



BASES GENÉTICAS DEL ANILLO PERIPUPILAR Y COLOR DE OJOS: APLICACIÓN EN EL ÁMBITO DE LA GENÉTICA FORENSE

Trabajo de Fin de Grado

Lara Campos Membrive

Grado de Biotecnología

Dirigido por José Ignacio Cano Bernal y
Bárbara Hernando Fuster



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

Tarragona, mayo 2018

Agradecimientos

Me gustaría agradecer este trabajo a mi familia, por darme la educación necesaria para llegar hasta la realización de este trabajo, por el ánimo y apoyo para alcanzar todos los objetivos, y sobre todo agradecer su esfuerzo para yo poder llegar a la finalización de mi Trabajo de Fin de Grado de Biotecnología. También agradecer el apoyo de mis seres queridos que han estado apoyándome día a día.

Por otro lado, agradecer la enseñanza proporcionada por los profesores de la Universitat Rovira i Virgili durante todos los años del grado y a aquellos que me han ayudado en la elaboración de este TFG.

También me gustaría agradecer a Bárbara Hernando Fuster y Conrado Martínez Cadenas por su dedicación, enseñanza y apoyo en todo momento durante la elaboración del trabajo.

Por último, agradecer al grupo de Genética del cáncer de piel y de la pigmentación humana por darme la oportunidad de realizar tanto las Prácticas Externas y el TFG, y poder desarrollarme tanto académica como personalmente en un grupo de investigación de un área de mi especial interés.

Índice

<u>Datos del centro</u>	<u>3</u>
<u>Resumen.....</u>	<u>4</u>
<u>Introducción.....</u>	<u>6</u>
1. <u>Características de pigmentación humana: fenotipos.</u>	<u>6</u>
2. <u>Aplicaciones del estudio de variantes genéticas relacionadas con la pigmentación humana.</u>	<u>7</u>
2.1. <u>Cáncer de piel</u>	<u>8</u>
2.2. <u>Medicina forense.....</u>	<u>9</u>
3. <u>Factores que influyen en la variación de la pigmentación del iris.</u>	<u>11</u>
3.1 <u>Genética</u>	<u>11</u>
3.2. <u>Hormonas sexuales</u>	<u>13</u>
<u>Hipótesis y objetivos.....</u>	<u>16</u>
<u>Metodología</u>	<u>18</u>
1. <u>Descripción de la población de estudio y recolección de datos</u>	<u>18</u>
1.1. <u>Población.....</u>	<u>18</u>
1.2. <u>Consideraciones éticas</u>	<u>18</u>
1.3. <u>Datos fenotípicos</u>	<u>19</u>
2. <u>Extracción de ADN</u>	<u>19</u>
3. <u>Genotipado de SNPs.....</u>	<u>19</u>
4. <u>Análisis de predicción mediante la herramienta IrisPlex</u>	<u>21</u>
5. <u>Análisis de predicción mediante Regresión logística.....</u>	<u>21</u>
6. <u>Análisis estadístico</u>	<u>22</u>
7. <u>Análisis de asociación: anillo peripupilar</u>	<u>22</u>
<u>Resultados y discusión.....</u>	<u>24</u>
1. <u>Modelo predictivo</u>	<u>24</u>
2. <u>Asociación anillo peripupilar</u>	<u>27</u>
<u>Conclusión</u>	<u>31</u>
<u>Autoevaluación</u>	<u>32</u>
<u>Referencias.....</u>	<u>33</u>
<u>Anexos.....</u>	<u>36</u>

Datos del centro

Grupo de Genética del cáncer de piel y de la pigmentación humana del departamento de la Unidad Predepartamental de Medicina de la Universidad Jaume I de Castelló (UJI). Este departamento pertenece a la Facultad de Ciencias de la Salud, situada en el campus del Riu Sec, en Castellón de la Plana (Avenida de Vicent Sos Baynat, s/n, 12071, Castellón de la Plana, España).

Este Proyecto está financiado por la Conselleria d'Educació de la Generalitat Valenciana (GV/2016/156) y cofinanciado por la Universitat Jaume I de Castelló.

Resumen

Los rasgos de pigmentación son una característica muy visible entre los humanos, incluyen el color de ojos, pelo y piel. Este rasgo fenotípico es poligénico y el background genético es muy diferente entre poblaciones. Por otro lado, existen diversas técnicas de biología molecular que nos permiten genotipar secuencias concretas del ADN de un individuo con una relativa facilidad. Además, el estudio de *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) ha permitido asociar regiones concretas del genoma con un fenotipo determinado, también para los rasgos de pigmentación humana.

Estudios anteriores crearon un modelo de predicción, IrisPlex, que se basa en el genotipado de secuencias del ADN en las que se han reconocido polimorfismos asociados a rasgos de pigmentación para, posteriormente, en función del genotipo de la muestra biológica analizada, dar una probabilidad de que el individuo donante de la muestra posea un determinado fenotipo. IrisPlex presenta una capacidad predictiva muy elevada para los colores de ojos marrón y azul, pero en el caso de los ojos verdes, tiene una sensibilidad muy baja.

En este estudio se plantea crear un nuevo modelo de predicción, basado en una regresión logística, en el que se tengan en cuenta los factores genotipo y sexo del individuo para tratar de mejorar la capacidad de predicción, especialmente para ojos verdes, mayor debilidad de IrisPlex. Por otra parte, se plantea realizar un análisis de asociación de anillo peripupilar, particularmente característico de ojos verdes y claros.

Tras la elaboración del modelo de predicción se concluye que tener en cuenta el sexo y genotipo del individuo en un modelo de predicción de color de ojos, basado en regresión logística, mejora la sensibilidad del modelo para el color de ojos verde. A partir del análisis de asociación se extrae que hay varios genes relacionados con el color de ojos que determinan la presencia o ausencia de anillo peripupilar, en especial *HERC2*, mayor determinante de ojos claros.

Palabras clave: pigmentación humana, genes del color de ojos, IrisPlex, modelo predicción, fenotipado, análisis de asociación, anillo peripupilar.

Introducción

1. Características de pigmentación humana: fenotipos.

El fenotipo son las características físicas o bioquímicas observables de un organismo, determinadas por el factor genético y medioambiental. Los rasgos de pigmentación en humanos son una de las características más visibles y diferenciadoras entre individuos [1].

La pigmentación humana está explicada por la cantidad y el tipo de melanina en la epidermis, en el iris y en el pelo, y por la capacidad de respuesta a los rayos ultravioleta (UV) [2]. La variación fenotípica de los rasgos de pigmentación y sensibilidad a la luz solar es atribuible al número, tamaño y distribución de los melanosomas, junto con el tipo de melanina sintetizada, ya que el número de melanocitos, normalmente, no varía. En piel clara poco pigmentada, los melanosomas tienden a agruparse alrededor del núcleo de los queratinocitos, mientras que en la piel oscura altamente pigmentada los melanosomas se distribuyen uniformemente dentro de las células [2, 3].

La melanina es el principal pigmento de los ojos, el pelo y la piel. La melanina es un biopolímero de estructura compleja sintetizado en los melanosomas de los melanocitos que se encuentran en la lámina basal, bulbo piloso y el iris. Existen dos tipos de melanina: la eumelanina, de color marrón-negruzco, y la feomelanina, de color amarillo-rojizo [1]. En el caso del color de ojos, los melanosomas se encuentran en los melanocitos del iris. El tipo de melanina, su densidad y la distribución determina el color de ojos. Los iris marrones tienen grandes cantidades de melanina y numerosos melanosomas que absorben la luz, de ahí el color oscuro mostrado. Aunque los ojos azules tienen un número similar de melanocitos que los ojos de color marrón, estos tienen un menor contenido de melanina en los melanosomas, de forma que la luz puede penetrar en el estroma, siendo parte de ella absorbida en la parte interna de los ojos, mientras que la demás es reflejada, dando apariencia de color azul. Los ojos verdes y de color miel tienen cantidades intermedias de melanina [4].

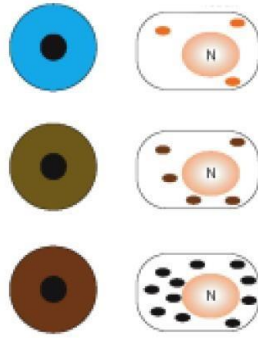


Figura 1. Distribución melanina en iris de diferentes colores [4].

La melanina no siempre se distribuye de forma uniforme en el iris, dando lugar a diferentes patrones de pigmentación en aquellos iris en los que no se distribuye uniformemente. Uno de los ejemplos más claros es el anillo peripupilar, patrón de pigmentación que se caracteriza por presentar un anillo alrededor de la pupila de pigmentación más oscura que la presentada en el resto del iris. Otros patrones de pigmentación no homogénea en el iris son, por ejemplo, heterocromía completa, heterocromía parcial y nevus [5, 6].

2. Aplicaciones del estudio de variantes genéticas relacionadas con la pigmentación humana.

Actualmente, el estudio de los denominados *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) y su asociación a diversos fenotipos se encuentra en crecimiento. Las variaciones de una o varias bases de la secuencia del ADN genómico permiten indicar una región del genoma que es probable que esté estrechamente asociada a un fenotipo dado. Los SNPs pueden afectar al riesgo a padecer determinadas enfermedades y a la respuesta de los individuos a diferentes fármacos, toxinas y virus. Así pues, los polimorfismos pueden servir de marcadores biológicos, ayudando a los científicos a localizar genes asociados a diferentes procesos, como enfermedades o vías metabólicas.

Los avances en genética médica y humana han permitido entender mejor el impacto de la genética en el fenotipo de un individuo. Los SNPs que presentan una elevada asociación con un fenotipo concreto se puede utilizar para predecir dicho fenotipo, basándose únicamente en la información genética disponible de estos marcadores de ADN. El

fenotipado de ADN se aplica en diferentes campos, como en el diagnóstico de enfermedades [7], la medicina personalizada [8] o la ciencia forense [2].

La medicina personalizada se ha centrado en predecir el riesgo a padecer cáncer y otras enfermedades humanas a partir de ADN durante los últimos años [9]. Un objetivo adicional de la medicina personalizada, una vez que el riesgo o la susceptibilidad a una enfermedad es identificada, recae en el desarrollo de medicamentos a medida, un campo reconocido como farmacogenética [2].

2.1. Cáncer de piel

El cáncer de piel es una de las neoplasias más comunes en todo el mundo [10]. La transformación de diversas células epidérmicas da lugar a diferentes tipos de neoplasias cutáneas, las cuales se clasifican en dos categorías principales: el melanoma cutáneo, el cual se origina de la transformación de melanocitos, y el cáncer de piel no melanoma, que surge de otras células epidérmicas, principalmente de los queratinocitos. El cáncer de piel no melanoma es el tipo de cáncer más común en las poblaciones caucásicas, aunque no suele presentar complicaciones clínicas. Sin embargo, el melanoma es uno de los que más malignidad presenta [10, 11].

Los principales factores etiológicos asociados a la predisposición a cualquier tipo de cáncer de piel son de carácter ambiental, como la ubicación geográfica y la exposición al sol, y de carácter genético, factores hereditarios que definen la variación en las características de la pigmentación de la piel [10]. Diversas variantes dentro de los genes implicados en la pigmentación se han asociado con fenotipos de alto riesgo como tener la piel clara, cabello castaño rojizo y ojos verdes o azulados. Muchas de estas variantes también se han visto implicadas en el riesgo de varios cánceres de piel [10]. En particular, las variantes no funcionales (alelos R) dentro del gen de pigmentación clave, receptor de melanocortina 1 (*MC1R*), se han relacionado con rasgos de alto riesgo que involucran tanto rasgos de pigmentación como presentar una limitada capacidad de reparación de daños en el ADN. Además, *MC1R* parece interactuar con otros genes de la ruta de la pigmentación como son: el gen de la proteína de señalización agouti (*ASIP*), de la tirosinasa (*TYR*), de la proteína relacionada con tirosinasa 1 (*TYRP1*), y del albinismo oculocutáneo II (*OCA2*) [11]. La mayoría de estas asociaciones han sido confirmadas

mediante estudios de asociación que, al mismo tiempo, han identificado nuevos loci implicados en la variación fenotípica y el riesgo de cáncer de piel [12]. En conclusión, las variantes genéticas dentro de los genes implicados en la pigmentación de la piel, además de influir en los rasgos fenotípicos, son determinantes importantes del riesgo de varios cánceres de piel. Sin embargo, el riesgo final de cáncer de piel depende de la interacción entre los factores genéticos, factores ambientales y otras características del huésped [2].

2.2. Medicina forense

Hay otros campos en los que el análisis de SNPs está siendo estudiado, como es el caso de la genética forense. Aquí, el fenotipado de ADN se refiere a la predicción de rasgos de apariencia o características visibles externamente (EVCs, de sus siglas en inglés) a partir de una muestra biológica. Los resultados de un “testigo biológico” pueden proporcionar pistas sobre personas desconocidas que no son identificables con el perfil de ADN comparativo actual [13]. Esta nueva aplicación de inteligencia de ADN marca un uso forense del material biológico diferente al de los perfiles de ADN usados hasta ahora. Además, esta herramienta se presenta como una gran promesa ya que se podría reducir un grupo de potenciales sospechosos, de forma que solo queden aquellos que coincidan con la apariencia predicha a partir del ADN de una mancha de crimen o de los restos de una persona fallecida. Así pues, las aplicaciones de esta nueva aplicación podrían incluir la ayuda al reconocimiento de personas tras catástrofes naturales, donde hay un gran número de cuerpos no identificados [2, 13].

Todavía hay muchas EVCs que están bajo investigación genética, pero los rasgos de pigmentación específicos ya son predecibles a partir de ADN con precisiones razonablemente altas mediante herramientas como IrisPlex o HIrisPlex [2, 14, 15]

2.2.1. IrisPlex

Diferentes estudios han demostrado que existe una fuerte correlación entre la latitud y el color de piel, estando el color más oscuro en zonas ecuatoriales y tropicales. Debido a este fenómeno, numerosas investigaciones sobre la evolución del color de piel han intentado responder al porqué de una tendencia tan obvia. Se han planteado numerosas hipótesis incluyendo la síntesis de la vitamina D y la influencia de la selección sexual en

individuos de pigmentación más clara. Existe mucho interés científico sobre cuándo apareció la piel clara. Por lo contrario, las variaciones en el color del pelo y de los ojos está más restringido geográficamente a Europa. El fenotipo ancestral en la mayoría de las poblaciones humanas era oscuro, sin embargo, la variación de este fenotipo se dio primero en la población europea [2, 14].

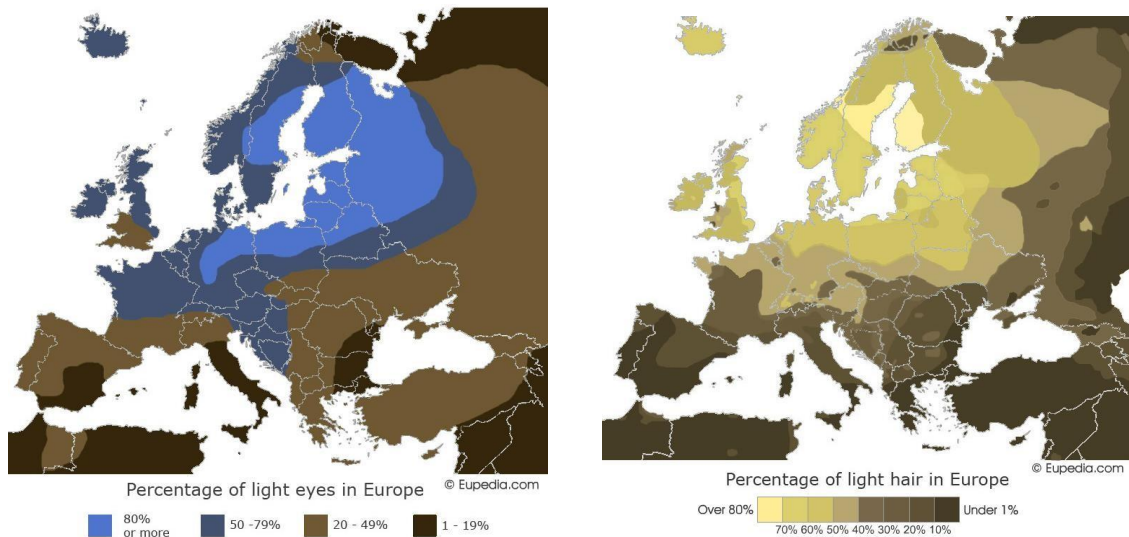


Figura 2. Representación de la distribución actual del color de iris (A) y pelo claro (B) en Europa [2].

El color del iris y del pelo son fenotipos altamente polimórficos en las personas con descendencia europea incluyendo las regiones de alrededor, oriente medio y oriente de Asia, y están bajo un fuerte control genético [2].

IrisPlex se presenta como una herramienta robusta y sensible, para la predicción precisa del color de ojos azul y marrón [14]. La fuerza de un SNP asociado a una característica no necesariamente refleja su valor individual para la predicción de esta característica. Por esta razón se estudió el valor predictivo de 37 SNPs asociados al color de ojos localizados en 8 genes involucrados en la vía de síntesis de melanina en una población europea constituida por 6168 holandeses. Los valores de precisión que se obtuvieron, expresados por el área bajo la curva (AUC), indicaron que la mayoría de la información del color de los ojos es proporcionada por un subconjunto de 6 SNPs localizados en 6 genes: *HERC2*, *OCA2*, *SLC24A4*, *SLC45A2*, *TYR* e *IRF4*. De esta forma, se desarrolló una robusta herramienta de predicción para el color de ojos a partir de una muestra biológica mediante

el genotipado de únicamente 6 variantes genéticas. IrisPlex presenta precisiones de predicción de más del 90% para ojos de color azul y marrón, siendo dicha capacidad de predicción más deficiente para el color de ojos verde [2].

2.2.2. *HIrisPlex*

HIrisPlex consiste en un único ensayo múltiple de genotipado de 24 variantes genéticas (entre las que se encuentran los 6 SNPs incluidos en IrisPlex) dirigido para predecir simultáneamente el color de ojos y de pelo a partir de una muestra biológica. Los resultados del análisis de HIrisPlex en muestras de ADN de todo el mundo indican que la predicción del color de pelo utilizando HIrisPlex es robusta independientemente de la ascendencia geográfica. Además, esta herramienta tiene la capacidad de inferir con una precisión de predicción mayor del 86% si un individuo de cabello negro y ojos marrones es de origen no-europeo o europeo (excluyendo e incluyendo regiones cercanas a Europa, respectivamente) [15].

Se espera que la aplicación forense práctica del sistema HIrisPlex beneficie los casos en que otras vías de investigación, incluido el perfil STR (*Short Tandem Repeat*), no proporcionen pistas sobre quién podría ser el donante desconocido de la muestra del escenario del crimen o la persona desaparecida desconocida [2].

3. Factores que influyen en la variación de la pigmentación del iris.

3.1 Genética

El color del iris es una característica fenotípica llamativa en humanos, y su variación es una de las manifestaciones más relevantes en el aspecto físico entre individuos. Este rasgo fenotípico es poligénico, y su background genético es variable entre poblaciones. El color de ojos está sujeto a ciertos cambios a lo largo de la vida. A pesar de ello, este fenotipo está influenciado principalmente por factores genéticos actuando juntos de forma cuantitativa, dando lugar a una amplia gama de colores entre el azul y marrón oscuro generados por interacciones genéticas complejas [4, 16].

En los últimos años los principales genes involucrados en la determinación del fenotipo del color del iris han sido identificados. De estos genes se señalaron SNPs particulares responsables de la variación de la pigmentación (*véase apartado IrisPlex*):

- *HERC2*: el gen *HERC2* no está relacionado con la ruta de la pigmentación humana, pero variantes genéticas localizadas en este gen se ha visto que influyen de manera importante en la determinación del color de pelo, ojos y piel. El SNP asociado de forma más significativa es rs12913832, el cual está situado en el intrón 86 de *HERC2* a 21kb *upstream* del promotor del gen *OCA2* (gen clave en la melanogénesis). Así pues, se ha visto que rs12913832 influye en la expresión de *OCA2*. Concretamente, el alelo T de *HERC2* rs12913832 aumenta el nivel de expresión de *OCA2* en los melanocitos dando lugar a una pigmentación más oscura. Por el contrario, el alelo C de *HERC2* rs12913832 reduce la expresión de *OCA2* dando lugar a una pigmentación más clara [1, 12, 17].
- *OCA2*: variantes genéticas localizadas en este gen, independientemente de *HERC2* rs12913832, también afectan a la variación en la pigmentación humana. Tres SNPs de *OCA2* afectan significativamente a la pigmentación humana, aunque se ha visto que existe un efecto sinérgico con *HERC2* rs12913832 [1]. De entre estos tres SNPs destaca rs1800407 [12, 17].
- *SLC24A4*: este gen codifica un transportador de iones que se localiza en la membrana del melanosoma, contribuyendo en la regulación del ambiente del melanosoma para su correcta maduración. Variantes en este gen, como por ejemplo rs12896399, se asocian con distribuciones específicas del pigmento en el iris y no un color homogéneo [1]. Interacciones entre *SLC24A4* y *HERC2* también afectan al color de ojos azules [18].
- *SLC45A2*: mutaciones en este gen causan albinismo oculocutáneo de tipo 4 en humanos. Dos SNPs se han asociado con variación normal en el color de la piel, el pelo y los ojos en europeos y sudasiáticos. El rs16891982 en *SLC45A2* es el mayor determinante del color de piel. La asociación de rs26722 se puede explicar por un desequilibrio ligado a rs16891982 [1].
- *TYR*: la tirosinasa es la enzima limitante en la producción de eumelanina. Se ha visto que mutaciones en el gen codificante son responsables de albinismo oculocutáneo de tipo III. Además, algunas variantes genéticas como rs1408799 o

rs1393350 se han asociado con variación en la pigmentación del iris en poblaciones europeas. [19]

- *IRF4*: varios estudios han demostrado que un SNP intrónico, rs12203592, se encuentra fuertemente asociado con el color de pelo, piel y ojos, la presencia de efélides y la sensibilidad a la exposición solar. Además, el alelo T muestra un efecto dominante para tener piel clara. Este SNP solo es polimórfico en europeos y muestra un gradiente de norte a sur en la frecuencia alélica. [1]

3.2. Hormonas sexuales

Junto con la genética, las hormonas sexuales contribuyen a las diferencias en el envejecimiento de la piel, sensibilidad solar e incidencia de melanoma entre sexos [20].

Los estrógenos aceleran la curación de heridas, mejoran los trastornos inflamatorios, aumentan el grosor de la piel, protegen del fotoenvejecimiento de la piel e inducen la activación y expresión de genes implicados en la síntesis de melanina. Por otro lado, los andrógenos tienen un efecto inhibitorio sobre los melanocitos [20].

Se ha observado que el incremento de hormonas relacionadas con la gestación induce la activación y expresión de genes involucrados en la síntesis de melanina en los melanocitos. También se ha observado que el uso de anticonceptivos que contienen estrógenos, determinados cosméticos y terapias estrógeno-progesterona se han asociado con hiperpigmentación [21].

Estudios recientes apuntan a que las mujeres caucásicas tienen una pigmentación ligeramente más oscura que los hombres caucásicos, para el mismo genotipo [21]. En cuanto al color del iris, cuando se comparan perfiles genéticos similares, las mujeres, en general, tienden a tener los ojos más oscuros que los hombres. Estas diferencias significativas entre los dos sexos sugieren que hay un factor sin identificar asociado al sexo que contribuye a la variación del color de ojos.

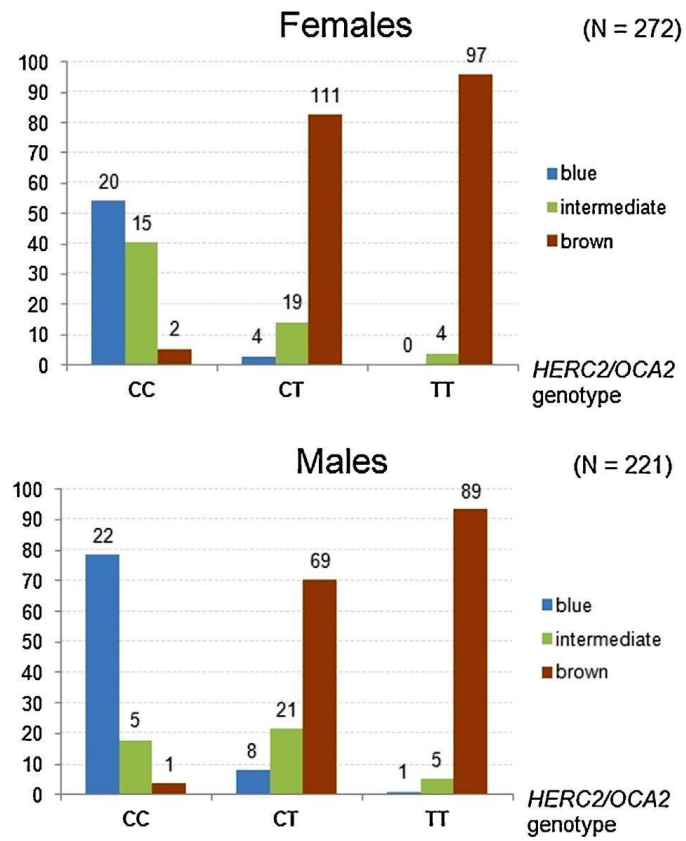


Figura 3. Diferencias en el fenotipo según género para el mismo genotipo *HERC2/OCA2* [17].

Hipótesis y objetivos

Por todo lo mencionado en la introducción, las hipótesis de este trabajo son:

1. Incluir el sexo en el modelo de predicción de EVCs relacionadas con la pigmentación mejorará su capacidad predictiva
2. Por otra parte, no todos los genes asociados al color de ojos siguen el mismo tipo de herencia, por lo que el método de predicción será más efectivo si se tiene en cuenta el genotipo del individuo
3. El anillo peripupilar es un rasgo de pigmentación en el iris, por lo que los genes que determinan este patrón de distribución del pigmento serán los mismos que los que determinan el color del iris.

Por tanto, los objetivos de este trabajo serán:

1. Comprobar la eficacia de IrisPlex en nuestra población de origen español, diferente origen a la que se usó en la creación del modelo.
2. Establecer un método de predicción del color de ojos en el que se tenga en cuenta el genotipo y el sexo del individuo, y determinar si la eficacia de predicción mejora.
3. Comprobar la asociación entre los genes señalados por la bibliografía que influyen en la presencia de anillo peripupilar y estudiar si existe alguna asociación no señalada con anterioridad.

Metodología

1. Descripción de la población de estudio y recogida de datos.

1.1. Población

En el estudio se ha incluido un total de 953 individuos, de los cuales 917 fueron para el estudio de predicción del color de ojos. Para el análisis de asociación de anillo peripupilar se utilizaron 163 de los que también habían sido usados para el análisis de predicción y, además, se incluyeron 36 muestras más que presentaban anillo peripupilar.

Las muestras que fueron usadas para el estudio de predicción provenían de un estudio anterior de pigmentación, el cuestionario de este estudio incluía datos sobre rasgos de pigmentación del iris. Las muestras fueron recogidas en Departamentos de Dermatología de cuatro hospitales españoles: Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid), Hospital Universitario La Paz (Madrid), Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid) y Hospital Provincial de Castellón (Castellón). Además, se recogieron muestras de voluntarios de la Universitat Jaume I de Castellón (Castellón), en su mayoría alumnado, equipo docente y personal.

Todos los sujetos donantes eran europeos de origen español.

1.2. Consideraciones éticas

Todos los participantes firmaron un consentimiento escrito y el estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad Jaume I de Castellón (Castellón, España). A cada una de las muestras se le asignó un código numérico aleatorio (ID), con el objetivo de preservar el anonimato de los participantes (Ley Orgánica de Protección de Datos). El estudio sigue las recomendaciones de la Declaración de Helsinki para estudios biomédicos.

1.3. Datos fenotípicos

Bajo la supervisión de un profesional, cada participante completó un cuestionario estandarizado en el que se recogía el sexo, edad, rasgos de pigmentación (color de ojos, piel y pelo), historial de quemaduras por el sol, fototipo cutáneo según Fitzpatrick y hábitos de exposición solar.

2. Extracción de ADN

El ADN genómico se obtuvo de muestras de saliva que se recogieron mediante torundas bucales, hasta el proceso de extracción se almacenaron a -20°C. Posteriormente, el ADN se extrajo siguiendo el protocolo del kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Se escogió este kit porque ofrece un procedimiento rápido y de alta calidad para la extracción de ADN a partir de muestras de saliva. Una vez extraído el ADN, los tubos de recolección con el ADN fueron marcados con el código ID y almacenados a -20 °C hasta el momento de realizar el análisis genético.

3. Genotipado de SNPs

La herramienta de predicción IrisPlex incluye 6 polimorfismos localizados en genes relacionados con la pigmentación del iris [1]. Debido a los valores elevados de precisión para la determinación del color de ojos que muestra IrisPlex, en este estudio se emplean los mismos determinantes genéticos para el análisis de predicción fenotípica de color de ojos, así como para el análisis de asociación para anillo peripupilar. Concretamente, los SNPs seleccionados son: rs12913832 en *HERC2*, rs1800407 en *OCA2*, rs12896399 en *SLC24A4*, rs16891982 en *SLC45A2*, rs1393350 en *TYR* y rs12203592 en *IRF4* [14].

El genotipado se hizo usando KASP Genotyping Chemistry (LGC, Hoddesdon, United Kingdom) para *SLC45A2* rs16891982, *OCA2* rs1800407, *SLC24A4* rs12896399, *TYR* rs1393350 y *IRF* rs12896399. Para *HERC2* rs12913832 se usó TaqMan technology (Applied Biosystems, Foster City, USA). Los análisis del genotipado se llevaron a cabo en un StepOnePlus™ Real-Time PCR System, variando las condiciones de la PCR en función de los requerimientos de cada prueba. El genotipo para cada muestra fue

determinado midiendo fluorescencia alelo-específica, usando el software SDS v2.3 para discriminación alélica (Applied BioSystems, Foster City, USA). Es decir, la sonda complementaria a cada uno de los alelos de cada SNP estaba marcada con un fluorocromo diferente en el extremo 5', de forma que según la emisión de fluorescencia detectada se determinaba el genotipo de la muestra mediante discriminación alélica (Figura 4). Para tener un control de la calidad, se incluyeron controles negativos y un trío de controles de los que se conoce el genotipo, uno de un homocigoto mayor, otro heterocigoto y otro de un homocigoto menor. Las placas que se usaron son de 96 pocillos.

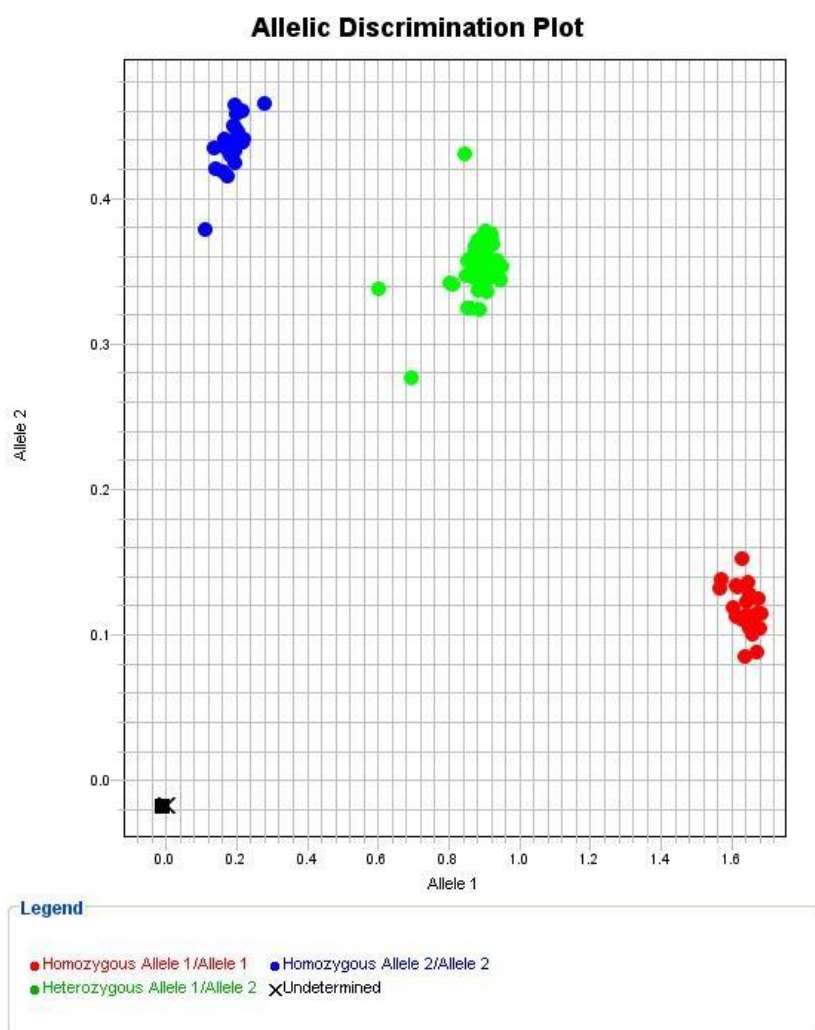


Figura 4. Gráfico de discriminación alélica realizado mediante PCR a tiempo real.

4. *Análisis de predicción mediante la herramienta IrisPlex*

Todas las muestras recogidas y genotipadas se testaron en el modelo online de IrisPlex disponible en la web (<https://hirisplex.erasmusmc.nl/>). Las probabilidades para colores de ojos particulares se generaron para las 917 muestras probadas considerando cada uno de los 6 SNPs de forma aditiva. La implementación de los diferentes SNPs se realizó de forma secuencial según su aporte individual en la capacidad predictiva (de mayor a menor aporte: *HERC2*, *OCA2*, *SLC24A4*, *SLC45A2*, *TYR* e *IRF4*), asumiendo los SNPs restantes como desconocidos.

5. *Análisis de predicción mediante Regresión logística*

Las mismas muestras se usaron para generar un modelo de predicción basado en una regresión logística multinomial. Para ello se utilizó el programa R (<http://www.R-project.org>). Se utilizó el mismo modelo que en IrisPlex, es decir, los mismos SNPs en el mismo orden, pero se tuvo en cuenta el genotipo de cada individuo y el sexo, de forma aditiva. La capacidad predictiva de este modelo fue evaluada aplicando una validación cruzada de 10 iteraciones (10-fold cross-validation).

Los individuos se dividieron en 10 subconjuntos de datos iguales. En cada una de las rondas de validación, nueve subconjuntos se usaron para llevar a cabo el análisis (training set) y el subconjunto restante se usaba para hacer el análisis de validación (testing set). El mismo proceso se llevó a cabo 10 veces, usando un testing set diferente cada vez. El proceso entero se llevó a cabo 100 veces, con el fin de usar diferentes particiones aleatorias de la muestra original. La partición de los datos se llevó a cabo con el paquete del programa R, 'caret package', y la validación cruzada de 10 iteraciones se llevó a cabo con programas personalizados escritos en R.

6. *Análisis estadístico*

Para comparar ambos modelos de predicción se utilizaron curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) y parámetros básicos de precisión.

El análisis de los datos obtenidos con IrisPlex se realizó con el software IBM SPSS Statistics v. 23 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Se calculó el Área Bajo la Curva (AUC) mediante análisis de curvas ROC para cada uno de los colores que puede presentar el iris. Posteriormente se hicieron tablas cruzadas en las que se incluían el número de falsos positivos (FP), falsos negativos (FN), verdaderos positivos (VP) y verdaderos negativos (VN), a partir de estos valores se sacaron los parámetros de precisión, especificidad y sensibilidad del modelo predictivo.

Para el modelo de Regresión logística multinomial todos los parámetros básicos de precisión, incluida la AUC (Curvas ROC) se calcularon con el software R. El cálculo de la AUC se realizó con el paquete ‘pROC package’ y el resto de los parámetros con el paquete ‘ROCR package’.

7. *Análisis de asociación: anillo peripupilar*

El análisis de asociación con anillo peripupilar se llevó a cabo con el software R (<http://www.R-project.org>). Para ello, se generó una base de datos que contenía el genotipo de cada una de las muestras para los mismos 6 SNPs que se usaron para el modelo predictivo y, una columna que incluía la presencia o no presencia de anillo peripupilar. No se cogieron muestras de color marrón ya que los iris de este color normalmente no presentan anillo peripupilar, de forma que todas las muestras eran de ojos de color claro (verde, azul o gris). Tanto las muestras de color azul como las de color gris, se tomaron como azules. Se utilizó el paquete ‘SNPassoc package’ y se llevaron a cabo tres análisis de asociación: en el primero se utilizaron todas las muestras, en el segundo se cogieron aquellas que eran homocigotas CC para *HERC2* rs12913832, y en el tercero se cogieron las que eran portadoras de un alelo T para *HERC2* rs12913832 (se incluyeron tanto los heterocigotos CT como los homocigotos TT en el mismo grupo).

Resultados y discusión

1. Modelo predictivo

Tal y como se ha comentado previamente (*véase apartado Hipótesis y objetivos*), los objetivos principales eran evaluar la capacidad de predicción de IrisPlex en nuestra población y compararla con un nuevo modelo de predicción generado mediante regresión logística en el que se tiene en cuenta tanto el genotipo de los 6 SNPs y el factor sexo de cada individuo.

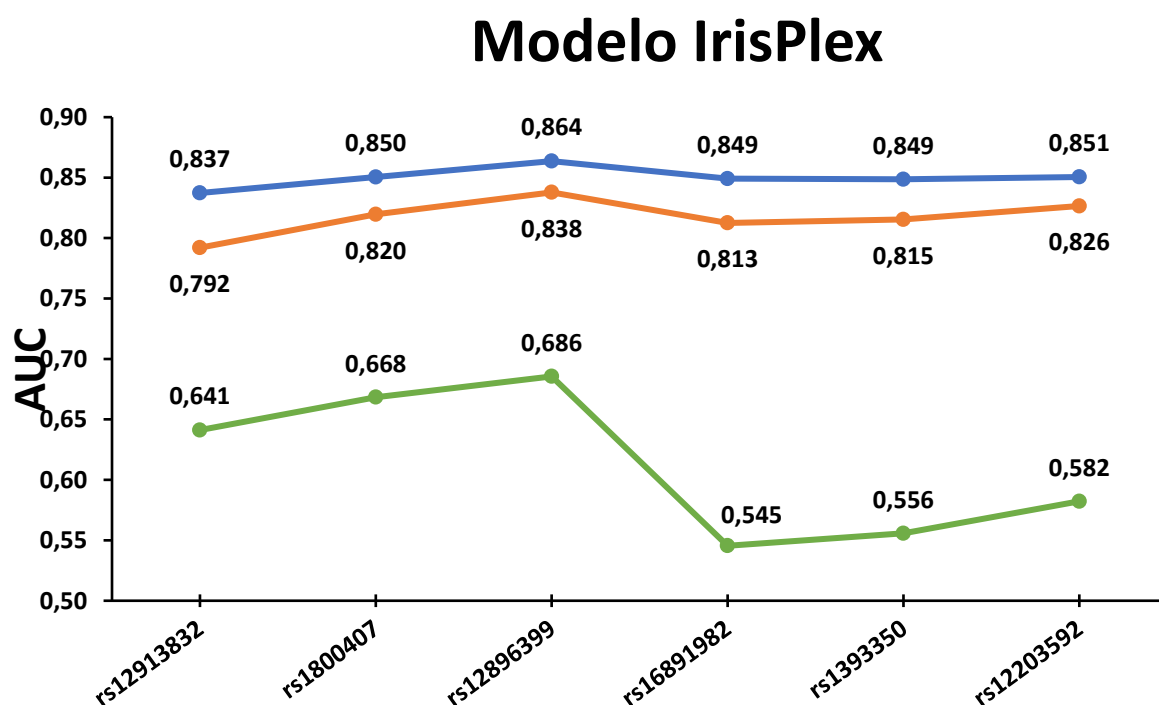


Figura 5. Contribución de los 6 SNPs de IrisPlex a la precisión de la predicción del color de ojos medido por el AUC, utilizando el modelo predictivo IrisPlex.

La contribución de cada variante genética analizada en la predicción del color de ojos azul, marrón y verde utilizando el modelo IrisPlex se muestra en la Figura 5. Si consideramos el AUC como una medida de precisión, la capacidad predictiva del color de ojos de la herramienta IrisPlex en una población española es menor que la mostrada al

aplicarla en la población holandesa, población donde se generó la herramienta [14]. Siendo el AUC 0,079 menor para ojos marrones (0.826 vs. 0.905, respectivamente) y 0,084 menor para ojos azules (0.851 vs. 0.935, respectivamente). IrisPlex se presenta como una herramienta de predicción de ojos azules y marrones por lo que no proporciona ningún dato del AUC para ojos verdes [14]. En el caso de nuestro estudio el AUC para ojos verdes o intermedios, los que no se clasifican como azules ni como marrones, es de 0,582 [14]. Recientemente, la herramienta IrisPlex se ha utilizado para predecir el color de ojos en una población polaca, población centroeuropea [22]. Los resultados obtenidos para el color de ojos verdes son similares a los obtenidos en este estudio, con un AUC de 0,556.

Como se ha explicado en el apartado *Análisis de predicción mediante Regresión logística (véase Metodología)* el modelo de predicción basado en una regresión logística multinomial se generó añadiendo los diferentes SNPs y el sexo de forma aditiva. Se calculó el AUC para cada uno de los modelos de regresión (Figura 6). Los resultados muestran que, en el caso de ojos azules e intermedios, el factor sexo aumenta la capacidad predictiva del modelo. Esto confirma la importancia del sexo en los rasgos de pigmentación, sobre todo en el caso de color de ojos claro [11, 20]. En el caso de ojos azules, el AUC aumenta 0,010 comparado con el modelo que no tiene en cuenta el sexo de los individuos. En el caso de los intermedios, ese aumento es de 0,013.

Si comparamos el modelo de Regresión logística con el modelo IrisPlex, los valores de AUC obtenidos aumentan para los tres colores, tanto teniendo en cuenta el factor sexo como solo incluyendo los 6 SNPs en el modelo. Sin tener en cuenta el factor sexo, los valores de AUC aumentan 0,037, 0,035 y 0,087 para ojos azules, marrones y verdes, respectivamente. Si se tiene en cuenta el factor sexo, la diferencia es mayor, y aumenta en 0,047 para ojos azules, 0,034 para ojos marrones y 0,1 para ojos intermedios.

En el modelo de IrisPlex el color de ojos que presenta unos valores de predicción menores es el color verde. Sin embargo, en el modelo de Regresión logística, a pesar de seguir siendo el color que se predice con menor precisión, el color verde es el que presenta una mayor mejora en la capacidad de predicción del modelo respecto a IrisPlex. Esto nos indica, que especialmente para el color intermedio, tener en cuenta el genotipo y el sexo del individuo es importante a la hora de predecir el fenotipo que mostrará la muestra de ADN analizada.

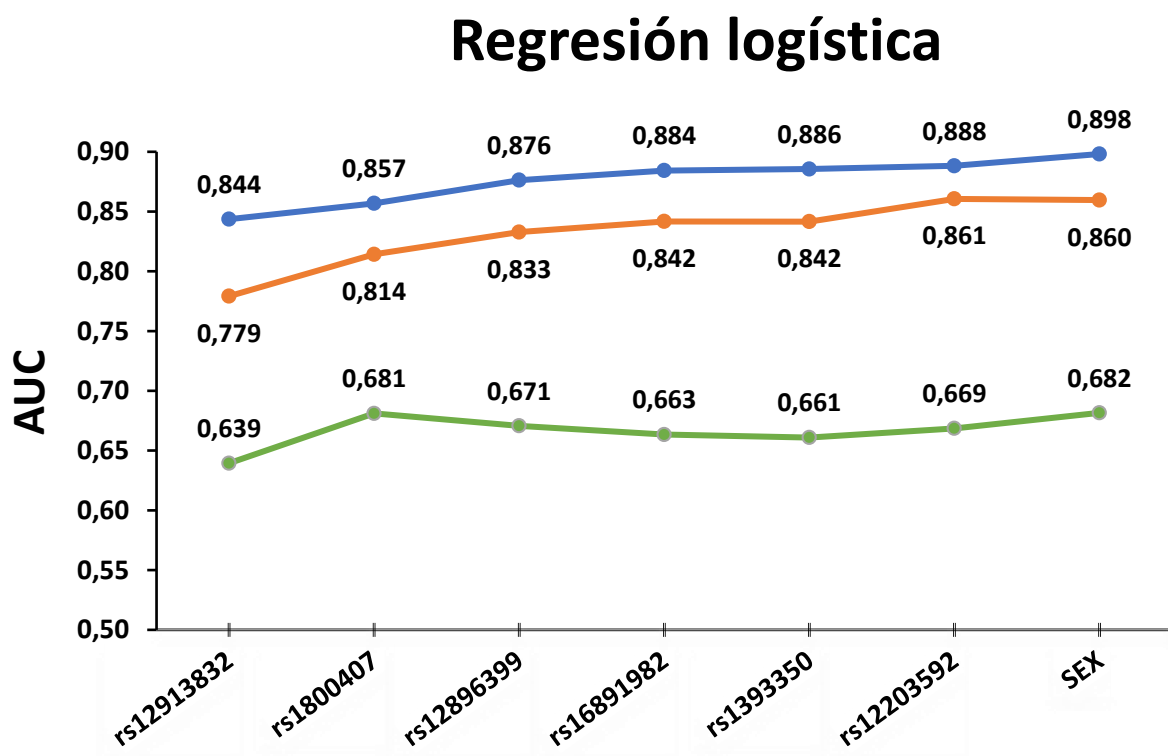


Figura 6. Contribución de los 6 SNPs de IrisPlex a la precisión de la predicción del color de ojos medido por el AUC utilizando el modelo predictivo Regresión logística.

Además, con el objetivo de comparar la capacidad predictiva de ambos modelos en nuestra población, se calcularon los valores de precisión, sensibilidad y especificidad para ambos modelos, como se muestra en la Tabla 1. Destacar que los valores obtenidos para el modelo de Regresión logística son el valor medio de las 10 iteraciones realizadas en el proceso de validación cruzada (*véase apartado Análisis de predicción mediante Regresión logística*).

Tabla 1. Valores de AUC, precisión, sensibilidad y especificidad de los modelos predictivos.

		AUC	Precisión	Sensibilidad	Especificidad
Regresión logística	Azul	0,898	85,80%	77,40%	89,50%
	Marrón	0,860	74,90%	86,50%	67,30%
	Intermedio	0,682	64,10%	69,70%	61,70%
IrisPlex	Azul	0,851	78,00%	75,70%	85,10%
	Marrón	0,826	64,10%	52,60%	40,10%
	Intermedio	0,582	63,80%	24,50%	95,40%

Para el parámetro de precisión, los valores obtenidos con el modelo de predicción de Regresión logística son mayores que los de IrisPlex para los tres colores de ojos, azul, verde y marrón. Solo en el caso del color verde, el valor obtenido con ambos modelos es muy cercano, con una variación de 0,2%. En el caso de la sensibilidad, igual que ocurre con la precisión, el modelo de Regresión logística presenta unos valores más elevados.

Sin embargo, para la especificidad el valor de este parámetro para ojos intermedios es mucho mayor en el modelo de IrisPlex que en el de Regresión logística.

El aumento en la sensibilidad posibilita que más positivos sean clasificados como positivos, es decir, en el modelo de IrisPlex (menor sensibilidad) muchos ojos de color verde quedaban sin clasificar. Esto, a su vez hace que la especificidad sea mayor disminuyendo el porcentaje de falsos positivos (un 5% en el caso de IrisPlex), lo que quiere decir que no hay ojos que sean clasificados como verdes y que realmente no lo sean. Por lo tanto, en el modelo de Regresión logística se ha aumentado la sensibilidad haciendo que haya más verdaderos positivos, aunque hay un número mayor de falsos positivos debido a una especificidad menor. A pesar de ello, el efecto de esta variación en la sensibilidad y la especificidad concluye en una mayor capacidad de predicción en términos generales para los ojos de color verde que es la mayor debilidad del modelo IrisPlex, como se ha comentado anteriormente.

2. Asociación anillo peripupilar

La asociación de los 6 SNPs estudiados con el anillo peripupilar se analizó para cada SNP teniendo en cuenta el modelo de herencia, para todas las muestras y separando los individuos según el genotipo *HERC2*. Los valores numéricos obtenidos se recogen en la Tabla S1 (Anexos). Se calcularon el OR para un intervalo de confianza (IC) 95%, los límites inferior y superior del IC y el p-value.

En el primer análisis de asociación, en el que se analizaron todos los SNPs de forma independiente, dos SNPs se asociaron con anillo peripupilar (Figura 7): *HERC2* rs12913832 (p-value = 0,0223) e *IRF4* rs12203592 (p-value = 0,0211). Se ha visto que el alelo T de *HERC2* rs12913832 es el mayor determinante de la pigmentación oscura de iris [1, 12]. Nuestros resultados indican que los individuos portadores del alelo rs12913832*T tienden a tener un anillo de pigmentación más oscura alrededor de la pupila cuando

tienen los ojos claros ($OR > 1$). En cambio, el alelo menor rs12203592*T de *IRF4* se encuentra asociado a la ausencia de anillo peripupilar ($OR < 1$). El alelo T de este polimorfismo se ha visto asociado a rasgos de pigmentación clara y sensibilidad solar [1].

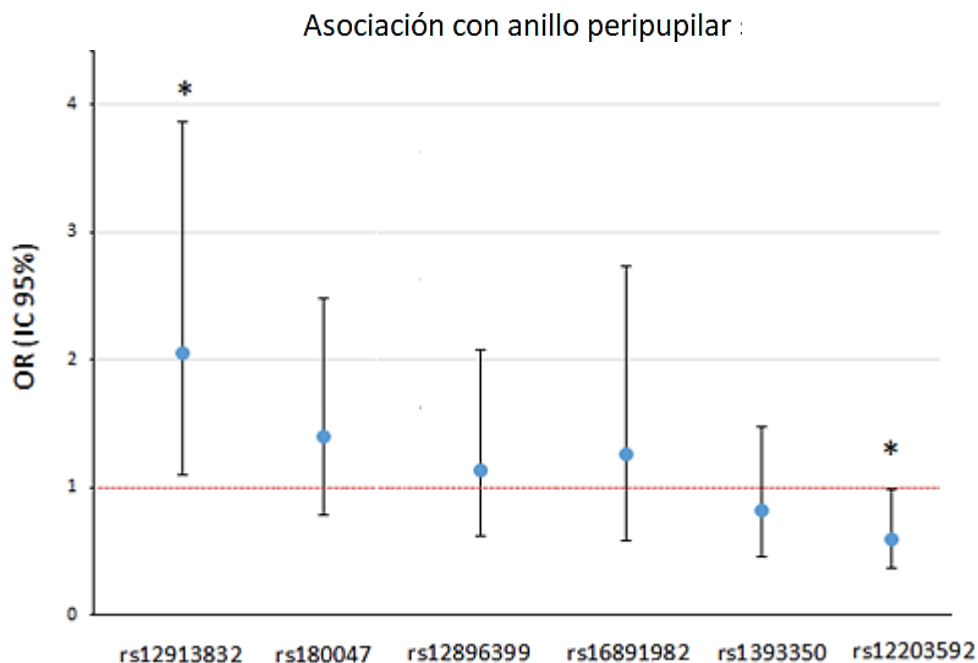


Figura 7. Asociación de cada SNP con la presencia o ausencia de anillo peripupilar

Como hemos explicado antes, *HERC2* rs12913832 se encuentra asociado a la presencia de anillo peripupilar. Además, *HERC2* rs12913832 es considerado el mayor determinante genético del color de ojos [17]. Por este motivo, el siguiente análisis de asociación con la presencia de anillo peripupilar se realizó en función del genotipo para este polimorfismo. Así pues, los individuos se separaron en dos grupos, homocigotos para el alelo C y portadores del alelo T. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 8.

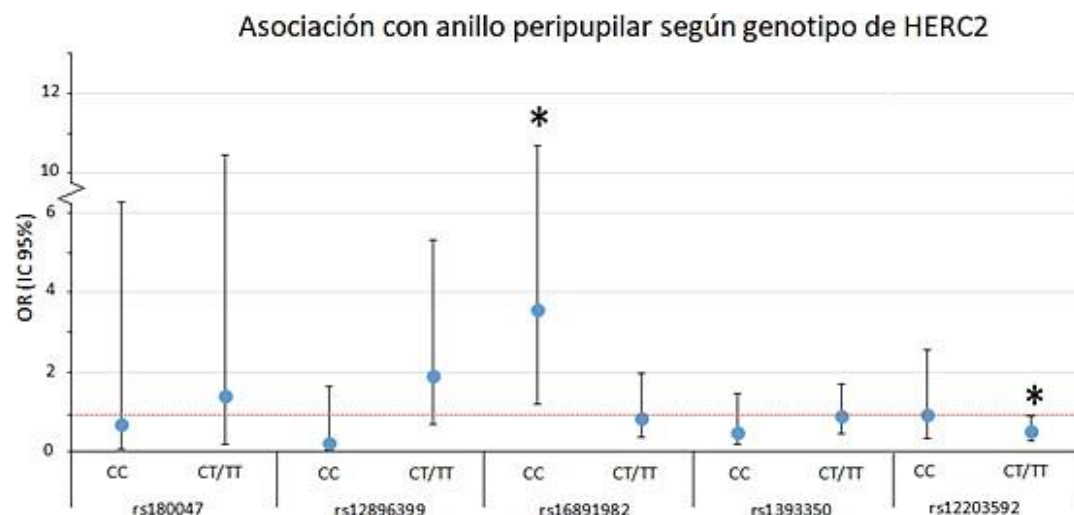


Figura 8. Asociación de cada SNP con la presencia o ausencia de anillo peripupilar, según el genotipo mostrado para *HERC2* rs12913832.

Teniendo en cuenta que los individuos homocigotos del alelo rs12913832*C no suelen presentar anillo peripupilar, se observa que aquellos que sí que lo presentan son portadores del alelo rs16891982*C de *SLC45A2* ($OR > 1$). El alelo rs16891982*C de *SLC45A2* está relacionado con la pigmentación muy oscura, sobre todo del color de piel. El alelo C de rs16891982 es muy frecuente en poblaciones africanas (96,4%), mientras que en las poblaciones europeas es mucho menos frecuente (6,2%) (datos obtenidos de la base de datos pública Ensembl: <https://www.ensembl.org>). En España, una población del Mediterráneo, la frecuencia del alelo rs16891982*C es del 18,2%. Así pues, se observa un gradiente Norte-Sur de dicho alelo, siendo más frecuente en aquellas poblaciones donde el color de piel es más oscuro con el objetivo de protegerse frente a los efectos dañinos de la radiación UV.

En cambio, la presencia del alelo rs12003592*T de *IRF4* en individuos portadores del alelo rs12913832*T de *HERC2* (los cuales presentan un mayor riesgo asociado a tener anillo peripupilar) está asociado a la ausencia de anillo peripupilar ($OR < 1$). Por lo tanto, el efecto del alelo rs12913832*T de *HERC2* se ve compensado por el efecto opuesto que presenta el alelo rs12003592*T de *IRF4* [2]. El factor 4 regulador de interferón (codificado por el gen *IRF4*), aunque está principalmente implicado en la respuesta contra infecciones virales y la inflamación, tiene un efecto inductor sobre la expresión de la tirosinasa, enzima que sí actúa directamente en la síntesis de melanina.

Estos resultados evidencian que los rasgos de pigmentación humana y sensibilidad solar son de carácter poligénico, es decir, intervienen muchos genes y cada uno de ellos tiene un efecto pequeño sobre el fenotipo. Además, la interacción entre genes juega un papel importante en la determinación de la pigmentación humana [11]. Por ello, futuras líneas de investigación para la mejora de la predicción de rasgos de la pigmentación a partir de una muestra biológica deberían estar encaminados en incluir interacciones gen-gen que afecten al fenotipo final del individuo.

Conclusión

Tras los análisis realizados para la capacidad de predicción del modelo de Regresión logística y de asociación de anillo peripupilar, se puede concluir que:

1. Tener en cuenta el genotipo del individuo en un nuevo modelo de predicción mejora la capacidad de predicción.
2. Tener en cuenta el sexo del individuo en un nuevo modelo de predicción mejora la capacidad de predicción.
3. Los alelos rs12913832*T de *HERC2*, rs16891982*C de *SLC45A2* y rs12003592*T de *IRF4* tienen un papel importante en la determinación del anillo peripupilar.

Autoevaluación

Mi estancia en prácticas con un grupo de investigación me ha permitido comprometerme con un estudio que posteriormente me ha servido para la realización de este trabajo. Por primera vez a lo largo de mi trayectoria académica me enfrenté a la realización de un trabajo de esta complejidad que requería una gran parte práctica y poner en común muchos conocimientos aprendidos hasta ese momento. Además, tuve que adquirir más conocimientos, sobre todo de estadística, para poder realizar los análisis de los resultados que se obtenían en el laboratorio, para ello conté con la ayuda del grupo.

Este trabajo ha supuesto una motivación para mí y como consecuencia de ello, creo que la actitud que he adquirido frente a la realización del TFG ha sido muy positiva. Me siento muy satisfecha con el trabajo realizado, según he ido avanzando y el trabajo ha ido cogiendo forma, he comprendido la aplicación e importancia de materias académicas como la estadística que a lo largo del grado no había desarrollado casi. Creo que he cumplido con los objetivos planteados al inicio del estudio, lo que es muy satisfactorio, pero también con los objetivos personales ya que me he esforzado por alcanzarlos.

Por otra parte, he aprendido que hay que ser muy paciente en la investigación. Muchos resultados no son los esperados a la primera, o incluso, no llegan a salir como se espera. Además, aunque los objetivos de un estudio estén bien definidos, durante el proceso puede que se obtengan conclusiones fuera de las hipótesis pero que nos proporcionan información relevante, por lo que hay que estar atento a este tipo de resultados y no centrarse únicamente en los objetivos principales.

Referencias

1. Liu F, Wen B, Kayser M. Colourful DNA polymorphisms in humans. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 24 (2013) 562– 575
2. Walsh S. DNA Phenotyping: the prediction of human pigmentation traits from genetic data [Tesis doctoral]. [Rotterdam (Netherlands)]: Erasmus MC University Medical Center Rotterdam; 2013. 305 p.
3. Sulem P, Gudbjartsson D F, Stacey S, Helgason A, Rafnar T, Magnusson K, Manolescu A, Karason A, Palsson A, Thorleifsson G, Jakobsdottir M, Steinberg S. Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nature Genetics* 39 (12) (2007) 1443-52.
4. Sturm R, Frudakis T.N. Eye colour: portals into pigmentation genes and ancestry. *TRENDS in Genetics* 20 (2004) 327-32
5. Sturm R, Larsson M. Genetics of human iris colour and patterns. *Pigment Cell Melanoma Res.* 22 (2009) 544–562.
6. 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. GWAS Findings for Human Iris Patterns: Associations with Variants in Genes that Influence Normal Neuronal Pattern Development. *The American Journal of Human Genetics* 89 (2011) 334–343.
7. Davies R. W, Dandona S, Stewart A F.R, Chen L, Ellis S. G, Tang W.H. W, Hazen S L, Roberts R, McPherson R, Wells G. A. Improved Prediction of Cardiovascular Disease Based on a Panel of Single Nucleotide Polymorphisms Identified Through Genome-Wide Association Studies. *Circulation: Genomic and Precision Medicine* 3 (2010) 468-474

8. Byrd J. B. Personalized medicine and treatment approaches in hypertension: current perspectives. *Integr Blood Press Control* 9 (2016) 59-67
9. Jackson S. E, Chester J. D. Personalised cancer medicine. *Int J Cancer* 137 (2) (2015) 262-6
10. Hernando B, Martínez-Cadenas C. La genètica de la pigmentación humana y de la predisposició al càncer de pell. *Anuari* 27 (2016) 35-44.
11. Branicki W, Brudnik U, Wojas-Pec A. Interactions between *HERC2*, *OCA2* and *MC1R* may influence human pigmentation phenotype. *Annals of Human Genetics* 73 (2) (2009) 160-70
12. Scherer D, Kumar R. Genetics of pigmentation in skin cancer. *Mutation Research* 705 (2010) 141–153
13. Manfred Kayser. Forensic DNA Phenotyping: Predicting human appearance from crime scene material for investigativa purposes. *Forensic Science International: Genetics* 18 (2015) 33–48
14. Walsh S, Liu F, Ballantyne K.N, van Oven M, Lao O, Kayser M. 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 (2011) 170–180
15. Walsh S, Liu F, Wollstein A, Kovatse L, Ralf A, Kosiniak-Kamysz A, Branicki W, Kayser M. The HIrisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. *Forensic Science International: Genetics* 7 (2013) 98–115
16. Hohl D.M, Bezus B, Ratowiecki J, Catanesi C.I. Genetic and phenotypic variability or iris color in Buenos Aires population. *Genetics and Molecular Biology* 41 (2018) 50-58

17. Martinez-Cadenas C, Peña-Chilet M, Ibarrola-Villava Maider, Ribas G. 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 (2013) 453–460
18. Pośpiech E, Draus-Barini J, Kupiec T, Wojas-Pelc A, Branicki W. Gene-gene interactions contribute to eye colour variation in humans. *J Hum Genet* 56 (6) (2011) 447–55.
19. Hernando B. The genetic basis of sunlight sensitivity and melanoma-risk pigmentation phenotypes: the role of sex-specific genetic effects, 3' untranslated regions and melanoma susceptibility genes [Tesis doctoral]. [Castellón de la Plana (España)]: Universitat Jaume I de Castelló; 2017. 183 p.
20. Hernando B, et al., Sex and MC1R variants in human pigmentation: Differences in tanning ability and sensitivity to sunlight between sexes, *J Dermatol Sci.* 84 (2016) 346-348.
21. Hernando B, Ibarrola-Villava M, Fernández L.P, Peña-Chilet M, Llorca-Cardenosa M, Oltra S.S, Alonso S, Boyano M.D, Martínez-Cadenas C, Ribas G. Sex-specific genetic effects associated with pigmentation, sensitivity to sunlight, and melanoma in a population of Spanish origin. *Biology of Sex Differences* (2016) 7-17
22. Pospiech E, Karłowska J, Ziemkiewicz B, Kukla M, Skowron M, Wojas-Pelc A, Branicki W. 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 (2016) 923-934

Anexos

Tabla S1. Asociación genotípica con anillo peripupilar

	Genotipo <i>HERC2</i>	Tipo de herencia		OR	95% IC		P-value
					Inferior	Superior	
rs12913832	TODOS	Dominante	CC / CT + TT	2,06	1,10	3,87	0,0223
rs180047	TODOS	Aditiva	0 / C / CC	1,40	0,78	2,48	0,2583
	CC	Codominante	CC / CT / TT	0,69	0,07	6,52	0,7361
	CT/TT	Recesiva	TT / CT + CC	1,41	0,19	10,46	0,7345
rs12896399	TODOS	Dominante	GG / GT + TT	1,14	0,62	2,08	0,6747
	CC	Recesiva	TT / GT + GG	0,20	0,02	1,63	0,0689
	CT/TT	Recesiva	TT / GT + GG	1,91	0,69	5,33	0,2136
rs16891982	TODOS	Superdominante	GG + CC / GC	1,26	0,58	2,74	0,5608
	CC	Dominante	GG / CC + GC	3,57	1,19	10,70	0,0238
	CT/TT	Aditiva	0 / G / GG	0,84	0,36	1,95	0,6804
rs1393350	TODOS	Dominante	GG / AG + AA	0,82	0,46	1,48	0,5125
	CC	Dominante	GG / AG + AA	0,49	0,17	1,45	0,1870
	CT/TT	Aditiva	0 / G / GG	0,88	0,46	1,69	0,7028
rs12203592	TODOS	Aditiva	0 / C / CC	0,60	0,37	0,98	0,0366
	CC	Recesiva	TT / CT + CC	0,92	0,33	2,56	0,8777
	CT/TT	Aditiva	0 / C / CC	0,50	0,27	0,92	0,0211

**CUESTIONARIO PARTICIPANTE DEL PROYECTO DE PIGMENTACIÓN
HUMANA Y CÁNCER DE PIEL EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA**

Nombre y Apellidos: _____ Código ID: _____
 Año Nacimiento: _____ Sexo: _____ Teléfono: _____ E-mail: _____
 Etnia: _____ Fecha: _____
 Lugar Nacimiento: _____ Infancia en: _____

Pecas (efélides)

Infancia-Adolescencia

- ☐ Muchas
☐ Pocas
☐ No
☐ Cara
☐ Brazos y manos
☐ Hombros o espalda
☐ Otras localizaciones

Embarazo

- ☐ Sí
☐ No

**Manchas/Pecas en
embarazo**

- ☐ Muchas
☐ Pocas
☐ No
☐ Cara
☐ Brazos y manos
☐ Hombros o espalda
☐ Otras localizaciones

Adulto

- ☐ Muchas
☐ Pocas
☐ No
☐ Cara
☐ Brazos y manos
☐ Hombros o espalda
☐ Otras localizaciones

Uso de anticonceptivos

- ☐ Sí
☐ No

**Manchas/Pecas tras
anticonceptivos**

- ☐ Muchas
☐ Pocas
☐ No
☐ Cara
☐ Brazos y manos
☐ Hombros o espalda
☐ Otras localizaciones

Árbol Genealógico:

Lugar de nacimiento (Pueblo, Provincia)

- ☐ Abuelo materno: _____, _____
☐ Abuela materna: _____, _____
☐ Abuelo paterno: _____, _____
☐ Abuela paterna: _____, _____

Exposición solar

- ☐ No
☐ Ocasional
☐ Habitual
☐ Rayos UVA
 Comentar: _____

Nevus

- ☐ < 10
☐ 10-25
☐ 25-50
☐ 50-100
☐ >100
☐ Síndr. Nevus Hereditario
- ☐ Hombros
☐ Brazos
☐ Manos
☐ Cara
☐ Espalda
☐ Piernas

Quemaduras en la infancia

- ☐ Muchas
☐ Pocas
☐ No
☐ No sabe

Léntigos solares

- ☐ Muchos
☐ Pocos
☐ No
☐ Cara
☐ Brazos y manos
☐ Hombros o espalda
☐ Otras localizaciones

Uso de fotoprotector

- ☐ No
☐ Ocasional
☐ Siempre

Fototipo: I II III IV V VI

Color piel no fotoexpuesta

- ☐ Muy clara (no se broncea)
☐ Clara
☐ Morena clara
☐ Morena
☐ Morena oscura

Color pelo

- ☐ rojo
☐ rubio
☐ castaño claro
☐ castaño oscuro
☐ negro

Color ojos

- ☐ azul/ gris
☐ verde
☐ castaño claro
☐ castaño oscuro
☐ castaño muy oscuro

Capacidad Bronceado

- ☐ Siempre se quema, nunca se broncea.
☐ Usualmente se quema, a veces se broncea
☐ Algunas veces se quema, se broncea con cierta facilidad
☐ Nunca se quema, siempre se broncea

Cáncer cutáneo:

- ☐ Sí
☐ Melanoma
☐ Carcinoma basocelular
☐ Escamoso/Espinocelular
☐ No sabe
☐ No

Otros tumores:

Antecedentes familiares cáncer cutáneo:

- ☐ Sí ¿Quién? _____
☐ Melanoma
☐ Carcinoma basocelular
☐ Escamoso/Espinocelular
☐ No sabe
☐ No
☐ No sabe

Otros tumores:

Eféli des familiares:

En caso afirmativo, ¿cuántas y dónde?

- ☐ Madre: _____
☐ Padre: _____
☐ Hermano: _____
☐ Hermana: _____

Observaciones:

Proyecto de Investigación titulado: **GENÉTICA DE LA PIGMENTACIÓN HUMANA Y EL CÁNCER DE PIEL EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA.**

Se solicita su participación en este Proyecto de Investigación, cuyo objetivo principal determinar y analizar la predisposición genética de la población española a los diferentes tipos cánceres de piel, incluyendo el melanoma, mediante estudios genéticos de los genes involucrados en la pigmentación humana. En este estudio participa un grupo de investigación del Departamento de Medicina de la Universidad Jaume I de Castellón.

La identificación de posibles factores genéticos relacionados con el cáncer de piel podría beneficiar en un futuro a los pacientes que padecen dicha enfermedad y podrá contribuir a un mejor conocimiento, prevención y tratamiento de esta enfermedad.

Si usted decide participar, se le realizará un cuestionario y se le tomará una muestra de saliva para obtener las muestras de ADN. El ADN es un elemento que está presente en todas sus células, lo ha recibido de sus padres y lleva un código en forma de "genes" que determina sus características físicas personales (como el color de ojos, de piel, etc.) y su predisposición a diversas enfermedades. Las diferencias entre unas personas y otras nos pueden ayudar a explicar por qué algunas personas desarrollan unas enfermedades y otras no.

Se le pedirá su consentimiento para que con su saliva se hagan 2 cosas:

- 1.- Que acepte que en el ADN de su saliva se estudien varios genes relacionados con sus rasgos de pigmentación y tolerancia al sol, además de con su predisposición a los diferentes tipos de cáncer de piel.
- 2.- Es probable que en un futuro se descubran más genes que puedan estar también involucrados en el cáncer cutáneo. Por ello se le solicita que autorice al Investigador a almacenar su muestra para el estudio de otros genes que se puedan descubrir en el futuro. Esta muestra sólo se utilizará para estudiar genes importantes implicados en la patología del cáncer cutáneo. Nunca se realizarán otros estudios con ella.

Toda la información relacionada con el estudio es estrictamente confidencial, y el equipo investigador que lleve a cabo el análisis genético nunca conocerá su identidad. Los resultados del estudio podrán ser comunicados en congresos médicos o publicaciones científicas. Sin embargo, se mantendrá siempre una estricta confidencialidad sobre la identidad de los participantes.

Si Ud. precisa mayor información sobre este estudio puede contactar con el Investigador principal, D. Conrado Martínez (Nº Teléfono: 964 387607 / E-mail: ccadenas@uji.es), o con Bárbara Hernando (E-mail: hernandb@uji.es) del Departamento de Medicina de la Universidad Jaume I de Castellón
He sido informado adecuadamente del estudio y de los temas que de ellos se derivan y acepto voluntariamente participar en el estudio.

En....., a..... de de 20

Nombre del profesional: _____ DNI nº: _____

Firma:

Proyecto de Investigación titulado: **GENÉTICA DE LA PIGMENTACIÓN HUMANA Y EL CÁNCER DE PIEL EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA.**

Se solicita su participación en este Proyecto de Investigación, cuyo objetivo principal determinar y analizar la predisposición genética de la población española a los diferentes tipos cánceres de piel, incluyendo el melanoma, mediante estudios genéticos de los genes involucrados en la pigmentación humana. En este estudio participa un grupo de investigación del Departamento de Medicina de la Universidad Jaume I de Castellón.

La identificación de posibles factores genéticos relacionados con el cáncer de piel podría beneficiar en un futuro a los pacientes que padecen dicha enfermedad y podrá contribuir a un mejor conocimiento, prevención y tratamiento de esta enfermedad.

Si usted decide participar, se le realizará un cuestionario y se le tomará una muestra de saliva para obtener las muestras de ADN. El ADN es un elemento que está presente en todas sus células, lo ha recibido de sus padres y lleva un código en forma de "genes" que determina sus características físicas personales (como el color de ojos, de piel, etc.) y su predisposición a diversas enfermedades. Las diferencias entre unas personas y otras nos pueden ayudar a explicar por qué algunas personas desarrollan unas enfermedades y otras no.

Se le pedirá su consentimiento para que con su saliva se hagan 2 cosas:

1.- Que acepte que en el ADN de su saliva se estudien varios genes relacionados con sus rasgos de pigmentación y tolerancia al sol, además de con su predisposición a los diferentes tipos de cáncer de piel.

2.- Es probable que en un futuro se descubran más genes que puedan estar también involucrados en el cáncer cutáneo. Por ello se le solicita que autorice al Investigador a almacenar su muestra para el estudio de otros genes que se puedan descubrir en el futuro. Esta muestra sólo se utilizará para estudiar genes importantes implicados en la patología del cáncer cutáneo. Nunca se realizarán otros estudios con ella.

Toda la información relacionada con el estudio es estrictamente confidencial, y el equipo investigador que lleve a cabo el análisis genético nunca conocerá su identidad. Los resultados del estudio podrán ser comunicados en congresos médicos o publicaciones científicas. Sin embargo, se mantendrá siempre una estricta confidencialidad sobre la identidad de los participantes.

Si Ud. precisa mayor información sobre este estudio puede contactar con el Investigador principal, D. Conrado Martínez (Nº Teléfono: 964 387607 / E-mail: ccadenas@uji.es), o con Bárbara Hernando (E-mail: hernandb@uji.es) del Departamento de Medicina de la Universidad Jaume I de Castellón. He sido informado adecuadamente del estudio y de los temas que de ellos se derivan y acepto voluntariamente participar en el estudio.

En....., a..... de de 20

Nombre:

DNI nº:

Firma:

El profesional: