

Determinación de perfiles genéticos en población afrodescendiente del Chota, provincia de Imbabura-Ecuador, caracterizados por 17 STR's-PCR, a partir de ADN purificado y almacenado tanto a temperatura ambiente como en refrigeración

Tatiana Bermeo¹, Dr. Marcelo Grijalva¹, Ing. Pedro Romero¹ & Dr. Ángel Guevara²

¹Escuela Politécnica del Ejército, Facultad de Biotecnología. Sangolquí-Ecuador. E-mail: tatianabermeo@yahoo.com. rmgrijalva@espe.edu.ec. prromero@espe.edu.ec

²Laboratorio de ADN. Fiscalía General del Estado. Quito-Ecuador. E-mail: guevaraa@fiscalia.gob.ec

RESUMEN

A fin de estimar la diversidad genética en población afroecuatoriana del Valle del Chota, Imbabura-Ecuador, se analizaron alelos en 17 STR's autosómicos de 100 individuos no relacionados mediante amplificación por PCR y análisis por electroforesis capilar y también 16 microsátélites del cromosoma "Y". Paralelamente se probó la efectividad del almacenamiento de ADN a temperatura ambiente y -80°C. El marcador más polimórfico e informativo fue PENTA E y todos los marcadores mostraron estar en equilibrio ($p > 0.05$); además los sistemas son óptimos para formar bases de datos propias de la región y ser usados en pruebas forenses y de paternidad. En cromosoma "Y" se estimó el haplogrupo en las muestras. En cuanto a las muestras de ADN fueron cuantificadas posterior al almacenamiento a temperatura ambiente y -80°C sin presentar variación significativa en su concentración y los perfiles genéticos obtenidos posterior al almacenamiento fueron legibles e idénticos a los iniciales.

Palabras clave: afroecuatorianos, frecuencias alélicas, almacenamiento

ABSTRACT

In order to estimate genetic diversity in afro population of the Chota valley, Imbabura-Ecuador, alleles were analyzed in 17 autosomal STR's of 100 unrelated persons by means of PCR amplification and analysis by capillary electrophoresis and also 16

microsatellites of the chromosome "Y". Simultaneously investigate the effectiveness of storage DNA at room temperature and -80°C. The most polymorphic and informative marker was PENTA E and all markers showed to be in equilibrium ($p > 0.05$); also the systems are good to form data's bases of the region and also to be used in forensic and paternity testing. In "Y" chromosome haplogroup was estimated in the samples. As for the DNA samples were quantified after storage at room temperature and -80 ° C without showing significant variation in concentration and genetic profiles obtained after storage were legible and identical to the original.

Key words: Afroecuadorian, allele frequencies, storage

Aceptado: 10-07-2012

INTRODUCCIÓN

En los laboratorios forenses, hospitales, clínicas y laboratorios clínicos se manejan grandes cantidades de muestras biológicas y su almacenamiento se lo realiza en ultra congeladores lo cual no es conveniente porque el equipo emite vapores al ambiente, ocupa grandes espacios físicos, consume mucha energía y si hay un daño en su funcionamiento se producen fluctuaciones de temperatura que afectan a las muestras; por lo que se plantea el almacenamiento de muestras de ADN a temperatura ambiente que es un almacenamiento amigable con el medio, ocupa espacios reducidos, supera los inconvenientes de transporte ya que no necesita refrigeración y a bajos costos, basándose en el principio de anhidrobiosis para mantener las muestras evitando los eventos adversos del enfriamiento (Lee *et al.*, 2010).

Esta técnica de almacenamiento mantiene el ADN estable, protegido y viable a largo plazo para ser usado en PCR, secuenciación, análisis con STR's, entre otras técnicas de biología molecular (Lee *et al.*, 2010; Biomátrica, 2011).

Referente a la población afroecuadoriana; actualmente los descendientes africanos en nuestro país constituyen el 8% de la sociedad ecuatoriana, siendo uno de los grupos étnicos más representativos en las regiones noroccidental y norte del país, en la provincia de Esmeraldas y Valle del Chota respectivamente (Codae, 2011).

Pese a ello y tomando en cuenta la importancia demográfica y sociocultural de dicha población en Ecuador, hay escasez de estudios enfocados a la caracterización genética de afroecuatorianos, (González *et al.*, 2005), datos que sirven para realizar inferencias sobre la historia evolutiva de estos grupos poblacionales, análisis forenses y paternidad y seguimiento de enfermedades. Varias investigaciones a nivel mundial han encontrado que las poblaciones humanas aisladas y las que cuentan con distintas contribuciones étnicas se diferencian respecto a su composición genética (Guauque *et al.*, 2009). Los afrodescendientes del Valle del Chota son una población considerada como aislada ya que su asentamiento no rebasa los límites de

dicho valle -sin tomar en cuenta por supuesto la migración- (Codae, 2011).

En base a lo anterior en este estudio se caracterizó a la población afroecuatoriana del Valle del Chota al norte del país, mediante análisis de microsatélites (*STR's*) autosómicos, a fin de observar su estructuración genética y parámetros poblacionales de interés forense y en paternidad

(González *et al.*, 2005; Obs. pers, 2011).

Es importante resaltar que las pruebas de paternidad y forenses deben basar sus análisis en datos estadísticos poblacionales relacionados con las frecuencias alélicas de los diferentes marcadores moleculares en las poblaciones y etnias de las cuales provienen (Guauque *et al.*, 2009).

METODOLOGÍA

La fase de campo se realizó en dos puntos geográficos: la comunidad de San Juan de Ilumán y el Valle del Chota, en la Provincia de Imbabura-Ecuador. La fase experimental se llevó a cabo en el laboratorio de ADN de la Fiscalía General del Estado.

Muestras biológicas: se extrajo de 3-5ml de sangre periférica en tubos EDTA junto con sus respectivos consentimientos informados. También se tomaron resultados, del banco de datos del laboratorio, de perfiles genéticos de población mestiza de la provincia de Imbabura; cabe recalcar que las muestras de indígenas y mestizos se colectaron y analizaron con el objetivo de servir de referencia para el análisis poblacional.

Extracción de ADN de sangre periférica: se realizó usando el kit comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit de Promega, mediante el procedimiento descrito en el respectivo manual.

Análisis cuantitativo de ADN extraído: para determinar la concentración de ADN (ng/ul),

mediante PCR en tiempo real usando el Kit de Fluometría Quantifiler™ Human. Se realizó en un inicio y luego del almacenamiento a -80°C y a temperatura ambiente. La variación en la concentración de ADN se contrastó con una prueba de Tukey y para determinar la viabilidad del ADN almacenado se realizó nuevamente perfiles genéticos.

Almacenamiento del ADN extraído: El almacenamiento del ADN extraído se realizó la mitad del volumen de las muestras a -80°C y la otra mitad a temperatura ambiente. Para el almacenamiento al ambiente se usó placas de Biomatrix, alíquotando 10ul de cada muestra en cada pocillo, se selló y controló la temperatura y humedad relativa por tres meses.

Determinación del haplotipo y genotipo

STR's del cromosoma Y: A los hombres de población negra e indígena se les realizó análisis del cromosoma Y con el kit comercial Y-filer para determinar el haplogrupo.

STR`s autosómicos:

Reacción en cadena de la polimerasa: con el kit Power Plex 18D, en el equipo GeneAmp PCR System 9700. Del ADN cuantificado se realizó diluciones para llegar a una concentración de 1-5ng/ul; se colocó 15ul de muestra, 5ul de primer y 5ul de master.

Perfiles genéticos: se preparó un master mix con 9ul de formamida y 1ul del reactivo CCS_ILS_500, se alíquotó 10ul de master mix en placas más 1ul de la muestra amplificada. Las muestras luego se sometieron a denaturación

(96°C por 3 minutos) e inmediatamente a shock térmico y se introdujeron al equipo 3130 GeneticAnalyzer. Los perfiles genéticos se obtuvieron en un inicio al extraer el ADN de las muestras (ADN extraído fresco) y posterior al almacenamiento (ADN almacenado tanto a temperatura ambiente como a -80°C).

Análisis genético: se realizó el cálculo de frecuencias alélicas, parámetros de interés forense, equilibrio de Hardy-Weinberg y distancias genéticas entre poblaciones.

RESULTADOS

Se registraron cuatro cuantificaciones: las iniciales, a los dos y tres meses de almacenamiento al ambiente (placa1 y placa2 respectivamente) y a los tres meses de almacenamiento a -80°C. Según el análisis de varianza (prueba de Tukey) no se observa traslape en los cuatro tratamientos ni diferencia significativa en la concentración de ADN posterior a su almacenamiento por los dos métodos, valor de $p = 0.5620$ (Ver Figura 1).

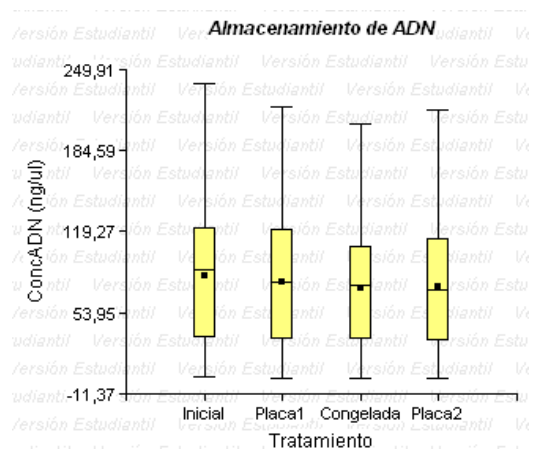


Figura 1. Cuantificación de ADN. En el eje "X" los tratamientos aplicados; en el

eje "Y" la concentración de ADN en ng/ul.

En el análisis de STR`s posterior al almacenamiento los perfiles que se obtuvieron coincidieron en su totalidad a los que se obtuvo en un inicio sin ninguna diferencia o distorsión (Ver Figura 2).

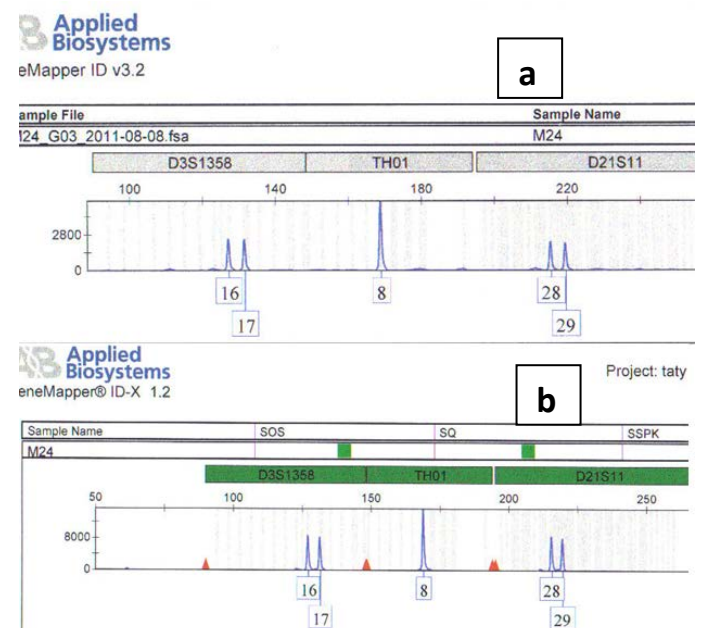


Figura 2. Parte de dos electroferogramas de la muestra 24 de población afroecuatoriana. **a.** Perfil genético obtenido a partir de ADN extraído fresco. **b.** Perfil genético obtenido a partir de ADN reconstituido de la placa 2, almacenada a temperatura ambiente por tres meses. En los dos perfiles todos los alelos en los marcadores coinciden y los picos hallados tienen el mismo patrón, altura y posición en el electroferograma corroborando que el ADN se mantuvo estable y viable, también se aprecia nitidez sin distorsión o contaminación.

En el análisis poblacional la distribución alélica encontrada es muy variada y amplia yendo desde el alelo 2.2 hasta el 46.2. Los sistemas más polimórficos fueron D18S51 con 11 alelos, PENTA D y D19S433 con 12 alelos, D21S11, FGA, PENTA E con 13, 14 y 16 alelos respectivamente; mientras que los sistemas menos polimórficos fueron TH01, D3S1358 y D16S539 con 6 alelos. Varios marcadores presentaron alelos con una frecuencia de 0.5%. Es importante resaltar al marcador PENTA D y específicamente la frecuencia presentada por el alelo 2.2 que en esta población es de 0.065, mientras que en población mestiza es apenas de 0.005 y en población indígena está ausente.

De los 17 marcadores analizados los más informativos, tomando en cuenta el parámetro de heterocigosidad esperada fueron PENTA E ($H_e = 0.91$), D19S433 ($H_e = 0.89$), D18S51 y FGA ($H_e = 0.88$), PENTA D ($H_e = 0.87$), D2S1338 ($H_e = 0.86$); los menos informativos D5S818 ($H_e = 0.73$) y D3S1358 ($H_e = 0.71$). Dicha informatividad se corroboró con los valores de PIC: PENTA E, D2S1338, FGA, D18S51, PENTA D, con 0.89, 0.875, 0.874, 0.86 y 0.85 respectivamente; los menos

informativos D5S818 (0.68) y D3S1358 (0.65).

La capacidad discriminadora genotípica que presentan los 17 marcadores analizados tienen un comportamiento similar a la H_e y el PIC, en donde se observó que el STR con mayor capacidad de discriminación es PENTA E (0.976) y el de menor PD fue D3S1358 (0.86). Los valores observados de probabilidad de exclusión (PE) e índice típico de paternidad (ITP) nos indican de la misma forma que los marcadores con mayor capacidad de exclusión son: D2S1338 (PE=0.83, ITP=6.25), D18S51 (PE=0.81, ITP=5.55), PENTA E y FGA (PE=0.79, ITP=5.0); y los STR's con menor capacidad de exclusión fueron: TPOX (PE=0.32, ITP=1.35), D13S317 (PE=0.36, ITP=1.47), D3S1358 (PE=0.47, ITP=1.85).

En cuanto al análisis de equilibrio, las distribuciones genotípicas para los 17 marcadores analizados estuvieron acordes con el equilibrio de Hardy-Weinberg ($p > 0.05$).

Con los datos de alelos autosómicos se determinó la distancia entre las tres poblaciones y se calculó el valor F_{ST} . La distancia genética entre indígenas y afroecuatorianos fue 0.059 mientras que entre indígenas y mestizos hay la distancia más corta 0.0054 corroborándose mayoritariamente el componente amerindio en la población mestiza.

Se determinaron los haplotipos en cromosoma Y de 43 individuos afroecuatorianos y 31 indígenas, de los cuales se estableció su haplogrupo, es decir el grupo racial al que pertenecen dichas poblaciones.

DISCUSIÓN

Las placas de Biomatrix contienen un polímero que cuando se le añade ADN permite el almacenamiento en seco del material a temperatura ambiente. El polímero puede proteger el ADN mediante la formación de una capa protectora a su alrededor, formando una barrera contra la degradación y pérdida.

En cuanto a concentración de ADN posterior al almacenamiento no hubo diferencia significativa entre la concentración inicial y la concentración luego de -80°C y temperatura ambiente es decir en este caso el F. Calculado fue menor al de F tabulado (5%) con una confiabilidad del 95%, ($0,68 < 3,46$), por lo que se acepta la hipótesis nula señalando que los tratamientos son similares y se corrobora esto con el valor $p = 0.5620$.

Esto permite afirmar que el almacenamiento a temperatura ambiente usando las placas de Biomatrix es óptimo porque el ADN se mantuvo viable y no se detectó inhibición o contaminación (por parte del polímero que encapsula al ADN en las placas puesto que no se usó ningún método de purificación del ADN y este fue usado directamente en el análisis de STR's) posterior al almacenamiento ya que los perfiles genéticos fueron totalmente legibles e idénticos a los iniciales sin presencia de artefactos inespecíficos. Estudios similares se llevaron a cabo por Lee *et al.*, 2010; Muller *et al.*, 2010; Bonnet *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011 con iguales resultados. La placa 2 se almacenó por tres meses al igual que las muestras a -80°C por lo tanto comparando las dos el mejor

tratamiento fue placa 2 con una media de 74.50 respecto a la media de -80°C que fue 73.27.

La temperatura ambiente promedio fue de 23°C y la humedad relativa 25-33%, datos comparables con los trabajos de Lee *et al.*, 2011 donde afirman que la humedad relativa debe ser menor a 50%; Lee *et al.*, 2010 donde las condiciones fueron 22.1°C y 40% HR; y similar también al trabajo de Muller *et al.*, 2010 donde las condiciones halladas fueron 22.4°C y 38% HR.

STR's AUTOSÓMICOS

Diversidad genética (Frecuencias alélicas y valor de diversidad), equilibrio y parámetros de interés forense

La distribución alélica en el presente estudio fue muy variada y amplia para cada marcador yendo desde el alelo 2.2 hasta el 46.2 y concordante con los hallazgos de González, 2006; Hincapié *et al.*, 2009; Quintero *et al.*, 2009; donde se muestra como sistema más polimórfico a PENTA E, característica que lo hace ser más informativo; mientras que los sistemas menos polimórficos en este trabajo fueron TH01 (concordante con Hincapié *et al.*), D3S1358 (concordante con González, 2006) y D16S539. Todos los marcadores se comportan de la forma indicada para los parámetros de interés forense: heterocigosidad esperada, contenido de información polimórfica, poder de discriminación, probabilidad de exclusión e índice típico de paternidad.

Los marcadores que presentaron alelos con una frecuencia de 0.5% resultan muy favorables en el momento de aplicarlos en pruebas de parentesco biológico o pruebas forenses. Su baja frecuencia y por ende baja probabilidad de encontrarse en nuestra población, los hace marcadores ideales que pueden ser ampliamente discriminativos a la hora de una evaluación estadística (Quintero *et al.*, 2009; Callisaya, 2007).

Se tiparon 17 STR's contenidos en el kit Power Plex 18D en individuos afroecuatorianos (n=100), mestizos (n=100); el total de la muestra para cada población equivale a 200 cromosomas independientes, número adecuado para establecer frecuencias alélicas representativas de la región y encontrar alelos con frecuencia igual o mayor a 5% (Quintero *et al.*, 2009). Para la población indígena estudiada (n=50, el total de la muestra equivale a 100 cromosomas independientes).

En población indígena se observó desequilibrio en los marcadores D21S11 y D16S539, para explicar esto hay dos posibilidades: la primera, que no se haya verificado los niveles de endogamia presente en la población y la segunda que la cantidad de cromosomas (100 como se mencionó anteriormente) analizados son insuficientes para generar una distribución alélica más representativa para el estudio (Callisaya, 2007); además del factor herocigocidad (0.76 y 0.72 respectivamente), lo que indica un déficit de heterocigotos en esos marcadores.

En mestizos se vio desequilibrio en el marcador vWa, a pesar de ser una

muestra representativa el desequilibrio se explica nuevamente por el valor de He: 0.65 (déficit de heterocigotos); siendo éste el único sistema STR que apporto significativamente a la poca diferenciación detectada. Sin embargo tanto en población indígena como mestiza el uso de los 17 marcadores en conjunto son útiles para su aplicación tomando en consideración que es indispensable utilizar las frecuencias mínimas para los marcadores en desequilibrio al momento de realizar cálculos de criminalística y pruebas de paternidad.

En población afroecuatoriana el análisis para el equilibrio indicó que los 17 marcadores analizados estuvieron acordes con el equilibrio de Hardy-Weinberg ($p > 0.05$) hallazgo concordante con González, 2006 donde se tiparon 104 individuos de la misma raza.

Haciendo una evaluación general de las frecuencias que presenta esta población en cada marcador para los distintos alelos posibles, se verifica notoriamente una amplia distribución alélica por tanto un elevado polimorfismo genético en esta población, esta afirmación se respalda por la diversidad genética cuyo valor es igual a 0.81.

Acorde a lo afirmado por Callisaya, 2007, en este trabajo tanto el equilibrio como las frecuencias y valores de parámetros de interés forense obtenidos, reflejan que el sistema es óptimo y permiten deducir que los valores reportados sirven para formar bases de datos propias de la región y útiles en el análisis probabilístico en la

identificación de individuos (pruebas forenses y de parentesco biológico).

En relación a Penta D, se debe tomar en cuenta que el alelo 2.2 para población afroecuatoriana del Valle del Chota reporta un valor igual a 0.065 siendo relativamente elevado en relación a otras poblaciones (indígena -ausente- y mestiza -0.005- de la provincia de Imbabura), considerando además que resultados similares se hallaron en el trabajo de González, 2006 con un valor de 0.089 para dicho alelo en población afroecuatoriana y 0.004 en mestizos de Ecuador. Esto lleva a pensar que el alelo 2.2 se encuentra mayoritariamente en el componente genético de población negra.

En cuanto a los valores de diversidad genética, los indígenas mostraron la diversidad más baja (0.725), en los trabajos de González, 2006 y Bortolini *et al.*, 2003 también se describe una menor variabilidad para grupos amerindios, mientras que la diversidad en mestizos (0.759) y afroecuatorianos (0.81) fue mayor, hallazgo similar a los reportados en las citas anteriores.

Distancia genética

El uso del R_{ST} cuando se analizan sistemas multilocus, se justifica dado que es un estimador útil de estructura genética poblacional, cuando las mutaciones han contribuido de manera sustancial a las diferencias alélicas que hay entre poblaciones; en este trabajo lo que se encontró fueron repeticiones imperfectas (alelos incompletos ejemplo: 9.3) más no mutaciones escalonadas por lo tanto no se usó el parámetro R_{ST} , únicamente el F_{ST} que

además de ser un parámetro de distribución estadística, revela algunas propiedades del proceso evolutivo que han permitido la divergencia entre poblaciones (González, 2006; Hincapié *et al.*, 2009).

Así se observó una diferencia entre población afroecuatoriana respecto a la indígena y mestiza de la zona de estudio. Los valores F_{ST} evidencian una relación en estructura genética entre población indígena y mestiza de la provincia de Imbabura.

STR`s DEL CROMOSOMA Y

La mayoría de grupos haploides están restringidos geográficamente de modo que la proporción de cromosoma Y en cada población se estimó prediciendo el haplogrupo mediante su haplotipo y se asignó las siguientes categorías: nativos americanos Q, europeos R1b, otros europeos E3b-G-J-I-R1a, africanos E3a, otros. La composición haplotípica se encuentra en tablas y figuras precedentes.

La población afroecuatoriana se compone de una mezcla 56.63% africana, 28.57% europea, 0.231% amerindia y ~14% otros; comparando con valores en población afroecuatoriana y brasileñas obtenidos por González, 2006 y Abe-Sandes *et al.*, 2004 respectivamente, se observa similitud; respecto a la primera cita 14% Q, 11% R1b, 41% E3a, 28% otros y la segunda referencia 47-77% E3a, 23-48% R1b, 0-4% nativos americanos.

La población indígena se compone de una mezcla amerindia 66.45%, otros ~26% y 6.3% de origen europeo putativo este último dato es interesante

ya que en el trabajo de Bortolini *et al.*, 2003 se aprecia una composición similar en grupos indígenas como 11% en Guaraní e Ingano, 14% en Kaingang; además en el estudio de González, 2006

se encontró un 7% de cromosoma Y de origen europeo en población Kichwa, 78% Q y 17% otros, lo cual es similar a los resultados obtenidos en este trabajo.

CONCLUSIONES

- Este estudio representa un nuevo aporte a la caracterización de STR's autosómicos en población afroecuatoriana (Valle del Chota), indígenas (Ilumán) y mestizos de la provincia de Imbabura y es el primer informe para las frecuencias de D2S1338 y D19S433 en población Ecuatoriana.

- En población afroecuatoriana muestran diferencia en las características genéticas con respecto a otras poblaciones.

- Los sistemas son óptimos y sirven para formar bases de datos propias de la región y útiles en el análisis probabilístico en pruebas forenses y de paternidad; en población indígena y mestiza el uso de los diecisiete marcadores en conjunto son viables para su aplicación utilizando las frecuencias mínimas para los marcadores en desequilibrio.

- La población afroecuatoriana presento mayor diversidad genética (0.81), seguido de la población mestiza (0.759) y la población indígena (0.725).

- La distancia genética entre población indígena y mestiza fue más corta (0.0054) y entre indígenas y afroecuatorianos se observó la mayor distancia (0.059).

- La incidencia del alelo 2.2 en población afroecuatoriana fue mayor respecto a otras poblaciones.

- La población afroecuatoriana se compone de una mezcla 56.63% africana, 28.57% europea, 0.231% amerindia y ~14% otros mientras que la población indígena se compone de una mezcla amerindia 66.45%, 6.3% de origen europeo putativo y otros ~26%.

- La concentración de ADN no varió significativamente luego del almacenamiento a temperatura ambiente y -80°C y los perfiles genéticos obtenidos posterior al almacenamiento fueron legibles e idénticos a los iniciales.

- Las muestras de ADN re-hidratadas fueron usadas directamente sin previa purificación y no presentaron interferencia ni inhibición en el análisis de STR's.

- El mejor tratamiento a los tres meses de almacenamiento fue placa 2 (a temperatura ambiente) con una media de 74.50.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda aumentar el tamaño de la muestra en aquellos marcadores que presentaron desequilibrio genético y frecuencias alélicas menores a las mínimas.
- Realizar comparaciones entre población afroecuatoriana del Valle del Chota y de la provincia de Esmeraldas para determinar la incidencia del alelo 2.2 y su posible asociación a alguna enfermedad o resistencia genética.
- Educar y asesorar al ente judicial sobre el manejo y las virtudes de utilizar esta herramienta como método identificatorio constituyéndose un medio casi infalible a la hora de determinar vínculos familiares o la incriminación de una persona en un hecho criminal.
- Iniciar ensayos de almacenamiento de ADN procedente de evidencias forenses que tengan concentraciones de ADN mínimas para probar la validez del sistema.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe-Sandes, K., Silva, W.A., Zago, M.A. (2004). Heterogeneity of the Y chromosome in Afro-Brazilian populations. *Hum Biol.* 76: 77-86.
- Almacenamiento de ADN a temperatura ambiente. Extraído el 06 de Mayo, 2011 del sitio Web: www.biomatrica.com
- Brinkman, B., Sajantila, A., Goedde, H.W., Matsumoto, H., Nishi, K., & Wiegand, P. (1996). Population genetic comparisons among eight populations using allele frequency and sequence data from three microsatellite loci. *Eur J Hum Genet*; 4: 175-182.
- Calisaya, R. (2007). Creación de una base de datos de frecuencias alélicas en población mestiza de la región andina bolivariana. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Carrera de Bioquímica. Tesis de grado para optar por el título de Licenciatura en Bioquímica. La Paz-Bolivia.
- Crowe, J., Hoekstra, F., Crowe, L. (1992). Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 579-599.
- Crowe, J., Crowe, L., Oliver, A., Tsvetkova, N., Wolkers, W., & Tablin, F. (2001). The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology* 43: 89-105.
- González, F., Sánchez, D., & Martínez, B. (2005). Genetic analysis of the Amerindian Kichwas and Afroamericandescendents populations from Ecuador characterized by 15 STR-PCR polymorphisms. *Forensic Science International* 160: 231-235.
- González, F., Sánchez, D., & Martínez, B. (2006). El Mestizaje Genético en Ecuador y su Aplicación Médico Forense. *Ciencia Forense*, 8: 133-154.
- González, J. (2006). Análisis molecular de variación de polimorfismos STR

autonómicos y de cromosoma Y en grupos étnicos de Ecuador con aplicación médico – forense. Universidad de Zaragoza. Facultad de Medicina. Departamento de Anatomía Patológica, Medicina Legal y Forense y Toxicología.

Guauque, S., Fuertes, A., Cárdenas, H., & Barreto, G. (2009). Diversidad y Estructura Genética de Tres Poblaciones Afrodescendientes del Suroccidente Colombiano a Partir de 8 STR's. Departamento de Biología, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

Hincapié, M., Gil, A., Pico, A., Gusmão, L., Rondón, F., Vargas, C., & Castillo, A. (2009). Análisis de la estructura genética en una muestra poblacional de Bucaramanga, departamento de Santander. Colombia Médica Vol. 40 N° 4. pp. 361-72.

Lee, S., Clabaugh, K., Silva, B., Odigie, K., Coble, M., Loreille, O., Scheible, M., Fournay, R., Stevens, J., Carmody, G., Parsons, T., Pozder, A., Eisenberg, A., Budowle, B., Ahmad, T., Miller, R., & Crouse, C. (2011). Assessing a novel room temperature DNA storage medium for forensic biological samples. Forensic Science International: Genetics 700.

Lee, S., Crouse, C., & Kline, M. (2010). Optimizing Storage and Handling of DNA Extracts. Forensic Science Review 22:131.

Muller, R., Cohn, J., Munson, M., & Clement, O. (2010). Scientific evaluations of Biomatrica's technologies for room temperature storage and stabilization of biological

samples. Biomatrica the Biostability Company. Saving samples, time, space & energy.

Quintero, A., Padilla, J., Hernández, G., Valle, Y., Valdez, L., Olivares, N., & Rivas, F. (2009). Datos poblacionales de cinco STRs de la serie INTERPOL en una población mestiza del Occidente de México. Revista de Investigación Clínica / Vol. 61, Núm. 2, pp 104-109.

Rickards, O., Tartaglia, M., Martínez-Labarga, C., & Stefano, GF. (1994). Genetic characterization of the Cayapa Indians of Ecuador and their genetic relationships to other Native American populations. HumBiol Dec; 66(6):1127.

Rondón, F., Orobio, R., Braga, Y., Cárdenas, H., & Barreto, G. (2006). Estudio de Diversidad Genética de Cuatro Poblaciones Aisladas del Centro y Suroccidente Colombiano. Salud UIS 38:12-20.