*, 1998). En los iris azules el color se debe al efecto Tyndall: la lámina marginal anterior y el estroma son prácticamente transparentes; la luz blanca atraviesa los mismos, llegando al IPE donde las longitudes de onda larga son absorbidas por la melanina, y las de onda corta son retrodispersadas; es decir, son reflejadas hacia el exterior donde se puede observar el color azul, siendo antes dispersadas por los componentes del tejido conectivo del estroma (Eagle, 1988; Imesch *et al.* 1997). Por ende, el iris azul se corresponde con un color estructural, y no es resultado de la composición química (Sturm y Frudakis, 2004; Wielgus y Sarna, 2005).

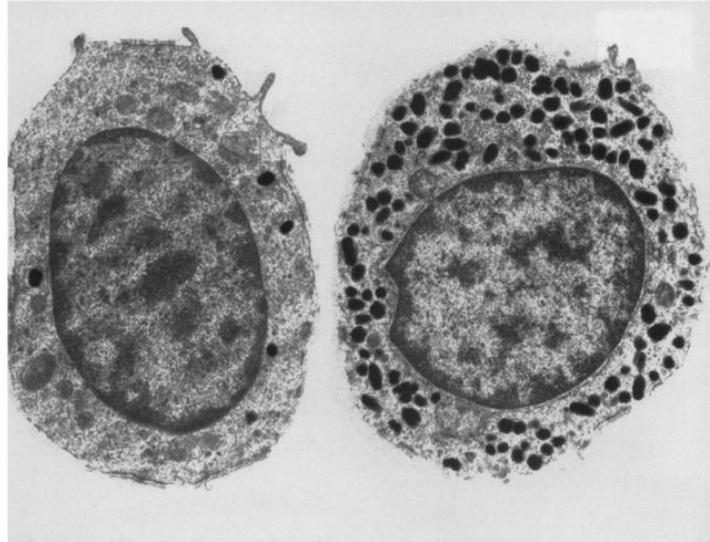


Figura 1.7. Microscopía electrónica (x4000) de melanocitos estromales superficiales de iris (izquierda: azul, derecha: marrón). Se denotan los melanosomas. Imagen tomada de Imesch *et al.*, 1997.

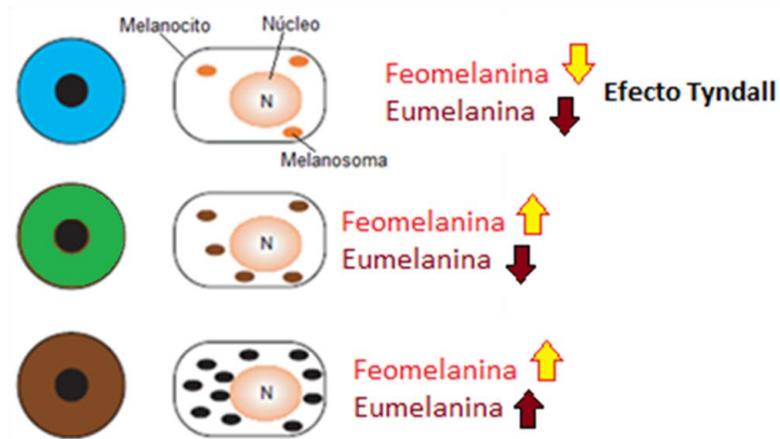


Figura 1.8. Relación entre el color de iris y la cantidad de melanosomas y melanina.

1.1.1.4 Percepción del color del iris

El color es una combinación de matiz/tono, saturación y brillo. En el caso del color de los ojos, su percepción está influenciada por el color de la piel y el cabello de la persona (pestañas y cejas), su color conjuntival y un limbo delineado. La córnea puede influir en la apariencia del color del iris, como también las criptas, surcos y collarete del iris, la iluminación externa y la dirección de la misma. La dilatación de la pupila influye en la percepción del color del iris, particularmente en los casos donde hay más pigmentación peripupilar (Larsson y Pedersen, 2004; Mackey *et al.*, 2011).

1.1.1.5 Cambio del color con la edad, patologías y fármacos

El color del iris no es constante durante toda la vida de los individuos. Algunos niños de ancestría europea nacen con ojos azules y luego su pigmentación aumenta durante los primeros años de su vida hasta los 6 años o más, cuando obtienen un color estable debido a que los

melanocitos adquieren una determinada cantidad de melanina genéticamente definida (Bito *et al.*, 1997). Se cree que esto puede deberse a que los melanocitos deben migrar desde la cresta neural o diferenciarse (Rennie, 2012).

A su vez, algunos estudios epidemiológicos sugieren que el iris humano se vuelve más claro con la edad, lo que podría ser el resultado de un cambio en la morfología de los melanosomas (Sun *et al.*, 2014; Imesch *et al.*, 1997).

La heterocromía *iridium* se refiere a una pigmentación distinta entre ambos iris de una persona, y puede ser congénita (Redei, 2008) o adquirida por patologías, lesiones (trauma, siderosis debido a cuerpos extraños metálicos) o cirugías (Armada Maresca *et al.*, 1996; Mackey *et al.*, 2011). La heterocromía *iridis* se refiere a zonas del mismo iris con diferente color, la cual puede ser uni o bilateral (Rennie, 2012).

Por otro lado, ciertas patologías y síndromes (albinismo, síndromes de Horner, de Waardenburg, de Prader-Willi y de Angelman, entre otros) pueden presentar alteraciones en el color del iris, así como algunos fármacos (Imesch *et al.*, 1997; Duffy *et al.* 2007; Rennie, 2012; Wiriyasermkul *et al.*, 2020).

1.1.1.6 Sexo y color de iris

En ciertos trabajos se ha encontrado que el sexo podría ser un factor que contribuye a la variación del color del iris, encontrándose iris más oscuros entre las mujeres (mayor prevalencia de colores marrón y verde) y más claros en los hombres (principalmente azul) (Martínez-Cadenas *et al.*, 2013). Otros autores aseguran que dichos resultados son dependientes de la población de la cual proviene la muestra y el N de la misma (Pietroni *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014). Sin embargo, podría existir un aporte, todavía desconocido, de genes del cromosoma X (Liu *et al.*, 2014) o alguna respuesta hormonal que explique estas diferencias, tal vez por influencia en la expresión de los genes de pigmentación por el efecto hormonal (Martínez-Cadenas *et al.*, 2014). El trabajo de Pietroni *et al.* (2014), sugiere que la diferencia sería pequeña y no detectable por el ojo humano. Sin embargo, en el trabajo de Pospiech *et al.* (2016) se vieron diferencias significativas entre hombres y mujeres provenientes de Polonia, con mayor prevalencia de azul en los primeros y verde en las segundas. Así, se determinó que la importancia del sexo en la predicción del color del iris depende de la población en estudio.

1.1.2 Genética del color del iris

El color del iris es un carácter complejo, poligénico y cuantitativo (Sturm y Frudakis, 2004; Liu *et al.*, 2010; White y Rabago-Smith, 2011), con una heredabilidad del 98% (Bito *et al.*, 1997; Posthuma *et al.*, 2006). El rango de colores varía desde el azul hasta el marrón oscuro, y su forma de herencia es compleja, a pesar de que en algunos casos aparente comportarse como un carácter con herencia mendeliana simple (Davenport y Davenport, 1907; Sturm y Frudakis, 2004). Esta visión tradicional es correcta en el sentido de que un alelo que codifica el color marrón es dominante sobre el azul y el verde, y el verde es dominante sobre el azul. Sin embargo, el fenotipo demuestra epistasis y dominancia incompleta. Aunque hay alrededor de 16 genes responsables, el color de los ojos es mayormente atribuido a 2 genes adyacentes ubicados en el cromosoma 15: *HERC2* y *OCA2*. Respecto a este último, a mayor actividad de

la proteína que codifica, más melanina se produce. Se ha sugerido que una zona del *HERC2* actúa como amplificador (*enhancer*) de *OCA2*, y por ello es importante si el alelo de la variante más importante del primero se encuentra en cis (en el mismo cromosoma) o en trans (en el cromosoma homólogo) respecto del segundo (Eiberg, 2008; Pietroni *et al.*, 2014).

En los últimos años, varios grupos de trabajo han logrado identificar otros genes que también juegan un rol en la determinación de este fenotipo. A partir de su estudio en poblaciones europeas se han identificado determinados polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, del inglés *Single Nucleotide Polymorphisms*) que permiten marcar con escaso error la variación en la pigmentación del iris de las poblaciones estudiadas (Eiberg, 2008; Liu *et al.*, 2010).

Las características físicas como la pigmentación, incluyendo el color del iris, están mejor definidas como de carácter cuantitativo o QT (Quantitative Trait), ya que pueden variar en grados continuos y ser atribuidas a efectos poligénicos (producto de dos o más genes) y a su interacción con el medio ambiente. Los loci que contienen a los genes responsables de esta variación continua se denominan QTL (Quantitative Trait Loci) (Strachan y Read, 1996). Sin embargo, en algunos estudios por convención se suelen asignar clases fenotípicas discretas a características que son de tipo cuantitativas, para así poder dirigir el análisis estadístico correspondiente (Sturm y Frudakis, 2004; Sturm y Larsson, 2009).

Una de las primeras publicaciones sobre herencia de color del iris data del año 1907 (Davenport y Davenport, 1907), pero en cuanto a la base genética de esta característica los primeros trabajos fueron publicados hace poco más de 30 años (Eiberg y Mohr, 1987). En el año 2004, Zhu *et al.* presentaron evidencia sobre la ubicación del QTL más importante en el cromosoma 15, estimando que el 74% de la variabilidad de este fenotipo se debe a este QTL. A su vez, concluyeron que la mayor parte de la variación en europeos se debe a los polimorfismos en el gen *OCA2*.

Cabe destacar que cualquier rasgo cuantitativo que esté codificado genéticamente y bien diferenciado entre grupos poblacionales, podría sufrir alteraciones en aquellas poblaciones geográficas donde ocurra mezcla (Jobling *et al.*, 2004).

1.1.2.1 Predicción genética del color del iris

En el año 2007 se publicaron los primeros trabajos sobre predicción del color del iris (Frudakis *et al.*, 2007; Sulem *et al.*, 2007) y en 2008, tres estudios paralelos llegaron a la conclusión de que *HERC2* es el gen más importante en la determinación de este fenotipo (Sturm *et al.*, 2008; Eiberg *et al.*, 2008; Kayser *et al.*, 2008). Los primeros dos definieron al SNP rs12913832 como el predictor más importante, detectando al SNP rs1129038 en desequilibrio de ligamiento con el mismo (Eiber *et al.*, 2008; Mengel-From *et al.*, 2010).

Otro trabajo importante se publicó en el año 2009 (Liu *et al.*, 2009), donde se desarrolló un modelo de predicción del color del iris con 24 SNPs de 8 genes en población holandesa. En este mismo trabajo se propuso un set de 6 SNPs para predecir el color: *HERC2* rs12913832, *OCA2* rs1800407, *SLC24A4* rs12896399, *SLC45A2* rs16891982, *TYR* rs1393350 e *IRF4* rs12203592, en orden de importancia. Sin embargo, realizar los estudios sólo sobre población europea no garantiza que los resultados puedan aplicarse en todas las poblaciones. El primer sistema validado de predicción del color del iris, basado en el trabajo de Liu *et al.*, es el IrisPlex (Walsh *et al.*, 2011a, 2013), que fue desarrollado a partir de información genética de individuos

provenientes de Europa (holandeses) y se basa en una regresión logística multinomial (RLM) para categorizar la muestra en 3 posibles colores (azul, intermedio -verde- o marrón). Los resultados indican que es útil en poblaciones no europeas para la predicción del color de iris azul o marrón, aún en ausencia de información de la ancestría biogeográfica, pero se requiere más investigación al respecto (Walsh *et al.*, 2011b). Luego, fue probado en 3840 europeos de 7 países: Noruega, Estonia, Reino Unido, Francia, Italia, Grecia y España, para lo cual se desarrolló un nuevo modelo de RLM (Walsh *et al.*, 2012).

Los SNPs incluidos en este múltiplex se incluyeron en el Identitas V1 Forensic Chip (Keating *et al.*, 2013). Actualmente se ha desarrollado un multiplex (HirisPlex-S) para predecir el color del iris, cabello y piel a partir de 41 SNPs y 3 modelos estadísticos de predicción, uno para cada carácter (Walsh *et al.*, 2013, 2017; Chaitanya *et al.*, 2018). Este sistema fue probado en población de Brasil (Marano *et al.* 2019) obteniendo buenos resultados, aunque respecto al color de iris, se concluyó que presenta dificultades para predecir el color de iris intermedio.

El trabajo de Liu *et al.* del año 2010, utilizando cuantificación del color a partir de imágenes digitales, demostró una asociación más significativa que la categorización en grupos de los SNPs de genes ya conocidos como determinantes del color, además de encontrar 3 nuevos loci asociados.

En el año 2013, Ruiz *et al.* desarrollaron un método basado en máxima verosimilitud (Bayesiano ingenuo) para la predicción del color: Snipper, con información genética de 476 individuos provenientes de 6 poblaciones europeas: Galicia (España), Baja Sajonia (Alemania), Dalarna (Suecia), Innsbruck (Austria), Copenhague (Dinamarca) y Zurich (Suiza). En el mismo, se pueden utilizar genotipos incompletos, lo cual no era permitido en el IrisPlex (hasta el desarrollo del Hirisplex-S). Se tipificaron 37 SNPs y se detectó que el SNP rs1129038 de *HERC2* aumentaba la capacidad de predicción al utilizarse en conjunto con el rs12913832. A su vez, se detectaron los SNPs rs1667394, rs7183877 (este último en particular mejora la predicción de colores intermedios), rs916977 (de *HERC2*) y rs4778138 de *OCA2*, que contribuyen a la predicción de colores intermedios. El uso de Snipper permite utilizar hasta 23 SNPs para la predicción. Al usar 13 SNPs (los 6 presentes en el IrisPlex más rs1129038, rs11636232, rs7183877 y rs1667394 del *HERC2*, y rs4778241, rs4778232 y rs8024968 de *OCA2*), la precisión del método de predicción (medida como el valor de Área Bajo la Curva - AUC-) aumentó para todos los colores; en particular para los intermedios, aumentó de 0,756 a 0,816. Esto indica que el Snipper sería mejor para la predicción de colores intermedios, basados en la población europea.

Tanto los resultados dados por el Snipper como el IrisPlex permiten al usuario decidir sobre el valor umbral que mejor se ajuste a las características de su muestra (Salvoro *et al.*, 2019).

Aparecen ideas contrapuestas, por un lado a favor del aumento del número de SNPs para mejorar las predicciones (por ejemplo, Ruiz *et al.*, 2013) y por el otro una estrategia conservadora, de centrarse en un menor número de SNPs (Pietroni *et al.*, 2014), refiriéndose al ya conocido efecto del rs12913832 de *HERC2*, que es muy fuerte. Incluso llegó a proponerse definir el fenotipo azul en presencia del genotipo GG, marrón para AA, y no concluyente para AG; sin embargo, esto resulta demasiado simplista para la ya conocida complejidad de la determinación del color del iris (White y Rabago-Smith, 2011).

En el año 2019, Salvoro *et al.* realizaron un estudio sobre la población italiana (296 individuos) para analizar 4 modelos de predicción de color del iris: IrisPlex (RLM), Ruiz (Bayesiano),

Allwood (árbol de clasificación) y Hart. La mayoría de los resultados incorrectos correspondieron a la categoría de intermedios, a la cual pertenecía un gran número de individuos de la muestra italiana. La mayor ocurrencia de estos colores en italianos puede deberse a un mayor grado de variabilidad genómica en dicha población respecto a las de otras partes de Europa. También se denota que los intermedios presentan mayor ocurrencia en poblaciones con algún grado de mezcla en su ancestría, como en los países de Sudamérica (Freire-Aradas 2014, Salvorio et al 2019).

Respecto a la prueba de estos sistemas de predicción de color en poblaciones de ancestría mixta, un estudio comparó el IrisPlex y el Snipper en una muestra de 99 individuos de Brasil y Venezuela (Freire-Aradas *et al.*, 2014). La predicción de colores intermedios mejoró al agregar el SNP rs1129038 en Snipper. A su vez, a pesar de que Walsh *et al.* aclararon que no es necesario conocer la ancestría de la muestra a analizar, este trabajo concluyó que sí lo es. El estudio de Yun *et al.* (2014) remarca la importancia de relevar información de poblaciones no europeas para mejorar estos modelos de predicción.

También se destaca el trabajo de Beleza *et al.* (2013) en 699 individuos de la población caboverdeana (afroeuropa), donde no es infrecuente encontrar personas con piel oscura y ojos claros. Respecto al color del iris, encontraron la región 15q13.1 (*HERC2/OCA2*) como la de mayor peso en su determinación, seguido por 15q21.1 (*SLC24A5*).

Respecto a los Estados Unidos, Dembinski y Picard (2014) analizaron 200 muestras y las tipificaron para los 6 SNPs del IrisPlex. No se encontró ninguna predicción correcta de colores intermedios, y hubo más resultados inconclusos que lo reportado para europeos, probablemente por presentar mayor cantidad de colores intermedios debido a que se trata de una población mixta.

La dificultad de predicción de intermedios con el IrisPlex fue reportada incluso en la población europea (específicamente de Noruega, Meyer *et al.*, 2021).

Los trabajos de Prestes *et al.* (2011) y Marano *et al.* (2019) obtuvieron resultados similares en cuanto a la mala predicción del HirisPlex-S respecto a los colores intermedios. Por otro lado, Carratto *et al.* (2021) aplicó este sistema en la población de Brasil y obtuvo resultados similares.

Respecto a la predicción del color del iris en América Latina, además de Marano *et al.* (2019), Carratto *et al.* (2021) y otros, también se destaca el trabajo de Palmal *et al.* (2021), realizado en el marco del Consorcio para el Análisis de la Diversidad y Evolución de Latinoamérica (CANDELA), actualmente en México, Colombia, Perú, Chile y Brasil, incluyendo un sistema propio de predicción del color. En este último trabajo, como en otros, se hace hincapié en utilizar con precaución los sistemas de predicción en la población latinoamericana cuando han sido desarrollados en base a otras poblaciones, por la posible insuficiente representatividad de la diversidad de las poblaciones latinas en cuestión.

Claramente, es necesaria más información sobre poblaciones con ancestría mixta para comprender la relación entre ésta y el color del iris, y la predicción del mismo a partir de los SNPs ya estudiados o el desarrollo de nuevos sets (Kayser *et al.*, 2015).

1.1.2.2 Genes y marcadores analizados

Los genes y SNPs más importantes para la determinación del color del iris son:

HERC2 (HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2)

Pertenece a una familia de genes que codifica un grupo de proteínas grandes, con múltiples dominios estructurales. Su función no está directamente ligada a la pigmentación, sino a la ubiquitinación de histonas para reclutar factores de reparación en caso de ADN dañado (Bekker-Jensen *et al.* 2010).

Las variaciones en *HERC2* están asociadas con la variabilidad en la pigmentación de la piel, el iris y el pelo (Visser *et al.*, 2012). La interacción entre los genes *HERC2* y *OCA2* es la principal determinante del color de ojos entre azul y marrón (Eiberg, 2008; Visser *et al.*, 2012). Ubicación: 15q13.1 (figura 1.9).

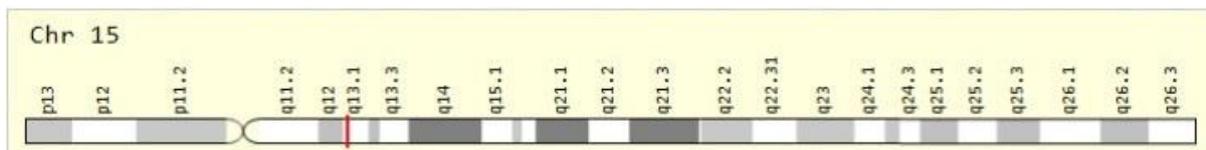


Figura 1.9. Localización del gen *HERC2* en el brazo largo del cromosoma 15 humano (banda 15q13.1). Imagen tomada de la base de datos GeneCards.

-rs12913832, NC_000015.10:g.28120472A>G. Ubicado en el intrón 86 del gen *HERC2*, 21 kpb aguas arriba del promotor del gen *OCA2* (figura 1.11). Esta región actúa como un *enhancer*. En los melanocitos con el alelo A se detecta la unión de los factores de transcripción HLTF (*helicase-like transcription factor*), LEF1 (*lymphoid enhancer-binding factor 1*) y MITF (*microphthalmia associated transcription factor*) al *enhancer*, y se forma un bucle de cromatina de largo alcance entre éste y el promotor de *OCA2*, aumentando su expresión; estos melanocitos están muy pigmentados. Por el contrario, en los que poseen el alelo G, la formación del bucle de cromatina, el reclutamiento de factores de transcripción y la expresión de *OCA2* se ven reducidos, dando lugar a melanocitos menos pigmentados (Visser *et al.*, 2012). Así, el alelo A se asocia con ojos marrones y el alelo G con ojos azules (Eiberg *et al.*, 2008; Sturm *et al.*, 2008; Nan *et al.*, 2009; Mengel-From *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010; Spichenok *et al.*, 2011; Walsh *et al.*, 2011a, 2012; Sturm y Duffy, 2012; Beleza *et al.*, 2013). De esta manera, los individuos con genotipo GG tienen más probabilidades de tener ojos azules, mientras que los AG y AA, marrón (Eiberg *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2019).

-rs1129038, NC_000015.10:g.28111713C>T. Alelo T ausente en el color marrón y alelo C asociado a color no-azul (Eiberg *et al.*, 2008; Mengel-From *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2013; Wollstein *et al.*, 2017).

Se han encontrado completamente asociados a azul a los alelos rs1129038*T y rs12913832*G en conjunto, y ligados (Eiberg *et al.*, 2008).

-rs7183877, NC_000015.10:g.28120587C>A. Se encuentra a 115 pb de rs12913832. Mejora la predicción de colores intermedios (Eiberg *et al.*, 2008; Kayser *et al.* 2008; Eriksson *et al.*, 2010; Larsson *et al.*, 2011; Visser *et al.*, 2012; Ruiz *et al.* 2013).

OCA2 (oculocutaneous albinism 2)

Es un gen de 24 exones, con alrededor de 267 kb (Zhu *et al.*, 2004) que codifica una proteína P transportadora, la cual posee 12 dominios transmembrana y se ubica en la membrana de los melanosomas regulando el pH de los mismos (Mengel-From *et al.*, 2009; Nan *et al.*, 2009; Visser *et al.*, 2012), modificando su desarrollo y maduración (Eiberg *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2013). OCA2 media la conductancia selectiva de Cl⁻, participando en la regulación del pH de los melanosomas y así de la actividad y el tráfico de TYR (Bellono *et al.*, 2014).

El fenotipo patogénico derivado de mutaciones en este gen incluye hipopigmentación de pelo y piel, reducción en la pigmentación del iris y la retina, y defectos oculares. Otros polimorfismos de OCA2 dan lugar a diversas variantes de color de ojos, pelo y piel (Eiberg *et al.*, 2008; Wiriyaerkmul *et al.*, 2020). En el año 2002, Rebbek *et al.*, mediante el estudio de 629 caucásicos (Pensilvania, EEUU), concluyeron que los individuos con las variantes Arg305Trp (rs1800401 C>T), Arg419Gln (rs1800407 G>A) o ambas tenían menos probabilidad de tener ojos azules. De la última variante, se ha llegado a la conclusión contraria en la actualidad (Liu *et al.*, 2009). Ubicación 15q12-q13.1 (figura 1.10).

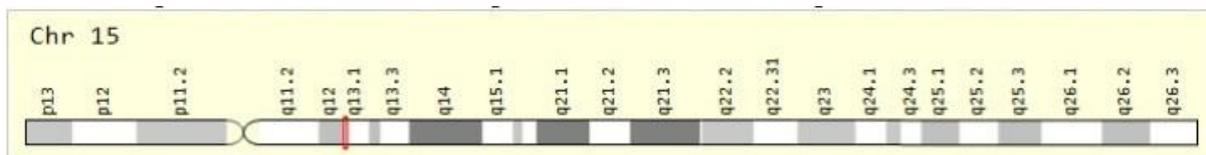


Figura 1.10. Localización del gen *OCA2* en el brazo largo del cromosoma 15 humano (banda 15q12-q13.1).

Imagen tomada de la base de datos GeneCards.

-rs1800407, NC_000015.10:g.27985172G>A, NP_000266.2:p.Arg419Gln. Ubicado en el exón 13. A pesar de la fuerte regulación dada por *HERC2* (el SNP rs1800407 actúa sólo como un modificador de penetrancia del rs12913832 en la determinación del color del iris) se sugiere que este SNP aportaría de forma independiente a este fenotipo (Sturm *et al.*, 2008; Branicki *et al.*, 2008). El alelo G se encontró asociado con mayores probabilidades de presentar ojos de color azul (Rebbek *et al.*, 2002; Branicki *et al.*, 2008). Sin embargo, el trabajo de Liu *et al.* (2010) demuestra que el alelo A se relaciona con el color azul. A pesar de ser el segundo SNP en importancia respecto a la predicción del color (Liu *et al.*, 2009), en la población europea no muestra una fuerte correlación genotipo-fenotipo ya que el alelo A presenta una baja frecuencia (Walsh *et al.*, 2012).

-rs1800410, NC_000015.10:g.27985038A>G. Se reporta en algunos trabajos (Frudakis *et al.*, 2003; Valenzuela *et al.*, 2010).

-rs4778232, NC_000015.10:g.28036619C>T. (Kayser *et al.*, 2008, Eriksson *et al.*, 2010).

Aunque el gen *OCA2* tenga los alelos relacionados a color marrón, si *HERC2* previene su expresión el color de ojos será claro, pudiendo presentar dominancia incompleta (White y Rabago-Smith, 2011).

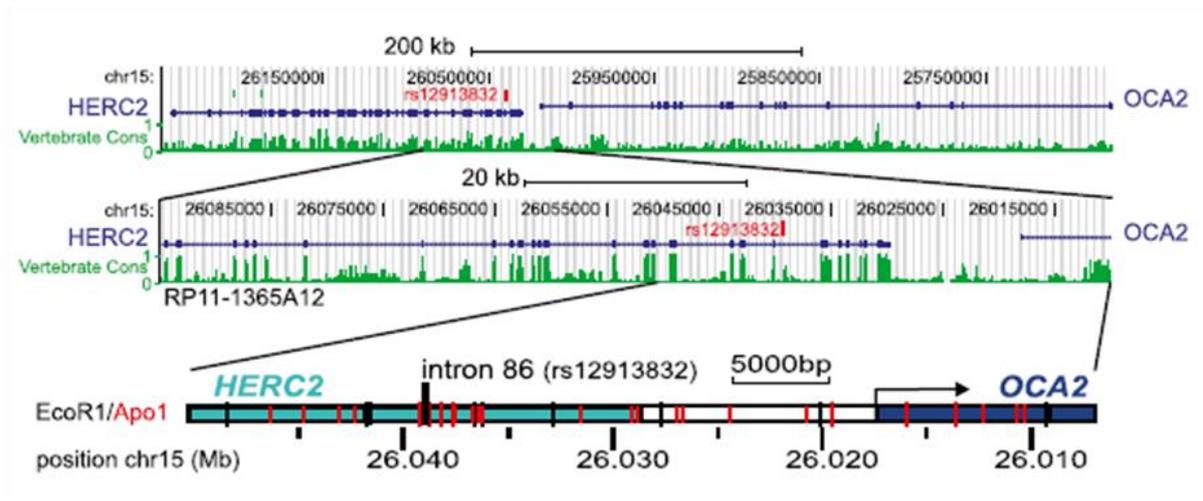


Figura 1.11. Panel superior: Loci *HERC2-OCA2*. Panel inferior: Ubicación del polimorfismo estudiado dentro del intrón 86 de *HERC2* y posición del promotor de *OCA2*. Imagen tomada de Visser *et al.* 2012.

IRF4 (interferon regulatory factor 4)

La proteína codificada por este gen coopera con el factor de transcripción MITF para activar la expresión de la tirosinasa, esencial en la síntesis de la melanina (Sturm y Duffy, 2012; Praetorius *et al.*, 2013; Ochiai *et al.*, 2013). Ubicación: 6p25.3 (figura 1.12).

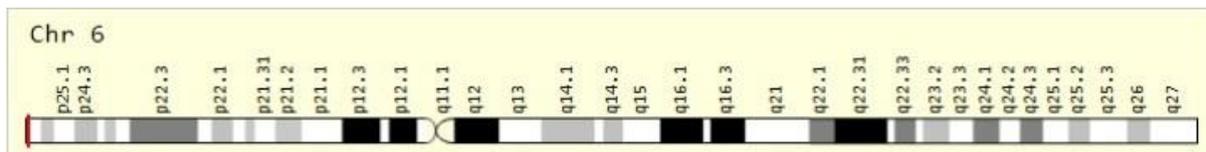


Figura 1.12. Localización del gen *IRF4* en el brazo corto del cromosoma 6 humano (banda 6p25.3). Imagen tomada de la base de datos GeneCards.

-rs12203592, NC_000006.12:g.396321C>T. Relacionado con el color de ojos azul (Liu *et al.*, 2010; Hart *et al.*, 2013; Sturm y Duffy, 2012; Lim y Oh, 2013; Kastelic *et al.*, 2013; Walsh *et al.*, 2011b; entre otros). Este polimorfismo se encuentra en el intrón 4 que forma parte de un *enhancer* del gen. El alelo T, asociado a color de ojos azul, perjudica la unión del factor de transcripción TFAP2A, el cual, junto con MITF, promueven la expresión del gen. A su vez, la proteína IRF4 coopera con MITF para activar la expresión de TYR (Praetorius *et al.*, 2013).

LOC105370627: gen *upstream* del gen *SLC24A4* (solute carrier family 24 - sodium/potassium/calcium exchanger-, member 4)

Este gen se encuentra aguas arriba del gen que codifica una proteína de la familia de los intercambiadores de sodio/calcio dependientes de potasio (Parry *et al.*, 2013). Codifica un ARN que no se traduce a proteína y, aunque su rol en la pigmentación no se ha dilucidado aún, se ha demostrado su asociación con las variaciones en el color de los ojos, el pelo y la piel (Hart *et al.*, 2013). Ubicación: 14q32.12 (figura 1.13).



Figura 1.13. Localización del gen *LOC105370627* en el brazo largo del cromosoma 14 humano (banda 14q32.12). Imagen tomada de la base de datos GeneCards.

-rs12896399, NC_000014.9:g.92307319G>T. Ubicado 15262 pb aguas arriba del promotor de *SLC24A4*, que modifica la unión de factores de transcripción como AML1 (Sulem *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010; Walsh *et al.*, 2011a, 2011b, 2012; Ruiz *et al.*, 2013; Kastelic *et al.*, 2013; Lim y Oh, 2013; Hart *et al.*, 2013). El alelo T se vio relacionado a ojos azules, mientras que el alelo G se asoció a ojos marrones (Sulem *et al.*, 2007; Walsh *et al.*, 2011a; Hart *et al.*, 2013). Sulem *et al.* 2007 lo describió por primera vez como asociado al color, siendo útil en la distinción entre verde y azul en islandeses y holandeses.

SLC45A2 (solute carrier family 45, member 2)

Codifica una proteína transportadora de 530 aminoácidos y 12 dominios transmembrana llamada MATP (*membrane-associated transporter protein*) que es un intercambiador de carbohidrato-hidrógeno. Mediante cambios del pH y de la osmolaridad dentro de los melanosomas, regula la actividad de TYR en los melanocitos humanos. Se expresa en los estadios III y IV (Bin *et al.*, 2015) y su acción promueve el tráfico de TYR desde el trans-Golgi a los melanosomas (Costin *et al.*, 2003). Ubicación: 5p13.2 (figura 1.14).

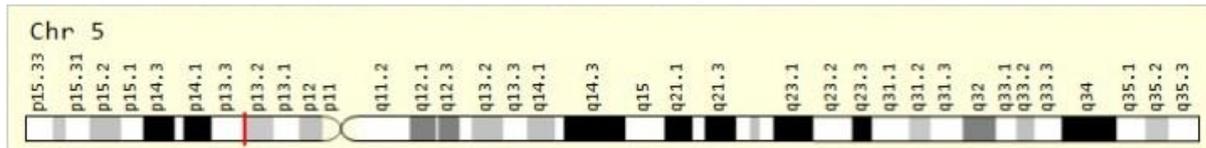


Figura 1.14. Localización del gen *SLC45A2* en el brazo corto del cromosoma 5 humano (banda 5p13.2). Imagen tomada de la base de datos GeneCards.

-rs16891982, NC_000005.10:g.33951588C>G, NP_001012527.1:p.Phe374Leu. Se lo ha reportado asociado al color de iris (Liu *et al.*, 2010; Walsh *et al.* 2011a, 2011b, 2012; Sturm y Duffy, 2012; Ruiz *et al.*, 2013; Hart *et al.*, 2013; Kastelic *et al.*, 2013; entre otros), siendo el alelo G el relacionado a la pigmentación clara (Walsh *et al.*, 2012; Wilde *et al.*, 2014). Se estima que este alelo comenzó a verse favorecido por selección entre 11.000 y 19.000 años atrás. Una transversión C/G es responsable del cambio de aminoácido Phe374Leu en la proteína (Wilde *et al.*, 2014).

Los polimorfismos de *SLC45A2* generan diferentes grados del tamaño, forma, madurez y melanina del melanosoma (Wiriyaerkmul *et al.*, 2020).

TYR (tirosinase)

Este gen codifica la enzima tirosinasa (TYR), una de las requeridas para la síntesis de ambos tipos de melanina (Sturm y Frudakis, 2004). En el citoplasma del melanocito ocurre la conversión de fenilalanina en tirosina; esta última entra al melanosoma para ser oxidada por la

tirosinasa y comenzar así la melanogénesis. La actividad de esta enzima es dependiente del pH del melanosoma (Sturm y Duffy, 2012; Wiriyasermkul *et al.*, 2020). En determinadas condiciones, su alta actividad conduce a la formación de mayor cantidad de eumelanina (Nan *et al.*, 2009). La función de TYR depende del pH neutro y de la presencia de Cu^{+2} como cofactor (Wiriyasermkul *et al.*, 2020). Ubicación: 11q14.3 (figura 1.15).

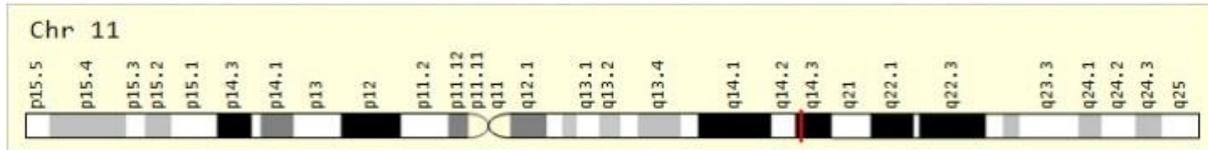


Figura 1.15. Localización del gen *TYR* en el brazo largo del cromosoma 11 humano (banda 11q14.3). Imagen tomada de la base de datos GeneCards.

-rs1393350, NC_000011.10:g.89277878G>A. Relacionado con la presencia de ojos claros (Sulem *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010; Kastelic *et al.*, 2013; Walsh *et al.*, 2011b, 2012; Kastelic y Drobnič 2012; entre otros). Se encuentra en un intrón del gen. El genotipo GG se asocia al color marrón y el AA al color azul (Walsh *et al.*, 2012). Es importante para distinguir entre los colores de iris azul y verde (Sulem *et al.*, 2007).

Seis de estos polimorfismos forman parte del sistema IrisPlex utilizado para la determinación de color de ojos en varias poblaciones, siendo la europea la población de la cual se poseen más datos (Walsh *et al.* 2011b; 2012; 2013).

Es materia de debate si la débil asociación que se encuentra en otros genes de pigmentación se debe a la baja penetrancia o a una subestructura poblacional (Sturm y Frudakis, 2004).

Se sabe que los SNPs asociados al color del iris (como otros) pueden presentar distintas frecuencias en las diversas poblaciones según su ancestría, debido a las distintas fuerzas evolutivas que han actuado sobre cada grupo humano. Por ello, los SNPs utilizados para la predicción del color del iris deberían estar idealmente asociados con este carácter estudiado y no estar influenciados por una subestructura poblacional. Esto es particularmente importante en las poblaciones mixtas (Allwood y Harbison, 2013) como la argentina.

1.1.3 Aspectos poblacionales

La mayor ocurrencia de colores de iris claros se encuentra en la población de Europa y en individuos con ancestros provenientes de dicho continente (Sturm y Frudakis, 2004). Las demás poblaciones presentan una mayor frecuencia de color marrón, lo que concuerda con el fenotipo ancestral y la hipótesis del origen africano de los humanos modernos. Se postula que el color de ojos azul en humanos surgió a partir de una mutación fundadora en un importante elemento regulador (rs12913832), la cual se supone que se originó al Noroeste del Mar Negro hace unos 6.000 a 10.000 años. (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994; Eiberg *et al.*, 2008). Se sugirió esta región al sur del Báltico debido a la distribución del color en anillos concéntricos, con disminución de la frecuencia del color azul desde esta zona hacia la periferia (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994; Coon, 1939; figura 1.16).

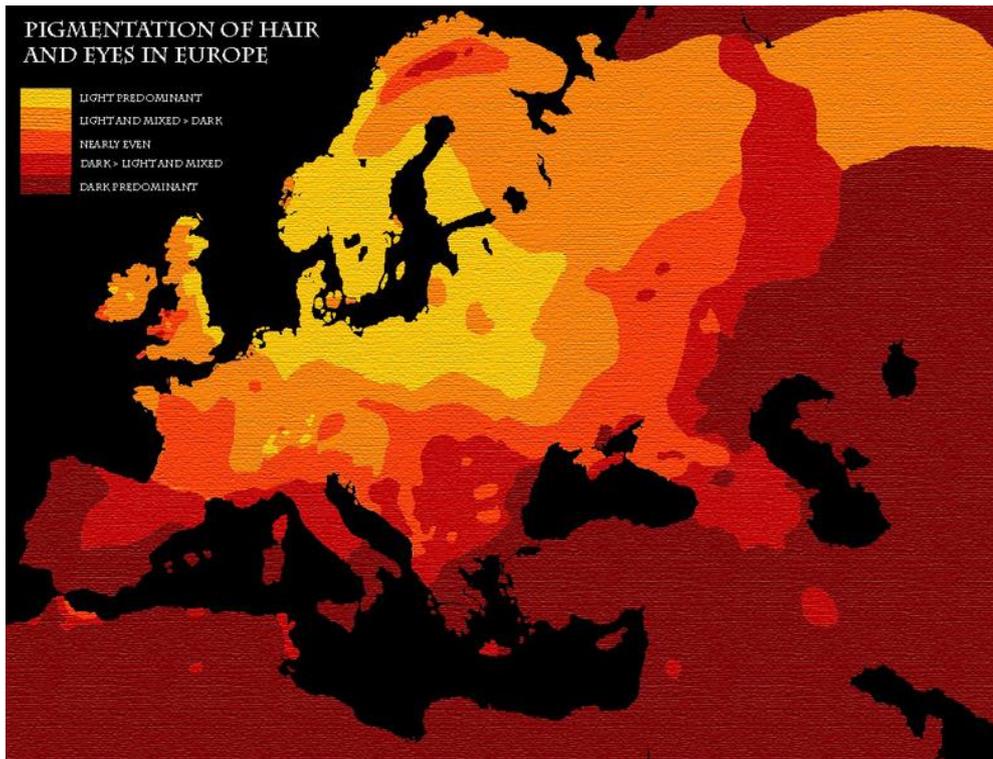


Figura 1.16. Patrón de distribución en Europa de pigmentación de cabello y ojos. Adaptada de Coon, 1939, según: <https://commons.wikimedia.org/>.

Este fenotipo podría haber sufrido selección sexual positiva (Cavalli-Sforza *et al.* 1994; Frost, 2006) y/o tener una correlación con la selección natural del color de la piel (efecto pleiotrópico). Respecto a esto último, se cree que la pigmentación oscura siempre estuvo presente en los humanos y que ha sido favorecida por una selección adaptativa en regiones con alta incidencia de radiación ultravioleta procedente de la luz solar (ya que la distribución del color de la piel está relacionada con la latitud -Parra, 2007-), al cumplir un rol de protección. Por otro lado, la piel clara en lugares con bajos niveles de radiación UV maximizaría la síntesis de vitamina D (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994; Frost, 2006).

La selección sexual también habría sido importante, especialmente en relación al color del cabello y de los ojos, ya que es sabido que este tipo de selección favorece a aquellos colores que surgen como novedosos frente a un rasgo frecuente (Frost, 2006; Wilde *et al.*, 2014). Notablemente, no existe una función fisiológica conocida para estas características (Sulem *et al.*, 2007) aunque se postula una ventaja de los colores de iris claros frente al trastorno afectivo estacional (Sturm y Larsson, 2009; Provencio, 2011). La contribución de la selección sexual es difícil de probar, ya que las preferencias son inestables y variables según la población y la cultura (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994). La selección natural y sexual no son mutuamente excluyentes, y se postulan ambas para explicar la distribución de la pigmentación humana mundial (Frost, 2006; Parra, 2007).

1.1.4 Aplicación Forense

La importancia del estudio del color de los ojos en las poblaciones humanas, relacionado con variaciones a nivel genotípico, radica en su potencial aplicación en Genética Forense (Eiberg y Mohr, 1996), ya que constituye una herramienta para la predicción de esta característica externa visible o EVC (*externally visible characteristic*). Las EVCs incluyen, entre otras, el color del pelo, la piel y los ojos, la altura y la morfología facial, los cuales tienen alta heredabilidad. A través de estudios de asociación del genoma completo (*genome-wide association study* –GWAS-) se han identificado muchas de las variantes genéticas que tienen influencia sobre dichas EVCs (Lim y Oh, 2013).

La descripción del fenotipo de color del iris desde un análisis genético forma parte de la inferencia de características físicas por medio de marcadores genéticos en el ámbito forense (*Forensic DNA Phenotyping*, FDP -Koops y Schellekens, 2008-), que incluyen las EVCs y marcadores de origen biogeográfico (Kayser y de Knijff, 2011; Keating *et al.*, 2013; Granja y Machado, 2020). De esta manera, aporta, por un lado, a la identificación de sospechosos de crímenes a partir de muestras biológicas recolectadas en la escena, cuando el perfil de ADN no se encuentra en ninguna base de datos o no hay ADN para comparar, convirtiendo al ácido desoxirribonucleico en un “testigo biológico” (Walsh *et al.*, 2011a) y reduciendo así la dependencia de los testigos oculares en la investigación (Keating *et al.*, 2013). Esto contribuye a disminuir la tasa de error, ya que debido al trauma muchas víctimas o testigos pueden equivocarse en su testimonio (Heaton-Armstrong, 1995) y también evita el estancamiento de los “casos fríos” (Kayser y Schneider, 2009). A su vez, este tipo de inferencia tiene un respaldo estadístico propio del sistema de predicción utilizado (Kayser-de Knijff, 2011). Al reducir el número de sospechosos, puede luego realizarse un “barrido” o “escaneo” de marcadores repetidos de tipo STRs (*short tandem repeats*) u otros utilizados en identificación, en un número reducido de personas (Silva de Cerqueira *et al.*, 2016).

También permitiría identificar a personas desaparecidas y víctimas de desastres (Spichenok *et al.*, 2011; Hart *et al.*, 2013; Silva de Cerqueira *et al.*, 2016). En estos casos, el ADN puede ser una herramienta forense muy útil para hacer más completa la descripción fenotípica de los individuos (para centrarse en un grupo o descartar a otros) cuando no se poseen muestras de ADN de familiares de los mismos con las cuales comparar, pero se cuenta con datos del color de ojos de dicha persona. Luego, como en el caso anterior, se reduciría el número de personas a las cuales evaluar con marcadores convencionales para identificación (Kayser y Schneider, 2009). Se debe tener en cuenta que estos estudios complementarían a otros realizados en este contexto, a partir de otro tipo de pruebas y con otras evidencias, considerando además que la FDP se utilizaría sólo en el proceso de investigación y no en el proceso judicial, ya que allí sólo pueden presentarse pruebas a partir de STRs. Además, los métodos de predicción son probabilísticos y no determinísticos. A su vez, debería observarse cuál es la visión de la población sobre el uso de estas nuevas tecnologías (Silva de Cerqueira *et al.*, 2016).

El uso de variantes genéticas para inferir EVCs está permitido por ley en Holanda desde el 2003, siempre que estén definidas desde el nacimiento. Actualmente, el país permite la determinación del sexo, la ancestría biogeográfica, y el color del pelo y del iris a partir de ADN con fines identificatorios (Hopman, 2021). En Eslovaquia, el testeo de EVCs se encuentra permitido (Samuel y Prainsack, 2019), y a finales del 2019 Alemania aprobó la predicción de

EVCs (pigmentación y edad) (Granja y Machado, 2020). Pero en la mayoría de los países europeos las leyes prohíben el uso de FDP, mientras que en otros la legislación sobre FDP se encuentra ausente o implícita, siendo un vacío legal que deja su uso a libre interpretación (Samuel y Prainsack, 2018).

Sin embargo, se ha presentado este uso en Estados Unidos y el Reino Unido, ya que existen leyes preexistentes que pueden dar lugar a su utilización (Kayser y de Knijff, 2011).

Se ha sugerido la necesidad de una definición más apropiada en las leyes actuales, denominando como “marcadores distintivos” a los STR y “marcadores predictivos” a aquellos que permitan predecir EVCs (causales o asociados) (Kayser y de Knijff, 2011). Cuando los marcadores no son causales del fenotipo, el análisis debe combinarse con uno de ancestría (Kayser y Schneider, 2009; Kayser y de Knijff, 2011; Silva de Cerqueira *et al.*, 2014).

De todas las características visibles, el color del iris es aquella que puede predecirse con mayor precisión (Kayser y de Knijff, 2011). Pero para usar un sistema de predicción, éste debe estar debidamente validado en la población a analizar, ya que algunos marcadores son muy informativos para ciertas poblaciones pero no para otras (Silva de Cerqueira *et al.*, 2016). Aunque se ha sugerido que esta correlación entre ancestría y variación fenotípica resulta significativa (Ruiz-Linares *et al.*, 2014), algunos autores no consideran el uso de la ancestría biogeográfica para la predicción del fenotipo visible, ya que es muy propenso a errores y todavía no está muy claro cómo la miscigenación puede relacionarse con las características externas (Kayser y de Knijff, 2011; Kayser, 2015). En otros casos, se considera que la inferencia del origen biogeográfico sería útil para evitar acusaciones injustas sólo por el hecho de pertenecer a un grupo biogeográfico en particular (Matheson, 2016).

Beleza *et al.* (2013) aseguran que un mayor conocimiento sobre la variación en la pigmentación humana supone un mayor entendimiento de la diversidad y una disminución del uso de estereotipos sociales.

1.1.5 Clasificación y cuantificación del color

El color del iris se presenta en un rango continuo, desde el azul claro al marrón oscuro (Sturm y Frudakis, 2004), siendo la clasificación en categorías discretas el resultado de un análisis más sencillo. El color del iris de las poblaciones humanas ha sido importante en distintos tipos de estudios y aplicaciones, por ejemplo, en Antropología para el estudio de la distribución de características fenotípicas y de rutas migratorias (Coon, 1939). Dependiendo del caso, los investigadores han utilizado distintas escalas o formas de clasificar o cuantificar el color del iris, algunas de ellas son las de Petrequin (1843), Martin-Schultz (1903, figura 1.17), Coon (1939), Riddell (1942), Seddon (1990), Mackey *et al.* (2011), y Simionescu (2014). Además de estas clasificaciones y escalas, se desarrollaron otras, pero todas tienen en común la subjetividad al determinar a qué grupo pertenece cada color de iris y, a pesar de los diversos esfuerzos y estudios en el tema, no existe en la actualidad una clasificación que se encuentre universalmente validada (Grigore y Avram, 2015).

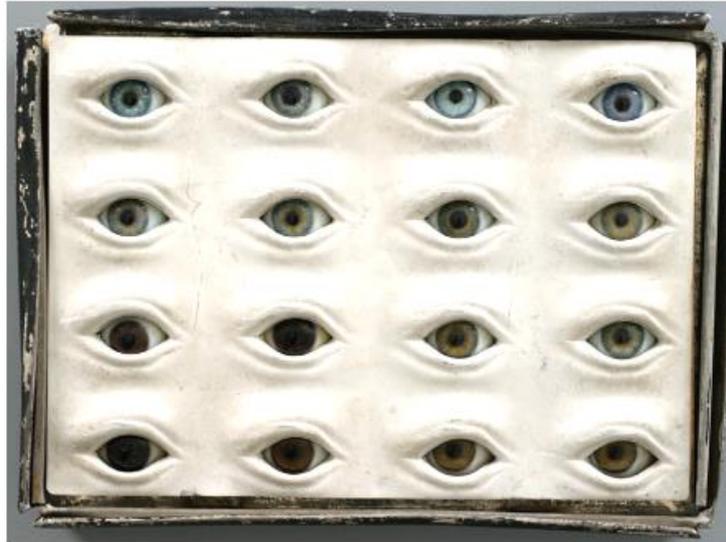


Figura 1.17. Escala de Martin-Schultz. Imagen tomada de Mackey *et al.*, 2011.

La clasificación en categorías es la adecuada para el uso en Ciencias Forenses, ya que la descripción de un fenotipo se basa en la definición de un color en particular. Según Meyer (2019), la clasificación con un sistema de 2 grupos (azul-marrón) tiene mejor concordancia con la percepción humana. Sin embargo, las escalas no están estandarizadas ni son reproducibles, además de que se basan en una evaluación subjetiva, tal como la división en grupos de color. Cuando se trata de imágenes impresas u ojos artificiales, éstos sufren el paso del tiempo, con el consecuente deterioro de su color. Además, muchas escalas se basaron en la población de Europa Occidental para su desarrollo y no reflejan la variabilidad de otras poblaciones. Mientras más categorías tenga una escala, más difícil es su uso y más subjetiva la clasificación; a su vez, con menos categorías, menos detallada e informativa es la clasificación, sin captar la variabilidad interindividual (Grigore y Avram, 2015).

La cuantificación del color del iris humano (método objetivo) presenta ventajas sobre las técnicas subjetivas, ya que al obtenerse datos continuos en vez de clasificaciones discretas, permite una asociación más robusta entre el color y otro parámetro determinado (Melgosa *et al.*, 2000). Los métodos tradicionales de medida de pigmentación en cabello y en piel están basados en reflectometría, por lo cual no pueden ser usados directamente sobre el iris (Edwards *et al.*, 2012). Por ello, la mayor objetividad en la cuantificación del color del iris se buscó ya sea por espectrofotometría sobre ojos artificiales (Melgosa *et al.*, 2000) o por cuantificación a partir de fotografías digitales de iris. Respecto a esto último, desde hace unos años (Takamoto *et al.*, 2001) se desarrollaron distintas metodologías basadas en diferentes espacios de color:

- espacio de color de matiz-saturación-brillo (*hue-saturation-brightness* o HSB) (Liu *et al.*, 2010). Este espacio de color provee una medida automatizada que permite estimar la cantidad de eumelanina y feomelanina, para separar entre los grupos azul y marrón (Wollstein *et al.*, 2017)
- *iris melanin index* (IMI), un valor numérico derivado de la relación entre la cuantificación RGB y la luminosidad (Dembinski y Picard, 2014)
- espacio de color CIELab, (Edwards *et al.*, 2012, entre otros)

- *Pixel Index of the Eye (PIE - Score)*, a partir del software *Digital Iris Analysis Tool (DIAT)*, Andersen *et al.*, 2013)
- espacio de color *red-green-blue* (RGB) y cálculo de índice T (Beleza *et al.* 2013).

1.1.6 Población argentina

La composición de la población americana puede dividirse, a grandes rasgos y según el aporte étnico, cultural y genético, en componentes nativo-americano, africano y europeo (Sans, 2000). Esto puede observarse en la población argentina (INDEC 2010; Avena *et al.*, 2006, 2012; Seldin *et al.*, 2007; Resano y Moral, 2018), siendo el componente africano de origen subsahariano. En general, la heterogeneidad observada entre poblaciones se debe a los aportes diferenciales recibidos desde las tres poblaciones parentales nombradas, lo que depende de procesos históricos y demográficos determinados.

La población argentina se caracteriza por dicha ancestría mixta debido, en parte, a la colonización española de fines del siglo XV. Hasta el momento de la conquista española en Argentina, los grupos humanos que habitaban la actual región eran exclusivamente americanos nativos (Sánchez Albornoz, 1973). Luego de la colonización, sobrevino la esclavitud de individuos africanos entre los siglos XVI y XVIII y, más tarde, las olas migratorias desde Europa, acontecidas desde fines del siglo XIX hasta mediados del siglo XX (Devoto, 2007; Salas *et al.*, 2008). Más recientemente, la inmigración desde países limítrofes (Bolivia, Paraguay y Perú, entre otros) (INDEC, 2010; Avena *et al.*, 2012) ha contribuido a la miscegenación, aportando nuevo componente genético nativo.

Para el país en general, el aporte genético europeo es dominante (65%-79%), siendo la contribución amerindia la segunda en porcentaje (17%-31%) y el aporte africano el mínimo (2%-4%) (Seldin *et al.*, 2007; Corach *et al.*, 2010; Avena *et al.*, 2012, entre otros). A grandes rasgos, la región central de Argentina presenta una mayor contribución europea, y las del Norte y el Sur poseen un mayor aporte nativo americano (Martínez-Marignac *et al.*, 1999; Avena *et al.*, 2001; Dipierri *et al.*, 1997; Alfaro *et al.*, 2004; Gonzales e Ianiro, 2012; Parolin *et al.*, 2013; García *et al.* 2015, entre otros). Por su parte, el aporte africano alcanza su máximo en las provincias de La Rioja y Santiago del Estero, de acuerdo con las rutas de traslado de esclavos en tiempos coloniales (Alfaro *et al.*, 2005).

De acuerdo con estudios previos, la ancestría promedio en nuestro país es un 65% europeo, 31% nativo y 4% africano, con distinta distribución en las regiones geográficas de Argentina (Avena *et al.*, 2012).

Teniendo en cuenta la región pampeana (centro) del país, los estudios realizados con AIMs autosómicos muestran un componente europeo que varía entre el 60 y el 65%, mientras que el nativo americano se estima entre 30 y 35% y el africano ronda el 5% (Resano y Moral, 2018).

1.1.6.1 Población bonaerense

Dentro de la provincia de Buenos Aires (incluyendo a la ciudad de Buenos Aires), se han reportado porcentajes de ancestría europea entre 68 y 81%, nativa entre 15 y 29% y africana entre 0 y 4% (Fejerman *et al.*, 2005; Resano *et al.*, 2007; Corach *et al.*, 2010; Avena *et al.*, 2012; Parolin *et al.*, 2013). La provincia muestra en promedio un 76% de contribución europea,

y contribuciones nativas y africanas que no se diferencian significativamente del promedio ya reportado para el país (Avena *et al.*, 2012).

Según los censos desde 1947 a 1991, el aporte europeo disminuye marcadamente desde mediados del siglo XX y es reemplazado por la migración tanto interna como de los países limítrofes y de Perú, de elevada composición nativa americana. En Buenos Aires, el aporte nativo ronda un 16%-17% en el interior y el primer cinturón urbano, aumentando a un 29% en el segundo (Avena *et al.* 2012).

Las estimaciones de la ancestría continental de los individuos o de las poblaciones no proveen sólo información de interés histórico, sino que también son útiles para estudiar la genética de ciertas patologías en poblaciones donde sus parentales presentan distinto riesgo o prevalencia, como en el caso de la fibrosis quística y las talasemias, o para estudiar la determinación de diferentes caracteres fenotípicos visibles, como es el objeto de este trabajo (Salzano y Sans, 2014).

Ya se ha mencionado el aporte al conocimiento obtenido a partir de estudios de GWAS respecto a las EVCs. No obstante, la cobertura de los GWAS -es decir, la cantidad de individuos analizados- suele ser baja en poblaciones no europeas. Esto puede ocasionar una inequidad en el empleo de datos para estos análisis (Need y Goldstein, 2009), ya que las poblaciones de distinta procedencia étnica y geográfica pueden portar diferentes variantes alélicas en genes que influyen en características fenotípicas, las cuales contribuyan a la descripción e identificación de individuos.

El conocimiento de la variación genética que origina el color del iris en nuestra población facilitará su aplicación futura en la identificación de personas, requerida por los diferentes motivos ya mencionados. La población bonaerense resulta de particular interés, ya que está conformada por individuos procedentes de diversos lugares del país, pudiendo considerarse representativa del mismo. Cabe remarcar que los estudios sobre los genes implicados en el color del iris en la población Argentina son escasos (Hohl *et al.* 2018, 2022).

1.2 HIPÓTESIS

-Dada la composición de la población argentina actual, la variación genética relacionada con el color del iris en la población bonaerense refleja en parte la variación previamente descripta para la población europea.

-En algunos loci a estudiar se presentan distintas distribuciones alélicas e incluso nuevos polimorfismos, como producto de la miscegenación con pueblos nativos americanos y de otras procedencias del mundo. En consecuencia, los componentes de distinta ancestría que han hecho un aporte a la diversidad genética de los bonaerenses influyen de manera particular en la determinación genética del color de los ojos.

1.3 OBJETIVOS

Objetivo general

Describir la variación genética relacionada con el color del iris en la población argentina para su aplicación a futuro en estrategias de predicción del fenotipo a partir del genotipo, dentro del campo de la Genética Forense.

Objetivos específicos

1. Caracterizar en la población bonaerense la variación de secuencia de ciertos fragmentos de los genes *HERC2*, *OCA2*, *LOC105370627* y *SLC45A2*, reportados en asociación con la determinación del color del iris, y caracterizar 2 SNPs adicionales (rs1393350 y rs12203592) que son utilizados en sistemas de predicción.
2. Caracterizar la variación de color del iris en la población bonaerense.
3. Evaluar la asociación de los polimorfismos genéticos tipificados con la determinación de color del iris en la población estudiada, y comparar los resultados obtenidos con datos de la bibliografía, pertenecientes a estudios realizados en otras poblaciones del mundo.
4. Evaluar la posible existencia de diferencias de ancestría en la determinación genética del color de ojos, a través del análisis de los individuos estudiados mediante la tipificación de marcadores informativos de ancestría (*Ancestry Informative Markers* o AIMS) y la comparación con datos de la bibliografía.

CAPÍTULO 2

Materiales y métodos



CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Muestras

Para la realización de este trabajo se recolectaron muestras de 308 individuos donantes voluntarios de un rango de edad entre 18 y 65 años que se identificaron como nacidos en la provincia de Buenos Aires, o que contaban con al menos 5 años de residencia en la misma. El rango de edad permite asegurar la mayoría de edad de los individuos y evitar ciertos cambios del color del iris que se presentan en edad temprana y avanzada (Sun *et al.*, 2014). Los individuos participantes fueron informados de forma verbal y escrita sobre las incumbencias del proyecto y la toma de muestra biológica; posteriormente a despejar sus inquietudes sobre el tema, los voluntarios firmaron un consentimiento informado. El consentimiento y el procedimiento de muestreo fueron avalados por el Comité de Ética en Investigaciones Biomédicas perteneciente al Instituto Multidisciplinario de Biología Celular IMBICE, el cual previamente evaluó y aprobó el proyecto referido a este trabajo de Tesis (anexo A.1 y A.2). Se tomaron dos muestras de enjuague bucal realizadas por 30 segundos, con 1 ml de agua cada uno, que se recolectaron en tubos falcon plásticos de 15 ml, se mezclaron con 2 volúmenes de etanol 96% por tubo y se conservaron a -20°C hasta el momento de la extracción de ADN. Se eliminaron de la muestra los individuos que presentaban algún parentesco conocido con alguno de los demás individuos en estudio, dejando como número final 302 individuos (200 mujeres y 102 hombres).

2.2 Fotografías de iris

La toma de las imágenes estuvo a cargo de la Dra. María de los Ángeles Gutiérrez. Se tomaron fotografías de ambos ojos de los voluntarios con un equipo de imágenes adaptado en el consultorio del Programa Ambiental de Extensión Universitaria (PAEU, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP), en condiciones normalizadas. Se utilizó una cámara digital Canon Eos rebel T3i réflex (600D) acoplada a una lámpara de hendidura, en oscuridad total sólo iluminando con dicha lámpara y utilizando el balance de blancos en modo “tungsteno”. En algunos casos, la imagen fue obtenida con balance de blancos en modo “automático”, por lo que luego se utilizó el software *Digital Photo Professional 4* (DPP, Canon) para editar las imágenes RAW (CR2) copiando la “receta” de una imagen obtenida con balance de blancos en tungsteno. Así, todas las imágenes se analizaron con un balance de blancos en “tungsteno”, contraste=0, luminosidad estándar, fuerza=3, radio=4, umbral=4, para luego almacenarlas en formato TIFF 8 bits y proceder a la cuantificación digital.

2.2.1 Clasificación en grupos de color

Con las imágenes obtenidas, se clasificaron visualmente los ojos de los participantes en 3 grupos de color (azul -A-, intermedio -I- y marrón -M-) y en 2 grupos de color (A y M), para compararlos luego con los sistemas de predicción de color. La clasificación se definió según un análisis visual por 3 observadoras independientes cuyas diferencias en el criterio para

clasificar las imágenes fueron comprobadas con un coeficiente de correlación (ICC), calculado a través del paquete *irr* del programa R v.3.6.3 (The R Development Core Team, 2008).

2.2.2 Cuantificación del color

A partir de las imágenes en formato TIFF se cuantificó el color de los iris en el espacio de color CIE (Commission International d'Eclairage) $L^*a^*b^*$ (CIELab), un sistema establecido en 1976, utilizando el software ImageJ v1.51a (Abramoff *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 2012). La colorimetría triestímulo se desarrolló para tratar de representar objetivamente el color de una manera análoga a la forma en que el ojo humano lo percibe (Hunter, 1942), siendo el CIELab uno de los sistemas más utilizados (Parra *et al.* 2007; McLaren y Rigg, 2008; Edwards *et al.*, 2012). Estas dimensiones representan el brillo (con valores de L^* de 0 -negro- a 100 -blanco-), verde y rojo (valores negativos y positivos de a^* , respectivamente), y azul y amarillo (valores negativos y positivos de b^* , respectivamente) (McLaren y Rigg, 2008). Se diferenció la medida entre las porciones ciliar y pupilar del iris (figura 2.1). Asimismo, se utilizó un macro (comandos automáticos) desarrollado por el Dr. Pablo Nicolás De Francesco, del laboratorio de Neurofisiología del IMBICE.

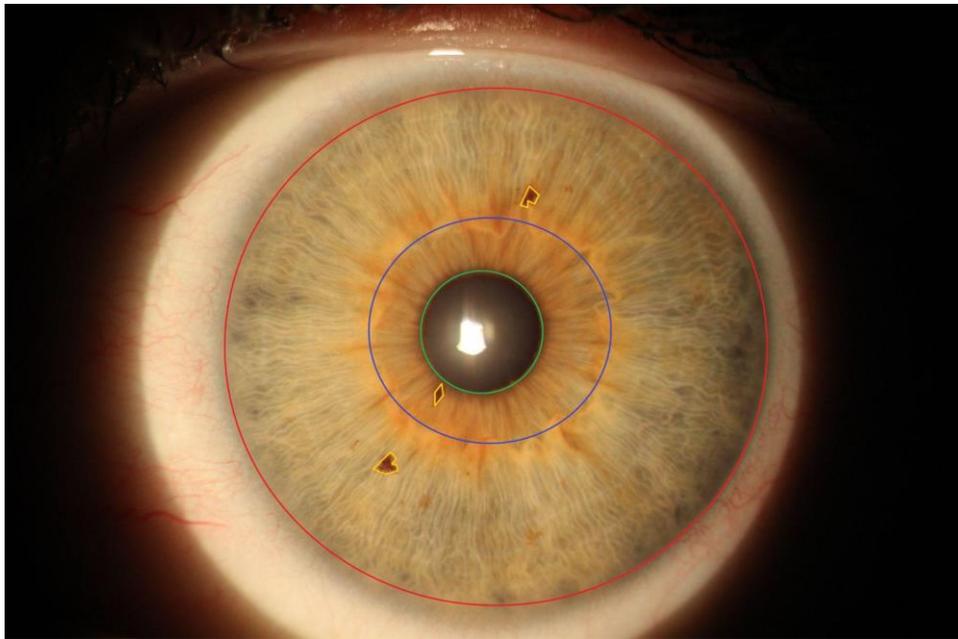


Figura 2.1. Fotografía del iris esquematizando la selección en ImageJ. Primeramente, la imagen es convertida al espacio de color CIEL*a*b*; luego se seleccionan el iris (círculo rojo), el collarete (círculo azul), la pupila (círculo verde) y los nevi (líneas amarillas). El programa identifica la zona pupilar (entre los círculos azul y verde) y la zona ciliar (entre los círculos rojo y azul) y sustrae la pupila y los nevi a fin de excluirlos de la cuantificación.

Mediante el programa GraphPad Prism v6 (GraphPad Software, San Diego, California USA) se compararon las cuantificaciones de las fotografías obtenidas de diferente manera. Para ello, se tomaron imágenes de ojos que habían sido obtenidas con balance de blancos en automático y luego en tungsteno, y las mismas corregidas en su balance de blancos por el software DPP

de automático a tungsteno, de formato RAW (CR2) a TIFF. Se realizó un test de Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad de las diferencias entre pares de datos (de L*, a* y b*, tanto ciliar como pupilar), y luego un test de Student o Wilcoxon para medidas repetidas (datos pareados o relacionados), según si las diferencias mantenían una distribución normal o no.

Se utilizaron las fotografías del ojo izquierdo de cada participante, siempre que tuvieran buena definición. De lo contrario, la medición se realizó sobre la foto del ojo derecho. Las imágenes fueron transformadas de RGB a CIELab para luego seleccionar las 2 zonas del iris y cuantificar las coordenadas de las dimensiones L*, a* y b*. La diferencia de color entre el iris ciliar y pupilar se determinó calculando el parámetro Delta E 1976 [$\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{1/2}$] (McLaren y Rigg, 2008; Edwards *et al.*, 2012, 2015; Norton *et al.*, 2015).

2.3 Extracción de ADN

Se extrajo ADN a partir de las células de descamación obtenidas del enjuague bucal mediante una técnica estándar (Gemmel y Akiyama, 1996).

- Las muestras se equilibraron con etanol 96% y se centrifugaron a 4000 rpm y 7°C durante 10 minutos.
- Se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet agregando 150 µl de buffer TE (Tris-EDTA) y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones.
- Se descartó el sobrenadante, se agregaron 300 µl de buffer de digestión y 10 µl de proteinasa K (10 mg/ml). Se incubó *over night*. en baño térmico a 37°C.
- Se agregaron 300 µl de LiCl 5 M y se mezcló en agitador durante 1 minuto.
- Se agregaron 600 µl de SEVAG (alcohol isoamílico : cloroformo 1:24) y se agitó durante 30 minutos.
- Se centrifugó durante 20 minutos en las condiciones ya descritas y luego se transfirió la fase superior (acuosa) a un nuevo tubo utilizando pipetas Pasteur.
- A dicha fase se le agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío y se mezcló suavemente por inversión hasta formación de un ovillo de ADN.
- El ovillo se tomó con una pipeta Pasteur y se lavó con etanol 70%, el cual se dejó evaporar antes de resuspender en 100 µl de buffer TE (Tris-EDTA pH = 8) en un tubo Eppendorf.
- En los casos en los que no se formó ovillo, se centrifugó la totalidad del volumen, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 50 µl de etanol 70 %, centrifugando 10 minutos a 13.000 rpm. Luego de descartar el sobrenadante y evaporar el etanol, se resuspendió el pellet en 100 µl de TE con ayuda de un vórtex.
- Las muestras se guardaron en heladera hasta el día siguiente, para luego cuantificar el ADN con un equipo Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.), utilizando H₂O Milli-Q como blanco de medición.

2.4 Genotipificación

2.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR se llevó a cabo con el fin de amplificar fragmentos determinados de la secuencia de ADN para poder analizarlos. Para ello se utilizaron oligonucleótidos específicos (*primers*), desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs), ADN polimerasa termoestable (*Taq* polimerasa) y ADN molde. Los *primers* fueron diseñados utilizando Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012). Los cambios cíclicos de temperatura se lograron utilizando un equipo termociclador MPI (La Plata, Argentina).

Los reactivos y concentraciones utilizados para las reacciones de PCR se detallan a continuación:

Buffer de reacción 1X

MgCl₂ 2 mM

dNTPs 0,2 mM

Primers 0,25 pmoles/μl

Taq (Inbio Highway, Argentina) 0,025 U/μl

ADN molde 2ng/μl

En la tabla 2.1 se muestran las condiciones generales de ciclado utilizadas.

Tabla 2.1 Condiciones generales de PCR

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (condición A)	Tiempo (condición B)	N° de ciclos
Desnaturalización inicial	94	2' 30''	2' 30''	1
Desnaturalización del ciclo	93	45''	1'	34
<i>Annealing</i>	Variable	50''	1'	
Extensión	72	55''	1'	
Extensión final	72	5'	10'	1

2.4.2 Secuenciación

La tabla 2.2 muestra las condiciones de amplificación para obtener fragmentos destinados a su secuenciación en un volumen final de 36 μl de PCR.

La amplificación de los fragmentos se comprobó mediante electroforesis en agarosa al 1,8% y, en los casos positivos, se procedió a la purificación de los amplicones.

- Se agregaron a las muestras amplificadas 35 μl de solución de polietilenglicol y NaCl, mezclando enérgicamente
- Se incubaron a 37°C durante 15 minutos y se centrifugaron 20 minutos a 13000 rpm.
- Se descartó el sobrenadante de cada tubo y se realizó un lavado con 70 μl de etanol 70% y posterior centrifugación a 13000 rpm durante 2 minutos.

- Luego de descartar el sobrenadante y esperar a que se evapore el etanol a 37°C, se resuspendieron los pellets en 20 µl de H₂O MilliQ con ayuda de un vórtex y se llevaron a heladera *over-night*.
- El éxito de la purificación se comprobó sembrando 2 µl de cada purificado junto con 1 µl de buffer de carga en un gel de agarosa al 1,8% para confirmar la presencia del producto de PCR.

Los fragmentos purificados se secuenciaron por la técnica de Sanger mediante un servicio externo (Macrogen Inc., Seúl, Corea) y las secuencias se analizaron utilizando el *software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 7*.

Tabla 2.2 Condiciones específicas para amplificar los fragmentos que luego se secuenciaron. * Touch Down: consiste en el descenso de la temperatura de annealing a medida que transcurren los ciclos de amplificación, con el objeto de facilitar la hibridación de los *primers* una vez que ya se ha obtenido cierta cantidad de producto amplificado específico.

Fragm.	Gen	Marcadores incluidos	Primers 5'-3'	Condiciones de PCR		Tamaño (pb)
				T annealing (°C) condición A	Touch Down *	
1	<i>HERC2</i>	rs540317226	Fw TCATTTTGGGGATGCTGCAATTT Rv CATCTCCATAGTGAGGTGCTG	62	-	791
		rs1129038				
		rs148711194				
		rs4778245				
2	<i>HERC2</i>	rs6497271	Fw TGCAAGTCAAGGTGCACTCA Rv TGTATCTTCGGTCACCCCTT	58	1°C/57°C/3	773
		rs12913832				
		rs7183877				
3	<i>OCA2</i>	rs182658649	Fw ATGTCAAAGCCCAGGTTGTC Rv ACGGGGTTTCACCAGAGGT	58	1°C/57°C/3	773
		rs36032918				
		rs117886461				
		rs1800407				
		rs121918166				
		rs1800410				
		rs1900758				

		rs141662330				
4		rs145662614	Fw GTTTCTTGGTGCCCATGGTCCTT Rv CCATTGGCTCTCGACCTTCCTG	66	-	784
		rs4778232				
		rs118163203				
		rs74005202				
		rs74007903				
		rs74007904				
		rs75102342				
		rs17680684				
		rs72712656				
		5				
rs12910433						
6	<i>LOC10537 0627</i>	rs12436973	Fw AGCTTGAGCTCATCCGAGTC Rv CCCAGGAATGGTGCTGAGTAA	60	-	750
		rs142020658				
		rs8021744				
		rs12437047				
		rs12896399				
		rs12896471				
7	<i>SLC45A2</i>	rs2278007	Fw ATGCTGACTTTGTCACCTGTCAT	61	-	845

		rs16891982	Rv GCAGAAGATGAGTGGTGGGATT			
		rs35398				
8		rs35397	Fw CCCTGAATTGGGGGTCAGTT Rv TACTTTGCTCTTGGAATCAGTGG	60	-	600
9		rs1364038	Fw AGTACAGAGCTGATGCTGTCAT Rv TCCAAGGGGGTAAAGTTCCAC	60	-	796
		rs185145				
		rs185146				
		rs250417				
10	<i>TYR</i>	rs1393350	Fw TTATCAGCTAGAGGTTGGTGAGC Rv AACAGGATTTAATGGGGAAGCCT	64	-	788
11	<i>IRF4</i>	rs12203592	Fw CCTACACCATGACAACGCCT Rv GGTGCTCTTACAGCCTCCAA	65	-	641

2.4.3 PCR alelo-específica

En esta técnica, se utilizan 3 *primers* por reacción, 2 de los cuales son específicos para cada alelo correspondiente a las variantes de los SNPs bialélicos. Esta especificidad se obtiene diseñando dichos *primers* con el nucleótido 3' complementario a la base polimórfica, y con ciertas modificaciones en posiciones específicas de los primers de acuerdo con las recomendaciones de Liu *et al.* (2012).

La lectura de los resultados a partir de una electroforesis en agarosa al 1,8% se define por la presencia/ausencia de una banda de ADN del tamaño esperado según el fragmento amplificado. Esto permitió combinar juegos de *primers* en una reacción en *multiplex* para genotipificar hasta 3 marcadores en simultáneo, con fragmentos resultantes de distinto tamaño.

2.4.4 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Esta técnica se basa en el uso de enzimas de restricción para diferenciar entre variantes alélicas, en base al corte por parte de la misma en un lugar definido del fragmento amplificado. Fue utilizada para la tipificación del SNP rs16891982 y para 5 AIMs (ver sección 2.5.2).

2.4.5 Electroforesis en geles de agarosa

La técnica de electroforesis en gel fue utilizada para visualizar los fragmentos resultantes de la PCR. Se utilizó agarosa (Genbiotech) al 1,8%, disolviendo la misma en buffer TAE 1X (Tris, acetato, EDTA, pH = 8). Se utilizaron cubas de acrílico (MPI, La Plata) con buffer TAE 1X, sembrando entre 1 μ L y 3 μ L de muestra con 1 μ L de buffer de carga. En este último se incorporó el colorante fluorescente GelRed™ (Biotium, USA). Para estimar el tamaño de los fragmentos obtenidos, se sembraron simultáneamente en el gel 2 μ L de escalera 100-MARKER® (Biodynamics), mi-100 bp+ DNA Marker Go (Metabion) o Marcador de ADN 100 pb (Inbio Highway, Argentina). La corrida electroforética se llevó a cabo a 100V durante 1 minuto y luego a 85V hasta que los colorantes del buffer de carga se separaron aproximadamente 5 cm. Se utilizó el sistema Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad, USA) para visualizar las bandas y registrar imágenes de los geles.

2.4.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Este tipo de electroforesis se utilizó para resolver los fragmentos resultantes de la digestión enzimática (rs16891982) y los múltiplex de AIMs. Para ello, se preparó el gel utilizando acrilamida-bisacrilamida (19:1) entre 8 y 12% según cada caso, y persulfato con tetrametiletilendiamina TEMED (como iniciador y catalizador de la polimerización, respectivamente).

Se realizó una precorrida del gel durante 15 minutos a 150-200 V, con buffer TBE 0,5X en una cuba vertical de acrílico de 12 cm de altura. Se agregaron 2 μ L de buffer de carga a los productos de digestión o de PCR y se sembraron entre 2 y 6 μ L según el caso, además de 1 o 2 μ L de un marcador de tamaño molecular de 50 o de 100 pb (Inbio Highway, Tandil) según los fragmentos a resolver. La corrida electroforética se realizó a 150 o 250 V. La tinción del gel se

realizó durante 15 minutos con solución de GelRed™ (80 mL de buffer TBE 0,5X, 5µL de GelRed™) y las bandas se visualizaron y registraron con el sistema Gel Doc™ XR+.

2.5 Marcadores

2.5.1 Relacionados al color del iris

Todos los marcadores analizados en relación con el color del iris son del tipo SNP. La información sobre localización y tipo de variación de estos marcadores se encuentra en la tabla 2.3.

Tabla 2.3. Marcadores relacionados al color del iris, su localización, tipo de variación, frecuencia global y efecto sobre el péptido. *= SNP incluido en el IrisPlex; MAF= *Minor Allele Frequency*; I= intrón; E= exón; 3' UTR= Región no traducida tres prima; aa= aminoácido

Gen	Cromosoma	Marcador	Posición	Alelos (ancestral/derivado)	Global MAF	I/E	Cambio de aa
<i>HERC2</i>	15	rs1129038	28111713	C/T	T=0.1769/886	3' UTR	-
		rs12913832*	28120472	A/G	G=0.1773/888	I	-
		rs7183877	28120587	C/A	A=0.1725/864	I	-
<i>OCA2</i>	15	rs1800407*	27985172	G/A	T=0.0254/127	E	Arg419Gln
		rs1800410	27985038	G/A	G=0.3678/1842	I	-
		rs4778232	28036619	T/C	C=0.4109/2058	I	-
<i>LOC105370627</i>	14	rs12896399*	92307319	G/T	T=0.2608/1306	I	-
<i>SLC45A2</i>	5	rs16891982*	33951588	C/G	G=0.2750/1377	E	Leu374Phe
<i>TYR</i>	11	rs1393350*	89277878	G/A	A=0.0793/397	I	-
<i>IRF4</i>	6	rs12203592*	396321	C/T	T=0.0367/184	I	-

Además de éstos, en la lectura de los fragmentos secuenciados se relevó información de 32 SNPs adicionales, con un N variable según el marcador.

Las condiciones de PCR alelo-específicas y PCR-RFLP para los marcadores de color del iris son las ya descritas, aunque contienen algunas variantes que se detallan en las tablas 2.4 a y b.

Tabla 2.4 Variantes en las condiciones de: a) PCR alelo-específico b) PCR-RFLP

Dúplex	Marcadores	Primers 5'-3'	Condiciones de PCR			Electroforesis (volumen sembrado y % de agarosa)	Tamaño (pb)
			C. primers (pmoles/ μ l de rx)	T annealing (°C) / Condición PCR	TD		
<i>HERC2</i>	rs12913832	FwA GCCAGTTTCATTTGAGCATGAAA FwG GCCAGTTTCATTTGAGCATAAAG Rv AGGGGTGTGTCCTGGTTACT	0,025	63 / B	-	3,5 μ l agarosa 1,8%	442
	rs1129038	FwC ACAGTCTACACAGCAGCTAGC FwT ACAGTCTACACAGCAGCCAGT Rv CCCTGAGTCTACACCTGTTT	0,030				308
<i>OCA2</i>	rs4778232	FwC TCTGCCCTCTTCTTCAATAGC FwT TCTGCCCTCTTCTTCAAGAGT Rv TTCCTTGTTACCGGCTCTGTA	0,025	61 / A	1°C/58° C/1	4 μ l agarosa 1,8%	363
	rs1800410	FwA AAGCACCTCTGCCGTCGGA FwG AAGCACCTCTGCCGTAGGG Rv GGCCCCACTGCTTGTAGCA	0,040				188

<i>TYR-IRF4</i>	rs1393350	FwA CAGTCCCTTCTCTGCGACA FwG CAGTCCCTTCTCTGCTACG Rv GAAGGTGAACTGAGGCCAAA	0,020	63 / A	1°C/56° C/1 56°Cx1 5 ciclos 1°C/52° C/1	3,5 µl agarosa 1,8%	168
	rs12203592	Fw ACAGGGCAGCTGATCTCTTCAGG RvC CCAAAAGTACCACAGGGGAAATTG RvT CCAAAAGTACCACAGGGGAAAGTTA	0,060				102
Simple							
<i>HERC2</i>	rs7183877	FwA AAGCAGTATACATTTAGAAATCGTA FwC AAGCAGTATACATTTAGAAATAGTC Rv TTTTGTTAAGTTCTGAGAAGTGGA	0,035	60 / B	1°C/59° C/3	3,5 µl agarosa 1,8%	220
<i>OCA2</i>	rs1800407	FwA AGGCATACCGGCTCTGCCA FwG AGGCATACCGGCTCTTCCG Rv CACCTTTTCATGCACCTGAGA	0,025	60 / A	-	3,5 µl agarosa 1,8%	234

<i>LOC1053</i> 70627	rs12896399	Fw TGGTCTACCAGTCTAGACCAA RvG TTAATCTGCTGTGACAAAGTGAC RvT TTAATCTGCTGTGACAAAGGGAA	0,025	60 / A	1°C/58° C/5	3 µl en agarosa 2%	278

b)

RFLP	Marcador	Primers 5'-3'	Condiciones de PCR				Electroforesis	Tamaño (pb)	Enzima	Alelo	Tamaño (pb)
			C. primer (pmoles/µl de rx)	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo					
<i>SLC45A2</i>	rs16891982	Fw TTTTCCTGACGTCCATAGATTT Rv GAGGTTGGATGTTGGGGATT	0,025	Di	94	2'30"	5 µl en acrilamida 8%	188	HinfI	C	160+28
				D	93	45"				G	140+28+20
				A	56	1'					
				E	72	1'					
				Ef	72	5'					

2.5.2 Relacionados a la ancestría o AIMs

Los AIMs (*Ancestry Informative Markers*, Shriver *et al.*, 2003) son marcadores genéticos de utilidad para la diferenciación de grupos de poblaciones (Phillips *et al.*, 2007). En su gran mayoría son SNPs autosómicos y algunos son InDels, con gran estabilidad (es decir, muy baja tasa mutacional) y amplio rango de frecuencias diferenciales en las poblaciones (Phillips *et al.*, 2007). Es por ello que pueden ser empleados para inferir el origen geográfico de un individuo o los de sus ancestros. Esta inferencia de la ancestría biogeográfica es útil para la identificación de individuos (Kayser y de Knijff, 2011).

Los AIMs analizados se detallan en las tablas 2.5 a) (basados en García *et al.* 2015 con diseños de *primers* propios, excepto para rs3138523 - Batzer *et al.* 1994-) y 2.5 b) (Patiño, 2021). Se analizó un total de 30 AIMs, de acuerdo con lo sugerido por Russo *et al.* (2016) para análisis de ancestría en la población argentina. Los marcadores utilizados son del tipo SNP excepto el rs3138522 (INDEL *APOA1*) y rs3138523 (ALU *PV92* -Batzer *et al.* 1994-). Los AIMs seleccionados de Patiño (2021) fueron tipificados bajo las condiciones descriptas en dicho trabajo, a excepción del buffer de PCR utilizado, la Taq polimerasa, la cantidad de ADN (entre 10 y 20 ng) y otros cambios que se detallan en la tabla 2.5 b). El volumen de siembra en acrilamida fue entre 1 y 2 μ l de amplicón, variando según la diferencia de tamaño (pb) entre fragmentos y su resolución.

Tabla 2.5 a) AIMs analizados (García *et al.* 2015). b) AIMs (Patiño 2021). Se detallan las variantes aplicadas al protocolo de Patiño (2021), celdas sombreadas. *Patiño (comunicación personal).

a)

Triplex	Gen	Marcador	Primers 5'-3'	Condiciones de PCR		Electroforesis (volumen usado y % agarosa)	Tamaño (pb)	Combinación de primers	
				C. primer (pmoles/ μ l de rx)	T annealing (°C) / Condición PCR			Mix 1	Mix 2
1	<i>W111909</i>	rs2695	FwG TATTTGTGTTGGGTGGTCTAGG FwA TATTTGTGTTGGGTGGTCGAGA Rv ATGTTTAGCAGCCATCTCACTG	0,022	60 / A	3,5 μ l agarosa 1,8%	442	A	G

	<i>TYR</i>	rs1042602	Fw CTGGCAACTTCATGGGATTCAA RvA CAATGTCTCTCCAGATTGCAT RvC CAATGTCTCTCCAGATTACAG	0,030			321	C	A
	<i>OCA2</i>	rs1800404	FwA ATCGTGACAGAACTCTCGCA FwG ATCGTGACAGAACTCTTGCG Rv TTCTGGGCAAAAACATGGACG	0,025			201	A	G
2	<i>CKM</i>	rs4884	FwC TTGGAGAAAGGCCAGTCTATC FwT TTGGAGAAAGGCCAGTCGATT Rv ACAGTGGCCAATTGCACGTC	0,035	58 / A	3,5 µl agarosa 1,8%	431	T	C
	<i>W114319</i>	rs2862	FwT AATCAAGGCACAAAGCTGAGT FwC AATCAAGGCACAAAGCTTAGC Rv TAATCCTTTGACTTGAGTGCTTA	0,025			322	C	T
	<i>ACKR1</i>	rs2814778 (se prefirió RFLP de Patiño 2021)	FwG GCGCCTGTGCTTCCTAGG FwA GCGCCTGTGCTTCCGAGA Rv CCCCACCTTTTCCTGAGTG	0,040			198	A	G
Simple								Alelos	

	<i>IL2</i>	rs2069762	FwG TCACATGTTTCAGTGTAGTTaTAG Fw T TCACATGTTTCAGTGTAGTTgTAT Rv TAGTGCAATGCAAGACAGGAG	0,025	61 / A	3,5 µl agarosa 1,8%	443	G	
								T	
ALU	<i>PV92</i>	rs3138523	Fw AACTGGGAAAATTTGAAGAGAAAGT Rv TGAGTTCTCAACTCCTGTGTGTTAG	0,030	54 / A (36 ciclos)	5 µl agarosa 1,8%	437	In	
							122	Del	

b)

AIM	Marcadores AFLP	Condiciones de PCR		Electroforesis			
		Combinado	Temperatura annealing (°C)	% Poliacrilamida	Voltaje (V)	Tiempo	Volumen de siembra (µl)
<i>FOXP1</i>	rs13069719	Solos (son del multiplex 1, en la misma acrilamida excepto OGFOD3)	52	12%	150	6 hs	3
<i>AMER1</i>	rs2065982						0,5 - 1
<i>KLHL29</i>	rs2288697		56				3
<i>OGFOD3</i>	rs7211306		52	10%	150	3 hs primera siembra, 1hr 30' segunda siembra	2
<i>AMER4</i>	rs12469563	Multiplex 2 (sin AMER2)	52	10%	150	5 hs	1,5 - 2
<i>DLGAP5</i>	rs8009244						
<i>SLC24A5</i>	rs1426654						
<i>NOTCH2</i>	rs5025718	Solos (son del multiplex 3)	61	10%	150	5 hs	2

<i>KIF3C</i>	rs2384319						
<i>SLC39A4</i>	rs1871534	Multiplex 4 (sin PTPRO)	65	10%	150 - 250	3 hs	2-3
<i>WI-9231</i>	rs2763						
<i>FLT1</i>	rs718273*	Dúplex Z	54	10%	150	4 hs primera siembra, 2 hs segunda siembra	1,5 - 2
<i>LOC105376988</i>	rs10510511						
-	rs2042314	Solos	54	12%	150	5 - 6 hs	2
<i>DAG1</i>	rs3870336						
<i>ARHGEF1</i>	rs717225*		57				
<i>MECOM</i>	rs9290363		47	10%	150	5 hs primera siembra, 3 hs segunda	2
			Electroforesis				
AIM	RFLP	Enzima	% Agarosa / Acrilamida	Voltaje (V)	Tiempo	Volumen de siembra (µl)	
<i>LPL</i>	rs285	PvuII	Agarosa 2%	85	20'	7,5	
<i>DRD2</i>	rs1800498	TaqI - v2	Agarosa 3%	85	15'	10	
<i>GC</i>	rs7041	HaeIII	Agarosa 2 - 3%	90	20'	10	
<i>WI-7423</i>	rs2816	SmaI	Acrilamida 10%	150	2 hs 30' primera siembra, 1 hr 15' segunda siembra	2	
<i>ACKR1</i>	rs2814778	StyI	Acrilamida	150	1 hr 20'	2	

			12%				
			Electroforesis				
AIM	InDel	Temperatura annealing (°C)	% Agarosa	Voltaje (V)	Tiempo	Volumen de siembra (µl)	
<i>APOA1</i>	rs3138522	60	1,8%	85	20-25'	3	
	Secuenciación	Primers	Temperatura annealing (°C)	Tamaño amplicón (pb)			
-	rs2042314	Fw GTTTCCGATTTCTGAGCGAGCA Rv GAGGGTTCTACCAAGGGAAG	62	629			

En todos los casos de *multiplex*, cuando la amplificación por PCR no fue satisfactoria, se repitieron las reacciones para dichos marcadores en forma individual.

2.6 Análisis estadístico

2.6.1 Grupos de color

2.6.1.1 Asociación entre color de iris y sexo

Para un análisis de asociación entre sexo y color de ojos, se aplicó la prueba de χ^2 al considerar 3 grupos de color, y test exacto de Fisher en el caso de las otras clasificaciones (GraphPad Prism 6).

2.6.1.2 Comparación entre cuantificación y grupos de color

Se analizó la distribución de las medidas de color (normalidad y homocedasticidad) (GraphPad Prism 6) mediante Kolmogorov-Smirnoff o Shapiro-Wilk, y test de Bartlett. Luego se realizaron análisis de ANOVA o Kruskal-Wallis según el caso para determinar la diferencia de cada variable entre los grupos, y test de Tukey o Dunn conforme cada caso (GraphPad Prism 6 y R).

2.6.2 Marcadores relacionados al color del iris

2.6.2.1 Variabilidad poblacional

2.6.2.1.1 Frecuencias alélicas

Un alelo es una de las varias formas alternativas de un gen que ocupa un locus determinado en un cromosoma. La frecuencia alélica es la proporción relativa de un alelo determinado respecto al total de alelos que pueden ocupar el locus en cierta población:

$p = \text{frecuencia del alelo A} = (2 \times \text{cantidad de homocigotas A} + \text{cantidad de heterocigotas}) / (2 \times \text{total de individuos})$

$q = \text{frecuencia del alelo a} = (2 \times \text{cantidad de homocigotas a} + \text{cantidad de heterocigotas}) / (2 \times \text{total de individuos})$

Se cumple que $p + q = 1$

Estas frecuencias fueron calculadas con el software Arlequin v3.5 (Excoffier y Lischer, 2010).

2.6.2.1.2 Frecuencias genotípicas

Se refiere a las proporciones de los distintos genotipos (combinación de alelos) de un locus respecto a los genotipos totales

$f = \text{frecuencia genotípica} = \text{número de individuos con cierto genotipo} / \text{total de individuos}$.

Las frecuencias genotípicas fueron calculadas con el software SNPStats (Solé *et al.*, 2006).

2.6.2.1.3 Equilibrio de Hardy-Weinberg

La ley de Hardy-Weinberg fue enunciada por el matemático inglés Godfrey Harold Hardy y el médico alemán Wilhelm Weinberg independientemente en 1908. Esta ley describe el estado de equilibrio de un locus en una población diploide con cruzamiento al azar (panmíctica) que no es afectada por mutación, migración, deriva génica, selección natural ni endogamia. En tal caso, para formar un cigoto, se requieren dos gametas al azar; así, la probabilidad de encontrar un individuo homocigota en la descendencia es el producto de las probabilidades de que cada una de las gametas porten el alelo en cuestión. Por otro lado, la probabilidad de que un individuo sea heterocigota es igual a dos veces el producto de las probabilidades de que una gameta posea un alelo y la otra gameta porte la otra variante, ya que son eventos mutuamente excluyentes.

La concordancia de una distribución de genotipos con el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) se estimó con el programa Arlequin v3.5 mediante el test exacto, utilizando 1.000.000 de pasos de la cadena de Markov (nivel de significación α = límite del p-valor/número de marcadores analizados. Para marcadores de iris= $0,05/41= 0,00122$, luego de la corrección de Bonferroni teniendo en cuenta sólo los marcadores polimórficos). Como la fase gamética no es conocida, se realiza locus por locus.

2.6.2.1.4 Asociación entre color de iris y SNPs

Se realizó un análisis de cada SNP de forma individual para:

-2 grupos de color: se utilizó χ^2 o Fisher según el caso y se calculó el OR agrupando el color azul e intermedio como “casos” y considerando los ojos marrones como “grupo control”. Alternativamente, se analizó tomando a los azules clasificados por las observadoras como casos (SNPStats).

-3 grupos de color: se realizó χ^2 o test de Fisher (Stata 14, StataCorp 2015) para los 3 grupos según clasificación de las observadoras, y análisis de residuos estandarizados como test post-hoc.

Se consideró como alelo de riesgo a los alelos informados en la bibliografía como asociados al color azul, y en el caso de no disponer de dicha información, se eligió uno de los dos alelos al azar.

También se analizó la asociación respecto a los genotipos.

2.6.2.1.5 Asociación entre la cuantificación del color y SNPs

Se analizó la posible asociación entre los 10 SNPs de iris tipificados en la totalidad de la muestra poblacional (según presencia/ausencia del alelo de riesgo) y la cuantificación del color del iris, específicamente para ΔE y L^* , a^* y b^* promedio (es decir, teniendo en cuenta a todo el iris) y separado en iris pupilar y ciliar. Se realizó este análisis mediante un modelo lineal generalizado (GLM, Stata 14).

2.6.2.1.6 Desequilibrio de ligamiento

La correlación estadística entre diferentes polimorfismos localizados cercanamente en el mismo cromosoma se denomina Desequilibrio de Ligamiento (DL). El ligamiento se refiere a la herencia correlacionada de dos o más loci dada por la conexión física en un cromosoma, mientras que el DL se trata de la correlación entre los alelos de dichos loci en una población. El análisis de poblaciones mezcladas puede revelar patrones distintos de DL, pudiendo ser diferentes que los observados en las poblaciones fundadoras.

El DL se calculó para los marcadores de todos los genes secuenciados analizando cada uno por separado, excepto para el caso de *OCA2* y *HERC2*, donde se analizaron ambos genes juntos por la cercanía de sus loci. Se utilizó el software SNPStats.

2.6.2.1.7 Haplotipos

Un haplotipo es un conjunto de marcadores estrechamente relacionados presentes en un cromosoma y que tienden a heredarse juntos. Desconociendo la fase gamética, los haplotipos se infieren por medio de 2 métodos posibles: el algoritmo ELB (bayesiano) o el algoritmo EM (de máxima verosimilitud, correspondiente a la estimación estadística mediante el algoritmo esperanza-maximización). Éste último es un método estadístico para tratar variables no observadas (en este caso, la proporción de individuos con cada posible haplotipo), y el utilizado para inferir haplotipos en este trabajo (Excoffier *et al.*, 2003).

Se infirieron los haplotipos para los genes *HERC2* y *OCA2* juntos, sólo respecto a los 6 SNPs contenidos en los mismos que fueron tipificados para los 302 individuos. Se utilizó el software SNPStats.

2.6.2.1.8 Asociación entre color de iris y haplotipos

Esta asociación se determinó a partir de los haplotipos inferidos (genes *HERC2* y *OCA2* juntos), tomando como casos los grupos de color de iris azul e intermedio, y como controles los individuos con iris color marrón (regresión logística, software SNPStats).

2.6.2.1.9 Comparación con otras poblaciones según los SNPs de color

Se compararon las distribuciones de los 10 SNPs de color completos para los 302 bonaerenses, con información de bases de datos de población africana, europea y nativa americana (se detallarán en la sección 2.6.3.2.1). Se calculó el EHW, *Fst* y se compararon las heterocigosis esperadas. Se utilizó el software Arlequín v3.5.

2.6.3 AIMs

2.6.3.1 Variabilidad poblacional

Se calcularon las frecuencias alélicas, genotípicas y el EHW como se detalla en las secciones 2.6.2.1.1 a 2.6.2.1.3. Respecto al EHW, el nivel de significación $\alpha = \text{límite del p-valor} / \text{número de marcadores analizados}$, fue $\alpha = 0,05/28 = 0,00179$ para AIMs, luego de la corrección de Bonferroni teniendo en cuenta sólo los marcadores polimórficos.

2.6.3.2 Estructura poblacional

El análisis de estructura poblacional evalúa la distribución de la variación genética. Los archivos de entrada para los softwares Structure y Arlequin, se adaptaron mediante el programa GA-TA (Gamboa Lerena *et al.*, 2020).

2.6.3.2.1 Estimación de ancestría y composición poblacional

Para inferir la proporción de ancestría individual, se utilizó información genética de la fase 3 de 1000 Genomes (1KG, The 1000 Genomes Project Consortium, 2015), ALFRED (the Allele Frequency Database) disponible en <http://alfred.med.yale.edu> (Osier *et al.*, 2001) y HGDP (Proyecto de Diversidad del Genoma Humano, Cann *et al.* 2002). Las poblaciones utilizadas fueron:

-europeas: poblaciones ibéricas en España -IBS- y poblaciones toscanas en Italia -TSI-: 214 individuos (1KG)

-nativas americanas: Pima, Maya, Piapoco, Curripaco, Karitiana y Surui: 64 individuos (HGDP)

-africanas: Gambia en la División Occidental, Gambia -GWD-, Esan en Nigeria -ESN- y Mende en Sierra Leona -MSL-: 297 individuos (1KG).

En los casos en los que los genotipos no se encontraban disponibles en HGDP o 1KG sino que la información se presentaba como frecuencias alélicas (ALFRED o bibliografía -Seldin *et al.*, 2007; Duque *et al.*, 2012-), se procedió a calcular las frecuencias alélicas ponderadas, simular los genotipos según el EHW y aplicar la función de aleatorización en Excel (Patiño, 2021). Para el caso de los europeos, esto significó incluir las poblaciones de Galicia y Francia. Para los nativos, las poblaciones Guihíba, Quechua, Ticuna, Ache, Ayoreo y Chimila, según el marcador a analizar. Para los africanos, las poblaciones de Tswana, Nguni y Yoruba.

El análisis se realizó utilizando todos los AIMs, y luego sólo los que se encontraban en EHW. Este análisis se realizó con el software Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000), asumiendo un modelo de mezcla y frecuencias alélicas correlacionadas (Falush *et al.*, 2003), para valores de K entre 2 y 5 (10.000 *burn-in-period*, 1000 repeticiones, $\alpha=0,33=1/k$ -según Wang, 2017-, 39 *seeds*, 10 iteraciones).

Structure modela una mezcla poblacional e individual, con un enfoque bayesiano (Shriver *et al.*, 2003). Se utilizó un modelo que incorpora la posibilidad de mezcla entre poblaciones, para poder asignar individuos de manera probabilística a más de una población (Fejerman *et al.*, 2005).

Para determinar el número óptimo de K (número de grupos genéticos que mejor se ajustan a los datos, es decir, el número más probable de poblaciones parentales) se utilizó la metodología del número de agrupamientos más probable según Evanno *et al.* (2005). Para aplicar esta metodología se utilizó el sitio web Structure Harvester (Earl and von Holdt, 2012).

Los gráficos obtenidos con Structure corresponden a un gráfico de barras, donde cada barra vertical representa un individuo y muestra K colores según las poblaciones parentales asumidas. La longitud de cada color representa el porcentaje inferido de ancestría de cada individuo. Otro tipo de gráfico es el triangular, donde se representan 3 *clusters*, y la posición relativa de cada individuo (representado como un punto de color) respecto a cada cluster.

También se calculó la normalidad de la totalidad de la muestra respecto a las 3 ancestrías (Kolmogorov-Smirnov), y el percentil 75 para separar la muestra entre “europeos” y “no europeos” (GraphPad Prism 6).

2.6.3.2.1.1 Comparación de los grupos de color según la ancestría

Se analizó la distribución de cada ancestría según los grupos de color del iris (normalidad según Shapiro-Wilk o Kolmogorov-Smirnov según el caso, GraphPad Prism 6), y se realizó un test de Kruskal-Wallis y test post hoc de Dunn con el software R.

2.6.3.2.1.2 Asociación entre color de iris y ancestría

Se realizó un análisis de χ^2 para estudiar la asociación entre ancestría (según percentil 75 de la ancestría europea) y los grupos de color ($p < 0,20$, análisis exploratorio). A su vez, se realizó una regresión logística con el fin de estudiar si la ancestría resulta ser un factor de confusión respecto a la predicción del color. Se consideró como condición “de riesgo” a la ancestría “no europea”.

2.6.3.2.2 Subestructura y estratificación

La estratificación existe cuando las subpoblaciones que la constituyen presentan diferencias entre sus frecuencias alélicas, en comparación con la población total. Esto es importante al momento de determinar una asociación genotipo-fenotipo, ya que la misma puede aparecer por la subestructura poblacional *per se* y no por una asociación real (Pritchard y Donnelly, 2001). Por ello, este tipo de estudios es importante a la hora de analizar asociaciones y utilizarlas en la predicción de fenotipos, como el color del iris. Se analizó la posible estratificación de la muestra con el software Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000), de la misma manera que se describió anteriormente, teniendo en cuenta sólo la población de Buenos Aires.

2.6.3.2.3 Análisis de la varianza molecular (AMOVA)

El análisis de varianza molecular evalúa la cantidad de estructura genética poblacional. En nuestro caso, se realiza con datos genotípicos (no haplotípicos) incluyendo el componente intra-individual de diversidad genética. Así, tiene en cuenta las diferencias génicas entre individuos y es otra manera de analizar de forma global el desvío respecto al EHW (Arlequin v3.5). Se realizó un AMOVA *locus-by-locus* ya que es el indicado para marcadores no ligados como son los AIMs (Fitzpatrick, 2009; Borrell *et al.*, 2012), incluyendo a la población de Buenos Aires y las parentales.

2.6.3.2.4 *Fst*

El *Fst* de Wright mide el porcentaje de variación genética debida a las diferencias entre poblaciones o grupos de individuos. Los valores que puede tomar este índice van de 0 a 1, siendo 0 indicativo de ausencia de subdivisión dentro de la población total. Un valor alto se observa, en cambio, en una población constituida por subpoblaciones que mantienen un escaso flujo génico, lo cual hace que existan diferencias entre ellas. Se calcularon con el software Arlequin v3.5.

2.6.4 Análisis general: color de iris, SNPs, ancestría y sexo

Para analizar la probabilidad de obtener un color de iris respecto a otro/s, se realizaron regresiones logísticas con los SNPs, el sexo y la ancestría como variables explicativas, tanto para 2 grupos como para 3 (regresión logística y regresión logística multinomial o RLM, respectivamente, Stata 14), tomando en cuenta la presencia/ausencia del alelo de riesgo.

Se realizó el mismo análisis para el caso de los genotipos, sólo con los SNPs que fueron significativos según el alelo de riesgo.

Se consideraron significativos aquellos con un p -valor $< 0,20$, por ser éste un análisis exploratorio.

2.7 Predicción del color de iris

2.7.1 IrisPlex

Se realizó la predicción del color de ojos para cada muestra utilizando el algoritmo IrisPlex incluido en la herramienta en línea HIrisPlex-S (<https://hirisplex.erasmusmc.nl/>) (Walsh *et al.*, 2014, 2017; Chaitanya *et al.*, 2018). Los SNPs incluidos son el rs12913832, rs12203592, rs12896399, rs1393350, rs16891982 y el rs1800407. Para este análisis no se consideró un valor umbral para las predicciones, ya que las muestras se clasificaron en base al valor de probabilidad más alto entre las categorías (Marano *et al.*, 2019; Salvoró *et al.*, 2019). Las predicciones se compararon con el color de iris previamente definido.

2.7.2 Snipper

Se realizó la predicción con el sistema Snipper (Ruiz *et al.*, 2013; <http://mathgene.usc.es/snipper/eyeclassifier.html>). Se realizaron las predicciones eligiendo alternativamente uno de los ocho modelos presentados por los autores: 7 SNPs (los presentes en el IrisPlex más el rs1129038) o 13 SNPs de los cuales 9 están tipificados en este trabajo (rs12913832, rs1129038, rs12203592, rs12896399, rs1393350, rs16891982, rs1800407, rs4778232, rs7183877), teniendo en cuenta o no el ligamiento entre rs12913832 y rs1129038. A su vez, se eligió alternativamente entre el clasificador bayesiano (Ruiz *et al.*, 2013) o la regresión logística multinomial (RLM, <http://mathgene.usc.es/snipper/eyeclassifier.html>). Para definir la predicción, se consideró el color que presentó mayor porcentaje (Salvoró *et al.*, 2019).

Todas las predicciones se compararon con el color de iris previamente definido.

En resumen, se predijo el color a partir de 6 (sistema IrisPlex), 7 y 9 SNPs (método Snipper).

2.7.3 Evaluación de los métodos de predicción de color

Se evaluó la precisión de los modelos determinando el área bajo la curva (AUC) de característica operativa del receptor (ROC) con el software R (paquete *pROC*, Robin *et al.*,

2011), a partir de la sensibilidad (S) y la especificidad (E), y los valores predictivos positivos (PPV) y negativos (NPV).

$S = [\text{verdaderos positivos} / (\text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos})] * 100$. Es el porcentaje de predicciones positivas correctas de un grupo de color respecto a todas las muestras observadas de dicho color.

$E = [\text{verdaderos negativos} / (\text{verdaderos negativos} + \text{falsos positivos})] * 100$. Es el porcentaje de predicciones negativas correctas respecto a todas las muestras negativas (es decir, que no están clasificadas dentro de ese grupo de color).

$PPV = [\text{verdaderos positivos} / (\text{verdaderos positivos} + \text{falsos positivos})] * 100$. Es el porcentaje de las predicciones positivas correctas sobre todas las predicciones positivas.

$NPV = [\text{verdaderos negativos} / (\text{verdaderos negativos} + \text{falsos negativos})] * 100$. Es el porcentaje de las predicciones negativas correctas sobre todas las predicciones negativas.

Se analizó la diferencia entre dichas AUC (test de DeLong para 2 curvas ROC).

2.7.4 Asociación entre predicción y ancestría

Se realizaron tablas de contingencia y análisis de χ^2 para estudiar una posible asociación entre las predicciones tanto del IrisPlex como del Snipper y la ancestría de los individuos (GraphPad Prism 6).

CAPÍTULO 3

Resultados



CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Color

3.1.1 Clasificación en grupos de color

La clasificación del color del iris en dos grupos dio como resultado 49 individuos de color azul (A) y 253 de color marrón (M), mientras que la clasificación en tres grupos dio como resultado 22 individuos de iris color azul, 153 intermedios y 127 marrones (figura 3.1, tabla 3.1). La correlación entre lo informado por las tres observadoras resultó en un ICC = 0,852 con un p-valor = $1,9e^{-120}$, lo que indica que no hubo diferencias entre las habilidades de categorización de las tres personas.

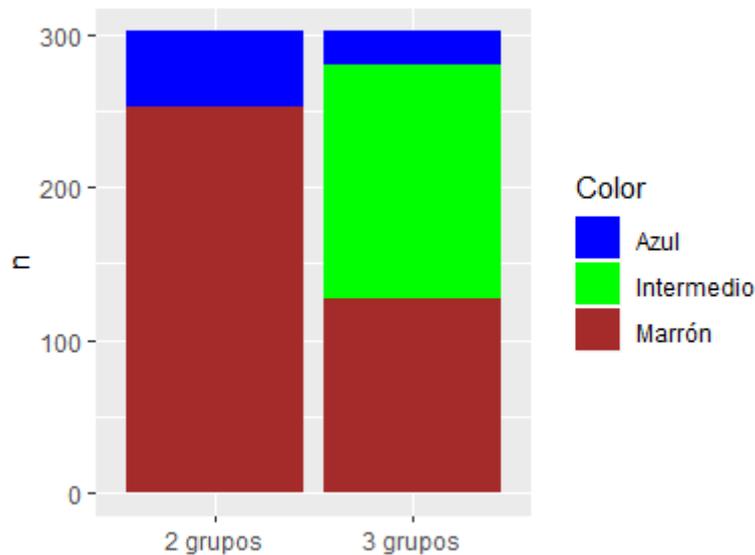


Figura 3.1 Gráfico de barras apiladas representando las categorías de color. n= número de individuos.

Al considerar 2 grupos de color, se utilizaron dos criterios: por un lado, se tomó en cuenta la clasificación realizada a partir de las observaciones; y por otro lado, se sumaron los grupos azul e intermedio con el fin de balancear el tamaño muestral con el grupo de color marrón.

Tabla 3.1 Distribución de los individuos según color (2 y 3 grupos según clasificación de 3 observadoras, y 2 grupos sumando los individuos de azul e intermedio) y sexo.

Color	Mujeres	Hombres	Total
2 grupos			
Azul	40	9	49
Marrón	160	93	253
Total	200	102	302
3 grupos			

Azul	18	4	22
Intermedio	104	49	153
Marrón	78	49	127
Total	200	102	302
2 grupos (sumando A e I de 3 grupos)			
Azul + Intermedio	122	53	175
Marrón	78	49	127
Total	200	102	302

3.1.2 Asociación entre color de iris y sexo

La asociación del color de ojos con el sexo resultó no significativa para la clasificación de los tres grupos de color (p -valor = 0,1413) y al comparar el agrupamiento de azul con intermedio contra marrón (p -valor= 0,1408). Sin embargo, al analizar el sexo de los individuos clasificados en dos grupos de color, el resultado fue significativo [p -valor= 0,0132; OR (*odds ratio*)= 2,60, riesgo de tener ojos azules siendo mujer vs. siendo hombre, IC= (1,20 - 5,56)].

3.1.3 Cuantificación del color

En cuanto a la cuantificación de color, se compararon 8 imágenes tomadas tanto en balance de blancos automático como tungsteno en formato TIFF y se encontraron diferencias significativas en el valor a^* (tanto ciliar - p -valor=0,0078 - como pupilar - p -valor= 0,0035 -), demostrando que tomar las imágenes de estas dos maneras resulta en diferencias significativas en el color de la imagen.

Luego, se realizó el mismo análisis para esas mismas muestras, entre dichas imágenes y las corregidas por el DPP de automático a tungsteno, en formato TIFF. Se vieron diferencias significativas en el valor a^* ciliar y pupilar (p -valor < 0,0001) entre las imágenes transformadas y las tomadas en automático.

Esta diferencia dejó de ser significativa al comparar las imágenes transformadas con las tomadas en tungsteno (p -valor= 0,8374 para a^* ciliar, y p -valor=0,1364 para a^* pupilar), por lo cual se consideró que la transformación a tungsteno fue exitosa y eliminó la disparidad en la cuantificación de color dada por el balance de blancos no homogéneo.

De esta manera, se procedió a trabajar con las cuantificaciones de las imágenes transformadas a balance de blanco tungsteno y las tomadas originalmente en tungsteno, sin diferenciar entre ellas.

Se muestra la distribución de los valores de L^* , a^* , b^* , tanto ciliar como pupilar, y el ΔE , en toda la muestra (figuras 3.2 a-g).

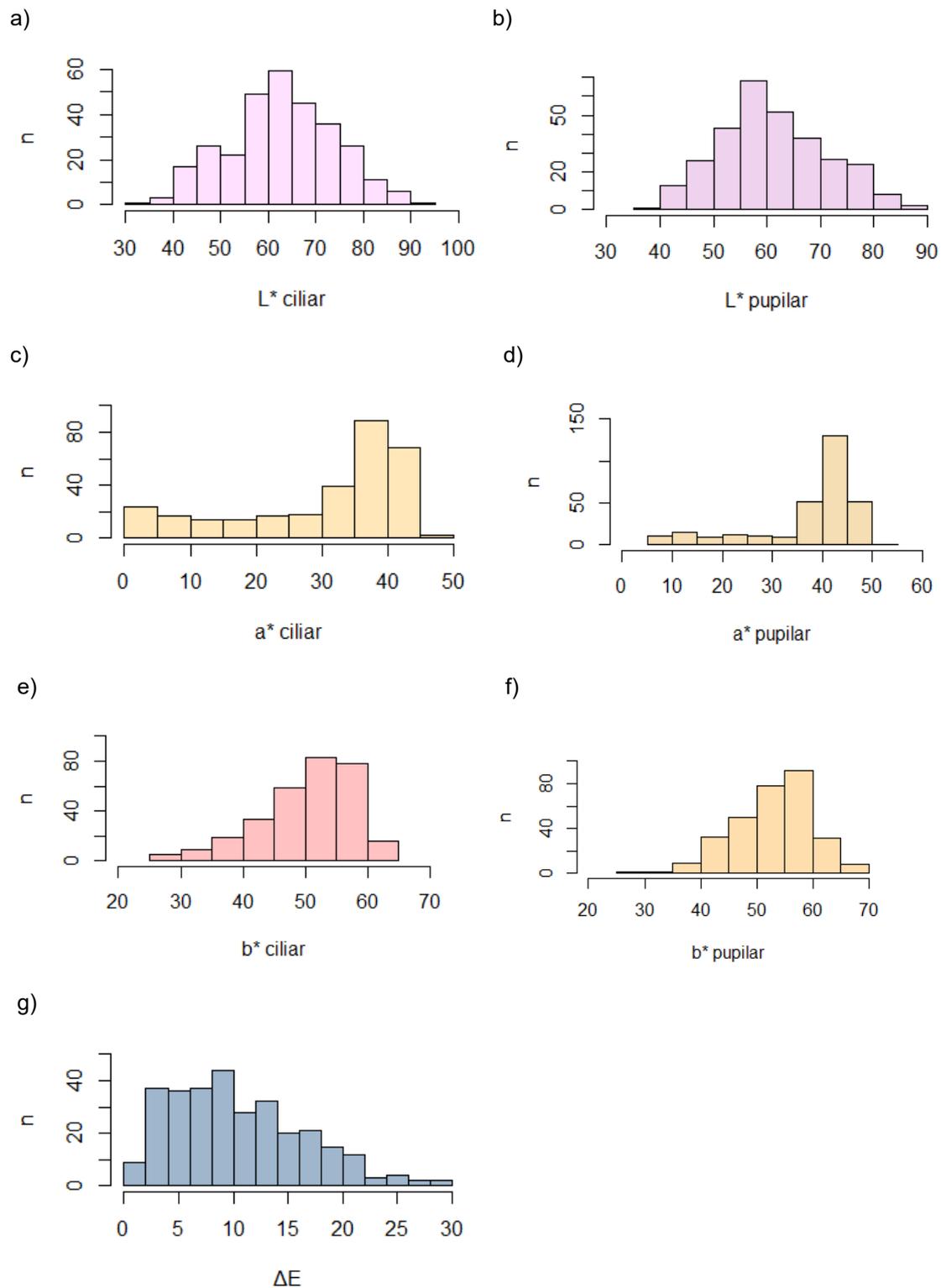
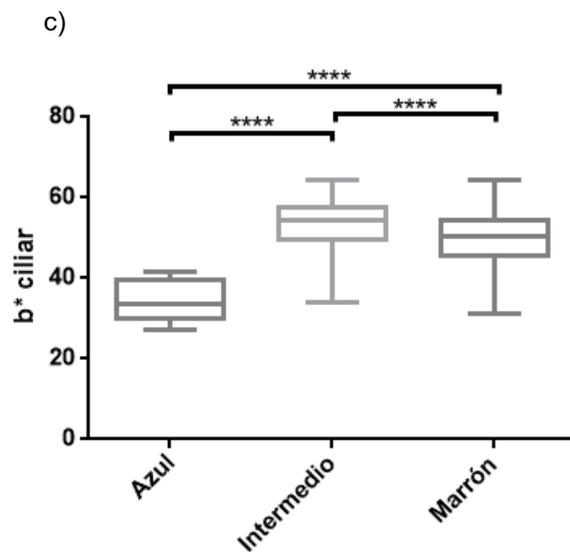
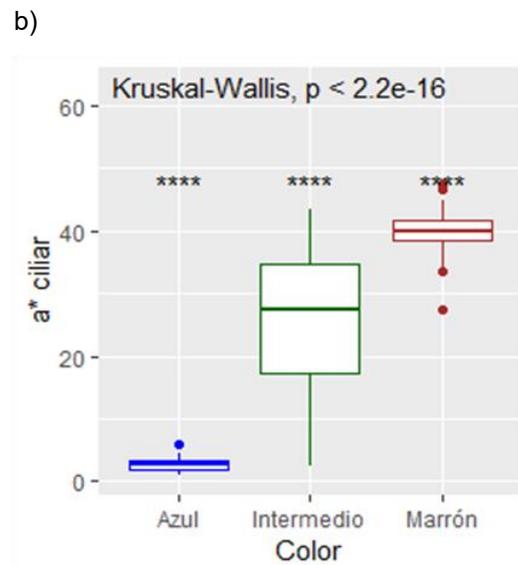
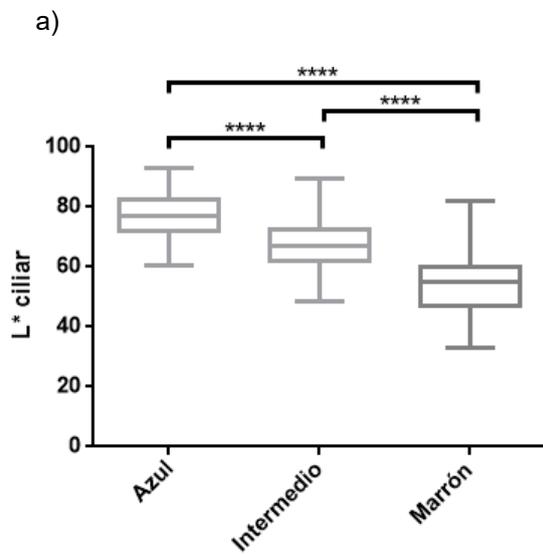


Figura 3.2 Histogramas mostrando la distribución de L*, a*, b* y ΔE .

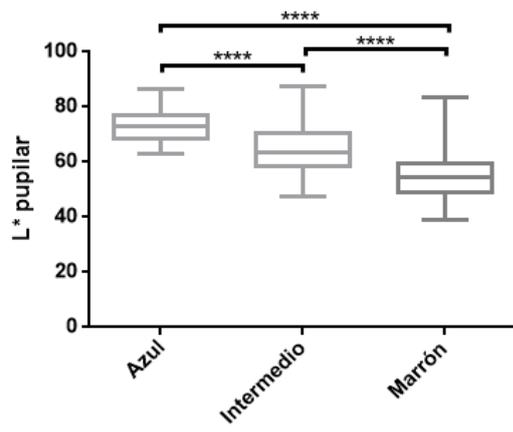
Respecto a la muestra total, la variable que resultó con una distribución normal fue L* ciliar (p-valor= 0,2).

3.1.4 Comparación entre cuantificación y grupos de color

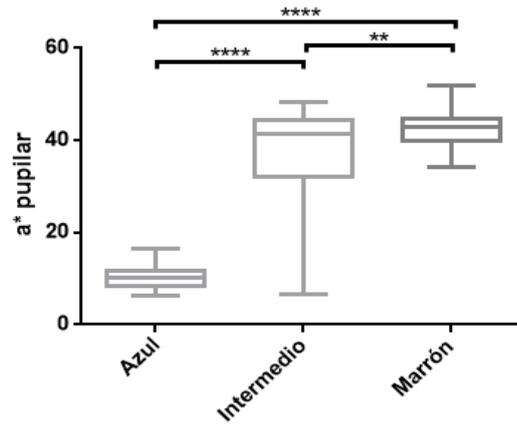
Las características de distribución de las variables en los grupos separados por color (A, I y M) condujeron a los diferentes tests de comparación entre los grupos (figuras 3.3 a-j). Se observan diferencias entre los grupos en la mayoría de las medidas.



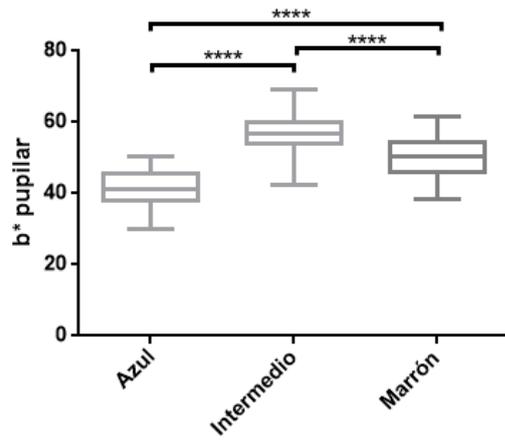
d)



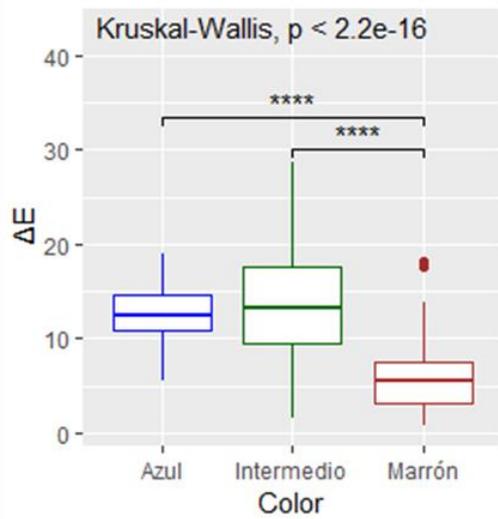
e)



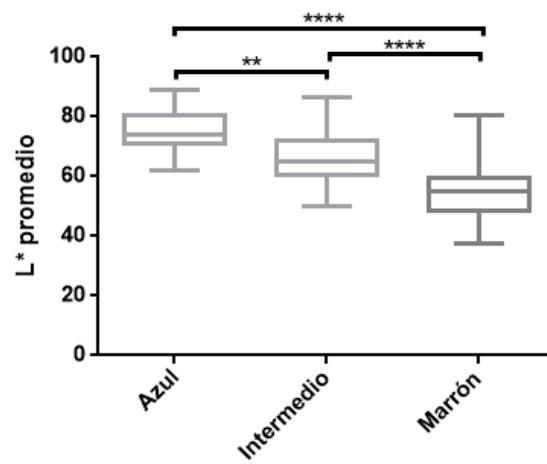
f)



g)



h)



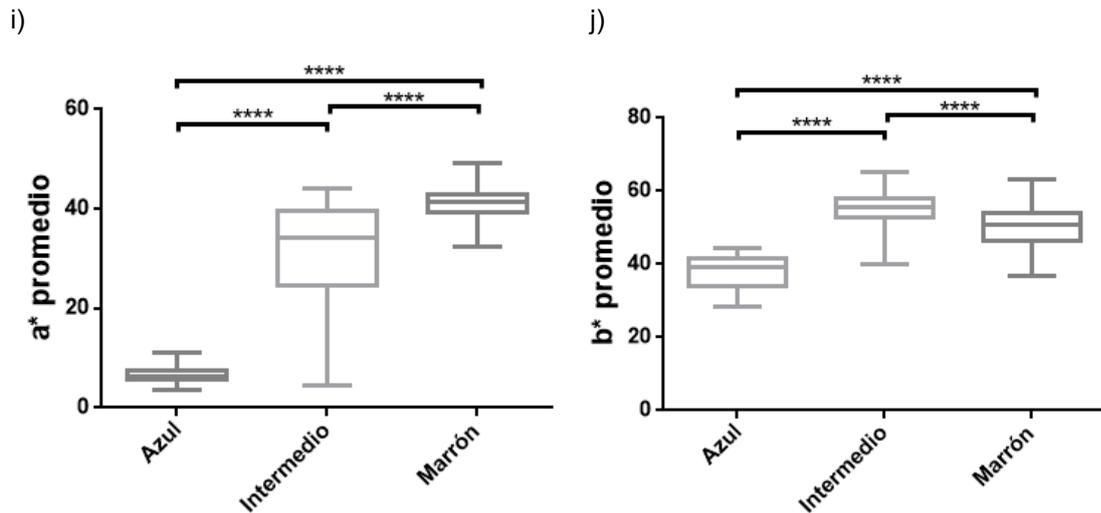


Figura 3.3. Comparación de las diferentes medidas de color entre los 3 grupos. a, c, d, e, f, h, i, j: ANOVA. b y g: Kruskal-Wallis.

3.2 SNPs relacionados al color de iris

3.2.1 Frecuencias alélicas, genotípicas y equilibrio de Hardy-Weinberg

En la figura 3.4 se muestran las fotografías de los geles correspondientes a las electroforesis de algunos marcadores relacionados al color del iris que se analizaron en este trabajo.

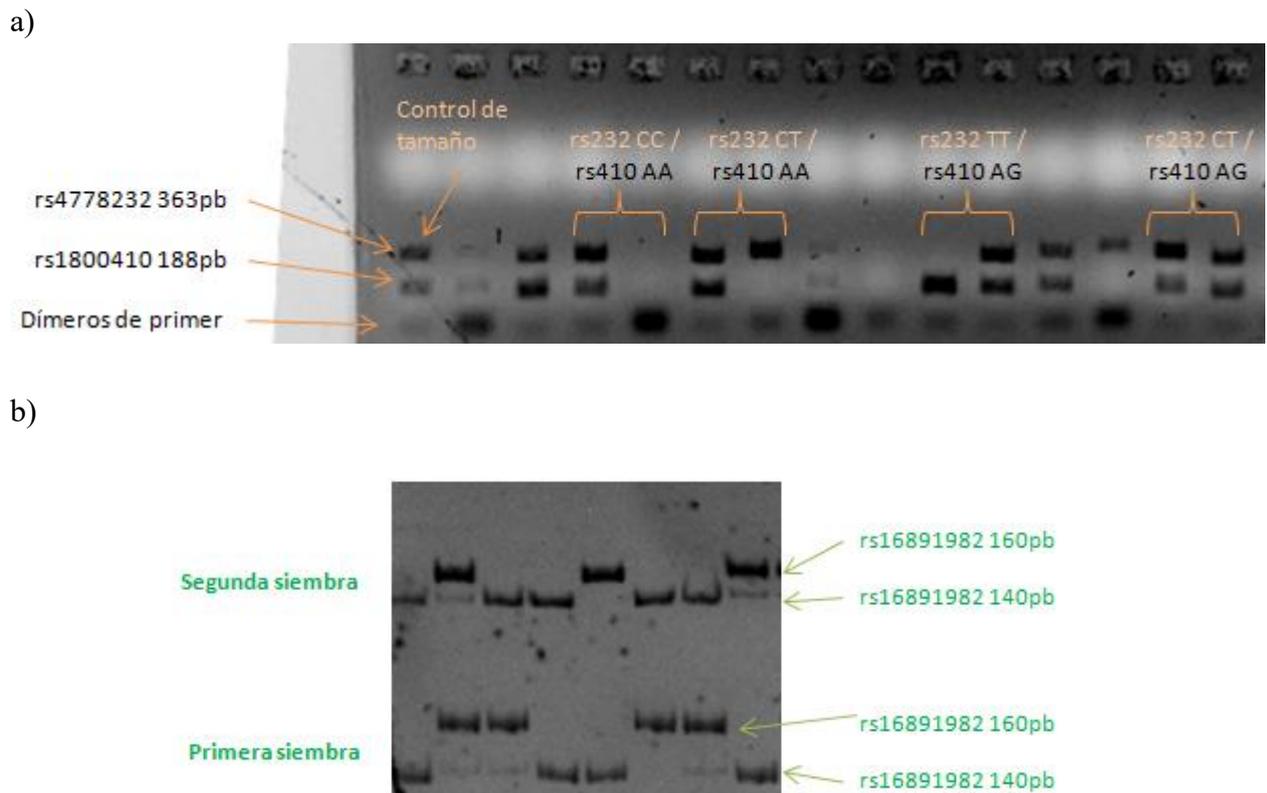


Figura 3.4 a) electroforesis en agarosa del dúplex *OCA2*. b) electroforesis en acrilamida al 8% del marcador rs16891982 (*SLC45A2*).

En la tabla 3.2 se presentan las frecuencias alélicas y genotípicas de estos marcadores. Se encontraron en muy baja frecuencia ciertos alelos como rs35397*G, rs2278007*G, rs35398*T, rs12203592*T, rs1393350*A, rs12437047*G, rs74653330*A, rs141662330*T, rs1800407*A, rs6497271*A y rs7183877*A. El rs121918166 resultó monomórfico. Los SNPs con mayor heterocigosis observada (mayor a 0,4) fueron: rs1900758, rs12910433, rs12913832, rs4778232 y rs1129038.

Tabla 3.2. Frecuencias alélicas y genotípicas para los SNPs de color de iris en la población bonaerense, obtenidos por secuenciación y por PCR alelo-específica. Las celdas a color indican los SNPs tipificados en el total de individuos de la muestra.

Gen	Cromosoma	SNP	Ubicación	N	Alelo	Frecuencia	Genotipo	Frecuencia
<i>SLC45A2</i>	5	rs35397	33951011	56	G	0,16964	GG	0,11
					T	0,83036	GT	0,12
							TT	0,77
		rs2278007	33951446	62	A	0,95968	AA	0,92
					G	0,040323	AG	0,08
							GG	0
		rs16891982	33951588	302	C	0,27483	CC	0,13
					G	0,72517	CG	0,28
							GG	0,58
		rs35398	33951721	61	G	0,86885	GG	0,79
					T	0,13115	GT	0,18
							TT	0,03

		rs1364038	33951956	40	A	0,025	AA	0
					C	0,975	AC	0,05
							CC	0,95
		rs185145	33951987	7	A	0,85714	AA	0,71
					G	0,14286	AG	0,29
							GG	0
		rs185146	33952001	7	C	0,21429	CC	0,14
					T	0,78571	CT	0,14
							TT	0,72
		rs250417	33952273	7	C	0,85714	CC	0,71
					G	0,14286	CG	0,29
							GG	0
<i>IRF4</i>	6	rs12203592	396321	302	C	0,87086	CC	0,76
					T	0,12914	CT	0,21
							TT	0,02
<i>TYR</i>	11	rs1393350	89277878	302	A	0,1904	AA	0,05
					G	0,8096	AG	0,28

							GG	0,67
<i>LOC105370627</i> (<i>LOC</i>)	14	rs12436973	92306906	11	A	0,95455	AA	0,91
					G	0,045455	AG	0,09
							GG	0
		rs142020658	92306935	73	A	0,97945	AA	0,96
					G	0,020548	AG	0,04
							GG	0
		rs8021744	92306951	79	C	0,93038	CC	0,87
					T	0,06962	CT	0,11
							TT	0,02
		rs12437047	92307068	81	C	0,90741	CC	0,83
					G	0,092593	CG	0,16
							GG	0,01
		rs12896399	92307319	302	G	0,66225	GG	0,46
					T	0,33775	GT	0,4
							TT	0,14
rs12896471	92307559	81	C	0,69136	CC	0,52		

					G	0,30864	CG	0,35
							GG	0,13
OCA2	15	rs74653330	27983407	62	A	0,0080645	AA	0
					G	0,99194	AG	0,02
							GG	0,98
		rs12910433	27983498	62	C	0,41129	CC	0,18
					T	0,58871	CT	0,47
							TT	0,35
		rs141662330	27984882	117	C	0,97436	CC	0,95
					T	0,025641	CT	0,05
							TT	0
		rs1900758	27984951	117	A	0,51282	AA	0,26
					G	0,48718	AG	0,5
							GG	0,24
rs1800410	27985038	302	A	0,77483	AA	0,61		
			G	0,22517	AG	0,33		
					GG	0,06		

		rs121918166	27985101	120	G	1	GG	1
		rs1800407	27985172	302	A	0,071192	AA	0,01
					G	0,92881	AG	0,12
							GG	0,87
		rs117886461	27985232	120	C	0,99583	CC	0,99
					T	0,0041667	CT	0,01
							TT	0
		rs36032918	27985348	120	G	0,0083333	GG	0
					T	0,99167	GT	0,02
							TT	0,98
		rs182658649	27985407	111	G	0,98649	GG	0,97
					T	0,013514	GT	0,03
							TT	0
		rs145662614	28036587	81	A	0,0061728	AA	0
					G	0,99383	AG	0,01
							GG	0,99
		rs4778232	28036619	302	C	0,63245	CC	0,41

					T	0,36755	CT	0,44
							TT	0,15
		rs118163203	28036682	81	C	0,0061728	CC	0
					T	0,99383	CT	0,01
							TT	0,99
		rs74005202	28036813	78	C	0,012821	CC	0
					T	0,98718	CT	0,03
							TT	0,97
		rs74007903	28036835	78	A	0,98718	AA	0,97
					G	0,012821	AG	0,03
							GG	0
		rs74007904	28036841	78	C	0,98718	CC	0,97
					G	0,012821	CG	0,03
							GG	0
		rs75102342	28036843	78	C	0,019231	CC	0
					T	0,98077	CT	0,04
							TT	0,96

		rs17680684	28036950	77	A	0,12987	AA	0,03
					G	0,87013	AG	0,21
							GG	0,77
		rs72712656	28037045	77	C	0,064935	CC	0,02
					T	0,93506	CT	0,1
							TT	0,88
<i>HERC2</i>	15	rs540317226	28111580	82	C	0,9878	CC	0,98
					T	0,012195	CT	0,02
							TT	0
		rs1129038	28111713	302	C	0,62417	CC	0,41
					T	0,37583	CT	0,42
							TT	0,17
		rs148711194	28111880	82	A	0,0060976	AA	0
					G	0,9939	AG	0,01
							GG	0,99
		rs4778245	28112084	82	C	0,97561	CC	0,95
T	0,02439				CT	0,05		

							TT	0
		rs6497271	28120285	144	A	0,034722	AA	0
					G	0,96528	AG	0,07
							GG	0,93
		rs12913832	28120472	302	A	0,61921	AA	0,4
					G	0,38079	AG	0,44
							GG	0,16
		rs7183877	28120587	302	A	0,15894	AA	0,05
					C	0,84106	AC	0,23
							CC	0,73

En la tabla 3.3 se presenta el análisis de EHW. De los SNPs analizados, la mayoría se ajustaron al EHW a excepción de dos ubicados en el gen *SLC45A2* (rs35397 y rs16891982).

Tabla 3.3 Análisis del EHW para los SNPs de iris en la población bonaerense. Het.: heterocigosis. d.s.: desvío estándar. *Fuera del EHW según corrección de Bonferroni ($\alpha = 0,00122$). Las celdas a color indican los SNPs tipificados en el total de individuos de la muestra.

Gen	SNP	Número de genotipos	Het. Observada	Het. Esperada	p-valor	d.s.
<i>SLC45A2</i>	rs35397	56	0,125	0,28427	0,00026*	0,00002
	rs2278007	62	0,08065	0,07802	1	0
	rs16891982	302	0,28477	0,39926	0*	0
	rs35398	61	0,19672	0,22978	0,25536	0,00044
	rs1364038	40	0,05	0,04937	1	0
	rs185145	7	0,28571	0,26374	1	0
	rs185146	7	0,14286	0,36264	0,22996	0,00042
	rs250417	7	0,28571	0,26374	1	0
<i>IRF4</i>	rs12203592	302	0,21192	0,2253	0,30693	0,0005
<i>TYR</i>	rs1393350	302	0,27483	0,3088	0,06154	0,00024
<i>LOC105370627</i>	rs12436973	11	0,09091	0,09091	1	0
	rs142020658	73	0,0411	0,04053	1	0
	rs8021744	79	0,11392	0,13037	0,31097	0,00046
	rs12437047	81	0,16049	0,16908	0,51026	0,00048
	rs12896399	302	0,39735	0,44809	0,05524	0,00025

	rs12896471	81	0,34568	0,42941	0,11427	0,0003
OCA2	rs74653330	62	0,01613	0,01613	1	0
	rs12910433	62	0,46774	0,4882	0,79665	0,00039
	rs141662330	117	0,05128	0,05018	1	0
	rs1900758	117	0,49573	0,50182	1	0
	rs1800410	302	0,33113	0,34951	0,40598	0,00053
	rs121918166	120	Monomórfico			
	rs1800407	302	0,12252	0,13247	0,17979	0,00037
	rs117886461	120	0,00833	0,00833	1	0
	rs36032918	120	0,01667	0,0166	1	0
	rs182658649	111	0,02703	0,02678	1	0
	rs145662614	81	0,01235	0,01235	1	0
	rs4778232	302	0,43709	0,46568	0,32228	0,00045
	rs118163203	81	0,01235	0,01235	1	0
	rs74005202	78	0,02564	0,02548	1	0
	rs74007903	78	0,02564	0,02548	1	0
	rs74007904	78	0,02564	0,02548	1	0
	rs75102342	78	0,03846	0,03797	1	0
rs17680684	77	0,20779	0,22748	0,60288	0,00049	

	rs72712656	77	0,1039	0,12223	0,26774	0,00045
<i>HERC2</i>	rs540317226	82	0,02439	0,02424	1	0
	rs1129038	302	0,42053	0,46994	0,0873	0,00028
	rs148711194	82	0,0122	0,0122	1	0
	rs4778245	82	0,04878	0,04788	1	0
	rs6497271	144	0,06944	0,06727	1	0
	rs12913832	302	0,44371	0,47236	0,32769	0,00049
	rs7183877	302	0,22517	0,2678	0,00934	0,0001

Al secuenciar fragmentos del gen *OCA2*, se relevaron en algunos individuos variantes intrónicas que no se encontraron informadas en las bases de datos dbSNP, gnomAD y GeneCards (figuras 3.5 y 3.6).

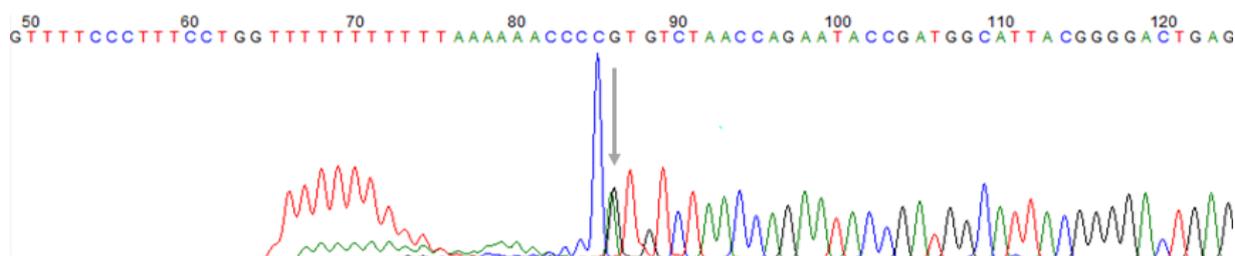


Figura 3.5 Electroferograma mostrando posible polimorfismo en la posición 27985505 (flecha) del cromosoma 15. Individuo AG.

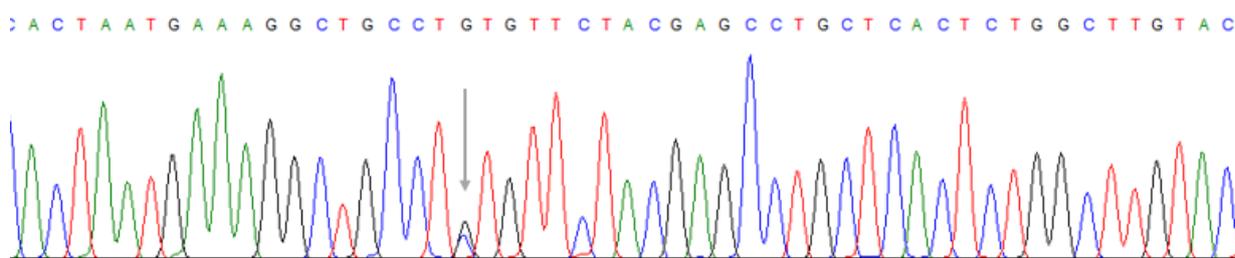


Figura 3.6 Electroferograma mostrando posible polimorfismo en la posición 27985244 (flecha) del cromosoma 15. Individuo GC, demás individuos CC.

3.2.2 Asociación entre el color del iris y SNPs

En las tablas 3.4 y 3.5 se presentan los resultados de la asociación genotipo-fenotipo, SNP por SNP individual, para los colores en 2 grupos.

Resultó más informativo el análisis en 2 grupos con azul e intermedio juntos (se encontraron más asociaciones en dicho caso).

Los SNPs presentes en el IrisPlex se encontraron asociados al color, excepto el rs1800407 y el rs12896399. Respecto al rs12203592 y el rs1393350, la asociación se perdió al analizar en 2 grupos separados como azules y marrones.

En algunos casos no se puede informar el IC debido a que no hay casos con el alelo contrario al de riesgo, como ocurre por ejemplo con el rs12913832.

Al analizar genotipos, algunas asociaciones se pierden por particionar la muestra.

Tabla 3.4 Análisis de asociación con color, SNP por SNP, según ausencia o presencia de alelo de riesgo. a) Análisis de χ^2 o Fisher de los individuos en 2 grupos de color, sumando los grupos intermedio y azul para los casos. b) Análisis de χ^2 o Fisher de los individuos en 2 grupos de color, siendo los casos el grupo de color de iris azul según la clasificación en 2 grupos por las 3 observadoras. †: Alelo de riesgo según bibliografía. OR: *odds ratio*. NA: *not applicable*. * $p < 0,05$

a)						b)		
Gen	SNP/alelo de riesgo	Genotipos	M	A+I	OR (IC 95%)	M	A	OR (IC 95%)
<i>SLC45A2</i>	rs35397/G	G/G-G/T	6 (25%)	7 (21,9%)	0,84 (0,24-2,92)	11 (23,9%)	2 (20%)	0,80 (0,15-4,32)
		T/T	18 (75%)	25 (78,1%)		35 (76,1%)	8 (80%)	
	rs2278007/G	A/G	4 (14,3%)	1 (2,9%)	0,18 (0,02-1,73)	5 (9,6%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		A/A	24 (85,7%)	33 (97,1%)		47 (90,4%)	10 (100%)	
	rs16891982/G†	C/C	29 (22,8%)	11 (6,3%)	4,41 (2,11-9,23)*	39 (15,4%)	1 (2%)	8,74 (1,17-65,25)*
		C/G-G/G	98 (77,2%)	164 (93,7%)		214 (84,6%)	48 (98%)	
	rs35398/T	G/G	18 (66,7%)	30 (88,2%)	0,27 (0,07-0,99)*	39 (76,5%)	9 (90%)	0,36 (0,04-3,15)
		G/T-T/T	9 (33,3%)	4 (11,8%)		12 (23,5%)	1 (10%)	
	rs1364038/A	A/C	0 (0%)	2 (9,1%)	NA (0,00-NA)	2 (6,2%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		C/C	18 (100%)	20 (90,9%)		30 (93,8%)	8 (100%)	
	rs185145/G	A/G	2 (50%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)	2 (28,6%)	0 (0%)	1,00 (0,00-NA)
		A/A	2 (50%)	3 (100%)		5 (71,4%)	0 (0%)	
	rs185146/C	C/C-C/T	2 (50%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)	2 (28,6%)	0 (0%)	1,00 (0,00-NA)

		T/T	2 (50%)	3 (100%)		5 (71,4%)	0 (0%)	
	rs250417/G	C/C	2 (50%)	3 (100%)	0,00 (0,00-NA)	5 (71,4%)	0 (0%)	1,00 (0,00-NA)
		C/G	2 (50%)	0 (0%)		2 (28,6%)	0 (0%)	
<i>IRF4</i>	rs12203592/T†	C/C	110 (86,6%)	121 (69,1%)	2,89 (1,58-5,28)*	196 (77,5%)	35 (71,4%)	1,38 (0,69-2,73)
		C/T-T/T	17 (13,4%)	54 (30,9%)		57 (22,5%)	14 (28,6%)	
<i>TYR</i>	rs1393350/A†	A/A-A/G	34 (26,8%)	66 (37,7%)	1,66 (1,01-2,72)*	80 (31,6%)	20 (40,8%)	1,49 (0,80-2,80)
		G/G	93 (73,2%)	109 (62,3%)		173 (68,4%)	29 (59,2%)	
<i>LOC105370627</i>	rs12436973/G	A/G	0 (0%)	1 (16,7%)	NA (0,00-NA)	1 (10%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		A/A	5 (100%)	5 (83,3%)		9 (90%)	1 (100%)	
	rs142020658/G	A/G	1 (2,8%)	2 (5,4%)	2,00 (0,17-23,08)	3 (4,8%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		A/A	35 (97,2%)	35 (94,6%)		60 (95,2%)	10 (100%)	
	rs8021744/T	C/C	35 (89,7%)	6 (15%)	1,54 (0,40-5,96)	59 (86,8%)	10 (90,9%)	0,66 (0,07-5,75)
		C/T-T/T	4 (10,3%)	34 (85%)		9 (13,2%)	1 (9,1%)	
	rs12437047/G	C/C	35 (87,5%)	32 (78%)	1,97 (0,60-6,50)	58 (82,9%)	9 (81,8%)	1,07 (0,21-5,61)
		C/G-G/G	5 (12,5%)	9 (21,9%)		12 (17,1%)	2 (18,2%)	
	rs12896399/T†	G/G	61 (48%)	79 (45,1%)	1,12 (0,71-1,78)	123 (48,6%)	17 (34,7%)	1,78 (0,94-3,37)
		G/T-T/T	66 (52%)	96 (54,9%)		130 (51,4%)	32 (65,3%)	

	rs12896471	C/C	18 (45%)	24 (58,5%)	0,58 (0,24-1,40)	36 (51,4%)	6 (54,5%)	0,88 (0,25-3,16)
		C/G-G/G	22 (55%)	17 (41,5%)		34 (48,6%)	5 (45,5%)	
OCA2	rs74653330/A†	A/G	1 (3,6%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)	1 (1,9%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		G/G	27 (96,4%)	34 (100%)		52 (98,1%)	9 (100%)	
	rs12910433/C	C/C-C/T	20 (71,4%)	20 (58,8%)	0,57 (0,20-1,66)	35 (66%)	5 (55,6%)	0,64 (0,15-2,69)
		T/T	8 (28,6%)	14 (41,2%)		18 (34%)	4 (44,4%)	
	rs141662330/T	C/C	53 (96,4%)	58 (93,5%)	1,83 (0,32-10,39)	94 (94%)	17 (100%)	0,00 (0,00-NA)
		C/T	2 (3,6%)	4 (6,5%)		6 (6%)	0 (0%)	
	rs1900758/A	A/A-A/G	36 (65,5%)	53 (85,5%)	3,11 (1,26-7,54)*	73 (73%)	16 (94,1%)	5,92 (0,75-46,80)
		G/G	19 (34,5%)	9 (14,5%)		27 (27%)	1 (5,9%)	
	rs1800410/G	A/A	72 (56,7%)	112 (64%)	0,74 (0,46-1,18)	150 (59,3%)	34 (69,4%)	0,64 (0,33-1,24)
		A/G-G/G	55 (43,3%)	63 (36%)		103 (40,7%)	15 (30,6%)	
	rs1800407/A†	A/A-A/G	15 (11,8%)	25 (14,3%)	1,24 (0,63-2,47)	34 (13,4%)	6 (12,2%)	0,90 (0,36-2,27)
		G/G	112 (88,2%)	150 (85,7%)		219 (86,6%)	43 (87,8%)	
rs117886461/T	C/C	57 (100%)	62 (98,4%)	NA (0,00-NA)	102 (99%)	17 (100%)	0,00 (0,00-NA)	
	C/T	0 (0%)	1 (1,6%)		1 (1%)	0 (0%)		
rs36032918/G	G/T	1 (1,8%)	1 (1,6%)	0,90 (0,06-14,78)	2 (1,9%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)	

		T/T	56 (98,2%)	62 (98,4%)		101 (98,1%)	17 (100%)	
rs182658649/T		G/G	52 (98,1%)	56 (96,5%)	1,86 (0,16-21,09)	94 (96,9%)	14 (100%)	0,00 (0,00-NA)
		G/T	1 (1,9%)	2 (3,5%)		3 (3,1%)	0 (0%)	
rs145662614/A		A/G	1 (2,5%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)	1 (1,4%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		G/G	39 (97,5%)	41 (100%)		69 (98,6%)	11 (100%)	
rs4778232/C		C/C-C/T	101 (79,5%)	156 (89,1%)	2,11 (1,11-4,02)*	210 (83%)	47 (95,9%)	4,81 (1,13-20,57)*
		T/T	26 (20,5%)	19 (10,9%)		43 (17%)	2 (4,1%)	
rs118163203/C		C/T	0 (0%)	1 (2,4%)	NA (0,00-NA)	1 (1,4%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		T/T	40 (100%)	40 (97,6%)		69 (98,6%)	11 (100%)	
rs74005202/C		C/T	1 (2,6%)	1 (2,6%)	1,00 (0,06-16,58)	2 (3%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		T/T	38 (97,4%)	38 (97,4%)		65 (97%)	11 (100%)	
rs74007903/G		A/A	38 (97,4%)	38 (97,4%)	1,00 (0,06-16,58)	65 (97%)	11 (100%)	0,00 (0,00-NA)
		A/G	1 (2,6%)	1 (2,6%)		2 (3%)	0 (0%)	
rs74007904/G		C/C	38 (97,4%)	38 (97,4%)	1,00 (0,06-16,58)	65 (97%)	11 (100%)	0,00 (0,00-NA)
		C/G	1 (2,6%)	1 (2,6%)		2 (3%)	0 (0%)	
rs75102342/C		C/T	2 (5,1%)	1 (2,6%)	0,49 (0,04-5,60)	3 (4,5%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		T/T	37 (94,9%)	38 (97,4%)		64 (95,5%)	11 (100%)	

	rs17680684/A	A/A-A/G	10 (26,3%)	8 (20,5%)	0,72 (0,25-2,09)	17 (25,8%)	1 (9,1%)	0,29 (0,03-2,42)
		G/G	28 (73,7%)	31 (79,5%)		49 (74,2%)	10 (90,9%)	
	rs72712656/C	C/C-C/T	4 (10,5%)	5 (12,8%)	1,25 (0,31-5,06)	7 (10,6%)	2 (18,2%)	1,87 (0,34-10,47)
		T/T	34 (89,5%)	34 (87,2%)		59 (89,4%)	9 (81,8%)	
<i>HERC2</i>	rs540317226/T	C/C	39 (97,5%)	41 (97,6%)	0,95 (0,06-15,74)	68 (97,1%)	12 (100%)	0,00 (0,00-NA)
		C/T	1 (2,5%)	1 (2,4%)		2 (2,9%)	0 (0%)	
	rs1129038/T†	C/C	84 (66,1%)	41 (23,4%)	6,38 (3,84-10,60)*	125 (49,4%)	0 (0%)	NA (0,00-NA)*
		C/T-T/T	43 (33,9%)	134 (76,6%)		128 (50,6%)	49 (100%)	
	rs148711194/A	A/G	0 (0%)	1 (2,4%)	NA (0,00-NA)	1 (1,4%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		G/G	40 (100%)	41 (97,6%)		69 (98,6%)	12 (100%)	
	rs4778245/T	C/C	37 (92,5%)	41 (97,6%)	0,30 (0,03-3,02)	66 (94,3%)	12 (100%)	0,00 (0,00-NA)
		C/T	3 (7,5%)	1 (2,4%)		4 (5,7%)	0 (0%)	
	rs6497271/A	A/G	8 (11,8%)	2 (2,6%)	0,20 (0,04-0,99)*	10 (8,2%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		G/G	60 (88,2%)	74 (97,4%)		112 (91,8%)	22 (100%)	
	rs12913832/G†	A/A	82 (64,6%)	38 (21,7%)	6,57 (3,94-10,95)*	120 (47,4%)	0 (0%)	NA (0,00-NA)*
		A/G-G/G	45 (35,4%)	137 (78,3%)		133 (52,6%)	49 (100%)	
rs7183877/C†	A/A	10 (7,9%)	4 (2,3%)	3,65 (1,12-	14 (5,5%)	0 (0%)	NA (0,00-NA)	

		A/C-C/C	117 (92,1%)	171 (97,7%)	11,93)*	239 (94,5%)	49 (100%)	
--	--	---------	-------------	-------------	---------	-------------	-----------	--

Tabla 3.5 Análisis de asociación con color, SNP por SNP, según genotipo. a) Análisis de χ^2 o Fisher de los individuos en 2 grupos de color, sumando los grupos intermedio y azul para los casos. b) Análisis de χ^2 o Fisher de los individuos en 2 grupos de color, siendo los casos el grupo de color de iris azul según la clasificación en 2 grupos por las 3 observadoras. NA: *not applicable*. *p<0,05

a)						b)		
Gen	SNP	Genotipo	M	A+I	OR (IC 95%)	M	A	OR (IC 95%)
SLC45A2	rs35397	GG	3 (12,5%)	3 (9,4%)	0,72 (0,13-3,99)	5 (10,9%)	1 (10%)	0,87 (0,09-8,56)
		GT	3 (12,5%)	4 (12,5%)	0,96 (0,19-4,83)	6 (13%)	1 (10%)	0,73 (0,08-6,93)
		TT	18 (75%)	25 (78,1%)	1	35 (76,1%)	8 (80%)	1
	rs2278007	AA	24 (85,7%)	33 (97,1%)	1	47 (90,4%)	10 (100%)	1
		AG	4 (14,3%)	1 (2,9%)	0,18 (0,02-1,73)	5 (9,6%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		GG	-	-	-	-	-	-
	rs16891982	CC	29 (22,8%)	11 (6,3%)	1	39 (15,4%)	1 (2%)	1
		GC	45 (35,4%)	41 (23,4%)	2,4 (1,07-5,42)*	76 (30%)	10 (20,4%)	5,13 (0,63-41,55)
		GG	53 (41,7%)	123 (70,3%)	6,12 (2,85-13,15)*	138 (54,5%)	38 (77,5%)	10,74 (1,43-80,72)*
	rs35398	GG	18 (66,7%)	30 (88,2%)	1	39 (76,5%)	9 (90%)	1
		GT	7 (25,9%)	4 (11,8%)	0,34 (0,09-1,34)	10 (19,6%)	1 (10%)	0,43 (0,05-3,83)
		TT	2 (7,4%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)	2 (3,9%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)

	rs1364038	AA	-	-	-	-	-	-
		AC	0 (0%)	2 (9,1%)	NA (0,00-NA)	2 (6,2%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		CC	18 (100%)	20 (90,9%)	1	30 (93,8%)	8 (100%)	1
	rs185145	AA	2 (50%)	3 (100%)	1	5 (71,4%)	0 (NaN%)	1
		AG	2 (50%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)	2 (28,6%)	0 (NaN%)	1,00 (0,00-NA)
		GG	-	-	-	-	-	-
	rs185146	CC	1 (25%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)	1 (14,3%)	0 (NaN%)	1,00 (0,00-NA)
		CT	1 (25%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)	1 (14,3%)	0 (NaN%)	1,00 (0,00-NA)
		TT	2 (50%)	3 (100%)	1	5 (71,4%)	0 (NaN%)	1
	rs250417	CC	2 (50%)	3 (100%)	1	5 (71,4%)	0 (NaN%)	1
		CG	2 (50%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)	2 (28,6%)	0 (NaN%)	1,00 (0,00-NA)
		GG	-	-	-	-	-	-
<i>IRF4</i>	rs12203592	CC	110 (86,6%)	121 (69,1%)	1	196 (77,5%)	35 (71,4%)	1
		CT	16 (12,6%)	48 (27,4%)	2,73 (1,46-5,08)*	52 (20,6%)	12 (24,5%)	1,29 (0,63-2,66)
		TT	1 (0,8%)	6 (3,4%)	5,45 (0,65-46,02)	5 (2%)	2 (4,1%)	2,24 (0,42-12,00)
<i>TYR</i>	rs1393350	AA	5 (3,9%)	11 (6,3%)	1,88 (0,63-5,60)	14 (5,5%)	2 (4,1%)	0,85 (0,18-3,95)
		AG	29 (22,8%)	55 (31,4%)	1,62 (0,95-2,74)	66 (26,1%)	18 (36,7%)	1,63 (0,85-3,13)

		GG	93 (73,2%)	109 (62,3%)	1	173 (68,4%)	29 (59,2%)	1
LOC105370627	rs12436973	AA	5 (100%)	5 (83,3%)	1	9 (90%)	1 (100%)	1
		AG	0 (0%)	1 (16,7%)	NA (0,00-NA)	1 (10%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		GG	-	-	-	-	-	-
	rs142020658	AA	35 (97,2%)	35 (94,6%)	1	60 (95,2%)	10 (100%)	1
		AG	1 (2,8%)	2 (5,4%)	2,00 (0,17-23,08)	3 (4,8%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		GG	-	-	-	-	-	-
	rs8021744	CC	35 (89,7%)	34 (85%)	1	59 (86,8%)	10 (90,9%)	1
		CT	4 (10,3%)	5 (12,5%)	1,29 (0,32-5,20)	9 (13,2%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		TT	0 (0%)	1 (2,5%)	NA (0,00-NA)	0 (0%)	1 (9,1%)	NA (0,00-NA)
	rs12437047	CC	35 (87,5%)	32 (78%)	1	58 (82,9%)	9 (81,8%)	1
		CG	5 (12,5%)	8 (19,5%)	1,75 (0,52-5,90)	12 (17,1%)	1 (9,1%)	0,54 (0,06-4,65)
		GG	0 (0%)	1 (2,4%)	NA (0,00-NA)	0 (0%)	1 (9,1%)	NA (0,00-NA)
	rs12896399	GG	61 (48%)	79 (45,1%)	1	123 (48,6%)	17 (34,7%)	1
		GT	52 (40,9%)	68 (38,9%)	1,01 (0,62-1,65)	96 (37,9%)	24 (49%)	1,81 (0,92-3,56)
		TT	14 (11%)	28 (16%)	1,54 (0,75-3,18)	34 (13,4%)	8 (16,3%)	1,70 (0,68-4,28)
rs12896471	CC	18 (45%)	24 (58,5%)	1	36 (51,4%)	6 (54,5%)	1	

		CG	18 (45%)	10 (24,4%)	0,42 (0,16-1,12)	26 (37,1%)	2 (18,2%)	0,46 (0,09-2,47)
		GG	4 (10%)	7 (17,1%)	1,31 (0,33-5,18)	8 (11,4%)	3 (27,3%)	2,25 (0,46-10,96)
OCA2	rs74653330	AA	-	-	-	-	-	-
		AG	1 (3,6%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)	1 (1,9%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		GG	27 (96,4%)	34 (100%)	1	52 (98,1%)	9 (100%)	1
	rs12910433	CC	4 (14,3%)	7 (20,6%)	1,00 (0,22-4,50)	10 (18,9%)	1 (11,1%)	0,45 (0,04-4,59)
		CT	16 (57,1%)	13 (38,2%)	0,46 (0,15-1,45)	25 (47,2%)	4 (44,4%)	0,72 (0,16-3,27)
		TT	8 (28,6%)	14 (41,2%)	1	18 (34%)	4 (44,4%)	1
	rs141662330	CC	53 (96,4%)	58 (93,5%)	1	94 (94%)	17 (100%)	1
		CT	2 (3,6%)	4 (6,5%)	1,83 (0,32-10,39)	6 (6%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		TT	-	-	-	-	-	-
	rs1900758	AA	11 (20%)	20 (32,3%)	3,84 (1,30-11,32)*	24 (24%)	7 (41,2%)	7,88 (0,90-41,27)
		AG	25 (45,5%)	33 (53,2%)	2,79 (1,08-7,19)*	49 (49%)	9 (52,9%)	4,96 (0,60-41,27)
		GG	19 (34,5%)	9 (14,5%)	1	27 (27%)	1 (5,9%)	1
	rs1800410	AA	72 (56,7%)	112 (64%)	1	150 (59,3%)	34 (69,4%)	1
		AG	45 (35,4%)	55 (31,4%)	0,79 (0,48-1,29)	85 (33,6%)	15 (30,6%)	0,78 (0,40-1,51)
		GG	10 (7,9%)	8 (4,6%)	0,51 (0,19-1,36)	18 (7,1%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)

	rs1800407	AA	2 (1,6%)	1 (0,6%)	0,37 (0,03-4,17)	3 (1,2%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		AG	13 (10,2%)	24 (13,7%)	1,38 (0,67-2,83)	31 (12,2%)	6 (12,2%)	0,99 (0,39-2,51)
		GG	112 (88,2%)	150 (85,7%)	1	219 (86,6%)	43 (87,8%)	1
	rs117886461	CC	57 (100%)	62 (98,4%)	1	102 (99%)	17 (100%)	1
		CT	0 (0%)	1 (1,6%)	NA (0,00-NA)	1 (1%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		TT	-	-	-	-	-	-
	rs36032918	GG	-	-	-	-	-	-
		GT	1 (1,8%)	1 (1,6%)	0,90 (0,06-14,78)	2 (1,9%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		TT	56 (98,2%)	62 (98,4%)	1	101 (98,1%)	17 (100%)	1
	rs182658649	GG	52 (98,1%)	56 (96,5%)	1	94 (96,9%)	14 (100%)	1
		GT	1 (1,9%)	2 (3,5%)	1,86 (0,16-21,09)	3 (3,1%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		TT	-	-	-	-	-	-
	rs145662614	AA	-	-	-	-	-	-
		AG	1 (2,5%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)	1 (1,4%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		GG	39 (97,5%)	41 (100%)	1	69 (98,6%)	11 (100%)	1
	rs4778232	CC	48 (37,8%)	77 (44%)	2,20 (1,1-4,39)*	97 (38,3%)	28 (57,1%)	6,21 (1,41-27,23)*
		CT	53 (41,7%)	79 (45,1%)	2,04 (1,03-4,05)	113 (44,7%)	19 (38,8%)	3,62 (0,81-16,20)

		TT	26 (20,5%)	19 (10,9%)	1	43 (17%)	2 (4,1%)	1
	rs118163203	CC	-	-	-	-	-	-
		CT	0 (0%)	1 (2,4%)	NA (0,00-NA)	1 (1,4%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		TT	40 (100%)	40 (97,6%)	1	69 (98,6%)	11 (100%)	1
	rs74005202	CC	-	-	-	-	-	-
		CT	1 (2,6%)	1 (2,6%)	1,00 (0,06-16,58)	2 (3%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		TT	38 (97,4%)	38 (97,4%)	1	65 (97%)	11 (100%)	1
	rs74007903	AA	38 (97,4%)	38 (97,4%)	1	65 (97%)	11 (100%)	1
		AG	1 (2,6%)	1 (2,6%)	1,00 (0,06-16,58)	2 (3%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		GG	-	-	-	-	-	-
	rs74007904	CC	38 (97,4%)	38 (97,4%)	1	65 (97%)	11 (100%)	1
		CG	1 (2,6%)	1 (2,6%)	1,00 (0,06-16,58)	2 (3%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		GG	-	-	-	-	-	-
	rs75102342	CC	-	-	-	-	-	-
		CT	2 (5,1%)	1 (2,6%)	0,49 (0,04-5,60)	3 (4,5%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		TT	37 (94,9%)	38 (97,4%)	1	64 (95,5%)	11 (100%)	1
	rs17680684	AA	1 (2,6%)	1 (2,6%)	0,90 (0,05-15,13)	2 (3%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)

		AG	9 (23,7%)	7 (17,9%)	0,70 (0,23-2,14)	15 (22,7%)	1 (9,1%)	0,33 (0,04-2,76)
		GG	28 (73,7%)	31 (79,5%)	1	49 (74,2%)	10 (90,9%)	1
	rs72712656	CC	0 (0%)	1 (2,6%)	NA (0,00-NA)	1 (1,5%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		CT	4 (10,5%)	4 (10,3%)	1,00 (0,23-4,33)	6 (9,1%)	2 (18,2%)	2,19 (0,38-12,54)
		TT	34 (89,5%)	34 (87,2%)	1	59 (89,4%)	9 (81,8%)	1
HERC2	rs540317226	CC	39 (97,5%)	41 (97,6%)	1	68 (97,1%)	12 (100%)	1
		CT	1 (2,5%)	1 (2,4%)	0,95 (0,06-15,74)	2 (2,9%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		TT	-	-	-	-	-	-
	rs1129038	CC	84 (66,1%)	41 (23,4%)	1	125 (49,4%)	0 (0%)	1
		CT	42 (33,1%)	85 (48,6%)	4,15 (2,45-7,01)*	114 (45,1%)	13 (26,5%)	NA (0,00-NA)*
		TT	1 (0,8%)	49 (28%)	100,39 (13,39-752,76)*	14 (5,5%)	36 (73,5%)	NA (0,00-NA)*
	rs148711194	AA	-	-	-	-	-	-
		AG	0 (0%)	1 (2,4%)	NA (0,00-NA)	1 (1,4%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		GG	40 (100%)	41 (97,6%)	1	69 (98,6%)	12 (100%)	1
	rs4778245	CC	37 (92,5%)	41 (97,6%)	1	66 (94,3%)	12 (100%)	1
		CT	3 (7,5%)	1 (2,4%)	0,30 (0,03-3,02)	4 (5,7%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		TT	-	-	-	-	-	-

	rs6497271	AA	-	-	-	-	-	-
		AG	8 (11,8%)	2 (2,6%)	1	10 (8,2%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)
		GG	60 (88,2%)	74 (97,4%)	4,93 (1,01-24,12)*	112 (91,8%)	22 (100%)	1
	rs12913832	AA	82 (64,6%)	38 (21,7%)	1	120 (47,4%)	0 (0%)	1
		AG	45 (35,4%)	89 (50,9%)	4,27 (2,52-7,22)*	121 (47,8%)	13 (26,5%)	NA (0,00-NA)*
		GG	0 (0%)	48 (27,4%)	NA (0,00-NA)*	12 (4,7%)	36 (73,5%)	NA (0,00-NA)*
	rs7183877	AA	10 (7,9%)	4 (2,3%)	1	14 (5,5%)	0 (0%)	1
		AC	38 (29,9%)	30 (17,1%)	1,97 (0,56-6,92)	66 (26,1%)	2 (4,1%)	0,00 (0,00-NA)
		CC	79 (62,2%)	141 (80,6%)	4,46 (1,36-14,69)*	173 (68,4%)	47 (95,9%)	0,00 (0,00-NA)*

En las tablas 3.6 y 3.7 se presentan los resultados de la asociación genotipo-fenotipo, SNP por SNP individual, en 3 grupos. Se encontraron asociados al color los SNPs del IrisPlex excepto el rs1800407, rs12896399 y el rs1393350.

Al analizar genotipos, en comparación con el análisis de alelos, se pierden asociaciones significativas debido a la mayor partición de la muestra, tanto en grupos como en los genotipos analizados.

Tabla 3.6 Análisis de asociación con color, SNP por SNP, según ausencia o presencia de alelo de riesgo. Análisis de χ^2 o Fisher de los individuos en 3 grupos de color. †: Alelo de riesgo según bibliografía. *p<0,05. ^asignificativo según análisis *post-hoc*.

Gen	SNP/alelo de riesgo	Genotipos	A	I	M	p-valor
<i>SLC45A2</i>	rs35397/G	G/G-G/T	0	7	6	0,786
		T/T	4	21	18	
	rs2278007/G	A/G	0	1	4	0,322
		A/A	4	29	24	
	rs16891982/G†	C/C	0	11	29	0*
		C/G-G/G	22	142 ^a	98 ^a	
	rs35398/T	G/G	4	26	18	0,123
		G/T-T/T	0	4	9	
	rs1364038/A	A/C	0	2	0	0,562
		C/C	3	17	18	
	rs185145/G	A/G	0	0	2	0,429
		A/A	0	3	2	
	rs185146/C	C/C-C/T	0	0	2	0,429
		T/T	0	3	2	
rs250417/G	C/C	0	3	2	0,429	
	C/G	0	0	2		
<i>IRF4</i>	rs12203592/T†	C/C	16	105 ^a	110 ^a	0,002*
		C/T-T/T	6	48	17	
<i>TYR</i>	rs1393350/A†	A/A-A/G	10	56	34	0,097

		G/G	12	97	93		
<i>LOC105370627</i>	rs12436973/G	A/G	0	1	0	1	
		A/A	0	5	5		
	rs142020658/G	A/G	0	2	1	0,676	
		A/A	5	30	35		
	rs8021744/T	C/C	4	30	35	0,647	
		C/T-T/T	1	5	4		
	rs12437047/G	C/C	4	28	35	0,445	
		C/G-G/G	1	8	5		
	rs12896399/T†	G/G	7	72	61	0,36	
		G/T-T/T	15	81	66		
	rs12896471	C/C	3	21	18	0,525	
		C/G-G/G	2	15	22		
	<i>OCA2</i>	rs74653330/A†	A/G	0	0	1	0,5
			G/G	3	31	27	
rs12910433/C		C/C-C/T	1	19	20	0,335	
		T/T	2	12	8		
rs141662330/T		C/C	7	51	53	0,78	
		C/T	0	4	2		
rs1900758/A		A/A-A/G	7	46 ^a	36	0,03*	
		G/G	0	9	19		
rs1800410/G		A/A	18	94	72	0,082	
		A/G-G/G	4	59	55		
rs1800407/A†		A/A-A/G	2	23	15	0,696	
		G/G	20	130	112		
rs117886461/T		C/C	7	55	57	0,525	
		C/T	0	1	0		

	rs36032918/G	G/T	0	1	1	1
		T/T	7	55	56	
	rs182658649/T	G/G	6	50	52	0,677
		G/T	0	2	1	
	rs145662614/A	A/G	0	0	1	1
		G/G	5	36	39	
	rs4778232/C	C/C-C/T	20	136	101	0,078
		T/T	2	17	26	
	rs118163203/C	C/T	0	1	0	0,506
		T/T	5	35	40	
	rs74005202/C	C/T	0	1	1	1
		T/T	5	33	38	
	rs74007903/G	A/A	5	33	38	1
		A/G	0	1	1	
	rs74007904/G	C/C	5	33	38	1
		C/G	0	1	1	
	rs75102342/C	C/T	0	1	2	1
		T/T	5	33	37	
	rs17680684/A	A/A-A/G	0	8	10	0,645
		G/G	5	26	28	
rs72712656/C	C/C-C/T	1	4	4	0,728	
	T/T	4	30	34		
<i>HERC2</i>	rs540317226/T	C/C	6	35	39	1
		C/T	0	1	1	
	rs1129038/T†	C/C	0	41	84	0*
		C/T-T/T	22	112 ^a	43	
	rs148711194/A	A/G	0	1	0	0,512

		G/G	6	35	40	
rs4778245/T		C/C	6	35	37	0,719
		C/T	0	1	3	
rs6497271/A		A/G	0	2	8	0,124
		G/G	11	63	60	
rs12913832/G†		A/A	0	38	82	0*
		A/G-G/G	22	115 ^a	45	
rs7183877/C†		A/A	0	4	10	0,083
		A/C-C/C	22	149	117	

Tabla 3.7 Análisis de asociación con color, SNP por SNP, según genotipo. Análisis de χ^2 o Fisher de los individuos en 3 grupos de color. *p<0,05.

Gen	SNP	Genotipo	A	I	M	p-valor
<i>SLC45A2</i>	rs35397	GG	0	3	3	1
		GT	0	4	3	
		TT	4	21	18	
	rs2278007	AA	4	29	24	0,322
		AG	0	1	4	
		GG	0	0	0	
	rs16891982	CC	0	11	29	0*
		GC	2	39	45	
		GG	20	103	53	
	rs35398	GG	4	26	18	0,306
		GT	0	4	7	
		TT	0	0	2	
rs1364038	AA	0	0	0	0,562	
	AC	0	2	0		
	CC	3	17	18		

	rs185145	AA	0	3	2	0,429
		AG	0	0	2	
		GG	0	0	0	
	rs185146	CC	0	0	1	1
		CT	0	0	1	
		TT	0	3	2	
	rs250417	CC	0	3	2	0,429
		CG	0	0	2	
		GG	0	0	0	
<i>IRF4</i>	rs12203592	CC	16	105	110	0,004*
		CT	5	43	16	
		TT	1	5	1	
<i>TYR</i>	rs1393350	AA	1	10	5	0,238
		AG	9	46	29	
		GG	12	97	93	
<i>LOC105370627</i>	rs12436973	AA	0	5	5	1
		AG	0	1	0	
		GG	0	0	0	
	rs142020658	AA	5	30	35	0,676
		AG	0	2	1	
		GG	0	0	0	
	rs8021744	CC	4	30	35	0,134
		CT	0	5	4	
		TT	1	0	0	
	rs12437047	CC	4	28	35	0,086
		CG	0	8	5	
		GG	1	0	0	

	rs12896399	GG	7	72	61	0,386
		GT	12	56	52	
		TT	3	25	14	
	rs12896471	CC	3	21	18	0,349
		CG	1	9	18	
		GG	1	6	4	
<i>OCA2</i>	rs74653330	AA	0	0	0	0,5
		AG	0	0	1	
		GG	3	31	27	
	rs12910433	CC	0	7	4	0,521
		CT	1	12	16	
		TT	2	12	8	
	rs141662330	CC	7	51	53	0,78
		CT	0	4	2	
		TT	0	0	0	
	rs1900758	AA	4	16	11	0,052
		AG	3	30	25	
		GG	0	9	19	
	rs1800410	AA	18	94	72	0,257
		AG	4	51	45	
		GG	0	8	10	
	rs1800407	AA	0	1	2	0,719
		AG	2	22	13	
		GG	20	130	112	
	rs117886461	CC	7	55	57	0,525
		CT	0	1	0	
		TT	0	0	0	

rs36032918	GG	0	0	0	1
	GT	0	1	1	
	TT	7	55	56	
rs182658649	GG	6	50	52	0,677
	GT	0	2	1	
	TT	0	0	0	
rs145662614	AA	0	0	0	1
	AG	0	0	1	
	GG	5	36	39	
rs4778232	CC	11	66	48	0,237
	CT	9	70	53	
	TT	2	17	26	
rs118163203	CC	0	0	0	0,506
	CT	0	1	0	
	TT	5	35	40	
rs74005202	CC	0	0	0	1
	CT	0	1	1	
	TT	5	33	38	
rs74007903	AA	5	33	38	1
	AG	0	1	1	
	GG	0	0	0	
rs74007904	CC	5	33	38	1
	CG	0	1	1	
	GG	0	0	0	
rs75102342	CC	0	0	0	1
	CT	0	1	2	
	TT	5	33	37	

	rs17680684	AA	0	1	1	0,857
		AG	0	7	9	
		GG	5	26	28	
	rs72712656	CC	0	1	0	0,608
		CT	1	3	4	
		TT	4	30	34	
<i>HERC2</i>	rs540317226	CC	6	35	39	1
		CT	0	1	1	
		TT	0	0	0	
	rs1129038	CC	0	41	84	0*
		CT	4	81	42	
		TT	18	31	1	
	rs148711194	AA	0	0	0	0,512
		AG	0	1	0	
		GG	6	35	40	
	rs4778245	CC	6	35	37	0,719
		CT	0	1	3	
		TT	0	0	0	
	rs6497271	AA	0	2	8	0,124
		AG	11	63	60	
		GG	0	0	0	
	rs12913832	AA	0	38	82	0*
		AG	4	85	45	
		GG	18	30	0	
	rs7183877	AA	0	4	10	0,003*
		AC	1	29	38	
		CC	21	120	79	

3.2.3 Asociación entre la cuantificación del color y SNPs

El análisis arrojó un aumento de ΔE asociado a los alelos rs16891982*G, rs12203592*T, rs1800407*A y rs12913832*G ($p < 0,05$). Lo mismo se observó con el L^* promedio, excepto para rs1800407. Un aumento del promedio de a^* se asoció con los alelos rs1129038*C y rs4778232*T ($p < 0,05$), y del promedio de b^* con rs1129038*C, rs1800410*G y el rs12913832*G ($p < 0,05$).

Teniendo en cuenta el iris ciliar, los resultados para L^* coinciden con los de L^* promedio; el aumento de a^* se asoció con los alelos rs16891982*C, rs12203592*C y rs4778232*T, y el de b^* con rs1129038*C, rs1800410*G ($p < 0,05$).

Para el iris pupilar, se encontró asociación entre el aumento de L^* con rs16891982*G y rs12203592*T, el de a^* con rs4778232*T y rs1129038*C, y el de b^* con rs12203592*T, rs1800407*A y rs12913832*G ($p < 0,05$).

3.2.4 Desequilibrio de ligamiento y haplotipos

Respecto al desequilibrio de ligamiento, en la tabla 3.8 se informan los p-valor obtenidos para los SNPs relevados de los fragmentos secuenciados para los genes *HERC2* y *OCA2*.

En algunos casos no se encontró desequilibrio de ligamiento entre SNPs vecinos, pero sí entre algunos intercalados. Los SNPs que fueron tipificados en el total de los individuos, se encontraron en DL entre sí ($p < 0,05$), excepto el rs1800410 con el rs4778232 y el rs7183877.

Tabla 3.8 Análisis de desequilibrio de ligamiento para los genes *OCA2* y *HERC2*. *p<0,05. Los SNPs se indican sólo con sus últimos números para simplificar la tabla.

	rs433	rs2330	rs758	rs410	rs407	rs461	rs918	rs649	rs232	rs614	rs203	rs202	rs903	rs904	rs342	rs684	rs656	rs226	rs038	rs194	rs245	rs7271	rs832	rs877
rs3330	0,2361	0,9113	0,3107	0,0653	0,8054	0,9776	0,998	0,9653	0,1935	0,999	0,9602	0,9667	0,9667	0,9667	0*	0,0107*	0,8183	0,9702	0,4459	0,9604	0,9156	0,884	0,4409	0,6787
rs433	.	0,134	0*	0*	2,00E-04*	1	0,403	0,3198	0,8437	0,9999	0,3047	0,2986	0,2986	0,2986	0,0656	0,3106	0,1183	0,142	0,0713	0,4804	0,0361	0,3452	0,0728	0,025*
rs2330	.	.	0,0172*	0,5326	0,5111	0,9295	0,8765	0,8225	0,13	0,9376	0,9376	0,8541	0,8541	0,8541	0,8039	0,0906	0,6181	0,8538	0,0562	0,938	0,7769	0,158	0,0536	0,2764
rs758	.	.	.	0*	0,0017*	0,3464	0,179	0,0971	0,6885	0,3475	0,322	0,1753	0,1753	0,1753	0,0782	0,5442	0,2832	0,1777	0*	0,3505	0,0427	0,7784	0*	2,00E-04*
rs410	0,0017*	0,6083	0,4606	0,358	0,276	0,6106	0,0674	0,453	0,453	0,453	0,0012*	0,3868	0,0793	0,0087*	0,0101*	0,6107	0,6621	0,7194	0,0012*	0,9575
rs407	0,8161	0,0184*	0,1008	3,00E-04*	0,8209	0,8209	0,7139	0,7139	0,7139	0,6423	0,1865	0,3733	0,7133	0*	0,8209	0,5919	0,5232	0*	0*
rs461	0,972	0,9867	0,1969	0,8943	0,8943	0,9871	0,9871	0,9871	0,9866	0,9965	0,9915	0,9959	0,2049	0,9294	0,9452	0,8993	0,2098	0,6862
rs918	0,9492	0,4157	0,9576	0,9576	0*	0*	0*	0,9263	0,6804	0,7931	0,9655	0,2811	0,9578	0,9021	0,8372	0,2748	0,0012*
rs649	0,9317	0,9977	0,9977	0,921	0,921	0,921	0,8869	0,4323	0,74	0,9198	0,0258*	0,9977	0,86	0,7782	0,0274*	0,0716
rs232	0,1976	0,4609	0,064	0,064	0,064	0,0224*	0*	0*	0,064	0*	0,1976	0,2591	6,00E-04*	0*	0,2191
rs614	0,9287	0,9977	0,9977	0,9977	0,9653	0,9936	0,9944	0,993	0,4526	0,9292	0,9418	0,9059	0,4476	0,0231*
rs203	0,9977	0,9977	0,9977	0,9653	0,7342	0,8372	0,993	0,4526	0,9292	0,9418	0,9059	0,4476	0,6892
rs202	0*	0*	0,8824	0,5992	0,7307	0,9211	0,0688	0,9977	0,8577	0,0012*	0,0718	0,2753
rs903	0*	0,8824	0,5992	0,7307	0,9211	0,0688	0,9977	0,8577	0,0012*	0,0718	0,2753
rs904	0,8824	0,5992	0,7307	0,9211	0,0688	0,9977	0,8577	0,0012*	0,0718	0,2753
rs342	0*	0,6618	0,884	0,3534	0,9655	0,8076	0,7612	0,1735	0,4554
rs684	0,2106	0,6079	0,0046*	0,7358	6,00E-	0,0383*	0,0057*	0,7725

																					04*			
rs656	0*	0,5064	0,8382	0,6225	0,5472	0,4243	0,1582
rs226	0,2757	0,993	0,8565	0,8161	0,2705	0,5486	
rs038	0,2057	0,1192	0,013*	0*	0*		
rs194	0,9418	0*	0,2106	0,6892			
rs245	0*	0,1153	0,013*				
rs7271	0,012*	0,1106		
r832	0*	

En las tablas anexas A.3 y A.4 se presenta el análisis de desequilibrio de ligamiento para los genes *SLC45A2* y *LOC105370627*, y en las tablas A.5, A.6 y A.7 los haplotipos estimados.

3.2.5 Asociación entre color de iris y haplotipos

En la tabla 3.9 se muestra el análisis de asociación de haplotipos con el color del iris. Se encontró que el haplotipo más frecuente (de referencia) presenta al rs12913832*G y rs1129038*T. En los haplotipos 1 al 12, estos alelos aparecen juntos o alternativamente con los alelos A y C de los mismos, y asociados a color marrón (protector frente al grupo de azul más intermedio).

Tabla 3.9 Frecuencia estimada de haplotipos, y asociación del haplotipo con la respuesta. Genes *OCA2* y *HERC2*. *p-valor<0,005.

Haplotipo	rs1800410	rs1800407	rs4778232	rs1129038	rs12913832	rs7183877	Frecuencia	OR (95% CI)	p-valor
1	A	G	C	T	G	C	0,2252	1	---
2	A	G	T	C	A	C	0,1778	0,11 (0,05 - 0,26)	<0,0001*
3	A	G	C	C	A	C	0,1221	0,07 (0,01 - 0,31)	0,0007*

4	G	G	C	C	A	C	0,0794	0,09 (0,03 - 0,24)	<0,0001*
5	A	G	T	T	G	C	0,0763	0,37 (0,08 - 1,77)	0,22
6	A	G	C	C	A	A	0,0704	0,06 (0,02 - 0,19)	<0,0001*
7	G	G	C	T	G	C	0,0484	0,25 (0,05 - 1,37)	0,11
8	G	G	T	C	A	C	0,0452	0,21 (0,04 - 0,97)	0,047*
9	A	A	C	C	A	A	0,0383	0,19 (0,05 - 0,77)	0,02*
10	G	G	T	C	A	A	0,0244	0,06 (0,01 - 0,31)	0,0009*
11	A	A	C	C	A	C	0,0217	0,09 (0,02 - 0,47)	0,0045*
12	A	G	T	C	A	A	0,0144	0,03 (0,00 - 0,79)	0,036*
13	A	G	C	C	G	C	0,0115	0,09 (0,01 - 0,73)	0,025*

3.2.6 Comparación con otras poblaciones según los SNPs de color

En las poblaciones parentales, todos los SNPs de iris se encontraron en EHW ($\alpha= 0,0071$ para africano, 0,005 para europeo y 0,0063 para americano).

Respecto a la heterocigosis esperada (tabla 3.10), las poblaciones con menor variabilidad fueron la africana y la nativa americana. En la población africana, la heterocigosis esperada para cada marcador fue baja excepto para los SNPs rs1800410 y rs4778232. En la población nativa americana se vieron valores de heterocigosis un poco más altos que en la población africana, sin embargo, algunos SNPs resultaron monomórficos tanto para africanos como para nativos americanos (rs1393350 y rs12203592). Cabe mencionar que la heterocigosis esperada para el SNP rs1800407 fue baja en todas las poblaciones.

Tabla 3.10. Heterocigosis esperadas para las distintas poblaciones respecto a los SNPs de color de iris. AFRO: africanos; EURO: europeos; AMER: nativos americanos; BA: bonaerenses.

SNP	AFRO	EURO	AMER	BA
rs1129038	0,01672	0,46926	0,14518	0,46994
rs12913832	0,01672	0,46807	0,20854	0,47236
rs7183877	0,18994	0,2836	0,50283	0,2678
rs1800407	0	0,17742	0,01562	0,13247
rs1800410	0,41354	0,31049	0,42704	0,34951
rs4778232	0,26686	0,42937	0,44439	0,46568
rs12896399	0,00337	0,46436	0,37397	0,44809
rs16891982	0,00672	0,1923	0,09006	0,39926
rs1393350	0	0,39174	0	0,3088
rs12203592	0	0,19597	0	0,2253

La tabla 3.11 muestra los *F_{st}* obtenidos. El valor más bajo se encontró entre la población bonaerense y la europea.

Tabla 3.11. *F_{st}* de las poblaciones agrupadas, analizando SNPs de color de iris. AFRO: africanos; EURO: europeos; AMER: nativos americanos; BA: bonaerenses. * p-valor < 0,005.

	AFRO	EURO	AMER
EURO	0,44673*	0	
AMER	0,31035*	0,26007*	0
BA	0,34793*	0,00948	0,1964*

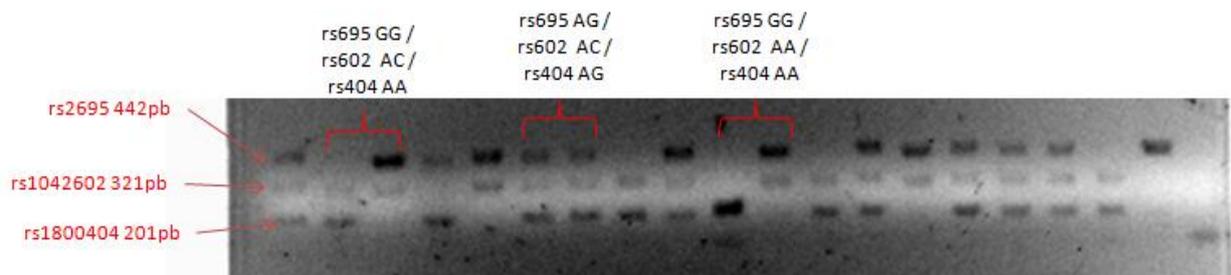
3.3 AIMs

3.3.1 Variabilidad poblacional

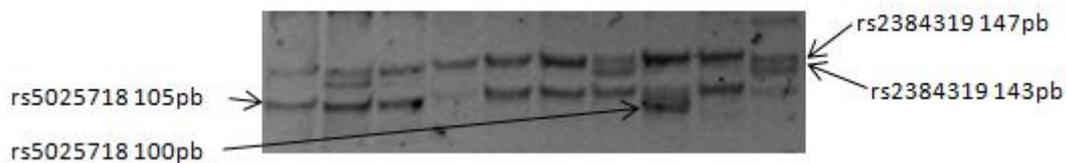
3.3.1.1 Frecuencias alélicas, genotípicas y equilibrio de Hardy-Weinberg

En la figura 3.7 se muestran las fotografías de los geles correspondientes a las electroforesis de algunos AIMs.

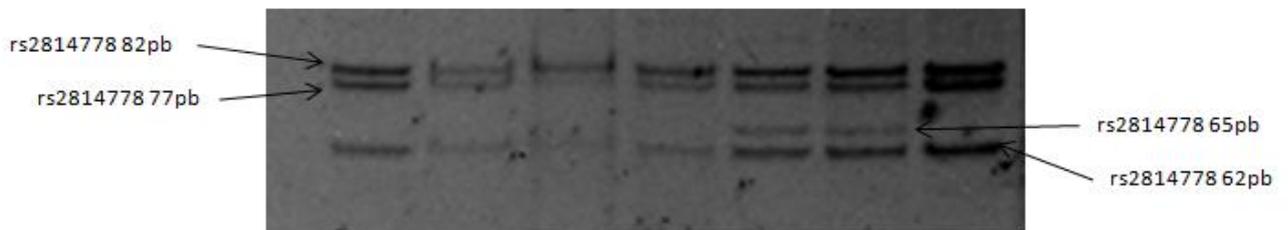
a)



b)



c)



d)

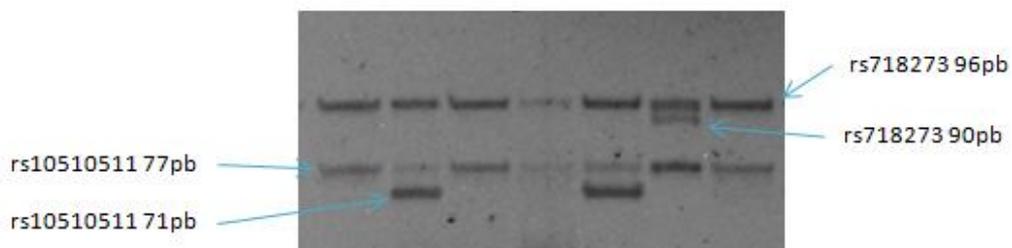


Figura 3.7. a) electroforesis en agarosa del tríplex 1. b) electroforesis en acrilamida 10% (*KIF3* y *NOTCH2*). c) Electroforesis en acrilamida 12% (*ACKR1*). d) electroforesis en acrilamida 10% (Dúplex Z).

En la tabla 3.12 se presentan las frecuencias alélicas y genotípicas de los AIMs en la población bonaerense.

Los SNPs rs1426654 y rs717225 resultaron monomórficos.

Tabla 3.12 Frecuencias alélicas (fa) y genotípicas (fg) de los AIMs en la población bonaerense.

SNP	Alelo	fa	Genotipo	fg
rs1800404	A	0,65	AA	0,4
	G	0,35	AG	0,49
			GG	0,11
rs1042602	A	0,41	AA	0,2
	C	0,59	AC	0,41
			CC	0,39
rs2695	A	0,35	AA	0,15
	G	0,65	AG	0,4
			GG	0,45
rs2862	C	0,29	CC	0,04
	T	0,71	CT	0,5
			TT	0,46
rs4884	C	0,63	CC	0,5
	T	0,37	CT	0,26
			TT	0,24
rs2069762	G	0,38	GG	0,21
	T	0,62	GT	0,35
			TT	0,44
3138523	Delección (D)	0,68	DD	0,49
	Inserción (I)	0,32	ID	0,37

			II	0,14
rs1871534	C	0,99	CC	0,99
	G	0,01	CG	0,007
			GG	0,003
rs2763	C	0,89	CC	0,84
	G	0,11	CG	0,11
			GG	0,05
rs3138522	Delección (D)	0,03	DD	0,003
	Inserción (I)	0,97	ID	0,043
			II	0,954
rs13069719	C	0,96	CC	0,91
	T	0,04	CT	0,09
			TT	0
rs2288697	A	0,03	AA	0
	G	0,97	AG	0,05
			GG	0,95
rs2065982	C	0,04	CC	0
	T	0,96	CT	0,08
			TT	0,92
rs7211306	A	0,1	AA	0,03
	G	0,9	AG	0,15
			GG	0,82
rs12469563	C	0,07	CC	0,03
	T	0,93	CT	0,09
			TT	0,88
rs8009244	A	0,06	AA	0,01
	G	0,94	AG	0,09

			GG	0,89
rs1426654	A	1	AA	1
	G	0	AG	0
			GG	0
rs5025718	C	0,89	CC	0,8
	T	0,11	CT	0,17
			TT	0,03
rs2384319	G	0,26	GG	0,08
	T	0,74	GT	0,35
			TT	0,57
rs718273	A	0,98	AA	0,95
	G	0,02	AG	0,05
			GG	0
rs10510511	A	0,24	AA	0,11
	C	0,76	AC	0,27
			CC	0,62
rs2042314	A	0,26	AA	0,08
	G	0,74	AG	0,36
			GG	0,56
rs717225	C	0	CC	0
	T	1	CT	0
			TT	1
rs3870336	C	0,76	CC	0,61
	T	0,24	CT	0,3
			TT	0,09
rs285	C	0,51	CC	0,24
	T	0,49	CT	0,55

			TT	0,21
rs1800498	C	0,45	CC	0,23
	T	0,55	CT	0,44
			TT	0,33
rs7041	G	0,45	GG	0,24
	T	0,55	GT	0,42
			TT	0,34
rs2816	C	0,54	CC	0,34
	T	0,46	CT	0,41
			TT	0,25
rs2814778	C	0,02	CC	0
	T	0,98	CT	0,03
			TT	0,97
rs9290363	G	0,08	GG	0,01
	T	0,92	GT	0,14
			TT	0,85

En la tabla anexa A.8 se presentan las frecuencias alélicas y genotípicas de los AIMs presentados, en las poblaciones parentales.

En la tabla 3.13 se presenta el análisis de EHW. 7 de los marcadores se desviaron del EHW.

Tabla 3.13 Análisis del EHW para los AIMs en la población bonaerense. Het.: heterocigosis. d.s.: desvío estándar. *Fuera del EHW ($\alpha = 0,00179$).

Locus	Het. Observada	Het. Esperada	p-valor	d.s.
rs1800404	0,49007	0,45635	0,21082	0,0004
rs1042602	0,40728	0,48422	0,00663	0,00009
rs2695	0,39404	0,45536	0,02325	0,00017
rs2862	0,5	0,41226	0,00014*	0,00001

rs4884	0,26159	0,4648	0*	0
rs2069762	0,34437	0,47392	0*	0
rs3138523	0,37417	0,43796	0,01238	0,00012
rs1871534	0,00662	0,01318	0,00975	0,0001
rs2763	0,10927	0,19757	0*	0
rs3138522	0,04636	0,05166	0,18463	0,00039
rs13069719	0,0894	0,08555	1	0
rs2288697	0,05298	0,05166	1	0
rs2065982	0,07947	0,07644	1	0
rs7211306	0,15232	0,18453	0,00661	0,00008
rs12469563	0,0894	0,13813	0,00001*	0
rs8009244	0,09272	0,11229	0,0149	0,00012
rs1426654	Monomórfico			
rs5025718	0,17219	0,20015	0,03703	0,00019
rs2384319	0,35099	0,38378	0,17705	0,00038
rs718273	0,04967	0,04852	1	0
rs10510511	0,27152	0,36719	0,00002*	0
rs2042314	0,36093	0,38854	0,23881	0,00049
rs717225	Monomórfico			
rs3870336	0,30132	0,362	0,00634	0,00008
rs285	0,53642	0,50048	0,25319	0,00045
rs1800498	0,44371	0,49652	0,08035	0,00027
rs7041	0,42384	0,49589	0,01295	0,00011
rs2816	0,40066	0,4974	0,00097*	0,00003
rs2814778	0,03311	0,03262	1	0
rs9290363	0,13576	0,14934	0,11779	0,00032

En las poblaciones parentales, se encontró fuera del EHW ($\alpha = 0,00179$) sólo el AIM rs2065982 para africanos (p -valor = 0,00106), en el límite del nivel de significancia, por lo que igualmente se decidió utilizar este marcador.

3.3.2 Estructura poblacional

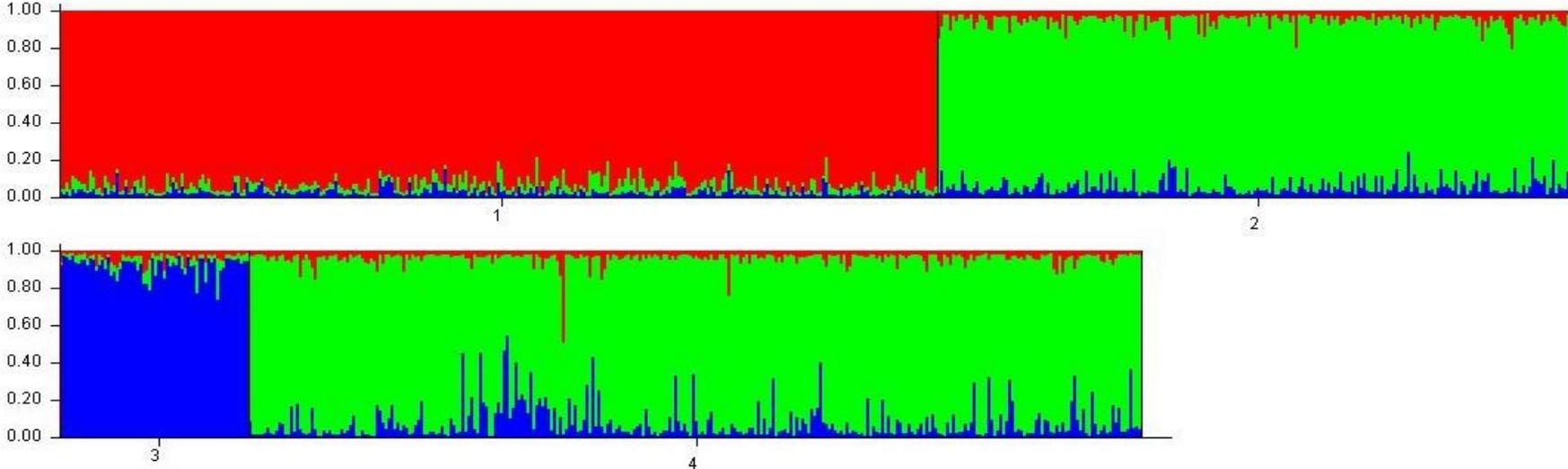
3.3.2.1 Ancestría estimada

Se realizó el análisis en Structure utilizando todos los AIMs (30 marcadores) y, alternativamente, descartando los que se encontraron fuera del EHW (quedando 23 marcadores a utilizar). El análisis en Structure Harvester arrojó como más probable el $K=3$. Se presentan los resultados correspondientes a dicho K para ambos análisis (tabla 3.14 y figuras 3.8 y 3.9). En los gráficos de barras puede observarse un mayor aporte europeo a la ancestría estimada de la población bonaerense, y en los gráficos triangulares se observa la cercanía entre las poblaciones bonaerenses y europea.

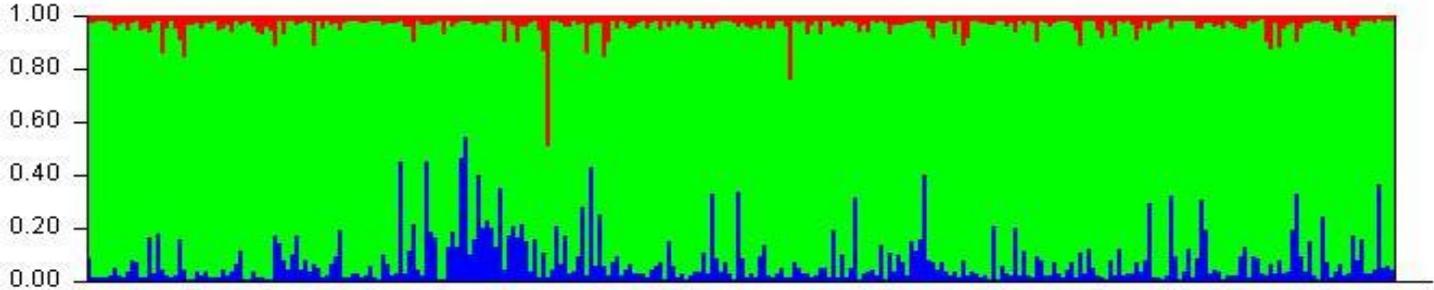
Tabla 3.14 Porcentaje de ancestrías de la población bonaerense analizando distinto número de AIMs.

30 AIMs		
% Ancestría en BA		
Europea	Nativa americana	Africana
88,03	8,16	3,81
23 AIMs		
% Ancestría en BA		
Europea	Nativa americana	Africana
89,45	6,71	3,84

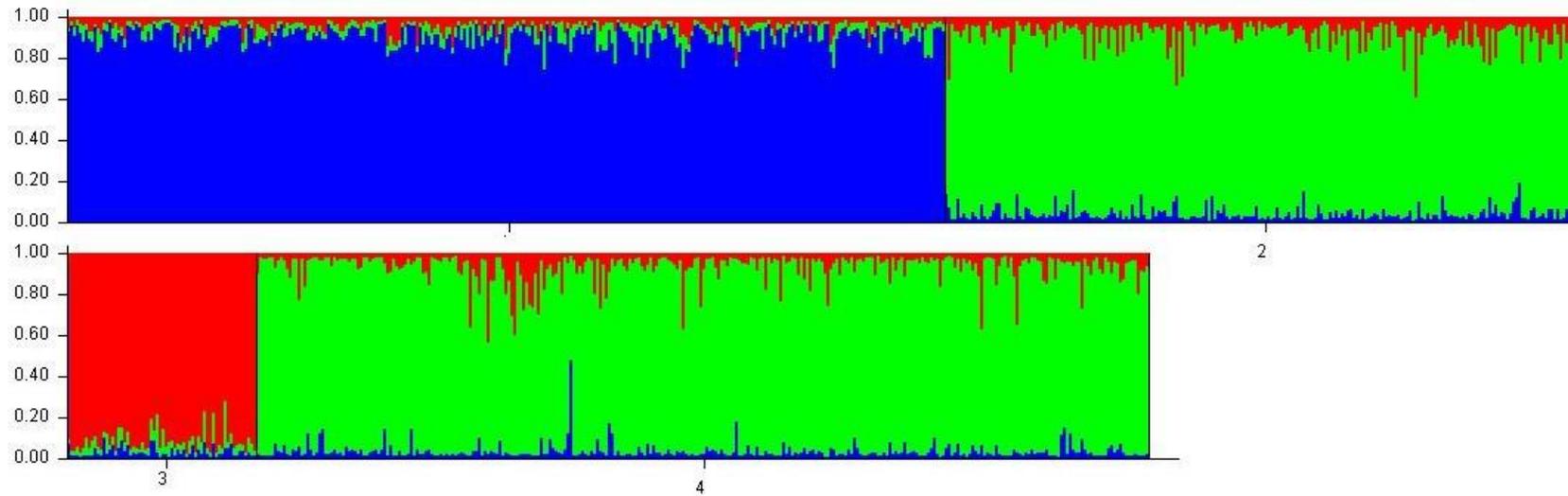
a.1)



a.2)



b.1)



b.2)

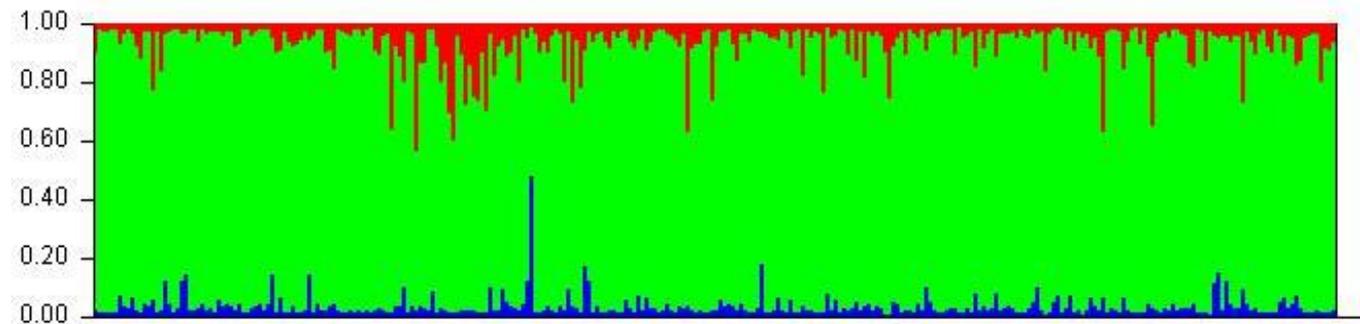


Figura 3.8 Barplots representando las ancestrías estimadas en individuos de las poblaciones: 1) africanas, 2) europeas, 3) nativas americanas y 4) bonaerense. Cada barra vertical representa un individuo y cada color una ancestría diferente según la proporción estimada. a) 30 AIMs: a.1) Buenos Aires y parentales, a.2) detalle de la población de Buenos Aires. b) 23 AIMs: b.1) Buenos Aires y parentales, b.2) detalle de la población de Buenos Aires.

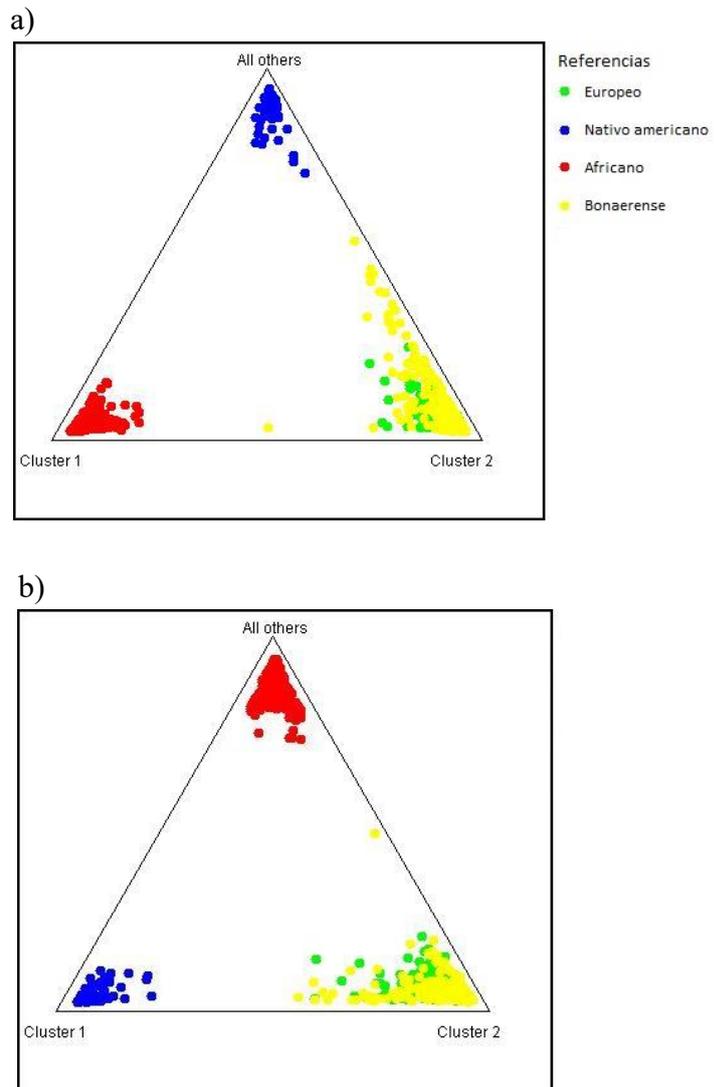
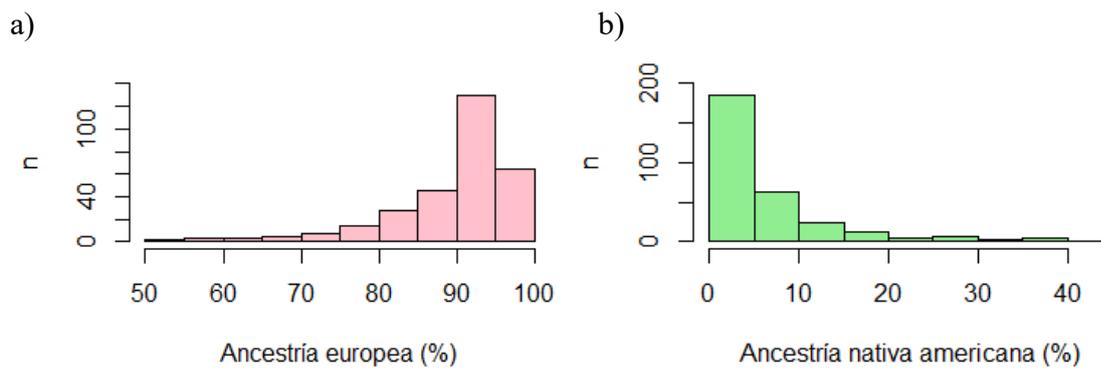


Figura 3.9 Gráficos triangulares. a) 30 AIMs. b) 23 AIMs.

Los histogramas describen la distribución general de la ancestría (figura 3.10 a-c). Se hace evidente en ellos el mayor aporte europeo.

La distribución de las 3 ancestrías resultó no normal (p -valor $<0,0001$). El percentil 75 de la distribución de ancestría europea fue 0,9483 (94,83%).



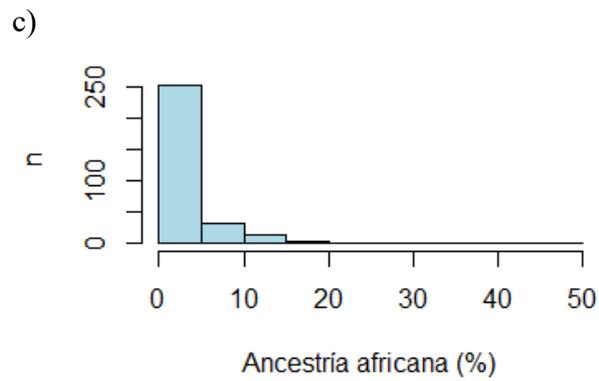


Figura 3.10 Histogramas de las ancestrías estimadas.

3.3.2.1.1 Comparación de los grupos de color según la ancestría

Se analizó la distribución de las ancestrías según el color del iris. En ningún caso hubo distribución normal de los datos, por lo que la comparación de los grupos se llevó a cabo por un test de Kruskal-Wallis y test *post-hoc* de Dunn en los casos significativos (tabla 3.15 y figura 3.11 a-c).

Tabla 3.15 Porcentajes de ancestría (con 23 AIMs) según el color de iris y comparación de los grupos de color. *p-valor<0,05. W: Shapiro-Wilk. KS: Kolmogorov-Smirnov.

Color (N)	Ancestría europea			Ancestría nativa americana			Ancestría africana		
	Media (IC 95%)	Mediana (IC 95%)	Test de normalidad (p-valor)	Media (IC 95%)	Mediana (IC 95%)	Test de normalidad (p-valor)	Media (IC 95%)	Mediana (IC 95%)	Test de normalidad (p-valor)
Azul (22)	93 (91,32 - 94,68)	93,45 (92,4 - 95)	W= 0,691 (<0,0001)	4,09 (2,48 - 5,70)	3,3 (1,8 - 4,5)	W= 0,691 (<0,0001)	2,92 (2,4 - 3,43)	2,45 (2,1 - 3,6)	W= 0,887 (0,0165)
Intermedio (153)	90,56 (89,48 - 91,64)	93 (91,5 - 94,2)	KS= 0,1715 (<0,0001)	5,84 (4,89 - 6,79)	3,4 (2,8 - 4,2)	KS= 0,2164 (<0,0001)	3,61 (3,18 - 4,03)	2,5 (2,4 - 2,9)	KS= 0,2053 (<0,0001)
Marrón (127)	87,5 (85,83 - 89,17)	91 (89,3 - 92,8)	KS= 0,1826 (<0,0001)	8,23 (6,70 - 9,75)	4,6 (4,6 - 5,9)	KS= 0,2197 (<0,0001)	4,29 (3,40 - 5,18)	2,8 (2,4 - 3,2)	KS= 0,2785 (<0,0001)
Kruskal-Wallis (p-valor)		14,23 (0,0008128*)			12,889 (0,001589*)			1,4258 (0,4902)	

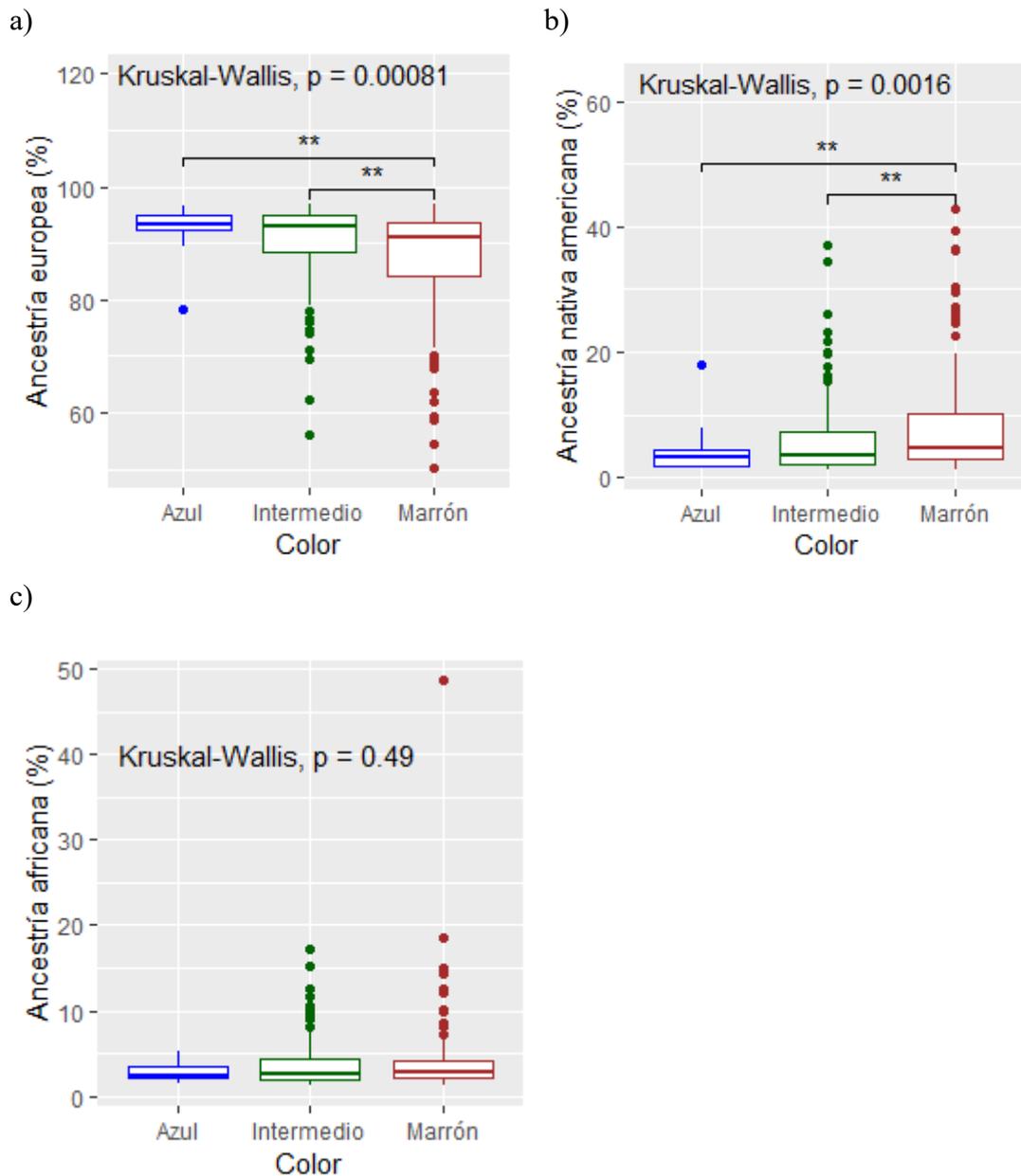


Figura 3.11 Diferencias entre las ancestrías según grupo de color. Test de Dunn, $\alpha=0,05$.

3.3.2.1.2 Asociación entre color de iris y ancestría

La asociación del color de ojos con la ancestría resultó no significativa para la clasificación en dos grupos de color (p -valor = 0,306). Al comparar el agrupamiento azul con intermedio contra marrón, se encontró asociada la ancestría europea con el grupo de azules más intermedios [p -valor= 0,002; OR= 0,41; IC= (0,22-0,75)], es decir, el color marrón asociado a no europeo con un OR = 2,45, IC= (1,34-4,60). Al analizar la clasificación en tres grupos de color, el resultado fue significativo, asociándose la ancestría europea con el color intermedio [p -valor= 0,003; OR= 0,45; IC= (0,25-0,80)].

En la regresión logística, algunos SNPs (rs1129038, rs12913832, rs16891982, rs1800407 y rs7183877) resultaron significativos como variables explicativas (p -valor < 0,05).

3.3.2.2 Subestructura y estratificación

El análisis de una posible subestructura dentro de la población en estudio resultó homogéneo (figura 3.12) por lo cual puede considerarse que no hay estratificación.

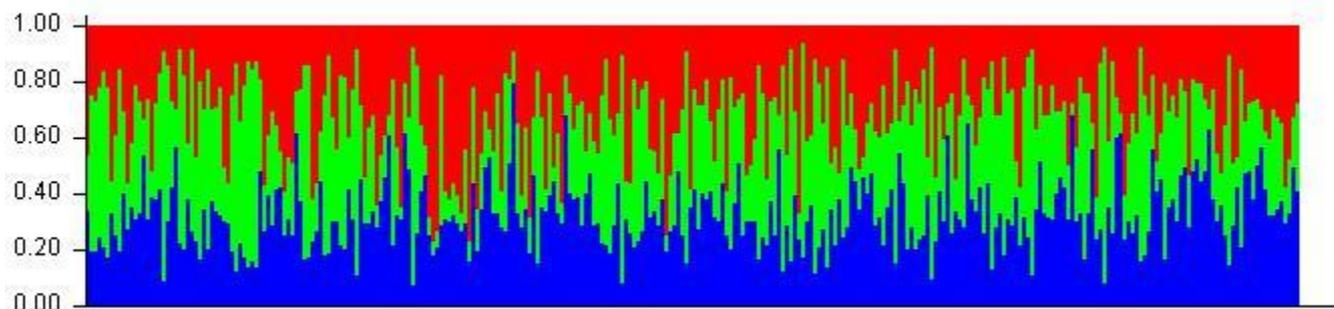


Figura 3.12 Resultado de Structure para la población bonaerense, K=3 (más probable según Structure Harvester), $\alpha=1$.

3.3.2.3 Análisis de la varianza molecular (AMOVA)

La tabla 3.16 muestra los resultados del AMOVA, tanto para las poblaciones por separado como agrupadas. Más allá de los distintos agrupamientos ensayados, los mayores porcentajes de variación se observaron entre grupos y dentro de las poblaciones individuales.

Tabla 3.16 Resultados de AMOVA. $\alpha=0,05$

Fuente de variación	Porcentaje de la variación		
	4 grupos	3 grupos (BA+Amer)	3 grupos (BA+Euro)
Entre grupos	49,28335	32,84617	50,1336
Entre poblaciones dentro de los grupos	0,11612	16,4951	4,9691
Dentro de las poblaciones	50,60053	50,65873	44,9691
p-valor	0,00037	0,05014	0,00087

3.3.2.4 *Fst*

Las tablas 3.17 a 3.19 muestran los resultados de *Fst* para las poblaciones agrupadas. Todos los valores resultaron significativos, con la mayor diferenciación para bonaerenses en relación con la población africana. La tabla A.9 (anexo) muestra este mismo análisis para las poblaciones por separado.

Tabla 3.17 *Fst* de las poblaciones agrupadas. AFRO: africanos; EURO: europeos; AMER: nativos. * p-valor < 0,00167.

	AFRO	EURO	AMER
EURO	0,56171*	0	
AMER	0,68969*	0,52153*	0
BA	0,54878*	0,15516*	0,52032*

Tabla 3.18 *Fst* de las poblaciones agrupadas, con nativos americanos y bonaerenses en conjunto. AFRO: africanos; EURO: europeos; AMER: nativos americanos; BA: bonaerenses. * p-valor < 0,00167.

	AFRO	EURO
EURO	0,56171*	0
AMER+BA	0,48069*	0,12991*

Tabla 3.19 *Fst* de las poblaciones agrupadas, con europeos y bonaerenses en conjunto. AFRO: africanos; EURO: europeos; AMER: nativos americanos; BA: bonaerenses. * p-valor < 0,00167.

	AFRO	EURO+BA
EURO+BA	0,50744*	0
AMER	0,68969*	0,48764*

3.4 Análisis general: color de iris, SNPs, ancestría y sexo

La tabla 3.20 (a-c) presenta los resultados de las regresiones logísticas teniendo en cuenta los 10 SNPs tipificados en toda la muestra, según alelo de riesgo, y según los genotipos teniendo en cuenta los que fueron significativos según el alelo de riesgo (tomando como valor de corte $p < 0,20$). En ambos casos, se excluyen aquellos que el análisis omite.

Teniendo en cuenta la clasificación en 2 grupos (azul y marrón), a pesar de encontrarse asociados al color, los SNPs rs16891982 y rs4778232 presentaron un IC muy amplio (baja precisión).

Al analizar los grupos azul e intermedio juntos, los IC son más acotados y hay más SNPs asociados al color. Llamativamente, el SNP rs1800407 muestra asociación según el alelo de

riesgo (aunque no según los genotipos), a pesar de que en el análisis individual no se asociaba al color.

En el caso de 3 grupos, se encontraron asociados más SNPs en la comparación marrón vs. intermedio que en las demás de 3 grupos. Nuevamente, el SNP rs1800407 mostró asociación según el alelo de riesgo (aunque no según los genotipos), a pesar de que en el análisis individual no se asociaba al color. No se informa el intermedio cuando la base es azul porque esto repite el resultado con el análisis de base intermedio y color azul (inverso).

Tabla 3.20 Regresión logística según alelo de riesgo y genotipo para 10 SNPs. a) 2 grupos de color según clasificación (casos= A); b) 2 grupos de color agrupando azul e intermedio (casos= A+I); c) 3 grupos de color (RLM). RRR: *relative risk ratio*. *p<0,20

a)

Variable	OR (IC 95%)	p-valor	Variable	OR (IC 95%)	p-valor
rs16891982	8,06 (1,06 - 61,46)	0,044*	CG	5,85 (0,71 - 48,39)	0,101*
			GG	11,32 (1,47 - 86,90)	0,02*
rs12203592	1,11 (0,53 - 2,32)	0,793			
rs1393350	1,42 (0,73 - 2,78)	0,301			
rs12896399	1,73 (0,88 - 3,38)	0,11*	GT	1,88 (0,92 - 3,83)	0,083*
			TT	1,56 (0,59 - 4,10)	0,37
rs1800410	0,63 (0,31 - 1,28)	0,2			
rs1800407	0,69 (0,25 - 1,90)	0,473			
rs4778232	4,86 (1,11 - 21,23)	0,036*	CT	0,52 (0,27 - 1,02)	0,057*
			TT	0,16 (0,04 - 0,71)	0,016*
Sexo	2,45 (1,11 - 5,41)	0,026*	Sexo	2,39 (1,08 - 5,28)	0,031*
Ancestría	0,91 (0,44 - 1,86)	0,79	Ancestría	0,91 (0,45 - 1,86)	0,799

b)

Variable	OR (IC 95%)	p-valor	Variable	OR (IC 95%)	p-valor
rs16891982	3,54 (1,49 - 8,37)	0,004*	CG	1,84 (0,64 - 5,28)	0,254
			GG	5,65 (2,13 - 14,98)	0*
rs12203592	4,49 (2,15 - 9,39)	0*	CT	4,85 (2,22 - 10,63)	0*
			TT	6,41 (0,62 - 65,82)	0,118*
rs1393350	1,73 (0,95 - 3,17)	0,074*	AG	1,27 (0,29 - 5,56)	0,747
			GG	0,66 (0,16 - 2,69)	0,562
rs12896399	0,85 (0,48 - 1,48)	0,557			
rs1800410	0,94 (0,53 - 1,67)	0,833			
rs1800407	2,47 (0,99 - 6,13)	0,051*	AG	2,63 (0,15 - 46,66)	0,509
			GG	0,9 (0,06 - 14,64)	0,94
rs4778232	1,61 (0,75 - 3,43)	0,222			
rs1129038	2,83 (0,76 - 10,53)	0,12*	CT	2,37 (0,57 - 9,94)	0,237
			TT	6,45 (0,49 - 84,15)	0,155*
rs12913832	2,71 (0,73 - 10,07)	0,137*	AG	2,1 (0,51 - 8,67)	0,306*
			GG	1 (empty)	
rs7183877	2,21 (0,54 - 9,06)	0,268			
Sexo	1,16 (0,64 - 2,10)	0,622	Sexo	1,03 (0,55 - 1,92)	0,933
Ancestría	0,58 (0,30 - 1,15)	0,118*	Ancestría	0,64 (0,31 - 1,20)	0,227

c)

Base intermedio

Azul	RRR (IC 95%)	p-valor	Variable	RRR (IC 95%)	p-valor
Variable					
rs1800410	0,26 (0,08 - 0,88)	0,031*	AG	0,32 (0,08 - 1,30)	0,111*
			GG	1.37e-06 (0)	0,997
rs1800407	0,34 (0,07 - 1,75)	0,197*	AG	0,0003767 (0)	0,999
			GG	0,0002589 (0)	0,999
Sexo	1,98 (0,60 - 6,58)	0,265	Sexo	0,90 (0,20 - 4,12)	0,896
Ancestría	2,20 (0,75 - 6,48)	0,154*	Ancestría	1,66 (0,43 - 6,40)	0,463
Marrón	RRR (IC 95%)	p-valor	Variable	RRR (IC 95%)	p-valor
Variable					
rs16891982	0,31 (0,13 - 0,74)	0,008*	CG	0,53 (0,18 - 1,52)	0,236
			GG	0,17 (0,06 - 0,46)	0*
rs12203592	0,22 (0,11 - 0,46)	0*	CT	0,75 (0,17 - 3,24)	0,701
			TT	8,32 (0,42 - 163,97)	0,164*
rs1393350	0,60 (0,32 - 1,11)	0,102*	AG	0,37 (0,02 - 6,39)	0,494
			GG	0,15 (0,01 - 2,41)	0,181*
rs1800407	0,39 (1,58 - 0,96)	0,04*	AG	0,0003767 (0)	0,999
			GG	0,0002589 (0)	0,999
rs1129038	0,39 (0,11 - 1,46)	0,163*	CT	403859,8 (0)	0,991
			TT	1800897 (0)	0,99
rs12913832	0,39 (0,10 - 1,45)	0,16*	AG	46364.28 (0)	0,993
			GG	394253.9 (0)	0,991
Sexo	0,90 (0,50 -	0,743	Sexo	0,99 (0,53 - 1,85)	0,53

	1,64)				
Ancestría	1,80 (0,91 - 3,56)	0,089*	Ancestría	1,61 (0,78 - 3,33)	0,199*

Base azul

Marrón	RRR (IC 95%)	p-valor	Variable	RRR (IC 95%)	p-valor
Variable					
rs12203592	0,25 (0,07 - 0,89)	0,033*	CT	0,42 (0,13 - 1,38)	0,154*
			TT	0,26 (0,01 - 4,84)	0,365
rs1393350	0,32 (0,11 - 0,94)	0,038*	AG	0,68 (0,06 - 7,28)	0,75
			GG	1,75 (0,17 - 18)	0,637
rs1800410	3,76 (1,04 - 13,67)	0,044*	AG	3,26 (1,00 - 10,64)	0,05*
			GG	711445,5 (0)	0,976
Sexo	0,46 (0,13 - 1,63)	0,227	Sexo	0,31 (0,10 - 1,01)	0,052*
Ancestría	0,83 (0,25 - 2,72)	0,746	Ancestría	1,57 (0,52 - 4,75)	0,427

La tabla 3.21 (a-c) presenta los resultados de las regresiones logísticas teniendo en cuenta todos los SNPs tipificados, según alelo de riesgo, y según los genotipos considerando los que fueron significativos según el alelo de riesgo (tomando como valor de corte $p < 0,20$). Para alelo de riesgo, se muestran sólo los significativos ($p < 0,20$). En ambos casos, se excluyen aquellos que el análisis omite.

Cuando la comparación es de 2 grupos (azul contra marrón), al disminuir el N analizando todos los SNPs según el alelo de riesgo (ya que se tienen en cuenta para el análisis aquellos individuos que pudieron tipificarse para la mayoría de esos SNPs), no se mantienen los mismos SNPs como significativos, pero sí continúa asociado el sexo femenino al color azul.

En el caso de los colores azul más intermedio contra marrón, al disminuir el N sólo se encontró como significativo un SNP (rs35398).

En el caso de 3 grupos, al analizar a todos los SNPs, no se sumaron nuevos SNPs significativos.

Tabla 3.21. Regresión logística según alelo de riesgo y genotipo para todos los SNPs. a) 2 grupos de color según clasificación (casos= A); b) 2 grupos de color agrupando azul e intermedio (casos= A+I); c) 3 grupos de color (RLM). *p<0,20

a)

Variable	OR (IC 95%)	p-valor	Variable	OR (IC 95%)	p-valor
rs12203592	79,34 (1,55 - 4054,57)	0,029*	CT	27,88 (1,22 - 639,50)	0,037*
			TT	1	
rs1393350	34,73 (0,93 - 1297,21)	0,055*	AG	1,21 (0,02 - 61,43)	0,923
			GG	0,09 (0,001 - 5,69)	0,256
rs1800407	0,004 (7,82e-08 - 2,35)	0,077*	AA	1	
			AG	0,01 (0,00008 - 2,76620)	0,114*
			GG	1	
rs35397	35,53 (0,18 - 7010,55)	0,185*	GT	0,14 (0,002 - 10,85)	0,373
			TT	0,1 (0,002 - 4,77)	0,242
rs35398	0,01 (0,00001 - 4,08)	0,13*	GT	0,09 (0,003 - 2,99)	0,177*
			TT	1	
rs12910433	27,01 (0,48 - 1535,33)	0,11*	CT	18,48 (0,05 - 68,18)	0,739
			TT	0,52 (0,02 - 14,83)	0,705
rs17680684	0,02 (0,0002 - 1,98)	0,093*	AA	1	
			AG	0,04 (0,0004 - 4,3742)	0,182
			GG	1	
Sexo	408,33 (1,98 - 84134,22)	0,027*	Sexo	65,94 (1,23 - 3523,25)	0,039*
Ancestría	65,61 (0,43 - 10014,46)	0,103*	Ancestría	21,76 (0,94 - 503,88)	0,055*

b)

SNP	OR (IC 95%)	p-valor	Genotipo	OR (IC 95%)	p-valor
rs35398	0,02 (0,0007 - 0,7768)	0,036*	GT	0,06 (8.03e-06 - 442.16)	0,535
			TT	1 (empty)	

c)

Base intermedio

Marrón	RRR (IC 95%)	p-valor
Variable		
rs16891982	0,27 (0,12 - 0,59)	0,001*
rs12203592	0,3 (0,17 - 0,57)	0*
Ancestría	2,27 (1,23 - 4,18)	0,008*

Base azul

Marrón	RRR (IC 95%)	p-valor
rs12203592	0,35 (0,12 - 1,06)	0,064*

3.5 Evaluación de los métodos de predicción de color

La tabla 3.22 muestra los valores de PPV, NPV, Sensibilidad y Especificidad de cada método de predicción en la muestra poblacional. Se puede observar que, respecto al grupo de color intermedio, la sensibilidad fue nula sólo en el caso del IrisPlex. En los demás sistemas, fue el valor más bajo respecto de los otros 2 grupos de color.

Tabla 3.22 Análisis de los modelos de predicción del color del iris. A: azul, I: intermedio, M: marrón. PPV: Valor predictivo positivo. NPV: valor predictivo negativo. Los valores son porcentuales. †Considerando rs12913832 y rs1129038 como haplotipo. 6 SNPs: rs12913832, rs1800407, rs12896399, rs16891982, rs1393350 y rs12203592. 7 SNPs: 6 más rs1129038. 9 SNPs: 7 más rs7183877 y rs4778232.

Método	Nº de SNPs	Modelo de predicción	Color	PPV	NPV	Sensibilidad	Especificidad
IrisPlex	6	Regresión logística multinomial	A	36,54	98,8	86,36	88,21
			I	-	100	0	100
			M	50,80	100	100	29,71
Snipper	7	Bayesiano†	A	36,96	98,04	77,27	89,61
			I	63,56	70,95	49,02	70,95
			M	63,50	76,22	69,05	71,43
		Bayesiano	A	36,96	98,05	77,27	89,64
			I	58,16	72,48	37,25	72,48
			M	56,96	74,31	70,87	61,14
		Regresión logística multinomial†	A	36,36	97,67	72,73	89,96
			I	65,12	69,59	54,90	69,59
			M	66,41	76,30	67,46	75,43
	Regresión logística multinomial	A	35,56	97,67	72,73	89,64	
		I	64,62	69,13	54,90	69,13	
		M	66,14	75,43	66,14	75,43	
	9	Bayesiano†	A	36,17	98,031	77,27	89,25
			I	63,74	77,70	37,91	77,70
			M	58,90	78,26	76,19	61,71
		Bayesiano	A	36,17	98,04	77,27	89,29
			I	59,46	79,87	28,76	79,87
			M	55,25	77,69	78,74	53,71
		A	34,04	97,64	72,73	88,89	
		I	63,95	79,05	35,95	79,05	

		Regresión logística multinomial†	M	58,33	78,95	77,78	60
		Regresión logística multinomial	A	36,17	98,04	77,27	89,29
	I		61,36	77,18	35,29	77,18	
	M		58,08	77,78	76,38	60	

La tabla 3.23 muestra los resultados del área bajo la curva de los distintos sistemas de predicción analizados en la muestra bonaerense, según distintos agrupamientos de color. Se encontraron diferencias significativas entre todas las AUC del grupo de azul con intermedio contra los grupos de azul (ya sea clasificado en 2 ó 3 grupos) dentro de un mismo sistema de predicción ($p < 0,05$). A su vez, comparando sistemas entre sí, se encontró una diferencia significativa entre el AUC de azules en 2 grupos en IrisPlex respecto al de Snipper 9 SNPs RLM sin haplotipo (p -valor = $1,069e^{-05}$) -y por ende, también con los valores de AUC menores- y entre marrones en 2 grupos en IrisPlex y todos los demás (p -valor $< 0,002936$). Por otro lado, en 3 grupos, el azul en IrisPlex fue diferente al de Snipper 9 SNPs RLM sin haplotipo (p -valor $< 0,002284$) -y por ende, también con los valores de AUC menores- y los grupos intermedio y marrón de IrisPlex contra los demás sistemas (p -valor $< 7,042e^{-08}$ y p -valor $< 3,887e^{-05}$, respectivamente. Prueba de DeLong para dos curvas ROC, $\alpha = 0,05$).

Tabla 3.23 AUC de los distintos sistemas de predicción (IC 95%).

Sistema de predicción	2 grupos	
	Azul	Marrón
IrisPlex	0,952 (0,923-0,981)	0,951 (0,921-0,981)
Snipper 7 SNPs Bayes con haplotipo	0,923 (0,884-0,962)	0,882 (0,833-0,931)
Snipper 7 SNPs Bayes sin haplotipo	0,919 (0,877-0,961)	0,880 (0,829-0,930)
Snipper 7 SNPs RLM con haplotipo	0,810 (0,742-0,880)	0,899 (0,853-0,944)
Snipper 7 SNPs RLM sin haplotipo	0,803 (0,733-0,872)	0,896 (0,851-0,942)
Snipper 9 SNPs Bayes con haplotipo	0,925 (0,880-0,970)	0,896 (0,853-0,940)
Snipper 9 SNPs Bayes sin	0,931 (0,891-0,970)	0,893 (0,848-0,939)

haplotipo			
Snipper 9 SNPs RLM con haplotipo	0,839 (0,774-0,903)	0,850 (0,800-0,901)	
Snipper 9 SNPs RLM sin haplotipo	0,840 (0,775-0,905)	0,862 (0,813-0,911)	
	Azul+Intermedio	Marrón	
IrisPlex	0,827 (0,782-0,871)	0,838 (0,795-0,881)	
Snipper 7 SNPs Bayes con haplotipo	0,764 (0,714-0,815)	0,707 (0,648-0,766)	
Snipper 7 SNPs Bayes sin haplotipo	0,762 (0,712-0,812)	0,703 (0,644-0,762)	
Snipper 7 SNPs RLM con haplotipo	0,628 (0,594-0,663)	0,766 (0,714-0,819)	
Snipper 7 SNPs RLM sin haplotipo	0,620 (0,586-0,653)	0,752 (0,698-0,807)	
Snipper 9 SNPs Bayes con haplotipo	0,737 (0,686-0,788)	0,732 (0,675-0,788)	
Snipper 9 SNPs Bayes sin haplotipo	0,753 (0,703-0,803)	0,7131 (0,656-0,771)	
Snipper 9 SNPs RLM con haplotipo	0,643 (0,608-0,677)	0,747 (0,693-0,801)	
Snipper 9 SNPs RLM sin haplotipo	0,643 (0,608-0,678)	0,739 (0,684-0,793)	
	3 grupos		
	Azul	Intermedio	Marrón
IrisPlex	0,943 (0,905-0,980)	0,745 (0,691-0,800)	0,838 (0,795-0,881)
Snipper 7 SNPs Bayes con haplotipo	0,913 (0,854-0,972)	0,566 (0,500-0,632)	0,707 (0,648-0,766)
Snipper 7 SNPs Bayes sin haplotipo	0,911 (0,849-0,974)	0,552 (0,486-0,618)	0,703 (0,644-0,762)

Snipper 7 SNPs RLM con haplotipo	0,812 (0,713-0,911)	0,582 (0,516-0,647)	0,766 (0,714-0,819)
Snipper 7 SNPs RLM sin haplotipo	0,814 (0,716-0,992)	0,5711 (0,506-0,637)	0,752 (0,698-0,807)
Snipper 9 SNPs Bayes con haplotipo	0,912 (0,843-0,981)	0,587 (0,522-0,651)	0,732 (0,675-0,788)
Snipper 9 SNPs Bayes sin haplotipo	0,914 (0,845-0,983)	0,563 (0,498-0,628)	0,713 (0,656-0,771)
Snipper 9 SNPs RLM con haplotipo	0,847 (0,762-0,932)	0,592 (0,532-0,652)	0,747 (0,693-0,801)
Snipper 9 SNPs RLM sin haplotipo	0,851 (0,768-0,937)	0,577 (0,517-0,638)	0,739 (0,684-0,793)

Las figuras 3.13 a 3.15 muestran las curvas ROC de todos estos sistemas de predicción. Se denota un mayor AUC para azules en el caso de 2 grupos según clasificación (figura 3.13). En el caso de 3 grupos, se observa invariablemente el menor AUC para el grupo de color intermedio (figura 3.15).

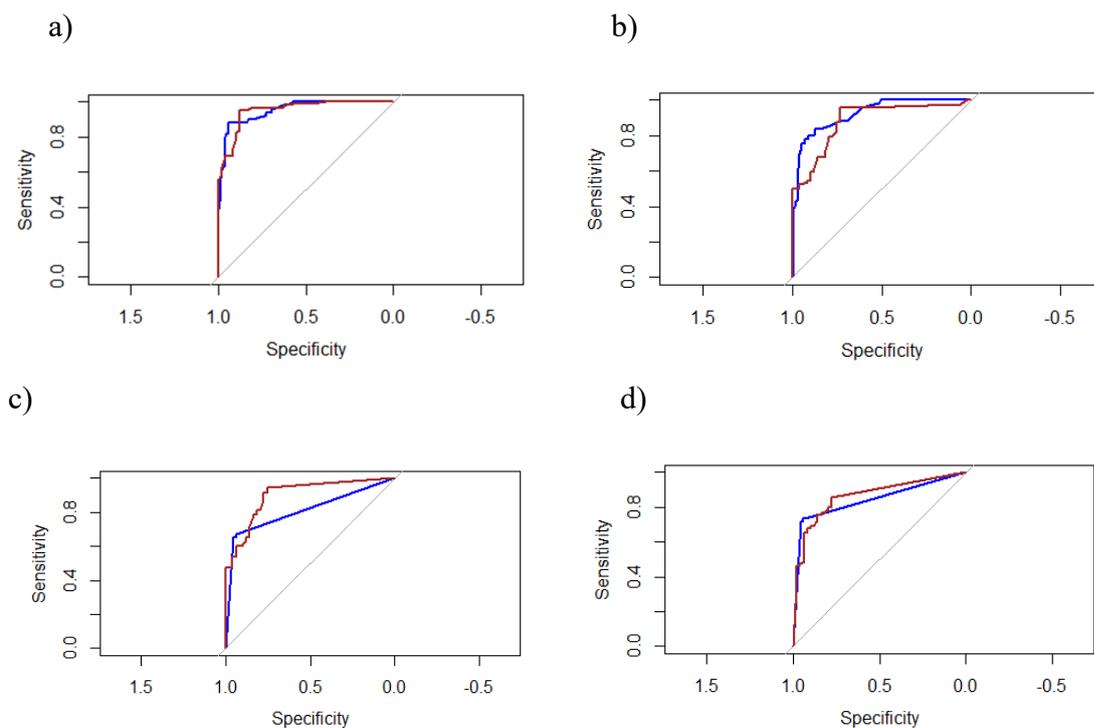


Figura 3.13 Curvas ROC según la clasificación de colores en 2 grupos. a) IrisPlex, b) 7 SNPs Bayes haplotipo, c) 7 SNPs RLM con haplotipo, d) 9 SNPs RLM sin haplotipo.

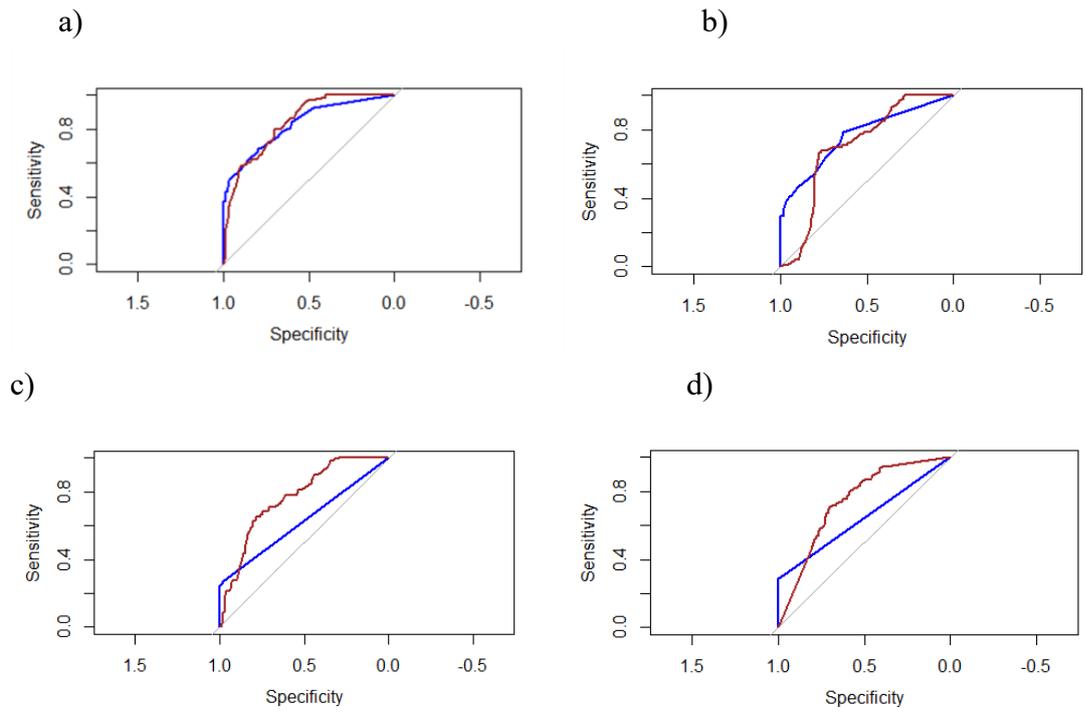


Figura 3.14 Curvas ROC según la clasificación de colores en 2 grupos sumando A+I (curva azul). a) IrisPlex, b) 7 SNPs Bayes haplotipo, c) 7 SNPs RLM con haplotipo, d) 9 SNPs RLM sin haplotipo.

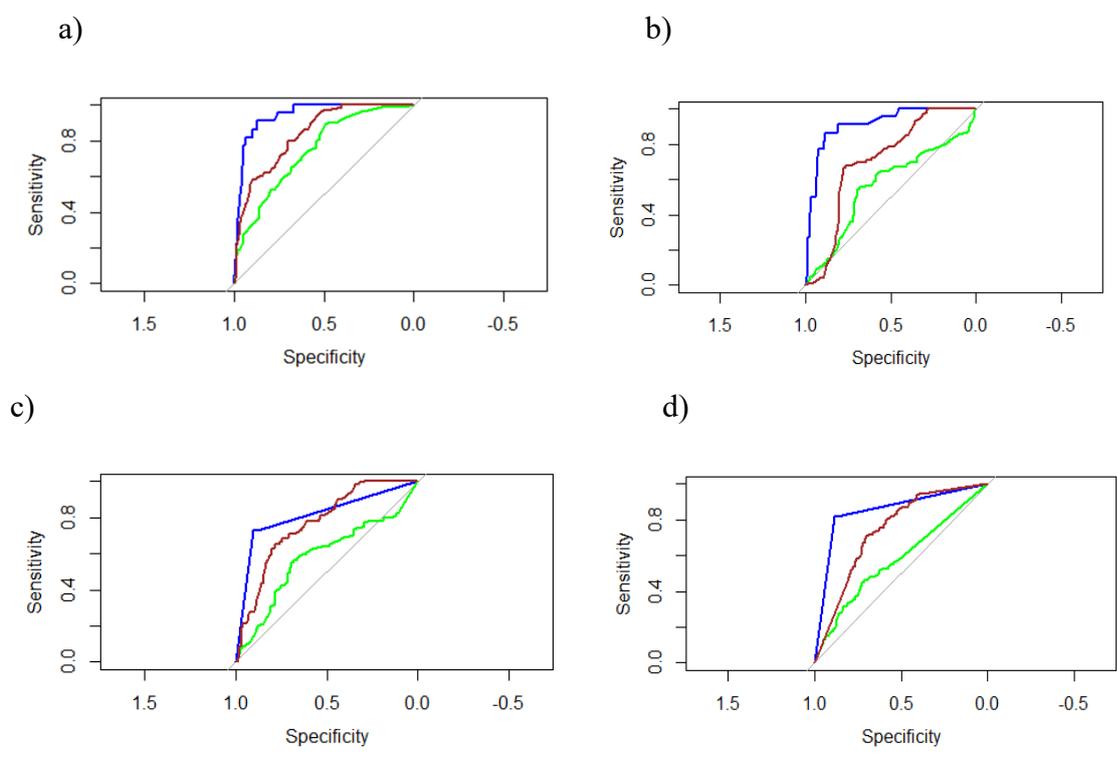


Figura 3.15. Curvas ROC según la clasificación de colores en 3 grupos. a) IrisPlex, b) 7 SNPs Bayes haplotipo, c) 7 SNPs RLM con haplotipo, d) 9 SNPs RLM sin haplotipo.

3.5.1 Asociación entre predicción y ancestría

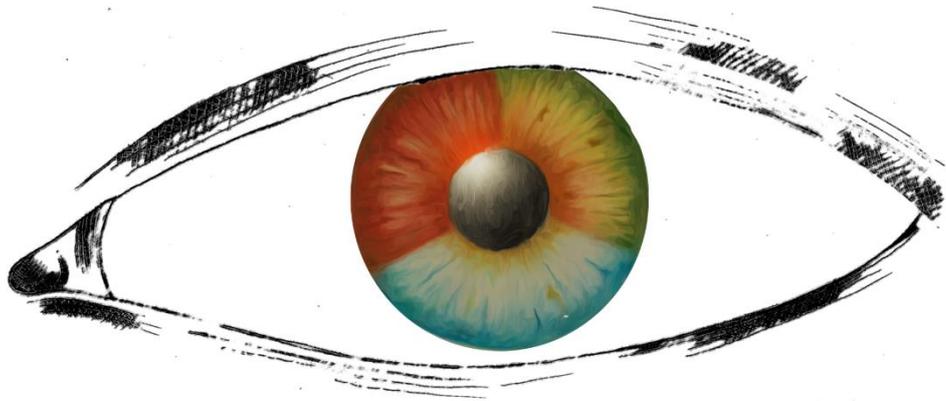
En cuanto a estas predicciones respecto a 3 grupos de color y las ancestrías estimadas, el único caso donde se encontraron diferencias significativas fue en el Irisplex (tabla 3.24), donde el análisis de χ^2 resultó significativo [7,475, p-valor=0,0063, OR= 2,11 (1,23-3,64)].

Tabla 3.24 Distribución de predicciones correctas e incorrectas del IrisPlex según la ancestría.

	Predicción correcta	Predicción incorrecta	Total
No europeo	49	26	75
Europeo	107	120	227
Total	156	146	302

CAPÍTULO 4

Discusión



CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

El color del iris es una característica fenotípica conspicua muy utilizada al momento de describir a una persona, por lo cual el uso de la predicción de este fenotipo a partir del genotipo podría ser de utilidad en el campo de las Ciencias Forenses. Esta tesis se basó en la necesidad de investigar el color del iris y su determinación genotípica en la población argentina, particularmente en la bonaerense, en respuesta a la poca información que se encuentra disponible sobre este tema en poblaciones mixtas (Beleza *et al.*, 2013; Hohl *et al.*, 2018, 2022; Marano *et al.*, 2019, entre otros), a diferencia de la existente sobre la población europea.

En particular, en nuestra población, el acervo génico se compone de un aporte nativo americano, europeo y africano (Seldin *et al.* 2007; Avena *et al.*, 2012; entre otros), llevando a posibles dificultades en la predicción del color del iris a partir de sistemas basados en poblaciones no mixtas con diferentes frecuencias alélicas de los SNPs involucrados. Una evidencia de esta dificultad se observa en los resultados obtenidos en este trabajo al evaluar la predicción del fenotipo a partir del genotipo con dichos sistemas.

Respecto a los grupos de color, el predominante fue el grupo de los intermedios, lo que es esperado en una población miscegenada (Palmal *et al.*, 2021). En segundo lugar se encuentra el grupo de iris color marrón y por último el de color azul, a pesar del considerable aporte europeo encontrado en este estudio.

En cuanto a los grupos de color y la asociación con el sexo, la asociación entre el sexo femenino y el color de iris clasificado como azul es contraria a lo que ocurre según Martínez-Cadenas *et al.* (2013) en la población española. Este hallazgo podría presentarse en nuestra población de manera casual, siendo dependiente de la población, como lo indican ciertos trabajos (Liu *et al.*, 2014; Pospiech *et al.* 2016). Alternativamente, podría explicarse por la influencia de genes del cromosoma X con un aporte aún desconocido sobre la pigmentación (Liu *et al.*, 2014), dado el mayor aporte nativo americano a los cromosomas X de nuestra población (Caputo *et al.*, 2021; Ongaro *et al.*, 2021; entre otros), que podría estar aportando a estas diferencias. Por otro lado, las hormonas sexuales podrían ocasionar una expresión diferencial de los genes relacionados a la pigmentación (Martinez-Cadenas *et al.*, 2013). Otras interpretaciones también son posibles, ya que este tema no se encuentra totalmente explicado por aquellos autores que apoyan estas diferencias.

Respecto a los SNPs de los genes analizados en relación al color, la variación mostró algunas diferencias con los datos reportados para poblaciones no mixtas, principalmente europeas.

Resulta llamativa la ausencia (rs121918166) o escasez (rs74653330) de variabilidad de algunos polimorfismos que se reportaron formando parte de un haplotipo junto a rs12913832:A>G y rs1800407:G>A (p.Arg419Gln), que explica el 75,6% de la variación normal del color en la población portuguesa (Andersen *et al.* 2016), y que también fue analizada en noruegos (excepto para rs121918166, Salvo *et al.*, 2022).

Otros resultados obtenidos en el presente trabajo están en concordancia con lo reportado en la bibliografía previa. El SNP rs16891982:C>G se encontró fuera del EHW, como se ha

informado para otras poblaciones (Silva de Cerqueira *et al.* 2014; Wollstein *et al.*, 2017; de Souza *et al.*, 2021), si bien en el caso de nuestra población, con un N menor se ajusta al EHW (Hohl *et al.*, 2018). Esto podría estar señalando el efecto de una migración reciente u otro/s proceso/s evolutivos que afectan a la población bonaerense.

Otra posible explicación puede estar dada por el tipo de cambio de nucleótido (transversión C>G), que puede dar lugar a ciertos errores de genotipado (Iniesta *et al.* 2005; Silva de Cerqueira *et al.* 2014). Por otro lado, la falta de ajuste al EHW puede deberse a limitaciones debido al tamaño muestral utilizado, siendo más probable esta última como causa principal. Hasta que se obtengan resultados más detallados, esta variante debe considerarse con precaución en un modelo de predicción para nuestra población. Otro SNP del mismo gen también se presenta fuera del EHW (rs35397, en desequilibrio de ligamiento respecto al rs16891982, que se encuentra cercano), lo cual podría interpretarse como un indicio de un proceso de selección sobre el gen *SLC45A2*. Sin embargo, este hallazgo requiere confirmación dado que el número de individuos que pudo tipificarse para rs35397 es menor.

En cuanto a las posibles nuevas variantes, las dos halladas en el gen *OCA2* resultan de interés, teniendo en cuenta que es uno de los genes más asociados al color según la bibliografía (Eiberg y Mohr, 1996; Eiberg *et al.* 2008; entre otros).

Los haplotipos estimados más frecuentemente observados como asociados a color marrón frente a azul e intermedio, coincidieron en parte con el análisis realizado por Eiberg *et al.* (2008) en la inclusión de los alelos rs1129038*C, rs12913832*A y rs7183877*C. También hay acuerdo en el hecho de que el SNP rs7183877 varíe entre los alelos A y C en la asociación con color marrón, a pesar de haberlo encontrado en nuestro estudio en desequilibrio de ligamiento con los otros 2 loci mencionados (p-valor=0). Visser *et al.* (2012) encontraron el alelo rs7183877*C en líneas celulares con baja y con alta pigmentación.

Se destaca la importancia del ligamiento entre rs1129038*C y rs12913832*A, asociado a color marrón frente a azul e intermedio, en coincidencia con otras poblaciones (Eiberg *et al.*, 2008; Mengel-From *et al.*, 2010).

Respecto a los haplotipos estimados de *OCA2-HERC2*, teniendo en cuenta el SNP rs1800407 y el rs12913832 (ambos presentes en el IrisPlex), la mayor frecuencia del haplotipo rs1800407*G - rs12913832*A, en asociación con el color marrón es lo esperado. Asimismo, este resultado se contrapone a lo reportado para la población noruega, de ancestría europea no mixta, donde se encontró sólo un individuo de ojos marrones con este haplotipo (Salvo *et al.*, 2022).

En las poblaciones parentales la menor variabilidad respecto a los SNPs de color de iris en africanos y nativos americanos justificaría su baja diversidad fenotípica respecto al color. La diversidad fenotípica hallada en los bonaerenses explica que resulte más cercana a la población europea, seguida por la nativa y más alejada de la africana, teniendo en cuenta el origen europeo del color de iris azul (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994).

Respecto a los marcadores de ancestría, los 2 que resultaron monomórficos (rs1426654*A y rs717225*T) presentaron en cada caso el alelo que presentó la mayor frecuencia en AMBA (Patiño Rico, 2021 y comunicación personal).

También en coincidencia con lo descrito por Patiño Rico (2021), no se encontraron grandes diferencias al analizar la ancestría con todos los AIMs o eliminando aquellos que no se ajustaron al EHW. Respecto a ello, Patiño Rico propone que la falta de ajuste al EHW podría deberse a la acción de mecanismos microevolutivos o bien a inconvenientes en la técnica (de amplificación, de resolución en gel y/o de lectura).

En la comparación con las ancestrías informadas en otros trabajos para la provincia de Buenos Aires (Avena *et al.*, 2001, 2006; Martínez-Marignac *et al.*, 2004; Seldin *et al.*, 2007; Toscanini *et al.*, 2011; Muzzio *et al.*, 2018, entre otros), el menor aporte nativo americano encontrado en este trabajo podría señalar cierto sesgo en la muestra utilizada. Sin embargo, la ancestría preponderante es europea, seguida de la nativa y luego la africana, como en la bibliografía ya mencionada, aunque los valores son diferentes.

A pesar de no encontrar un aporte nativo alto, se denotan las dificultades para predecir el color de iris con los sistemas desarrollados a partir de información genética de la población europea.

Observando la variabilidad entre poblaciones dentro de los grupos, la misma aumenta al agrupar a la población bonaerense con la nativa americana respecto a bonaerenses por fuera, y este valor disminuye al agruparse con europeos pero no tanto como cuando están todas separadas, lo cual remarca las diferencias de bonaerenses con europeos. Esto explica que, a pesar de haber obtenido los valores más bajos de *Fst* entre nuestra población y la parental europea, los valores fueron significativos.

Respecto a los grupos de color, la ancestría europea aumenta y las nativa y africana disminuyen cuando se observa desde el grupo de color marrón al intermedio y por último al azul. Algo similar ocurre con la población de Brasil analizada por Carratto *et al.* (2021). Esto explica las diferencias significativas entre los porcentajes de ancestría europea y nativa americana de los grupos de color azul e intermedio respecto al marrón, a la vez que no hubo diferencias significativas entre azules e intermedios, mostrando un componente europeo alto (y similar) en ambos grupos. Por otro lado, la comparación de la ancestría africana no denotó diferencias entre los grupos probablemente debido a que la misma fue baja en todos los casos. La correlación entre fenotipo y ancestría coincide con datos obtenidos para otras poblaciones (Ruiz-Linares *et al.*, 2014; Silva de Cerqueira *et al.*, 2014; Adhikari *et al.*, 2019, entre otros trabajos) que han demostrado que la ancestría genética continental tiene un poder predictivo considerable. A su vez, los SNP utilizados para la predicción de la pigmentación se encuentran entre los más correlacionados con los componentes de la ancestría continental, probablemente como resultado de la frecuencia variable de varios alelos asociados con la pigmentación entre las poblaciones (Palmal *et al.*, 2021).

Teniendo en cuenta la asociación de la ancestría con el color, se encontró asociada la ancestría europea con el grupo de azules más intermedios (es decir, color marrón asociado a no europeo).

Al analizar la clasificación en tres grupos de color, el resultado fue significativo, asociándose la ancestría europea con el color intermedio. Puesto que además se encontró asociación de la ancestría con algunos SNPs de color de iris, la ancestría podría ser un factor de confusión a la hora de predecir fenotipo desde el genotipo. Este factor podría sobreestimar o alternativamente subestimar el efecto de los SNPs sobre el color del iris, por lo que esto debería analizarse más en profundidad (Gómez-Restrepo y Benavides, 2006).

Respecto a la asociación genotipo-fenotipo, los resultados de ciertos SNPs coinciden con lo observado para la población europea y otros no. Sobre los SNPs que se incluyen en el IrisPlex, el rs12913832*G se encontró asociado de forma individual en todos los análisis realizados, coincidiendo con la bibliografía, dejando en claro la importancia de este marcador (Liu *et al.*, 2009; Pietroni *et al.*, 2014, entre otros). En las regresiones logísticas, cuando no fue omitido por el análisis, se encontró como una variable explicativa de importancia. Dada la mayor ancestría europea de la población estudiada, llama la atención la mayor frecuencia del alelo A, contrariamente al alelo mayoritario en europeos (Walsh *et al.*, 2011b; 1KG The 1000 Genomes Project Consortium, 2015).

El rs1800407 no se encontró asociado de manera individual, pero sí en las regresiones logísticas, con el alelo A aumentando la probabilidad de azules e intermedios (concordando con Liu *et al.*, 2010) o con el alelo G aumentando la probabilidad de azules (coincidiendo con Rebbek *et al.*, 2002). Estos resultados contrapuestos podrían deberse a la baja frecuencia encontrada del alelo A en nuestra población, lo que también se ha reportado en europeos (Walsh *et al.*, 2012) y mixta (de Souza *et al.*, 2021).

El rs16891982, cuando se encontró asociado, fue con el alelo informado como de riesgo en bibliografía (alelo G, Wilde *et al.*, 2014). Sin embargo, este resultado debe tomarse con precaución ya que este SNP se encontró fuera del EHW en este estudio.

El rs12896399 no se encontró asociado individualmente al color pero fue significativo en las logísticas, con el alelo de riesgo (T) aumentando la probabilidad del color azul, coincidiendo con bibliografía respecto a población europea (Sulem *et al.*, 2007; Hart *et al.*, 2013).

El rs1393350*A se encontró asociado de forma individual y en las logísticas a azul e intermedio en conjunto. Para 3 grupos se asoció a los colores intermedio y azul (ambos respecto al color marrón), contrariamente a lo observado por Sulem *et al.* (2007), que lo informó como útil para diferenciar entre azules e intermedios.

El rs12203592*T se asoció individualmente al grupo de azul más intermedio, y el alelo contrario a intermedio y marrón. Fue significativo en este mismo sentido en las logísticas para 2 grupos. El alelo más frecuente en nuestra población no coincidió con el de mayor frecuencia en europeos (Sturm y Duffy, 2012) a pesar de la prevalencia de la ancestría europea en los bonaerenses.

Por todo lo dicho, se encontró que los SNPs presentes en el IrisPlex se comportan de la manera esperada según la bibliografía en cuanto a la asociación genotipo-fenotipo (excepto en parte el rs1800407).

Los SNPs que se sumaron para analizar con Snipper fueron rs1129038, rs7183877 y rs4778232.

Respecto al rs1129038*T, los resultados coincidentes con los expuestos para el SNP rs12913832*G, se explican por el ligamiento demostrado entre ambos.

El rs7183877*C, se asoció individualmente al grupo de azules y azules más intermedios, pero no en el análisis en conjunto (logísticas). Coincide con el trabajo de Eiberg *et al.* (2008) que reportó haplotipos para ojos azules sólo con la presencia del alelo C. Sin embargo, su asociación con el color no es clara aún (Visser *et al.*, 2012).

En cuanto al rs4778232*C, se encontró asociado individualmente a color azul y azul más intermedio, y también fue significativo en el aumento de la probabilidad del color azul. Llamativamente, no es uno de los SNPs más relacionados con el color de iris en otras poblaciones (Eriksson *et al.*, 2010), pero es utilizado en el sistema de predicción Snipper (Ruiz *et al.*, 2013).

Cabe mencionar que, al considerar las frecuencias alélicas de los europeos en general (1KG, The 1000 Genomes Project Consortium, 2015), las mismas se ven invertidas para los SNPs rs12913832, rs1129038 y rs4778232 respecto a nuestra población.

Algo similar a lo que ocurre con el SNP rs4778232 sucede con rs1900758: se encontró asociado al color con su alelo A (grupo de azul e intermedios), no siendo uno de los SNPs más relacionados con el color según bibliografía (Frudakis *et al.*, 2003; Branicki *et al.*, 2008; Jaworek *et al.*, 2012).

Otro SNP que se encontró asociado al color de iris marrón de forma individual fue el rs6497271*G. Dicho alelo se encontró en una frecuencia alta en nuestra población, coincidiendo con Sturm *et al.* (2008).

El alelo rs35398*G se encontró asociado al grupo de azul más intermedio de manera individual, a pesar de que en la bibliografía sólo se lo reporta asociado a color de pelo (Eriksson *et al.*, 2010).

Por otro lado, el SNP rs1800410, no se asocia a los grupos de color en forma individual, pero sí en algunas regresiones logísticas, con el alelo A aumentando la probabilidad del color azul contra intermedio, y el G aumentando la probabilidad del color marrón contra azul. En bibliografía no se lo encuentra asociado a los grupos de color (Frudakis *et al.*, 2003), pero sí a la cuantificación del color como en Lippert *et al.* (2017). Respecto a esto último, se vieron asociados todos los SNPs incluidos en los sistemas de predicción a al menos una variable de la cuantificación, excepto el rs1393350, rs7183877 y rs12896399. El caso de los dos primeros podría deberse a su baja variabilidad en nuestra población, llevando a que el análisis realizado pierda eficacia para detectar la asociación.

En cuanto a los genotipos, tanto en los análisis individuales como por regresión logística, los resultados fueron concordantes entre sí y con la bibliografía previa (Eiberg *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2019; entre otros).

Debido a que algunos SNPs son poco variables, el alelo minoritario sólo se observó en pocos individuos, por lo cual, la precisión de los intervalos de confianza fue baja en algunos de los análisis realizados.

Respecto a las imágenes, las diferencias halladas entre la cuantificación del color en aquellas con balance de blancos en automático y en tungsteno pudieron resolverse mediante la transformación a tungsteno desde el balance de blancos automático. La misma eliminó la disparidad en la cuantificación de color dada por el balance no homogéneo.

La concordancia entre los grupos de color y las distintas variables de la cuantificación indican la utilidad de las mismas para diferenciar entre los grupos de color en nuestra población por medio del uso del software ImageJ, dado que concuerda la separación en grupos (subjetiva) con una medida objetiva (Edwards *et al.*, 2012; Beleza *et al.*, 2013). La similitud en la medida de ΔE entre azules e intermedios es esperable, ya que la diferencia de color entre las zonas pupilar y ciliar del iris (heterocromía central) es notoria en grado similar en los colores claros (Larsson *et al.*, 2011). Por esta misma razón, es lógico el resultado obtenido de la asociación de los mismos alelos con el aumento de L^* y con ΔE (rs12913832*G, rs16891982*G, rs12203592*T y rs1800407*A - este último sólo con ΔE), y que los mismos se asocien al grupo de color azul.

Se observa, como es esperado, desde el color azul hacia el intermedio y luego marrón, una disminución en L^* (luminosidad) y un aumento en a^* (color rojo), como fue reportado en Edwards *et al.* (2016a) y Wollstein *et al.* (2017). La mayor cantidad de feomelanina (pigmento amarillo-rojo), presente en ojos verdes y marrones (Prota *et al.*, 1998; Wielgus y Sarna, 2005; Wakamatsu *et al.*, 2008) se relaciona con este valor, y un mayor valor de b^* (color amarillo) en intermedios (principalmente) y marrones también se condice con esto último.

Es razonable, entonces, la relación significativa del aumento de a^* con 2 alelos que se asocian al color marrón en nuestra población.

Es esperable también en parte, el resultado obtenido para b^* , aunque es llamativo que el alelo de rs1129038 relacionado sea el contrario al esperado según el ligamiento con el rs12913832.

En parte, estos resultados se condicen con los de Wollstein *et al.* (2017), aunque en dicho trabajo se encontraron más asociaciones de los SNPs con estas medidas de color, probablemente por tratarse de una población de ancestría diferente a la analizada en el presente estudio.

El ΔE no se encontró asociado al rs12896399, como sí lo encontró Larsson respecto a la heterocromía en europeos (2011). El resultado en nuestra población coincide con el de Edwards *et al.* en este caso (2016a), asociándose con rs12913832 (en su análisis de europeos y de población de Asia del Sur), además de otros 3 marcadores en nuestro estudio. Por el contrario,

no coincide nuestro resultado con Edwards respecto a la asociación que encontró con el rs1393350 y la heterocromía.

Respecto a los sistemas de predicción, el mejor resultado para la población estudiada se obtiene al analizar 2 categorías (azul y marrón, según observadoras), aunque no significativamente diferente al separar en 3 categorías. Contrariamente, la clasificación en 2 grupos sumando azules e intermedios resulta en una disminución significativa en el poder predictivo.

El sistema IrisPlex resulta adecuado para predecir los colores azul y marrón en bonaerenses: es el que mejor clasifica a los ojos marrones pero sin clasificar bien a ningún color intermedio, concordando con resultados obtenidos para otras poblaciones mixtas (Marano *et al.*, 2019; Carratto *et al.*, 2021; Palmal *et al.*, 2021) e incluso europeas como la población noruega (Meyer *et al.*, 2021). Esto remarca la importancia de la población de referencia utilizada para el desarrollo del sistema de predicción.

El sistema IrisPlex tiene baja exactitud para la predicción de intermedios, como ya se demostró previamente (Walsh *et al.*, 2011a). Respecto a los azules, no hay diferencias entre este sistema y el Snipper en los casos donde se utilizó como clasificador bayesiano, pero respecto a los intermedios resulta mejor el sistema Snipper con 7 SNPs, con rs1129038 y rs12913832 ligados, y RLM. El aumento de sensibilidad indica que la predicción de intermedios mejoraría al adicionar el SNP rs1129038, que presenta un desequilibrio de ligamiento significativo con rs12913832 en nuestra población. Además, este sistema está entre los que resultan en los PPV más altos para los 3 colores.

La falta de una buena predicción de intermedios podría deberse a la acción todavía desconocida de ciertos polimorfismos o incluso genes asociados a la pigmentación (Liu *et al.*, 2009; Walsh *et al.*, 2012, 2014). Se insiste en buscar la mejor predicción de intermedios porque, debido a la ancestría mixta de nuestra población, este color se corresponde a una gran cantidad de individuos (Palmal *et al.*, 2021).

Los resultados muestran que la ancestría estaría interviniendo en las predicciones erróneas sólo para el IrisPlex (mayor riesgo de una predicción incorrecta en el caso de ancestría no europea). Que no se haya encontrado un resultado similar para las predicciones del Snipper podría deberse a las diferencias aplicadas en el desarrollo del mismo. Esto podría estar demostrando que el sistema Snipper es en parte independiente de la ancestría en la predicción del color en nuestra población.

Como se expuso anteriormente, este resultado podría reforzar la idea de un aporte nativo diferencial respecto al color del iris.

Finalmente, estos resultados demuestran la importancia de llevar a cabo estudios de este tipo en poblaciones de ancestría mixta.

CAPÍTULO 5

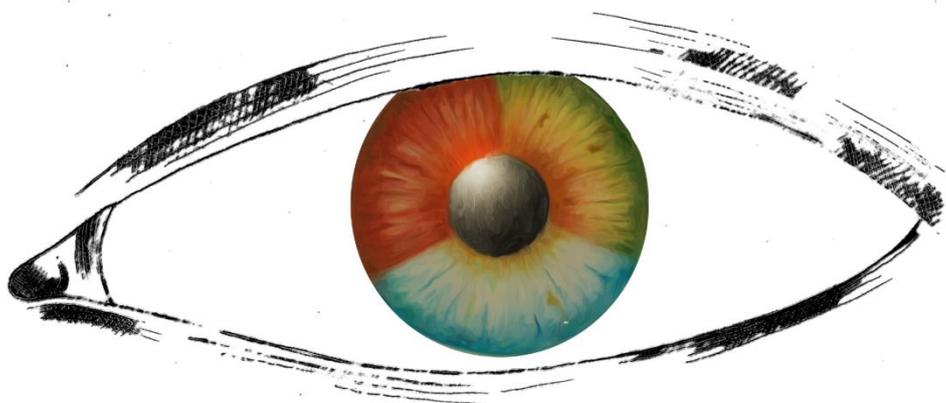
Conclusiones



CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- La variación genética relacionada con el color del iris en la población bonaerense se relaciona con la variación previamente descrita para la población europea, pero con particularidades propias.
- Los distintos componentes de ancestría que aportan a la diversidad genética de los bonaerenses influyen en la determinación genética del color de los ojos.
- La variabilidad particular de la genética determinante del color del iris resulta en dificultades para aplicar los sistemas de predicción del color validados en población europea. La predicción del fenotipo a partir del genotipo constituye una herramienta prometedora para la identificación de personas, aunque para promover su aplicación, debe ser analizada en cada población en particular. En el caso de la población bonaerense, los sistemas de predicción disponibles actualmente no resultaron totalmente satisfactorios, y se encontraron ciertas particularidades esperables en una población mixta. Por ello, se deberían analizar más en profundidad ciertas variantes que mostraron resultados interesantes en este trabajo, no utilizadas en los sistemas de predicción analizados, y los posibles nuevos polimorfismos que no se encuentran informados en las bases de datos.
- El color de iris intermedio es universalmente el más difícil de predecir. Para su resolución, queda pendiente un análisis de asociación genotipo-fenotipo de mayor profundidad, que probablemente podrá lograrse a partir de la determinación de nuevas variantes genéticas asociadas a este fenotipo en poblaciones de origen mixto.

Bibliografía



BIBLIOGRAFÍA

Abramoff, M. D., Magalhaes, P. J., & Ram, S. J. (2004). Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11, 36–42

Adhikari, K., Mendoza-Revilla, J., Sohail, A., Fuentes-Guajardo, M., Lampert, J., Chacón-Duque, J. C., Hurtado, M., Villegas, V., Granja, V., Acuña-Alonzo, V., Jaramillo, C., Arias, W., Lozano, R. B., Everardo, P., Gómez-Valdés, J., Villamil-Ramírez, H., Silva de Cerqueira, C. C., Hunemeier, T., Ramallo, V., Schuler-Faccini, L., ... Ruiz-Linares, A. (2019). A GWAS in Latin Americans highlights the convergent evolution of lighter skin pigmentation in Eurasia. *Nature communications*, 10(1), 358. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08147-0>

Alfaro, E. L., Dipierri, J. E., Gutiérrez, N., & Vullo, C. M. (2004). Frecuencias génicas y haplotípicas del sistema HLA en el Noroeste Argentino. *Antropo*, 6, 15-23.

Alfaro, E. L., Dipierri, J. E., Gutierrez, N. I., & Vullo, C. M. (2005). Genetic structure and admixture in urban populations of the Argentine North-West. *Annals of Human Biology*, 32(6), 724-737. <https://doi.org/10.1080/03014460500287861>

Allwood, J. S., & Harbison, S. (2013). SNP model development for the prediction of eye colour in New Zealand. *Forensic science international. Genetics*, 7(4), 444–452. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.03.005>

Andersen, J. D., Johansen, P., Harder, S., Christoffersen, S. R., Delgado, M. C., Henriksen, S. T., Nielsen, M. M., Sørensen, E., Ullum, H., Hansen, T., Dahl, A. L., Paulsen, R. R., Børsting, C., & Morling, N. (2013). Genetic analyses of the human eye colours using a novel objective method for eye colour classification. *Forensic science international. Genetics*, 7(5), 508–515. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.05.003>

Anderson, M. G., Hawes, N. L., Trantow, C. M., Chang, B., & John, S. W. (2008). Iris phenotypes and pigment dispersion caused by genes influencing pigmentation. *Pigment cell & melanoma research*, 21(5), 565-578.

Armada Maresca, F., Durán, M. A., Vázquez, P., & Pastora, N. (1996). V. 2. Siderosis y otras maculopatías de depósito. *Archives of Ophthalmology*, 114, 1097-1100.

Avena, S. A., Goicoechea, A. S., Dugoujon, J. M., Slepoy, M. G., Slepoy, A. S., & Carnese, F. R. (2001). Análisis antropogenético de los aportes indígena y africano en muestras hospitalarias de la Ciudad de Buenos Aires. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 3.

Avena, S., Goicoechea, A. S., Rey, J., Dugoujon, J. M., Dejean, C. B., & Carnese, F. R. (2006). Mezcla génica en una muestra poblacional de la ciudad de Buenos Aires. *Medicina (Buenos Aires)*, 66, 113–118.

Avena, S., Via, M., Ziv, E., Perez Stable, E. J., Gignoux, C. R., Dejean, C., Huntsman, S., Torres-Mejía, G., Dutil, J., Matta, J. L., Beckman, K., Gonzalez Burchard, E., Parolin, M. L., Goicoechea, A., Acreche, N., Boquet, M., Rios Part, M. C., Fernandez, V., Rey, J., ... Fejerman, L. (2012). Heterogeneity in

genetic admixture across different regions of Argentina. *PLoS One*, 7, e34695. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034695>

Batzer, M., Stoneking, M., Alegria-Hartman, M., Bazan, H., Kass, D., Shaikh, T., Novick, G., Ioannou, P., Scheer, W., and Herrera, R. (1994). African origin of human-specific polymorphic Alu insertions. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 91, 12288- 12292.

Bekker-Jensen, S., & Mailand, N. (2010). Assembly and function of DNA double-strand break repair foci in mammalian cells. *DNA repair*, 9(12), 1219–1228. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.09.010>

Beleza, S., Johnson, N. A., Candille, S. I., Absher, D. M., Coram, M. A., Lopes, J., Campos, J., Araújo, I. I., Anderson, T. M., Vilhjálmsson, B. J., Nordborg, M., Correia e Silva, A., Shriver, M. D., Rocha, J., Barsh, G. S., & Tang, H. (2013). Genetic architecture of skin and eye color in an African-European admixed population. *PLoS Genetics*, 9, e1003372. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003372>

Bellono, N. W., & Oancea, E. V. (2014). Ion transport in pigmentation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 563, 35-41.

Bellono, N. W., Escobar, I. E., Lefkovith, A. J., Marks, M. S., & Oancea, E. (2014). An intracellular anion channel critical for pigmentation. *eLife*, 3, e04543. <https://doi.org/10.7554/eLife.04543>

Bin, B. H., Bhin, J., Yang, S. H., Shin, M., Nam, Y. J., Choi, D. H., Shin, D. W., Lee, A. Y., Hwang, D., Cho, E. G., & Lee, T. R. (2015). Membrane-Associated Transporter Protein (MATP) Regulates Melanosomal pH and Influences TYROSINASE Activity. *PLoS one*, 10(6), e0129273. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129273>

Bito, L. Z., Matheny, A., Cruickshanks, K. J., Nondahl, D. M., & Carino, O. B. (1997). Eye color changes past early childhood. The Louisville Twin Study. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 115(5), 659–663. <https://doi.org/10.1001/archophth.1997.01100150661017>

Borrell, Y. J., Pinera, J. A., Sánchez Prado, J. A., & Blanco, G. (2012). Mitochondrial DNA and microsatellite genetic differentiation in the European anchovy *Engraulis encrasicolus* L. *ICES Journal of Marine Science*, 69(8), 1357-1371.

Branicki, W., Szczerbińska, A., Brudnik, U., Wolańska-Nowak, P., & Kupiec, T. (2008). The *OCA2* gene as a marker for eye colour prediction. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 1(1), 536-537.

Bush, W. D., Garguilo, J., Zucca, F. A., Albertini, A., Zecca, L., Edwards, G. S., Nemanich, R. J., & Simon, J. D. (2006). The surface oxidation potential of human neuromelanin reveals a spherical architecture with a pheomelanin core and a eumelanin surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(40), 14785–14789. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604010103>

Caputo, M., Amador, M. A., Sala, A., Riveiro dos Santos, A., Santos, S., & Corach, D. (2021). Ancestral genetic legacy of the extant population of Argentina as predicted by autosomal and X-chromosomal DIPs. *Molecular Genetics and Genomics*, 296, 581–590. <https://doi.org/10.1007/s00438-020-01755-w>

Cann, H. M., de Toma, C., Cazes, L., Legrand, M. F., Morel, V., Piouffre, L., Bodmer, J., Bodmer, W. F., Bonne-Tamir, B., Cambon-Thomsen, A., Chen, Z., Chu, J., Carcassi, C., Contu, L., Du, R., Excoffier, L., Ferrara, G. B., Friedlaender, J. S., Groot, H., ... Cavalli-Sforza, L. L. (2002). A human genome diversity cell line panel. *Science*, 296(5566), 261–262. <https://doi.org/10.1126/science.296.5566.261b>

Carratto, T. M. T., Marcorin, L., do Valle-Silva, G., de Oliveira, M. L. G., Donadi, E. A., Simões, A. L., Castelli, E., & Mendes-Junior, C. T. (2021). Prediction of eye and hair pigmentation phenotypes using the HRISplex system in a Brazilian admixed population sample. *International Journal of Legal Medicine*, 135, 1329–1339. <https://doi.org/10.1007/s00414-021-02554-7>

Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, Piazza A (1994). The History and geography of Human genes. Princeton University Press, Princeton

Chaitanya, L., Breslin, K., Zuñiga, S., Wirken, L., Pośpiech, E., Kukla-Bartoszek, M., Sijen, T., de Knijff, P., Liu, F., Branicki, W., Kayser, M., & Walsh, S. (2018). The HRISplex-S system for eye, hair and skin colour prediction from DNA: Introduction and forensic developmental validation. *Forensic Science International: Genetics*, 35, 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.04.004>

Coon, C. S. (1939). Pigmentation of Hair and Eyes in *The Races of Europe*, New York, United States: Macmillan, 875 pp.

Corach, D., Lao, O., Bobillo, C., van Der Gaag, K., Zuniga, S., Vermeulen, M., van Duijn, K., Goedbloed, M., Vallone, P. M., Parson, W., de Knijff, P., & Kayser, M. (2010). Inferring continental ancestry of Argentineans from autosomal, Y-chromosomal and mitochondrial DNA. *Annals of Human Genetics*, 74, 65–76. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.2009.00556.x>

Costin, G. E., Valencia, J. C., Vieira, W. D., Lamoreux, M. L., & Hearing, V. J. (2003). TYRsinase processing and intracellular trafficking is disrupted in mouse primary melanocytes carrying the underwhite (uw) mutation. A model for oculocutaneous albinism (OCA) type 4. *Journal of cell science*, 116(15), 3203–3212. <https://doi.org/10.1242/jcs.00598>

Davenport, G. C., & Davenport, C. B. (1907). Heredity of eye-color in man. *Science (New York, N.Y.)*, 26(670), 589–592. <https://doi.org/10.1126/science.26.670.589-b>

de Souza, J. M., Bastos, M. L., Silva, B. de O., Lima, K. G. G. de, Albuquerque, G. S. de., Oliveira, R. S. de., Lima, L. P. O. de, Dellalibera, E., Lins, A. J. da C. C., & Muniz, M. T. C. (2021). Forensic DNA Phenotyping: starting point to prediction model in Pernambuco population, Brazil. *Research, Society and Development*, 10(13), e262101320955. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i13.20955>

D'Alba, L., & Shawkey, M. D. (2019). Melanosomes: Biogenesis, Properties, and Evolution of an Ancient Organelle. *Physiological reviews*, 99(1), 1–19. <https://doi.org/10.1152/physrev.00059.2017>

Dembinski, G. M., & Picard, C. J. (2014). Evaluation of the IrisPlex DNA-based eye color prediction assay in a United States population. *Forensic science international. Genetics*, 9, 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.12.003>

Devoto, F. (2007). La inmigración de ultramar. In Torrado, S. (ed). Población y Bienestar en la Argentina del Primero al Segundo Centenario (pp. 531–548) Edhasa.

Dipierri JE, Alfaro E, Vullo C, Gutierrez N (1997) El polimorfismo HLA en el noroeste argentino. III Jornadas Nacionales de Antropología Biológica. Rosario. Argentina.

Duffy, D. L., Montgomery, G. W., Chen, W., Zhao, Z. Z., Le, L., James, M. R., Hayward, N. K., Martin, N. G., & Sturm, R. A. (2007). A three–single-nucleotide polymorphism haplotype in intron 1 of *OCA2* explains most human eye-color variation. *The American Journal of Human Genetics*, *80*, 241–252. <https://doi.org/10.1086/510885>

Duque C., Parra M., Valencia A., Bedoya G., Ruiz-Linares A. (2012) Comparación de Cuatro programas utilizados en la determinación de la composición genética ancestral de la población antioqueña. *Revista Colombiana de Antropología*, *48*(1): 233 – 257.

Eagle Jr, R. C. (1988). Iris pigmentation and pigmented lesions: an ultrastructural study. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, *86*, 581.

Earl, D. A. and vonHoldt, B. M. (2012) Structure harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, *4*(2): 359-361 doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.

Edwards M, Gozdzik A, Ross K, Miles J, Parra EJ.(2012). Technical note: quantitative measures of iris color using high resolution photographs. *Am J Phys Anthropol*. *147*(1):141–9.

Edwards, M., Cha, D., Krithika, S., Johnson, M., Cook, G., & Parra, E. J. (2016a). Iris pigmentation as a quantitative trait: variation in populations of European, East Asian and South Asian ancestry and association with candidate gene polymorphisms. *Pigment cell & melanoma research*, *29*(2), 141-162. doi: 10.1111/pcmr.12435

Edwards, M., Cha, D., Krithika, S., Johnson, M., & Parra, E. J. (2016b). Analysis of iris surface features in populations of diverse ancestry. *Royal Society open science*, *3*(1), 150424.<http://dx.doi.org/10.1098/rsos.150424>

Eiberg, H., & Mohr, J. (1987). Major genes of eye color and hair color linked to LU and SE. *Clinical genetics*, *31*(3), 186–191. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1987.tb02793.x>

Eiberg, H., & Mohr, J. (1996). Assignment of genes coding for brown eye colour (BEY2) and brown hair colour (HCL3) on chromosome 15q. *European Journal of Human Genetics*, *4*(4), 237-241. <https://doi.org/10.1159/000472205>

Eiberg, H., Troelsen, J., Nielsen, M., Mikkelsen, A., Mengel-From, J., Kjaer, K., & Hansen, L. (2008). Blue eye color in humans may be caused by a perfectly associated founder mutation in a regulatory element located within the *HERC2* gene inhibiting *OCA2* expression. *Human Genetics*, *123*, 177–187. <https://doi.org/10.1007/s00439-007-0460-x>

Eriksson, N., Macpherson, J. M., Tung, J. Y., Hon, L. S., Naughton, B., Saxonov, S., Avey, L., Wojcicki, A., Pe'er, I., & Mountain, J. (2010). Web-based, participant-driven studies yield novel genetic associations for common traits. *PLoS Genetics*, *6*(6), e1000993. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000993>

Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, *14*(8), 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>

Excoffier, L., Laval, G., & Balding, D. (2003). Gametic phase estimation over large genomic regions using an adaptive window approach. *Human genomics*, *1*(1), 1-13.

- Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564–567.
- Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164(4), 1567–1587. <https://doi.org/10.1093/genetics/164.4.1567>
- Fejerman, L., Carnese, F. R., Goicoechea, A. S., Avena, S. A., Dejean, C. B., & Ward, R. H. (2005). African ancestry of the population of Buenos Aires. *American journal of physical anthropology*, 128(1), 164–170. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20083>
- Fitzpatrick B. M. (2009). Power and sample size for nested analysis of molecular variance. *Molecular ecology*, 18(19), 3961–3966. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04314.x>
- Freire-Aradas, A., Ruiz, Y., Phillips, C., Maroñas, O., Söchtig, J., Tato, A. G., Dios, J. Á., de Cal, M. C., Silbiger, V. N., Luchessi, A. D., Luchessi, A. D., Chiurillo, M. A., Carracedo, Á., & Lareu, M. V. (2014). Exploring iris colour prediction and ancestry inference in admixed populations of South America. *Forensic science international. Genetics*, 13, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.06.007>
- Frost P. (2006). European hair and eye color: a case of frequency-dependent sexual selection? *Evol Hum Behav.*, 27:85
- Frudakis, T. N., Thomas, M., Gaskin, Z., Venkateswarlu, K., Chandra, K. S., Ginjupalli, S., Gunturi, S., Natrajan, S., Ponnuswamy, V. K., & Ponnuswamy, K. N. (2003). Sequences associated with human iris pigmentation. *Genetics*, 165, 2071–2083. <https://doi.org/10.1093/genetics/165.4.2071>
- Frudakis, T., Terravainen, T., & Thomas, M. (2007). Multilocus *OCA2* genotypes specify human iris colors. *Human genetics*, 122(3-4), 311–326. <https://doi.org/10.1007/s00439-007-0401-8>
- Gamboa Lerena, M. M., Di Santo Meztler, G. P., del Palacio, S., & López Armengol, F. G. (2020). GA-TA: Genetics application - Table adapter. <http://gata.fcaglp.unlp.edu.ar/>
- García, A., Demarchi, D. A., Tovo-Rodrigues, L., Pauro, M., Callegari Jacques, S. M., Salzano, F. M., & Hutz, M. H. (2015). High interpopulation homogeneity in central Argentina as assessed by ancestry informative markers (AIMs). *Genetics and Molecular Biology*, 38,324–331. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738320140260>
- Gemmell N., Akiyama S. (1996). An efficient method for the extraction of DNA from vertebrate tissues. *Trends in Genetics* 12(9): 338.
- Geneser, Finn. (2000). Histología sobre bases biomoleculares, tercera edición. Editorial médica Panamericana.
- Gómez-Restrepo, C., & Benavides, M. O. (2006). Metodología y lectura crítica de estudios Factores de confusión. *Revista Colombiana de Psiquiatría*, 35(2), 242-248.
- Gonzales, V., & Ianiro, J. L. (2012). Frecuencias de antígenos de HLA en la población de Mar del Plata y la zona concurrentes al Hospital Privado de Comunidad. *Rev HPC*,15 (1).

- Granja, R., & Machado, H. (2020). Forensic DNA phenotyping and its politics of legitimation and contestation: Views of forensic geneticists in Europe. *Social Studies of Science*, 0306312720945033.
- Grigore, M., & Avram, A. (2015). Iris colour classification scales—Then and now. *Romanian Journal of Ophthalmology*, 59(1), 29–33.
- Hart, K. L., Kimura, S. L., Mushailov, V., Budimlija, Z. M., Prinz, M., & Wurmbach, E. (2013). Improved eye- and skin-color prediction based on 8 SNPs. *Croatian medical journal*, 54(3), 248–256. <https://doi.org/10.3325/cmj.2013.54.248>
- Heaton-Armstrong A. (1995). Recording and disclosing statements by witnesses—law and practice. *Medicine, science, and the law*, 35(2), 136–143. <https://doi.org/10.1177/002580249503500207>
- Hohl, D. M., Bezus, B., Ratowiecki, J., & Catanesi, C. I. (2018). Genetic and phenotypic variability of iris color in Buenos Aires population. *Genetics and Molecular Biology*, 41, 50–58. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2017-0175>
- Hohl, D. M., González, R., Di Santo Meztler, G. P., Patiño-Rico, J., Dejean, C., Avena, S., Gutiérrez, M. L. Á., & Catanesi, C. I. (2022). Applicability of the IrisPlex system for eye color prediction in an admixed population from Argentina. *Annals of human genetics*, 86(6), 297–327. <https://doi.org/10.1111/ahg.12480>
- Holmes, S., & Loomis, H. (1909). The Heredity of Eye Color and Hair Color in Man. *Biological Bulletin*, 18(1), 50-65. doi:10.2307/1535989
- Hopman, R. (2021). The face as folded object: Race and the problems with 'progress' in forensic DNA phenotyping. *Social studies of science*, 3063127211035562. <https://doi.org/10.1177/03063127211035562>
- Hunter, R.S. (1942). Photoelectric tristimulus colorimetry with three filters. NBS Circ. C 249, U.S. Dept. Commerce, Washington, D.C.
- INDEC - Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. (2010). <https://www.indec.gov.ar/indec/web/Nivel4-Tema-2-18-77>
- Imesch, P. D., Wallow, I. H., & Albert, D. M. (1997). The color of the human eye: a review of morphologic correlates and of some conditions that affect iridial pigmentation. *Survey of ophthalmology*, 41 Suppl 2, S117–S123. [https://doi.org/10.1016/s0039-6257\(97\)80018-5](https://doi.org/10.1016/s0039-6257(97)80018-5)
- Iniesta, R., Guinó, E., & Moreno, V. (2005). Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gaceta Sanitaria*, 19, 333-341.
- Ito, S., & IFPCS (2003). The IFPCS presidential lecture: a chemist's view of melanogenesis. *Pigment cell research*, 16(3), 230–236. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2003.00037.x>
- Ito, S., & Wakamatsu, K. (2006). Chemistry of melanins. *The pigmentary system: physiology and pathophysiology*, 282-310.

Jaworek, T. J., Kausar, T., Bell, S. M., Tariq, N., Maqsood, M. I., Sohail, A., Ali, M., Iqbal, F., Rasool, S., Riazuddin, S., Shaikh, R. S., & Ahmed, Z. M. (2012). Molecular genetic studies and delineation of the oculocutaneous albinism phenotype in the Pakistani population. *Orphanet journal of rare diseases*, 7, 44. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-44>

Jobling, M. A., Hurles, M., Tyler-Smith, C. (2004). *Human Evolutionary Genetics. Origin, Peoples & Disease*. Garland Publishing.

Kastelic, V., Pošpiech, E., Draus-Barini, J., Branicki, W., & Drobnič, K. (2013). Prediction of eye color in the Slovenian population using the IrisPlex SNPs. *Croatian medical journal*, 54(4), 381–386. <https://doi.org/10.3325/cmj.2013.54.381>

Kastelic, V., & Drobnic, K. (2012). A single-nucleotide polymorphism (SNP) multiplex system: the association of five SNPs with human eye and hair color in the Slovenian population and comparison using a Bayesian network and logistic regression model. *Croatian medical journal*, 53(5), 401–408. <https://doi.org/10.3325/cmj.2012.53.401>

Kayser, M., Liu, F., Janssens, A. C. J. W., Rivadeneira, F., Lao, O., van Duijn, K., Vermeulen, M., Arp, P., Jhamai, M. M., van Ijcken, W. F. J., den Dunnen, J. T., Heath, S., Zelenika, D., Despriet, D. D. G., Klaver, C. C. W., Vingerling, J. R., de Jong, P. T. V. M., Hofman, A., Aulchenko, Y. S., ... van Duijn, C. M. (2008). Three genomewide association studies and a linkage analysis identify *HERC2* as a human iris color gene. *The American Journal of Human Genetics*, 82, 411–423. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.10.003>

Kayser, M., & Schneider, P. M. (2009). DNA-based prediction of human externally visible characteristics in forensics: motivations, scientific challenges, and ethical considerations. *Forensic Science International: Genetics*, 3, 154–161.

Kayser, M., & de Knijff, P. (2011). Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nature reviews. Genetics*, 12(3), 179–192. <https://doi.org/10.1038/nrg2952>

Kayser M. (2015). Forensic DNA Phenotyping: Predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes. *Forensic science international. Genetics*, 18, 33–48. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.02.003>

Keating, B., Bansal, A. T., Walsh, S., Millman, J., Newman, J., Kidd, K., Budowle, B., Eisenberg, A., Donfack, J., Gasparini, P., Budimlija, Z., Henders, A. K., Chandrupatla, H., Duffy, D. L., Gordon, S. D., Hysi, P., Liu, F., Medland, S. E., Rubin, L., Martin, N. G., ... International Visible Trait Genetics (VisiGen) Consortium (2013). First all-in-one diagnostic tool for DNA intelligence: genome-wide inference of biogeographic ancestry, appearance, relatedness, and sex with the Identitas v1 Forensic Chip. *International journal of legal medicine*, 127(3), 559–572. <https://doi.org/10.1007/s00414-012-0788-1>

Koops, B. J., & Schellekens, M. (2008). Forensic DNA phenotyping: Regulatory issues. *The Columbia Science and Technology Law Review*, 9, 158–160.

Larsson, M., & Pedersen, N. L. (2004). Genetic correlations among texture characteristics in the human iris. *Molecular vision*, 10, 821–831.

- Larsson, M., Duffy, D. L., Zhu, G., Liu, J. Z., Macgregor, S., McRae, A. F., Wright, M. J., Sturm, R. A., Mackey, D. A., Montgomery, G. W., Martin, N. G., & Medland, S. E. (2011). GWAS findings for human iris patterns: associations with variants in genes that influence normal neuronal pattern development. *The American Journal of Human Genetics*, *89*, 334–343. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.07.011>
- Lim, J. E., & Oh, B. (2013). Allelic frequencies of 20 visible phenotype variants in the Korean population. *Genomics & informatics*, *11*(2), 93–96. <https://doi.org/10.5808/GI.2013.11.2.93>
- Lippert, C., Sabatini, R., Maher, M. C., Kang, E. Y., Lee, S., Arikan, O., Harley, A., Bernal, A., Garst, P., Lavrenko, V., Yocum, K., Wong, T., Zhu, M., Yang, W. Y., Chang, C., Lu, T., Lee, C. W. H., Hicks, B., Ramakrishnan, S., Tang, H., ... Venter, J. C. (2017). Identification of individuals by trait prediction using whole-genome sequencing data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(38), 10166–10171. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711125114>
- Liu, F., van Duijn, K., Vingerling, J. R., Hofman, A., Uitterlinden, A. G., Janssens, A. C. J. W., & Kayser, M. (2009). Eye color and the prediction of complex phenotypes from genotypes. *Current Biology*, *19*(5), R192–R193. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.01.027>
- Liu, F., Wollstein, A., Hysi, P. G., Ankra-Badu, G. A., Spector, T. D., Park, D., Zhu, G., Larsson, M., Duffy, D. L., Montgomery, G. W., Mackey, D. A., Walsh, S., Lao, O., Hofman, A., Rivadeneira, F., Vingerling, J. R., Uitterlinden, A. G., Martin, N. G., Hammond, C. J., & Kayser, M. (2010). Digital quantification of human eye color highlights genetic association of three new loci. *PLoS Genetics*, *6*(5), e1000934. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000934>
- Liu, J., Huang, S., Sun, M., Liu, S., Liu, Y., Wang, W., ... & Hua, W. (2012). An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application. *Plant Methods*, *8*(1), 1–9.
- Liu, F., Walsh, S., & Kayser, M. (2014). Of sex and IrisPlex eye colour prediction: a reply to Martínez-Cadenas *et al.* *Forensic Science International: Genetics*, *9*, e5–e6.
- Mackey DA, Wilkinson CH, Kearns LS, Hewitt AW. (2011). Classification of iris colour: review and refinement of a classification schema. *Clin Experiment Ophthalmol.* *39*(5):462–71.
- Marano, L. A., Andersen, J. D., Goncalves, F. T., García, A. L. O., & Fridman, C. (2019). Evaluation of HIrisPlex-S system markers for eye, skin and hair color prediction in an admixed Brazilian population. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, *7*, 427–428. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2019.10.038>
- Martínez-Cadenas, C., Peña-Chilet, M., Ibarrola-Villava, M., & Ribas, G. (2013). Gender is a major factor explaining discrepancies in eye colour prediction based on *HERC2/OCA2* genotype and the IrisPlex model. *Forensic Science International: Genetics*, *7*, 453–460. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.03.007>
- Martínez-Marignac, V. L., Bravi, C. M., Lahitte, H. B., & Bianchi, N. O. (1999). Estudio del ADN mitocondrial de una muestra de la ciudad de La Plata. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, *2*.

- Martínez-Marignac, V. L., Bertoni, B., Parra, E. J., & Bianchi, N. O. (2004). Characterization of admixture in an urban sample from Buenos Aires, Argentina, using uniparentally and biparentally inherited genetic markers. *Human Biology*, 76, 543–557. <https://doi.org/10.1353/hub.2004.0058>
- Matheson S. (2016). DNA Phenotyping: Snapshot of a Criminal. *Cell*, 166(5), 1061–1064. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.016>
- McLaren, K., & Rigg, B. (2008). XII-The SDC recommended colour difference formula: Change to CIELAB. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, 92, 337–338. <https://doi.org/10.1111/j.1478-4408.1976.tb03300.x>
- Melgosa M, Rivas MJ, Gómez L, Hita E. (2000). Towards a colorimetric characterization of the human iris. *Ophthalmic Physiol Opt.*, 20(3):252–60
- Mengel-From, J., Wong, T. H., Morling, N., Rees, J. L., & Jackson, I. J. (2009). Genetic determinants of hair and eye colours in the Scottish and Danish populations. *BioMed Central Genetics*, 10(1), 88. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-10-88>
- Mengel-From, J., Børsting, C., Sanchez, J. J., Eiberg, H., & Morling, N. (2010). Human eye colour and *HERC2*, *OCA2* and *MATP*. *Forensic science international. Genetics*, 4(5), 323–328. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.12.004>
- Meyer, O. S., Børsting, C., & Andersen, J. D. (2019). Perception of blue and brown eye colours for forensic DNA phenotyping. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 7, 476–477. <https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2019.10.057>
- Meyer, O. S., Salvo, N. M., Kjærbye, A., Kjersem, M., Andersen, M. M., Sørensen, E., Ullum, H., Janssen, K., Morling, N., Børsting, C., Olsen, G. H., & Andersen, J. D. (2021). Prediction of Eye Colour in Scandinavians Using the EyeColour 11 (EC11) SNP Set. *Genes*, 12(6), 821. <https://doi.org/10.3390/genes12060821>
- Meyer, W. K., Zhang, S., Hayakawa, S., Imai, H., & Przeworski, M. (2013). The convergent evolution of blue iris pigmentation in primates took distinct molecular paths. *American journal of physical anthropology*, 151(3), 398–407. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22280>
- Muzzio, M., Motti, J. M. B., Paz Sepúlveda, P. B., Yee, M., Cooke, T., Santos, M. R., Ramallo, V., Alfaro, E. L., Dipierri, J. E., Bailliet, G., Bravi, C. M., Bustamante, C. D., & Kenny, E. E. (2018). Population structure in Argentina. *PLoS One*, 13(5), e0196325. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196325>
- Nan, H., Kraft, P., Hunter, D. J., & Han, J. (2009). Genetic variants in pigmentation genes, pigmentary phenotypes, and risk of skin cancer in Caucasians. *International journal of cancer*, 125(4), 909–917. <https://doi.org/10.1002/ijc.24327>
- Need, A. C., & Goldstein, D. B. (2009). Next generation disparities in human genomics: concerns and remedies. *Trends in genetics : TIG*, 25(11), 489–494. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2009.09.012>
- Norton, H. L., Edwards, M., Krithika, S., Johnson, M., Werren, E. A., & Parra, E. J. (2015). Quantitative assessment of skin, hair, and iris variation in a diverse sample of individuals and associated genetic

variation. *American Journal of Physical Anthropology*, 160, 570–581. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22861>

Ochiai, K., Maienschein-Cline, M., Simonetti, G., Chen, J., Rosenthal, R., Brink, R., Chong, A. S., Klein, U., Dinner, A. R., Singh, H., & Sciammas, R. (2013). Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of *IRF4*. *Immunity*, 38(5), 918–929. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.009>

Ongaro, L., Molinaro, L., Flores, R., Marnetto, D., Capodiferro, M. R., Alarcón-Riquelme, M. E., Moreno-Estrada, A., Mabunda, N., Ventura, M., Tambets, K., Achilli, A., Capelli, C., Metspalu, M., Pagani, L., & Montinaro, F. (2021). Evaluating the impact of sex-biased genetic admixture in the Americas through the analysis of haplotype data. *Genes*, 12, 1580. <https://doi.org/10.3390/genes12101580>

Osier, M. V., Cheung, K. H., Kidd, J. R., Pakstis, A. J., Miller, P. L., & Kidd, K. K. (2001). ALFRED: An allele frequency database for diverse population and DNA polymorphisms - an update. *Nucleic Acids Research*, 29, 317–319.

Oyster CW. (1999). *The human eye: structure and function*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.

Palmal, S., Adhikari, K., Mendoza-Revilla, J., Fuentes-Guajardo, M., Silva de Cerqueira, C. C., Chacón-Duque, J. C., Sohail, A., Hurtado, M., Villegas, V., Granja, V., Jaramillo, C., Arias, W., Barquera Lozano, R., Everardo-Martínez, P., Gómez-Valdés, J., Villamil-Ramírez, H., Hünemeier, T., Ramallo, V., Gonzalez-José, R., ... Ruiz-Linares, A. (2021). Prediction of eye, hair and skin color in admixed populations of Latin America. *Forensic Science International: Genetics*, 53, 102517. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102517>

Parolin, M. L., Avena, S. A., Fleischer, S., Pretell, M., Rocca, F. D. F., Rodríguez, D. A., ... & Carnese, F. R. (2013). Análisis de la diversidad biológica y mestizaje en la ciudad de Puerto Madryn (Prov. de Chubut, Argentina). *Revista argentina de antropología biológica*, 15(1), 61-75.

Parra E. J. (2007). Human pigmentation variation: evolution, genetic basis, and implications for public health. *American journal of physical anthropology*, Suppl 45, 85–105. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20727>

Parry, D. A., Poulter, J. A., Logan, C. V., Brookes, S. J., Jafri, H., Ferguson, C. H., Anwari, B. M., Rashid, Y., Zhao, H., Johnson, C. A., Inglehearn, C. F., & Mighell, A. J. (2013). Identification of mutations in *SLC24A4*, encoding a potassium-dependent sodium/calcium exchanger, as a cause of amelogenesis imperfecta. *American journal of human genetics*, 92(2), 307–312. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.01.003>

Patiño-Rico, J. J. (2021). Determinación de marcadores informativos de ancestría mediante multiplex PCR APLP en una muestra de la ciudad de Buenos Aires. (Tesis de Maestría, Universidad de Buenos Aires).

Peles, D. N., Hong, L., Hu, D. N., Ito, S., Nemanich, R. J., & Simon, J. D. (2009). Human iridal stroma melanosomes of varying pheomelanin contents possess a common eumelanin outer surface. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(32), 11346-11351.

Pétrequin J. (1843). Sur les diverses couleurs de l'iris et leurs proportions dans nos climats. *Ann d'oculistique.*, 10:120–125.

Phillips, C., Salas, A., Sánchez, J. J., Fondevila, M., Gómez-Tato, A., Alvarez-Dios, J., Calaza, M., de Cal, M. C., Ballard, D., Lareu, M. V., Carracedo, A., & SNPforID Consortium (2007). Inferring ancestral origin using a single multiplex assay of ancestry-informative marker SNPs. *Forensic science international. Genetics*, 1(3-4), 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.06.008>

Pietroni, C., Andersen, J. D., Johansen, P., Andersen, M. M., Harder, S., Paulsen, R. R., Børsting, C., & Morling, N. (2014). The effect of gender on eye colour variation in European populations and an evaluation of the IrisPlex prediction model. *Forensic Science International: Genetics*, 11, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.02.002>

Pośpiech, E., Karłowska-Pik, J., Ziemkiewicz, B., Kukla, M., Skowron, M., Wojas-Pelc, A., & Branicki, W. (2016). Further evidence for population specific differences in the effect of DNA markers and gender on eye colour prediction in forensics. *International journal of legal medicine*, 130(4), 923–934. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1388-2>

Posthuma, D., Visscher, P. M., Willemsen, G., Zhu, G., Martin, N. G., Slagboom, P. E., de Geus, E. J., & Boomsma, D. I. (2006). Replicated linkage for eye color on 15q using comparative ratings of sibling pairs. *Behavior genetics*, 36(1), 12–17. <https://doi.org/10.1007/s10519-005-9007-x>

Praetorius, C., Grill, C., Stacey, S. N., Metcalf, A. M., Gorkin, D. U., Robinson, K. C., Van Otterloo, E., Kim, R. S., Bergsteinsdottir, K., Ogmundsdottir, M. H., Magnusdottir, E., Mishra, P. J., Davis, S. R., Guo, T., Zaidi, M. R., Helgason, A. S., Sigurdsson, M. I., Meltzer, P. S., Merlino, G., Petit, V., ... Steingrímsson, E. (2013). A polymorphism in *IRF4* affects human pigmentation through a tyrosinase-dependent MITF/TFAP2A pathway. *Cell*, 155(5), 1022–1033. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.022>

Prestes, P. R., Mitchell, R. J., Daniel, R., Ballantyne, K. N., & Van Oorschot, R. A. H. (2011). Evaluation of the IrisPlex system in admixed individuals. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 3(1), e283-e284.

Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959.

Pritchard, J. K., & Donnelly, P. (2001). Case-control studies of association in structured or admixed populations. *Theoretical population biology*, 60(3), 227–237. <https://doi.org/10.1006/tpbi.2001.1543>

Prota, G., Hu, D. N., Vincensi, M. R., McCormick, S. A., & Napolitano, A. (1998). Characterization of melanins in human irides and cultured uveal melanocytes from eyes of different colors. *Experimental eye research*, 67(3), 293-299.

Provencio I. (2011). The hidden organ in your eyes. *Scientific American*, 304(5), 54–59. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0511-54>

Purtscher, E. (1965). On the development and morphology of iris crypts. *Acta Ophthalmologica*, 43: 109-119. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.1965.tb06376.x>

R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

Raposo, G., Tenza, D., Murphy, D. M., Berson, J. F., & Marks, M. S. (2001). Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *The Journal of cell biology*, 152(4), 809–824. <https://doi.org/10.1083/jcb.152.4.809>

Raposo, G., & Marks, M. S. (2007). Melanosomes—dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(10), 786-797.

Rebbeck, T. R., Kanetsky, P. A., Walker, A. H., Holmes, R., Halpern, A. C., Schuchter, L. M., Elder, D. E., & Guerry, D. (2002). P gene as an inherited biomarker of human eye color. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 11(8), 782–784.

Redei, G. Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics, and Informatics. (2008). 3rd edn (Springer, New York City, NY).

Rennie I. G. (2012). Don't it make my blue eyes brown: heterochromia and other abnormalities of the iris. *Eye (London, England)*, 26(1), 29–50. <https://doi.org/10.1038/eye.2011.228>

Remington, L.A. Capítulo 3 - Uvea, Editor(s): Lee Ann Remington, Clinical Anatomy and Physiology of the Visual System (Third Edition), Butterworth-Heinemann, 2012, Pages 40-60, ISBN 9781437719260, <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-1926-0.10003-7>.

Resano, M., Esteban, E., González-Pérez, E., Vía, M., Athanasiadis, G., Avena, S., Goicoechea, A., Bartomioli, M., Fernández, V., Cabrera, A., Dejean, C., Carnese, F., & Moral, P. (2007). How many populations set foot through the Patagonian door? Genetic composition of the current population of Bahía Blanca (Argentina) based on data from 19 Alu polymorphisms. *American journal of human biology*: 19(6), 827–835. <https://doi.org/10.1002/ajhb.20648>

Resano, M., Moral, P., 2018. Mestizaje genético en las poblaciones humanas actuales de Argentina. Revisión. *Antropo*, 39, 77-96. www.didac.ehu.es/antropo

Riddell W. Studies in the classification of eye colour. (1942). *Annals of Eugenics*. 2:245–59

Robin, X., Turck, N., Hainard, A. *et al.* pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics* 12, 77 (2011). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-77>

Ruiz, Y., Phillips, C., Gomez-Tato, A., Alvarez-Dios, J., Casares de Cal, M., Cruz, R., Maroñas, O., Söchtig, J., Fondevila, M., Rodriguez-Cid, M. J., Carracedo, A., & Lareu, M. V. (2013). Further development of forensic eye color predictive tests. *Forensic science international. Genetics*, 7(1), 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.05.009>

Ruiz-Linares, A., Adhikari, K., Acuña-Alonzo, V., Quinto-Sanchez, M., Jaramillo, C., Arias, W., Fuentes, M., Pizarro, M., Everardo, P., de Avila, F., Gómez-Valdés, J., León-Mimila, P., Hunemeier,

- T., Ramallo, V., Silva de Cerqueira, C. C., Burley, M. W., Konca, E., de Oliveira, M. Z., Veronez, M. R., Rubio-Codina, M., ... Gonzalez-José, R. (2014). Admixture in Latin America: geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals. *PLoS genetics*, *10*(9), e1004572. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004572>
- Russo, M. G., Di Fabio Rocca, F., Doldán, P., Cardozo, D. G., Dejean, C. B., Seldes, V., & Avena, S. A. (2016). Evaluación del número mínimo de marcadores para estimar ancestría individual en una muestra de la población argentina.
- Salas, A., Jaime, J. C., Álvarez-Iglesias, V., & Carracedo, Á. (2008). Gender bias in the multiethnic genetic composition of central Argentina. *Journal of human genetics*, *53*(7), 662–674. <https://doi.org/10.1007/s10038-008-0297-8>
- Salvo, N. M., Mathisen, M. G., Janssen, K., Berg, T., & Olsen, G. H. (2022). Experimental long-distance haplotyping of *OCA2-HERC2* variants. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, *8*, 188-190.
- Salvoro, C., Faccinetto, C., Zucchelli, L., Porto, M., Marino, A., Occhi, G., de Los Campos, G., & Vazza, G. (2019). Performance of four models for eye color prediction in an Italian population sample. *Forensic science international. Genetics*, *40*, 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.03.008>
- Salzano, F. M., & Sans, M. (2014). Interethnic admixture and the evolution of Latin American populations. *Genetics and molecular biology*, *37*(1 Suppl), 151–170. <https://doi.org/10.1590/s1415-47572014000200003>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- Samuel, G., & Prainsack, B. (2019). Forensic DNA phenotyping in Europe: Views “on the ground” from those who have a professional stake in the technology. *New Genetics and Society*, *38*(2), 119-141.
- Sánchez Albornoz, N., 1973, *La población de América Latina desde los tiempos precolombinos al año 2000*. (Madrid, Alianza Editorial, 1973).
- Sans M. (2000). Admixture studies in Latin America: from the 20th to the 21st century. *Human biology*, *72*(1), 155–177.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, *9*(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Seddon, J. M., Sahagian, C. R., Glynn, R. J., Sperduto, R. D., & Gragoudas, E. S. (1990). Evaluation of an iris color classification system. The Eye Disorders Case-Control Study Group. *Investigative ophthalmology & visual science*, *31*(8), 1592–1598.
- Seldin, M. F., Tian, C., Shigeta, R., Scherbarth, H. R., Silva, G., Belmont, J. W., Kittles, R., Gamron, S., Allevi, A., Palatnik, S. A., Alvarellos, A., Paira, S., Caprarulo, C., Guillerón, C., Catoggio, L. J., Prigione, C., Berbotto, G. A., García, M. A., Perandones, C. E., Pons-Estel, B. A., ... Alarcon-Riquelme, M. E. (2007). Argentine population genetic structure: large variance in Amerindian contribution. *American journal of physical anthropology*, *132*(3), 455–462. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20534>

Shriver, M. D., Parra, E. J., Dios, S., Bonilla, C., Norton, H., Jovel, C., Pfaff, C., Jones, C., Massac, A., Cameron, N., Baron, A., Jackson, T., Argyropoulos, G., Jin, L., Hoggart, C. J., McKeigue, P. M., & Kittles, R. A. (2003). Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. *Human genetics*, 112(4), 387–399. <https://doi.org/10.1007/s00439-002-0896-y>

Simionescu O, Grigore M, Furtunescu F, Minca D, Chitu V, Costache M. (2014). A Novel Iris Colour Classification Scale. *Ann Res Rev Biol.*,4(15):2525–34

Silva de Cerqueira, C. C., Hünemeier, T., Gomez-Valdés, J., Ramallo, V., Volasko-Krause, C. D., Barbosa, A. A. L., Vargas-Pinilla, P., Ciconet Dornelles, R., Longo, D., Rothhammer, F., Bedoya, G., Canizales-Quinteros, S., Acuña-Alonzo, V., Gallo, C., Poletti, G., González-José, R., Salzano, F. M., Callegari-Jacques, S. M., Schuler-Faccini, L., ... Bortolini, M. C. (2014). Implications of the admixture process in skin color molecular assessment. *PLoS One*, 9(5), e96886. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096886>

Silva de Cerqueira, C. C., Ramallo, V., Hünemeier, T., de Azevedo, S., Quinto Sanchez, M. E., Paschetta, C. A., ... & González José, R. (2016). Predicting physical features and diseases by DNA analysis: current advances and future challenges. *J Forensic Res*, 7: 336. doi:10.4172/2157-7145.1000336

Solé, X., Guinó, E., Valls, J., Iniesta, R., & Moreno, V. (2006). SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*, 22, 1928–1929. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti283>

Spichenok, O., Budimlija, Z. M., Mitchell, A. A., Jenny, A., Kovacevic, L., Marjanovic, D., Caragine, T., Prinz, M., & Wurmbach, E. (2011). Prediction of eye and skin color in diverse populations using seven SNPs. *Forensic Science International: Genetics*, 5, 472–478. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.10.005>

StataCorp. 2015. *Stata Statistical Software: Release 14*. College Station, TX: StataCorp LP.

Strachan T. & Read A.P. (1996). Human Molecular Genetics 2. In 2, Kingston, F., ed. Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd, pp. 129-133.

Sturm, R. A., & Frudakis, T. N. (2004). Eye colour: portals into pigmentation genes and ancestry. *TRENDS in Genetics*, 20(8), 327-332. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.06.010>

Sturm, R. A., Duffy, D. L., Zhao, Z. Z., Leite, F. P. N., Stark, M. S., Hayward, N. K., Martin, N. G., & Montgomery, G. W. (2008). A single SNP in an evolutionary conserved region within intron 86 of the *HERC2* gene determines human blue-brown eye color. *The American Journal of Human Genetics*, 82, 424–431. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.11.005>

Sturm, R. A., & Larsson, M. (2009). Genetics of human iris colour and patterns. *Pigment cell & melanoma research*, 22(5), 544–562. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2009.00606.x>

Sturm, R.A., Duffy, D.L. (2012). Human pigmentation genes under environmental selection. *Genome Biol* 13, 248 . <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-9-248>

Sun H.P., Lin Y., Pan C. W. (2014). Iris color and associated pathological ocular complications: a review of epidemiologic studies. *Int J Ophthalmol*, 7(5):872-878. <https://doi.org/10.3980/j.issn.2222-3959.2014.05.25>

Sulem, P., Gudbjartsson, D. F., Stacey, S. N., Helgason, A., Rafnar, T., Magnusson, K. P., Manolescu, A., Karason, A., Palsson, A., Thorleifsson, G., Jakobsdottir, M., Steinberg, S., Palsson, S., Jonasson, F., Sigurgeirsson, B., Thorisdottir, K., Ragnarsson, R., Benediktsdottir, K. R., Aben, K. K., ... Stefansson, K. (2007). Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nature Genetics*, 39, 1443–1452. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.13>

Takamoto, T., Schwartz, B., Cantor, L. B., Hoop, J. S., & Steffens, T. (2001). Measurement of iris color using computerized image analysis. *Current eye research*, 22(6), 412–419. <https://doi.org/10.1076/ceyr.22.6.412.5490>

The 1000 Genomes Project Consortium. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature*, 526, 68–74.

Toscanini, U., Gusmão, L., Berardi, G., Gómez, A., Pereira, R., & Raimondi, E. (2011). Ancestry proportions in urban populations of Argentina. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 3(1), e387–e388. <https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2011.09.055>

Valenzuela, R. K., Henderson, M. S., Walsh, M. H., Garrison, N. A., Kelch, J. T., Cohen-Barak, O., Erickson, D. T., John Meaney, F., Bruce Walsh, J., Cheng, K. C., Ito, S., Wakamatsu, K., Frudakis, T., Thomas, M., & Brilliant, M. H. (2010). Predicting phenotype from genotype: normal pigmentation. *Journal of forensic sciences*, 55(2), 315–322. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2009.01317.x>

Visser, M., Kayser, M., & Palstra, R. J. (2012). *HERC2* rs12913832 modulates human pigmentation by attenuating chromatin-loop formation between a long-range enhancer and the *OCA2* promoter. *Genome Research*, 22, 446–455. <https://doi.org/10.1101/gr.128652.111>

Wakamatsu, K., Hu, D. N., McCormick, S. A., & Ito, S. (2008). Characterization of melanin in human iridal and choroidal melanocytes from eyes with various colored irides. *Pigment cell & melanoma research*, 21(1), 97–105. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2007.00415.x>

Wakamatsu, K., Ohtara, K., & Ito, S. (2009). Chemical analysis of late stages of pheomelanogenesis: conversion of dihydrobenzothiazine to a benzothiazole structure. *Pigment cell & melanoma research*, 22(4), 474–486. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2009.00580.x>

Walsh, S., Liu, F., Ballantyne, K. N., van Oven, M., Lao, O., & Kayser, M. (2011a). IrisPlex: A sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information. *Forensic Science International: Genetics*, 5, 170–180. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.02.004>

Walsh, S., Lindenbergh, A., Zuniga, S. B., Sijen, T., de Knijff, P., Kayser, M., & Ballantyne, K. N. (2011b). Developmental validation of the IrisPlex system: determination of blue and brown iris colour for forensic intelligence. *Forensic Science International: Genetics*, 5, 464–471. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.09.008>

Walsh, S., Wollstein, A., Liu, F., Chakravarthy, U., Rahu, M., Seland, J. H., Soubrane, G., Tomazzoli, L., Topouzis, F., Vingerling, J. R., Vioque, J., Fletcher, A. E., Ballantyne, K. N., & Kayser, M. (2012). DNA-based eye colour prediction across Europe with the IrisPlex system. *Forensic Science International: Genetics*, 6, 330–340. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.07.009>

- Walsh, S., Liu, F., Wollstein, A., Kovatsi, L., Ralf, A., KosiniakKamysz, A., Branicki, W., & Kayser, M. (2013). The HIrisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye color from DNA. *Forensic Science International: Genetics*, 7, 98–115. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.07.005>
- Walsh, S., Chaitanya, L., Clarisse, L., Wirken, L., Draus-Barini, J., Kovatsi, L., Maeda, H., Ishikawa, T., Sijen, T., de Knijff, P., Branicki, W., Liu, F., & Kayser, M. (2014). Developmental validation of the HIrisPlex system: DNA-based eye and hair colour prediction for forensic and anthropological usage. *Forensic Science International: Genetics*, 9, 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.12.006>
- Walsh, S., Chaitanya, L., Breslin, K., Muralidharan, C., Bronikowska, A., Pospiech, E., Koller, J., Kovatsi, L., Wollstein, A., Branicki, W., Liu, F., & Kayser, M. (2017). Global skin colour prediction from DNA. *Human Genetics*, 136, 847–863. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1808-5>
- Wang J. (2017). The computer program structure for assigning individuals to populations: easy to use but easier to misuse. *Molecular ecology resources*, 17(5), 981–990. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12650>
- Watt, B., van Niel, G., Raposo, G., & Marks, M. S. (2013). PMEL: a pigment cell-specific model for functional amyloid formation. *Pigment cell & melanoma research*, 26(3), 300–315. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12067>
- White, D., & Rabago-Smith, M. (2011). Genotype-phenotype associations and human eye color. *Journal of human genetics*, 56(1), 5–7. <https://doi.org/10.1038/jhg.2010.126>
- Wielgus, A. R., & Sarna, T. (2005). Melanin in human irides of different color and age of donors. *Pigment Cell Research*, 18, 454–464. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2005.00268.x>
- Wilde, S., Timpson, A., Kirsanow, K., Kaiser, E., Kayser, M., Unterländer, M., Hollfelder, N., Potekhina, I. D., Schier, W., Thomas, M. G., & Burger, J. (2014). Direct evidence for positive selection of skin, hair, and eye pigmentation in Europeans during the last 5,000 y. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(13), 4832–4837. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316513111>
- Wiriyasermkul, P., Moriyama, S., & Nagamori, S. (2020). Membrane transport proteins in melanosomes: Regulation of ions for pigmentation. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*, 1862(12), 183318. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2020.183318>
- Wollstein, A., Walsh, S., Liu, F., Chakravarthy, U., Rahu, M., Seland, J. H., Soubrane, G., Tomazzoli, L., Topouzis, F., Vingerling, J. R., Vioque, J., Böhringer, S., Fletcher, A. E., & Kayser, M. (2017). Novel quantitative pigmentation phenotyping enhances genetic association, epistasis, and prediction of human eye color. *Scientific Reports*, 7, 43359. <https://doi.org/10.1038/srep43359>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. (2012). Primer-BLAST: A tool to design targetspecific primers for polymerase chain reaction. *BioMed Central Bioinformatics*, 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Yun, L., Gu, Y., Rajeevan, H., & Kidd, K. K. (2014). Application of six IrisPlex SNPs and comparison of two eye color prediction systems in diverse Eurasia populations. *International journal of legal medicine*, 128(3), 447–453. <https://doi.org/10.1007/s00414-013-0953-1>

Zhu, G., Evans, D. M., Duffy, D. L., Montgomery, G. W., Medland, S. E., Gillespie, N. A., Ewen, K. R., Jewell, M., Liew, Y. W., Hayward, N. K., Sturm, R. A., Trent, J. M., & Martin, N. G. (2004). A genome scan for eye color in 502 twin families: most variation is due to a QTL on chromosome 15q. *Twin research: the official journal of the International Society for Twin Studies*, 7(2), 197–210. <https://doi.org/10.1375/136905204323016186>

Anexo



ANEXO

Ética

A.1 Aval del comité de ética para el proyecto



INSTITUTO MULTIDISCIPLINARIO DE BIOLOGÍA CELULAR
CONICET
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Calle 526 y Camino General Belgrano
B1906APO La Plata, Buenos Aires Argentina
Tel. +54 221 421 0112
www.imbice.gov.ar

La Plata, Junio 12, 2017

Comité de Ética en Investigaciones Biomédicas

Dictamen

Proyecto: VARIACIÓN GENÉTICA DEL COLOR DEL IRIS EN LA POBLACIÓN BONAERENSE
Investigador Responsable: Dra Cecilia Inés Catanesi, Laboratorio Diversidad Genética, Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE), CCT-CONICET, La Plata.

Examinados la Cartilla de Información para los donantes y el formulario de Consentimiento Informado, referidos al Plan de Trabajo: " Variación genética del color del iris en la población bonaerense ", presentado por la becaria DIANA MARIA HOHL , este Comité aprueba las correcciones introducidas en ambos documentos, de acuerdo a las indicaciones realizadas por los miembros del Comité. Por este motivo y en razón de que la formulación del proyecto contempla las recomendaciones enunciadas en el Marco Etico de Referencia para las Investigaciones Biomédicas : Principios Eticos para las Investigaciones Biomédicas en seres humanos, el Comité de Etica en Investigaciones Biomédicas del IMBICE avala la ejecución del Proyecto sometido a su evaluación.



Dra. Lidia A. Vidal Rioja
Coordinadora

Comité de Ética en Investigaciones Biomédicas

IMBICE

RENIS CE000023

Prof. Dr. Eduardo L Tinant

Prof. Lic. Jorge P. Asuaje

Dr. Luis J. Couyet Leavy

A.2 Consentimiento informado

Carta de información para los participantes de “VARIACIÓN GENÉTICA DEL COLOR DEL IRIS EN LA POBLACIÓN BONAERENSE”

Lo invitamos a participar en una investigación que tiene por objetivo estudiar ciertas regiones de su ADN que son variables entre los individuos de una población.

En las poblaciones humanas los rasgos genéticos se van transmitiendo de una generación a otra. Algunos tienen un efecto visible, como en el color del cabello y los ojos, que se producen a partir de la información genética heredada de los padres. Para analizar esta información, se requieren técnicas de laboratorio.

En el Laboratorio de Genética Molecular del IMBICE (CICPBA/CONICET/UNLP) utilizamos técnicas de laboratorio molecular para estudiar la variación del color del iris de los ojos. Para ello, le solicitamos su consentimiento para donar dos muestras de saliva. Además, solicitaremos completar una encuesta para recabar datos sobre su ancestría.

Su participación no implica riesgos físicos ni morales para su persona, y su muestra será tratada de forma completamente anónima y confidencial. No existen beneficios para el donante, sino que el beneficio directo de este estudio es para la comunidad local, por el aporte al conocimiento de la variación genética de su población.

Su participación en esta investigación es absolutamente voluntaria, y Ud. puede abandonar el estudio en cualquier momento si así lo desea. Si Ud. acepta participar, tenga a bien completar y firmar el Consentimiento adjunto. La persona responsable de tomar la muestra le informará sobre el proyecto y le aclarará todas sus dudas respondiendo claramente sus preguntas.

Teléfono de contacto: 0221-4210112

Correo electrónico de contacto: ccatanesi@imbice.gov.ar

**FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO "VARIACIÓN GENÉTICA DEL
COLOR DEL IRIS EN LA POBLACIÓN BONAERENSE"**

Yo,..... (nombres y apellidos completos), de.....años (edad), en calidad de donante de muestra biológica, he leído la Carta de Información "Variación genética del color del iris en la población bonaerense" y he podido hacer preguntas sobre la investigación a (responsable de la toma de muestra). Declaro haber entendido la carta, y que mi participación es voluntaria, gratuita, anónima y confidencial. Comprendo que puedo retirarme de la investigación cuando quiera sin tener que dar explicaciones, y que puedo contar con los datos obtenidos si lo requiero. Por ello, presto libre conformidad para que se tome una muestra de saliva de mi persona, para estudiar rasgos genéticos con fines poblacionales.

Entiendo que mi participación está limitada a los estudios especificados en la Cartilla de Información previa, y no otros, caso del que deberé ser informado y podré consentir o no. Con tal salvedad (marque lo que corresponda)

SI	NO
----	----

autorizo que al término del estudio se almacene mi muestra de ADN.

Lugar y fecha:

Firma y aclaración del donante:

Firma y aclaración del responsable de la toma de muestra:

Firma y aclaración del investigador responsable del proyecto:

Firma y aclaración de un testigo:

Tablas

A.3 Análisis de desequilibrio de ligamiento para el gen *SLC45A2*. *significativo ($p < 0,05$).

	rs2278007	rs16891982	rs35398	rs1364038	rs185145	rs185146	rs250417
rs35397	0,0959	0*	0*	0,0031	0,0235*	0,0119*	0,0235*
rs2278007	.	2,00E-04*	0,5956	0,7864	0,0609	0,1429	0,0609
rs16891982	.	.	0*	0,0205*	0,0131*	0,0015*	0,0131*
rs35398	.	.	.	0,2162	0,0139*	0,0073*	0,0139*
rs1364038	0,9995	0,9999	0,9995
rs185145	0,0035*	0,0002*
rs185146	0,0035*

A.4 Análisis de desequilibrio de ligamiento para el gen *LOC*. *significativo ($p < 0,05$).

	rs142020658	rs8021744	rs12437047	rs12896399	rs12896471
rs12436973	0,89	2,00E-04*	0,0014*	0,1524	0,4955
rs142020658	.	1,00E-04*	5,00E-04*	0,2155	0,2469
rs8021744	.	.	0*	0,0142*	0,0219*
rs12437047	.	.	.	0,0038*	0,0067*

rs12896399	0*
------------	---	---	---	---	----

A.5 Estimación de frecuencias haplotípicas. Genes *OCA2* y *HERC2*. n= 302.

Haplotipo	rs1800410	rs1800407	rs4778232	rs1129038	rs12913832	rs7183877	Total	Frecuencia acumulada
1	A	G	C	T	G	C	0,2285	0,2285
2	A	G	T	C	A	C	0,1822	0,4107
3	A	G	C	C	A	C	0,1191	0,5298
4	G	G	C	C	A	C	0,0839	0,6137
5	A	G	T	T	G	C	0,0745	0,6881
6	A	G	C	C	A	A	0,0661	0,7542
7	G	G	C	T	G	C	0,0454	0,7997
8	G	G	T	C	A	C	0,0409	0,8406
9	A	A	C	C	A	A	0,0387	0,8793
10	G	G	T	C	A	A	0,0249	0,9042
11	A	A	C	C	A	C	0,0209	0,9251
12	A	G	T	C	A	A	0,0156	0,9406
13	A	G	C	C	G	C	0,0113	0,952

14	G	G	T	T	G	C	0,0085	0,9604
15	G	G	C	C	A	A	0,0082	0,9686
16	G	G	T	T	A	C	0,0043	0,973
17	A	G	T	T	G	A	0,0038	0,9767
18	A	G	T	T	A	C	0,0037	0,9804
19	A	A	T	C	A	C	0,0037	0,9841
20	A	A	C	T	G	C	0,0033	0,9875
21	G	A	T	C	A	C	0,0031	0,9906
22	G	G	T	C	G	C	0,0024	0,993
23	A	G	C	T	A	C	0,002	0,995
24	G	G	C	T	A	C	0,0018	0,9969
25	G	G	C	C	G	A	0,0017	0,9986
26	A	A	C	C	G	C	0,0014	1
27	G	A	T	C	A	A	0	1

A.6 Estimación de frecuencias haplotípicas. Gen *SLC45A2*

Haplotipo	rs35397	rs150284510	rs562727261	rs2278007	rs16891982	rs35398	rs1364038	rs185145	rs185146	rs250417	Total	Frecuencia acumulada

1	T	A	C	A	G	G	C	A	T	C	0,7	0,7
2	G	A	C	A	C	T	C	G	C	G	0,1006	0,8006
3	G	A	C	A	G	G	C	A	T	C	0,0251	0,8257
4	G	A	C	G	C	T	C	A	C	C	0,0089	0,8346
5	T	A	C	A	C	G	C	A	C	C	0,0058	0,8404
6	T	A	C	A	C	G	C	G	C	G	0,0057	0,8461
7	T	A	C	A	C	G	C	G	T	G	0,0057	0,8518
8	T	A	C	A	C	G	C	A	C	G	0,0057	0,8575
9	T	A	C	A	C	G	C	A	T	G	0,0056	0,8631
10	T	A	C	A	C	G	C	G	T	C	0,0056	0,8687
11	T	A	C	A	C	G	C	G	C	C	0,0055	0,8742
12	T	A	C	A	C	G	C	A	T	C	0,0055	0,8798
13	T	A	C	A	C	T	C	G	C	G	0,0047	0,8845
14	T	A	C	G	C	G	C	A	C	G	0,0045	0,889
15	T	A	C	G	C	G	C	G	C	C	0,0045	0,8935
16	T	A	C	G	C	G	C	G	T	C	0,0045	0,898
17	T	A	C	G	C	G	C	G	T	G	0,0044	0,9024
18	T	A	C	G	C	G	C	A	C	C	0,0044	0,9068

19	T	A	C	G	C	G	C	G	C	G	0,0044	0,9113
20	T	A	C	G	C	G	C	A	T	G	0,0044	0,9156
21	T	A	C	G	C	G	C	A	T	C	0,0043	0,9199
22	G	A	C	A	C	G	A	A	T	C	0,0038	0,9237
23	G	A	C	A	C	G	A	G	C	G	0,0037	0,9274
24	G	A	C	A	C	G	C	A	T	C	0,0037	0,9311
25	G	A	C	A	C	G	C	A	T	G	0,0037	0,9347
26	G	A	C	A	C	G	C	A	C	C	0,0037	0,9384
27	G	A	C	A	C	G	A	A	C	C	0,0036	0,942
28	G	A	C	A	C	G	A	A	C	G	0,0036	0,9457
29	G	A	C	A	C	G	C	A	C	G	0,0036	0,9493
30	G	A	C	A	C	G	C	G	T	G	0,0036	0,9529
31	G	A	C	A	C	G	A	G	C	C	0,0036	0,9565
32	G	A	C	A	C	G	C	G	C	G	0,0036	0,9601
33	G	A	C	A	C	G	C	G	T	C	0,0036	0,9637
34	G	A	C	A	C	G	C	G	C	C	0,0036	0,9673
35	G	A	C	A	C	G	A	G	T	G	0,0036	0,9708
36	G	A	C	A	C	G	A	A	T	G	0,0035	0,9744

37	G	A	C	A	C	G	A	G	T	C	0,0035	0,9779
38	T	A	C	A	C	T	C	A	C	G	0,0033	0,9811
39	T	A	C	A	C	T	C	A	C	C	0,0032	0,9843
40	T	A	C	A	C	T	C	G	T	C	0,0032	0,9875
41	T	A	C	A	C	T	C	A	T	C	0,0031	0,9906
42	T	A	C	A	C	T	C	G	T	G	0,0031	0,9938
43	T	A	C	A	C	T	C	G	C	C	0,0031	0,9969
44	T	A	C	A	C	T	C	A	T	G	0,0031	1

A.7. Estimación de frecuencias haplotípicas. Gen *LOC105370627*

Haplotipo	rs12436973	rs142020658	rs8021744	rs12437047	rs12896399	rs12896471	Total	Frecuencia acumulada
1	A	A	C	C	G	C	0,5788	0,5788
2	A	A	C	C	T	G	0,2945	0,8733
3	A	A	T	G	G	C	0,0477	0,921
4	G	A	C	C	T	C	0,0263	0,9473
5	A	G	T	G	G	C	0,0151	0,9624

6	A	A	C	G	G	C	0,0109	0,9733
7	G	A	T	G	T	C	0,0099	0,9832
8	G	A	C	G	G	C	0,0094	0,9926
9	G	G	C	C	T	G	0,0036	0,9962
10	A	G	C	C	T	G	0,0034	0,9996
11	G	A	T	G	G	C	0,0004	1
12	A	A	C	C	T	C	0	1

Tabla A.8 Frecuencias alélicas (fa) y genóticas (fg) de los AIMs en las poblaciones parentales. ESN: Esan en Nigeria; GWD: Gambia en la División Occidental, Gambia; MSL: Mende en Sierra Leona; IBS: poblaciones ibéricas en España; TSI: poblaciones toscanas en Italia; AMER: nativas americanas.

SNP	Alelo	Genotipo	ESN		GWD		MSL		IBS		TSI		AMER	
			fa	fg	fa	fg								
rs1800404	A	AA	0,14	0,03	0,15	0,03	0,08	0,01	0,73	0,56	0,71	0,52	0,287	0,08
	G	AG	0,86	0,21	0,85	0,25	0,92	0,14	0,27	0,35	0,29	0,36	0,713	0,41
		GG		0,76		0,73		0,85		0,09		0,11		0,51
rs1042602	A	AA	0	0	0	0	0,01	0	0,39	0,17	0,51	0,25	0,02	0
	C	AC	1	0	1	0	0,99	0,01	0,61	0,45	0,49	0,52	0,98	0,03

		CC		1		1		0,99		0,38		0,22		0,97
rs2695	A	AA	0,22	0,03	0,25	0,07	0,21	0,04	0,27	0,07	0,22	0,04	0,84	0,77
	G	AG	0,78	0,37	0,75	0,35	0,79	0,35	0,73	0,41	0,78	0,36	0,16	0,15
		GG		0,6		0,58		0,61		0,52		0,6		0,08
rs2862	C	CC	0,3	0,06	0,35	0,13	0,34	0,13	0,2	0,04	0,24	0,07	0,687	0,47
	T	CT	0,7	0,48	0,65	0,42	0,66	0,41	0,8	0,32	0,76	0,36	0,313	0,43
		TT		0,45		0,44		0,46		0,64		0,58		0,1
rs4884	C	CC	0,81	0,65	0,81	0,68	0,89	0,8	0,65	0,4	0,71	0,51	0,35	0,12
	T	CT	0,19	0,33	0,19	0,26	0,11	0,18	0,35	0,5	0,29	0,39	0,65	0,46
		TT		0,02		0,06		0,02		0,1		0,09		0,42
rs2069762	G	GG	0,03	0	0,02	0	0	0	0,25	0,06	0,33	0,08	0,491	0,24
	T	GT	0,97	0,05	0,98	0,04	1	0	0,75	0,39	0,67	0,49	0,509	0,5
		TT		0,95		0,96		1		0,55		0,43		0,26
3138523	Delección (D)	DD	0,79	0,64	0,81	0,65	0,84	0,69	0,88	0,78	0,82	0,67	0,135	0,02
	Inserción (I)	ID	0,21	0,3	0,19	0,31	0,16	0,29	0,12	0,21	0,18	0,29	0,865	0,23
		II		0,06		0,04		0,01		0,01		0,04		0,75
rs1871534	C	CC	0,94	0,89	0,9	0,82	0,98	0,95	0,005	0	0	0	0,99	0,98028858
	G	CG	0,06	0,11	0,1	0,16	0,02	0,05	0,995	0,01	1	0	0,01	0,01961332

		GG		0		0,02		0		0,99		1		9,8104E-05
rs2763	C	CC	0,86	0,72	0,87	0,75	0,79	0,62	0,88	0,78	0,86	0,74	0,88	0,77
	G	CG	0,14	0,28	0,13	0,24	0,21	0,33	0,12	0,21	0,14	0,24	0,12	0,21
		GG		0		0,01		0,05		0,02		0,02		0,01
rs3138522	Delección (D)	DD	0,4	0,18	0,41	0,13	0,41	0,19	0,05	0,01	0,03	0	0,04	0,002
	Inserción (I)	ID	0,6	0,44	0,59	0,55	0,59	0,44	0,95	0,08	0,97	0,06	0,96	0,078
		II		0,37		0,32		0,38		0,91		0,94		0,92
rs13069719	C	CC	0,76	0,59	0,69	0,5	0,72	0,52	0,86	0,76	0,8	0,66	0,09	0,01
	T	CT	0,24	0,35	0,31	0,38	0,28	0,41	0,14	0,21	0,2	0,28	0,91	0,16
		TT		0,06		0,12		0,07		0,03		0,06		0,83
rs2288697	A	AA	0,01	0	0,01	0	0,02	0	0,04	0	0,06	0	0,256	0,07
	G	AG	0,99	0,02	0,99	0,02	0,98	0,05	0,96	0,08	0,94	0,11	0,744	0,38
		GG		0,98		0,98		0,95		0,92		0,89		0,55
rs2065982	C	CC	0,08	0	0,06	0,01	0,06	0,01	0,02	0	0,07	0,01	0,86	0,74
	T	CT	0,92	0,15	0,94	0,1	0,94	0,11	0,98	0,05	0,93	0,12	0,14	0,24
		TT		0,85		0,89		0,88		0,95		0,87		0,02
rs7211306	A	AA	0,39	0,19	0,4	0,19	0,35	0,11	0,35	0,13	0,37	0,15	0,95	0,89
	G	AG	0,61	0,39	0,6	0,43	0,65	0,49	0,65	0,43	0,63	0,44	0,05	0,11

		GG		0,41		0,38		0,4		0,44		0,41		0
rs12469563	C	CC	0,02	0	0	0	0	0	0,03	0	0,02	0	0,76	0,58
	T	CT	0,98	0,03	1	0	1	0	0,97	0,06	0,98	0,04	0,24	0,36
		TT		0,97		1		1		0,94		0,96		0,06
rs8009244	A	AA	0,08	0	0,1	0,01	0,05	0,02	0,84	0,71	0,91	0,82	0,91	0,83
	G	AG	0,92	0,15	0,9	0,19	0,95	0,06	0,16	0,26	0,09	0,17	0,09	0,16
		GG		0,85		0,81		0,92		0,03		0,01		0,01
rs1426654	A	AA	0,03	0	0,08	0,01	0,09	0,01	1	1	0,995	0,99	0,04	0,002
	G	AG	0,97	0,05	0,92	0,13	0,91	0,15	0	0	0,005	0,01	0,96	0,081
		GG		0,95		0,86		0,84		0		0		0,917
rs5025718	C	CC	0,01	0	0,08	0,02	0,02	0	0,87	0,78	0,87	0,77	0,824	0,68
	T	CT	0,99	0,02	0,92	0,13	0,98	0,05	0,13	0,19	0,13	0,21	0,176	0,29
		TT		0,98		0,85		0,95		0,04		0,02		0,03
rs2384319	G	GG	0,07	0	0,03	0	0,05	0	0,08	0	0,1	0	0,89	0,83
	T	GT	0,93	0,14	0,97	0,06	0,95	0,11	0,92	0,16	0,9	0,2	0,11	0,12
		TT		0,86		0,94		0,89		0,84		0,8		0,05
rs718273	A	AA	0,03	0	0,03	0	0,05	0,01	0,31	0,11	0,32	0,11	0,14	0,02
	G	AG	0,97	0,05	0,97	0,05	0,95	0,07	0,69	0,39	0,68	0,42	0,86	0,23

		GG		0,95		0,95		0,92		0,5		0,47		0,75
rs10510511	A	AA	0	0	0	0	0	0	0,04	0,01	0,03	0	0,88	0,8
	C	AC	1	0	1	0	1	0	0,96	0,07	0,97	0,07	0,12	0,17
		CC		1		1		1		0,93		0,93		0,03
rs2042314	A	AA	0,17	0,02	0,1	0,01	0,09	0	0,09	0	0,13	0,01	0,97	0,94
	G	AG	0,83	0,3	0,9	0,19	0,91	0,19	0,91	0,19	0,87	0,23	0,03	0,06
		GG		0,68		0,81		0,81		0,81		0,76		0
rs717225	C	CC	0,84	0,7	0,87	0,74	0,79	0,61	0,02	0	0,01	0	0	0
	T	CT	0,16	0,28	0,13	0,25	0,21	0,36	0,98	0,04	0,99	0,02	1	0
		TT		0,02		0,01		0,02		0,96		0,98		1
rs3870336	C	CC	0,89	0,79	0,95	0,89	0,87	0,74	0,93	0,87	0,93	0,86	0,11	0,02
	T	CT	0,11	0,21	0,05	0,11	0,13	0,26	0,07	0,13	0,07	0,14	0,89	0,19
		TT		0		0		0		0		0		0,8
rs285	C	CC	0,04	0	0,05	0,1	0,03	0	0,51	0,27	0,46	0,21	0,697	0,49
	T	CT	0,96	0,08	0,95	0,9	0,97	0,06	0,49	0,48	0,54	0,5	0,303	0,42
		TT		0,92		0		0,94		0,25		0,29		0,09
rs1800498	C	CC	0,89	0,79	0,89	0,79	0,95	0,89	0,33	0,11	0,36	0,11	0,95	0,902
	T	CT	0,11	0,2	0,11	0,2	0,05	0,11	0,67	0,44	0,64	0,5	0,05	0,096

		TT		0,01		0,01		0		0,45		0,38		0,002
rs7041	G	GG	0,08	0,01	0,08	0,01	0,05	0	0,57	0,31	0,55	0,26	0,47	0,19
	T	GT	0,92	0,14	0,92	0,14	0,95	0,11	0,43	0,51	0,45	0,58	0,53	0,56
		TT		0,85		0,85		0,89		0,18		0,16		0,25
rs2816	C	CC	1	1	0,996	0,99	1	1	0,5	0,25	0,42	0,14	0,95	0,91
	T	CT	0	0	0,004	0,01	0	0	0,5	0,49	0,58	0,55	0,05	0,09
		TT		0		0		0		0,26		0,31		0
rs2814778	C	CC	1	1	1	1	1	1	0,02	0	0,01	0	0,01	7,3185E-05
	T	CT	0	0	0	0	0	0	0,98	0,04	0,99	0,02	0,99	0,01696322
		TT		0		0		0		0,96		0,98		0,9829636
rs9290363	G	GG	0,88	0,8	0,89	0,79	0,84	0,71	0,04	0	0,04	0	0,12	0,02
	T	GT	0,12	0,17	0,11	0,2	0,16	0,26	0,96	0,07	0,96	0,08	0,88	0,21
		TT		0,03		0,01		0,04		0,93		0,92		0,77

Tabla A.9 *Fst* de todas las poblaciones por separado. * p-valor < 0,00167 (sólo para *Fst*). ESN: Esan en Nigeria; GWD: Gambia en la División Occidental, Gambia; MSL: Mende en Sierra Leona; TSI: poblaciones toscanas en Italia; IBS: poblaciones ibéricas en España; AMER: poblaciones nativas americanas; BA: Buenos Aires. Los genotipos de los nativos se obtuvieron por promedio ponderado y simulación para 20 de los 30 AIMs. En el caso de las poblaciones nativas, éstas se agruparon debido a que algunas de ellas presentaban un N muy bajo.

	ESN	GWD	MSL	TSI	IBS	AMER
GWD	0,0024	0				

MSL	0,00344	0,0068*	0			
TSI	0,55777*	0,54542*	0,55342*	0		
IBS	0,55603*	0,54322*	0,55252*	0,00276	0	
AMER	0,6746*	0,66782*	0,67761*	0,52165*	0,53072*	0
BA	0,52429*	0,51723*	0,51819*	0,15946*	0,14983*	0,52032*

Reactivos

Buffer de digestión

100 mM NaCl
50 mM TRIS – HCl
1 % SDS
50 mM EDTA
pH = 8

Buffer TE

10 mM TRIS BASE
1 mM EDTA
pH = 8

Loading buffer

0,25 % Azul de bromofenol
0,25 % Xilen-cianol
40 % p/v Sacarosa en H₂O
Sambrook *et al.*,1989

Buffer TAE 50X

242 gr Tris Base
57,1 ml Ácido Acético Glacial
100 ml EDTA 0,5M
H₂O desionizada c.s.p. 1000 ml
pH = 7,2

Buffer TBE 10X

107,8 gr TRIS BASE
7,44 gr EDTA
55 gr Ácido bórico
H₂O desionizada c.s.p. 1000 ml
pH = 8,3

Solución 20% PEG - 2,5 M NaCl

10 gr PEG 8000 ó 6000
7,3 gr NaCl
H₂O desionizada c.s.p. 50 ml

Acrilamida 40 %

2 gr Bisacrilamida
38 gr Acrilamida
H₂O desionizada c.s.p. 100 ml