

Análisis de Doce Marcadores Polimórficos en el ADN de una Muestra Poblacional del Valle Central Costarricense

Eugenia Rojas,¹ Jorge Lobo² y Pedro León³

Objetivo: Desarrollo de bases de datos de frecuencias alélicas en una muestra de la población costarricense del Valle Central.

Métodos: Muestras de sangre periférica de más de 40 individuos del Valle Central de Costa Rica fueron utilizadas para aislar ADN y analizar 10 marcadores polimórficos de repeticiones dinucleotídicas y 2 marcadores de tipo minisatélite por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. Los alelos se identificaron usando como referencia ADN de las familias del Centro de Estudios de Polimorfismos Humanos (CEPH). La identificación de los alelos se hizo marcando uno de los dos iniciadores con ³²P en la punta 5', y separando los productos de la amplificación por electroforesis en geles de secuenciación y por autoradiografía.

Resultados y conclusión: El análisis de las frecuencias alélicas en esta muestra indica que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg y no se presenta evidencia de desequilibrio gamético entre diferentes marcadores. En este trabajo se compara la muestra costarricense con otras poblaciones estudiadas con los mismos marcadores genéticos, y se encuentra similitud entre ellas en cuanto a las frecuencias alélicas. Es notable que la muestra costarricense presenta, con 4 de 10 marcadores, los niveles más bajos de heterocigosidad, seguidos por la muestra de Cerdeña. En contraste, las muestras de origen africano presentan los más altos índices de heterocigosidad, con más alelos presentes.

Descriptores: micro y minisatélites del ADN, PCR de polimorfismos humanos, identificación humana

Introducción

Los estudios del genoma humano han revelado la existencia de secuencias repetitivas en tandem en muchos sitios a lo largo de todos los cromosomas, que varían en el número de veces que la unidad de repetición está presente.¹⁻⁷ Cuando la unidad repetitiva del marcador genético es corta, de 2 a 5 nucleótidos, se les denomina microsátélites, o 'short tandem repeats' (STRs) mientras que si la secuencia repetitiva es de 9 a 64 nucleótidos se les denomina minisatélites. También se ha acuñado el término

'variable number tandem repeat' (VNTR) para designar a los minisatélites, aunque esto se presta a confusión porque todos estos polimorfismos, finalmente, representan alguna forma de repetición en tandem.^{2,8} En el genoma nuclear se han descrito miles de microsátélites multialélicos con un alto grado de heterocigosidad (>70%) en todas las poblaciones estudiadas hasta la fecha.⁹⁻¹¹ Ha sido precisamente con base en marcadores dinucleotídicos que el consorcio francés GENETHON elaboró los primeros mapas completos del genoma humano, con una resolución menor de 5 cM.^{12,13} Esto permite, en principio, el

Abreviaturas: CEPH, Centro de Estudios de Polimorfismos Humanos; STR, repeticiones pequeñas en tandem; VNTR, repeticiones en tandem en número variable; cM, centiMorgan; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; CA, citosina-adenina.

1. Perkin-Elmer, Santiago, Chile.
2. Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica.
3. Escuela de Medicina y CIBCM, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

Correspondencia: Pedro León. CIBCM, Universidad de Costa Rica.

ma-peo de cualquier gen causante de enfermedades hereditarias simples o complejas.^{14,15}

Los microsatélites también han resultado de mucha utilidad para resolver casos de paternidad dudosa y de identidad.^{8, 16-23} En contraste, los marcadores clásicos (de tipo inmunológico, grupos sanguíneos, proteínas séricas, HLA, etc.) son muy pocos y presentan una baja heterocigosidad. Por lo tanto, la tendencia en el ámbito mundial es la de utilizar repeticiones tri- y tetranucleotídicas, muchas de los cuales tienen alelos pequeños, fáciles de resolver aún en geles de agarosa. Además, se ha visto que estas son más estables durante el proceso de amplificación y tienen una tasa de mutación más baja durante la replicación que las repeticiones dinucleotídicas.²⁴

Las tecnologías moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han facilitado el acceso de muchos laboratorios a participar en el mapeo genético y la identificación forense, incluso en países en vías de desarrollo.^{25, 26} La PCR permite analizar cantidades muy pequeñas de ADN, por lo que aún minúsculas muestras de material biológico aportan evidencias de identidad.^{27, 28} Además, como ya se indicó, los alelos de los microsatélites son de tamaño pequeño, por lo que es posible analizar ADN degradados, en contraste con los minisatélites con alelos más grandes. El uso de las técnicas de hibridación de Southern tiene la desventaja de que requiere gran cantidad de ADN no degradado para el análisis.^{7, 21, 29}

Este trabajo representa el primer estudio genético hecho con micro y minisatélites en una muestra de la población costarricense, usando ADN nuclear para fines forenses. Previamente, Barrantes y colaboradores han estudiado muestras de amerindios costarricenses con marcadores clásicos³⁰ y con microsatélites multialélicos en el cromosoma Y y en el gen de la mio-tonina quinasa.^{31, 32} Los datos poblacionales que se ofrecen en este trabajo fueron utilizados para establecer las probabilidades de paternidad en 10 casos analizados como parte de una tesis de maestría.³³ En este artículo se presentan los resultados del análisis de estos polimorfismos genéticos en la muestra de la Meseta Central y se comparan con las muestras de Cerdeña, Egipto y África al sur del Sahara estudiadas por Di Rienzo *et al*³⁴ con estos mismos marcadores.

Materiales y Métodos

Muestra poblacional: La muestra proviene de 10 parejas no relacionadas entre sí, referidas para pruebas de paternidad por el Laboratorio del Organismo de Investigaciones Judiciales de la Corte Suprema de Justicia, al CIBCM en la Universidad de Costa Rica. Otras 26 personas no relacionadas con 4 apellidos comunes en el Valle Central (E. Fournier, comunicación personal) donaron voluntariamente, previo consentimiento informado, una muestra de 20 ml de sangre venosa en tubos con ácido cítrico-dextrosa (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes NJ 07417-1885). Se utilizaron métodos previamente descritos para el aislamiento de núcleos, digestión

con Proteinasa K y extracción con solventes orgánicos antes de precipitar el ADN con etanol.^{34, 35} Las muestras de ADN se mantuvieron concentradas y en congelación a -20°C.

Tipo genético con marcadores de ADN: Los métodos de amplificación y análisis con estos marcadores genéticos han sido descritos.^{34, 36} Los marcadores genéticos usados fueron aportados por el Dr. Nelson Freimer y analizados parcialmente en su laboratorio en la Universidad de California en San Francisco. La mayoría de estos pertenecen a la serie de James Weber en Marshfield, USA con el dinucleótido citosinaadénina (CA) repetido de 15 a 30 veces.⁶ Las condiciones para la amplificación de estos marcadores están detalladas en el trabajo de Di Rienzo *et al*³⁴ y en Rojas.³³ Para el análisis de los STRs se marcó uno de los iniciadores en la punta 5' con ³²P por la reacción de la T4-kinasa, según el protocolo descrito por Freimer *et al*,³⁶ y los productos de amplificación se separaron en geles de secuenciación de poliacrilamida al 6%. Los dos minisatélites, APO B y D1S80, se analizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Los genotipos fueron registrados por dos personas, independientemente, para mayor consistencia.

Análisis estadístico: Las frecuencias alélicas, el grado de heterocigosidad, y el análisis de Hardy-Weinberg se realizaron con el programa Biosys-1.³⁷ También se analizaron las frecuencias genotípicas observadas y esperadas usando una prueba de Chi-cuadrado para muestras pequeñas y se determinó el índice de fijación, que cuantifica el exceso o deficiencia relativa de heterocigotos en la población ($F=1$ cuando solo se observan heterocigotos); el Chi-cuadrado evalúa estadísticamente la significancia de la observación.³⁸

Resultados

El Cuadro 1 muestra la lista de marcadores amplificados, su locus genético, el número de cromosomas analizados, el nivel de heterocigosidad detectado y otras características de esta muestra del Valle Central. También se presentan los valores del Chi-cuadrado y los valores del índice de fijación, que son muy bajos para casi todos los marcadores, lo cual es consistente con la hipótesis de que la población está próxima a un estado de equilibrio. En algunos casos este índice toma un pequeño valor negativo, lo cual sugiere que existe una deficiencia de homocigotas y un exceso de heterocigotas para ese marcador. Estas desviaciones son muy leves y no significativas, como tampoco lo son los valores de Chi-cuadrado del cálculo de Hardy-Weinberg. El Cuadro 2 presenta las frecuencias alélicas observadas en la muestra. El tamaño del alelo incluye las regiones únicas donde se hibridan los iniciadores y otras secuencias adyacentes, que deben de restarse para establecer el número de repeticiones, según explica la leyenda del Cuadro 2. El análisis de los datos también revela la ausencia de ligamiento entre los marcadores utilizados (detalles en 33).

El análisis de los resultados refleja una distribución alélica comparable con las muestras de Cerdeña, Egipto y África al sur

Cuadro 1

Nombre del locus genético, el marcador específico en paréntesis, la localización cromosómica, heterocigosidad (H), número de alelos detectados, rango de tamaño de los alelos, número de cromosomas en esta muestra (N), el valor de Chi-cuadrado corregido para el tamaño de la muestra (λ^2) y el índice de fijación (F) para cada marcador en esta muestra poblacional del Valle Central de Costa Rica

Locus genético	Cromosoma	H	# alelos	Rango tamaño	N	λ^2	F
APO B	2p23-24	0.78	9	480-905	96	0.934	-0.040
DIS80(MCT118)	1p35-36	0.85	16	433-689	90	0.567	0.092
APOA2 (Mfd3)	1q21-23	0.78	8	131-147	90	0.030	-0.067
D18S35(MFD 32)	18q21	0.64	8	100-124	86	0.028	-0.042
D22S156(MFD 33)	22q11-12-12	0.64	6	98-108	94	0.043	0.117
D4S175(MFD38)	4q25-34	0.82	11	110-132	88	1.958	0.017
D4S174(MFD59)	4q11-13	0.85	10	177-197	74	0.836	0.093
D12S59(MFD75)	12q	0.86	13	162-192	90	0.014	-0.018
D21S156(MFD55)	21q22.3	0.82	11	77-105	90	0.657	-0.040
D8S164(MFD104)	8q13-22.1	0.75	12	163-201	88	0.441	0.016
D19S178(M 139)	19q13.2	0.70	12	153-185	90	0.008	0.022
D4S193(MFD142)	4p21-q24	0.76	7	95-107	86	1.440	-0.090

del Sahara,³⁴ que son de tamaño similar. No se presentan diferencias extremas en la frecuencia de los alelos más comunes entre las poblaciones. Por ejemplo, para los marcadores D18S35, D19S178 y D22S156 podemos observar que el alelo más común es el mismo en todas las poblaciones, mientras que con el marcador D4S175 el alelo predominante es el mismo en tres de las cuatro poblaciones comparadas. Algunos de estos marcadores presentan perfiles multimodales, como se observa claramente con APOA2, D19S35 y D19S178 en las cuatro poblaciones. Aunque la muestra del Valle Central no se diferencia notablemente de las otras poblaciones, en particular con marcadores muy conservados como APOA2, D22S156 y D19S178, el marcador D4S175 presenta un alelo muy común en la población costarricense (alelo 112 con frecuencia de 0.30) que en las otras poblaciones está presente en menos del 0.10 de la población. Dado el tamaño pequeño de las muestras es imposible hacer aseveraciones muy certeras sin estudios adicionales.

Discusión

La comparación de marcadores en la muestra de la Meseta Central de Costa Rica con las poblaciones estudiadas por Di Rienzo *et al.*,³⁴ confirma la similitud genética de las poblaciones humanas. La muestra de la Meseta, sin embargo, presenta, con 4 de los 10 marcadores, la tasa de heterocigosidad más baja³⁴ (Cuadro 3), seguida por la muestra de Cerdeña con 3 de 10 marcadores. Esto podría deberse a efectos fundadores de una población que se expande, con algunos alelos sobrerrepresentados y otros ausentes,^{11,34,38,40} propiciados por condiciones de "insularidad".

La distribución multimodal en estos STRs ha sido relacionada con modelos mutacionales de dos eventos, que introducen

mutaciones y variabilidad al acervo genético de la población.^{34,41} Por un lado, las mutaciones sencillas de adición o deleción de una unidad de repetición generan una distribución bimodal alrededor de una media. Por otro, eventos mutacionales menos comunes, que ocurren posiblemente en la meiosis, involucran cambios de muchas unidades que alteran la distribución bimodal de estas repeticiones. La persistencia de perfiles similares de frecuencias alélicas con algunos marcadores en todas las poblaciones humanas, sugiere que este patrón se estableció en un antepasado común, antes de la separación de subpoblaciones y del surgimiento de diferentes etnias.

La disponibilidad de bases de datos sobre las frecuencias alélicas en la población costarricense es útil para estimar las probabilidades de identidad en procesos judiciales. De hecho, estos datos fueron utilizados para resolver los primeros 10 casos de paternidad dudosa solicitados por el Poder Judicial.³³ La probabilidad de que alguien posea un alelo dado depende de la frecuencia de ese alelo en la población. La probabilidad de poseer una serie de alelos de diferentes marcadores no ligados, se establece como el producto de la frecuencia alélica de cada miembro de la serie. Con esta estadística se pueden calcular índices de verosimilitud para la probabilidad de paternidad o de identidad forense.^{16,18,38} Es evidente que se requieren estudios de otras subpoblaciones en el territorio nacional, para llegar a tener perfiles genéticos representativos de todo el país.

Cuando no se dispone de bases de datos de las poblaciones locales, se usan datos de otras poblaciones humanas, o se hacen aproximaciones^{21,26} que utilizan valores de frecuencia muy altos, restando poder incriminatorio a cada marcador. Esto favorece al imputado, siguiendo el principio legal *in dubio pro reo*, y aumenta el costo de la prueba, pues para lograr el mismo grado de

Cuadro 2.

Frecuencias alélicas de 10 micro y 2 minisatélites en el ADN nuclear. Excepto por el marcador D1S80, el tamaño de los alelos (en negrita) es en pares de bases. El tamaño de las secuencias, a ambos lados de la repetición, en pares de bases: APOA2, 104; D18S355, 79; D22S156, 50; D4S174, 136; D4S175, 71; D4S193, 62; D8S164, 115; D12S59, 100; D19S178, 124. Para D1S80 se utilizó la nomenclatura validada por Cosso y Reynolds³⁹

Locus	Frecuencia alélicas debajo de los alelos (negritas)												
APOA2	131 0.23	133 0.13	135 0.00	137 0.31	139 0.03	141 0.04	143 0.21	145 0.02	147 0.01				
D4S174	177 0.28	179 0.13	181 0.09	183 0.06	185 0.12	187 0.08	189 0.08	191 0.06	193 0.05	197 0.01			
D4S175	110 0.02	112 0.30	114 0.03	116 0.01	118 0.03	122 0.01	124 0.14	126 0.13	128 0.06	130 0.06	132 0.18		
D4S193	95 0.01	97 0.03	99 0.04	101 0.17	103 0.22	107 0.37	107 0.14						
D8S164	163 0.01	165 0.15	167 0.05	169 0.02	171 0.43	173 0.08	187 0.01	193 0.14	195 0.05	197 0.01	199 0.01	201 0.01	
D12S59	162 0.02	166 0.10	168 0.22	170 0.03	172 0.10	174 0.04	176 0.20	178 0.13	180 0.06	182 0.02	186 0.02	188 0.02	192 0.01
D18S35	100 0.01	104 0.55	106 0.06	108 0.05	118 0.05	120 0.04	122 0.18	124 0.01					
D19S178	153 0.01	155 0.52	157 0.02	169 0.02	171 0.01	173 0.04	175 0.11	177 0.04	179 0.08	181 0.04	183 0.04	185 0.03	0.02
D21S156	77 0.34	85 0.03	89 0.06	91 0.12	93 0.03	95 0.08	97 0.07	99 0.12	101 0.07	103 0.02	105 0.01		
D22S156	98 0.01	100 0.01	102 0.20	104 0.52	106 0.20	108 0.05							
APO B	480 0.01	550 0.12	603 0.16	641 0.39	689 0.03	782 0.04	825 0.01	866 0.11	905 0.01				
D1S80	18 0.30	20 0.03	21 0.01	22 0.01	23 0.01	24 0.16	25 0.12	26 0.03	27 0.03	28 0.02	29 0.07	30 0.05	
	31 0.07	32 0.01	33 0.01	34 0.02									

Cuadro 3

Valores de heterocigosidad de las cuatro poblaciones estudiadas con diez marcadores genéticos**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Costa Rica	0.64	0.85	0.75	0.70	0.76	0.85	0.78	0.64	0.82	0.86
Cerdeña	0.79	0.87	0.77	0.76	0.78	0.79	0.67	0.70	0.76	0.85
Egipto	0.77	0.88	0.79	0.77	0.75	0.88	0.73	0.70	0.87	0.84
África*	0.74	0.80	0.78	0.82	0.59	0.87	0.84	0.66	0.83	0.85

*África al sur del Sahara

**Se indican en negrita el menor valor de cada serie

1: D4S174; 2: D22S156; 3: D8S164; 4: D19S178; 5: D4S193; 6: D21S156; 7: D22S156; 8: D18S35; 9: D4S175; 10: D12S59.

confiabilidad estadística es necesario aumentar el número de marcadores (por ejemplo, de 6 a 10).

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a muchos compañeros en el CIBCM que hicieron diferentes aportes: Sandra Silva, Reynaldo Pereira, Henriette Raventós, Heidy Villalobos y Amy C. Peterson. También agradecemos el apoyo del Dr. Nelson Freimer del laboratorio de Neurogenética de la Universidad de California en San Francisco. Además de la Vice Rectoría de Investigación, este trabajo recibió el apoyo del CONICIT (801-90567) y de la IAEA (COS 013/) para la pasantía de E. R. en el laboratorio del Dr. Freimer.

Abstract

Aim: To establish databases of allele frequencies in a Costa Rican Central Valley population sample.

Methods: Peripheral blood samples from more than 40 individuals were used to isolate DNA and analyze each sample with 10 dinucleotide repeat genetic markers and with 2 minisatellite repeats, using the polymerase chain reaction. Alleles were identified by comparison with DNA from CEPH family members. Genotypes were determined by labelling one of the two PCR primers with ³²P before amplification, electrophoresis in sequencing gels and autoradiography.

Results and Conclusions: Analysis of this data set indicates that this sample is in Hardy-Weinberg equilibrium and shows no evidence of linkage disequilibrium between markers. These data are compared with results from other human populations analyzed with the same markers, finding similarities in allele frequencies among them. Notably, the Costa Rican sample presents the lowest heterozygosity value, with 4 of the 10 dinucleotide markers tested, followed by a Cerdanian sample. In contrast, the two African samples presented the highest heterozygosity indexes with a larger number of alleles.

Referencias

1. Jeffreys AJ, Brookfield JFY, Semenov R. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature* 1985; 317: 818-819.
2. Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoto E, Hoff M, Kuhlman E, White R. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 1987; 235: 1616-1622.
3. Nanda I, Zischler H, Epplen C, Guttenbach M, Schmid M. Chromosomal organization of simple repeated DNA sequences used for DNA fingerprinting. *Electrophoresis* 1991; 12: 193-203.
4. Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 1989; 17: 6463-6471.
5. Weber JL. Informativeness of human (dC-dA).(dG-dT) polymorphisms. *Genomics* 1990; 7: 524-530.
6. Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 1989; 44: 388-396.
7. Wilson V, Thein SL. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* 1985; 314: 67-72.
8. Kasai K, Nakamura Y, White R. Amplification of a Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) Locus (pMCT118) by the Polymerase Chain Reaction (PCR) and its Application to Forensic Science. *J Foren Sci* 1990; 35: 1196-1200.
9. Cabrera C, Díez A, Valverde E, Carracedo A, Alemany J. Allele frequency distribution of four PCR-amplified loci in the Spanish population. *Foren Sci International*. 1995; 71: 153-164.
10. Edwards A, Civitello A, Hammond H, Caskey T. DNA Typing and Genetic Mapping with Trimeric and Tetrameric Tandem Repeats. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 746-756.
11. Flint J, Boyce AJ, Martinson JJ, Clegg JB. Population Bottlenecks in Polynesia revealed by minisatellites. *Hum Genet* 1989; 83: 257-263.
12. Weissenbach J, Gyapay G, Dib C, Vignal A, Morissette J, Millasseau P, Lathrop M. 1992; A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* 359:794-801.
13. Gyapay G, Morissette J, Vignal A, Dib C, Fizames C, Millasseau P, Marc S. *et al.* The 1993-94 Génethon human genetic linkage map. *Nature Genet*. 1994; 7: 246-339.
14. Armour JAL, Patel I, Thein SL, Fey MF, Jeffreys AJ. Analysis of somatic mutations at human minisatellite loci in tumours and cell lines. *Genomics* 1989; 4: 328-334.
15. McKusick VA. Mendelian Inheritance in Man (8th edition), the John Hopkins University Press, Baltimore and London, vol. 1 and 2, 1994.
16. Alford RL, Hammond HA, Coto I, Caskey CT. Rapid and Efficient Resolution of Parentage by Amplification of Short Tandem Repeats. *Am J Hum Genet* 1994; 55 (1): 190-195.
17. Amos W, Barrett JA, Pemberton JM. DNA fingerprinting: parentage studies in natural populations and the importance of linkage analysis *Proc R Soc Lond B* 1992; 249:157-162.
18. Baird M, Balazs I, Giusti A, Miyazaki L, Nicholas L, Wexler K, Kanter E, Glassberg J, Allen F, Rubinstein P, Sussman L. Allele frequency distribution of two highly polymorphic DNA sequences in three ethnic groups and its application to the determination of paternity. *Am J Hum Genet* 1986; 39:489-501.
19. Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allens RC. Analysis of the VNTR Locus D1S80 by the PCR followed by High-Resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 137-144.

20. Gill P, Werrett DJ. Exclusion of a man charged with murder by DNA fingerprinting. *Foren. Sci. International* 1987; 35: 145-148.
21. Hagelberg E, Gray IC, Jeffreys AJ. Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature* 1991; 352: 427-429.
22. Hammond HA, Jin L, Zhong Y, Caskey CT, Chakraborty R. Evaluation of 13 Short Tandem Repeat Loci for use in Personal Identification Applications. *Am J Hum Genet* 1994; 55 (1): 175-189.
23. Trabetti E, Galavotti R, Pignatti PF. Genetic Variation in the Italian population at Five Tandem Repeat Loci Amplified *in vitro*: use in paternity testing. *Molec and Cell Probes* 1993; 7: 81-87.
24. Utah Marker Development Group. A collection of ordered tetranucleotide-repeat markers from the human genome. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 619-628.
25. Jeffreys AJ, Pena SDJ. Brief introduction to human DNA fingerprinting. In *DNA Fingerprinting: State of the Science* ed Pena SDJ, Chackaborty R, Epplen JT, Jeffreys AJ, Birkhauser Verlag Basel/Switzerland, 1993.
26. Jeffreys AJ, Royle V, Patel V, Armour JAL, MacLeod A, Collick A, Gray IC, Neumann R, Gibbs M, Crosier M, Hill M, Signer E, Monckton D. Principles and Recent Advances in Human DNA Fingerprinting. In *DNA Fingerprinting: Approaches and Applications*. ed. Burke T, Dolf G, Jeffreys AJ, Wolff R, Birkhauser Verlag Basel/Switzerland. 1991.
27. Mullis K, Faloona F, Scharf SJ, Saiki R, Horn G, Erlich HA. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol* 1986; 51: 263-273.
28. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.
29. Sajantilla A, Strom M, Budowle B, Karhunen PJ, Peltonen L. The polymerase chain reaction and post-mortem forensic identity testing: application of amplified DIS80 and HLA-DQA loci to the identification of fire victims. *Foren Sci International*. 199; 51: 23-34.
30. Barrantes R., Smouse PE, Mohrenweiser H, Gershowitz H, Azofeifa J, Arias TD, Neel JV. Microevolution in Lower Central America: Genetic characterization of the Chibcha-speaking groups of Costa Rica and Panama, and a consensus taxonomy based on genetic and linguistic affinity. *Am J Hum Genet* 1990; 46: 63-84.
31. Deka R, Jin L, Shriver MD, Yu LM, Saha N, Barrantes R, Chakraborty R, Ferrell RE. Dispersion of human Y chromosome haplotypes based on five microsatellites in global populations. *Genome Research* 1996; 6:1177-1184.
32. Deka R, Majumder P O, Shriver MD, Stivers DN, Zhong Y, Yu LM, Barrantes R, Yin SJ, Miki T, Hundrieser J, Bunker CH, McGarvery ST, Sakallah S, Ferrel RE, Chakraborty R. Distribution and evolution of CTG repeats at the myotinin protein kinase gene in human populations. *Genome Research* 1996; 6:142-154.
33. Rojas E. Estudio de una muestra poblacional costarricense con marcadores de ADN. Tesis de Maestría, Universidad de Costa Rica. 1995.
34. Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdés AM, Slatkin M, Freimer NB. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 3166-3170.
35. León PE, Raventos H, Lynch E, Morrow J, King MC. A gene for an inherited form of deafness maps to chromosome 5q31. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 5181-5184.
36. Freimer NB, Reus VI, Escamilla M, McInnes A, Spesny M, Leon PE, Service S, Smith L, Silva S, Rojas E, Gallegos A, Meza L, Fournier E, Baharloo S, Blankenship K, Tyler D, Batki S, Vinogradov S, Weissenbach J, Barondes S, Sandkuijl LA. Genetic mapping using haplotypes, association and linkage methods suggests a locus for severe bipolar disorder (BPI) at 18q22-q23. *Nature Genet* 1996; 12: 436-441.
37. Swofford DL. *Phylogenetic analysis using parsimony, version 3.0*. University of Illinois, Urbana; 1990.
38. Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York. 1987; 512pp.
39. Cosso S, Reynolds R. Validation of the AmpliFLP D1S80 PCR amplification kit for forensic casework analysis according to TWGDAM guidelines. *J. Forensic Sci.* 1991; 40: 424-434.
40. Escamilla MA, Spesny M, Reus VI, Gallegos A, Meza L, Molina J, Sandkuijl L, Fournier E, León PE, Smith L, Freimer NB. Use of linkage disequilibrium approaches to map genes for bipolar disorder in the Costa Rican population. *Am J Med Genet* 1996; 67: 244-253.
41. Valdés AM, Slatkin M, Freimer NB. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. *Genetics* 1993; 133: 737-749.