

Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires



**Informe de Beca de Entrenamiento
Período informado: octubre 2015-marzo
2016**

Variación genética del color del iris en la población bonaerense

**Becaria: Diana M. Hohl
Directora: Cecilia I. Catanesi**

Introducción

Color del iris: aspectos biológicos y poblacionales

El color de los ojos es un carácter fenotípico conspicuo en los humanos y su variación es una de las manifestaciones más relevantes del aspecto físico entre los individuos. A pesar de que la variación genética subyacente a este fenotipo es distinta según la población estudiada, la mayoría de los estudios genómicos están basados en individuos de ancestría únicamente europea, faltando información sobre dicha variación en otras poblaciones del mundo (Beleza *et al.*, 2013).

La causa de los ojos de color azul en humanos es una mutación fundadora en un importante elemento regulador de uno de los genes relacionado a la pigmentación, la cual se supone que se originó al Este o Noroeste del Mar Negro hace unos 6.000 a 10.000 años (Eiberg *et al.*, 2008). La mayor ocurrencia de colores de iris claros se encuentra casi exclusivamente en la población de Europa y en individuos con ancestros provenientes de dicho continente (Sturm y Frudakis, 2004).

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, ya que constituye una herramienta para la predicción de esta característica visible externamente o EVC (*externally visible characteristic*). La descripción del color del iris desde un análisis genético ayudaría, 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, convirtiendo al ácido desoxirribonucleico en un “testigo biológico” (Walsh, Liu, *et al.*, 2011) y reduciendo así la dependencia de los testigos oculares en la investigación (Keating *et al.*, 2013). A su vez, permitiría identificar a personas desaparecidas o víctimas de desastres, ya que los antropólogos forenses pueden determinar algunas características visibles a partir de los restos de un individuo, tales como altura, sexo y etnia, pero las características relacionadas con la pigmentación no pueden ser inferidas si ocurre una descomposición de los restos (Hart *et al.*, 2013; Spichenok *et al.*, 2011). En estos casos, el ADN puede ser una herramienta forense muy útil para hacer más completa la descripción fenotípica de los individuos y lograr su identificación 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.

El iris (gr. iris, arco iris, por las variaciones de color que presenta) es una estructura con forma de disco que está incluida en la parte anterior del ojo.

Sobre la superficie anterior del iris pueden observarse crestas, criptas y pliegues; por el contrario, la superficie posterior es bastante lisa, además de ser de color negro debido a la pigmentación del epitelio posterior.

Desde el punto de vista histológico, el iris se compone de las siguientes capas:

-Capa limitante anterior o lámina marginal anterior: se compone, en su mayor parte, de fibroblastos y melanocitos.

-Estroma del iris: se compone de tejido conectivo laxo que contiene fibras de colágeno muy delgadas, separadas por sustancia fundamental y células. Las células son, principalmente, fibroblastos y melanocitos (Sturm y Frudakis, 2004). También se encuentran macrófagos con pigmentos en su interior y mastocitos.

-Epitelio anterior: está formado por una única capa de células cúbicas a cilíndricas, muy polarizadas, cada una compuesta por una parte muscular basal y una parte apical que contiene el núcleo y posee abundantes gránulos de pigmento en el citoplasma.

-Epitelio posterior: se compone de una única capa de células cilíndricas, cuyo citoplasma está ocupado casi en su totalidad por gránulos de melanina. (Geneser, 2000).

La melanina es la molécula responsable de la pigmentación. En el iris, el epitelio anterior y el estroma que se encuentra por delante del mismo son las partes que juegan el rol más importante en la apariencia del color (Sturm y Frudakis, 2004).

Los principales factores que influyen en el color del iris son: la cantidad de pigmento melánico, el tipo de empaquetamiento de dicho pigmento (Sturm y Frudakis, 2004), el tipo de melanina presente en las células del epitelio pigmentado y en los melanocitos del estroma del iris, así como también las propiedades de absorción y dispersión de la luz dada por componentes extracelulares en el estroma (Prota *et al.*, 1998) y el número de melanosomas o compartimentos subcelulares de los melanocitos donde se sintetiza y acumula la melanina (Hart *et al.*, 2013; Sulem *et al.*, 2007). El número de melanocitos parece no variar entre los distintos colores.

El color marrón indica abundancia de melanosomas. El iris azul indica bajo contenido melánico (figura 1) y cuando la luz incide sobre las estructuras anteriores del mismo, las proteínas presentes principalmente en el estroma dispersan los fotones de longitud de onda corta hacia la superficie (Sturm y Frudakis, 2004).

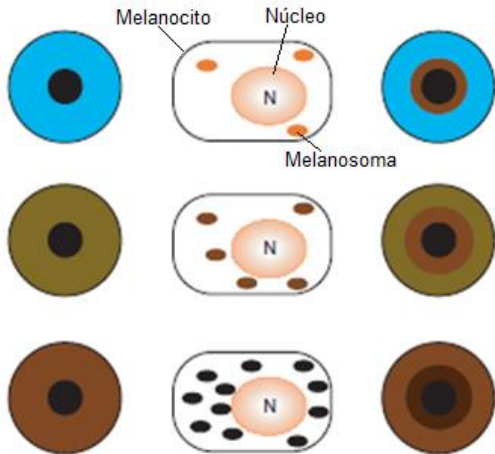


Figura 1. Representación de la distribución intracelular y contenido de los melanosomas dentro de los melanocitos. Sturm y Frudakis 2004.

La melanina presenta dos variantes (figura 2): la eumelanina es un pigmento marrón a negro que está empaquetado en eumelanosomas ovoides (estriados), mientras que la feomelanina es un pigmento amarillo a rojo producido en feomelanosomas granulares inmaduros (Sturm y Frudakis, 2004).

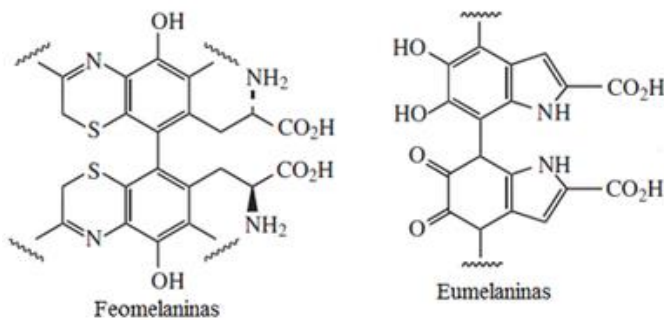


Figura 2. Estructuras de los tipos de melanina. <https://es.wikipedia.org/wiki/Melanina>.

Una pigmentación feomelánica se asocia al color verde, la presencia de ambos pigmentos en alta concentración da lugar al color marrón y una baja cantidad de ambos produce el color azul (Prota *et al.*, 1998).

El color del iris es un carácter poligénico que sufre cambios con el paso de los años (Sturm y Frudakis, 2004; Liu *et al.* 2010). Según algunos autores, también varía de acuerdo con el género (Martínez-Cadenas *et al.*, 2013, 2014) aunque respecto a esto último, otros trabajos manifiestan lo contrario (Liu *et al.*, 2014). Se trata de un carácter cuantitativo, con un rango de colores que va desde el azul hasta el marrón oscuro; por lo tanto, su forma de herencia es compleja, a pesar de que en algunos casos aparente comportarse como un carácter con herencia mendeliana simple (Martínez-Cadenas *et al.*, 2013).

En los últimos años varios grupos de trabajo han logrado identificar los principales genes que juegan un rol en la determinación de este fenotipo. Entre ellos se incluyen:

-HERC2 (HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2): Las variaciones en este gen 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 (Martínez-Cadenas *et al.*, 2013; Visser *et al.*, 2012). Ubicación: 15q13 (figura 3).

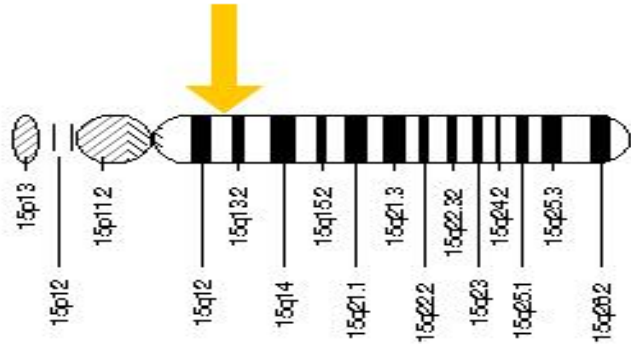


Figura 3. Ubicación del gen *HERC2* en el cromosoma 15. *Genetics Home Reference.*

-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 (Praetorius *et al.*, 2013, Sturm y Duffy, 2012; Ochiai *et al.*, 2013). Ubicación: 6p25-p23 (figura 4).

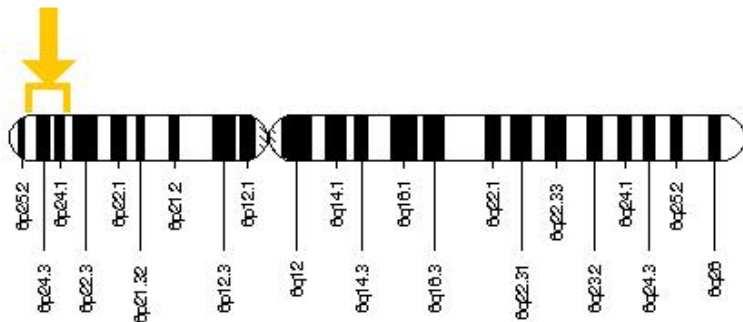


Figura 4. Ubicación del gen *IRF4* en el cromosoma 6. *Genetics Home Reference.*

-SLC24A4 (solute carrier family 24 -sodium/potassium/calcium exchanger-, member 4): Este gen codifica una proteína de la familia de los intercambiadores de sodio/calcio dependientes de potasio (Parry *et al.*, 2013). Ubicación: 14q32.12 (figura 5).

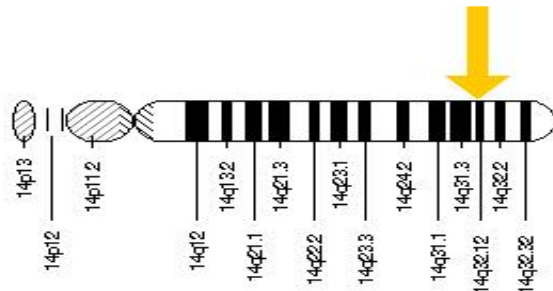


Figura 5. Ubicación del gen *SLC24A4* en el cromosoma 14. *Genetics Home Reference.*

-SLC45A2 (solute carrier family 45, member 2): Codifica una proteína transportadora llamada MATP (*membrane-associated transporter protein*) que es un intercambiador de sodio-hidrógeno. Mediante cambios del pH y del entorno iónico dentro de los melanosomas (figura 6), regula la actividad de la tirosinasa en los melanosomas humanos (Nan *et al.*, 2009; Sturm y Duffy, 2012). Ubicación: 5p13.2 (figura 7).

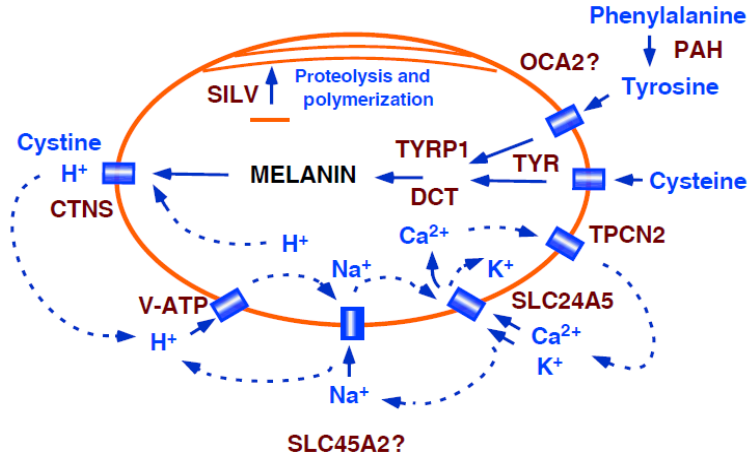


Figura 6. Formación de melanina en el melanosoma. Los transportadores son importantes para el control del entorno iónico y el pH. Sturm y Duffy, 2012.

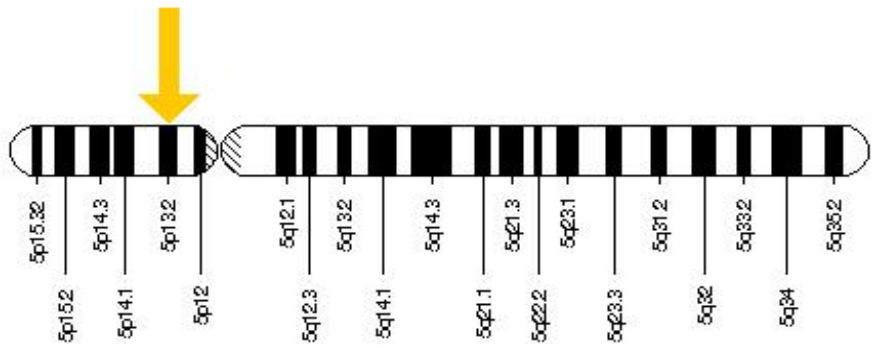


Figura 7. Ubicación del gen SLC45A2 en el cromosoma 5. Genetics Home Reference.

-TYR (tirosinasa): Es una de las enzimas requeridas para la síntesis de ambos tipos de melanina (Sturm y Frudakis, 2004). Su actividad es dependiente del pH del melanosoma (figura 6) (Sturm y Duffy, 2012). En la melanogénesis (figura 8), la tirosina es oxidada por esta enzima para dar dopaquinona (Sturm y Frudakis, 2004). Ubicación: 11q14.3 (figura 9).

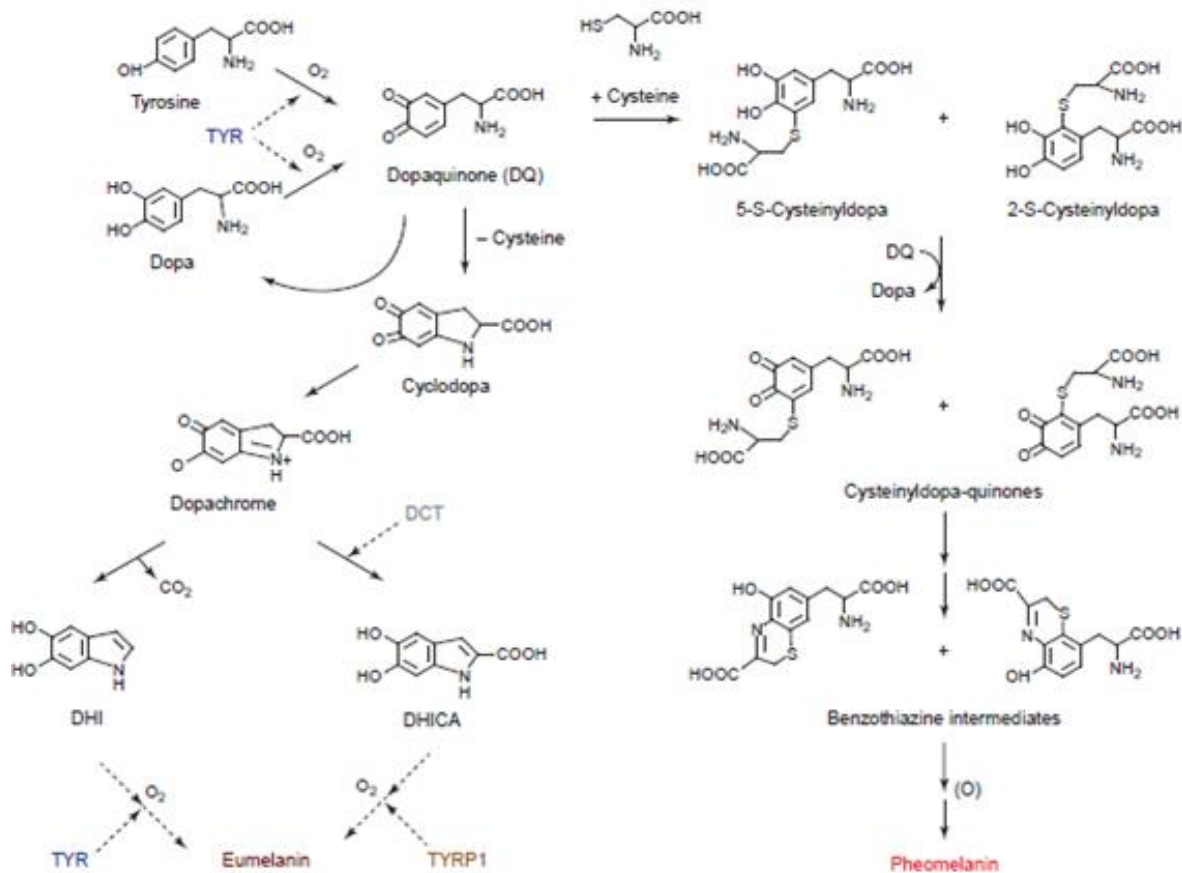


Figura 8. Melanogénesis. Sturm y Frudakis, 2004.

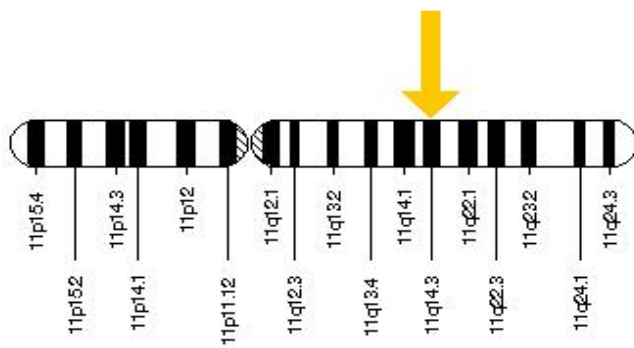


Figura 9. Ubicación del gen TYR en el cromosoma 11. *Genetics Home Reference*.

A partir del estudio de los genes mencionados se han identificado determinados polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, *Single Nucleotide Polymorphisms*) que permiten marcar con escaso error la variación en la pigmentación del iris en la población europea. Los SNPs estudiados en este trabajo fueron:

-rs12913832, ubicado en el intrón 86 del gen *HERC2*, 21kpb upstream del promotor del gen *OCA2* (figura 10). Esta región actúa como un enhancer. En los melanocitos con el alelo A se detecta la unión de ciertos factores de transcripción 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 (Visser et al., 2012). El alelo A se asocia con ojos no azules y el alelo G con ojos no marrones (Beleza et al., 2013; Sturm et al., 2008; Sturm y Duffy, 2012; Liu et al., 2010; Ruiz et al., 2013; Hart et al., 2013; Wilde et al., 2014; Draus-Barini et al., 2013; Valenzuela et al., 2010; Lim y Oh, 2013; Kastelic et al., 2013; Kastelic y Drobnič, 2012; Walsh, Lindenbergh et al., 2011; Walsh, Liu et al., 2011, 2012; Eiberg et al., 2008; Nan et al., 2009; Mengel-From et al., 2009; Spichenok et al., 2011). Presenta dos alelos posibles, A y G.

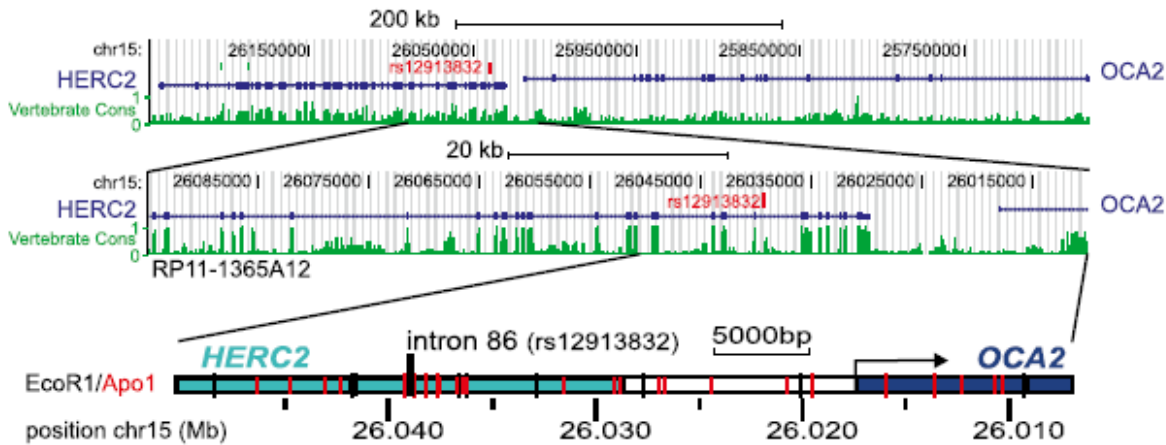


Figura 10. Panel superior: Locus *HERC2-OCA2*. Panel inferior: Ubicación del polimorfismo estudiado dentro del intrón 86 de *HERC2* y posición del promotor de *OCA2*. Visser et al. 2012.

-rs12203592, de *IRF4* (Hart et al., 2013; Liu et al., 2010; Sturm y Duffy, 2012; Lim y Oh, 2013; Kastelic et al., 2013; Walsh, Lindenbergh et al., 2011; Martínez-Cadenas et al., 2013; Praetorius et al., 2013; Walsh et al. 2012). Este polimorfismo se encuentra en el intrón 4 que forma parte de un enhancer del gen. El alelo T se relaciona con el color de ojos azul (Praetorius et al., 2013). Presenta los alelos C y T.

-rs12896399, del gen *SLC24A4*, ubicado 15262pb aguas arriba de su promotor que modifica la unión de factores de transcripción (Liu et al., 2010; Ruiz et al., 2013; Kastelic et al., 2013; Walsh, Liu et al., 2011; Walsh et al. 2012; Lim y Oh, 2013; Walsh, Lindenbergh et al., 2011; Martínez-Cadenas et al., 2013; Sulem et al., 2007; Hart et al., 2013). El alelo T se vio relacionado a ojos azules, mientras que el alelo G se asoció a ojos marrones (Hart et al., 2013; Sulem et al., 2007, Martínez-Cadenas et al., 2013). Presenta los alelos G y T.

-rs16891982, del gen *SLC45A2* (Hart *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2010; Sturm y Duffy, 2012; Ruiz *et al.*, 2013; Wilde *et al.*, 2014; Valenzuela *et al.*, 2010; Fernandes Durso *et al.*, 2014; Kastelic *et al.*, 2013; Lim y Oh, 2013; Walsh, Liu *et al.* 2011; Walsh *et al.* 2012; Spichenok *et al.*, 2011; Walsh, Lindenbergh *et al.*, 2011; Martínez-Cadenas *et al.*, 2013), siendo el alelo G el relacionado a la pigmentación clara (Wilde *et al.*, 2014; Walsh *et al.*, 2012). Una transversión C/G es responsable del cambio de aminoácido Phe374Leu en la proteína (Wilde *et al.*, 2014). Presenta los alelos C y G.

-rs1393350, del gen *TYR* (Liu *et al.*, 2010; Kastelic *et al.*, 2013; Walsh, Lindenbergh *et al.*, 2011; Ruiz *et al.*, 2013; Lim y Oh, 2013; Martínez-Cadenas *et al.*, 2013; Sulem *et al.*, 2007; Kastelic y Drobnič 2012; Walsh *et al.* 2012). Se encuentra en un intrón del gen. Según Walsh *et al.* (2012), el genotipo GG se asocia al color marrón y el AA al color azul. Presenta los alelos G y A.

Estos cinco 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, Lindenbergh *et al.* 2011; Walsh *et al.* 2012, 2013). Hasta el momento, no existen datos tomados sobre la población de nuestro país para la variación genética asociada con el carácter fenotípico del color de ojos.

Genética de poblaciones

La Genética de poblaciones es la disciplina que estudia las frecuencias alélicas y genotípicas y la eficacia biológica de los genotipos en las poblaciones naturales. La evolución es el cambio en dichas frecuencias a través del tiempo, en algunos casos debido a la diferencia de su eficacia en determinados ambientes. Uno de los objetivos de esta disciplina es describir la estructura genética de las poblaciones y comparar la variación intra e interpoblacional (Gillespie, 1998).

Alelos y frecuencia alélica

Un alelo es una de las varias formas alternativas de un gen que ocupa un locus determinado en un cromosoma (Krebs *et al.*, 2012). La frecuencia alélica es la proporción relativa de un alelo determinado respecto al total de alelos que pueden ocupar el locus en cierta población:

$p = \text{frecuencia del alelo } A = \frac{2 \times \text{cantidad de homocigotas } A + 0,5 \times \text{cantidad de heterocigotas}}{2 \times \text{total de individuos}}$

$q = \text{frecuencia del alelo } a = \frac{2 \times \text{cantidad de homocigotas } a + 0,5 \times \text{cantidad de heterocigotas}}{2 \times \text{total de individuos}}$

A su vez, $p + q = 1$

Ley de Hardy-Weinberg

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 y endogamia. De esta forma, existe la probabilidad de encontrar individuos homocigotas y heterocigotas según las frecuencias alélicas. Si consideramos p = frecuencia del alelo **A** en la población y q = frecuencia del alelo **a**, las tres posibles frecuencias genotípicas finales de la descendencia son:

Genotipo	AA	Aa	aa
Frecuencia	p^2	$2pq$	q^2

En una población que se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg las frecuencias genotípicas y alélicas se mantienen constantes de generación en generación. (Gillespie, 1998).

Una población en equilibrio puede alejarse del mismo variando sus frecuencias alélicas y genotípicas al sufrir eventos tales como mutación, migración, deriva génica, selección natural, o cruzamientos que no son al azar, por ejemplo, por endogamia (Hedrick, 2000).

Población americana

América fue poblada entre unos 23000 y 8000 años atrás. Los primeros habitantes de este continente llegaron principalmente desde Asia, específicamente desde Siberia por el estrecho de Bering, en una única oleada migratoria. Estos ancestros se diversificaron en dos ramas genéticas basales hace 13000 años (Raghavan *et al.*, 2015).

Población argentina

La actual composición étnica de la población Argentina es el resultado de la gran ola de inmigración europea sucedida entre 1850 y 1955, que se sumó a la población local cuantitativamente menor que estaba instalada previamente a la independencia de Argentina, integrada por una base indígena originaria, africana inmigrada forzosamente entre los siglos XVII y XVIII y con una relativamente pequeña población de colonizadores españoles que arribaron durante los siglos XVI a XVIII, fuertemente mestizadas entre sí.

Desde mediados de siglo XX, la composición étnica estuvo muy influenciada por la inmigración proveniente de países sudamericanos, principalmente Paraguay y Bolivia (Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas del año 2010, Instituto Nacional de Estadística y Censos -INDEC-) que se mantiene hasta la actualidad, con lo cual la población se encuentra actualmente en un proceso de cambio en cuanto a su composición genética.

Adicionalmente la Argentina cuenta con considerables minorías étnicas, aunque éstas han sido menos tenidas en cuenta en los censados poblacionales (Bagú 1983).

Existe un bajo aporte genético africano por vía paterna, el cual se debe en parte a la alta mortalidad masculina en las guerras (Andrews, 1989). Otros estudios indican que 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).

Población bonaerense

Regionalmente, la composición de la población, atendiendo a los orígenes nacionales y étnicos, varía. La región central del país se caracteriza por un predominio de ascendientes europeos, principalmente italianos y españoles, además de la presencia de minorías étnicas. Varios investigadores sostienen que en el proceso de mestizaje sucedido luego de la gran inmigración ultramarina, se diluyeron los rasgos genotípicos indígenas y africanos (Marino *et al.*, 2007) y predominaron los rasgos europeos que dan cierto aspecto físico diferencial a la población argentina, sobre todo en las ciudades y regiones que recibieron mayor inmigración, como la provincia de Buenos Aires, en relación con otros países de la región. Esto fue corroborado mediante un estudio que reveló una considerable diferencia en la composición étnica desde la perspectiva de género (Corach *et al.*, 2010). Sin embargo, desde mediados del siglo XX se aprecia que el aporte europeo disminuye marcadamente y es reemplazado por la migración interna, de los países limítrofes y de Perú, de elevada composición indígena (Avena *et al.*, 2006). Estas comunidades son predominantes en los partidos del oeste y sur del conurbano industrial de Buenos Aires, que constituyen la mayor concentración urbana del país. En el Gran Buenos Aires se concentra también la inmigración asiática, compuesta por coreanos, chinos, vietnamitas y japoneses.

A consecuencia de las migraciones internas y desde países limítrofes y Perú, se habría modificado sustancialmente la composición genética de la población bonaerense, aumentando la proporción del componente genético amerindio y africano (Avena *et al.*, 2001, 2006). Actualmente, la provincia de Buenos Aires muestra 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).

Las poblaciones de distinta procedencia étnica y geográfica pueden portar diferentes variantes alélicas en genes que influyen en características fenotípicas que facilitan la 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 en la población Argentina no se ha hecho anteriormente ningún estudio poblacional referido a los genes implicados en el color del iris; menos aún, estudios que evalúen la relación entre el genotipo y el color de los ojos.

Objetivos

El objetivo general del presente proyecto es describir la variación genética relacionada con el color del iris en la población argentina, para su posterior aplicación dentro del área de Genética Forense, en pruebas de identificación de personas.

Los objetivos particulares del proyecto son:

- Caracterizar la variación genética de los polimorfismos rs12913832, rs12203592, rs12896399, rs16891982 y rs1393350 y relevar la variación de color del iris en una muestra de la población bonaerense.
- Analizar la asociación de dichos polimorfismos genéticos con la determinación de color del iris.
- Comparar los resultados obtenidos con datos de la bibliografía, los cuales pertenecen a estudios realizados en otras poblaciones del mundo.
- Analizar una posible relación entre la variación del color del iris y el sexo de los individuos.
- Analizar diferencias étnicas en la herencia del color de ojos, a través del estudio de la ancestría predominante de los individuos estudiados, mediante la tipificación de marcadores específicos de linaje materno y paterno nativo americano y europeo.

Hipótesis

Dada la composición de la población argentina en la actualidad, la variación genética relacionada con el color del iris reflejaría en parte la variación previamente descrita para la población europea, si bien podrían hallarse distintas distribuciones alélicas como reflejo de la miscegenación con pueblos nativos americanos y de otras procedencias del mundo. Por ende, la implementación de un conjunto de polimorfismos de utilidad en poblaciones europeas para la determinación del color del iris puede no ser aplicable en nuestra población.

Materiales y métodos

Toma de muestras

En este proyecto se analizaron muestras de ADN de 115 individuos donantes voluntarios, de edad comprendida entre los 18 y 50 años, identificados como provenientes de la provincia de Buenos Aires. El proyecto fue aprobado previamente por el Comité de Ética en Investigaciones Biomédicas del IMBICE; los donantes fueron consultados para participar voluntariamente del proyecto y se les solicitó la firma de un consentimiento informado. Posteriormente se tomaron dos muestras de enjuague bucal, se agregaron 2 volúmenes de etanol por tubo de muestra, se mezcló cada uno por inversión y se guardaron en heladera hasta la etapa de extracción del ADN.

El color del iris se registró con fotografías tomadas por una cámara digital Nikon Coolpix s3400, 20 megapixels con flash de relleno, normalizando la intensidad de la luz que llegaba sobre el iris de cada ojo al utilizar un sistema que evitaba la incidencia de la luz ambiente y una linterna de una intensidad determinada constante. Las muestras se categorizaron luego en grupos según el color del iris, de acuerdo con una clasificación dada por Walsh, Liu *et al.* (2011).

Extracción de ADN

A partir de las muestras de enjuague bucal se extrajo el ADN de las células de descamación bucal mediante una técnica estándar (Gemmel y Akiyama, 1996) que utiliza Proteinasa K para la lisis celular, LiCl y etanol absoluto frío para precipitar el ADN.

Cuantificación de ADN

Se cuantificaron las muestras utilizando un espectrofotómetro (NanoDrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA). De acuerdo a estos resultados, se prepararon diluciones de las muestras a 10 ng/μL, con agua destilada Milli-Q® estéril.

Las diluciones y los stock de las muestras se almacenaron a -20°C.

Diseño de primers y elección de enzimas de restricción

Para el análisis de los SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*, polimorfismos de nucleótido simple) se utilizó la técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa), la cual consiste en la amplificación específica de un segmento de ADN de interés (Mullis *et al.*, 1986). Para ello fue necesario el diseño de los *primers* u oligonucleótidos flanqueantes al segmento en cuestión. Utilizando la base de datos dbSNP de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se obtuvo la secuencia de la región que contiene el SNP en formato FASTA, se quitaron los espacios en blanco de la misma con *Nucleic Acid Sequence Massager* (<http://www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm>) y se diseñaron los oligonucleótidos *forward* y *reverse* con Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Se calculó la temperatura de fusión o de *melting* (T_m) de los oligonucleótidos como

$$T_m (\text{°C}) = 2x(A+T) + 4x(G+C)$$

Y a partir de ésta, se determinó la temperatura de hibridación o *annealing*

$$T_a (\text{°C}) = T_m - 4$$

Se realizaron cambios en la secuencias de los oligonucleótidos cuando fue necesario, para que la temperatura de hibridación de los mismos fuese similar y/o para evitar problemas de autocomplementariedad. Se comprobó la ausencia de homologías con otras regiones del genoma humano utilizando BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) de NCBI.

Como se utilizaron dos variantes de la técnica, el diseño se realizó de dos formas distintas según el caso:

-PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*): Con NEBcutter (New England Biolabs, <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) se buscaron enzimas de restricción cuyo sitio de reconocimiento incluyera al SNP. Como no se encontraron enzimas homólogas con los sitios de ubicación de los SNPs, se reemplazaron bases aguas arriba y aguas abajo por una base N; de este modo se obtuvieron enzimas compatibles para dos de los marcadores. Luego de elegir la enzima (figuras 11 y 12), uno de los oligonucleótidos se diseñó con dicho *mismatch* (en minúscula en la secuencia) y el otro se diseñó de acuerdo con lo sugerido por *Primer3* (tabla 1).

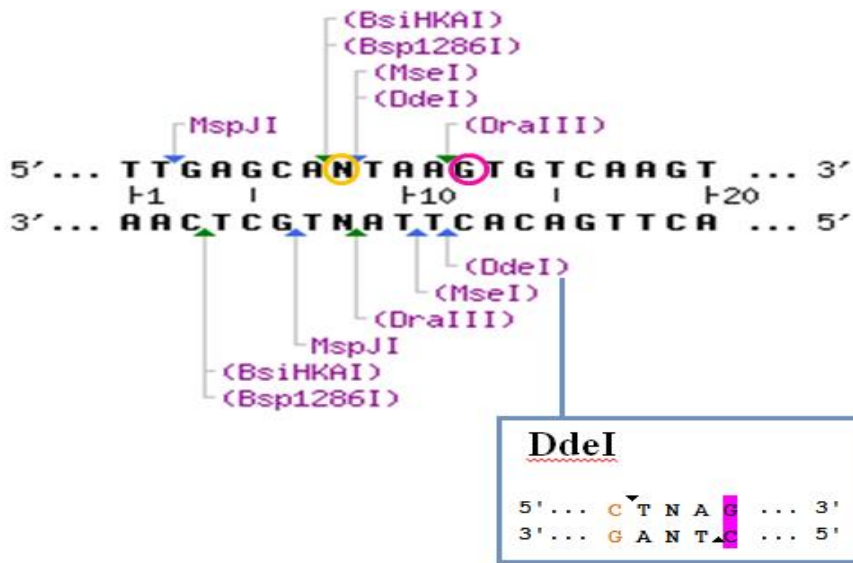


Figura 11. Secuencia de la región que contiene el polimorfismo rs12913832 y enzima elegida con el sitio de restricción. Realizado con NebCutter.

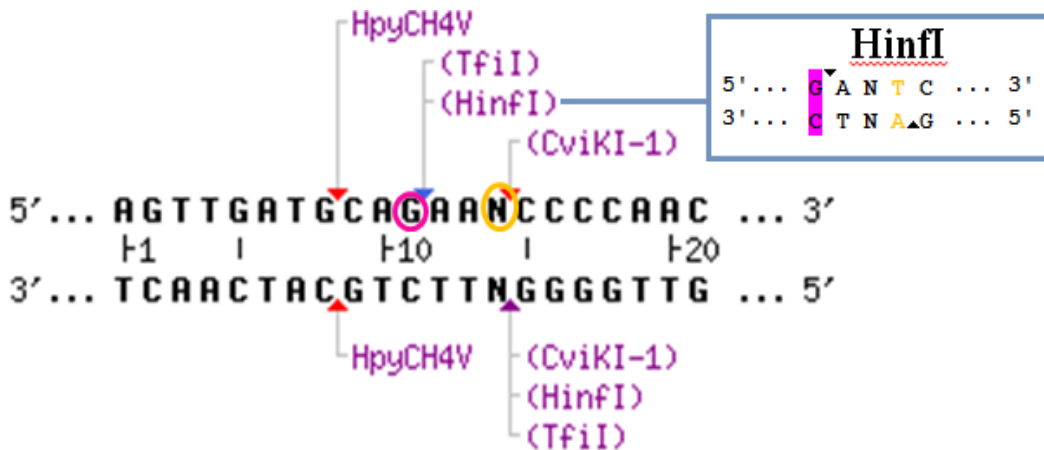


Figura 12. Secuencia de la región que contiene el polimorfismo rs16891982 y enzima elegida con el sitio de restricción. Realizado con NebCutter.

Gen	Polimorfismo	Oligonucleótidos utilizados	Ta calculada	Enzima de restricción
<i>HERC2</i>	rs12913832	<i>Forward</i> 5'-CCAGTCTCATTGAGCAcTAA-3' <i>Reverse</i> 5'-CCCCACCACTGGTAGTTTTTC-3'	56°C 58°C	<i>Ddel</i>
<i>SLC45A2</i>	rs16891982	<i>Forward</i> 5'-TTTTCTGACGTCCATAGATTT-3' <i>Reverse</i> 5'-GAGGTTGGATGTTGGGGaTT-3'	56°C 56°C	<i>HinfI</i>

Tabla 1. Detalle de los oligonucleótidos utilizados para la técnica PCR-RFLP.

-PCR alelo-específica: Se diseñaron un oligonucleótido *forward* y dos *reverse*, siendo estos últimos específicos de un alelo ya que el extremo 3' de cada uno es complementario a un alelo u otro del SNP en cuestión (rs12203592); de esta forma la PCR amplifica según el/los alelo/s presente/s. Según la base presente en este extremo, se realizó un cambio (*mismatch*, se muestra en minúscula en la secuencia) tres posiciones aguas arriba, según lo indicado por Gaudet *et al.* (2009). En el caso de los polimorfismos rs1393350 y rs12896399 se diseñaron dos *forward* específicos de alelo y un *reverse* (tabla 2).

Gen	Polimorfismo	Oligonucleótidos utilizados	Ta calculada
<i>IRF4</i>	rs12203592	<i>Forward</i> (Modificado de Walsh <i>et al.</i> , 2013) 5'-ACAGGGCAGCTGATCTCTTCAGG-3' <i>Reverse C</i> 5'-CCAAAAGTACCACAGGGGAAaTTG-3' <i>Reverse T</i> 5'-CCAAAAGTACCACAGGGGAAgTTA-3'	Ta=68°C Ta= 66°C Ta= 66°C
<i>SLC24A4</i>	rs12896399	<i>Forward</i> G 5'-TCTTTAGGTCAGTATATTTTaGGG-3' <i>Forward</i> T 5'-TTCTTTAGGTCAGTATATTTcGGT-3' <i>Reverse</i> 5'-GACCCTGTGTGAGACCCAGT-3'	Ta=60°C Ta=62°C Ta=60°C
<i>TYR</i>	rs1393350	<i>Forward A</i> 5'-CAGTCCCTTCTCTGCgACA-3' <i>Forward G</i> 5'-CAGTCCCTTCTCTGcTACG-3' <i>Reverse</i> 5'-GAAGGTGAACTGAGGCCAAA-3'	Ta= 56°C Ta= 56°C Ta= 56°C

Tabla 2. Detalle de los oligonucleótidos utilizados para la técnica PCR alelo-específica.

Marcadores de ancestría

La porción no recombinante del cromosoma Y es útil para el estudio de los orígenes del hombre, la migración y los procesos de mezcla ocurridos en el pasado. Particularmente, se ha descrito el SNP M3 como exclusivamente polimórfico en el hemisferio Occidental. El polimorfismo en estudio es una transición C/T, siendo el alelo T de origen pre-colombino más frecuente en las poblaciones nativas de América Central y del Sur. Se infiere que la mutación se originó hace 30.000 años aproximadamente, generando el haplogrupo Q1a3a en alguna de las poblaciones a partir de la cual descienden los americanos (Underhill *et al.*, 1996).

Para el SNP M3 se realizó PCR alelo-específica, utilizando un juego de primers según Underhill *et al.* (1996).

PCR

Para una reacción de PCR de 10µl finales se utilizaron:

- Buffer de reacción TAS 1X (INBIO HIGHWAY®, Argentina)
- 2mM de MgCl₂
- 0,2mM de dNTPs (INBIO HIGHWAY®, Argentina)
- 2,5pmoles de oligonucleótidos
- 0,25U de Taq ADN polimerasa (INBIO HIGHWAY®, Argentina)
- 20ng de ADN molde
- Agua Milli-Q® estéril para completar 10µL por reacción.

Estas concentraciones estándar se utilizaron para las reacciones de prueba de los oligonucleótidos. En el caso de que no amplificaran, aún luego de modificar la Ta del ciclado correspondiente, se ajustaron las reacciones con cambios en las concentraciones de los reactivos.

En todas las reacciones se incluyó un control negativo, un control de digestión para la PCR-RFLP, y un control positivo para ambos alelos en el caso de la PCR alelo-específica.

Se utilizaron termocicladores MPI-02-Evo (Argentina) y Biometra (Alemania).

rs12913832 (HERC2)

-Se utilizaron las concentraciones estándar de los reactivos.

-Condiciones de ciclado:

Desnaturalización inicial: 94°C, 2' 30''

Desnaturalización: 93°C, 45''

Hibridación: 56°C, 1'

Touchdown (T.D.):* descenso de 1°C cada un ciclo hasta 52°C

Extensión: 72°C, 1'

Extensión final: 72°C, 5'

Número de ciclos: 34

*El T.D. tiene por objeto establecer condiciones más estrictas de amplificación durante los primeros ciclos de PCR, a fin de obtener un producto amplificado de alta especificidad y luego, en los ciclos posteriores, las condiciones de hibridación se relajan gradualmente para obtener abundante producto, utilizando como molde al amplificado específico de los primeros ciclos.

rs12203592 (IRF4)

-Concentraciones de los reactivos:

1,75mM de MgCl₂

4,0pmoles de oligonucleótidos

3U de ADN polimerasa.

-Condiciones de ciclado:

Desnaturalización inicial: 94°C, 2' 30"

Desnaturalización: 93°C, 45"

Hibridación: 56°C, 50"

Extensión: 72°C, 55"

Extensión final: 72°C, 5'

Número de ciclos: 34

rs12896399 (SLC24A4)

-Concentraciones estándar de los reactivos, a excepción del siguiente:

1,75mM de MgCl₂

-Condiciones de ciclado:

Desnaturalización inicial: 94°C, 2' 30"

Desnaturalización: 93°C, 45"

Hibridación: 63°C, 50"

T.D.: descenso de 1°C cada un ciclo hasta 60°C.

Extensión: 72°C, 55"

Extensión final: 72°C, 5'

Número de ciclos: 34

rs16891982 (SLC45A2)

-Concentraciones estándar de los reactivos.

-Condiciones de ciclado:

Desnaturalización inicial: 94°C, 2' 30"

Desnaturalización: 93°C, 45"

Hibridación: 56°C, 1'

Extensión: 72°C, 1'

Extensión final: 72°C, 5'

Número de ciclos: 34

rs1393350 (TYR)

-Concentraciones estándar de los reactivos.

-Condiciones de ciclado:

Desnaturalización inicial: 94°C, 2' 30"

Desnaturalización: 93°C, 45"

Hibridación: 56°C, 50"

Extensión: 72°C, 55"

Extensión final: 72°C, 5'

Número de ciclos: 34

M3 (DYS199)

-Concentraciones estándar de los reactivos.

-Condiciones de ciclado:

Desnaturalización inicial: 94°C, 2' 30"

Desnaturalización: 93°C, 45"

Hibridación: 62°C, 50"

T.D.: descenso de 1°C cada dos ciclos hasta 57°C.

Extensión: 72°C, 55"

Extensión final: 72°C, 5'

Número de ciclos: 34

Electroforesis en gel de agarosa 1,8%

Se utilizó esta técnica para visualizar los resultados de la PCR. La agarosa (Promega, USA) se disolvió en *buffer* TAE 1X (Tris, acetato, EDTA, pH: 8) y se volcó en moldes adecuados para luego permitir que gelifique. Se usaron cubas de acrílico (MPI, La Plata) con *buffer* TAE 1X. Para la siembra se utilizó 1µL de *buffer* de carga (0,25% de xileno-cianol –XC-, 0,25% de azul de bromofenol –ABF- y 30% de glicerol en agua, Sambrook *et al.*, 1989). En el *buffer* de carga se incorporó también el colorante GelRed™ (Biotium, USA), que fluoresce a la luz UV cuando se intercala con el ADN. Para estimar el tamaño de los fragmentos obtenidos, se sembraron simultáneamente en el gel 2µL de la escalera 100-MARKER® (Biodynamics) u otros fragmentos de ADN de longitud conocida.

La corrida electroforética se llevó a cabo a 100V durante 2 minutos y luego a 85V.

Se utilizó el sistema Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad Laboratories) para visualizar las bandas y registrar imágenes de los geles.

Digestión enzimática

Para el polimorfismo rs12913832 se utilizó la enzima *DdeI* (New England Biolabs, USA). Cada reacción de 16µL finales consistió de:

- Buffer* CutSmart® 1X (acetato de potasio 50mM, Tris-acetato 20mM, acetato de magnesio 10mM, albúmina sérica bovina –BSA- 100µg/ml, pH: 7.9; New England Biolabs, USA)
- 3,2 U de enzima de restricción
- aproximadamente 100ng de muestra
- cantidad suficiente de agua Milli-Q® para completar 16µL.

Para el polimorfismo rs16891982 se utilizó la enzima *HinfI* (Promega, USA). Cada reacción de 16µL finales consistía de:

- 1,6µL de *buffer* B® 10X (Tris-HCl 60mM, NaCl 500mM, DIT 10mM, AgCl₂ 60mM, pH: 7,5. Promega)
- 0,16µL de BSA
- 3,5U de enzima de restricción
- aproximadamente 100ng de muestra
- Agua Milli-Q®, c.s.p. 16µL

En ambos casos, las reacciones se incubaron *overnight* en un baño térmico a 37°C.

Electroforesis en gel de poliacrilamida neutra 8%

Este tipo de electroforesis se utilizó para resolver los fragmentos resultantes de la digestión enzimática. Para ello, se preparó el gel con:

- Acrilamida 38%-bisacrilamida 2%
- Buffer* TBE (Tris, ácido bórico 45mM, EDTA 1mM) 10X
- Agua destilada
- Persulfato como iniciador de la polimerización
- Tetrametiletilendiamina (TEMED) como catalizador de la polimerización.

Se agregaron 2µL del *buffer* de carga anteriormente mencionado sin GelRed™ a los tubos con el producto de digestión y se sembraron 5 ó 6µL, luego de una precorrida del gel de 15 minutos a 230V. También se sembraron 2µL de *escalera* en el mismo gel (o controles de tamaño conocido). La corrida electroforética se realizó a 250V con *buffer* TBE 0,5X en una cuba vertical de acrílico (duración aproximada: 1 hora y media). En algunos casos se realizaron siembras dobles.

La tinción se realizó durante 10 minutos con solución de GelRed™ (80mL de *buffer* TBE 0,5X con 5µL de GelRed™) y las bandas se visualizaron y registraron con el sistema Gel Doc™ XR+.

Cálculos estadísticos

Frecuencias alélicas y genotípicas

Las frecuencias alélicas de cada marcador se calcularon por separado para cada grupo: personas de ojos azules y personas de ojos marrones, y luego para la población total. El cálculo de frecuencias alélicas (*Pi*) se efectuó con la fórmula:

$$P_i = n_i/T$$

donde n_i es el número de alelos i observados en la población y T es la cantidad total de alelos observados para un locus determinado.

Las frecuencias genotípicas (P_{ij}) corresponden a las proporciones de los distintos genotipos de un locus en una población. Para calcularlas, se contabilizaron los diferentes genotipos hallados en la población y se usó la fórmula:

$$P_{ij} = n_{ij}/N$$

donde n_{ij} es la cantidad de veces que se observa el genotipo con alelos i y j en la población y N es el número de individuos de la población.

El desvío estándar (σ) de las frecuencias alélicas es una medida de la desviación típica de la distribución de muestreo. Se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\sigma = \sqrt{[P_i(1 - P_i)] / (2N)}$$

Para las frecuencias genotípicas se utilizó la fórmula:

$$\sigma = \sqrt{[P_{ij}(1 - P_{ij})] / (N)}$$

Equilibrio de Hardy-Weinberg

Para evaluar si la población se encontraba en equilibrio, se compararon las heterocigosis observada y esperada mediante el test exacto (cadenas de Markov) utilizando el programa Arlequín 3.5 (Schneider *et al.*, 2000).

A grandes rasgos, a partir de los datos de la población en estudio, se calcularon los valores esperados para cada genotipo:

$$\text{Esp}(AA) = p^2n$$

$$\text{Esp}(Aa) = 2pqn$$

$$\text{Esp}(aa) = q^2n$$

siendo n el número total de individuos de la población. Estos valores se compararon con los números observados en la población por medio de la prueba χ^2 de Pearson:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

siendo O el valor observado y E el valor esperado de cada genotipo. Para grados de libertad = número de genotipos - número de alelos = $3 - 2 = 1$, el nivel de significancia de tabla es 3,84; si el valor de χ^2 es menor a 3,84 puede decirse con un porcentaje de confianza del 95% que la población se encuentra en equilibrio.

Diversidad nucleotídica

Es el número promedio de diferencias por sitio entre secuencias tomadas a pares. Se utilizó el programa Arlequín 3.5 (Schneider *et al.*, 2000) para calcularla.

Heterocigosis observada (H_o)

Es la frecuencia del genotipo heterocigota en la población en estudio. Se utilizó el programa Arlequín 3.5 (Schneider *et al.*, 2000) para calcularla. La media se calculó como la suma de las heterocigosis observadas de cada marcador dividido el total de marcadores. La desviación estándar se calculó como la sumatoria de cada heterocigosis observada menos la heterocigosis media, dividido el número de marcadores.

Heterocigosis esperada (H_e)

Se calculó según la ley de Hardy-Weinberg, como

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

siendo k el número de alelos para un locus y p las frecuencias de cada alelo.

AMOVA (Análisis de Varianza Molecular)

Es un análisis estadístico que permite determinar la variación genética dentro y entre las poblaciones o grupos de poblaciones elegidos (Excoffier *et al.*, 1992). Se utilizó el programa Arlequín 3.5 (Schneider *et al.*, 2000) para calcularlo.

Fst o índice de Wright

Este valor mide el grado de diferenciación o distancia genética entre poblaciones. Puede variar de 0 a 1; a mayor valor, más diferentes son genéticamente dos poblaciones en base a los datos. Se calculó el valor de Fst para cada par de poblaciones con el programa Arlequín 3.5 (Schneider *et al.*, 2000).

Fis

Es un valor que mide el grado de endogamia en una población. Mientras menor sea la heterocigosis observada respecto de la esperada, más cercano a 1 será este valor y habrá más indicios de endogamia en la muestra analizada (Hedrick, 2000). Se calculó como:

$$Fis = 1 - (H_o/H_e)$$

Resultados

rs12913832

Al realizar la PCR con los primers que flanquean el sitio de este polimorfismo, se obtuvo un fragmento de 225pb (figuras 13 y 14). La digestión con la enzima *Ddel* permitió discernir entre los siguientes genotipos (figura 15):

- sólo una banda de 225pb (fragmento no digerido): homocigota A,
- sólo una banda de 203pb (fragmento digerido): homocigota G,
- una banda de 225pb y una banda de 203pb: heterocigota AG.

En los casos donde hubo digestión enzimática, el fragmento más pequeño, de 22pb, no pudo ser visualizado en el gel de poliacrilamida porque su rápida migración a través del mismo no lo permitió.

CCAGTTTCATTTGAGCAcTAARTGTCAAGTTCTGCACGCTATCATCATCAGGGGCCGAGGC
TTCTCTTTGTTTTAATTAATTGTTTTAACTGTGAGTTTATATACACTTGAAGCAGTATACA
TTTAGAAATGGTCTACTTGTCGTTTCTTTGATTACTACCCATGAGACAGTATTAGTAATTCT
GGCCTATGAAATTGGCAAAGGAAAACTACCAGTGGTGGGG

Figura 13. Secuencia del fragmento amplificado. En negrita y subrayado se marcan las regiones de hibridación de los oligonucleótidos. R: A ó G. Se resalta en gris el sitio de restricción de la enzima.

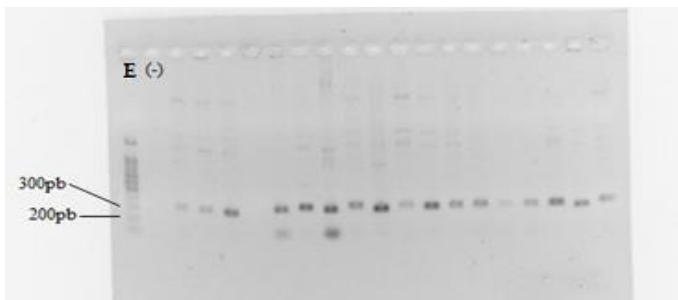


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de rs12913832. E: Escalera 100pb. (-): Control negativo.

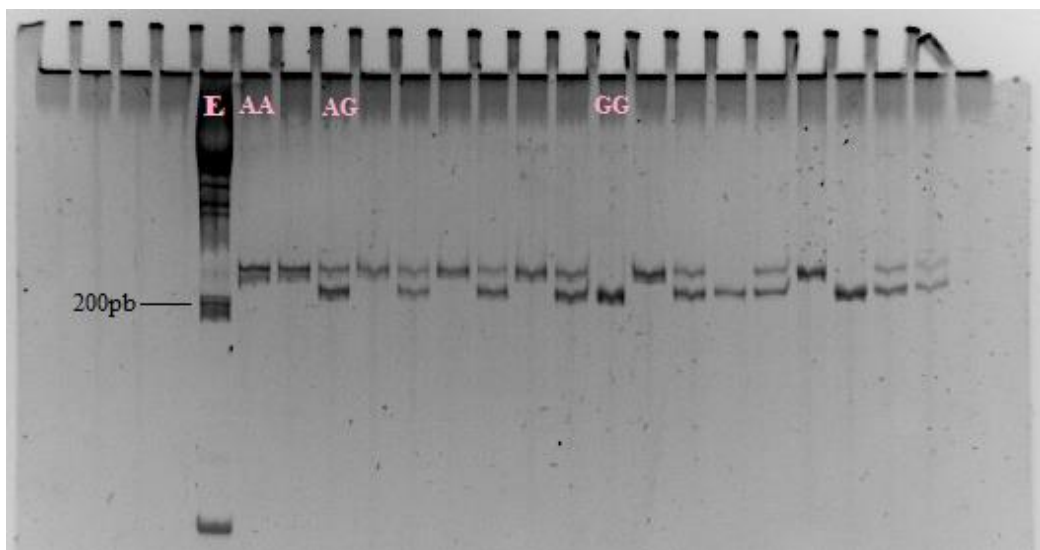


Figura 15. Electroforesis en gel de poliacrilamida de rs12913832. E: Escalera 100pb.

Frecuencias alélicas y genotípicas

En la población analizada se obtuvieron las siguientes frecuencias alélicas y genotípicas para este marcador (tablas 3 y 4).

Alelo	Ojos azules (n=23)	Ojos marrones (n=92)	Frecuencia poblacional (n=115)
A	0,08696±0,04154	0,72283±0,03299	0,59565±0,03236
G	0,91304±0,04154	0,27717±0,03299	0,40435±0,03236

Tabla 3. Frecuencias alélicas con sus desvíos estándar para rs12913832. n: tamaño muestral.

Genotipo	Ojos azules (n=23)	Ojos marrones (n=92)	Frecuencia poblacional (n=115)
AA	0,0000±0,0000	0,47826±0,05207	0,38261±0,04532
AG	0,17391±0,07903	0,48913±0,05212	0,42609±0,04611
GG	0,82608±0,07903	0,03261±0,01851	0,19130±0,03668

Tabla 4. Frecuencias genotípicas con sus desvíos estándar para el marcador rs12913832. n: tamaño muestral.

Se puede observar una relación de este marcador con los colores de ojos azul y marrón. El alelo G es mucho más frecuente en los individuos de ojos azules y el alelo A se observa con mayor frecuencia en las muestras de individuos de ojos marrones. A su vez, el genotipo AA sólo se presentó en los individuos de ojos marrones, el genotipo GG con mayor frecuencia en los de ojos azules y el genotipo AG presenta mayor prevalencia en los individuos de ojos marrones.

Para este marcador, la heterocigosis esperada en la población bonaerense fue de 0,48380 y la heterocigosis observada fue de 0,42609 (tabla 13).

Este marcador se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0,24266\pm 0,00040$) (tabla 13).

rs12203592

Los resultados de cada individuo para este marcador se determinaron como presencia o ausencia de la banda de 102pb para cada alelo (figura 16), es decir, el ADN de los homocigotas se amplificó sólo en la reacción de PCR específica para un alelo, mientras que el de los heterocigotas se amplificó en ambas reacciones (figura 17).

ACAGGGCAGCTGATCTCTTCAGGCTTTCTTGATGTGAATGACAGCTTTGTTTCATCCACTT
TGGTGGGTAAAAGAAGGYAAATCCCTGTGGTACTTTGG

Figura 16. Secuencia del fragmento amplificado. En negrita y subrayado se marcan las regiones de hibridación de los oligonucleótidos sin incluir la base cambiada en los *reverse*. Y: C ó T.

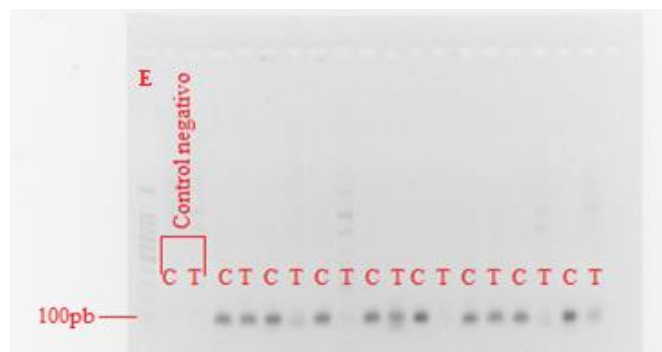


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa de rs12203592. E: Escalera 100pb.

Frecuencias alélicas y genotípicas

En la población analizada se obtuvieron las siguientes frecuencias alélicas y genotípicas para este marcador (tablas 5 y 6).

Alelos	Ojos azules (n=23)	Ojos marrones (n=92)	Frecuencia poblacional (n=115)
C	0,86957±0,04966	0,91304±0,02077	0,90435±0,01939
T	0,13043±0,04966	0,08696±0,02077	0,09565±0,01939

Tabla 5. Frecuencias alélicas con sus desvíos estándar para rs12203592. n: tamaño muestral.

Genotipo	Ojos azules (n=23)	Ojos marrones (n=92)	Frecuencia poblacional (n=115)
CC	0,78261±0,08601	0,84783±0,03745	0,83478±0,03463
CT	0,17391±0,07903	0,13043±0,03511	0,13913±0,03227
TT	0,04348±0,04252	0,02174±0,01520	0,02609±0,01486

Tabla 6. Frecuencias genotípicas con sus desvíos estándar para rs12203592. n: tamaño muestral.

Las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas para este marcador no permiten definir una relación con el color de los ojos. Se ve una leve tendencia del genotipo homocigota C a presentarse con mayor frecuencia en los individuos con ojos marrones y del heterocigota a presentarse en los de ojos azules más frecuentemente. Puede observarse una mayor frecuencia del alelo C, la cual se ve reflejada a su vez en una alta frecuencia de homocigotas C en esta población.

Para este marcador, la heterocigosis esperada en la población bonaerense fue de 0,17376 y la heterocigosis observada fue de 0,13913 (tabla 13).

Este marcador se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0,06264\pm0,00025$) (tabla 13).

rs12896399

Los resultados de cada individuo para este marcador se determinaron como presencia o ausencia de la banda de 105pb para cada alelo (figuras 18 y 19).

TCTTTAGGTCAGTATATTTTGGGKTCTCTTTGTACACAGCAGATTAACCTTCCTCATCAATA
CAACATCAAGACCCAGGGCTAAGTACTGGGTCTCACACAGGGTC

Figura 18. Secuencia del fragmento amplificado. En negrita y subrayado se marcan las regiones de hibridación de los oligonucleótidos sin incluir la base cambiada en los *forward*. K: G ó T.

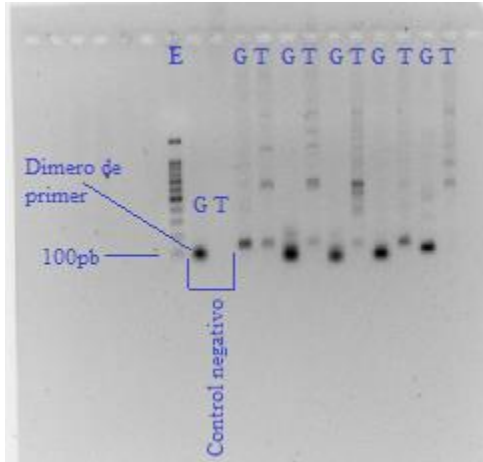


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa de rs12896399. E: Escalera 100pb.

Frecuencias alélicas y genotípicas

En la población analizada se obtuvieron las siguientes frecuencias alélicas y genotípicas para este marcador (tablas 7 y 8).

Alelos	Ojos azules (n=21)	Ojos marrones (n=81)	Frecuencia total (n=102)
G	0,61905±0,07493	0,67901±0,03668	0,66667±0,03300
T	0,38095±0,07493	0,32099±0,03668	0,33333±0,03300

Tabla 7. Frecuencias alélicas con sus desvíos estándar para rs12896399. n: tamaño muestral.

Genotipo	Ojos azules (n=21)	Ojos marrones (n=81)	Frecuencia poblacional (n=102)
GG	0,47619±0,10899	0,46914±0,05545	0,47059±0,04942
GT	0,28571±0,09858	0,41975±0,05484	0,39216±0,04834211
TT	0,23810±0,09294	0,11111±0,03492	0,13725±0,03407259

Tabla 8. Frecuencias genotípicas con sus desvíos estándar para rs12896399. n: tamaño muestral.

Se denota una tendencia leve del alelo G a estar más presente en los individuos de ojos marrones y del alelo T en los de ojos azules. Los datos genotípicos indican una tendencia del genotipo homocigota T a encontrarse más presente entre los individuos de ojos azules y del heterocigota entre los de color marrón. En el genotipo restante no se observa este tipo de tendencia. Puede observarse una mayor frecuencia del alelo G, la cual se ve reflejada a su vez en una alta frecuencia de homocigotas G en esta población.

Para este marcador, la heterocigosis esperada en la población bonaerense fue de 0,44663 y la heterocigosis observada fue de 0,39216, (tabla 13).

Este marcador se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0,26476\pm 0,00044$) (tabla 13).

rs16891982

La PCR llevada a cabo para este marcador dio como resultado un fragmento de 188pb (figuras 20 y 21). Luego de digerir con la enzima *HinfI*, se pudo diferenciar entre los siguientes genotipos (figura 22):

-banda de 160pb (fragmento digerido en un sitio del amplicón): homocigota C

-banda de 140pb (fragmento digerido en un sitio del amplicón y en la zona del polimorfismo): homocigota G

-una banda de 160pb y una de 140pb: heterocigota CG.

Los fragmentos de 28pb y 20pb no pudieron visualizarse en el gel de poliacrilamida ya que eran muy pequeños.

TTTCCTGACGTCCATAGATT**TATTAAGAATCTGGTATTTTAAACAGTAGGAAATACACA**
TAGAAATATCAAATCCAAGTTGTGCTAGACCAGAACTTTTAGAAGACATCCTTAGGAGAG
AGAAAGACTTACAAGAATAAAGTGAGGAAAACACGGAGTTGATGCA**SAAtCCCAACATC**
CAACCTC

Figura 20. Secuencia del fragmento amplificado. En negrita y subrayado se marcan las regiones de hibridación de los oligonucleótidos. S: C ó G. Se resaltan en gris los sitios de restricción de la enzima.



Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa de rs16891982. (-): Control negativo. S: Control de tamaño.

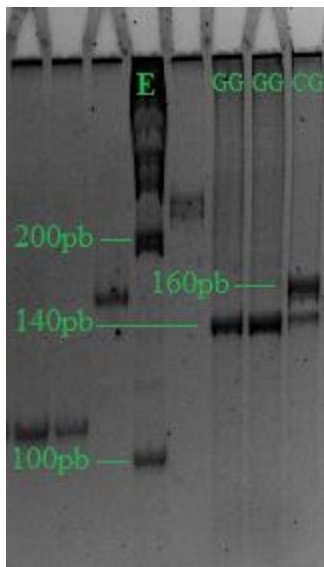


Figura 22. Electroforesis en gel de poliacrilamida de rs16891982. E: Escalera 100pb.

Frecuencias alélicas y genotípicas

En la población analizada se obtuvieron las siguientes frecuencias alélicas y genotípicas para este marcador (tablas 9 y 10).

Alelo	Ojos azules (n=23)	Ojos marrones (n=91)	Frecuencia poblacional (n=114)
C	0,15217±0,05296	0,20879± 0,03013	0,19737± 0,02636
G	0,84783±0,05296	0,79121± 0,03013	0,80263± 0,02636

Tabla 9. Frecuencias alélicas con sus desvíos estándar para rs16891982. n: tamaño muestral.

Genotipo	Ojos azules (n=23)	Ojos marrones (n=91)	Frecuencia poblacional (n=114)
CC	0,00000±0,00000	0,04396±0,02149	0,03509±0,01723
CG	0,30435±0,09594	0,32967±0,04928	0,32456±0,04385
GG	0,69565±0,09594	0,62637±0,05071	0,64035±0,04495

Tabla 10. Frecuencias genotípicas con sus desvíos estándar para rs16891982. n: tamaño muestral.

Estos datos no muestran una relación de los alelos ni de los genotipos de este marcador con los colores de ojos. Puede verse una leve tendencia del genotipo homocigota G a estar más presente en los individuos con color de ojos azul. Se observa una frecuencia muy baja del alelo C, lo cual se ve reflejado en la frecuencia genotípica de homocigotas C y heterocigotas. Para este marcador, la heterocigosis esperada en la población bonaerense fue de 0,31822 y la heterocigosis observada fue de 0,32456 (tabla 13). Este marcador se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=1,00000\pm 0,00000$) (tabla 13).

rs1393350

Los resultados de cada individuo para este marcador se determinaron como presencia o ausencia de la banda de 168pb para cada alelo (figuras 23 y 24).

CAGTCCCTTCTCTGCAAC**RAATTCTGTGTGGTCTTTTACAAATGATAATCTGTTCGTGTTA**
TCATTCACCTTCCCAGATACAAACAGTGACTTTCTGTTAGGAAAAAACACAAATCTCCCT
AACATGGCCTCTGCTACCCTTCATGATTTGGCCTCAGTTCACCTTC

Figura 23. Secuencia del fragmento amplificado. En negrita y subrayado se marcan las regiones de hibridación de los oligonucleótidos sin incluir la base cambiada en los *forward*. R: A ó G

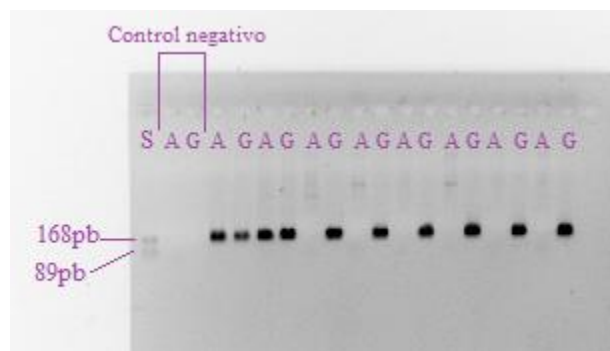


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa de rs1393350. S: Control de tamaño.

Frecuencias alélicas y genotípicas

En la población analizada se obtuvieron las siguientes frecuencias alélicas y genotípicas para este marcador (tablas 11 y 12).

Alelos	Ojos azules (n=23)	Ojos marrones (n=91)	Frecuencia poblacional (n=114)
A	0,32609±0,06912	0,20879±0,03013	0,23246±0,02797
G	0,67391±0,06912	0,79121±0,03013	0,76754±0,02797

Tabla 11. Frecuencias alélicas con sus desvíos estándar para rs1393350. n: tamaño muestral.

Genotipo	Ojos azules (n=23)	Ojos marrones (n=91)	Frecuencia poblacional (n=114)
AA	0,08696±0,05875	0,07692±0,02793	0,07895±0,02526
AG	0,47826±0,10416	0,26374±0,04619	0,30702±0,04320
GG	0,43478±0,10337	0,65934±0,04968	0,61403±0,04560

Tabla 12. Frecuencias genotípicas con sus desvíos estándar para rs1393350. n: tamaño muestral.

Las frecuencias alélicas de este marcador permiten definir una relación con el color de los ojos, ya que el alelo A es más frecuente en los individuos de ojos azules y el alelo G lo es en los de ojos marrones. Puede observarse también una relación entre los genotipos y este fenotipo, debido a que es más frecuente el homocigota G en el caso de los ojos marrones y el heterocigota en los individuos de ojos azules. La frecuencia de homocigotas A es baja para ambos fenotipos.

Para este marcador, la heterocigosis esperada en la población bonaerense fue de 0,35841 y la heterocigosis observada fue de 0,30702 (tabla13).

Este marcador se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0,18646\pm0,00041$) (tabla13).

M3

Los resultados de cada individuo varón para este marcador se determinaron como presencia o ausencia de la banda de 201pb para cada alelo (figuras 35 y 36).

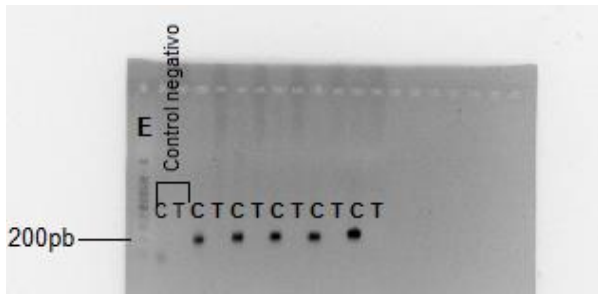


Figura 35. Electroforesis en gel de agarosa de M3. E: Escalera 100pb.

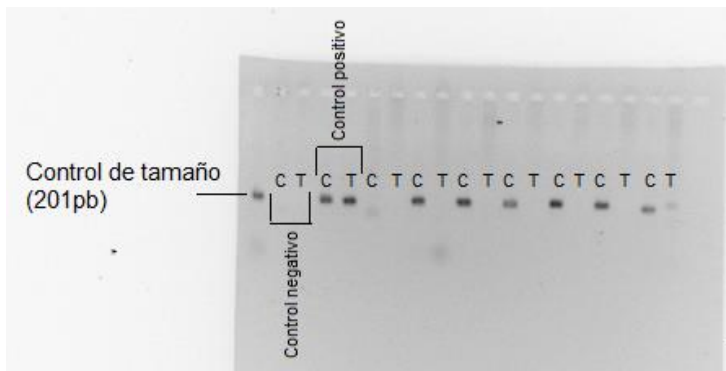


Figura 36. Electroforesis en gel de agarosa de M3. Los controles positivos corresponden a dos individuos diferentes.

Frecuencia alélica

En la población analizada, la frecuencia del alelo T fue de $0,021 \pm 0,021$ (sólo un individuo de 48 varones analizados).

Resultados para todos los marcadores relacionados al color de ojos

La diversidad nucleotídica fue de $0,330615 \pm 0,228683$.

Se observó una asociación alélica significativa entre los polimorfismos rs16891982 y rs1393350.

La heterocigosis media esperada fue de $33,35\% \pm 35,74\%$, teniendo en cuenta los cinco marcadores en conjunto.

La heterocigosis media observada fue de $31,78\% \pm 0,008\%$ teniendo en cuenta todos los marcadores.

Fis

Se calcularon los valores de Fis (tabla 13) con la fórmula descripta. Con Arlequín se obtuvo un valor de Fis general de la población igual a $0,08069$ con un valor P de $0,052786$.

Marcador (<i>GEN</i>)	Ho	He	Valor P	Fis
rs12913832 (<i>HERC2</i>)	0,42609	0,4838	$0,24266 \pm 0,00040$	0,11928483
rs12203592 (<i>IRF4</i>)	0,13913	0,17376	$0,06264 \pm 0,00025$	0,19929788
rs12896399 (<i>SLC24A4</i>)	0,39216	0,44663	$0,26476 \pm 0,00044$	0,12195777
rs16891982 (<i>SLC45A2</i>)	0,32456	0,31822	$1,00000 \pm 0,00000$	-0,01992332
rs1393350 (<i>TYR</i>)	0,30702	0,35841	$0,18646 \pm 0,00041$	0,14338328

Tabla 13. Valores de heterocigosis observada (Ho) y esperada (He), ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg (P) y valores de Fis de la población bonaerense para cada marcador.

Relación entre el color del iris y el sexo

Del total de individuos:

- 52 son mujeres con ojos marrones
- 16 son mujeres con ojos azules
- 40 son hombres con ojos marrones
- 7 son hombres con ojos azules.

Aplicando un Chi-cuadrado con corrección de Yates para estos datos, el resultado es de $0,811$ con un $p=0,367$, no significativo, es decir que no puede afirmarse que hay una asociación entre el sexo de los individuos y el color del iris

Comparación entre poblaciones

Heterocigosis esperada

Locus	Buenos Aires	África	América	Asia del Este	Europa	Media	Heterocigosis total
HERC2	0,48380	0,00000	0,20138	0,01728	0,50111	0,24401± 0,21755	0,30867
IRF4	0,17376	0,00000	0,00000	0,00435	0,15236	0,05771± 0,08209	0,05771
SLC24A4	0,44663	0,04805	0,37409	0,41196	0,44666	0,35648 ± 0,15349	0,39153
SLC45A2	0,31822	0,00000	0,10708	0,07134	0,23058	0,18320 ± 0,14696	0,37317
TYR	0,35841	0,01951	0,00000	0,01728	0,40582	0,15643± 0,18217	0,18067

Tabla 14. Heterocigosis esperada y heterocigosis media con su respectiva desviación estándar. Exceptuando los resultados de Buenos Aires, los datos pertenecen a Walsh, Liu *et al.* (2011).

AMOVA

Al comparar la población de Buenos Aires con otras poblaciones del mundo (Walsh, Liu, *et al.*, 2011), se obtuvieron los siguientes resultados según el agrupamiento dado.

Grupo 1: Buenos Aires, América y Europa (tabla 15).

Grupo 2: Buenos Aires y Europa (tabla 16).

Grupo 3: Buenos Aires y América (tabla 17).

Fuente de la variación	d.f.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	1	79,232	0,07258	7,92
Entre poblaciones dentro de los grupos	2	114,002	0,26225	28,63
Dentro de las poblaciones	874	507,956	0,58118	63,45
Total	877	701,189	0,91601	100

Tabla 15. Resultados del AMOVA para el grupo 1 comparado con África. $p=0,3596$

Fuente de la variación	d.f.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	1	54,250	0,06817	6,55
Entre poblaciones dentro de los grupos	1	59,751	0,22596	21,71
Dentro de las poblaciones	671	501,098	0,74679	71,74
Total	673	615,099	1,04093	100

Tabla 16. Resultados del AMOVA para el grupo 2 comparado con América. $p=0,5150$

Fuente de la variación	d.f.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	1	98,381	0,22816	21,53
Entre poblaciones dentro de los grupos	1	15,621	0,08471	7,99
Dentro de las poblaciones	671	501,098	0,74679	70,47
Total	673	615,099	1,05966	100

Tabla 17. Resultados del AMOVA para el grupo 3 comparado con Europa. $p= 0,2414$

Los resultados de la tabla 15 se obtuvieron al comparar el grupo 1 con la población africana, siendo esta última filogenéticamente distante (y, por ende, muy distinta) de las poblaciones americana, europea y bonaerense por ser una más antigua.

En la tabla 16 se observa una disminución del porcentaje de variación entre grupos respecto a los datos de la tabla 15.

En la tabla 17 se ve un aumento en el porcentaje de la variación entre grupos respecto a los datos de la tabla 16.

Como se indica en las leyendas de las tablas, los valores de AMOVA no fueron significativos ($p>0,05$).

Fst

Los valores de Fst se muestran en la tabla 18. De acuerdo con los resultados obtenidos, la población bonaerense se diferencia claramente de otras poblaciones del mundo en la variación de los polimorfismos analizados.

	Buenos Aires	África	América	Europa	Asia del Este
Buenos Aires	0,00000 p=0,0000 0				
África	0,28325 p=0,0000 0	0,00000 p=0,00000			
América	0,11629 p=0,0000 0	0,16536 p=0,00000	0,00000 p=0,00000		
Europa	0,20880 p=0,0000 0	0,52826 p=0,00000	0,39329 p=0,00000	0,00000 p=0,00000	
Asia del Este	0,21005 p=0,0000 0	0,15482 p=0,00000	0,01842 p=0,01802	0,50612 p=0,00000	0,00000 p=0,00000

Tabla 18. Valores de Fst entre distintas poblaciones del mundo, con sus respectivos valores p. Cuando $p < 0,05$, el valor de Fst es significativo. Exceptuando los resultados de Buenos Aires (este trabajo), los datos pertenecen a Walsh, Liu *et al.* (2011).

Discusión

El color de los ojos es un carácter poligénico, lo que hace que la determinación de este fenotipo a partir del genotipo requiera del análisis de varios genes. En este estudio se analizaron cinco polimorfismos ubicados en distintos genes que han sido relacionados al color de los ojos por varios autores y que ya se han analizados en otras poblaciones distintas a la estudiada en este trabajo. De hecho, no hay estudios realizados en nuestro país sobre la relación entre el genotipo y esta característica fenotípica. Resulta importante este tipo de análisis para conocer la diferencia entre las frecuencias alélicas y genotípicas de los marcadores entre poblaciones, la posibilidad o no de aplicar los mismos criterios en la predicción del color del iris en distintas poblaciones a partir de datos genotípicos y la relevancia de los marcadores incluidos en su relación con el color del iris en el grupo estudiado, entre otras cuestiones.

Los cinco polimorfismos analizados en este trabajo (rs12913832, rs12896399, rs12203592, rs16891982 y rs1393350) se encuentran dentro de los primeros seis marcadores más importantes para la predicción del color del iris de un individuo a partir de datos genotípicos (Ruiz *et al.*, 2013).

Respecto al polimorfismo rs12913832 ubicado en el intrón 86 del gen *HERC2*, encontramos en la población bonaerense que el alelo A es más frecuente en individuos de ojos marrones y el alelo G en individuos de ojos azules, lo que se corresponde con los resultados de otras poblaciones, donde resultó estar asociado el alelo A a los ojos no azules y el alelo G a ojos no marrones (Beleza *et al.*, 2013; Sturm *et al.*, 2008; Sturm y Duffy, 2012; Liu *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2013; Hart *et al.*, 2013; Wilde *et al.*, 2014; Draus-Barini *et al.*, 2013; Valenzuela *et al.*, 2010; Lim y Oh, 2013; Kastelic *et al.*, 2013; Kastelic y Drobnič, 2012; Walsh, Lindenbergh *et al.*, 2011; Walsh, Liu *et al.*, 2011; Walsh *et al.* 2012; Eiberg *et al.*, 2008; Nan *et al.*, 2009; Mengel-From *et al.*, 2009; Spichenok *et al.*, 2011).

El alelo G resultó ser menos frecuente en nuestra población que en la población europea (frecuencia de 0,79 según Beleza *et al.* 2013, 0,71 según Wilde *et al.* 2014). Esto puede deberse a la variada composición étnica de la población bonaerense, ya que en la población africana este alelo no está presente (frecuencia igual a 0) según estos mismos autores.

El genotipo homocigota G asociado a los ojos azules y el heterocigota, están casi exclusivamente restringidos a Europa y Asia Occidental, donde se espera que el color del iris sea principalmente azul e intermedio. Por otro lado, el genotipo homocigota A asociado a los ojos marrones se observa en todos los lugares del mundo y es casi el único presente en Oceanía, Asia Oriental y África sub-Sahariana, donde se espera que la población tenga color de ojos marrón en su mayoría (Walsh, Liu, *et al.* 2011). En nuestra población las frecuencias más altas fueron para el genotipo homocigota A y el heterocigota, ya que hay una mayor presencia de color de ojos marrón. Sin embargo se observa una frecuencia significativa del genotipo homocigota G ya que el color azul también está presente debido al aporte migratorio desde otras partes del mundo, principalmente Europa.

Debemos tener en cuenta que en la población analizada el número de individuos con ojos azules es menor que el de individuos de ojos marrones.

Respecto al polimorfismo rs12203592 del gen *IRF4*, se ha encontrado una asociación del alelo T con el color de ojos azul (Praetorius *et al.*, 2013). En este trabajo no se encontró una relación clara debido a la baja frecuencia del alelo T en la muestra, a pesar de denotarse una leve tendencia.

Según Walsh *et al.* (2012), el genotipo CC se asocia al color marrón y el genotipo homocigota T es más frecuente en los individuos de ojos azules. Nuevamente, en nuestra población no hemos visto esta relación, sino una tendencia leve del homocigota C a estar más presente en los casos de ojos marrones y del heterocigota en encontrarse más frecuentemente en los individuos de ojos azules.

La frecuencia global del alelo T es de 0,0367, menor que en nuestra población.

En un estudio realizado con seis poblaciones europeas (Ruiz *et al.*, 2013), este marcador no fue considerado un buen predictor del color de los ojos, debido a la baja frecuencia del alelo derivado. Esto pone en evidencia la importancia de examinar cada población en particular a la hora de utilizar los marcadores estudiados como base de la predicción del color del iris de los individuos, principalmente cuando no se trata de polimorfismos con una asociación alélica o genotípica muy marcada con dicho fenotipo.

En nuestros resultados se observó una caída de la heterocigosis observada respecto de la esperada para este marcador; a ello se debe el valor P bajo en el análisis de Hardy-Weinberg.

El polimorfismo rs12896399 de *SLC24A4* muestra una frecuencia levemente mayor del alelo G en individuos con ojos marrones y del alelo T en aquellos de ojos azules, tal como se ha visto en otros trabajos (Hart *et al.*, 2013; Sulem *et al.*, 2007; Martínez-Cadenas *et al.*, 2013). A su vez, el genotipo heterocigota se mostró más frecuente en el caso de los ojos marrones, mientras que el homocigota T se vio más en los ojos azules. Sin embargo, el genotipo homocigota G no presentó diferencia entre su frecuencia respecto de un color o el otro.

Este polimorfismo presenta, en Europa, una frecuencia del alelo T de 0,57 según Lim y Oh (2013) o 0,60 según Sulem *et al.* (2007), y una frecuencia global mucho más baja, de 0,2608. En la población española el alelo G es el más común, con una frecuencia de 0,66 (Martínez-Cadenas *et al.*, 2013). En nuestra población, el alelo G resultó el más frecuente, como en la

población española. El alelo T en la población bonaerense tiene una frecuencia similar a la global previamente informada. Esto puede deberse a la diversidad de nuestra población.

El polimorfismo rs16891982 perteneciente al gen *SLC45A2* tiene una frecuencia de 0,97 para el alelo G en Europa (Wilde *et al.* 2014). En la población bonaerense se encontró una frecuencia muy alta de este alelo respecto al alelo C. Esto puede explicarse por el aporte genético europeo en nuestra población. A su vez, varios autores lo asociaron a la baja pigmentación (Walsh *et al.* 2012, Wilde *et al.* 2014), lo cual se observa sólo como una tendencia en los resultados obtenidos en este trabajo.

El genotipo homocigota G asociado al color de ojos azul es más frecuente en Europa y Asia Occidental (Walsh, Liu, *et al.* 2011), el homocigota C puede observarse más comúnmente en el resto del mundo, y el heterocigota se encuentra en baja frecuencia según Walsh *et al.* (2011). En nuestra población, la frecuencia del genotipo homocigota G es muy alta y tendiente a estar más presente en los individuos de ojos azules.

Para el polimorfismo rs1393350 del gen *TYR* se observó en nuestra población una alta frecuencia del genotipo homocigota G en individuos con ojos de color marrón, tal como se ha visto en otras poblaciones (Walsh *et al.*, 2012). Sin embargo, los mismos autores han encontrado asociación del genotipo homocigota A con el color de ojos azul, mientras que en este estudio esa relación se da con el genotipo heterocigota. Esto puede deberse a una baja frecuencia del alelo A en nuestra muestra, además de un bajo número de individuos de ojos azules.

La frecuencia global del alelo A es de 0,0793, mucho menor que en nuestra muestra; esto puede deberse a la presencia de componente europeo en nuestra población.

Los resultados obtenidos para M3 indican que dicho haplotipo nativo americano es muy poco frecuente en la población estudiada. Esto es acorde con los antecedentes históricos, ya que las batallas entre los conquistadores y los nativos americanos ocasionaron una reducción importante de varones y una consecuente merma del componente nativo masculino en relación con los valores más altos de ADN mitocondrial que se describen en poblaciones urbanas argentinas (Avena *et al.*, Salas *et al.* 2008).

Es importante aclarar que el color del iris depende en parte de las propiedades de absorción y reflexión de la luz de los componentes extracelulares en el estroma del iris (Prota *et al.*, 1998), siendo esto una posible explicación a la relación poco clara de ciertos polimorfismos con el color de los ojos. Además, en este trabajo no se clasificaron los ojos de color verde como categoría "intermedia", pudiendo esto ser un factor que cause discrepancias con los resultados de algunos autores.

La diversidad nucleotídica presenta una desviación estándar alta porque cada sitio presenta sólo 2 alelos, es decir, son polimorfismos bialélicos.

Ya que los genes en cuestión se encuentran en cromosomas diferentes, la existencia de asociación alélica entre los polimorfismos debe responder a alguna cuestión poblacional. Aunque no puede descartarse un sesgo debido al tamaño muestral, la asociación encontrada entre rs16891982 y rs1393350 podría explicarse por la historia migratoria de nuestra población.

Todos los marcadores se ajustaron al equilibrio de Hardy-Weinberg, demostrando de esta forma que en la población actual de Buenos Aires podría descartarse la ocurrencia de procesos importantes de deriva, selección, migración y endogamia. De hecho, los valores de Fis obtenidos para los marcadores indican que la población no presenta endogamia. En el caso del marcador rs12203592 el valor de Fis de casi 20% se debería a la baja frecuencia del alelo T para este marcador y no a un proceso de endogamia.

El valor de heterocigosis media en bonaerenses deja ver la variación presente en dicha población, siendo el valor muy similar al obtenido para la población europea.

A diferencia de otros estudios (Martínez-Cadenas *et al.*, 2013, 2014), en esta población no se encontró asociación entre el sexo de los individuos y el color del iris. Por el contrario, este resultado concuerda con el presentado por Liu *et al.* (2014).

Las conclusiones que se obtienen a partir del análisis de Fst y Amova se condicen; la población bonaerense analizada es genotípicamente distinta a otras poblaciones del mundo, reafirmando así la importancia de estudiar estos genes en nuestra población, para su aplicación en la identificación de personas en base al color del iris.

En las comparaciones entre poblaciones, la de Buenos Aires resultó más semejante a la población de otros países americanos y en segundo lugar a la población europea. Estos resultados pueden explicarse por los movimientos migratorios transoceánicos ocurridos hasta mitad del siglo XIX y aquellos más recientes desde países limítrofes, como se ha mencionado previamente. Sin embargo, se esperaría que la población bonaerense con la americana fuesen más similares; el resultado obtenido puede deberse a que los autores tomaron datos de Brasil, México y Colombia, países donde hay una menor frecuencia de ojos de color azul que en la provincia de Buenos Aires. Lo mismo se esperaría al comparar con Europa; lo que se obtuvo puede explicarse porque en nuestra población hay aporte nativo y de países limítrofes, además de un posible componente migratorio diferencial, contribuyendo a una tasa de color de ojos marrones mayor a la europea debido al país europeo de origen en este último caso, influyendo esto en las frecuencias alélicas de la población.

La diferenciación hallada entre poblaciones, aún ensayando distintos agrupamientos, se condice con el hecho de que estos marcadores se relacionan con un fenotipo de importante valor adaptativo regional. Particularmente, el porcentaje de variación entre grupos mostrado en el primer análisis indica una diferencia entre las poblaciones presentadas, debiéndose esto a la distancia filogenética existente entre los grupos que se comparan, que se ve atenuada por el hecho de que la población americana en este análisis proviene de países con alto

componente africano. En el segundo análisis se observa una disminución de la variación entre grupos porque no se incluye a la población africana. En el tercer análisis se observa que nuestra población es más similar a la población americana que a la europea, pudiendo deberse al componente nativo que aún se encuentra presente en las poblaciones urbanas de nuestro país.

Por lo expuesto anteriormente, los distintos resultados obtenidos son coherentes entre sí en presentar a la población bonaerense con una identidad diferente de la de otras poblaciones del mundo, remarcando aún más la importancia de analizar la variación de estos genes y su relación con el color del iris en nuestra población en particular.

Conclusiones

- Este es el primer aporte que se realiza en Argentina sobre genética poblacional respecto a genes relacionados con el color de los ojos.
- La población bonaerense es muy diversa en la variación de genotipos relacionados con el color del iris; las frecuencias alélicas y genotípicas de estos marcadores responden a la historia migratoria de nuestro país, la miscegenación y el aporte de la población nativa.
- La población bonaerense se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg para los polimorfismos analizados.
- Genotípicamente, la población es distinta de las poblaciones del mundo con las que se comparó.
- Las relaciones (o tendencias en algunos casos) de cada alelo y genotipo con cierto color de iris es coherente con las asociaciones vistas en otros trabajos para otras poblaciones.
- En nuestra población se encontró que el marcador más importante en la definición del color del iris es el rs12913832, al igual que en otras poblaciones del mundo.
- El color del iris no se encontró asociado al sexo de los individuos.

Bibliografía

- Andrews G. R. (1989). Los afroargentinos de Buenos Aires. Buenos Aires, Ediciones de la Flor.
- Avena S., Goycochea A., Dugoujon J., *et al.* (2001). Análisis Antropogenético de los Aportes Indígena y Africano en Muestras Hospitalarias de la Ciudad de Buenos Aires. *Rev. Argent. Antropol. Biol.*, 3:79-99.
- Avena S. A., Goicochea A. S., Rey J., *et al.* (2006). Mezcla génica en una muestra poblacional de la ciudad de Buenos Aires. *MEDICINA (Buenos Aires)*, 66(2):113-118.
- Avena S., Via M., Ziv E., *et al.* (2012). Heterogeneity in Genetic Admixture across Different Regions of Argentina. *PLoS ONE*, 7(4),e34695.
- Bagú S. 1983. Argentina 1875-1975 - Población, economía, sociedad – Estudio temático y bibliográfico. 2da Edición. Ediciones Solar, 159pp.
- Beleza S., Johnson N. A., Candille S. I., *et al.* (2013). Genetic Architecture of Skin and Eye Color in an African-European Admixed Population. *PLoS Genet*, 9(3):e1003372.
- Corach D., Lao O., Bobillo C., *et al.* (2010). Inferring Continental Ancestry of Argentineans from Autosomal, Y-Chromosomal and Mitochondrial DNA. *Annals of Human Genetics*, 74:65-76.
- Draus-Barini J., Walsh S., Pośpiech E., *et al.* (2013). Bona fide colour: DNA prediction of human eye and hair colour from ancient and contemporary skeletal remains. *Investigative Genetics*, 4:3.
- Eiberg H., Troelsen J., Nielsen M., *et al.* (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. *Hum Genet*, 123:177-187.
- es.wikipedia.org, (2015). *Composición étnica de Argentina*. [online]. Disponible en: https://es.wikipedia.org/wiki/Composici%C3%B3n_%C3%A9tnica_de_Argentina.
- es.wikipedia.org, (2015). *Ley de Hardy-Weinberg*. [online]. Disponible en: https://es.wikipedia.org/wiki/Ley_de_Hardy-Weinberg.
- es.wikipedia.org, (2015). *Melanina*. [online] Disponible en: <https://es.wikipedia.org/wiki/Melanina>.
- es.wikipedia.org, (2015). *Selección Natural*. [online]. Disponible en: https://es.wikipedia.org/wiki/Selecci%C3%B3n_natural.
- Excoffier L., Smouse P. E., Quattro J. M. (1992). Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics*, 131:479-491.
- Fernandes Durso D., Bydlowski S. P., Hutz M. H., *et al.* (2014). Association of Genetic Variants with Self-Assessed Color Categories in Brazilians. *PLoS ONE*, 9(1): e83926.

- Gaudet M., Fara A. G., Beritognolo I., *et al.* (2009). Allele-Specific PCR in SNP Genotyping. Single Nucleotide Polymorphisms. *Methods in Molecular Biology*, 578:415-424.
- Gemmel N., Akiyama S. (1996). An efficient method for the extraction of DNA from vertebrate tissues. *Trends in Genetics*, 12(9):338-339.
- Geneser, Finn. (2000). *Histología sobre bases biomoleculares*, tercera edición. Editorial médica Panamericana.
- Gillespie J. H. (1998). *Population Genetics, A Concise Guide*. The Johns Hopkins University Press.
- Griffiths A. J. F., Miller J. H., Suzuki D. T., *et al.* (2008). *Genética* 9a.ed. Madrid. McGraw-Hill Interamericana.
- Hart K., Kimura S., Mushailov V., *et al.* (2013). Improved eye- and skin-color prediction based on 8 SNPs. *Croat Med J.*, 54:248-56.
- Hedrick P.W. *Genetics of populations*. 2nd. Edition, Jones and Bartlett Publishers, 2000, 551 pp.
- Kastelic V., Drobnič 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. *Croat Med J.*, 53:401-408.
- Kastelic V., Pošpiech E., Draus-Barini J., *et al.* (2013). Prediction of eye color in the Slovenian population using the IrisPlex SNPs. *Croat Med J.*, 54:381-386.
- Keating B., Bansal A. T., Walsh S., *et al.* (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. *Int J Legal Med*, 127:559-572.
- Krebs J., Goldstein E., Kilpatrick, S. (2012). *Lewin. Genes: fundamentos*. Segunda edición. Editorial Médica Panamericana.
- Librogen.com.ar, (2015). *Poblaciones*. [online]. Disponible en: <http://www.librogen.com.ar/poblaciones.htm>.
- Lim J., Oh B. (2013). Allelic Frequencies of 20 Visible Phenotype Variants in the Korean Population. *Genomics Inform*, 11(2):93-96.
- Liu F., Wollstein A., Hysi P. G., *et al.* (2010). Digital Quantification of Human Eye Color Highlights Genetic Association of Three New Loci. *PLoS Genet.*, 6(5): e1000934.
- Marino M., Sala A., Corach D. (2007). Genetic attributes of the YHRD minimal haplotype in 10 provinces of Argentina. *Forensic Science International: Genetics* 1:129–133.
- Martínez Marignac V.L., Bravi C. M., Lahitte H.B., *et al.* (1999). Estudio del ADN mitocondrial de una muestra de la ciudad de La Plata. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 2(1):281-300.
- Martínez-Cadenas C., Peña-Chilet M., Ibarrola-Villava M., *et al.* (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.
- Martínez-Cadenas C., Peña-Chilet M., Llorca-Cardenosa M. J., *et al.* (2014). Gender and eye colour prediction discrepancies: A reply to criticisms. *Letter to the Editor / Forensic Science International: Genetics*, 9:e7-e9.
- Mengel-From J., Wong T. H., Morling N., *et al.* (2009). Genetic determinants of hair and eye colours in the Scottish and Danish populations. *BMC Genetics*, 10:88.
- Meyer W. K., Zhang S., Hayakawa S., *et al.* (2013). The Convergent Evolution of Blue Iris Pigmentation in Primates Took Distinct Molecular Paths. *American Journal of Physical Anthropology*, 151:398-407.

- Mullis K., Faloona F., Scharf S., *et al.* (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 51:263-273.
- Nan H., Kraft P., Hunter D., *et al.* (2009). Genetic variants in pigmentation genes, pigmentary phenotypes, and risk of skin cancer in Caucasians. *Int J Cancer*, 125(4):909-917.
- Ochiai K., Maienschein-Cline M., Simonetti G. *et al.* (2013). Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of IRF4. *Immunity*, 38(5):918-929.
- Parry D., Poulter J., Logan K., *et al.* (2013). Identification of Mutations in SLC24A4, Encoding a Potassium-Dependent Sodium/Calcium Exchanger, as a Cause of Amelogenesis Imperfecta. *The American Journal of Human Genetics*, 92:307-312.
- Praetorius C., Grill C., Stacey S.N., *et al.* (2013). A polymorphism in IRF4 affects human pigmentation through a tyrosinase-dependent MITF/TFAP2A pathway. *Cell*, 155(5):1022-1033.
- Prota G., Hu D., Vincensi M. *et al.* (1998). Characterization of Melanins in Human Irides and Cultured Uveal Melanocytes From Eyes of Different Colors. *Exp. Eye Res.*, 67:293-299.
- Raghavan M., Steinrücken M., Harris K., *et al.* (2015). POPULATION GENETICS. Genomic evidence for the Pleistocene and recent population history of Native Americans. *Science*, 349(6250).
- Ruiz Y., Phillips C., Gomez-Tato A., *et al.* (2013). Further development of forensic eye color predictive tests. *Forensic Science International: Genetics*, 7:28-40.
- Salas A, Jaime JC, Alvarez-Iglesias V, Carracedo A (2008) Gender bias in the multiethnic genetic composition of central Argentina. *J Hum Genet.* 2008;53(7):662-74.
- Schneider S., Roessli D., Excoffier L. (2000). Arlequin: A software for population genetics data analysis. Version 2.000. *Geneva: University of Geneva.*
- Spichenok O., Budimlija Z. M., Mitchell A. A., *et al.* (2011). Prediction of eye and skin color in diverse populations using seven SNPs. *Forensic Science International: Genetics*, 5:472-478.
- Sturm R.A., Frudakis T.N. (2004). Eye colour: portals into pigmentation genes and ancestry. *TRENDS in Genetics*, 20(8):327-332.
- Sturm R., Duffy D., Zhao Z., *et al.* (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.
- Sturm R. A., Duffy D. L. (2012). Human pigmentation genes under environmental selection. *Genome Biology*, 13:248.
- Sulem P., Gudbjartsson D. F., Stacey S. N., *et al.* (2007). Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nature Genetics*, 39(12):1443-1452.
- 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.
- Underhill P., Jin L., Zemans R, *et al.* (1996). A pre-Columbian Y chromosome-specific transition and its implications for human evolutionary history. *PNAS*, 93:196-200.
- Valenzuela R., Henderson M., Walsh M., *et al.* (2010). Predicting Phenotype from Genotype: Normal Pigmentation. *J Forensic Sci.*, 55(2): 315-322.
- Visser M., Kayser M., Palstra R. (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.
- Walsh S., Liu F., Ballantyne K., *et al.* (2011). 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.

- Walsh S., Lindenberg A., Zuniga S. B., *et al.* (2011). Developmental validation of the IrisPlex system: Determination of blue and brown iris colour for forensic intelligence. *Forensic Science International: Genetics*, 5:464-471.
- Walsh S., Wollstein A., Liu F., *et al.* (2012). DNA-based eye colour prediction across Europe with the IrisPlex system. *Forensic Science International: Genetics*, 6:330-340.
- Walsh S., Liu F., Wollstein A., *et al.* (2013). The HIrisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. *Forensic Science International: Genetics*, 7:98-115
- Wilde S., Timpson A., Kirsanow K., *et al.* (2014). Direct evidence for positive selection of skin, hair, and eye pigmentation in Europeans during the last 5,000 years. *PNAS*, 111(13):4832-4837.

Trabajos presentados durante el período informado

Título: "Variación genética del color del iris en la población bonaerense".

Autores: D. M. Hohl; C. I. Catanesi.

Evento: VI Jornadas de Jóvenes Investigadores y Jóvenes Extensionistas.

Organizadores: Agrupación El Impulso (coordinación del Centro de estudiantes de la Facultad de Ciencias Exactas), agrupación Frente Natural, Construcción Graduados.

Lugar: Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

Fecha: Septiembre 2015

Título: Variación del gen COMT en la población de Resistencia y su asociación con la sensibilidad al dolor.

Autores: R. González; D. M. Hohl; G. P. Di Santo Meztler; L. A. Glesmann; C. I. Catanesi.

Evento: XLIV Congreso Argentino de Genética.

Institución organizadora: Sociedad Argentina de Genética.

Lugar: Mar del Plata.

Fecha: Septiembre 2015