

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

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

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

ZULMA TATIANA BERMEO MÁRMOL

SANGOLQUÍ, 10 de julio de 2012

## CERTIFICACIÓN

Dr. Marcelo Grijalva M. D; Ph. D.

Ing. Mat. Pedro Romero

### **Certifican:**

Que el trabajo titulado “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”, realizado por la Srta. ZULMA TATIANA BERMEO MÁRMOL, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a su importancia en genética humana y forense se recomienda su publicación.

El mencionado trabajo consta de dos documentos empastados y dos discos compactos los cuales contienen en formato portátil de Acrobat (PDF); autorizan a ZULMA TATIANA BERMEO MÁRMOL que lo entregue a ING. TATIANA PÁEZ, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

Sangolquí, 10 de julio de 2012

-----  
Dr. Marcelo Grijalva M. D; Ph. D.  
DIRECTOR DE TESIS

-----  
Ing. Mat. Pedro Romero  
CODIRECTOR DE TESIS

## **DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD**

Yo, Zulma Tatiana Bermeo Mármol

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “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”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 10 de julio de 2012

-----  
ZULMA TATIANA BERMEO MÁRMOL

# AUTORIZACIÓN

Yo, Zulma Tatiana Bermeo Mármol

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución, del trabajo “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”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 10 de julio de 2012

-----  
ZULMA TATIANA BERMEO MÁRMOL

## **DEDICATORIA**

Este trabajo lo dedico a mi familia.

**Tatiana Bermeo**

## **AGRADECIMIENTO**

Expreso mi agradecimiento al Laboratorio de ADN de la Fiscalía General del Estado y a su Coordinador, el Dr. Ángel Guevara E. MSc PhD por abrirme las puertas y brindarme la oportunidad, además de realizar mi tesis, de adquirir nuevos conocimientos y experiencia laboral; al personal del laboratorio Verónica Villegas, María Elisa Lara, Gisella Fiallos, Verónica Miño; al Doctor Aníbal Gaviria y Doctor Germán Burgos por su cooperación en el desarrollo del trabajo.

Al Dr. Marcelo Grijalva e Ing. Mat. Pedro Romero, por aportar en la dirección y codirección, respectivamente, de este trabajo.

También al Colegio Técnico Valle del Chota y al Lic. Luis Tejada por permitirme obtener las muestras y datos necesarios; así como al colegio San Juan de Ilumán.

Agradezco a mi familia Sulma, Ruth, Edith, Marcia por su amor y apoyo incondicional; en especial a mi madre por su esfuerzo, trabajo, enseñanzas continuas.

A mis amigas por los momentos vividos, el camino recorrido juntas, por su apoyo.

**Tatiana Bermeo**

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD .....	iii
AUTORIZACIÓN.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vii
LISTADO DE TABLAS .....	x
LISTADO DE CUADROS.....	xi
LISTADO DE FIGURAS.....	xii
LISTADO DE ANEXOS .....	xiv
NOMENCLATURA UTILIZADA .....	xv
RESÚMEN.....	xv
ABSTRACT .....	xvi
CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1    Formulación del problema.....	1
1.2    Justificación.....	2
1.3    Objetivos.....	4
1.3.1    Objetivo general .....	4
1.3.2    Objetivos específicos.....	4
1.4    Marco teórico.....	5
1.4.1    Biodiversidad étnica en el Ecuador .....	5
1.4.1.1    Pueblos afrodescendientes.....	5
1.4.1.2    Pueblos indígenas .....	6
1.4.2    Genética forense .....	8
1.4.2.1    ADN .....	8
1.4.2.2    Marcadores STR´s.....	10
1.4.2.2.1    Características .....	10
1.4.2.2.2    Nomenclatura.....	10
1.4.2.2.3    Clasificación .....	11
1.4.2.2.4    Mutaciones.....	12
1.4.2.2.5    Análisis multiplex.....	12
1.4.2.2.5.1    Marcadores autosómicos.....	12
1.4.2.2.5.2    Marcadores del cromosoma Y .....	13
1.4.2.2.5.3    Kits comerciales.....	14

1.4.2.2.5.4	Problemas con los análisis multiplex.....	15
1.4.2.3	Genética de poblaciones.....	17
1.4.2.3.1	Frecuencias alélicas .....	18
1.4.2.3.2	Parámetros estadísticos de interés forense.....	18
1.4.3	Almacenamiento de ADN a temperatura ambiente.....	20
1.4.3.1	Anhidrobiosis .....	20
1.4.3.1.1	Funcionamiento .....	21
1.4.3.1.2	Placas .....	23
1.5	Análisis de datos.....	24
1.6	Hipótesis .....	24
CAPÍTULO II.....		25
2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
2.1	Ubicación geográfica.....	25
2.2	Muestras biológicas .....	26
2.3	Extracción de ADN de sangre periférica.....	27
2.4	Análisis cuantitativo de ADN extraído.....	27
2.5	Almacenamiento del ADN extraído .....	28
2.6	Determinación del haplotipo y genotipo .....	28
2.6.1	STR`s del cromosoma Y .....	28
2.6.2	STR`s autosómicos .....	29
2.6.2.1	Reacción en cadena de la polimerasa.....	29
2.6.2.2	Perfiles genéticos.....	29
2.6.2.3	Análisis genético .....	30
CAPÍTULO III .....		30
3	RESULTADOS .....	30
3.1	Muestras biológicas .....	30
3.2	Almacenamiento de ADN .....	30
3.3	STR`s autosómicos .....	34
3.3.1	Frecuencias alélicas, equilibrio y parámetros de interés forense en población afroecuatoriana.....	34
3.3.2	Frecuencias alélicas, equilibrio y parámetros de interés forense en población indígena.....	39
3.3.3	Frecuencias alélicas, equilibrio y parámetros de interés forense en población mestiza .....	43
3.3.4	Valor de diversidad genética .....	47
3.3.5	Distancia genética.....	48
3.3.6	STR`s del cromosoma Y .....	49
CAPÍTULO IV .....		52



4	DISCUSIÓN.....	52
	CAPÍTULO V .....	58
5	CONCLUSIONES.....	58
	CAPÍTULO VI.....	60
6	RECOMENDACIONES .....	60
7	BIBLIOGRAFÍA.....	61
8	ANEXOS.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 3.1. Análisis de varianza (SC tipo III) de las muestras en los dos métodos de almacenamiento. 95% de confiabilidad.....	33
Tabla 3.2. Test de Tukey, Alfa=0,05; diferencia significativa mínima (DMS=20,16959) la cual permite determinar los pares de medias que son diferentes. No hay diferencia significativa entre las medias por tanto se clasifica a los tratamientos dentro de una misma categoría (letras iguales).....	33
Tabla 3.3. Frecuencias alélicas de 17 STR`s en una muestra poblacional (n=100) de afroecuatorianos del Valle del Chota, Imbabura – Ecuador. 2011.....	37
Tabla 3.4. Equilibrio de Hardy – Weinberg y parámetros de interés forense en una muestra poblacional (n=100) de afroecuatorianos del Valle del Chota, Imbabura – Ecuador. 2011.....	40
Tabla 3.5. Frecuencias alélicas de 17 STR`s en una muestra poblacional (n=50) de indígenas de San Juan de Ilumán, Imbabura – Ecuador. 2011.....	42
Tabla 3.6. Equilibrio de Hardy – Weinberg y parámetros de interés forense en una muestra poblacional (n=50) de indígenas de San Juan de Ilumán, Imbabura – Ecuador. 2011.....	44
Tabla 3.7. Frecuencias alélicas de 17 STR`s en una muestra poblacional (n=100) de mestizos de Imbabura – Ecuador. 2011.....	46
Tabla 3.8. Equilibrio de Hardy – Weinberg y parámetros de interés forense en una muestra poblacional (n=100) de mestizos de Imbabura – Ecuador. 2011.....	48
Tabla 3.9. Medidas de diversidad genética y un promedio de heterocigosidad de los 17 marcadores STR`s en cada población. ....	50
Tabla 3.10. $F_{ST}$ distancias genéticas basadas en 17 STR loci autosómicos.....	51
Tabla 3.11. Haplotipos del cromosoma Y observados en población afroecuatoriana del Valle del Chota; n=43, haplotipos encontrados = 35.....	51
Tabla 3.12. Haplotipos del cromosoma Y observados en población indígena de San Juan de Ilumán; n=31, haplotipos encontrados = 18.....	53
Tabla 3.13. Haplogrupos en las poblaciones afroecuatoriana del Valle del Chota e indígena de San Juan de Ilumán, Imbabura-Ecuador, establecidos a partir de los haplotipos encontrados con cromosoma Y.....	54

## LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1. Clasificación del ADN no codificante-repetitivo. En rojo ● : los STR's, son ADN repetitivo y son de interés en esta investigación (González, 2006).....	9
Cuadro 1.2. Clasificación de las secuencias STR`s (modificado de González, 2006; Butler, 2011; Callisaya 2007).....	11

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Representantes de la población afroecuatoriana del Valle del Chota, provincia de Imbabura. Tomadas al momento de extraer la muestra de sangre. Colegio Técnico Valle del Chota, Junio 2011.....	6
Figura 1.2. Representantes de la comunidad indígena de Ilumán, provincia de Imbabura. Tomada al momento de extraer las muestras de sangre. Colegio San Juan de Ilumán, Agosto 2011.....	7
Figura 1.3. Comparación de tecnologías de tipificación de ADN; donde se contrasta el poder de discriminación de la prueba multiplex de STR's vs. la velocidad del análisis (González, 2006).....	8
Figura 1.4. Ubicación en los cromosomas de los marcadores STR's más usados presentes en el kit Power Plex 18D de la casa comercial Promega.....	13
Figura 1.5. Tipos de amplificaciones inespecíficas que se pueden producir en análisis multiplex (modificado de Butler, 2001).....	16
Figura 1.6. Tardígrado <i>Echiniscus blumi</i> : pueden persistir durante meses o incluso años en el estado anhidrobiótico. La fisiología y bioquímica de la anhidrobiosis está enlazada a un sistema complejo que implica que muchos componentes moleculares diferentes trabajen juntos como bio protectores (Guidetti, 2007).....	21
Figura 1.7. Osmoprotección de proteínas por la trehalosa (un crioprotector): al disminuir el agua, se forma una capa protectora de trehalosa que atrapa el agua disponible quedando en contacto con la proteína. En la vecindad de la proteína, se incrementan los puentes de hidrógeno entre trehalosa-agua y trehalosa-trehalosa (Mascorro <i>et al.</i> , 2005).....	22
Figura 1.8. Las membranas biológicas son protegidas por la trehalosa durante la desecación evitando su fusión, cambio de fase y rompimiento (Mascorro <i>et al.</i> , 2005).....	23
Figura 2.1. <b>a.</b> Localización geográfica de San Juan de Ilumán. Parroquia rural de Otavalo, ubicada a 7km al suroeste de Ibarra, a una altura de 2600 m.s.n.m, con un clima templado y una temperatura media de 14°C. <b>b.</b> Localización geográfica del Valle del Chota. Ubicado a 47 km del cantón Ibarra en la frontera entre Imbabura y Carchi, con una altura de 1560 m.s.n.m y temperatura promedio de 25 C°. Fuente: Extraído el 8 de Octubre, 2011 del sitio Web: maps.google.com.....	26

Figura 2.2. Localización geográfica de la Fiscalía General del Estado. Fuente: extraído el 25 de Abril, 2011 del sitio Web: <a href="http://www.mapmonde.org">www.mapmonde.org</a> .....	27
Figura 2.3. Condiciones de amplificación para el Kit Power Plex 18D (Inserto de Promega).....	30
Figura 3.1. Cuantificación de ADN. En el eje “X” los tratamientos aplicados; en el eje “Y” la concentración de ADN en ng/ul. 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.....	33
Figura 3.2. Parte de dos electroferogramas de la muestra 24 de población afroecuatoriana. <b>a.</b> Perfil genético obtenido a partir de ADN extraído fresco. <b>b.</b> Perfil genético obtenido a partir de ADN reconstituido de la placa 2, almacenada a temperatura ambiente por tres meses. En los dos perfiles se observan los alelos 16-17 en el marcador D3S1358, 8-8 en el marcador TH01 y 28-29 en el D21S11; es decir 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.....	34
Figura 3.3. Temperatura ambiente a la cual se almacenó el ADN. En el eje “X”, el tiempo de almacenamiento (3 meses); en el eje “Y” la temperatura en grados centígrados. Se registraron tres tomas diarias a las 8am, 12 y 16pm.....	35
Figura 3.4. Humedad relativa a la cual se almacenó el ADN. En el eje “X”, el tiempo de almacenamiento (3 meses); en el eje “Y” el porcentaje de humedad relativa. Se registraron dos tomas diarias a las 8 am y 16 pm.....	35
Figura 3.5. Distancia genética entre las tres poblaciones analizadas.....	50
Figura 3.6. Representación gráfica de los haplogrupos encontrados en población afroecuatoriana e indígena.....	54

## LISTADO DE ANEXOS

<b>ANEXO A</b> Información de los STR's autosómicos mas comúnmente usados, incluyen los 13 del CODIS y otros de interés forense y disputa de paternidad. En negrilla los marcadores presentes en el kit power plex 18D, usado en este estudio (modificado de Butler, 2011).....	72
<b>ANEXO B</b> Alelos observados como producto de la PCR del marcador PENTA D. En amarillo el alelo 2.2, se ha visto mayores frecuencias de este alelo en población negra (modificado de Butler, 2011).....	73
<b>ANEXO C</b> Marcadores presentes en el kit Yfiler usado para análisis de STR's en cromosoma Y.....	75
<b>ANEXO D</b> Ladder plex 18D de Promega. Escalera alélica del kit Power Plex 18D....	76
<b>ANEXO E</b> Listado de los kits comerciales para análisis de STR's de las casas Promega y Applied Biosystems (Butler, 2011).....	78
<b>ANEXO F</b> Formato del consentimiento informado usado en este trabajo.....	79
<b>ANEXO G</b> Protocolo de extracción de ADN con el kit comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit de Promega.....	80
<b>ANEXO H</b> Protocolo usado para la cuantificación de ADN con el Kit de Fluometría Quantifiler™ Human.....	81
<b>ANEXO I</b> Perfiles genéticos de la muestra 24 procedentes del Valle del Chota, provincia de Imbabura-Ecuador, antes y después del almacenamiento.....	81
<b>ANEXO J</b> Frecuencias alélicas presentes en el marcador PENTA D en las tres poblaciones de estudio.....	85
<b>ANEXO K</b> Electroferograma de un haplotipo encontrado en población indígena.....	86
<b>ANEXO L</b> Fotografías.....	87

## NOMENCLATURA UTILIZADA

p: valor estadístico del equilibrio

ObsHe: heterocigosidad observada

ExpHe: heterocigosidad esperada

PM: probabilidad de match o coincidencia

PD: poder de discriminación

PIC: contenido de información polimórfica

PE: probabilidad de exclusión

ITP: índice típico de paternidad

$P_{\min}$ : frecuencia mínima

UR: unidades de repetición

HR: humedad relativa

## RESÚMEN

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". Los resultados se compararon con indígenas de Ilumán y mestizos, poblaciones de la misma provincia. Paralelamente se probó la efectividad del almacenamiento de ADN a temperatura ambiente y  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se determinaron las frecuencias alélicas con las que se calcularon parámetros de interés forense, equilibrio de Hardy-Weinberg, valor de diversidad genética y distancias entre las poblaciones. En afroecuatorianos el marcador mas polimórfico e informativo fue PENTA E y todos los marcadores mostraron estar en equilibrio ( $p > 0.05$ ). Este estudio representa un nuevo aporte a la caracterización de STR's autosómicos en población afroecuatoriana, indígenas y mestizos de la provincia de Imbabura, además de ser el primer informe para las frecuencias de D2S1338 y D19S433 en población Ecuatoriana. Los sistemas son óptimos por lo que los valores reportados sirven para formar bases de datos propias de la región además de ser útiles en la identificación de individuos (pruebas forenses y de parentesco biológico). En cuanto a las muestras de ADN fueron re-hidratadas posterior a su almacenamiento al ambiente, cuantificadas (su concentración no vario significativamente luego del almacenamiento a temperatura

ambiente y -80°C) y fueron usadas en el análisis de STR's directamente sin previa purificación, no presentaron interferencia ni inhibición en el análisis por lo que 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 ". The results were compared with Iluman indigenous and mestizo towns of the same province. Simultaneously investigate the effectiveness of storage DNA at room temperature and -80°C. Allele frequencies were determined to calculate parameters of forensic interest, Hardy-Weinberg equilibrium, value of genetic diversity and distances between towns. In Afro-ecuadorians the most polymorphic and informative marker was PENTA E and all markers showed to be in equilibrium ( $p > 0.05$ ). This study represents a new contribution to the characterization of autosomal STR 's in afro-ecuadorian population, indigenous and mestizos of the Imbabura province, also to be the first report for the frequencies of D2S1338 and D19S433 in Ecuadorian population. The systems are good so the values can be used to form data's bases of the region and also to be in the identifying of the people (forensic evidence and biological parentage). As for DNA samples were rehydrated and quantified after storage at room temperature (its concentration did not vary significantly after the storage at room temperature and -80°C) and they were used in the analysis of STR's directly without previous purification, there was no interference or inhibition in the analysis and the genetic profiles obtained after storage were legible and identical to the original.

**Key words:** Afroecuadorian, allele frequencies, storage



# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Formulación del problema

En los laboratorios forenses, hospitales, clínicas y laboratorios clínicos se manejan grandes cantidades de muestras biológicas y su almacenamiento se lo realiza en freezers lo cual produce inconvenientes tanto de funcionamiento del equipo que emite vapores al ambiente, ocupa grandes espacios físicos y consume mucha energía; así como el que las muestras deben mantenerse estables y protegidas del daño oxidativo en bancos de datos como evidencia, además de servir para repetir el análisis en caso de necesitarse. Por este motivo es indispensable y 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.

Referente a la población afroecuatoriana; 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, 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, seguimiento de enfermedades hereditarias e identificación de personas. 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). En este caso 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).

## 1.2 Justificación

La molécula de ADN, almacenada a bajas temperaturas puede sufrir alteraciones en su estabilidad y preservación debido a fluctuaciones en los ciclos de refrigeración y presencia de agua y oxígeno que promuevan la hidrólisis y daño oxidativo, por lo que se plantea el almacenamiento de ADN a temperatura ambiente en placas DNASTable de Biomatrix, las cuales usan el principio de anhidrobiosis para mantener las muestras evitando los eventos adversos del enfriamiento (Lee *et al.*, 2010).

Esta técnica de almacenamiento, además de mantener el ADN purificado\_ estable, protegido, en buen estado y viable a largo plazo, permite recuperar las muestras al rehidratarlas y ser compatibles con las siguientes aplicaciones sin implicación de alteración en los resultados:

- PCR, qPCR, secuenciación, análisis con STR's, amplificación de cualquier lugar del genoma, análisis de restricción.
- Transformación y clonación
- Tecnologías de microarrays

Al igual que el ADN humano, el material genético de microorganismos benéficos e infecciosos se mantiene estable y viable, de modo que sirve para vacunas o diagnóstico de enfermedades entre otras aplicaciones en medicina e industria (Lee *et al.*, 2010; Biomatrix, 2011)

Conjuntamente con el beneficio en investigación, medicina clínica y forense que ofrece el almacenamiento de ADN a temperatura ambiente, está el beneficio económico ya que no sería necesario invertir grandes cantidades de dinero en freezers que son costosos, ocupan espacios físicos grandes, consumen gran cantidad de energía eléctrica, además de las emisiones que emite, al usar placas DNAs se las puede apilar una sobre otra optimizando espacio y costos de una forma amigable con el ambiente.

Respecto a la determinación de perfiles genéticos en población afroecuatoriana, muestras tomadas de poblaciones específicas y consideradas aisladas ayudarán a elucidar características propias de las mismas, observar su composición genética para diferenciarla de otras etnias, estimar distancias genéticas con mayor confiabilidad y relevancia, estudios de ancestría, avances en medicina debido a que se ha encontrado ya sea resistencia o vulnerabilidad a enfermedades en los componentes genéticos y brindar patrones genéticos puntuales para identificación de personas y disputas de paternidad (Medina & Castro, 2010).

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

Debido a la heterogeneidad de la población ecuatoriana, se requieren bases de datos específicas para cada región del país y cada etnia, por tanto resulta imprescindible incrementar las bases de datos que brinden información genética de las poblaciones afroecuatorianas. Con base en lo anterior, se propone caracterizar alelos identificados por análisis de microsatélites (*STR's*) autosómicos en muestras poblacionales afrodescendientes del Valle del Chota al norte del país, a fin de observar su estructuración genética y parámetros poblacionales de interés forense y en paternidad disputada (González *et al.*, 2005; Obs. pers, 2011).

### 1.3 Objetivos

#### 1.3.1 Objetivo general

Determinar 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.

#### 1.3.2 Objetivos específicos

- Extraer y cuantificar ADN de muestras de sangre periférica en EDTA provenientes de individuos de descendencia afroecuatoriana del Chota-Ecuador.
- Realizar los perfiles genéticos de los individuos en estudio usando marcadores STR's autosómicos.
- Almacenar el ADN extraído por duplicado, la mitad a temperatura ambiente y la otra mitad en ultracongelación a -80°C.
- Reconstituir las muestras almacenadas al ambiente y comparar la estabilidad del ADN almacenado tanto a temperatura ambiente como en ultracongelación mediante cuantificación y análisis de perfiles genéticos.
- Determinar los haplogrupos de las muestras en cromosoma Y.
- Determinar frecuencias alélicas y comparar los resultados obtenidos en esta población afroecuatoriana con otras poblaciones.

## 1.4 Marco teórico

### 1.4.1 Biodiversidad étnica en el Ecuador

Ecuador es uno de los países que posee la mayor biodiversidad del planeta respecto a flora, fauna y también diversidad étnica humana, así negros, blancos, indios y mestizos que habitan nuestro país son el resultado de un complejo y largo proceso de fusión de varios grupos humanos (Rickards *et al.*, 1994).

Actualmente se ha observado un creciente interés en los estudios genéticos poblacionales en Latinoamérica debido a nuestra riqueza etnográfica. En los últimos cinco siglos varias poblaciones originales entraron en contacto, interactuaron entre sí y se mezclaron, produciendo el mestizaje; ellos son los amerindios (grupo derivado del Asia Central), los europeos (mayoritariamente Españoles), y los africanos (traídos como esclavos desde Guinea Ecuatorial) (Benítez & Garcés, 1989).

#### 1.4.1.1 Pueblos afrodescendientes

El tráfico de esclavos del Atlántico promovido por los imperios occidentales entre los siglos XV y XIX, provocó la movilización de al menos 11 millones de personas desde África. La población negra de Ecuador descende de estos esclavos africanos. La historia menciona su ingreso al país alrededor del año 1553 (año donde se registran los mayores cargamentos de esclavos) cuando aún no existía la República del Ecuador como tal y era conocida como la Real Audiencia de Quito (Estupiñan-Bass, 2006).

Son llamados afroecuatorianos (Ver Figura 1.1) a los descendientes de los esclavos que llegaron a América. Etimológicamente el nombre de afroecuatorianos proviene, de

afros=descendientes de África y ecuatorianos=nacidos en Ecuador. Su ubicación histórica data principalmente en Esmeraldas y el Valle del Chota.

El valle del Chota está situado a 34 Km. al norte de Ibarra, y está habitado casi en su totalidad por la comunidad afroecuatoriana con una población aproximada de 2.000 habitantes de raza negra (Codea, 2011).

Su introducción al valle fue debido a la disminución de la población indígena que trabajaba en las haciendas, por ese motivo estos esclavos fueron llevados en gran cantidad para suplantar la mano de obra, ellos se adaptaron muy bien al clima y condiciones, asentándose definitivamente en esta región geográfica luego de abolida la esclavitud en 1851 (Codea, 2011).

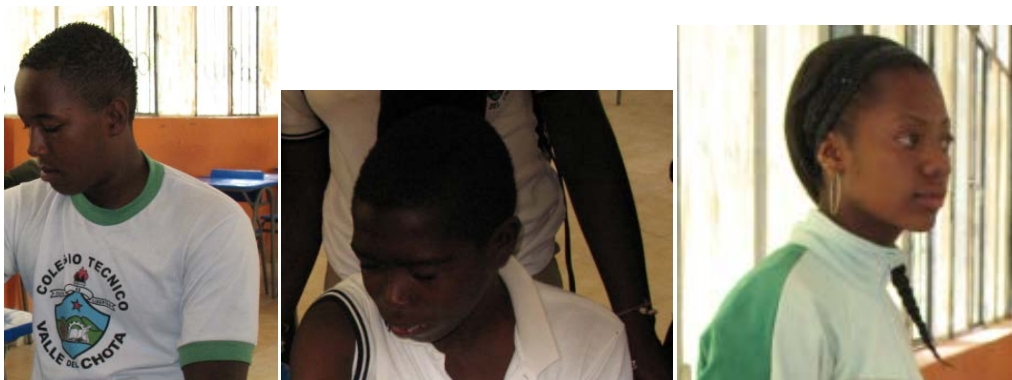


Figura 1.1. Representantes de la población afroecuatoriana del Valle del Chota, provincia de Imbabura. Tomadas al momento de extraer la muestra de sangre. Colegio Técnico Valle del Chota, Junio 2011.

#### 1.4.1.2 Pueblos indígenas

Los pueblos indígenas han definido a la <nacionalidad indígena> como una entidad histórica y política, que tiene en común identidad, historia, idioma, cultura

propia. Vive en un territorio determinado, cuenta con sus propias instituciones y formas tradicionales de organización social, económica, jurídica, política y ejercicio de autoridad. Hay que resaltar que muchos de estos grupos viven en condiciones de aislamiento y de extrema pobreza. El grupo indígena mayoritario lo constituyen los Kichwas (quichuas) (Benítez & Garcés, 1989).

Los Quichuas (Ver Figura 1.2) comprenden una población de ~3.000.000 de habitantes (20% de la población ecuatoriana), siendo el grupo más representativo de los amerindios de nuestro país y la mayoría viven en la región andina, desde Carchi al norte hasta la provincia de Loja al sur; su idioma (quichua) es el segundo más utilizado en el país, especialmente donde se asientan comunidades indígenas en las zonas de la sierra (Codenpe, 2002).



Figura 1.2. Representantes de la comunidad indígena de Ilumán, provincia de Imbabura.  
Tomada al momento de extraer las muestras de sangre. Colegio San Juan de Ilumán,  
Agosto 2011.

## 1.4.2 Genética forense

Los esfuerzos científicos por entender la variabilidad genética como medio de identificación humana llevó a que en el 2007 Torres *et al.* Describieran un método de identificación individual que se denominó DNA fingerprinting o huella genética.

Hoy la prueba de ADN está consolidada, validada científicamente y cuenta con un riguroso control de calidad (Hernández, 2002), así el análisis de marcadores STR´s en sistemas multiplex permiten una rápida velocidad de análisis y un poder de discriminación alto (Ver Figura 1.3).

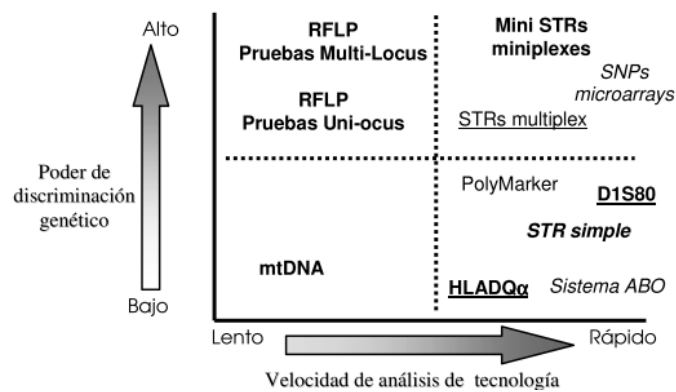


Figura 1.3. Comparación de tecnologías de tipificación de ADN; donde se contrasta el poder de discriminación de la prueba multiplex de STR´s vs. la velocidad del análisis (González, 2006).

### 1.4.2.1 ADN

El ácido desoxirribonucleico (ADN) forma parte de todas las células, contiene la información genética usada en el desarrollo, funcionamiento y transmisión hereditaria de los organismos vivos conocidos y de algunos virus (Descailleaux, 2004; Hernández,



2002; González, 2006; Cervantes, 2003). Para estudiar la complejidad del genoma humano éste puede dividirse en función de su carácter repetitivo y codificante, en:

**Genes:** son aquellos que codifican para las proteínas, contienen la información genética de un genoma e influyen en una característica particular de un organismo (Descailleaux, 2004, González, 2006).

**ADN no codificante-repetitivo:** no codifica para proteínas, sus funciones pueden estar relacionadas a la regulación de la expresión diferencial de genes, por ejemplo: algunos intrones representan pseudogenes que tienen valor evolutivo y otros proceden de la duplicación de pequeñas regiones del ADN; regiones útiles en estudios de filogenia (Descailleaux, 2004). El contenido del ADN repetitivo es el siguiente:

Cuadro 1.1. Clasificación del ADN no codificante-repetitivo. En rojo ●: los STR's, son ADN repetitivo y son de interés en esta investigación (González, 2006).

ADN repetitivo	Variedad	ADN No codificante	Tamaño
	Total	44,83% ~ 45%	
<b>Trasposones y elementos derivados</b> (repeticiones entremezcladas)	SINEs	13,14 %	6 – 8 Kb
	LINEs	20,42 %	100 – 300 pb
	LTR retrotrasposon	8,29 %	6 – 11 Kb autosómico
	ADN trasposon (fósil)	2,84 %	1,5 – 3 Kb no autónomos
	Sin clasificar	0,14 %	2 – 3 Kb autosómicos
			80 – 3000 pb no autónómico
<b>Pseudogenes</b> (copias de genes inactivos)	Pseudogenes	3 %	Variable
<b>Repeticiones secuenciales simples (SSR)</b>	Total	3%	1 – 2 bases
	SNPs		2 – 13 bases
	STRs ●		14 – 500 bases
<b>Duplicaciones segmentales</b>	Total	3,6 – 5%	1 – 200 Kb
	Inter cromosómica	1,5 %	
	Intra cromosómica	2 %	
Bloques de secuencias repetidas en tándem (centrómeros, telómeros, brazos cortos de cromosomas acrocéntricos, grupos de genes ribosomales; varían de acuerdo a cada cromosoma)	Pericentroméricas	Cromosoma 22	1,5 Mb
		Cromosoma 21	1 Mb
		Cromosoma 2	160 Kb
		Cromosoma 10	400 Kb
		Cromosoma 16	300 Kb
Subteloméricas	Cromosoma 22	50 Kb	
	Cromosoma 21	30 Kb	

#### 1.4.2.2 Marcadores STR's

STR's (Short Tandem Repeat) son secuencias específicas de tamaño variable esparcidas por todo el genoma y que tienen un alto grado de variabilidad en la población haciendo fácil el diferenciar a uno de otro individuo (González, 2006; Butler, 2011). Las unidades de repetición (UR) de estas regiones van entre 2 a 7pb en longitud y su tamaño va entre 90 y 500 pb (González, 2006, Callisaya, 2007).

##### 1.4.2.2.1 Características

Los STR's constituyen elementos útiles en la identificación humana y en el mapeo genético debido a: (1) Su elevado polimorfismo (gran variabilidad y elevado poder de discriminación), (2) Tasa de mutación relativamente baja, (3) Tamaño pequeño que permite optimizar su amplificación (loci con alelos de longitud pequeña proporcionan mejores resultados en muestras con ADN degradado), (4) Ubicación cromosómica establecida y separada para cada STR de manera que se evite la selección de loci cercanos que puedan segregarse conjuntamente como un grupo de ligamiento, (5) Poca capacidad para formar stutter o "bandas tartamudas" que es característico en el análisis de mezclas, (6) Facilidad de análisis y elevada reproducibilidad de los métodos y resultados (exámenes múltiples) (Brinkmann *et al.*, 1996; Martínez, 1999; Gill *et al.*, 1996; Acuña, 2010; Butler, 2011; Callisaya, 2007).

##### 1.4.2.2.2 Nomenclatura

Según la Comisión de DNA de la ISFG (International Society of Forensic Genetics), se recomienda nombrar a los alelos STR's según el número de UR completas que tenga y cuando alguno tuviera una UR incompleta designar el número de UR completas y a continuación separado por un punto el número de pares de bases de la UR incompleta; ejemplo: alelo 14, alelo 9.3 (Gill *et al.*, 2001).

Para loci STR's que están dentro de una región codificante de proteínas se debe usar la hebra codificante; ejemplo: vWA su denominación viene de su ubicación en el sitio que codifica para el factor von Willebrand. Mientras que para loci STR's que no tienen conexión a genes la nomenclatura esta designada por D#S### ejemplo: D18S351 (base de datos GenBank 18333) (Gill *et al.*, 2001).

#### 1.4.2.2.3 Clasificación

Las secuencias de los STR's se clasifican en:

Cuadro 1.2. Clasificación de las secuencias STR's (modificado de González, 2006; Butler, 2011; Callisaya 2007).

Por la longitud de la UR y el número de repeticiones de dicha unidad	Respecto al patrón de repetición al que se ajustan
Mononucleotídicas (3): A A A	Simple: contienen UR idénticas en longitud y secuencia, ejemplo: AATG.
Dinucleotídicas (5): AC AC AC AC AC	Compuestas: constan de dos o más repeticiones simples adyacentes, ejemplo: TCTA/TCTG.
Trinucleotídicas (4): ACC ACC ACC ACC	Complejas: contienen dos o más UR de longitud variable, ejemplo: TCTA/TCTGG.
Tetranucleotídicas (2): AAAC AAAC	Hipervariables complejas: poseen numerosos alelos no consensos que difieren tanto en tamaño como en secuencia.
Pentanucleotídicas (3): ATTGG ATTGG ATTGG	Microvariantes: son alelos que contienen UR incompletas, ejemplo: el alelo 9.3 en el locus
Hexanucleotídicas (2): AAGGGG AAGGGG	TH01, contiene 9 unidades tetranucleotídicas y una repetición incompleta de tres nucleótidos.

#### 1.4.2.2.4 Mutaciones

La tasa de mutación es la frecuencia en la que se producen nuevas mutaciones de dicha secuencia en cada generación, los STR's presentan tasas de mutación que son muy bajas (Brinkmann *et al.*, 1998). La variabilidad alélica de los STR's se da por errores en el deslizamiento de la enzima provocando que un alelo gane o pierda una o varias unidades, siendo más susceptibles los tramos homogéneos con idénticas UR respecto a las repeticiones irregulares intercaladas (Brinkmann *et al.*, 1998).

Según estudios la tasa de mutación de los STR's a nivel general es de  $4.1 \cdot 10^{-4}$  a  $6.7 \cdot 10^{-3}$  por base y por año, esto hace que exista una probabilidad del 95% de que un único STR haya sobrevivido sin cambios durante 1000 generaciones, ratificando así su efectividad para propósitos de identificación humana (Brinkmann *et al.*, 1998).

#### 1.4.2.2.5 Análisis multiplex

##### 1.4.2.2.5.1 Marcadores autosómicos

Los laboratorios del FBI patrocinaron estudios para establecer un set de STR básicos a ser analizados en pruebas forenses y de disputa de paternidad, creando una base de datos denominada CODIS (Combined DNA Index System), dicho sistema consta de los siguientes marcadores autosómicos: CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11; los cuales al ser analizados en una muestra simultáneamente tienen un poder de discriminación de uno en un trillón para diferenciar a un individuo de otro (Butler, 2011).

Posteriormente se sumaron otros marcadores a los 13 básicos, aumentando el poder de discriminación y elaborándose de forma comercial (Ver Figura 1.4) (Ver ANEXO A).

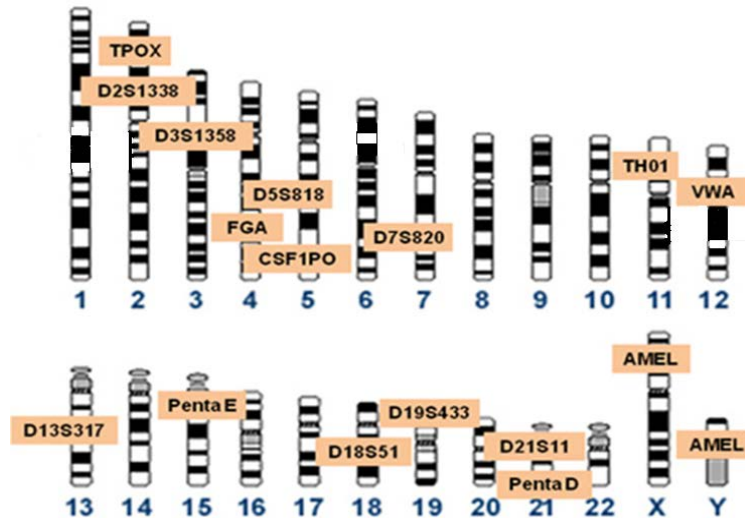


Figura 1.4. Ubicación en los cromosomas de los marcadores STR's más usados presentes en el kit Power Plex 18D (Promega).

Un marcador de interés en población afrodescendiente es el PENTA D ubicado en el cromosoma 21q22.3, cuya repetición es [AAAGA]. La secuencia de los primers incluidos en los kits comerciales es: 5'-[JOE]-GAAGGTCGAAGCTGAAGTG-3'; 5'-ATTAGAATTCTTTAATCTGGACACAAG-3'; ubicado a 25Mb del marcador D21S11 (PubMed, 2011). Este marcador contiene el alelo 2.2 y del cual se ha observado un mayor porcentaje en población negra respecto a otras poblaciones (Hincapié *et al.*, 2009) (Ver ANEXO B).

#### 1.4.2.2.5.2 Marcadores del cromosoma Y

También están los marcadores del cromosoma Y que brindan información de ancestría, el kit más usado es el Yfiler de Applied Biosystems, permite determinar un haplotipo con el que se puede inferir el haplogrupo de una población (Ver ANEXO C).

#### 1.4.2.2.5.3 Kits comerciales

Los kits comerciales de STR's que actualmente se venden constan de: (1) mezcla de primers (un par para cada STR marcados con un fluorocromo), (2) buffer de PCR, (3) ADN polimerasa (en varios kits viene incluida en el buffer), (4) ladder alélico, (5) ADN control positivo (es una muestra para comprobar que todos los reactivos del kit estén funcionando adecuadamente).

Un ladder alélico es una mezcla artificial de los alelos comunes presentes en las poblaciones humanas para un marcador STR en particular, son generados con el mismo primer de las muestras analizadas y así proporcionan una muestra de ADN de referencia para cada alelo incluido en el ladder; en otras palabras un ladder sirve como estándar o regla alélica para cada STR (Ver ANEXO D) (Butler, 2011).

Actualmente existe una variedad de kits comerciales para llevar a cabo el análisis de STR's, el elegir uno u otro dependerá de las necesidades del estudio. Applied Biosystems y Promega son las principales corporaciones que ofrecen kits de STR's, este sistema permite una gran eficiencia en la amplificación multiplex revolucionando los análisis forenses ya que las probabilidades de un error son mínimas y es posible tener resultados con muestras que tienen una concentración de 1ng o menos de ADN (Ver ANEXO E) (Butler, 2011).

La ventaja de estos sistemas es que los primers que usan están ya establecidos así como las condiciones para su amplificación por lo que no se requiere su optimización, además dichos primers vienen marcados con fluorocromos lo cual hace fácil su detección. El sistema incluye varios STR's lo que brinda información de varios loci en una sola reacción disminuyendo también el tiempo del análisis con menor cantidad de templado y de reactivos. La construcción de bases de datos es rápida usando estos sistemas (Lins *et al.*, 1996).

#### 1.4.2.2.5.4 Problemas con los análisis multiplex

Durante la amplificación de los alelos STR's pueden aparecer artefactos que interfieren en la clara interpretación de los resultados, entre ellos están: amplificaciones inespecíficas, amplificaciones preferenciales de algunos loci e inhibición de la amplificación por formación de dímeros de primers.

**Amplificaciones inespecíficas:** cuatro son las principales: a) bandas tartamudas o stutter; b) artefactos inespecíficos; c) pull up; d) bandas N y N+1 (Ver Figura 1.5).

- a) Bandas tartamudas o stutter: son productos alélicos que se diferencian estructuralmente del alelo verdadero por una UR y su presencia en un electroferograma se ve como picos más pequeños que el pico del alelo original (tienen menos del 10% del peso del pico del alelo principal) (Gill *et al.*, 2001), esto se debe a que la enzima polimerasa sufre un desplazamiento al momento de amplificar la cadena molde (Hauge & Litt, 1993). La propensión a formar estas bandas disminuye mientras la UR es mayor y la secuencia de repetición es imperfecta (Butler, 2001).
- b) Artefactos inespecíficos: se generan como resultado de la hibridación de fragmentos de ADN degradado o bacteriano, tienen una secuencia diferente a la de los STR's y suelen migrar de forma atípica dando como resultado picos pequeños que tienen el área del pico baja y su morfología es aberrante. Otra de las características que los distingue es que la mayoría están fuera del rango alélico del locus y/o están relacionados con hibridación del primer en otro sitio del genoma (Whitaker *et al.*, 1995; Clayton *et al.*, 1998).
- c) Pull up: se producen por interacciones hardware/matriz principalmente en muestras sobre amplificadas, son picos menores en un color diferente y

directamente por debajo de un pico alélico verdadero o picos pequeños debajo de un pico grande exactamente en la misma posición, para diferenciarlos de los alelos verdaderos se lo hace por medio de posición y morfología del pico (Gill *et al.*, 2001).

- d) Bandas N y N+1: la señal del alelo verdadero se conoce como pico “N”, pero si en la amplificación al final de la elongación la enzima polimerasa adiciona una base extra al producto, éste tendrá una base más larga que la longitud del alelo verdadero y esto es llamado pico “N+1” (Sparkes *et al.*, 1996; Clayton *et al.*, 1998).

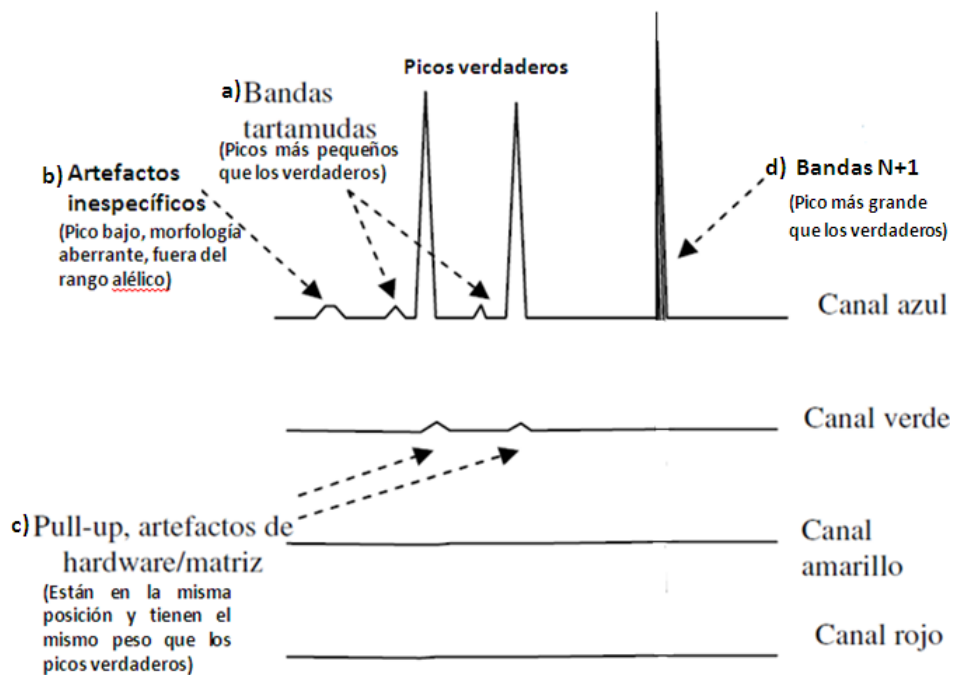


Figura 1.5. Tipos de amplificaciones inespecíficas que se pueden producir en análisis multiplex (modificado de Butler, 2001)



### 1.4.2.3 Genética de poblaciones

La genética poblacional estudia la distribución de los alelos dentro de una población, así como los factores que mantienen o modifican estas frecuencias y por ende la estructura genética de una población dada.

Entre los factores que la modifican se destacan: **las mutaciones**, como la base de las diferencias genéticas entre los seres humanos; **la selección**, ya sea a favor o en contra de un genotipo específico; **los entrecruzamientos**, íntimamente ligados a la selección; **el aislamiento de poblaciones**, muchas veces favorecidos por patrones de conductas sociales; **las migraciones**, como fenómeno demográfico que mezcla no solamente culturas sino que además fortalece el flujo génico entre poblaciones; y por último **la deriva génica**, que se relaciona con las variaciones al azar de las frecuencias génicas (Callisaya, 2007).

El factor que mantiene una adecuada distribución alélica es básicamente el equilibrio por lo que se postuló la ley del equilibrio de Hardy-Weinberg en 1908. Según ésta ley en una población de gran tamaño y en panmixia, las frecuencias génicas y genotípicas permanecen constantes de generación en generación si se cumple con tres principios fundamentales:

- 1) Equilibrio de frecuencias génicas o alélicas
- 2) Equilibrio de frecuencias genotípicas
- 3) Si el equilibrio se perturba, éste se restablecerá en una sola generación de cruzamientos al azar pero con las nuevas frecuencias alélicas y si los anteriores requisitos se mantienen (González, 2006).

En poblaciones naturales difícilmente el equilibrio es estricto, por lo que hay que determinar si las desviaciones observadas en la muestra pueden atribuirse al azar o a

alguno de los factores antes mencionados que modifican la distribución de alelos (migración, selección, etc) (González, 2006).

Se debe destacar también que un exceso de homocigotos puede ser explicado por procesos de aislamiento y endogamia de una población y puede ser considerado como indicador de subestructuración poblacional.

#### 1.4.2.3.1 Frecuencias alélicas

Este es un parámetro fundamental de la genética de poblaciones para la aplicación de cualquier marcador genético en genética forense. El conocimiento de la distribución de los diferentes alelos de un sistema en una población de referencia constituye el primer paso de un largo proceso que culmina con la elaboración de un informe de paternidad o de criminalística (Callisaya, 2007).

La frecuencia de un alelo en una población se denomina frecuencia génica o alélica y la podemos definir como el cociente resultante de dividir el número de alelos iguales en una población por el número total de alelos.

#### 1.4.2.3.2 Parámetros estadísticos de interés forense

Es imprescindible, en genética forense, manejar aspectos estadísticos que nos permitan valorar e interpretar de forma adecuada los resultados de un análisis de una evidencia biológica de modo que para dar respuestas a dichos resultados los genetistas forenses se basan en las estadísticas poblacionales con el objeto de estimar la fracción de personas dentro de la población que presenten este particular patrón genético. De igual forma en disputas de paternidad, al interpretar los perfiles genéticos de los individuos en cuestión debemos basarnos en la estadística para establecer la

probabilidad de que un padre alegado sea o no el padre biológico de un hijo (Callisaya, 2007). Los principales parámetros de interés forense son los siguientes:

**Heterocigosidad (He):** parámetro indicativo de la cuantía del polimorfismo y eficacia de cada marcador genético. Representa la probabilidad de que dos alelos del mismo locus tomados al azar en una población sean distintos, la frecuencia de heterocigotos también representa la variabilidad dentro de una población (Quintero *et al.*, 2009; Callisaya, 2007). La heterocigosidad observada para un locus se define como el número de individuos heterocigotos observados respecto al total analizado y la heterocigosidad esperada es la proporción de heterocigotos que se esperarían encontrar si la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg (González, 2006).

**Contenido de información polimórfica (PIC):** está directamente relacionado a la heterocigosidad y oscila entre 0-1. Evalúa la informatividad de un marcador en una población de acuerdo al número de alelos y sus frecuencias (Quintero *et al.*, 2009).

**Probabilidad de exclusión (PE):** es la probabilidad de que un sistema genético específico dará evidencias que conducirán a la exclusión de un sospechoso ó a descartar una supuesta paternidad de un individuo; es un método muy común para cuantificar la validez de un sistema genético (Callisaya, 2007). Es un valor estadístico porcentual función directa del polimorfismo de un marcador, así cuanto más polimórfico es un sistema y más equilibradas están las funciones de sus alelos, mayor será su probabilidad de exclusión *a priori* y por tanto su eficiencia en pruebas forenses y parentesco biológico (González, 2006).

**Poder de discriminación (PD):** capacidad que tiene un marcador o conjunto de marcadores STR`s de diferenciar a un hombre tomado al azar de ser genotípicamente idéntico con otra persona, muestra o evidencia forense.

**Índice típico de paternidad (ITP):** indica cuantas veces es más probable que un supuesto padre comparta material genético con un individuo tomado al azar (Quintero *et al.*, 2009).

**Probabilidad de match o coincidencia (PM):** probabilidad de que dos individuos tomados al azar tengan el mismo genotipo en uno o varios sistemas genéticos dados.

### 1.4.3 Almacenamiento de ADN a temperatura ambiente

#### 1.4.3.1 Anhidrobiosis

Los ambientes extremos obligan a los organismos a desarrollar o adoptar mecanismos eficaces de protección celular y molecular; los animales superiores pueden evitar el desecamiento de una manera conductual (migración o enterrándose bajo tierra) o fisiológicamente (entrando en letargo). Algunos insectos acuáticos que pueden resistir al desecamiento moderado secretan una cutícula espesa para limitar la pérdida de agua. Alternativamente otros organismos han desarrollado la estrategia opuesta, ellos permiten la pérdida de agua pero pueden sobrevivir al desecamiento; este proceso se denomina Anhidrobiosis (Cornette *et al.*, 2010).

La anhidrobiosis es la habilidad de organismos de sobrevivir en el estado seco, caracterizado por una extrema inactividad metabólica, es un ejemplo específico de criptobiosis, es una de las estrategias más avanzadas entre los estados del hipometabolismo (Gusev *et al.*, 2010; Cornette *et al.*, 2010).

Mientras las células de otros organismos frente a la deshidratación sufren un daño de sus organelos, ácidos nucleicos y membranas, los organismos anhidro bióticos

pueden neutralizar los efectos negativos de suspensión de agua eficazmente gracias a la presencia de sustancias crio protectoras, preservando así sus células, biomoléculas y recuperarse sin efectos negativos al ser re-hidratadas (Gusev *et al.*, 2010).

#### 1.4.3.1.1 Funcionamiento

Se encuentran moléculas crio protectoras en cantidades considerables en organismos anhidrobiontes, como el tardígrado *Echiniscus blumi* (Ver Figura 1.6), *Artemia salina*, la planta vascular inferior *Selaginella lepidophylla*, en las angiospermas *Myrothamus flabellifolius* y *Sporobolu satrovirens* (Crowe *et al.*, 1992; Iturriaga *et al.*, 2000). Estos organismos tienen en común la propiedad de sobrevivir en estado de casi total desecación, siendo capaces de soportar condiciones extremas de altas o bajas temperaturas, salinidad y radiación, para recuperar sus funciones vitales tan pronto como se re-hidratan (Mascorro *et al.*, 2005).



Figura 1.6. Tardígrado *Echiniscus blumi*: pueden persistir durante meses o incluso años en el estado anhidrobiótico. La fisiología y bioquímica de la anhidrobiosis está enlazada a un sistema complejo que implica que muchos componentes moleculares diferentes trabajen juntos como bio protectores (Guidetti, 2007).

Las propiedades fisicoquímicas de estas moléculas crio protectoras permiten proteger y estabilizar la estructura y la función de las enzimas y la integridad de las membranas biológicas bajo condiciones de estrés abiótico extremo como desecación,

altas temperaturas, congelación, alta salinidad, oxidación y radiación (Mascorro *et al.*, 2005).

Las proteínas mantienen mejor su actividad bajo estrés abiótico en presencia de crioprotectores, ya que éstos reemplazan al agua formando una especie de cápsula alrededor de la proteína deshidratada protegiendo así su estructura terciaria y su actividad (Mascorro *et al.*, 2005). La interacción por puentes de hidrógeno entre ambas moléculas es debida a los grupos polares de la proteína y los hidroxilos del crioprotector, sin reducción de los grupos aminos y por ende el color café asociado a la degradación de las proteínas, reacción que se acelera a mayores temperaturas (Mascorro *et al.*, 2005) (Ver Figura 1.7).

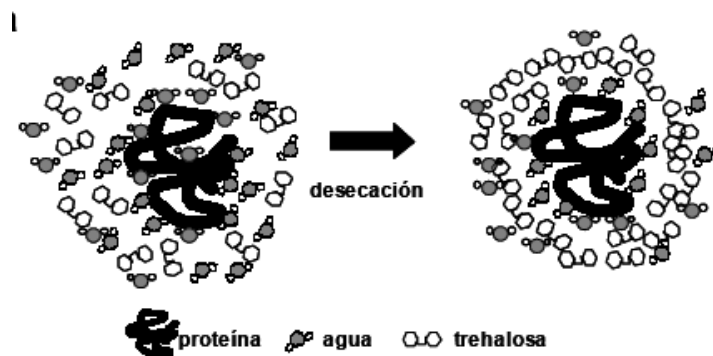


Figura 1.7. Osmoprotección de proteínas por la trehalosa (un crioprotector): al disminuir el agua, se forma una capa protectora de trehalosa que atrapa el agua disponible quedando en contacto con la proteína. En la vecindad de la proteína, se incrementan los puentes de hidrógeno entre trehalosa-agua y trehalosa-trehalosa (Mascorro *et al.*, 2005).

La capacidad de los crioprotectores para proteger las membranas durante la deshidratación radica en que interactúa con éstas favoreciendo la permanencia del estado fluido de los lípidos, evitando así su fusión, la separación de fases y el rompimiento de las membranas (Mascorro *et al.*, 2005) (Ver Figura 1.8). Las evidencias sugieren que los crioprotectores retardan la transición de líquido a gel mediante el reemplazo de las moléculas de agua por las del crioprotector, manteniendo a las

membranas en forma de cristal líquido, encajándose entre los grupos polares de las cabezas de los fosfolípidos con los que interactúa mediante sus hidroxilos (Crowe *et al.*, 2001).

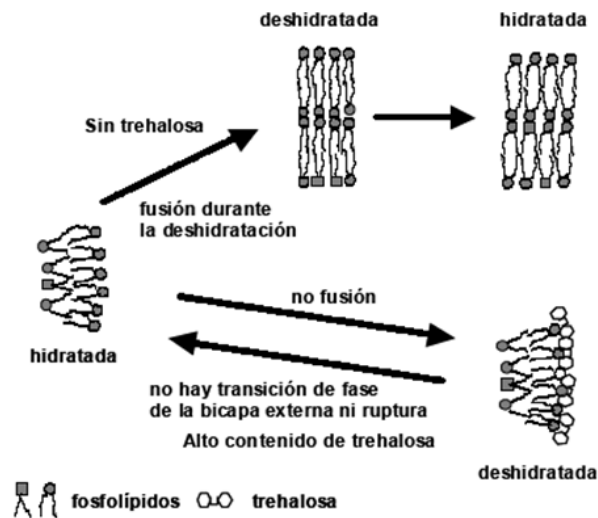


Figura 1.8. Las membranas biológicas son protegidas por la trehalosa durante la desecación evitando su fusión, cambio de fase y rompimiento (Mascorro *et al.*, 2005).

#### 1.4.3.1.2 Placas

Biomatica The Biostability Company (San Diego-Estados Unidos) llevó el principio de anhidrobiosis de la naturaleza a productos comerciales que ofrecen conservar DNA y RNA purificados, ADN en sangre, ADN en tejidos y bacterias; los cuales al ser reconstituidos en el tiempo conservan su estructura y función y pueden ser aplicados a varios fines como PCR, qPCR, secuenciación, análisis de STR's, amplificaciones, restricciones, transformación y clonación, entre otras aplicaciones; con las ventajas de optimización de espacio, reducción de costos, de una forma amigable con el ambiente y facilidad de transporte respecto al uso de congeladores.

## 1.5 Análisis de datos

Se realizó un **muestreo aleatorio simple (MAS)** para determinar el tamaño de la muestra que sea significativa para el análisis:

$$n = \frac{z_{\alpha/2}^2 N \hat{p} (1 - \hat{p})}{NE^2 + z_{\alpha/2}^2 \hat{p} (1 - \hat{p})}$$

Donde:

N: tamaño poblacional,  $z_{\alpha/2}$ : confiabilidad, E: error,  $\hat{p}$ : proporción muestral, n: tamaño muestral

**Almacenamiento de ADN:** a fin de establecer la variación en la concentración de ADN al inicio y al final del estudio se lo hizo por análisis de varianza (prueba de Tukey) con el paquete estadístico InfoStat y su viabilidad se corroboró mediante análisis de STR`s antes y posterior al almacenamiento.

**Análisis genético:** Se empleó el programa Power Star para determinar las frecuencias alélicas y parámetros de interés forense. Para determinar los haplogrupos se usó el programa Ancestry.com. Para analizar diferencias de variabilidad genética entre dos o más poblaciones, el equilibrio Hardy-Weinberg y distancias genéticas se usaron los paquetes estadísticos Arlequin 3.5.1.2 e InfoGen/E.

## 1.6 Hipótesis

**Hipótesis 1:** La molécula de ADN almacenada a temperatura ambiente conserva su concentración inicial y viabilidad para realizar análisis de microsatélites, sin afectar sus resultados.



**Hipótesis 2:** La población afroecuatoriana demuestra perfiles genéticos similares a poblaciones de otras regiones geográficas.

## CAPÍTULO II

### 2 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 Ubicación geográfica

La fase de campo se realizó en dos puntos geográficos de donde se recolectaron las muestras son: la comunidad de San Juan de Ilumán y el Valle del Chota, los dos en la Provincia de Imbabura-Ecuador.



Figura 2.1. **a.** Localización geográfica de San Juan de Ilumán. Parroquia rural de Otavalo, ubicada a 7km al suroeste de Ibarra, a una altura de 2600 m.s.n.m, con un clima templado y una temperatura media de 14°C. **b.** Localización geográfica del Valle del Chota. Ubicado a 47 km del cantón Ibarra en la frontera entre Imbabura y Carchi, con una altura de 1560 m.s.n.m y temperatura promedio de 25 C°. Fuente: Extraído el 8 de Octubre, 2011 del sitio Web: maps.google.com.

La fase experimental del presente proyecto se llevó a cabo en los Laboratorios de ADN, pertenecientes a la Fiscalía General del Estado; ubicada en la Calle 9 de Octubre N1933 y Patria Tercer Piso.



Figura 2.2. Localización geográfica de la Fiscalía General del Estado. Fuente: Extraído el 25 de Abril, 2011 del sitio Web: [www.mapmonde.org](http://www.mapmonde.org).

Provincia: Pichincha  
Cantón: Distrito Metropolitano de Quito  
Longitud: 78° 29' 54.56" O  
Latitud: 0° 12' 23.49" S  
Altitud: 2799 metros sobre el nivel del mar

Fuente: Extraído el 25 de Abril, 2011 del sitio Web: [www.googleearth.com](http://www.googleearth.com)

## 2.2 Muestras biológicas

Para la toma de muestras se tomó en consideración las siguientes particularidades: los apellidos de las personas, sus rasgos fenotípicos y el hecho de que no debían tener parentesco directo unos con otros (es decir sean hermanos o primos hermanos).

Las muestras fueron obtenidas de individuos afroecuatorianos a los cuales se les extrajo de 3-5ml de sangre periférica en tubos EDTA, se colectaron en el Valle del Chota Imbabura-Ecuador en el Colegio Técnico Valle del Chota junto con los respectivos consentimientos informados de los voluntarios (Ver ANEXO F),

comprendidos entre las edades de 12-20 años. Las muestras y consentimientos firmados fueron trasladados al Laboratorio de la Fiscalía General del Estado para su procesamiento y almacenamiento, respectivamente.

Las muestras de los individuos de raza indígena de San Juan de Ilumán se colectaron en papel FTA en el colegio San Juan de Ilumán junto con el respectivo consentimiento informado de los voluntarios, comprendidos entre las edades de 12-20 años. Las muestras y consentimientos firmados fueron trasladados al Laboratorio de la Fiscalía General del Estado para su procesamiento. 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.

### 2.3 Extracción de ADN de sangre periférica

Previo a la extracción se impregnó una cantidad de sangre de cada muestra en papel FTA oportunamente rotulado como respaldo para el laboratorio a manera de un banco de muestras de población afroecuatoriana. La extracción se realizó usando el kit comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit de Promega, mediante el procedimiento descrito en el respectivo manual (Ver ANEXO G).

### 2.4 Análisis cuantitativo de ADN extraído

Posterior a la extracción se realizó un análisis cuantitativo (para determinar la concentración de ADN (ng/ul)), mediante PCR en tiempo real usando el Kit de Fluometría Quantifiler<sup>TM</sup> Human; el análisis se hizo en el equipo 7500 Real Time PCR System (Ver ANEXO H), tanto el Kit como el equipo son de Applied Biosystems. Dicha cuantificación se realizó también luego del almacenamiento de las muestras a

-80°C y a temperatura ambiente, para comparar si se mantiene la cantidad de ADN en el tiempo con los dos métodos de almacenamiento. Para cuantificar las muestras almacenadas al ambiente se requiere reconstituir la placa con agua de PCR. 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.

## 2.5 Almacenamiento del ADN extraído

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

## 2.6 Determinación del haplotipo y genotipo

### 2.6.1 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 de Applied Biosystem para corroborar que concuerde su composición genética (haplotipo) con sus características fenotípicas; las condiciones de amplificación fueron las establecidas en el inserto del kit, seguido de separación y detección de los productos de PCR para finalmente determinar el haplogrupo en el programa de Ancestry.com.

## 2.6.2 STR`s autosómicos

### 2.6.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa

Las regiones STR`s autosómicas en estudio fueron amplificadas mediante la técnica de PCR multiplex para lo que se usó el kit Power Plex 18D de la casa comercial Promega el cual consta de 17 marcadores autosómicos y uno para determinar el sexo del individuo, en el equipo GeneAmp PCR System 9700 de Applied Biosystems. 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, las condiciones de amplificación (temperaturas, tiempo y ciclos) establecidas consistieron en las siguientes etapas de denaturación, anillamiento y elongación:

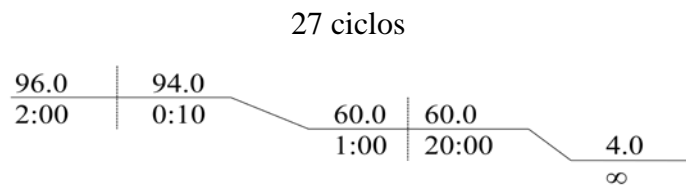


Figura 2.3. Condiciones de amplificación para el Kit Power Plex 18D (Inserto de Promega).

### 2.6.2.2 Perfiles genéticos

Se procedió a la obtención de perfiles genéticos de cada individuo preparando 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, de Applied Biosystems, junto con el Ladderplex como referencia. La detección de los fragmentos se dio por electroforesis capilar. El análisis de resultados se realizó mediante el software Genemapper versión 3.2. 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  $-80^{\circ}\text{C}$ ) para determinar si el ADN se mantiene viable luego del almacenamiento y es compatible con el análisis de STR's sin afectar sus resultados.

#### 2.6.2.3 Análisis genético

Una vez obtenidos los perfiles genéticos se realizó el cálculo de frecuencias alélicas y el valor de diversidad genética, parámetros de interés forense, equilibrio de Hardy-Weinberg y distancias genéticas entre poblaciones.

## **CAPÍTULO III**

### **3 RESULTADOS**

#### 3.1 Muestras biológicas

Se colectaron 100 muestras de individuos afroecuatorianos del Valle del Chota, 50 muestras de individuos indígenas de Ilumán y 100 muestras adicionales analizadas previamente a partir de individuos mestizos de la provincia de Imbabura ya registrados en el banco de datos del Laboratorio de ADN de la Fiscalía General del Estado.

#### 3.2 Almacenamiento de ADN

Se cuantificó el ADN extraído fresco (muestras identificadas como iniciales), se almacenó una alícuota a  $-80^{\circ}\text{C}$  (muestras identificadas como congeladas) y dos alícuotas a temperatura ambiente (muestras identificadas como placa1 y placa2). 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 3.1 y Tabla 3.1). Con la media calculada en la prueba de Tukey y la diferencia significativa mínima ( $DMS=20,16959$ ) la cual permite determinar los pares de medias que son diferentes se clasificó a los tratamientos dentro de una sola categoría lo cual corrobora la hipótesis planteada (Ver Tabla 3.2).

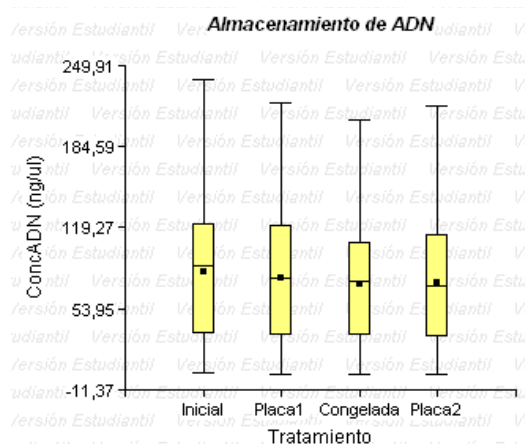


Figura 3.1. Cuantificación de ADN. En el eje “X” se observan los tratamientos aplicados; en el eje “Y” la concentración de ADN en ng/ul. Se registraron cuatro cuantificaciones: las iniciales, a los dos y tres meses de almacenamiento al ambiente (placa1 y placa2 respectivamente) y a los tres meses de almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Tabla 3.1. Análisis de varianza (SC tipo III) de las muestras en los dos métodos de almacenamiento. 95% de confiabilidad.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamiento	5739.05	3	1913.02	0.68	<b>0.5620</b>
Error	1006255.66	360	2795.15		
Total	1011994.70	363			

Tabla 3.2. Test de Tukey, Alfa=0,05; DMS=20,16959. Medias con una letra común no hay diferencia significativa.

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
Congelada	73,27	91	5,54	<b>A</b>
Placa2	74,50	91	5,54	<b>A</b>
Placa1	78,30	91	5,54	<b>A</b>
Inicial	83,47	91	5,54	<b>A</b>

Posterior al almacenamiento se realizó un análisis de STR`s, los perfiles que se obtuvieron coincidieron en su totalidad a los que se obtuvo en un inicio sin ninguna diferencia o distorsión (Ver Figura 3.2). En el ANEXO I se encuentran los electroferogramas completos de la muestra 24 de población afroecuatoriana antes y después del almacenamiento a temperatura ambiente.

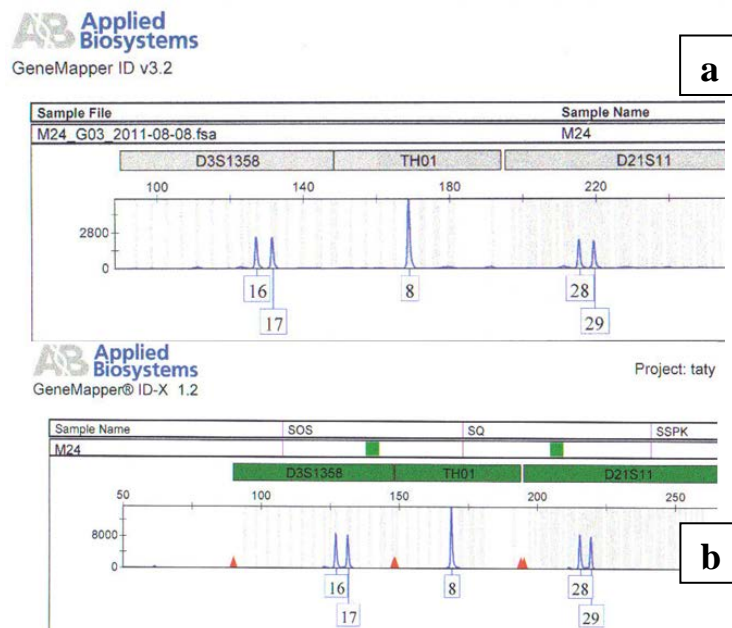


Figura 3.2. Parte de dos electroferogramas de la muestra 24 de población afroecuatoriana. **a.** Perfil genético obtenido a partir de ADN extraído fresco. **b.** Perfil genético obtenido a partir de ADN reconstituido de la placa 2, almacenada a temperatura ambiente por tres meses. En los dos perfiles se observan los alelos 16-17 en el marcador D3S1358, 8-8 en el marcador TH01 y 28-29 en el D21S11; es decir 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.

La temperatura y humedad relativa se encontraron dentro de los parámetros establecidos por el inserto de Biomatrix para una adecuada manutención del ADN al ambiente, temperatura hasta 25°C (Ver Figura 3.3) y humedad relativa hasta 33% (Ver Figura 3.4).

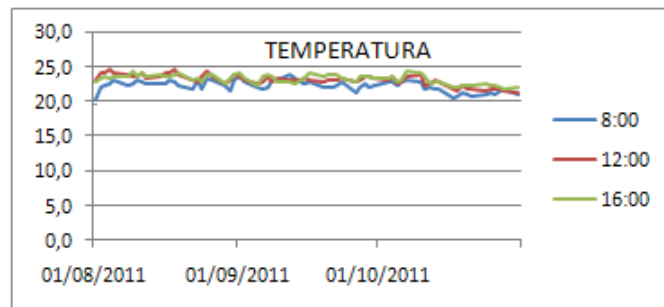


Figura 3.3. Temperatura ambiente a la cual se almacenó el ADN. En el eje “X”, el tiempo de almacenamiento (3 meses); en el eje “Y” la temperatura en grados centígrados. Se registraron tres tomas diarias a las 8am, 12 y 16pm.

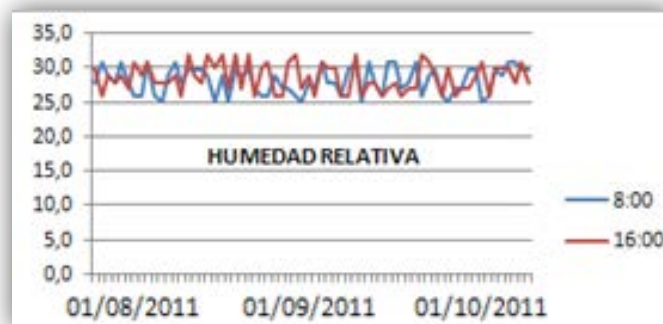


Figura 3.4. Humedad relativa a la cual se almacenó el ADN. En el eje “X”, el tiempo de almacenamiento (3 meses); en el eje “Y” el porcentaje de humedad relativa. Se registraron dos tomas diarias a las 8 am y 16 pm.

### 3.3 STR`s autosómicos

Se determinaron los perfiles genéticos (Ver los electroferogramas en el ANEXO I) de todos los individuos y a partir de ellos se calculó las frecuencias alélicas para 17 marcadores STR`s (presentes en el kit Power Plex 18D) y el valor de diversidad genética en cada población; se calcularon también parámetros de interés forense, el equilibrio de Hardy – Weinberg y distancia genética.

#### 3.3.1 Frecuencias alélicas, equilibrio y parámetros de interés forense en población afroecuatoriana

La distribución alélica encontrada es muy variada y amplia para cada marcador 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% (Ver Tabla 3.3). 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 (Ver ANEXO J).

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) (Ver Tabla 3.4).

La capacidad discriminatoria genotípica que presentan los 17 marcadores analizados tienen un comportamiento similar a la He 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) (Ver Tabla 3.4).

En cuanto al análisis de equilibrio, las distribuciones genotípicas para los 17 marcadores analizados estuvieron acordes con el equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p>0.05$ ) (Ver Tabla 3.4).

Tabla 3.3. Frecuencias alélicas de 17 STR`s en una muestra poblacional (n=100) de afroecuatorianos del Valle del Chota, Imbabura – Ecuador. 2011.

	D3S1358	TH01	D21S11	D18S51	Penta E	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539
2,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	0,050	-	-	-	-
6	-	0,100	-	-	-	-	-	-	-
7	-	0,350	-	-	0,075	0,005	-	-	-
8	-	0,330	-	-	0,140	0,040	0,040	0,210	0,030
9	-	0,110	-	-	0,090	0,010	0,070	0,090	0,195
9.3	-	0,075	-	-	-	-	-	-	-
10	-	0,035	-	-	0,030	0,080	0,040	0,275	0,170
11	-	-	-	-	0,020	0,265	0,385	0,220	0,270
12	-	-	-	0,100	0,060	0,400	0,290	0,180	0,255
12,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	0,105	0,120	0,180	0,115	0,020	0,080
13.2	-	-	-	0,015	-	-	-	-	-

	D3S1358	TH01	D21S11	D18S51	Penta E	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539
14	0,065	-	-	0,095	0,055	0,020	0,060	0,005	-
14.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	0,400	-	-	0,160	0,045	-	-	-	-
15.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	0,305	-	-	0,180	0,160	-	-	-	-
16.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	0,180	-	-	0,145	0,070	-	-	-	-
18	0,035	-	-	0,065	0,035	-	-	-	-
18.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	0,015	-	-	0,090	0,005	-	-	-	-
19,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	0,030	0,015	-	-	-	-
21	-	-	-	0,010	0,030	-	-	-	-
22	-	-	-	0,005	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	0,050	-	-	-	-	-	-
28	-	-	0,155	-	-	-	-	-	-
29	-	-	0,200	-	-	-	-	-	-
30	-	-	0,230	-	-	-	-	-	-
30.2	-	-	0,005	-	-	-	-	-	-
31	-	-	0,090	-	-	-	-	-	-
31.2	-	-	0,060	-	-	-	-	-	-
32	-	-	0,015	-	-	-	-	-	-
32.2	-	-	0,120	-	-	-	-	-	-
33	-	-	0,045	-	-	-	-	-	-
33.2	-	-	0,010	-	-	-	-	-	-
34	-	-	0,005	-	-	-	-	-	-
35	-	-	0,015	-	-	-	-	-	-
46,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3.3. Frecuencias alélicas de 17 STR`s en una muestra poblacional (n=100) de Afroecuatorianos del Valle del Chota, Imbabura – Ecuador. 2011 (Continuación)

	CSF1PO	Penta D	vWA	D8S1179	TPOX	FGA	D2S1338	D19S433
2,2	-	0,065	-	-	-	-	-	-
3,2	-	0,005	-	-	-	-	-	-
5	-	0,060	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	0,025	-	-	-
7	0,070	0,020	-	-	0,015	-	-	-
8	0,080	0,115	-	-	0,280	-	-	-
9	0,050	0,145	-	0,005	0,175	-	-	-
9.3	-	-	-	-	-	-	-	-
10	0,295	0,190	-	0,035	0,175	-	-	0,050
11	0,225	0,190	-	0,065	0,285	-	-	0,035
12	0,240	0,080	-	0,120	0,045	-	-	0,025
12,2	-	-	-	-	-	-	-	0,060
13	0,030	0,095	0,035	0,160	-	-	-	0,260
13.2	-	-	-	-	-	-	-	0,095
14	0,010	0,030	0,040	0,370	-	-	-	0,190
14.2	-	-	-	-	-	-	-	0,090
15	-	0,005	0,215	0,190	-	-	-	0,095
15.2	-	-	-	-	-	-	-	0,030
16	-	-	0,270	0,050	-	-	0,075	0,010
16.2	-	-	-	-	-	-	-	0,060
17	-	-	0,235	0,005	-	-	0,135	-
18	-	-	0,155	-	-	0,005	0,050	-
18.2	-	-	-	-	-	0,035	-	-
19	-	-	0,030	-	-	0,055	0,170	-
19,2	-	-	-	-	-	0,025	-	-
20	-	-	0,020	-	-	0,020	0,080	-
21	-	-	-	-	-	0,070	0,125	-
22	-	-	-	-	-	0,165	0,145	-
23	-	-	-	-	-	0,180	0,105	-
24	-	-	-	-	-	0,120	0,050	-

	CSF1PO	Penta D	vWA	D8S1179	TPOX	FGA	D2S1338	D19S433
25	-	-	-	-	-	0,155	0,040	-
26	-	-	-	-	-	0,055	0,025	-
27	-	-	-	-	-	0,040	-	-
28	-	-	-	-	-	0,040	-	-
29	-	-	-	-	-	0,015	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-
30.2	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-
31.2	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-
32.2	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-
33.2	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-
46,2	-	-	-	-	-	0,020	-	-

Tabla 3.4. Equilibrio de Hardy – Weinberg y parámetros de interés forense en una muestra poblacional (n=100) de afroecuatorianos del Valle del Chota, Imbabura – Ecuador. 2011.

	D3S1358	TH01	D21S11	D18S51	Penta E	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539
ObsHe	0,7300	0,7400	0,8700	0,9100	0,9000	0,7600	0,6600	0,7400	0,7900
ExpHe	0,7124	0,7433	0,8561	0,8817	0,9115	0,7325	0,7464	0,7949	0,7918
p	0,5968	0,2110	0,9653	0,9764	0,3503	0,2207	0,2937	0,2207	0,4707
PM	0,1368	0,1218	0,0422	0,0336	0,0237	0,1324	0,1078	0,0814	0,0858
PD	0,8632	0,8782	0,9578	0,9664	0,9763	0,8676	0,8922	0,9186	0,9142
PIC	0,6595	0,6990	0,8352	0,8648	0,8997	0,6870	0,7058	0,7584	0,7547
PE	0,4762	0,4928	0,7346	0,8159	0,7954	0,5270	0,3691	0,4928	0,5806
ITP	1,8519	1,9231	3,8462	5,5556	5,0000	2,0833	1,4706	1,9231	2,3810
P <sub>min</sub>	0,0270	0,0272	0,0302	0,0315	0,0312	0,0276	0,0258	0,0272	0,0282

Continuación.....

	CSF1PO	Penta D	vWA	D8S1179	TPOX	FGA	D2S1338	D19S433
ObsHe	0,8000	0,8700	0,7900	0,7200	0,6300	0,9000	0,8600	0,9200
ExpHe	0,7939	0,8733	0,8000	0,7829	0,7801	0,8893	0,8619	0,8904
p	0,3482	0,8112	0,8253	0,1237	0,0514	0,7620	0,3302	0,3696
PM	0,0810	0,0364	0,0728	0,0786	0,0873	0,0306	0,0348	0,0406
PD	0,9190	0,9636	0,9272	0,9214	0,9127	0,9694	0,9652	0,9594
PIC	0,7594	0,8552	0,7676	0,7511	0,7408	0,8743	0,8750	0,8435
PE	0,5990	0,7346	0,5806	0,4599	0,3284	0,7954	0,8364	0,7147
ITP	2,5000	3,8462	2,3810	1,7857	1,3514	5,0000	6,2500	3,5714
P <sub>min</sub>	0,0284	0,0302	0,0282	0,0268	0,0253	0,0312	0,0320	0,0299

### 3.3.2 Frecuencias alélicas, equilibrio y parámetros de interés forense en población indígena

La distribución alélica encontrada va desde el alelo 6 hasta el 33.2. El sistema más polimórfico fue PENTA E con 13 alelos mientras que los menos polimórficos fueron TH01, vWA, TPOX con 4 alelos. (Ver Tabla 3.5).

De los 17 marcadores analizados el más informativo, tomando en cuenta el parámetro de heterocigosidad esperada fue PENTA E ( $He = 0.86$ ), el menos informativo D3S1358 ( $He = 0.54$ ), acorde con los valores de PIC: PENTA E (0.83) contrastando con D3S1358 (0.5). La capacidad discriminatoria genotípica, la probabilidad de exclusión e índice típico de paternidad que presentan los 17 marcadores analizados tienen un comportamiento similar a la  $He$  y el PIC (Ver Tabla 3.6).

En esta población, 15 de los 17 marcadores STR`s analizados están en equilibrio ( $p > 0.05$ ), los 2 marcadores que presentaron diferencias genotípicas significativamente diferentes a las esperadas fueron D16S539 y D21S11 ( $p < 0.05$ ) (Ver Tabla 3.6).

Tabla 3.5. Frecuencias alélicas de 17 STR`s en una muestra poblacional (n=50) de indígenas de San Juan de Ilumán, Imbabura – Ecuador. 2011.

	D3S1358	TH01	D21S11	D18S51	Penta E	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539
2,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	0,510	-	-	-	-	-	-	-
7	-	0,370	-	-	-	0,090	-	-	-
8	-	-	-	-	0,010	-	-	0,010	-
9	-	-	-	-	-	0,190	0,400	0,020	0,110
9.3	-	0,110	-	-	-	-	-	-	-
10	-	0,010	-	-	-	0,040	0,040	0,240	0,410
11	-	-	-	-	-	0,560	0,100	0,330	0,230
12	-	-	-	0,030	0,280	0,100	0,250	0,350	0,240
12,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	0,050	0,030	0,020	0,090	0,050	0,010
13.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	0,080	-	-	0,210	0,140	-	0,120	-	-
14.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	0,650	-	-	0,160	0,150	-	-	-	-
15.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	0,150	-	-	0,100	0,070	-	-	-	-
16.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	0,110	-	-	0,300	0,040	-	-	-	-
18	0,010	-	-	0,110	0,020	-	-	-	-
18.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	0,010	0,110	-	-	-	-
20	-	-	-	0,010	0,070	-	-	-	-
21	-	-	-	0,010	0,050	-	-	-	-
22	-	-	-	0,010	0,020	-	-	-	-
23	-	-	-	-	0,010	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-



	D3S1358	TH01	D21S11	D18S51	Penta E	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	0,020	-	-	-	-	-	-
29	-	-	0,120	-	-	-	-	-	-
30	-	-	0,260	-	-	-	-	-	-
30.2	-	-	0,010	-	-	-	-	-	-
31	-	-	0,090	-	-	-	-	-	-
31.2	-	-	0,110	-	-	-	-	-	-
32	-	-	0,010	-	-	-	-	-	-
32.2	-	-	0,240	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33.2	-	-	0,140	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3.5. Frecuencias alélicas de 17 STR`s en una muestra poblacional (n=50) de indígenas de San Juan de Ilumán, Imbabura – Ecuador. 2011 (Continuación)

	CSF1PO	Penta D	vWA	D8S1179	TPOX	FGA	D2S1338	D19S433
2,2	-	-	-	-	-	-	-	-
3,2	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	0,510	-	-	-
9	0,020	0,390	-	-	-	-	-	-
9.3	-	-	-	-	-	-	-	-
10	0,370	0,240	-	0,080	0,010	-	-	-
11	0,170	0,140	-	0,070	0,280	-	-	-
12	0,380	0,100	-	0,260	0,200	-	-	-
12,2	-	-	-	-	-	-	-	0,020
13	0,050	0,130	-	0,400	-	-	-	0,230

	CSF1PO	Penta D	vWA	D8S1179	TPOX	FGA	D2S1338	D19S433
13.2	-	-	-	-	-	-	-	0,230
14	0,010	-	-	0,160	-	-	-	0,200
14.2	-	-	-	-	-	-	-	0,050
15	-	-	0,030	0,020	-	-	-	0,100
15.2	-	-	-	-	-	-	-	0,070
16	-	-	0,440	0,010	-	-	-	0,080
16.2	-	-	-	-	-	-	-	0,010
17	-	-	0,370	-	-	0,110	0,160	0,010
18	-	-	0,160	-	-	-	0,030	-
18.2	-	-	-	-	-	0,010	-	-
19	-	-	-	-	-	0,080	0,280	-
20	-	-	-	-	-	0,030	0,160	-
21	-	-	-	-	-	0,040	-	-
22	-	-	-	-	-	0,070	0,130	-
23	-	-	-	-	-	0,080	0,160	-
24	-	-	-	-	-	0,100	0,070	-
25	-	-	-	-	-	0,310	0,010	-
26	-	-	-	-	-	0,140	-	-
27	-	-	-	-	-	0,030	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3.6. Equilibrio de Hardy – Weinberg y parámetros de interés forense en una muestra poblacional (n=50) de indígenas de San Juan de Ilumán, Imbabura – Ecuador. 2011.

	D3S1358	TH01	D21S11	D18S51	Penta E	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539
ObsHe	0,5200	0,6200	0,7600	0,8000	0,8800	0,7000	0,7200	0,6600	0,7200
ExpHe	0,5418	0,5967	0,8282	0,8226	0,8602	0,6365	0,7509	0,7151	0,7163
p	0,2477	0,9078	0,0328	0,5016	0,7717	0,9751	0,3755	0,9386	0,0175
PM	0,2680	0,2512	0,0728	0,0688	0,0520	0,1760	0,1104	0,1320	0,1624
PD	0,7320	0,7488	0,9272	0,9312	0,9480	0,8240	0,8896	0,8680	0,8376
PIC	0,5007	0,5099	0,7963	0,7909	0,8368	0,5933	0,7074	0,6529	0,6592

	D3S1358	TH01	D21S11	D18S51	Penta E	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539
PE	0,2056	0,3156	0,5270	0,5990	0,7548	0,4283	0,4599	0,3691	0,4599
ITP	1,0417	1,3158	2,0833	2,5000	4,1667	1,6667	1,7857	1,4706	1,7857
P <sub>min</sub>	0,0457	0,0484	0,0527	0,0542	0,0580	0,0507	0,0514	0,0495	0,0514

Continuación...

	CSF1PO	Penta D	vWA	D8S1179	TPOX	FGA	D2S1338	D19S433
ObsHe	0,7600	0,7400	0,5000	0,7800	0,8000	0,8000	0,8400	0,8800
ExpHe	0,6937	0,7513	0,6494	0,7424	0,6276	0,8494	0,8381	0,8303
p	0,3166	0,1644	0,1254	0,0777	0,0598	0,2947	0,0705	0,5491
PM	0,1800	0,1176	0,1880	0,1456	0,2808	0,0552	0,0712	0,0736
PD	0,8200	0,8824	0,8120	0,8544	0,7192	0,9448	0,9288	0,9264
PIC	0,6291	0,7054	0,5724	0,6957	0,5535	0,8257	0,7987	0,8082
PE	0,5270	0,4928	0,1875	0,5625	0,5990	0,5990	0,7548	0,6753
ITP	2,0833	1,9231	1,0000	2,2727	2,5000	2,5000	4,1667	3,1250
P <sub>min</sub>	0,0527	0,0520	0,0451	0,0534	0,0542	0,0542	0,0580	0,0559

### 3.3.3 Frecuencias alélicas, equilibrio y parámetros de interés forense en población mestiza

La distribución alélica abarcó desde el alelo 2.2 hasta el 34.2. El sistema más polimórfico fue PENTA E con 16 alelos mientras que el menos polimórfico fue TH01 con 5 alelos. Varios marcadores presentaron alelos con frecuencias del 0.5% (Ver Tabla 3.7).

De los 17 marcadores el más informativo, tomando en cuenta el parámetro de heterocigosidad esperada fue PENTA E ( $He=0.89$ ), el menos informativo D3S1358 ( $He=0.60$ ). Dicha informatividad se corroboró con los valores de PIC: PENTA E (0.87) contrastando con D3S1358 (0.55). La capacidad discriminadora genotípica, la probabilidad de exclusión e índice típico de paternidad que presentan los 17 marcadores analizados tienen un comportamiento similar a la  $He$  y el PIC (Ver Tabla 3.8).

En cuanto al análisis de equilibrio, 16 de los 17 marcadores STR`s analizados están en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p>0.05$ ), el marcador que presentó diferencias genotípicas significativamente diferentes a las esperadas fue vWA ( $p<0.05$ ) (Ver Tabla 3.8).

Tabla 3.7. Frecuencias alélicas de 17 STR`s en una muestra poblacional (n=100) de mestizos de Imbabura – Ecuador. 2011.

	D3S1358	TH01	D21S11	D18S51	Penta E	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539
2,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	0,015	-	-	-	-
6	-	0,435	-	-	-	-	-	-	-
7	-	0,315	-	-	-	0,075	-	-	-
8	-	0,015	-	-	0,010	0,010	0,050	0,020	0,010
9	-	0,035	-	-	0,005	0,175	0,280	0,035	0,270
9.3	-	0,200	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	0,035	0,090	0,300	0,315
11	-	-	-	-	0,050	0,495	0,135	0,340	0,165
12	0,005	-	-	0,015	0,200	0,175	0,235	0,265	0,170
12,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	0,100	0,060	0,035	0,155	0,030	0,070
13.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	0,060	-	-	0,290	0,075	-	0,050	0,010	-
14.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	0,580	-	-	0,130	0,190	-	0,005	-	-
15.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	0,225	-	-	0,110	0,095	-	-	-	-
16.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	0,100	-	-	0,210	0,045	-	-	-	-
18	0,025	-	-	0,045	0,070	-	-	-	-
19	0,005	-	-	0,020	0,065	-	-	-	-
20	-	-	-	0,020	0,040	-	-	-	-
21	-	-	-	0,035	0,045	-	-	-	-

	D3S1358	TH01	D21S11	D18S51	Penta E	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539
22	-	-	-	0,010	0,025	-	-	-	-
23	-	-	-	0,010	0,010	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	0,005	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	0,0303	-	-	-	-	-	-
29	-	-	0,2879	-	-	-	-	-	-
30	-	-	0,2121	-	-	-	-	-	-
30.2	-	-	0,0101	-	-	-	-	-	-
31	-	-	0,0556	-	-	-	-	-	-
31.2	-	-	0,1465	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32.2	-	-	0,2020	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33.2	-	-	0,0455	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34.2	-	-	0,0101	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3.7. Frecuencias alélicas de 17 STR`s en una muestra poblacional (n=100) de mestizos de Imbabura – Ecuador. 2011 (Continuación)

	CSF1PO	Penta D	vWA	D8S1179	TPOX	FGA	D2S1338	D19S433
2,2	-	0,005	-	-	-	-	-	-
3,2	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	0,005	0,005	-	-	-	-	-	-
8	0,010	-	-	-	0,495	-	-	-
9	0,015	0,290	-	0,005	0,015	0,005	-	-
9.3	-	-	-	-	-	-	-	-

	CSF1PO	Penta D	vWA	D8S1179	TPOX	FGA	D2S1338	D19S433
10	0,310	0,215	-	0,110	0,035	-	-	0,0152
11	0,305	0,160	-	0,050	0,310	-	-	-
12	0,290	0,065	-	0,235	0,135	-	-	0,0152
12,2	-	-	-	-	-	-	-	0,0202
13	0,065	0,190	-	0,350	0,010	-	-	0,2020
13.2	-	-	-	-	-	-	-	0,1818
14	-	0,065	0,005	0,180	-	-	-	0,1919
14.2	-	-	-	-	-	-	-	0,0505
15	-	0,005	0,045	0,050	-	0,005	0,005	0,1313
15.2	-	-	-	-	-	-	-	0,1061
16	-	-	0,475	0,015	-	-	0,005	0,0556
16.2	-	-	-	-	-	-	-	0,0253
17	-	-	0,330	0,005	-	0,035	0,195	0,0051
18	-	-	0,115	-	-	0,005	0,065	-
19	-	-	0,030	-	-	0,030	0,275	-
20	-	-	-	-	-	0,035	0,150	-
21	-	-	-	-	-	0,050	0,015	-
22	-	-	-	-	-	0,095	0,085	-
23	-	-	-	-	-	0,110	0,140	-
24	-	-	-	-	-	0,140	0,030	-
25	-	-	-	-	-	0,250	0,030	-
26	-	-	-	-	-	0,175	0,005	-
27	-	-	-	-	-	0,055	-	-
28	-	-	-	-	-	0,010	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3.8. Equilibrio de Hardy – Weinberg y parámetros de interés forense en una muestra poblacional (n=100) de mestizos de Imbabura – Ecuador. 2011.

	D3S1358	TH01	D21S11	D18S51	Penta E	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539
ObsHe	0,6000	0,7200	0,8100	0,9000	0,9000	0,6800	0,8800	0,6500	0,8600
ExpHe	0,6017	0,6734	0,8080	0,8324	0,8917	0,6889	0,8150	0,7251	0,7706

	D3S1358	TH01	D21S11	D18S51	Penta E	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539
p	0,3688	0,1467	0,4489	0,4095	0,9485	0,1400	0,6204	0,2163	0,1768
PM	0,2180	0,1940	0,0748	0,0644	0,0278	0,1458	0,0734	0,1260	0,1144
PD	0,7820	0,8060	0,9252	0,9356	0,9722	0,8542	0,9266	0,8740	0,8856
PIC	0,5535	0,6085	0,7760	0,8084	0,8777	0,6486	0,7855	0,6704	0,7291
PE	0,2909	0,4599	0,6141	0,7954	0,7954	0,3980	0,7548	0,3552	0,7147
ITP	1,2500	1,7857	2,6053	5,0000	5,0000	1,5625	4,1667	1,4286	3,5714
P <sub>min</sub>	0,0249	0,0268	0,0288	0,0312	0,0312	0,0261	0,0305	0,0256	0,0299

Continuación...

	CSF1PO	Penta D	vWA	D8S1179	TPOX	FGA	D2S1338	D19S433
ObsHe	0,7500	0,8500	0,7000	0,8300	0,6800	0,8800	0,8800	0,8800
ExpHe	0,7258	0,8034	0,6525	0,7763	0,6423	0,8614	0,8578	0,8348
p	0,0780	0,6434	0,0302	0,8406	0,4871	0,6359	0,3833	0,3820
PM	0,1490	0,0798	0,2002	0,0946	0,1992	0,0414	0,0660	0,0468
PD	0,8510	0,9202	0,7998	0,9054	0,8008	0,9586	0,9340	0,9532
PIC	0,6700	0,7704	0,5893	0,7400	0,5785	0,8422	0,8102	0,8368
PE	0,5098	0,6949	0,4283	0,6559	0,3980	0,7548	0,7548	0,7523
ITP	2,0000	3,3333	1,6667	2,9412	1,5625	4,1667	4,1667	4,1250
P <sub>min</sub>	0,0274	0,0296	0,0265	0,0291	0,0261	0,0305	0,0305	0,0307

### 3.3.4 Valor de diversidad genética

La diversidad genética es directamente proporcional a la heterocigosidad. La población afroecuatoriana del Valle del Chota presenta una mayor diversidad que la población mestiza e indígena (Ver Tabla 3.9).

Tabla 3.9. Medidas de diversidad genética y un promedio de heterocigosidad de los 17 marcadores STR`s en cada población.

Grupos	Diversidad genética (medias)	Heterocigosidad promedio
Afroecuatorianos	0.810	0.799
Mestizos	0.759	0.791
Indígenas	0.725	0.734

### 3.3.5 Distancia genética

Con los datos de alelos autosómicos se determinó la distancia entre las tres poblaciones (Ver Figura 3.4) y se calculó el valor  $F_{ST}$  (Ver Tabla 3.10). Las distancias genéticas son cortas; los afroecuatorianos están más cerca a los mestizos (0.042) y más lejos de los indígenas (0.059) mientras que los indígenas tienen una distancia más corta en relación a los mestizos de 0.0054 corroborándose mayoritariamente el componente amerindio en la población mestiza. Se evidencia una diferencia en la composición genética de población afroecuatoriana e indígena.

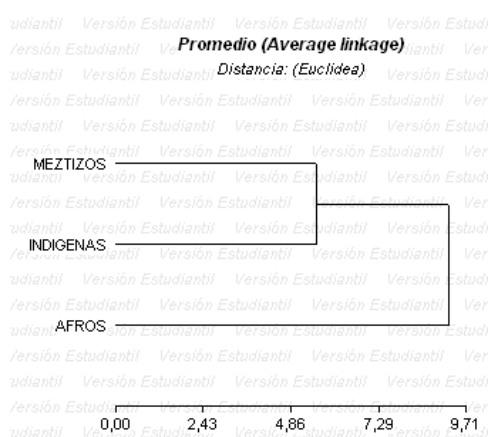


Figura 3.5. Distancia genética entre las tres poblaciones analizadas



Tabla 3.10.  $F_{ST}$  distancias genéticas basadas en 17 STR loci autosómicos

POBLACIÓN	Afroecuatorianos	Indígenas	Mestizos
Afroecuatorianos	0		
Indígenas	0.059	0	
Mestizos	0.042	0.0054	0

### 3.3.6 STR's del cromosoma Y

Se determinaron los haplotipos en cromosoma Y (16 marcadores presentes en el kit Y-filer) de 43 individuos afroecuatorianos y 31 indígenas (Ver Tabla 3.11, Tabla 3.12 respectivamente; un electroferograma completo se encuentran en el ANEXO K), de los cuales se estableció su haplogrupo, es decir el grupo racial al que pertenecen dichas poblaciones (Ver Tabla 3.13, Figura 3.5).

Tabla 3.11. Haplotipos del cromosoma Y observados en población afroecuatoriana del Valle del Chota; n=43, haplotipos encontrados = 35.

contaje	MARCADORES															
	456	389I	390	389II	458	19	385	393	391	439	635	392	H4	437	438	448
1	14	13	22	30	16	16	13 17	13	10	11	21	11	11	14	11	21
1	14	14	22	31	16	16	14 17	13	10	11	22	11	12	14	11	21
1	14	14	21	32	16	14	14 15	14	10	12	22	14	11	14	10	19
2	14	12	21	29	17	16	12 12	14	10	11	23	11	12	15	10	19
1	15	13	21	29	16	15	18 18	13	10	11	21	11	12	14	11	21
1	15	13	21	30	17	15	15 17	13	10	11	22	11	12	14	11	21
1	15	13	21	29	18	16	17 17	14	10	12	21	11	11	14	11	22
1	15	13	21	30	18	15	15 15	13	10	11	21	11	12	14	11	21
1	15	13	22	30	18	15	16 16	13	10	12	21	11	12	14	10	21
1	15	13	21	31	18	16	16 18	13	10	12	21	11	11	14	11	21
1	15	12	22	30	15	17	13 16	12	10	11	20	12	11	16	10	19

MARCADORES																
contaje	456	389I	390	389II	458	19	385	393	391	439	635	392	H4	437	438	448
1	15	13	21	31	17	15	16 16	13	10	11	20	11	12	14	11	21
1	15	13	24	29	17	14	11 14	13	10	13	23	13	12	15	12	19
1	15	14	24	31	17	14	11 15	13	11	11	23	13	11	14	12	18
1	15	14	21	31	16	17	18 18	15	10	12	20	11	10	14	11	21
1	15	14	21	31	15	16	17 18	14	10	11	22	11	11	14	11	21
1	15	13	25	29	16	14	11 14	12	10	12	23	11	12	15	12	19
1	15	13	22	30	18	15	16 16	13	10	12	22	11	12	14	10	21
2	15	13	21	30	17	17	16 20	15	10	13	22	11	11	14	11	21
2	15	14	24	30	18	13	13 15	13	10	10	21	11	12	14	10	20
2	15	14	25	30	18	16	13,2 16	13	11	13	23	13	13	14	12	19
3	15	12	21	31	16	15	17 18	13	10	12	21	11	12	14	11	21
1	16	12	22	30	15	17	13 16	12	10	11	20	12	11	16	10	19
1	16	13	24	29	17	15	11 14	13	10	12	23	13	11	14	13	19
1	16	13	24	29	18	14	11 14	13	11	11	25	13	12	15	12	19
1	16	13	24	29	19	14	11 14	13	11	13	23	13	12	15	12	19
1	16	14	21	32	19	15	16 17	13	10	14	21	11	11	14	11	19
1	16	13	21	30	15	16	16 18	13	10	12	25	11	11	14	11	20
1	16	13	21	30	15	16	16 17	13	10	12	25	11	11	14	11	20
1	16	13	21	31	19	15	16 17	13	10	13	21	11	11	14	11	19
2	16	13	21	29	16	15	17 17	13	10	11	22	11	11	14	11	21
2	16	14	24	30	17	14	11 14	13	11	13	23	13	12	14	12	19
1	17	13	24	29	16	15	11 14	13	10	12	23	13	12	15	12	18
1	17	14	21	31	15	16	16 17	14	10	12	23	11	11	15	11	19
1	17	14	24	30	17	14	11 15	13	11	12	23	13	11	14	12	16

Tabla 3.12. Haplotipos del cromosoma Y observados en población indígena de San Juan de Ilumán; n=31, haplotipos encontrados = 18.

MARCADORES																
contaje	456	389I	390	389II	458	19	385	393	391	439	635	392	H4	437	438	448
1	14	14	24	32	18	13	14 17	14	10	14	22	14	11	13	11	21
1	14	13	24	29	17	14	11 15	13	11	13	23	13	12	14	12	19

MARCADORES																
contaje	456	389I	390	389II	458	19	385	393	391	439	635	392	H4	437	438	448
1	15	13	23	31	14	14	13 17	12	10	12	22	11	11	15	9	21
1	15	13	24	29	15	13	14 14	13	10	12	21	13	12	14	11	20
1	15	13	24	29	15	13	14 14	13	10	12	21	13	12	14	11	19
1	15	13	24	30	17	13	14 19	13	11	11	24	13	12	14	12	20
2	15	13	23	31	19	12	16 17	13	10	11	22	14	12	13	11	20
2	15	14	24	31	17	13	11 18	14	11	13	22	14	11	14	11	20
3	15	12	25	28	16	14	14 20	13	10	11	23	14	11	14	11	19
4	15	13	21	29	16	12	15 16	13	11	11	22	14	12	13	11	20
1	16	12	25	30	17	14	14 19	13	10	12	22	14	11	14	11	19
1	16	14	23	32	18	15	12 12	13	9	13	22	11	11	14	10	20
2	16	13	23	30	17	12	15 16	13	10	12	22	14	12	13	11	20
2	16	13	24	30	16	13	12 17	14	11	12	22	14	12	15	11	20
3	16	14	23	32	18	15	12 12	13	9	14	22	11	11	14	10	20
3	16	14	24	30	17	13	13 15	13	10	10	21	11	12	14	10	20
1	17	13	25	30	16	13	14 17	13	10	12	22	14	12	14	12	19
1	17	13	25	31	16	13	14 17	13	10	12	22	14	12	14	12	19

Tabla 3.13. Haplogrupos en la población afroecuatoriana del Valle del Chota e indígena de San Juan de Ilumán, Imbabura-Ecuador, establecidos a partir de los haplotipos encontrados con cromosoma Y.

Haplogrupo	Negros (%)	Indígenas (%)
E3a (Africano)	56,63	-
R1b (Español)	28,57	6,389
otros europeos	6,371	26,91
otros	8,200	0,239
Q (Amerindio)	0,231	66,45

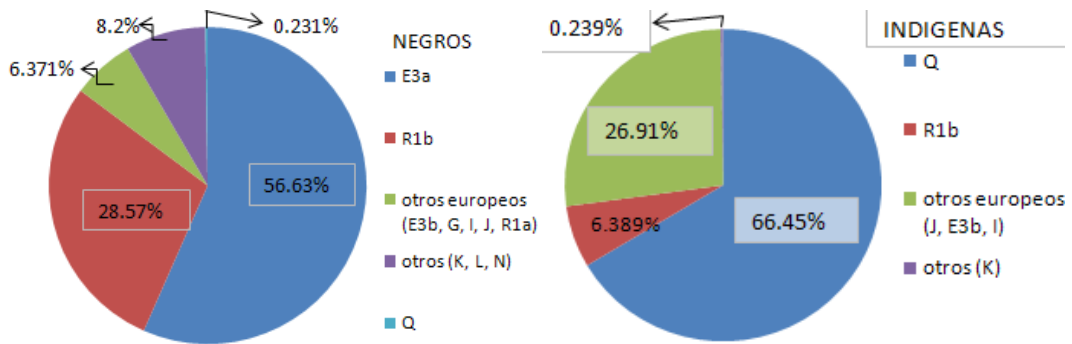


Figura 3.6. Representación gráfica de los haplogrupos encontrados en población afroecuadoriana e indígena.

## CAPÍTULO IV

### 4 DISCUSIÓN

#### ALMACENAMIENTO DE ADN

El almacenamiento de ADN es importante en medicina forense, epidemiología y en el trabajo de rutina de laboratorios clínicos y genéticos. En nuestro caso específico el mantener las evidencias forenses y su integridad permite que las mismas sean usadas a futuro si se reabre el caso judicial o para confirmar los resultados previos o probar nuevas tecnologías. También es útil su adecuado almacenamiento en el caso de material genético procedente de evidencias donde la cantidad y concentración de ADN que se puede obtener de ellas es limitado como cabello, dientes, uñas y otras muestras fácilmente degradables.

Las placas de Biomatrix contienen un polímero que cuando se le añade ADN permite el almacenamiento en seco del material a temperatura ambiente, por lo tanto no hay necesidad de costosos sistemas de refrigeración que eventualmente fallan. El polímero puede proteger el ADN mediante la formación de una capa protectora a su alrededor, formando una barrera contra la degradación y pérdida.

Los resultados en cuanto a concentración de ADN posterior al almacenamiento mostraron que no hay diferencia significativa entre la concentración inicial y la concentración luego de  $-80^{\circ}\text{C}$  y temperatura ambiente (tablas y figuras precedentes), 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  $p = 0.5620$ . El error en la prueba de Tukey fue alto debido probablemente a la forma y cantidad en la que se procesó las muestras, ya que todas las muestras fueron procesadas el mismo momento pudiendo afectarse los tiempos de acción de cada reactivo.

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  $-80^{\circ}\text{C}$  por lo tanto comparando las dos el mejor tratamiento fue placa 2 con una media de 74.50 respecto a la media de  $-80^{\circ}\text{C}$  que fue 73.27.

La temperatura ambiente promedio fue de  $23^{\circ}\text{C}$  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  $22.1^{\circ}\text{C}$  y 40% HR; y similar también al trabajo de Muller *et al.*, 2010 donde las condiciones halladas fueron  $22.4^{\circ}\text{C}$  y 38% HR.

## **STR`s AUTOSÓMICOS**

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

Las frecuencias alélicas, valor de diversidad genética, equilibrio y parámetros forenses se presentan en las tablas precedentes; los resultados de este trabajo se compararon con investigaciones de Ecuador, Colombia y México, cabe recalcar que en este estudio se incluyeron por primera vez los marcadores D2S1338 y D19S433 de los cuales no hay reportes previos en Ecuador.

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  $H_e$ : 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.

## CAPÍTULO V

### 5 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.

Las distribuciones y frecuencias alélicas en población afroecuatoriana muestran diferencia en las características genéticas con respecto a otras poblaciones.

Los afroecuatorianos se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg para los diecisiete STR`s autosómicos realizados, los indígenas están en equilibrio para quince marcadores y los mestizos para dieciséis.

Según las frecuencias alélicas, el equilibrio y parámetros forenses, los sistemas son óptimos y 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 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.

La capacidad de las placas de Biomatrix para estabilizar y proteger el ADN de la degradación a temperatura ambiente durante largos periodos de tiempo podría tener un gran impacto en la simplificación y mejora de las condiciones de almacenamiento de las muestras.

## CAPÍTULO VI

### 6 RECOMENDACIONES

Se recomienda aumentar el tamaño de la muestra en aquellos marcadores que presentaron desequilibrio genético y frecuencias alélicas menores a las mínimas. No obstante se pueden utilizar estas últimas en los cálculos en pruebas de identificación y parentesco.

Sería importante realizar comparaciones entre población afroecuatoriana del Valle del Chota y de la provincia de Esmeraldas incluyendo también otros marcadores.

Determinar la incidencia del alelo 2.2 en población ecuatoriana, es decir observar en que población o raza se encuentra mayoritariamente 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.

Para bajar el error calculado se recomienda procesar las muestras de poco en poco.

## 7 BIBLIOGRAFÍA

Abe-Sandes, K., Silva, WA., Zago, MA. (2004). Heterogeneity of the Y chromosome in Afro-Brazilian populations. *Hum Biol.* 76: 77-86.

Ácido desoxirribonucleico. Extraído el 20 de Mayo, 2011 del sitio Web: [www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com).

Acuña, V. (2004). Técnicas Genéticas aplicadas a las Ciencias Forenses. *Nature Reviews Genetics.* 5: 739-752.

Acuña, V. (2010). Técnicas genéticas aplicadas a las ciencias forenses. Escuela Nacional de Antropología e Historia.

Afroecuatoriano. Extraído el 06 de Mayo, 2011 del sitio Web: [www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com).

Almacenamiento de ADN a temperatura ambiente. Extraído el 06 de Mayo, 2011 del sitio Web: [www.biomatrica.com](http://www.biomatrica.com)

Barreto, I. (2007). Estudio biodemográfico de la población de Villa Soriano, Depto. de Soriano, Uruguay. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Córdoba.

Benítez, L & Garcés, A. (1989). Culturas ecuatorianas ayer y hoy. Quito, Edit. Abya-Yala.

Bertoni, B. (2005). "Directional mating and a rapid male population expansion in a hybrid Uruguayan population". *American Journal of Human Biology*, 17: 801-808.

Bonnet, J., Colotte, M., Coudy, D., Couallier, V., Portier, J., Morin, B., & Tuffet, S. (2010). Chain and conformation stability of solid-state DNA: implications for room temperature storage. *Nucleic Acids Research*, Volumen 38, N° 5: 1531-1546.

Bortolini, MC., Salzano, FM., Thomas, MG., Stuart, S., Nasanen, SP., Bau, CH., Hutz, MH., Layrisse, Z., Petzl-Erler, ML., Tsuneto, LT, Hill, K., Hurtado, AM., Castro de

Guerra, D., Torres, MM., Groot, H., Michalski, R., Nymadawa, P., Bedoya, G., Bradman, N., Labuda, D., Ruiz-Linares, A. (2003). "Y" chromosome evidence for differing ancient demographic histories in the Americas. *Am J Hum Genet.* 73:524-39.

Brinkman, B., Sajantila, A., Goedde, HW., 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.

Brinkmann, B., Klintschar, M., Neuhuber, F., Huhne, J., Rolf, B. (1998). Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am J Hum Genet*, 62: 1408-1415.

Butler, J. (2011). Advanced topics in forensic DNA typing: Methodology. National Institute of Standards and Technology Gaithersburg. Maryland. USA. Elsevier Inc.

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.

Cervantes, J. (2003). Obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN) útil para análisis genético, a partir de uñas recortadas. *Rev Med Hered* 14:230-233.

Clayton, TM., Whitaker, JP., Sparkes, R., & Gill, P. (1998). Analysis and Interpretation of mixed forensic stains using DNA STR profiling. *For Sci Int*, (91) 55-70.

CODENPE-SIDENPE-SIISE. (2002). Pueblos Ecuatorianos. Extraído de la página Web: [www.codempe.com](http://www.codempe.com)

Cornette, R., Kanamori, Y., Watanabe, M., Nakahara, Y., Gusev, O., Mitsumasu, K., Kadono-Okuda, K., Shimomura, M., Mita, K., Kikawada, T., & Okuda, T. (2010). Identification of Anhydrobiosis-related Genes from an Expressed Sequence Tag Database in the Cryptobiotic Midge *Polypedilum vanderplanki* (Diptera: Chironomidae). *The Journal of Biological Chemistry* 285(46): 35889–35899.

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.

Descailleaux, J. (2004). El ADN la molécula de la vida. Nanociencia et Moletrónica, Vol. 2; N°2.

EcoR1. (2009). Caracterización del perfil de ADN humano como herramienta de identificación forense. XVII Concurso Universitario Feria de las Ciencias.

Estupiñan-Bass, N. (2006). El negro ecuatoriano y su cultura. Descripción y relación de la provincia y tierra de las Esmeraldas por Miguel Cabello de Balboa M, 1553. Extraído del sitio Web: [www.cncultura.gov.ec](http://www.cncultura.gov.ec).

Frippiat, C., Zorbo, S., Leonard, D., Marcotte, A., Chaput, M., Aelbrecht, C., & Noel, F. (2010). Evaluation of novel forensic DNA storage methodologies. Forensic Science International: Genetics 627.

Gill, P., Urquhart, A., Millican, ES., Oldroyd, NJ., Watson, S., Sparkes, R., & Kimpton, CP. (1996). A new method of STR interpretation using inferential logic-development of a criminal intelligence database. Int J Legal Med; 109(1): 14-22.

Gill, P., Brenner, C., Brinkmann, B., Budowlw, B., Carracedo, A., Jobling, P., De Knijff, P., Kayser, M., Mayr, WR., Morling, N., Olaisen, B., Pasacali, V., Prinz, M., Roewer, L., Schneider, P., Sajantilla, A., & Tyler-Smith, C. (2001). DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on forensic analysis using Y-chromosome STRs. For Sci Int.

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.

Guidetti, R. (2007). “Proyecto Biokis, el animal más resistente de la Tierra se prueba en el espacio”. Disponible en el sitio Web: <http://www.ikerjimenez.com/noticias/Proyecto-Biokis-el-animal-mas-resistente-de-la-Tierra/>.

Gusev, O., Nakahara, Y., Vanyagina, V., Malutina, L., Cornette, R., Sakashita, T., Hamada, N., Kikawada, T., Kobayashi, Y., & Okuda, T. (2010). Anhydrobiosis-Associated Nuclear DNA Damage and Repair in the Sleeping Chironomid: Linkage with Radioresistance. *PLoSOne* 5(11): e14008.

Hauge, XY., & Litt, M. (1993). A study of the origin of “shadow bands” seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by the PCR. *Hum Mol Genet*, 2(4): 411-415.

Hernández, L. (2002). La Prueba del ADN, una Herramienta Contundente en el Esclarecimiento de los Delitos de Violación. *Revista Latinoamericana de Derecho Médico y Medicina Legal* 6 (2):15-20.

Hincapié, M., Gil, A., Pico, A., Gusmáo, 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.

Hib, J & De Robertis, E. D. P. (1998). Fundamentos de biología celular y molecular. El Ateneo, 3ª edición, 416 páginas. ISBN 950-02-0372-3. ISBN 978-950-02-0372-2.



Información General del Chota. Extraído el 06 de Mayo, 2011 de la Dirección de Turismo - Gobierno Provincial de Imbabura del sitio Web: [www.imbaburaturismo.gov.ec](http://www.imbaburaturismo.gov.ec).

Iturriaga, G., Gaff, D., & Zentella, R. (2000). New desiccation tolerant plants, including a grass, in the central highlands of Mexico, accumulate trehalose. Aust. J. Bot. 48: 153-158.

Kleiman & Yaakov. (2000). The fascinating story of how DNA studies confirm an ancient biblical tradition. Extraído el 25 de Mayo, 2011 del sitio Web: [www.aish.com](http://www.aish.com).

La criptobiosis en el phylum Tardigrada. Extraído el 20 de Mayo, 2011 del Mundo de la Biología del sitio Web: [www.nematodes.org/tardigrades/Tardigrades.html](http://www.nematodes.org/tardigrades/Tardigrades.html).

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.

Lins, AM., Sprecher, CJ., Puers, C., & Schumm, JW. (1996). Multiplex sets for the amplification of polymorphic short tandem repeat loci – silver stain and fluorescence detection. Biotechniques, 20: 882-889.

Martínez, B. (1999). Introducción al estudio de los Polimorfismos del AND en Medicina Forense. En: Martínez Jarreta MB (ed), La prueba del ADN en Medicina Forense. Barcelona: Masson.

Mascorro, J., Avonce, N., & Iturriaga, G. (2005). Biotecnología de la Trehalosa en las Plantas. Revista Chapingo Serie Horticultura Volumen.11, número 002, pp. 193-202. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo – México.

Medina, H., & Castro, M. (2010). AFROECUATORIANOS: Un Movimiento Social Emergente. Extraído el 10 de Mayo, 2011 del sitio Web: [www.mira.ec](http://www.mira.ec).

Mosquera, J. (2010). Tardigrados Espaciales. Tardigrades in space.

Muller, R., Cohn, J., Munson, M., & Clement, O. (2010). Scientific evaluations of Biomatrix's technologies for room temperature storage and stabilization of biological samples. Biomatrix the Biostability Company. Saving samples, time, space & energy.

Nedel, F., De Almeida, D., Oliveira, I., Chaves, S., & Demarco, F. (2009). Buccal Cells Submitted to Three Different Storage Conditions Before DNA Extraction. Journal of Applied Oral Science 17(2): 113-5.

Parkinson, G., & Lee, M. (2002). Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. Nature 417 (6891): pp. 876–80. PMID 12050675.

Población Afroecuatoriana Información General. Extraído el 06 de Mayo, 2011 del sitio Web: [www.codae.gov.ec](http://www.codae.gov.ec).

Poyatos, D., & Morer, I. (2008). Pruebas de Paternidad. Departamento de Genética Molecular y Patologías Hereditarias. Laboratorio de análisis Dr. Echevarne. Barcelona.

Proyecto Biokis: El animal 'más resistente de la Tierra' se prueba en el espacio. Extraído el 20 de Mayo, 2011 del sitio Web: <http://www.ikerjimenez.com/noticias/Proyecto-Biokis-el-animal-mas-resistente-de-la-Tierra/>.

Quiénes son, Afroecuatorianos. Extraído el 06 de Mayo, 2011 del sitio Web: [afros.wordpress.com](http://afros.wordpress.com).

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.

Rada, A., & Taboada, G. (1998). Métodos de obtención y purificación de ADN humano para su aplicación en genética molecular. Instituto de Genética. Facultad de Medicina. Universidad Mayor de San Andrés. BIOFARBO volumen VI.

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.

Sans, M. (2009). "Raza", adscripción étnica y genética en Uruguay. *Runa* v.30 n.2 Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Satz, L., & Kornblihtt, A. (1993). La reacción en cadena de la polimerasa, El método y sus aplicaciones. *Ciencia Hoy Volumen 4, N°23*.

Sparkes, R., Kimpton, C., Gilbard, S., Carne, P., Andersen, J., Oldroyd, N., Thomas, D., Urquhart, A., & Gill, P. (1996). The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework (II), artefacts, casework studies and success rates. *Int J Legal Med* 1996, 109(4): 195-204.

Torres, Y., Aler, M., Plata, A., Domínguez, A., Sanz, P., & Gisbert, M. (2007). Factores que afectan al análisis biológico de las muestras de agresiones sexuales. *Cuad Med Forense*; 13(47):45-56.

Vasil, IK. (2007). Molecular genetic improvement of cereals: transgenic wheat (*Triticumaestivum L.*). *Plant Cell Rep.* 26 ((8)).1133-54.

Wan, E., Akana, M., Pons, J., Chen, J., Musone, S., Kwok, P., & Liao, W. (2010). Green Technologies for Room Temperature Nucleic Acid Storage. *Curr. Issues Mol. Biol.* 12: 135-142.

Weir, B., Triggs, C., Starling, L., Stowell, L., Walsh, K., & Buckleton, J. (1997). Interpreting DNA mixture. *J Forensic Sci* 42 (2): pp. 213–22.

Whitaker, JP., Clayton, TM., Urquhart, AJ., Millican, ES., Downes, TJ., & Kimpton, CP. (1995). Short typing repeat typing of bodies from a mass disaster: high success rate and characteristic amplification patterns in highly degraded samples. *Bio Techniques*, 18 (4): 670-7.