

Maestría de Medicina Molecular
Curso de Genética molecular Forense

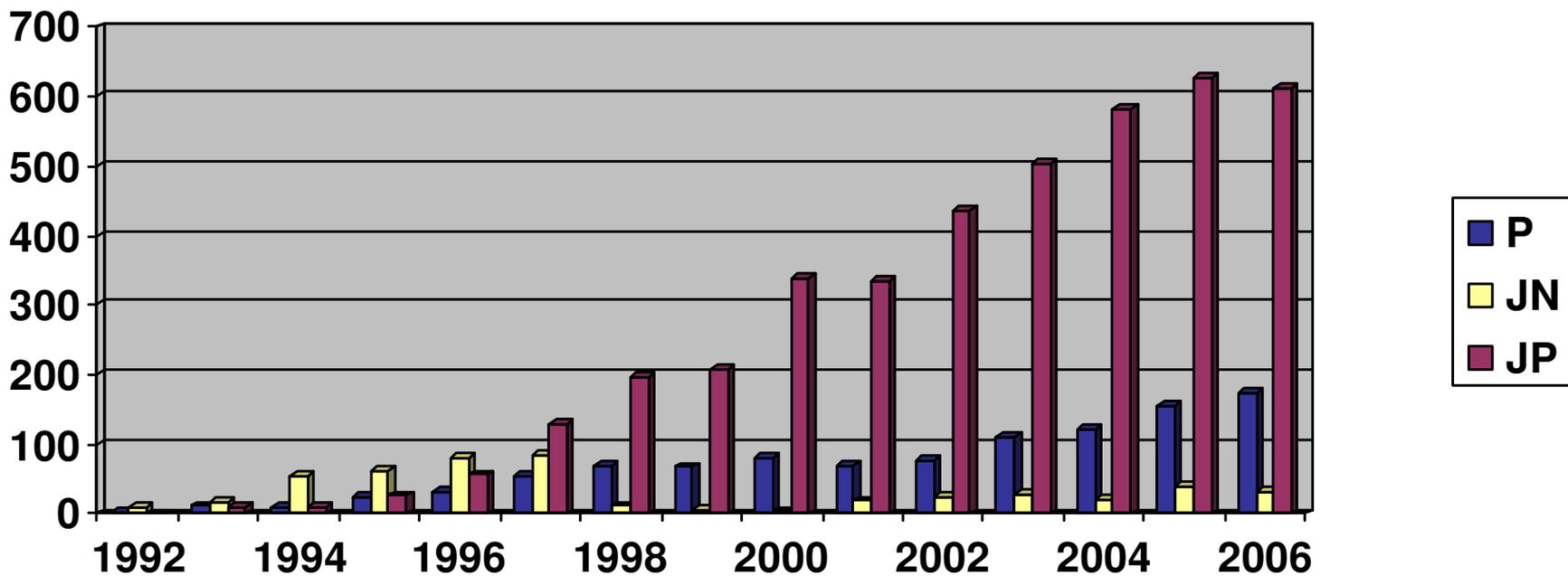
21 DE JUNIO de 2008
Instituto Leloir

Dr. Daniel Corach
Servicio de huellas digitales genéticas
Facultad de Farmacia y Bioquímica
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Demanda de Análisis de Identificación

Poder Judicial de la Nación , Provinciales y Particulares

Solicitantes



Genética Forense

Biología Molecular

Estadística

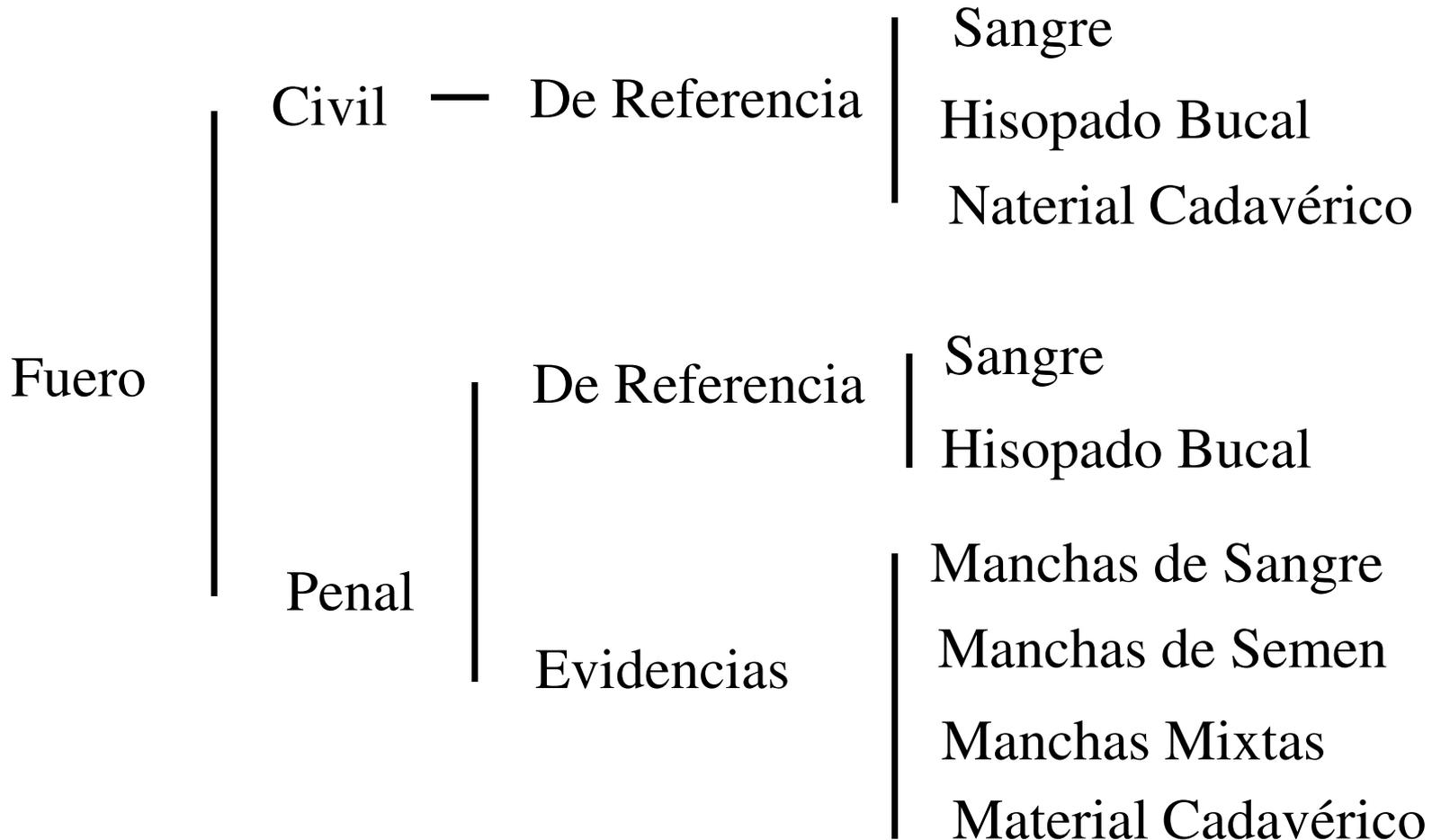
Derecho Civil y Penal

Criminalística

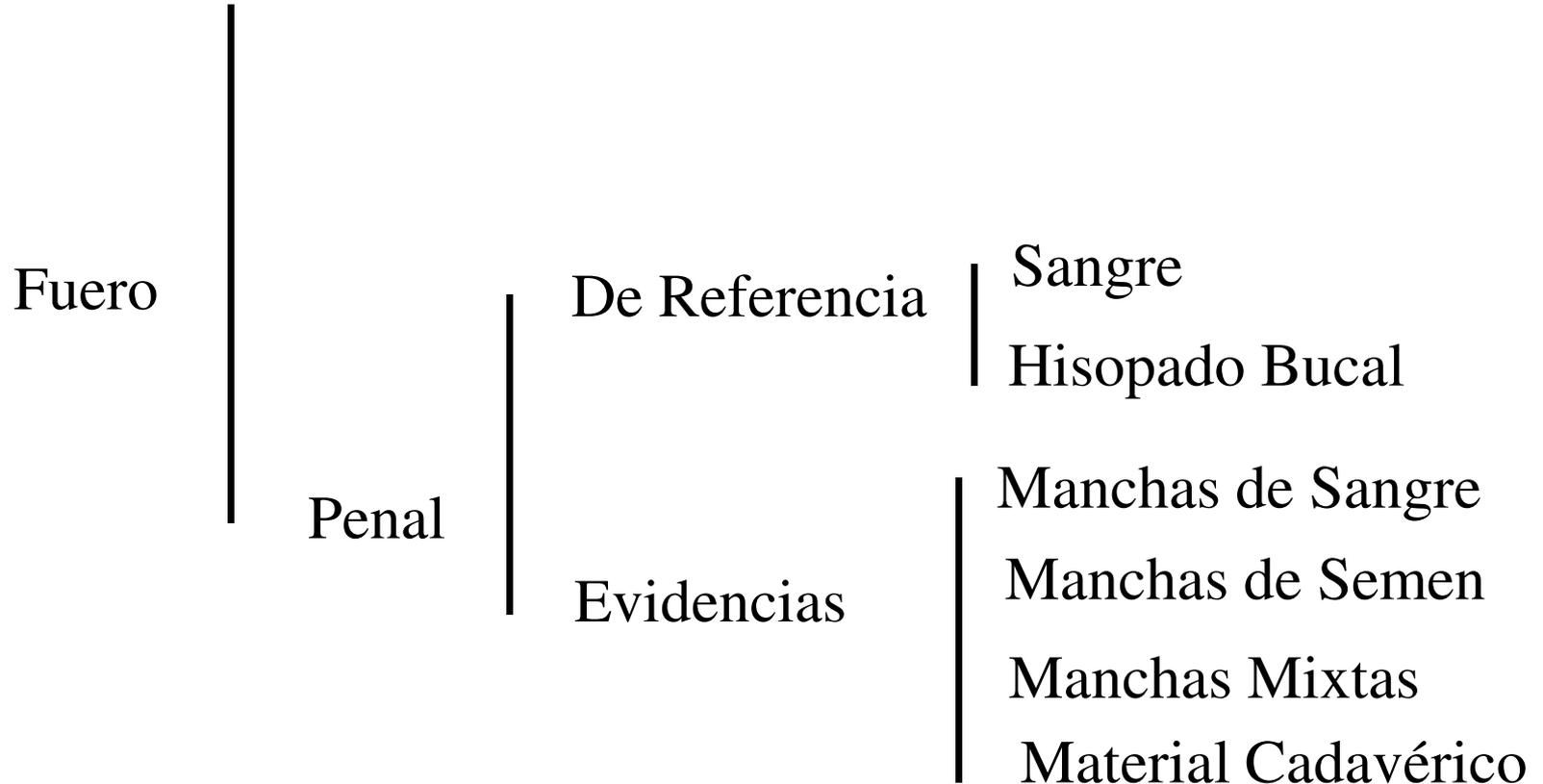
Genética de Poblaciones

Tipos de Vestigios que Pueden Contribuir a la Identificación de Evidencias Moleculares

Tipos de Muestras



Tipos de Muestras



Evidencias y Muestras

- Los análisis de ADN se encuentran optimizados.
- La evidencia es sin duda el material más importante de una pericia.
- Actualmente la mayor parte de los problemas periciales surgen por errores en el manejo de las evidencias.

Testimonio en Juicio

- El Perito Forense es un testigo experto que aporta un testimonio objetivo y una opinión fundada.
- Objetivo~incluye la descripción de los métodos analíticos empleados y sus hallazgos
- Opinión~como el experto interpreta los resultados obtenidos

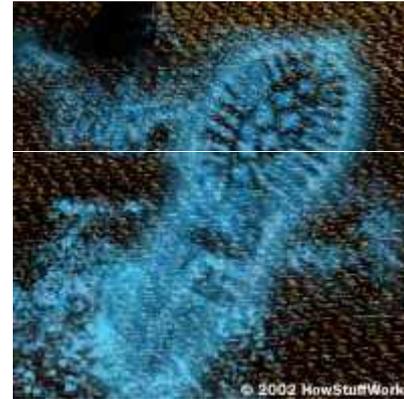
Historia del Caso y Especímenes

- Colección de hechos
- Hallazgos relevantes de la causa
- Drogas disponibles al occiso
- Intervalo entre la aparición de síntomas y el desceso
- Lugar del hallazgo
- Presencia de fauna cadavérica
- Muestras analizadas
- Análisis realizados

Obtención de evidencias en el lugar de hecho: Recomendaciones de GEP-ISFG



Detección de Trazas de fluidos biológicos: Uso del Luminol



Protección de las muestras

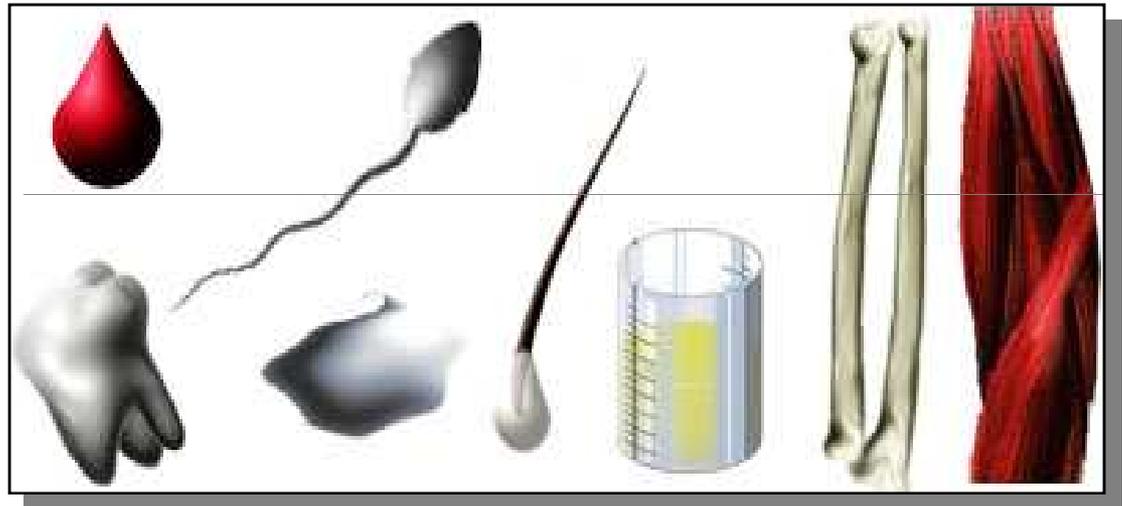
- Usar material descartable para cada muestra
- No añadir conservantes a las muestra tomadas.
- Dejar secar a temperatura ambiente, en un lugar protegido, antes de empaquetar.
- Empaquetar cada muestra por separado.
- Utilizar bolsas de papel evitando siempre el plástico.

Documentación

- Formulario de envío de muestras.
- Identificación de las muestras (muestras de referencia, evidencias, etc.)
- Cadena de custodia: debe figurar el nombre y firma de las personas responsables de cada uno de los pasos seguidos por las muestras; fecha y hora, y condiciones de almacenamiento.

Fuentes de Evidencias Biológicas.

- **Sangre**
- **Semen**
- **Saliva**
- **Orina**
- **Pelos**
- **Dientes**
- **Hueso**
- **Tejidos blandos**
- **Materia fecal**
- **Vómito**



Rendimiento de Extracción

Tipo de Muestra	Cantidad de ADN
Pelo cortado sin bulbo	1 ng
1 μ l de saliva	30ng
1 μ l de sangre	45ng
1 μ l de semen	300ng
Pelo con bulco	10 a 600 ng

Conservación de los diferentes tipos de muestras

Vestigios y Rastros de Interés Forense



El procedimiento de colección de las muestras dependerá del tipo de vestigio que estemos analizando, si estos son muebles o inmuebles, etc..

Evidencias Más Frecuentemente Empleadas.

- Sangre
- Hisopados y Apósitos
- Pelo
- Mancha de Fluidos Biológicos Sobre materiales absorbentes: tela, papel, etc.
- Tejido Cadavérico Tejidos Blandos, Hueso y Dientes.

Sangre

- Es la fuente ADN más común y la de elección.
- La conservación y los métodos de extracción han cambiado, simplificándose, disminuyendo el volumen necesario y los requerimientos de bajas temperaturas.
- El volumen de almacenamiento ha sido disminuido en gran medida

El Envío y la Conservación de Material ha Dejado de Ser un Conflicto

- No se requieren más tubos.
- No se requiere más criopreservación.
- Prolongado período de conservación.
- La sangre se conserva a temperatura ambiente

Grandes Volúmenes, Grandes Errores

Volúmenes mayores a 1ml requieren criopreservación y manejo de volúmenes grandes.

La manipulación de las muestras puede conducir a errores.

Grandes Volúmenes, Grandes Errores

- La extracción de más 50 ul de sangre líquida requiere al menos de 4 tubos diferentes rotulados individualmente.
- Numerosos solventes orgánicos son también requeridos.

Punción dactilar o de talón permiten el análisis de más de Treinta Marcadores Polimórficos

Práctica NO Cruenta.

Previene Posibles Infecciones en Areas Endémicas.

La muestra no supera los 100 microlitros.

Permite repetir el ensayo varias veces.

Conservación de muestras de sangre.

- Soportes adsorbentes.
- Conservación a temperatura ambiente.
- Largo tiempo de conservación.
- Permite generar un banco de muestras.

Extracción de ADN a partir de sangre líquida

- Ventajas

Cantidad de ADN

Calidad de ADN

- Desventajas

Tiempo de trabajo

Gran número de pasos que aumenta el riesgo de cometer errores

Uso de solventes orgánicos

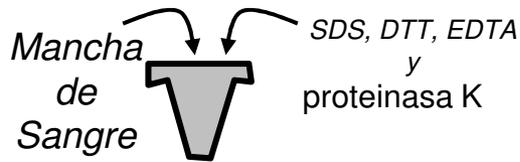
Extracción a partir de sangre sobre papel de filtro e hisopados bucales

- Se corta una porción de un centímetro de lado del papel de filtro o la punta del hisopo seco.
- Se extraen con TEC/SDS/PK durante una a dos horas a 56 °C.
- Luego se realiza la extracción con solventes orgánicos.

Extracción de ADN de sangre sobre soportes sólidos (FTA)

- Menor tiempo de trabajo (aprox. 30 minutos)
- Menor número de pasos.
- Posibilidad de procesar gran número de muestras sin riesgo de errores y contaminaciones.
- No se utilizan solventes.

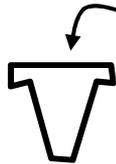
ORGANICA



INCUBAR (56 °C)



Centrifugar



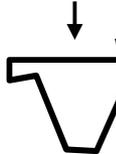
Fenol, cloroformo, Alcohol isoamilico

VORTEX



Centrifugar

TRANSFERIR face acuosa (superior) a tubo nuevo



Buffer TE

CONCENTRAR la muestra (Centricon/Microcon-100 o precipitación con etanol)

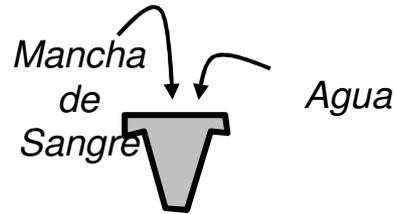


Centrifugar

QUANTIFICAR DNA

Amplificar por PCR

CHELEX



INCUBAR (T ambiente)



Centrifugar

SACAR sobrenadante



5% Chelex

INCUBAR (56 °C)

INCUBAR (100 °C)

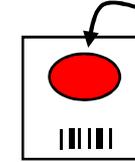


Centrifugar

QUANTIFICAR DNA

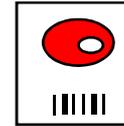
Amplificar por PCR

Papel FTA



Depositar sangre sobre el FTA y dejar secar

Sacabocado



Lavar varias veces con Buffer de extracción

Descartar sobrenadante



Reactivos de PCR

(NO se Cuantifica las muestras son uniformes)

Amplificar por PCR

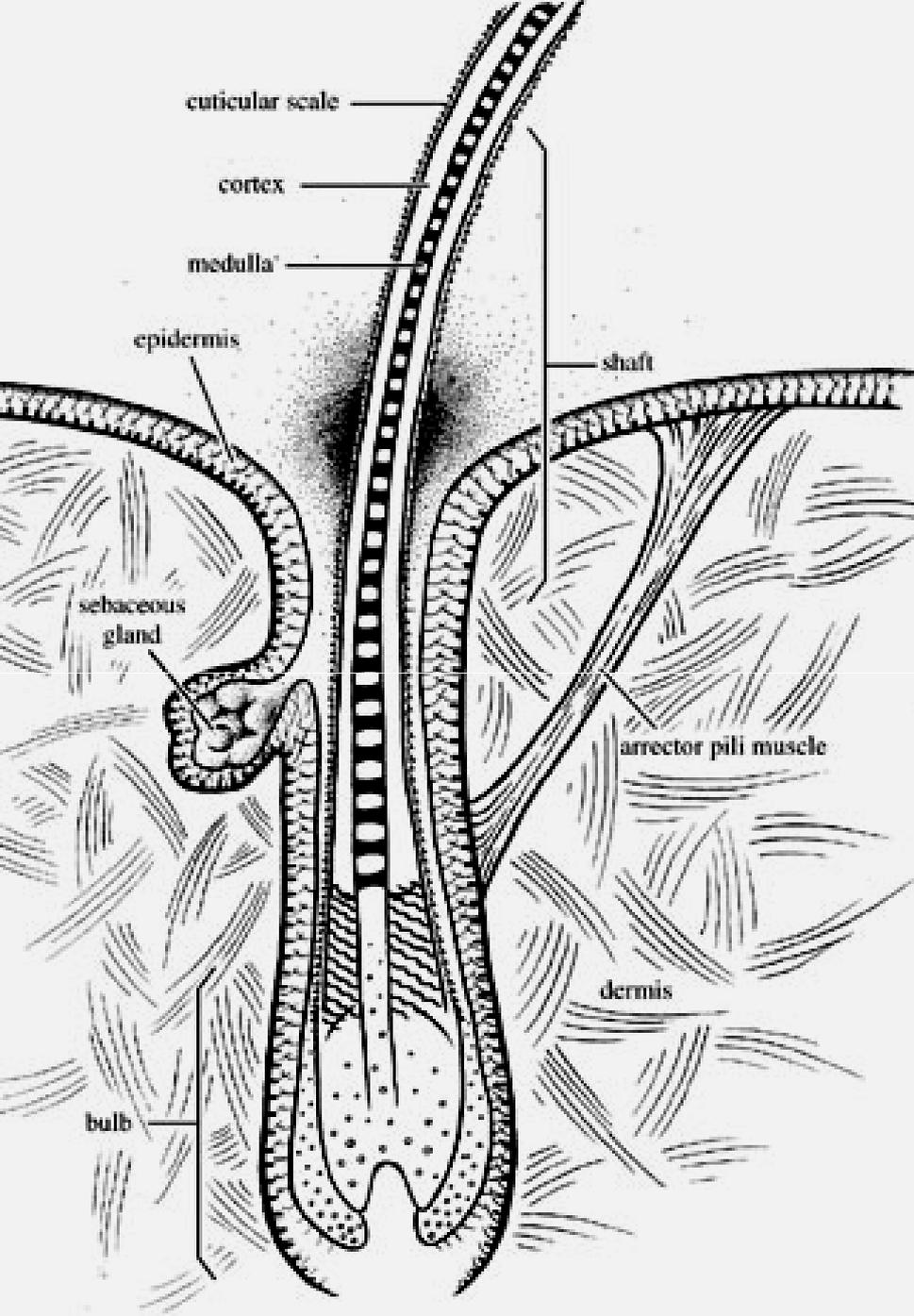
Pelo

- Material frecuente como evidencia.
- La Presencia de bulbo permite obtener ADN nuclear y mitocondrial (ADNmt).
- En ausencia de bulbo sólo se podrá obtener ADNmt.
- El análisis de ADNmt obtenido a partir de pelo presenta limitaciones interpretativas.

Pelo

- En caso de violación resulta necesario el peinado pubiano de la víctima con el objeto de rescatar pelos del victimario.
- En la escena del crimen también suelen hallarse pelos de los criminales. Se deberán tomar precauciones para evitar coleccionar las de los investigadores!.

Pelo



- Si el pelo cae espontáneamente aunque exhiba un engrosamiento semejante a un bulbo piloso, se encuentra queratinizado y sólo contiene restos de ADNmt.
- Sólo los pelos **en crecimiento activo** contienen gran cantidad de células nucleadas.
- Para obtenerlo es necesario arrancarlo del cuero cabelludo.

Marcas de Mordidas.

- Halladas frecuentemente en casos de violaciones.
- Al detectarse deben ser suavemente frotadas con hisopos humecidos en solución fisiológica, secados al aire y colocados en sobres de papel, esto permitirá el análisis de ADN.
- Debe ser fotografiada. .
- Mordeduras más viejas pueden a veces ser visualizadas y fotografiadas usando luz UV.
- Si la mordedura ha dejado una impresión se puede tomar un molde.
- Perfil de ADN, molde y fotografía podrán ser comparados con el sospechoso.

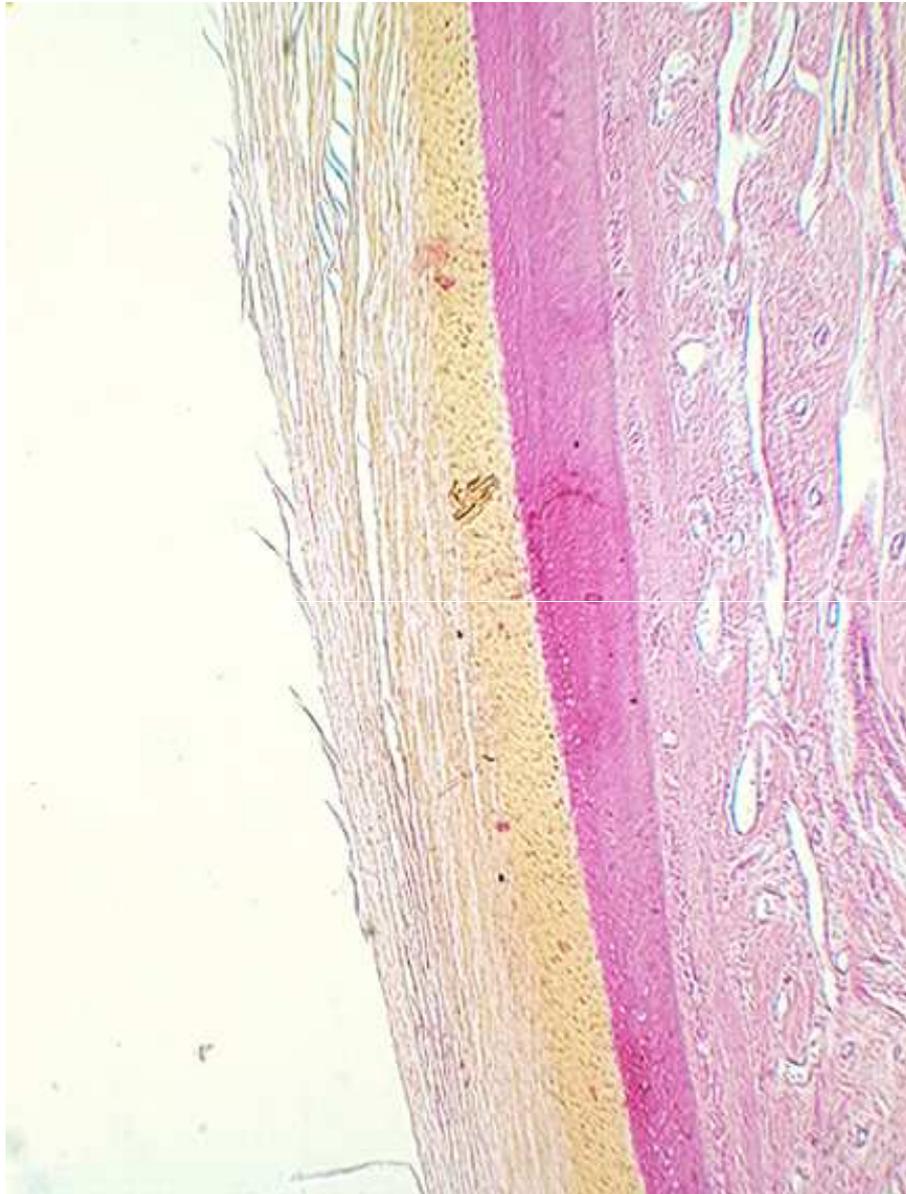
Violaciones

- Un eyaculado puede contener varios millones de cabezas espermáticas.
- La conservación y adecuada manipulación de los hispdos es fundamental.

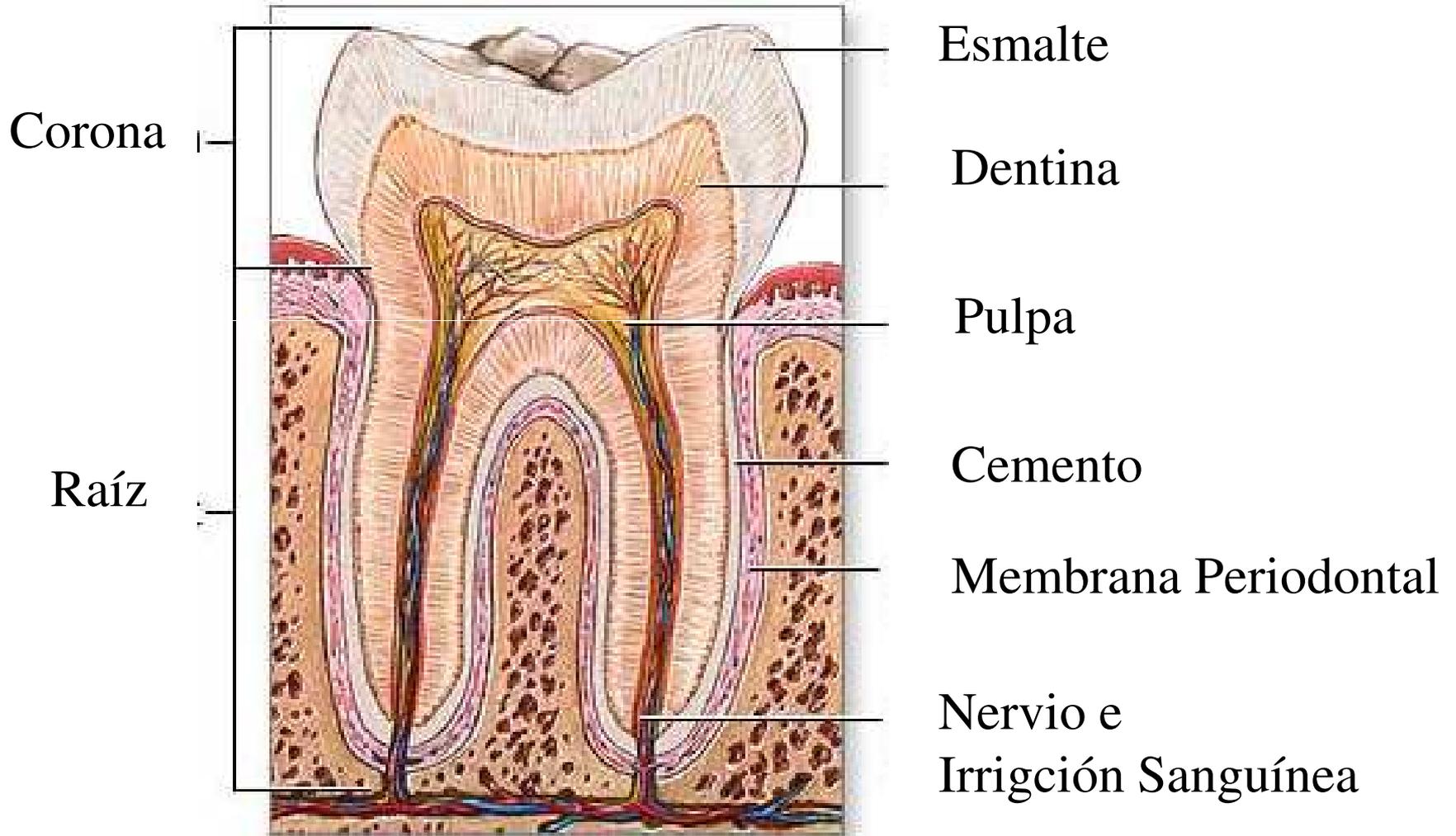
Espermatozoides

- Las características estructurales de los espermatozoides permiten separarlo de otros tipos celulares para efectuar estudios comparativos

Uñas



Dientes

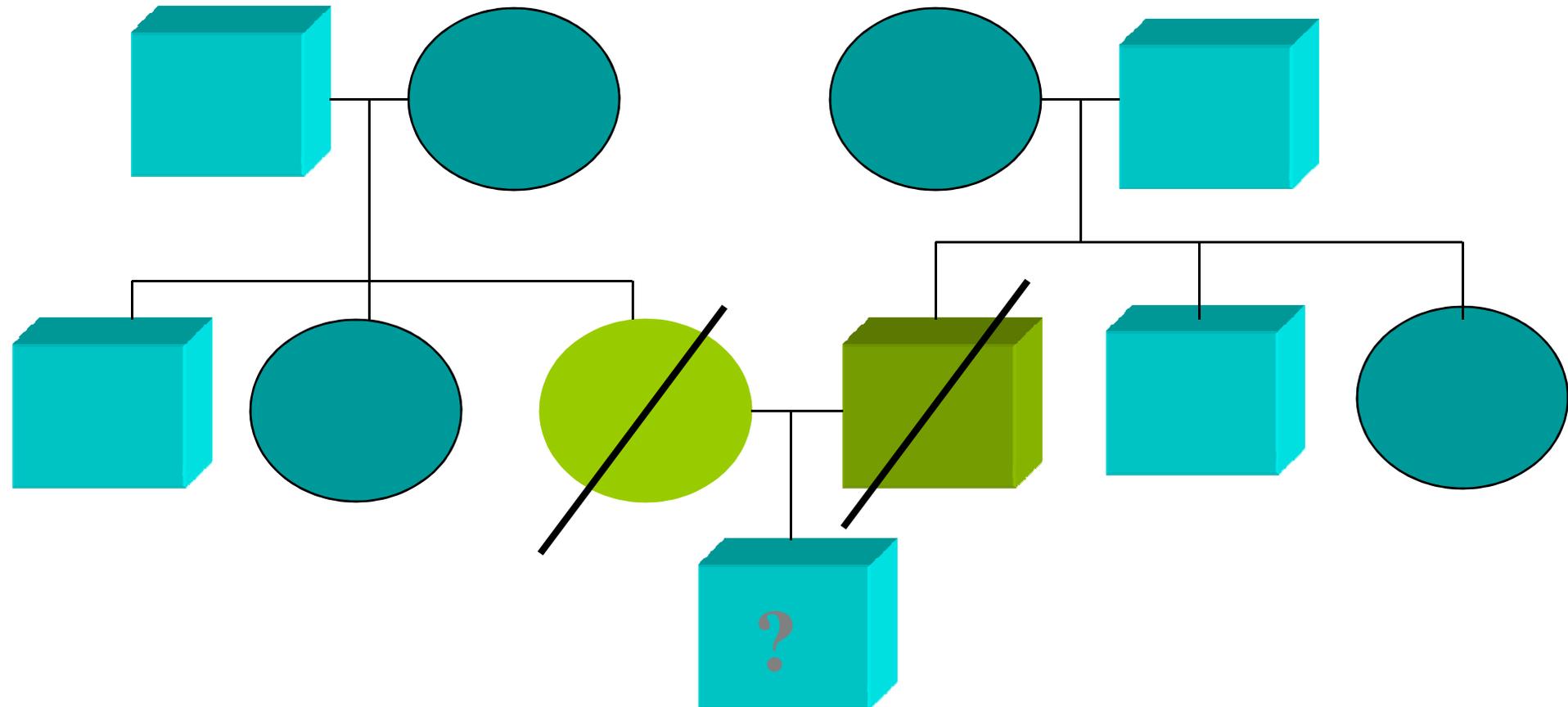


Material Cadavérico

- En casos de estudios de paternidad “*Post Mortem*”, si en la familia existe un número considerable de parientes del fallecido se puede evitar la exhumación.
- El éxito del análisis de este material depende en gran medida del estado de conservación del material a analizar.

Análisis de Paternidad:

En Ausencia de Progenitores Directos



Material Cadavérico

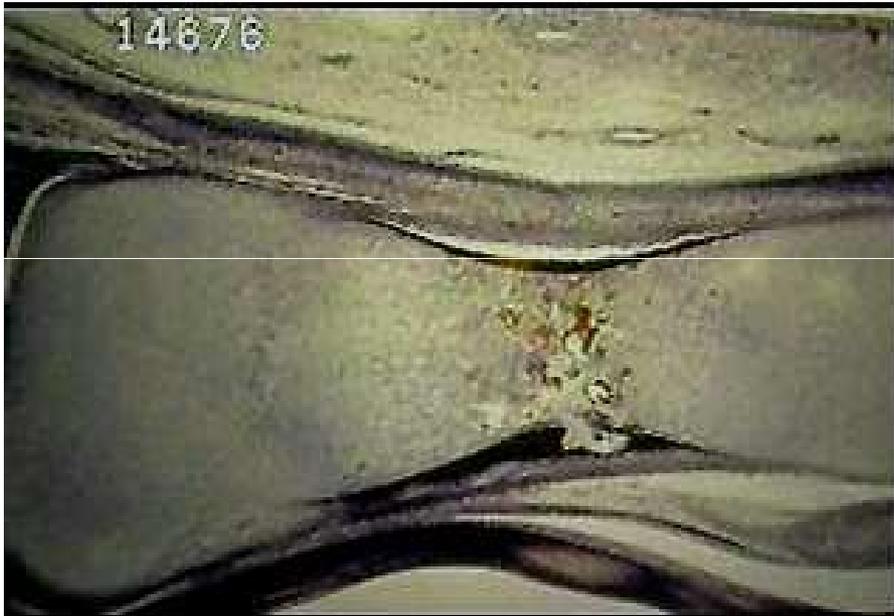
- Tejidos blandos frescos o descompuestos deben ser congelados y mantenidos en esta condición al momento de la extracción de ADN.
- No se debe romper la cadena de frío ya que de lo contrario se descompondrá en forma rápida el tejido imposibilitando una contrapericia.

Material Cadavérico

- Si el material se encuentra descomuesto un fragmento de 2 x 4 cm se debe colocar en un tubo de 50 ml (polipropileno) con sal de mesa.
- Si el material está seco o esqueletizado se podrá conservar a temperatura ambiente en sobres de papel Manila.

Hueso

- El tejido óseo mineralizado es escaso en los recién nacidos. El proceso de mineralización facilita la conservación de material genético.



Investigación de Vínculos de Parentesco: Análisis Forense. Simples

Acta de Conformidad y Solicitud

- Autoriza la realización del análisis y da conformidad para eventuales re-extracciones.
- Provee información identificatoria, dactiloscópica, caligráfica y fotográfica.
- Es confidencial.



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Servicio de Huellas Digitales Genéticas

ACTA DE CONFORMIDAD PARA ESTUDIO DE HUELLAS DIGITALES GENÉTICAS

Buenos Aires, 20 de Septiembre de 1999.

Por la presente, los abajo firmantes dan su entera conformidad para la realización del Estudio de Huellas Digitales Genéticas, así como para la extracción de muestras de sangre y/o hisopados bucales adicionales, en caso de resultar insuficiente los tomados en esta oportunidad.

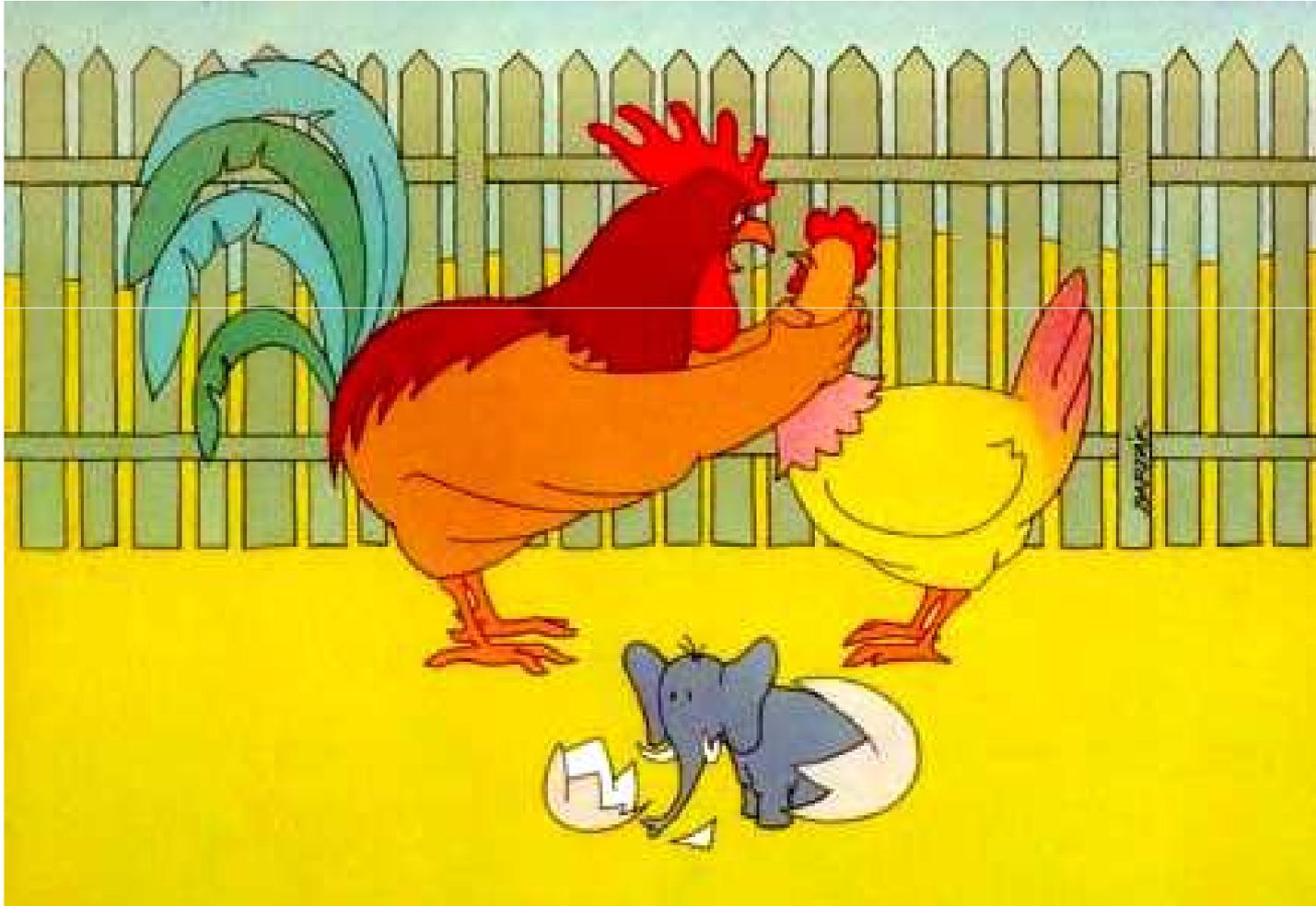
NOMBRE Y APELLIDO:
D.N.I.:
DOMICILIO: Dígito pulgar derecho:

NOMBRE Y APELLIDO:
D.N.I.:
DOMICILIO: Dígito pulgar derecho:

NOMBRE Y APELLIDO:
D.N.I.:
DOMICILIO: Dígito pulgar derecho:

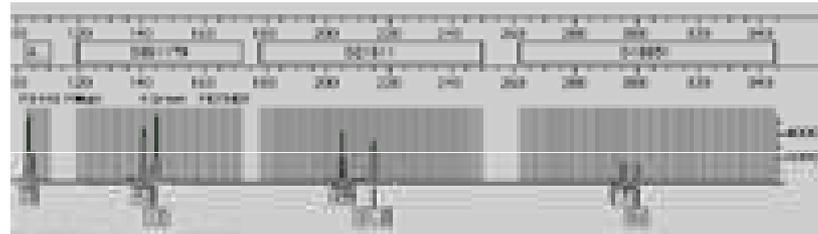
Las extracciones se efectuaron en presencia de los Dres. y por el Servicio de Huellas Digitales Genéticas.

Menos Políticamente Correcto, Aunque Más Realista



Cuatro STRs amplificados en Multiplex detectados simultáneamente

Gallina



Huevo

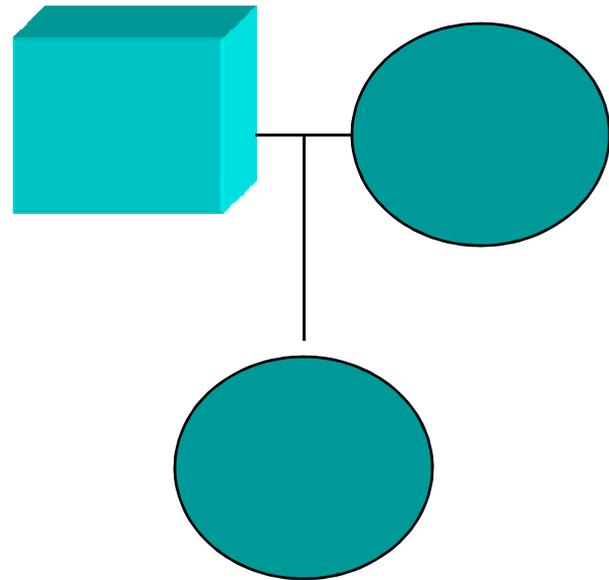


Gallo



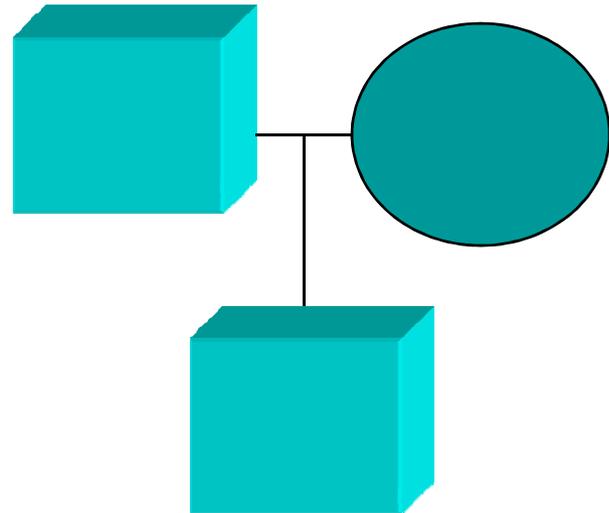
Criterios Empleados

- ADN extraído de todos los integrantes del trío.
- Análisis de 15 microsatélites autosómicos.



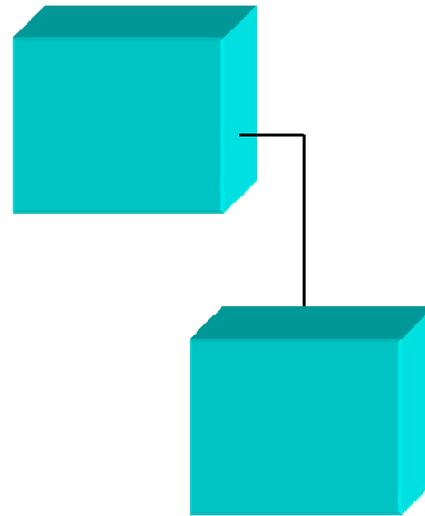
Criterios Empleados.

- Análisis de 15 microsatélites autosómicos.
- Análisis de 9 microsatélites del cromosoma Y.



Criterios Empleados

- En ausencia de la madre la investigación de la paternidad es también factible.
- El Índice de Paternidad es algo menor que en la condición óptima.

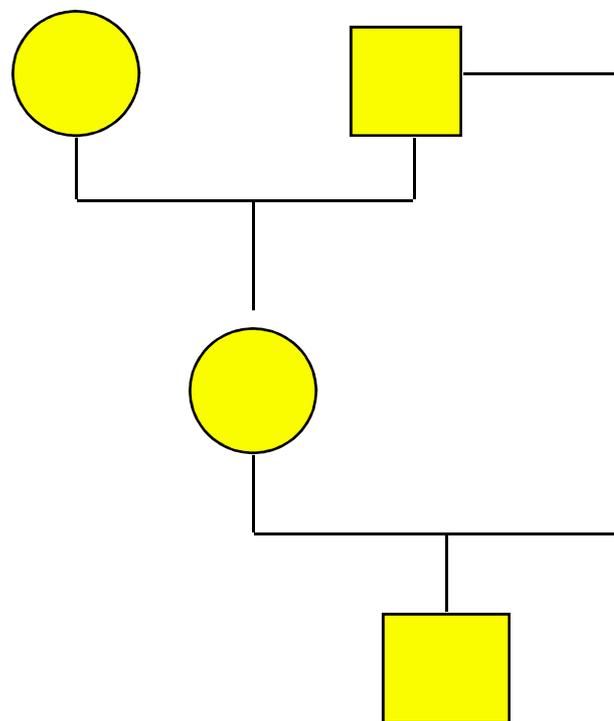


Características del Análisis.

- Voluntario.
- Permite develar una situación de duda.
- Puede constituir una prueba anticipada previo a un juicio.
- Puede ser ordenado por un Juez del fuero Civil o Penal.

Incesto

”transgresión que consiste en la práctica de relaciones sexuales entre parientes”



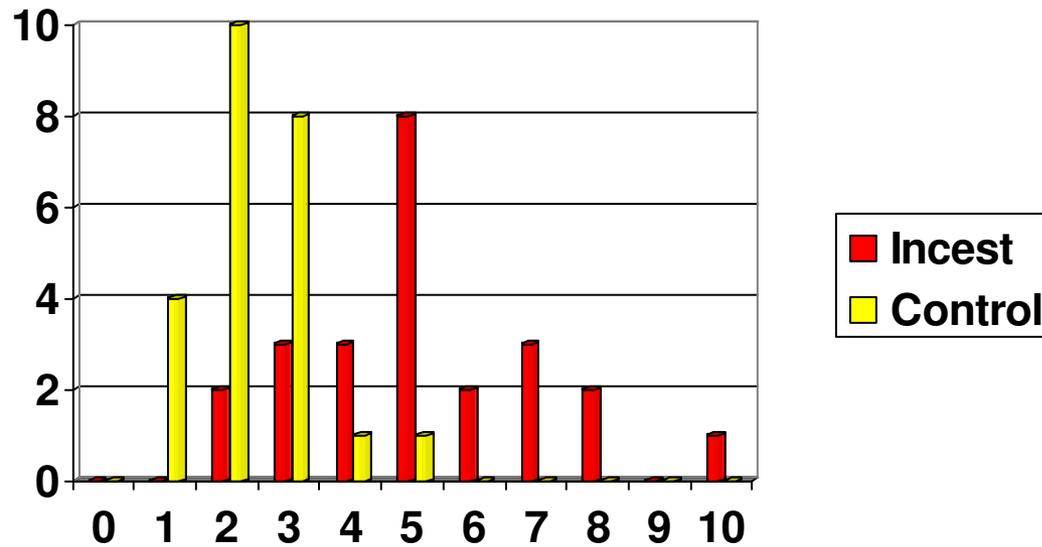
Código Penal, Cap. II “Violación y estupro”-Art.122 y Cap. III “Corrupción, abuso deshonesto y ultrajes al pudor” Art 125. (Ley 20509 y 23077)

Características Moleculares de los Genotipos en Casos de Incesto

- Mayor frecuencia de homocigotas en el descendiente.
- Madre e hijo presentan una mayor incidencia de heterocigotas iguales en los STRs analizados.

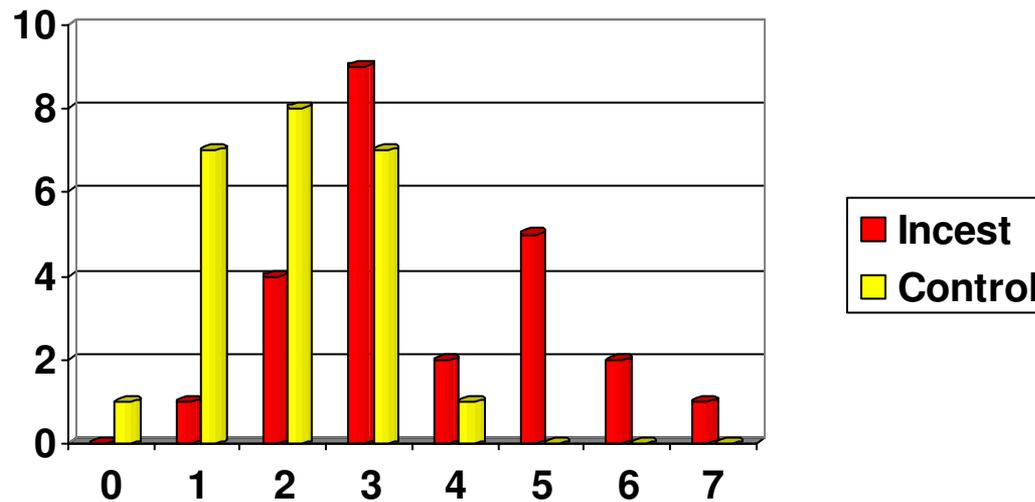
Frecuencias de Homocigocis (*n=24*)

Perfiles homocigotas



Frecuencias de Heterocigótas Iguales ((n=24)

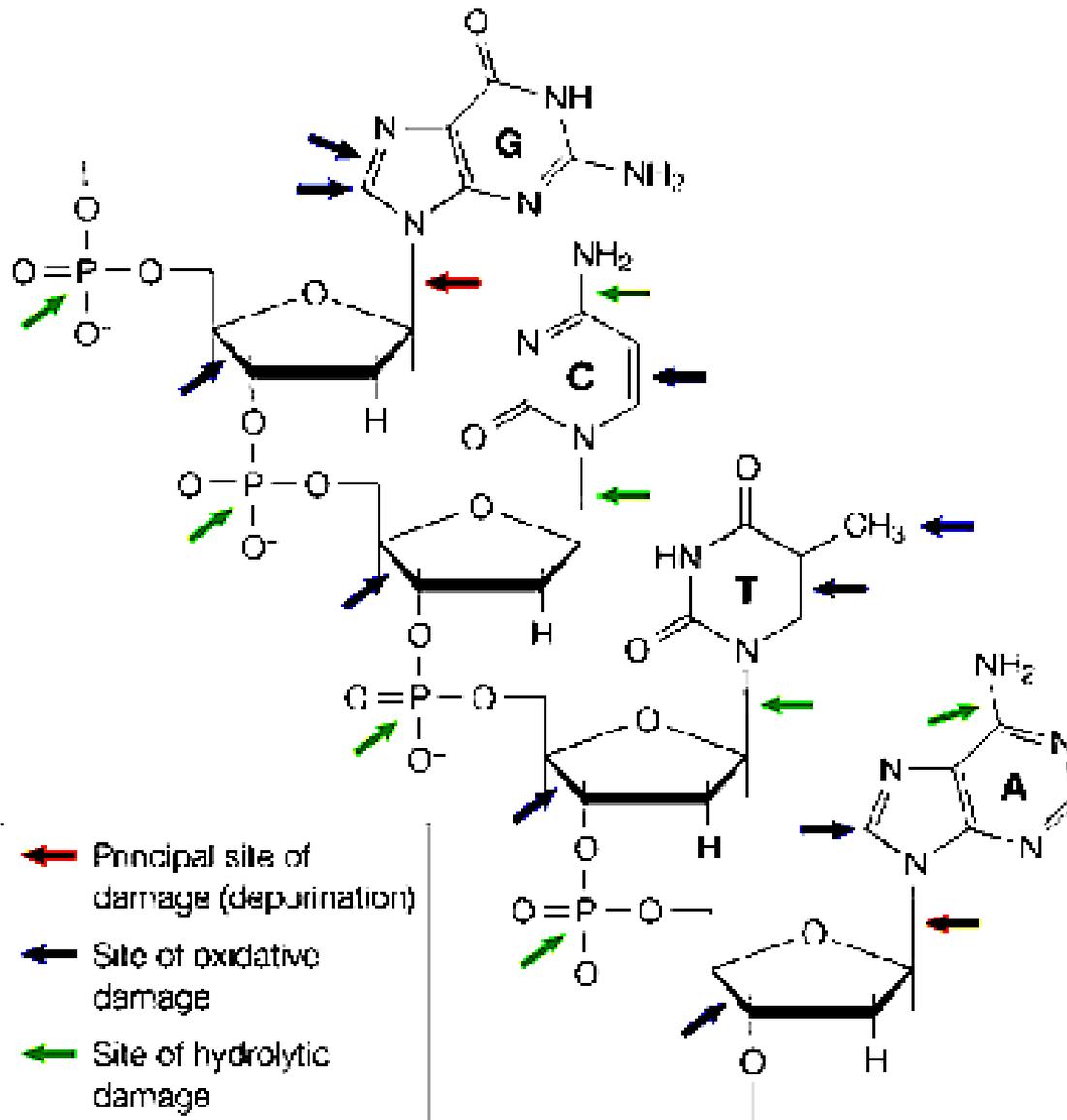
Perfiles heterocigotas e iguales



Situaciones Analíticas Complejas

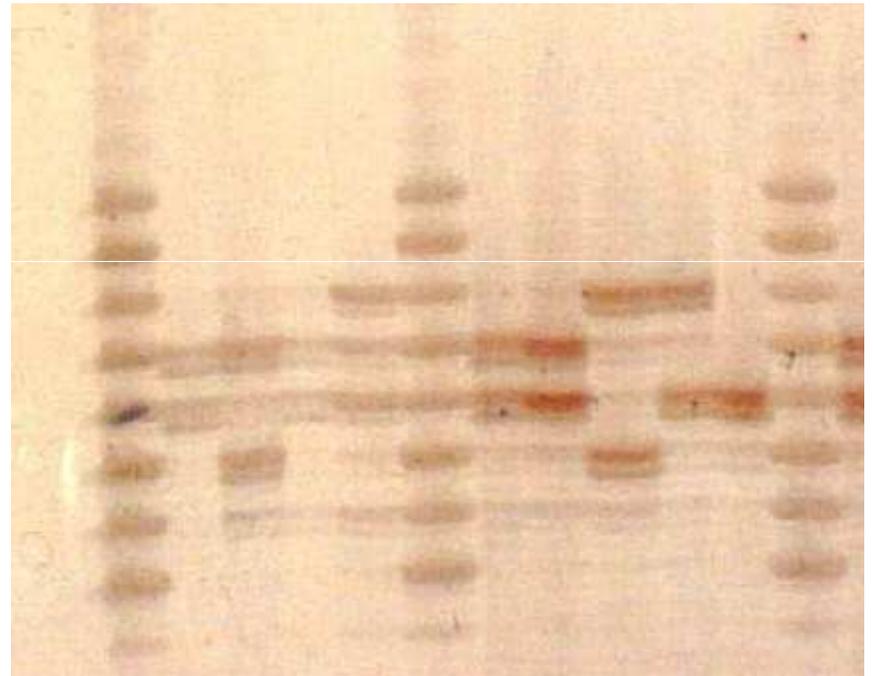
Hueso





Analisis de Microsatélites

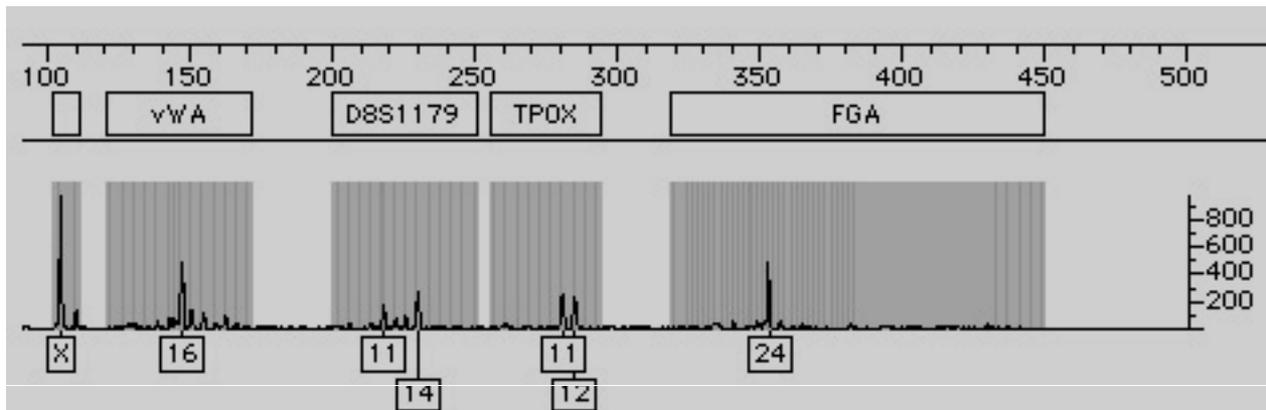
- Algunos STRs requieren particular atención en el momento del análisis.
- El sistema VWA es uno de ellos.



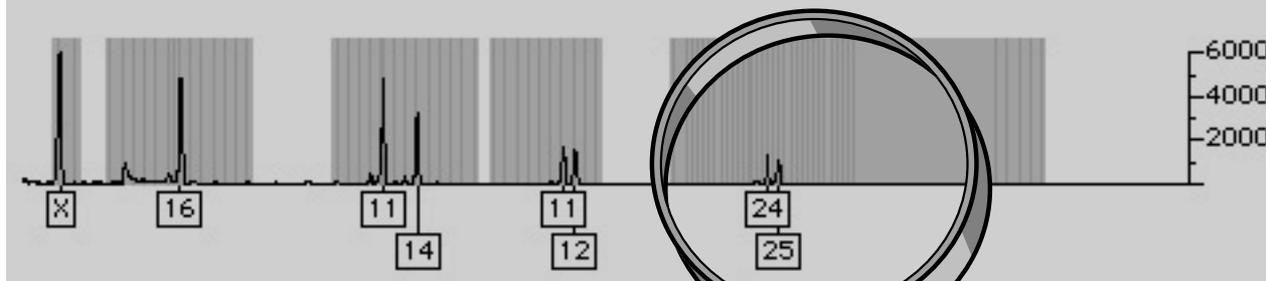
Análisis de Material Cadavérico.

Resultados Editados.

Hueso

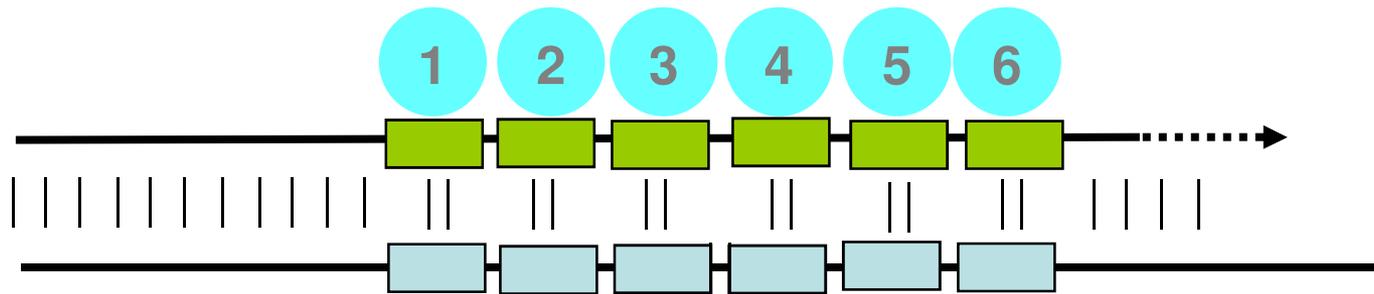


Cordón Umbilical

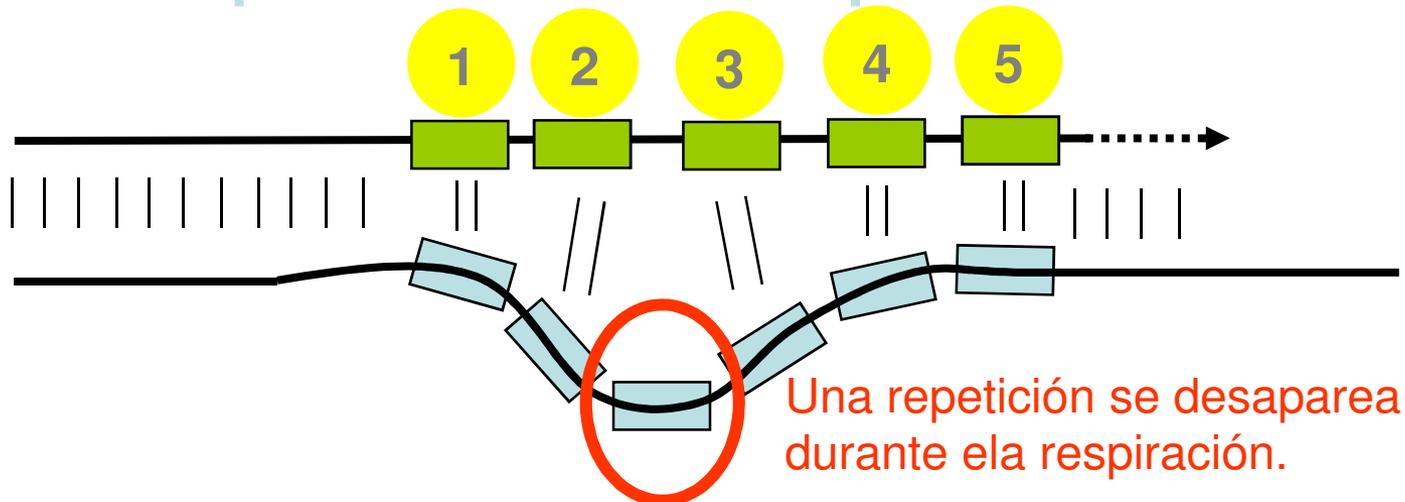


Esquema del Proceso de Formación de Productos “Stutter”

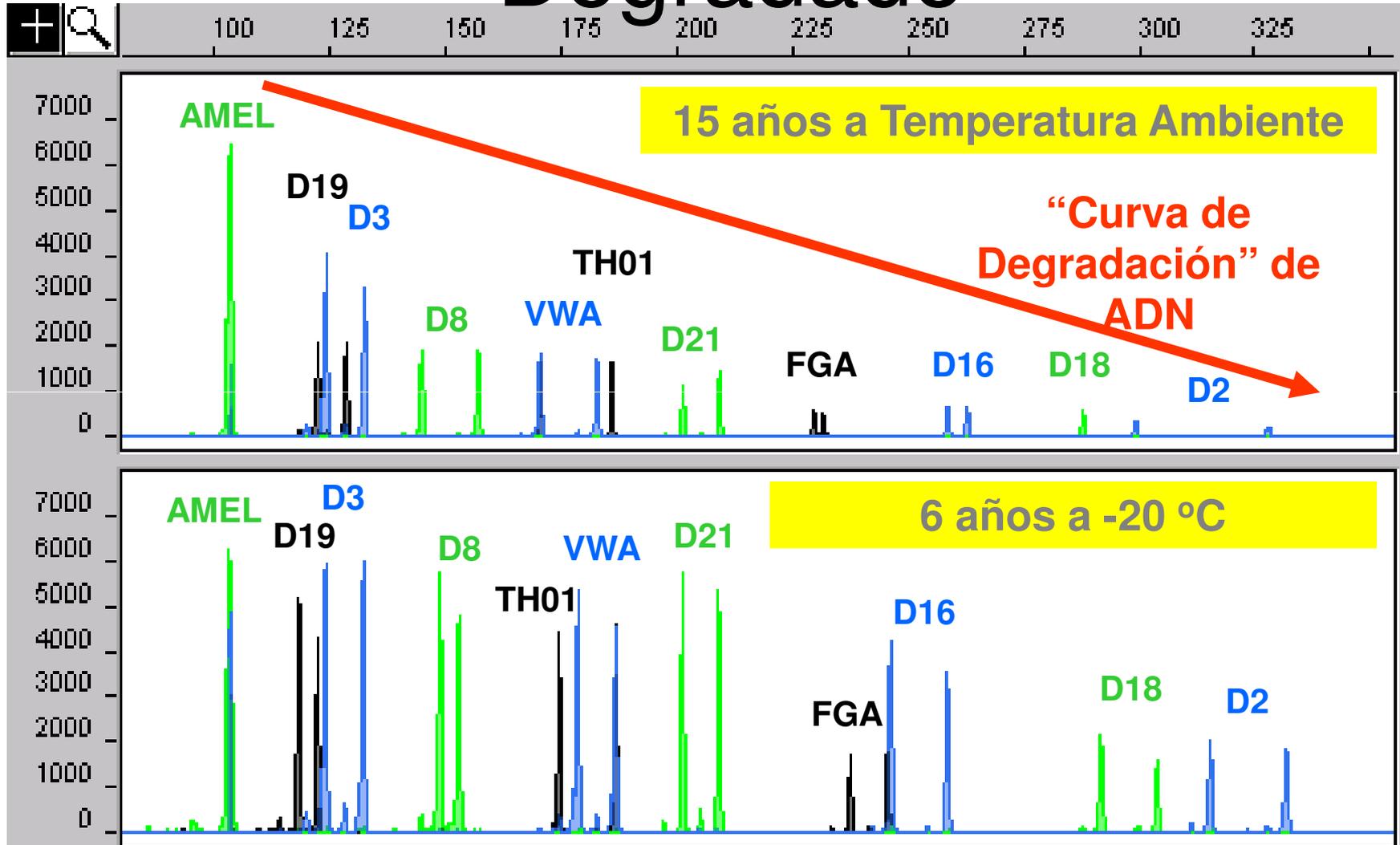
Normal STR Allele Replication



Cadena desplazada Modelo de Apareado incorrecto



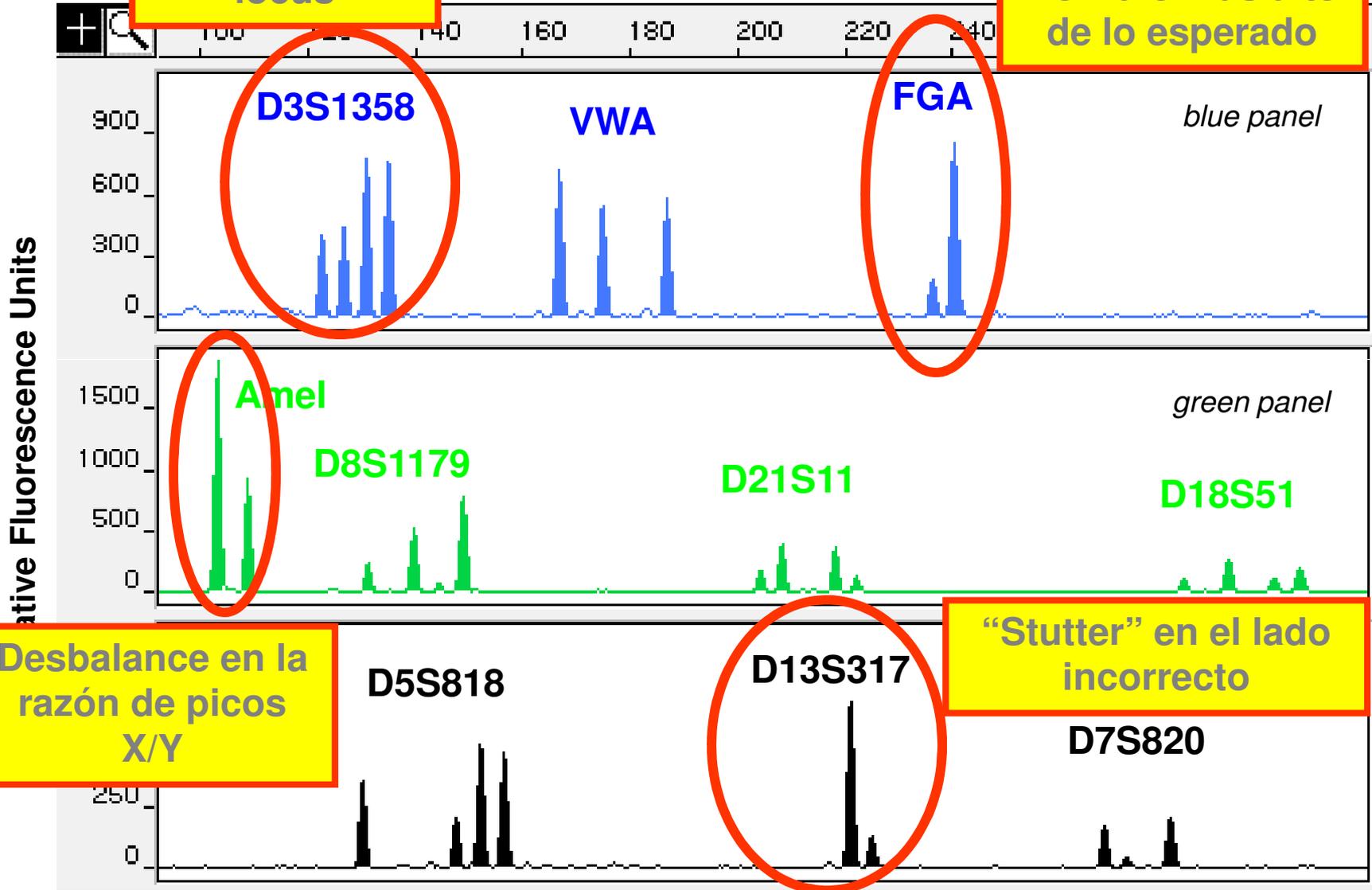
Resultados con ADN Degradado



Ejemplo de Muestra Mezclada

4 picos en un locus

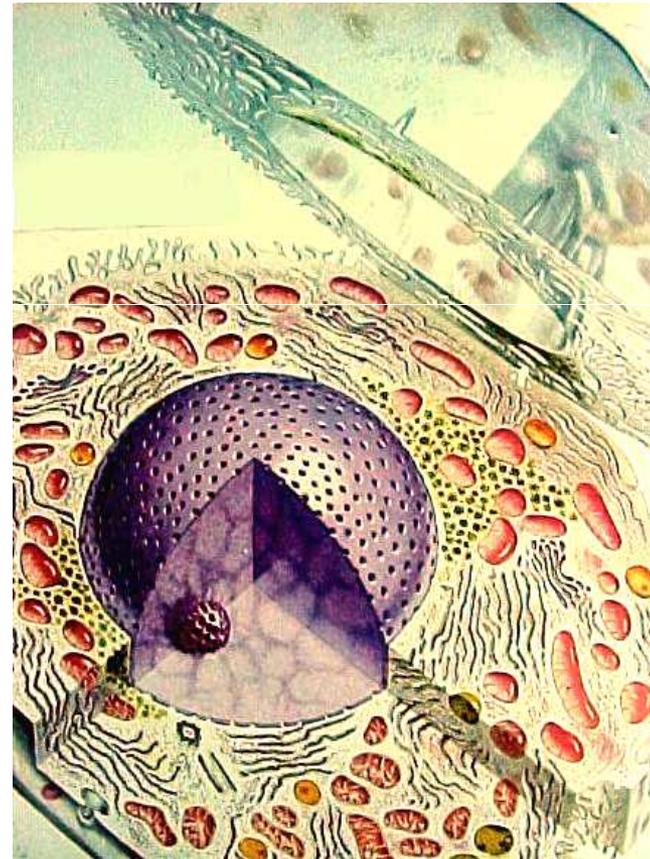
Hombro más alto de lo esperado



Marcadores Genéticos

Localización del ADN en las células eucariotas

- En el núcleo celular (cromosomas autosómicos: 22 pares y sexuales X e Y).
- En mitocondrias número variable de genomas.



ADN

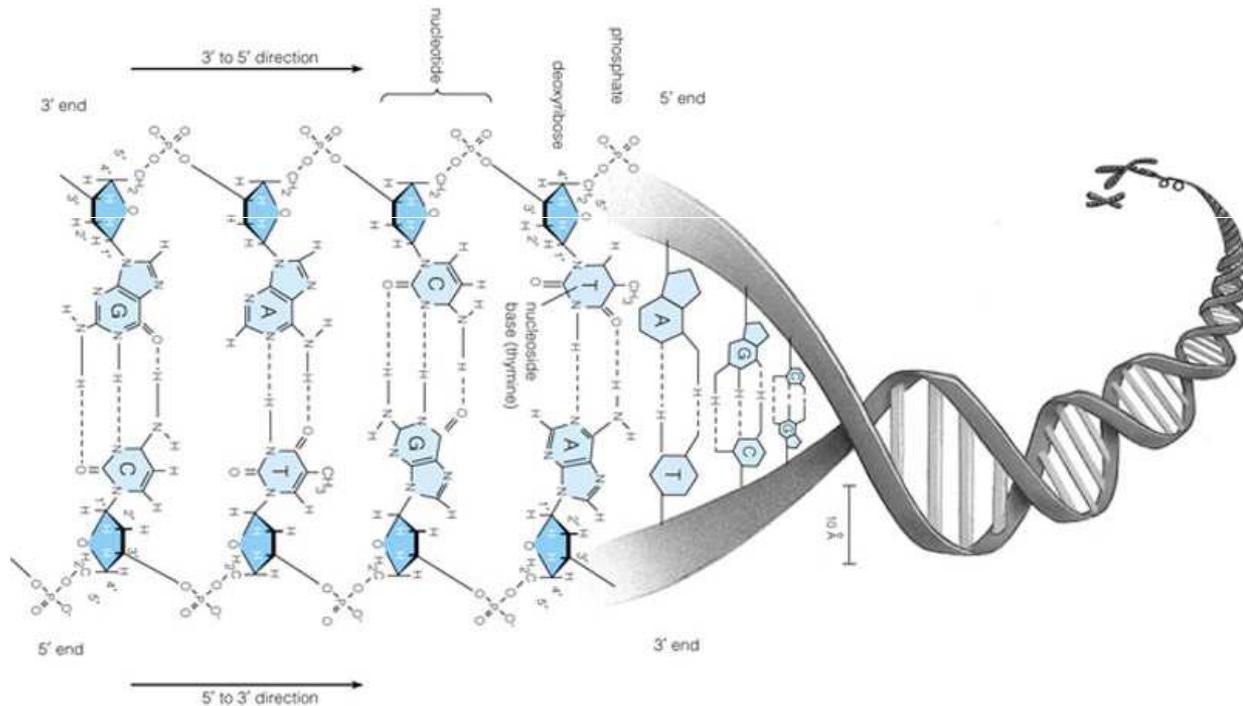
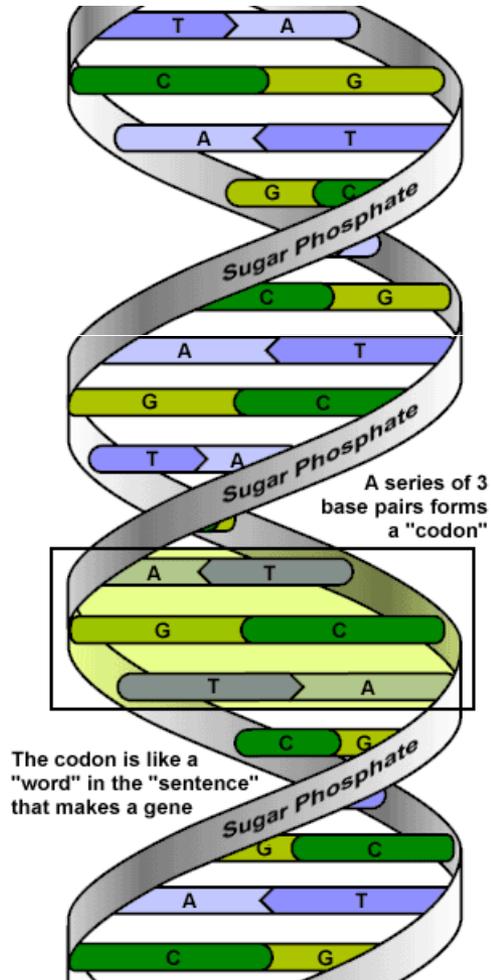
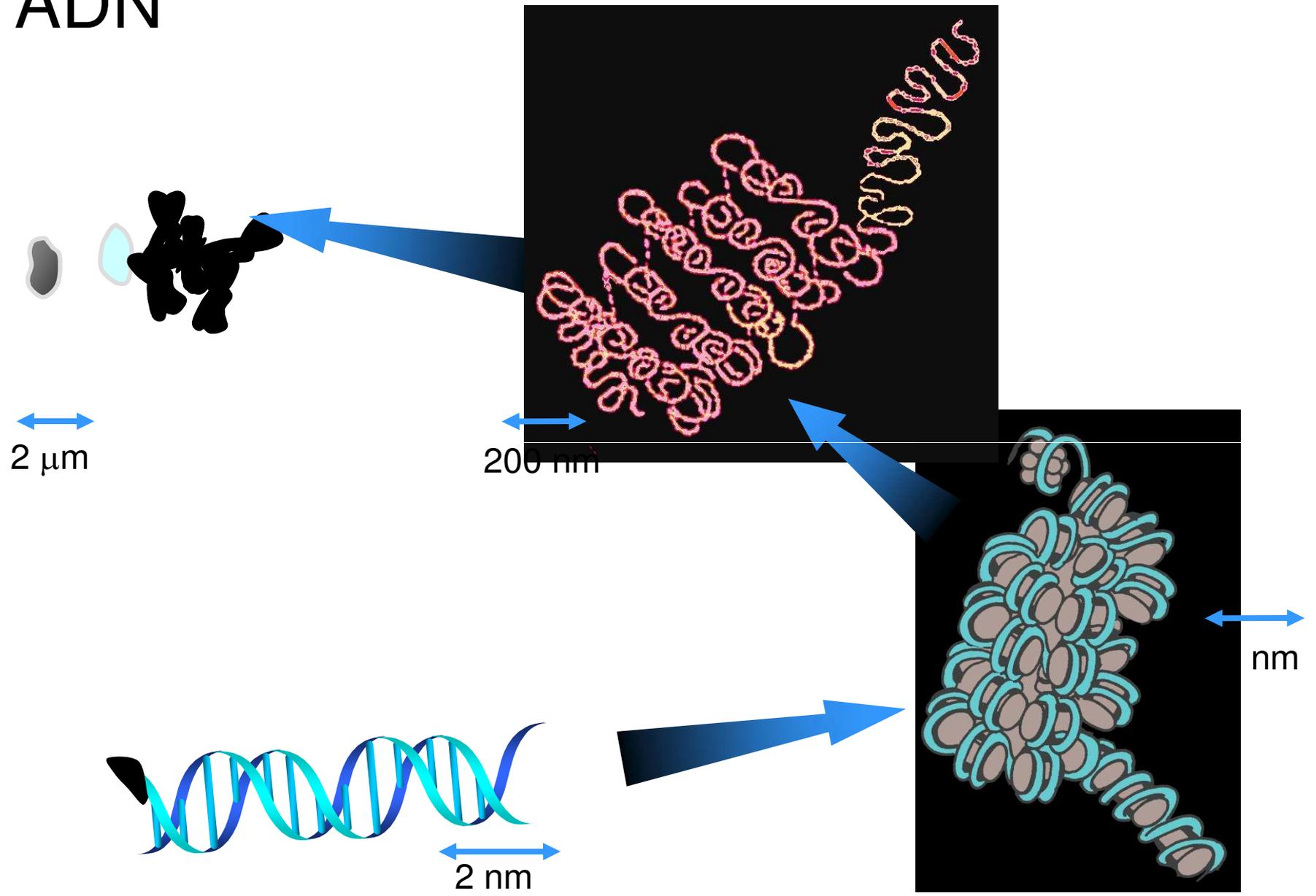
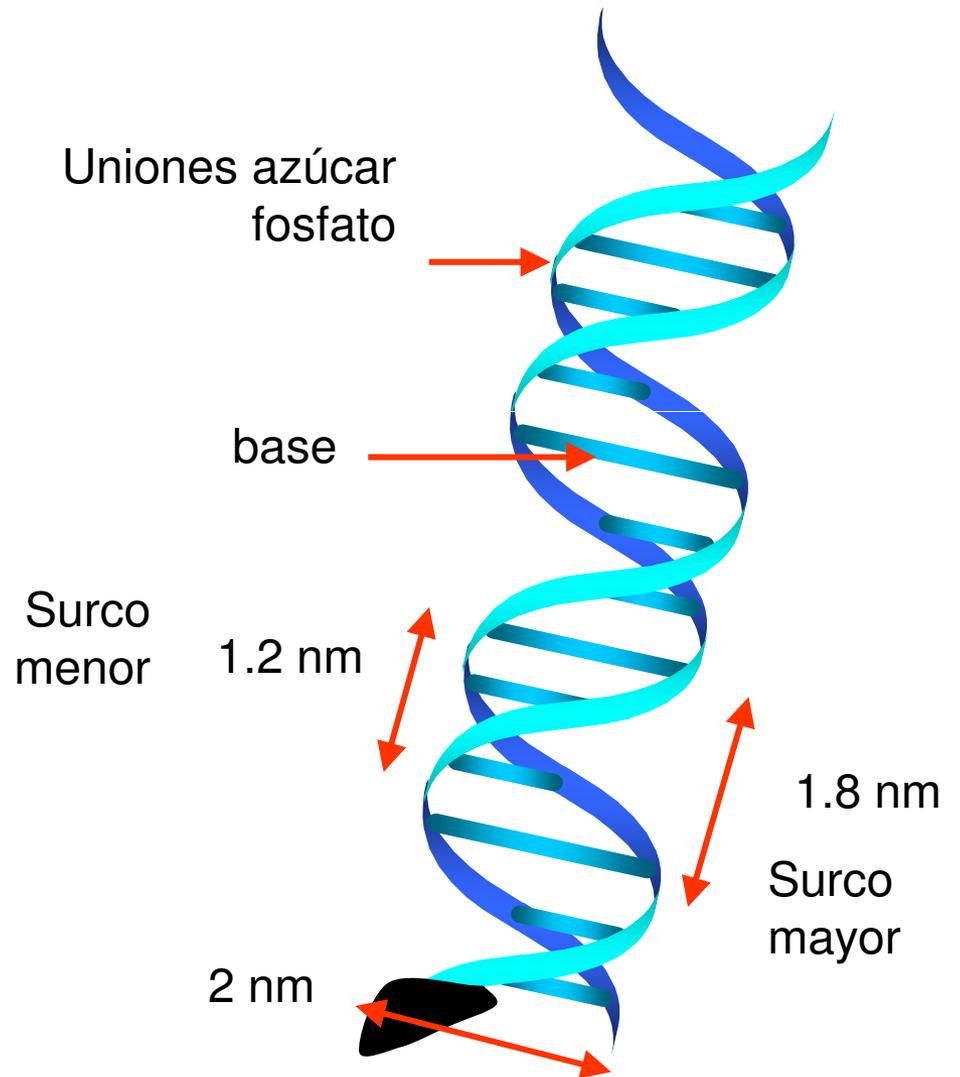
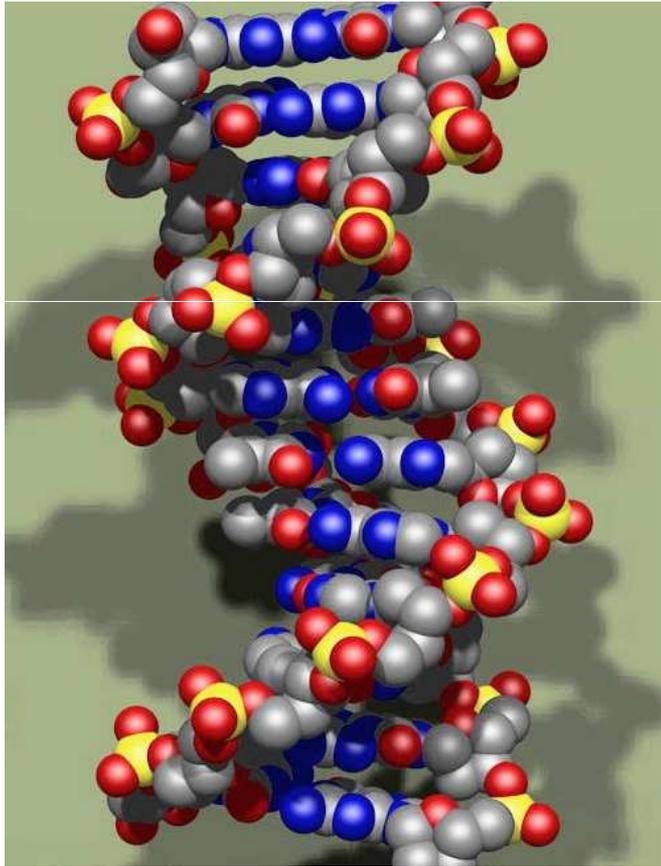


FIGURE 2.10 The double-strand structure of DNA illustrating the nucleotides, each composed of a deoxyribose sugar, a phosphate, and a nitrogen-containing base.

ADN

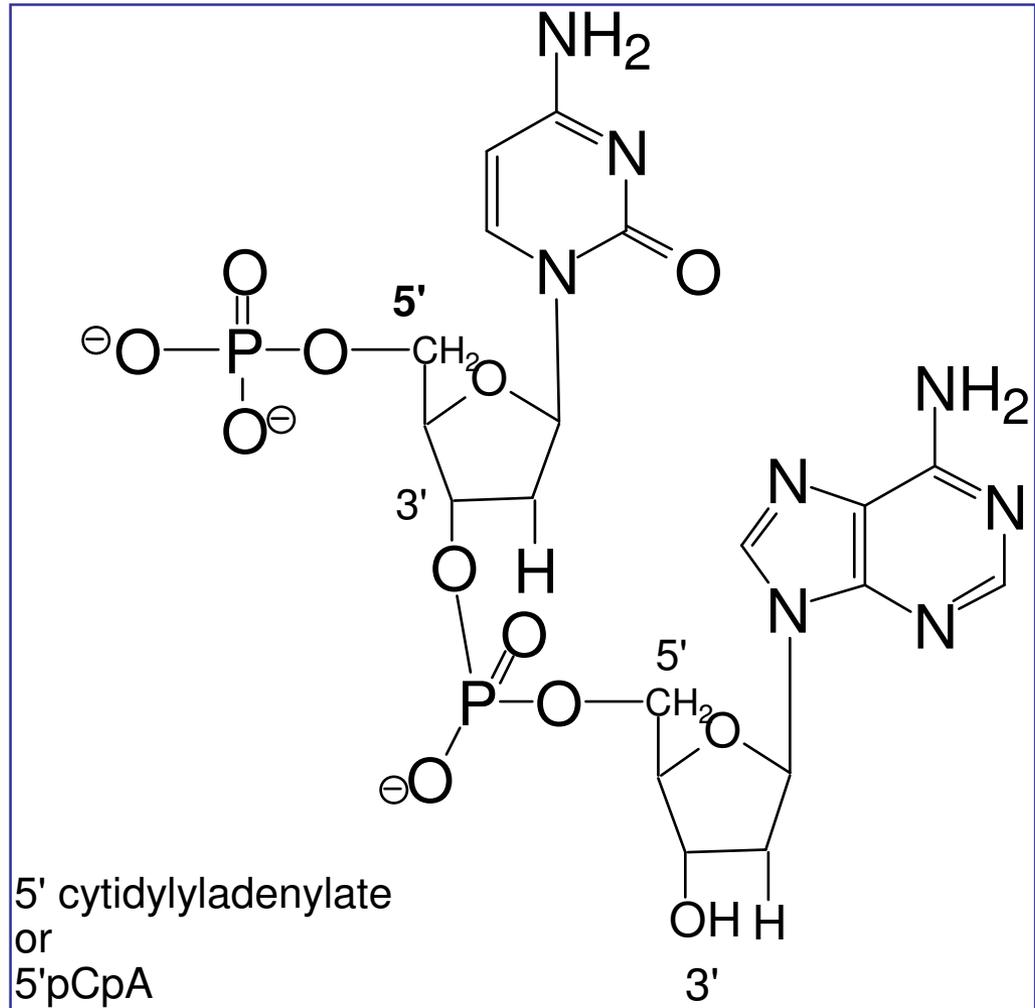


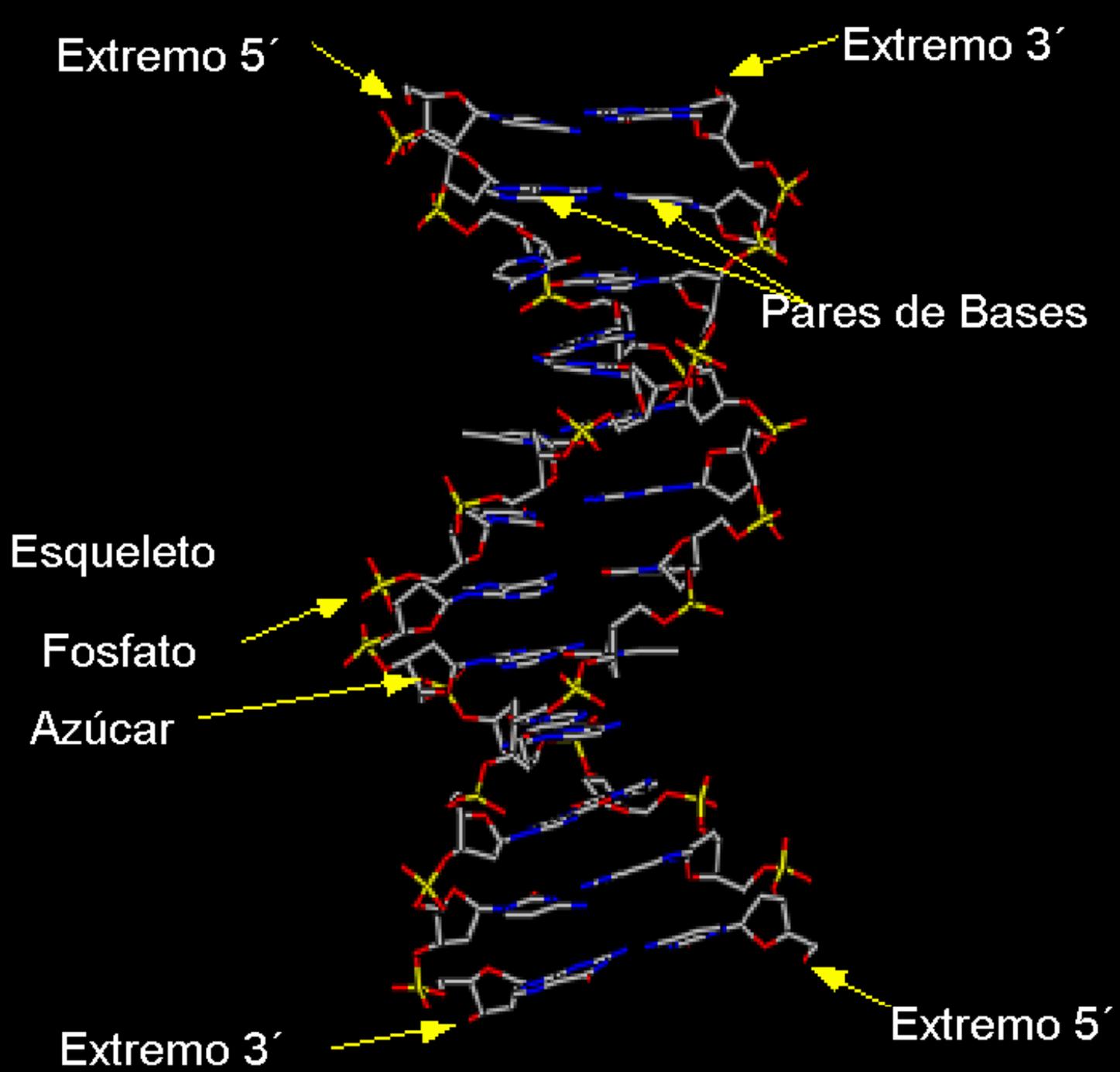
ADN



Estructura de un Nucleótido.

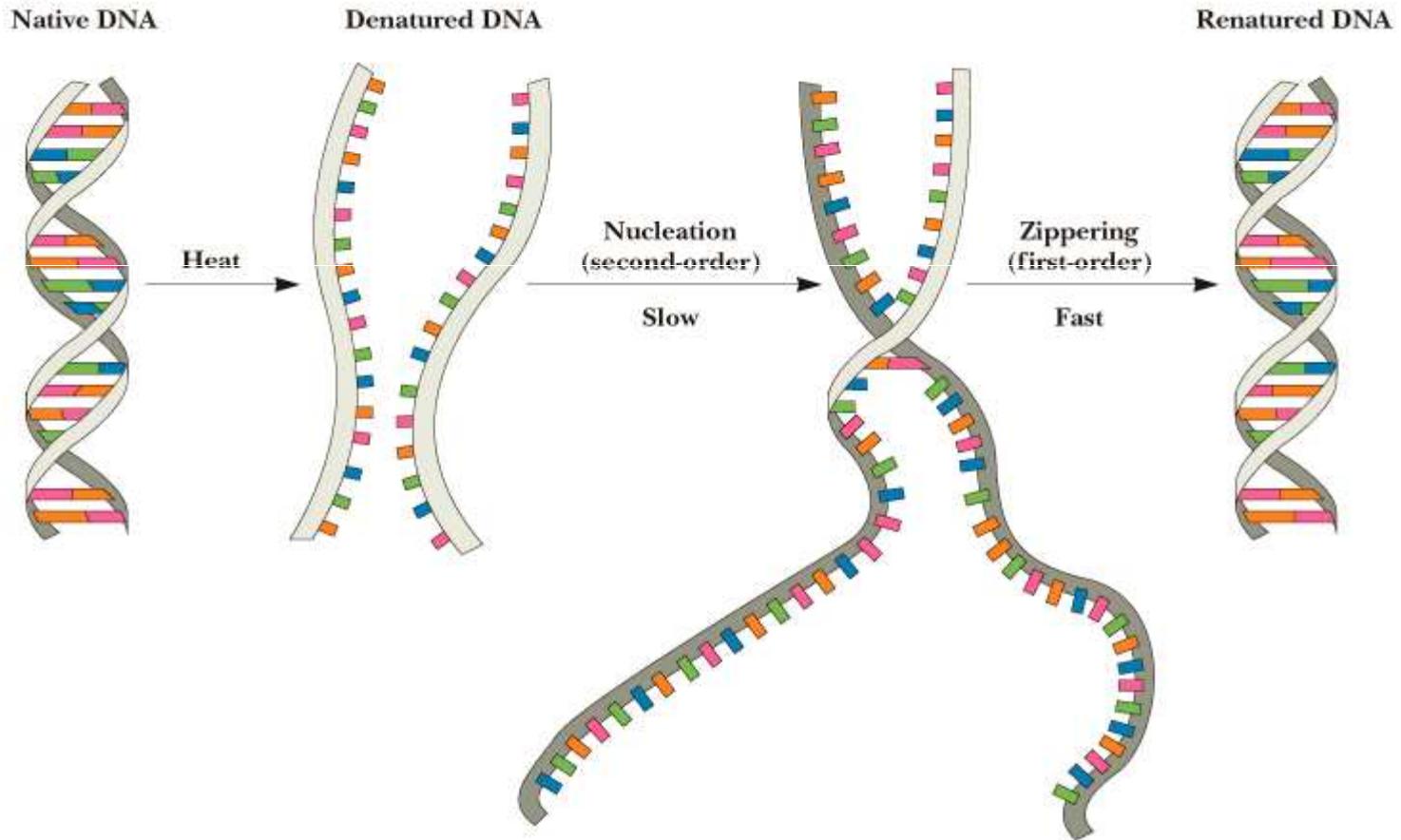
El 3' C de un nucleótido está unido al 5' C del siguiente nucleótido a través de una unión fosfodiéster.



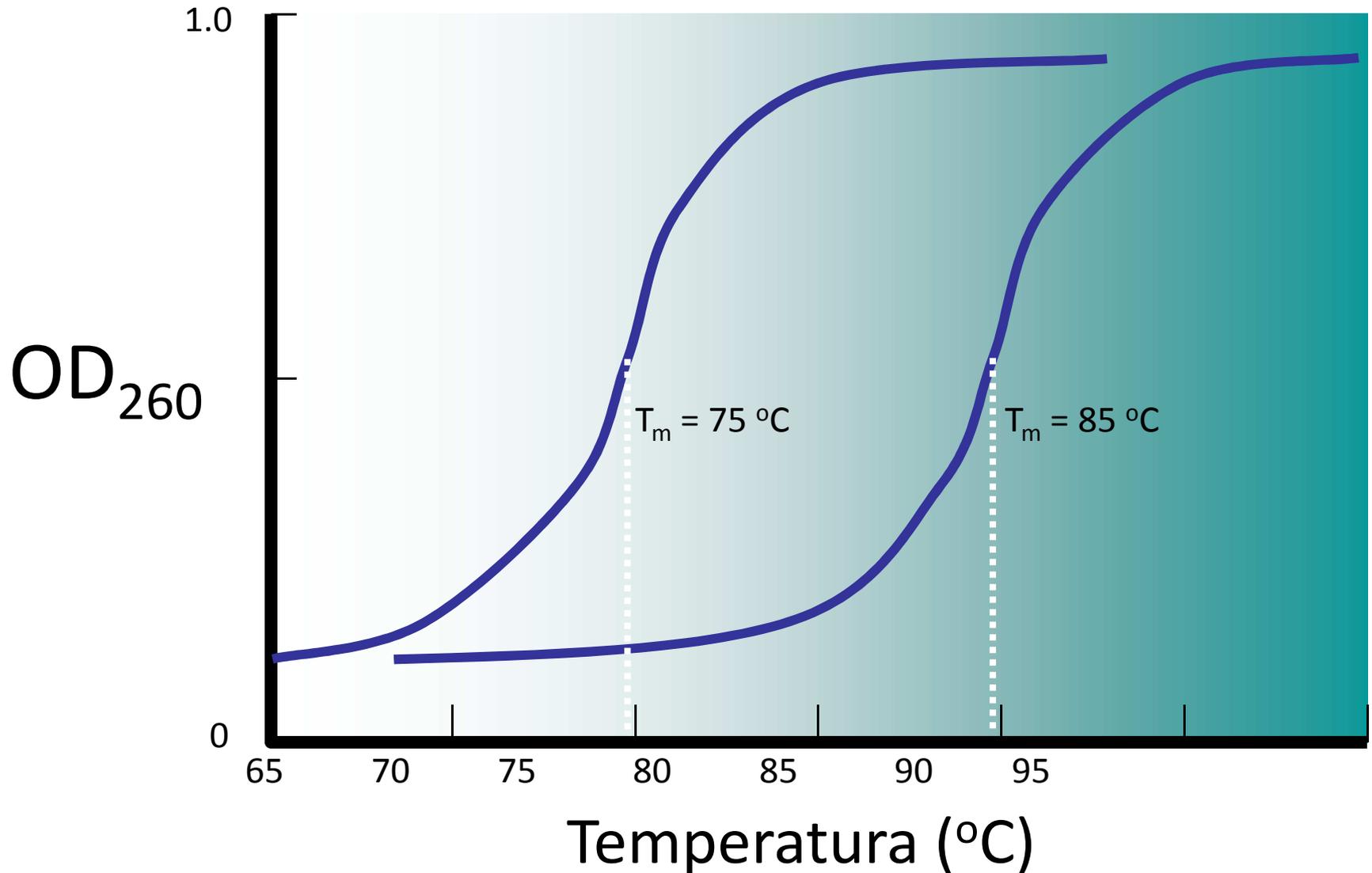


Vista lateral
de una
Molécula de
ADN

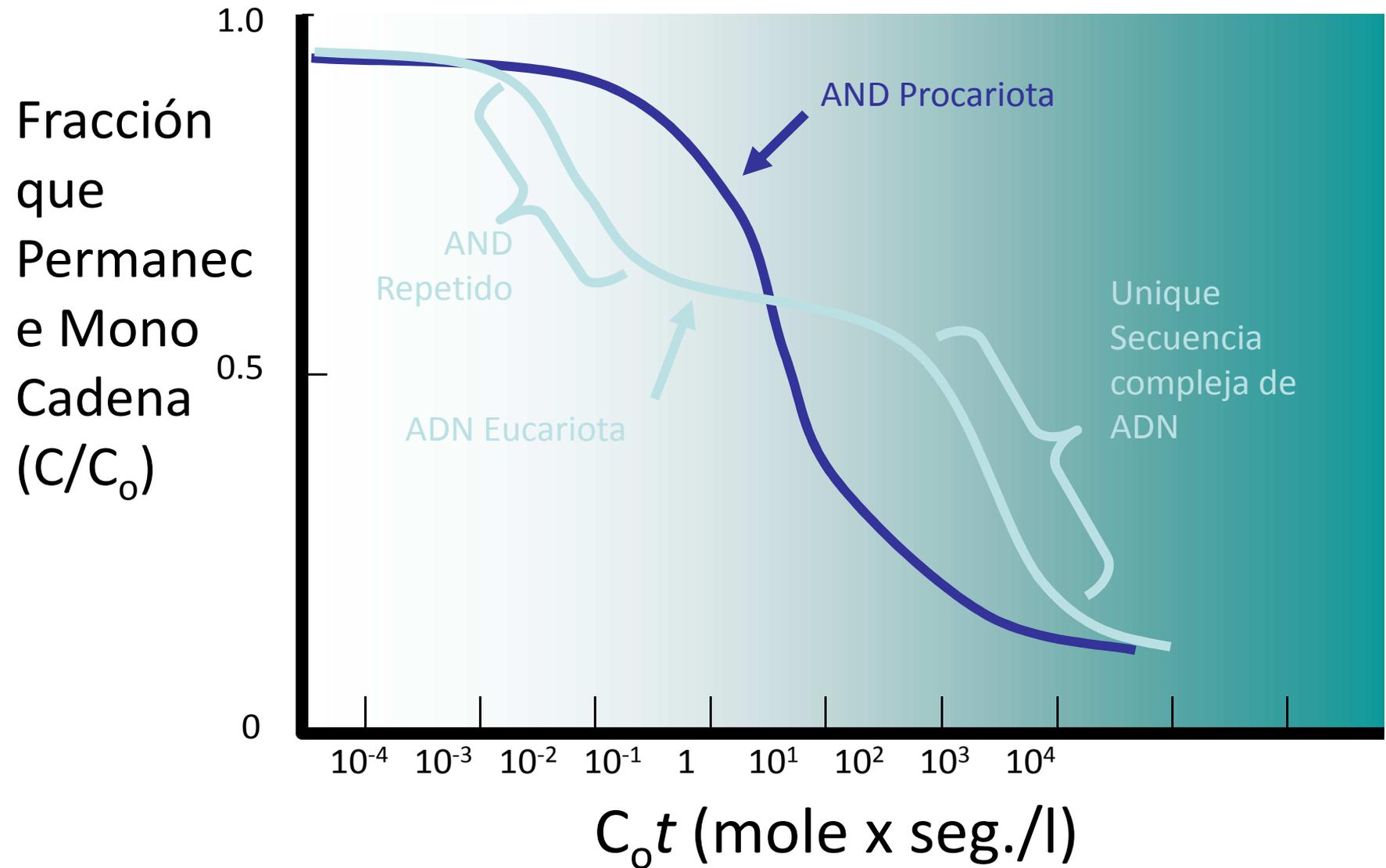
Cambios Estructurales Durante la desnaturalización



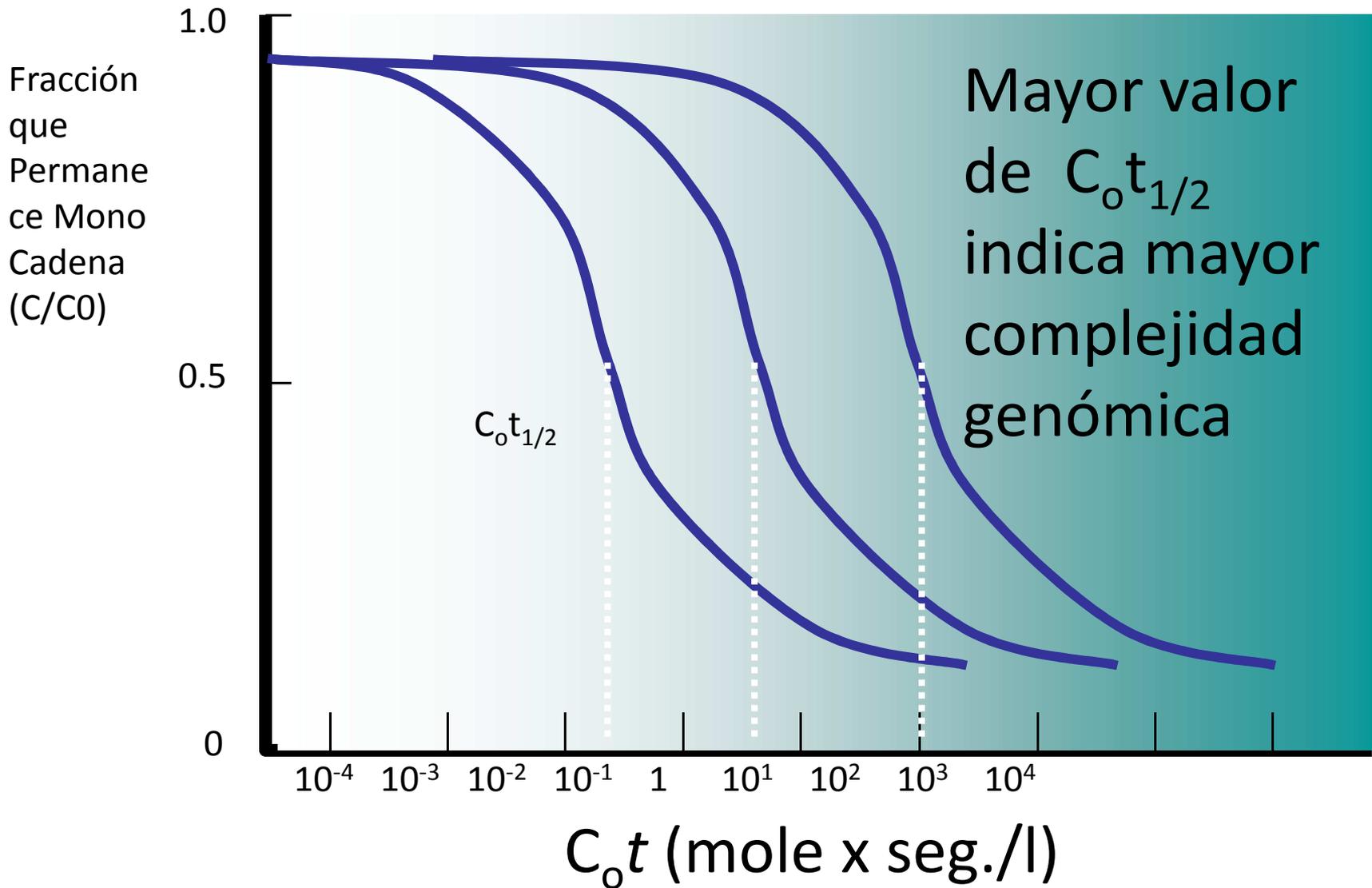
Seterminación del Contenido en GC



Cinética de Reasociación

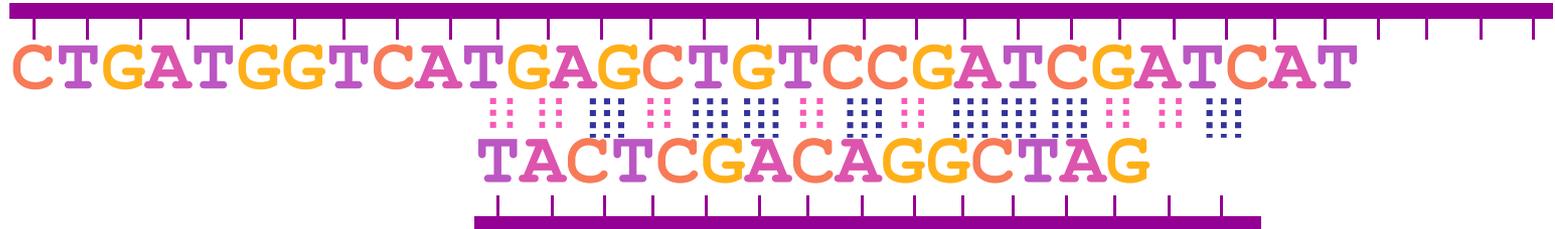


Cinética de Reasociación



Hibridación

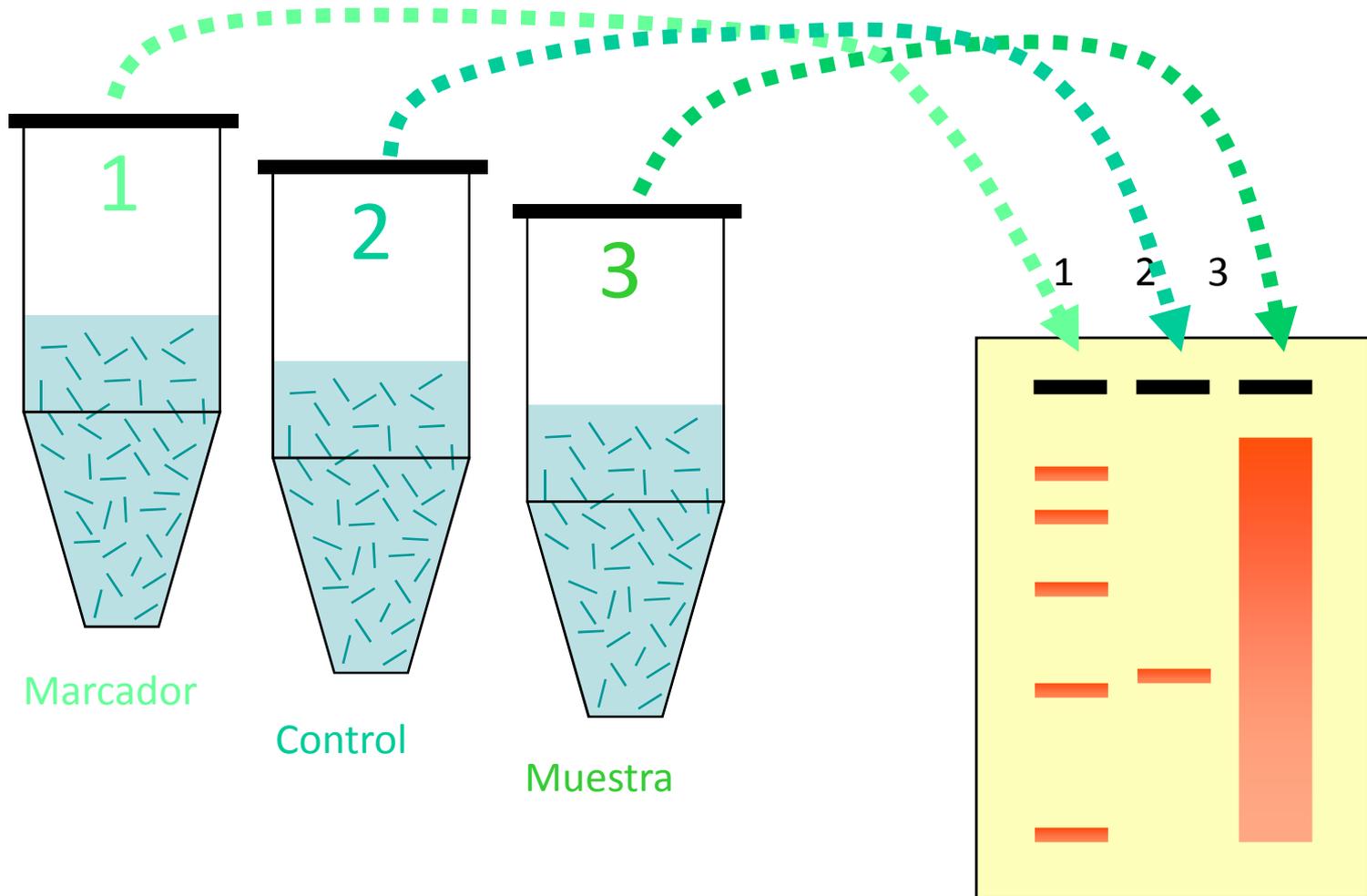
AND Templado



Primer

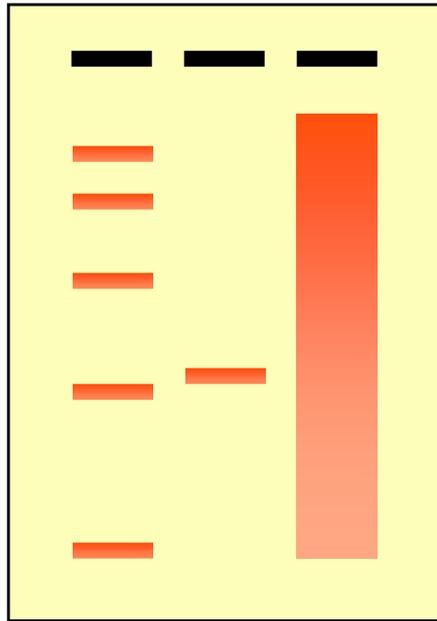
Análisis de Southern:

Restricción y Separación Electrofrética

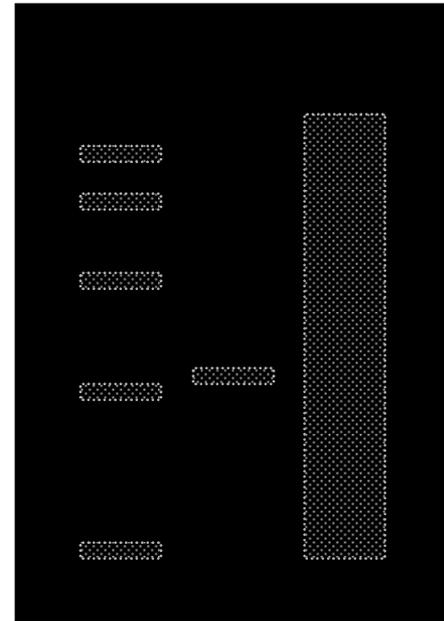


Análisis de Southern

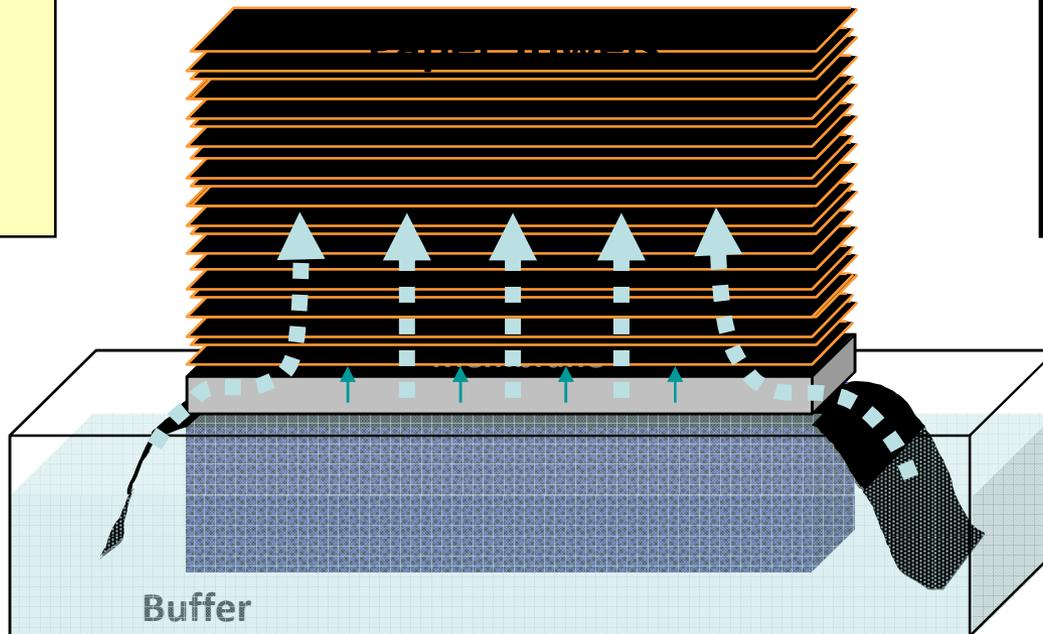
Transferencia del ADN a la Membrana



Gel

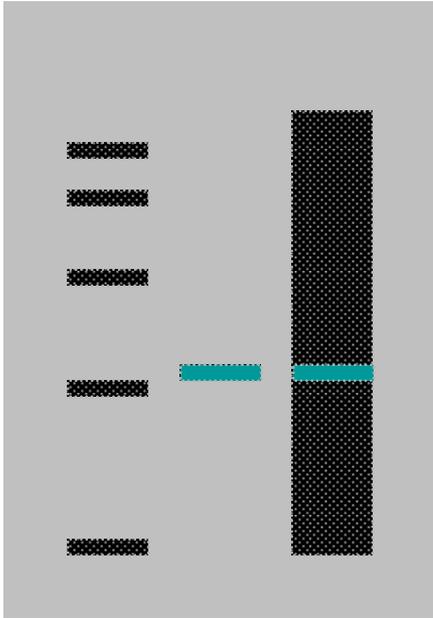


Membrana

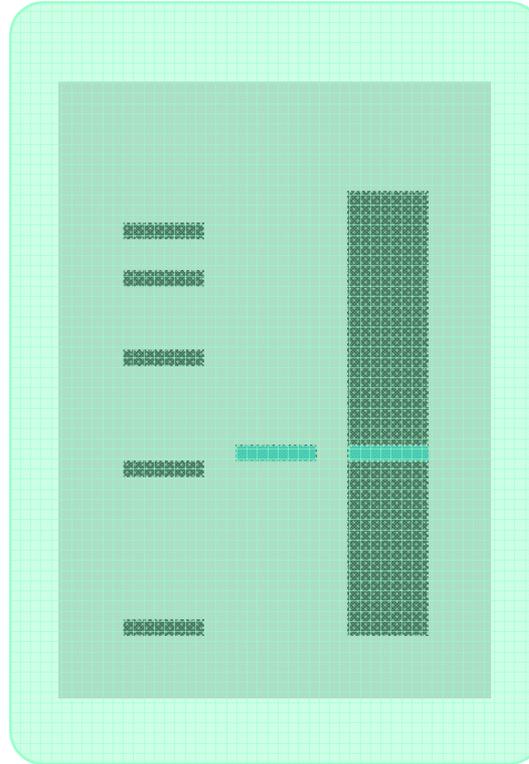


Análisis de Southern

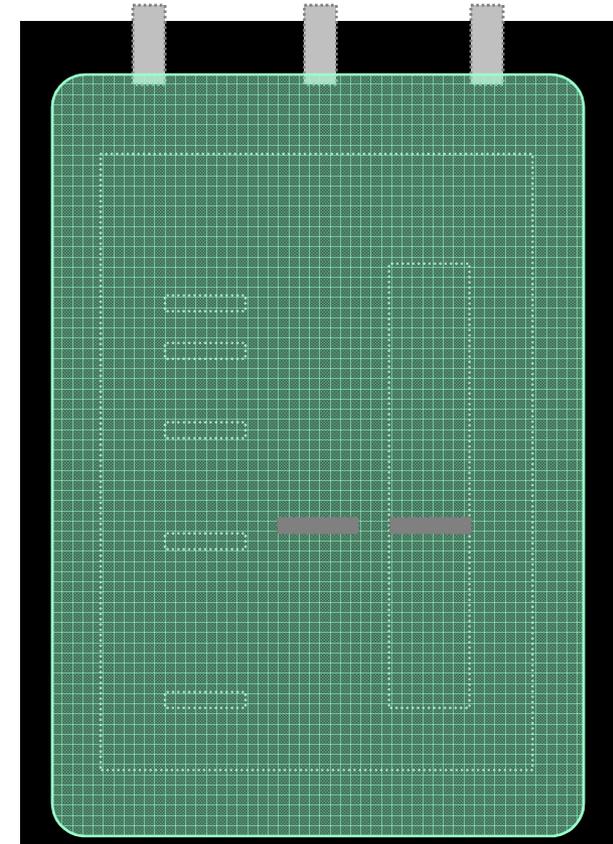
Revelado de Autorradiografías



Membrana con la sonda marcada hibridizada



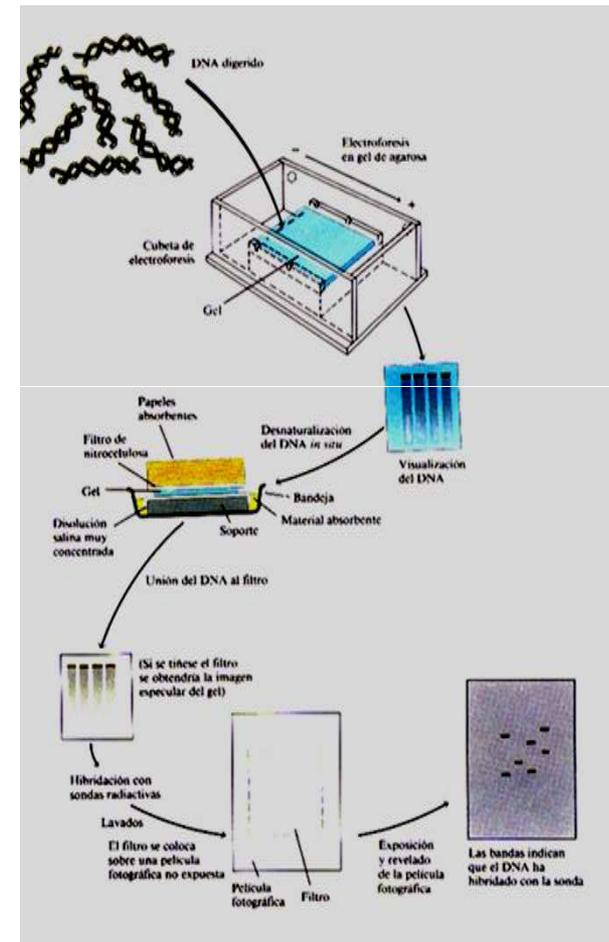
Exposición a placas de Rx



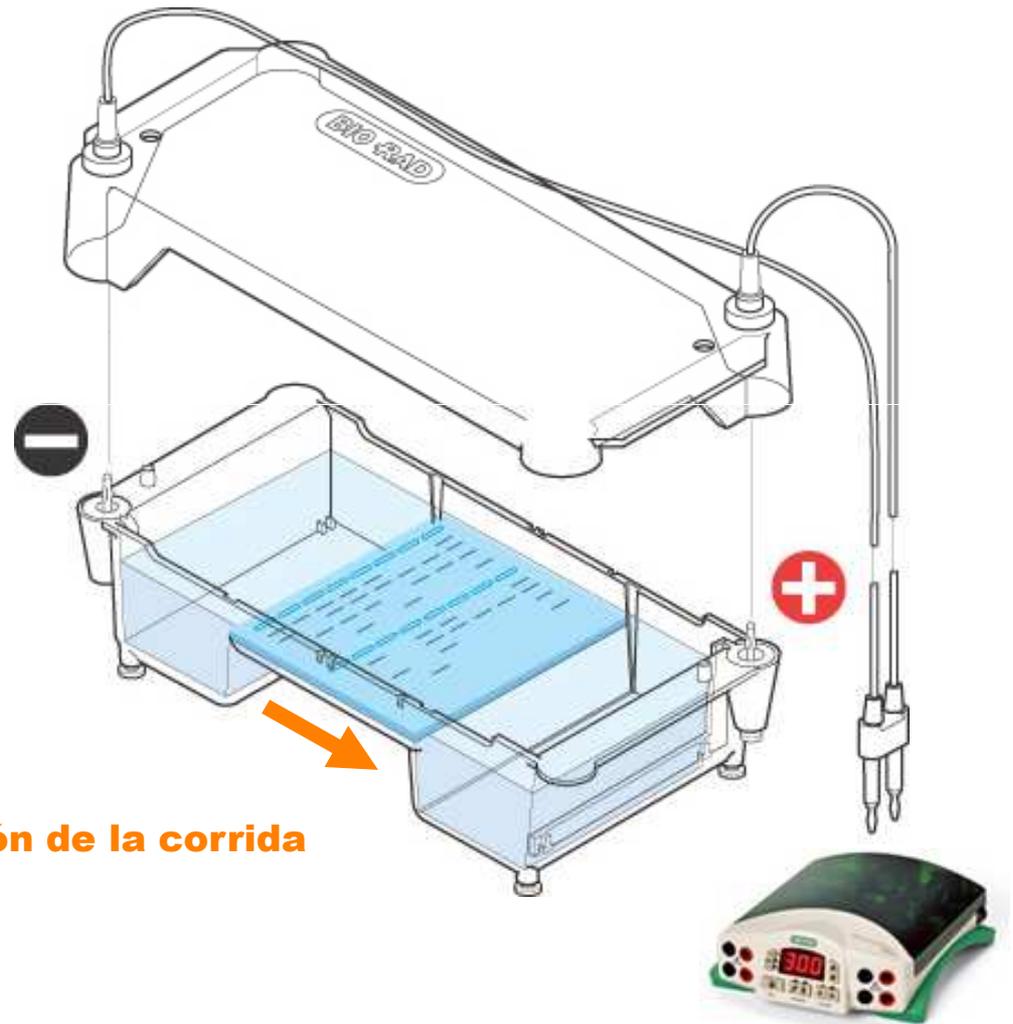
Se detectan los fragmentos específicos

Análisis de Minisatélites.

- Transferencia de Southern.
- Gran capacidad discriminativa.
- Requiere integridad del ADN.
- Requiere alta concentración.
- Optimo para estudios de paternidad.
- Económica.



La electroforesis en geles de agarosa permiten separar al ADN por tamaño los fragmentos menores se mueven más rápido que los mayores Small fragments La concentración de agarosa determina el rango de resolución de tamaño de los fragmentos



Dirección de la corrida

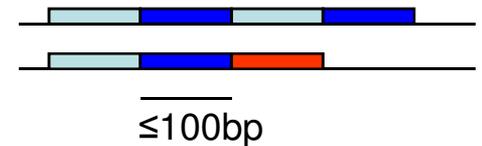
Tipos de Polimorfismos

- Polimorfismos de Sustitución SNPs
 - Single nucleotide polymorphisms
 - 1 cada pocos cientos de pb, tasa de mutación $\approx 10^{-9}$
- Ins/dels cortos (=inserción/delección)
 - 1 cada pocas kb, tasa de mutación muy variable
- Microsatelites (STR) repeticiones repetidas
 - 1 cada pocas kb, tasa de mutación $\leq 10^{-3}$
- Minisatelites
 - 1 cada pocas kb, tasa de mutación $\leq 10^{-1}$

TGCATT**G**CGTAGGC
TGCATT**C**CGTAGGC

TGCATT----TAGGC
TGCATT**CCG**TAGGC

TGCT**CATCATCATCA**GC
TGCT**CATCA**-----GC



Análisis de Minisatélites por RFLP

- Permite el análisis de vínculo biológico de parentesco.

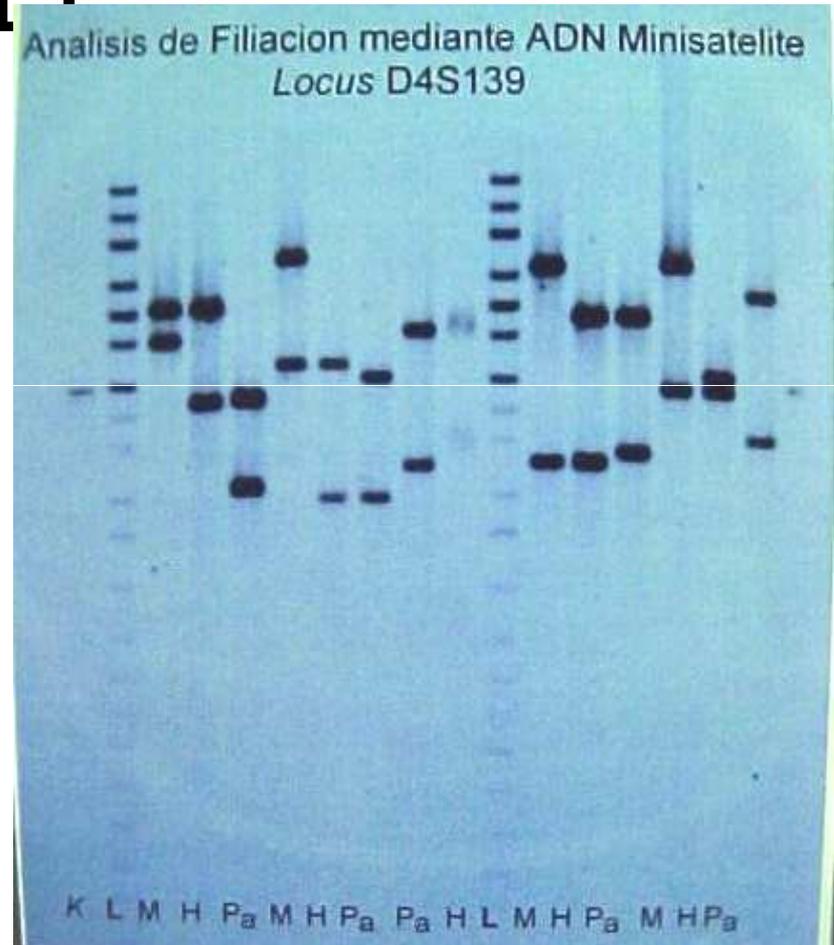
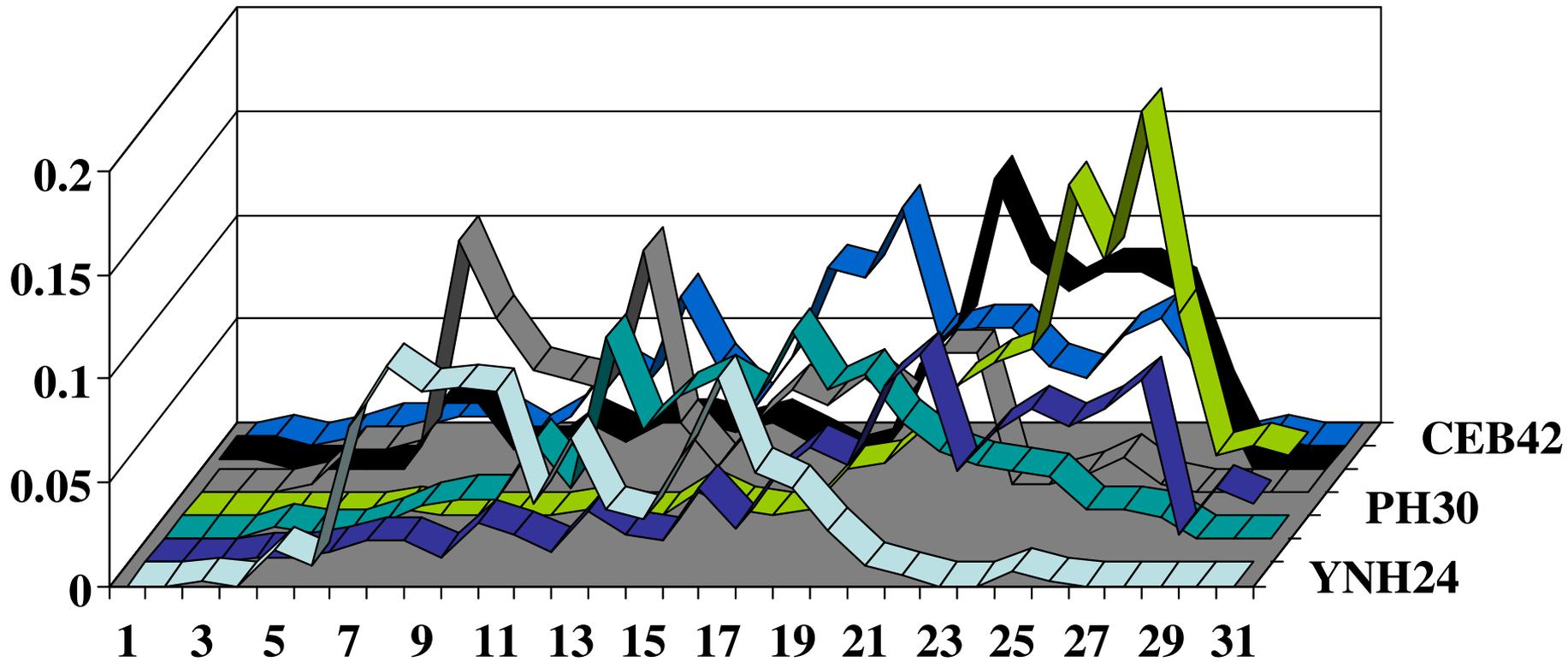


Table 1. Racial Population Distribution for Madrid, Buenos Aires Metropolitan Population*

Age	Age Range	2004	2010	2015	2020	2025	2030
1	0-4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2	5-9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3	10-14	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
4	15-19	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	20-24	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
6	25-29	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7	30-34	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
8	35-39	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9	40-44	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	45-49	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
11	50-54	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
12	55-59	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
13	60-64	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
14	65-69	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
15	70-74	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
16	75-79	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
17	80-84	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
18	85-89	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
19	90-94	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
20	95-99	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
21	100+	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

VNTRs Distribución de las Frecuencias Alélicas en la Población del Area Metropolitana de Buenos Aires.



Resultados en un estudio de paternidad

M

H

PA



INCLUSION

Resultados en un estudio de paternidad

M

H

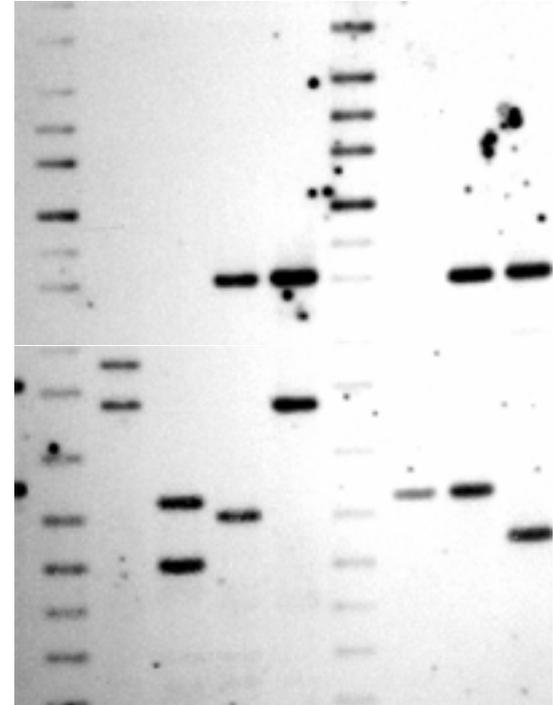
PA



EXCLUSION

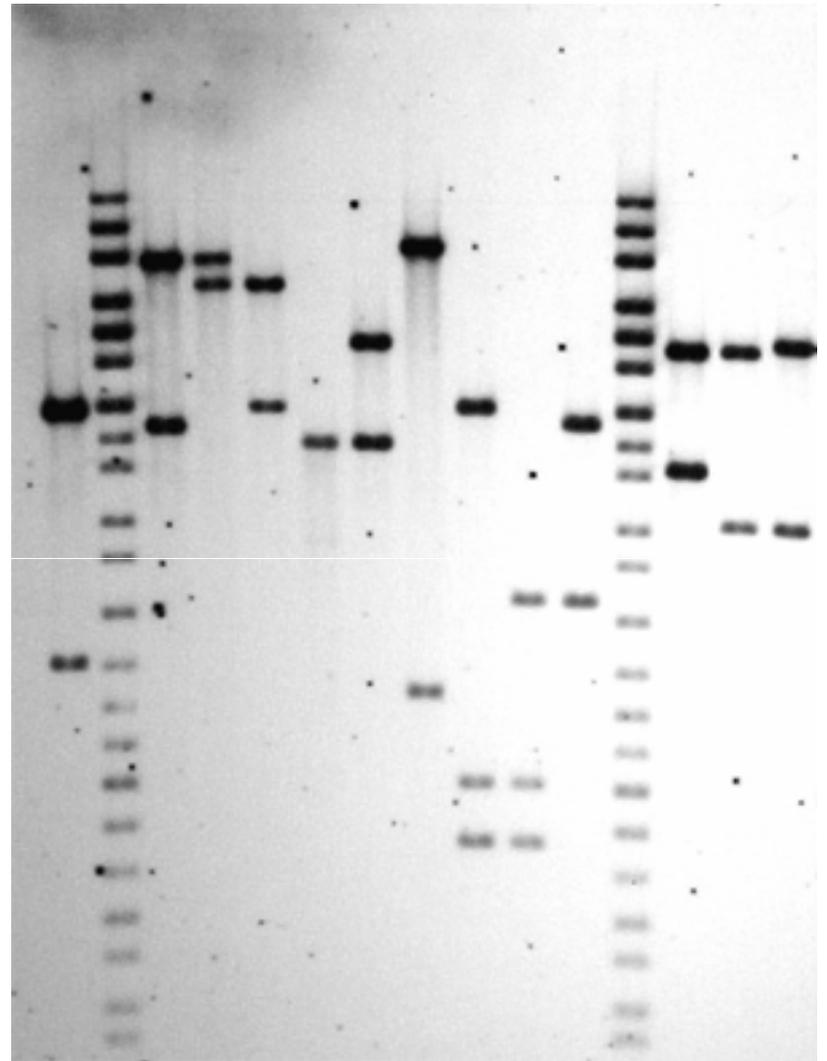
MUTACION!

Una mutación puede interpretarse falsamente como una exclusión de vínculo



MUTACION

Las mutaciones pueden elevar la probabilidad de vínculo



Minisatellites: Frecuencia de Mutaciones

<i>Locus</i>	N	Frecuencia
D1S7	6/486	0.01
D5S110	3/486	0.0062
D10S28	1/486	0.002
D4S139	4/486	0.008

N=Numero de mutaciones/caso de paternidad.

Herramienta Diagnóstica Biomédica

Polimorfismos de Longitud

Microsatélites o STRs

Iniciador Directo



Alelo 1



Alelo 2

Iniciador Reverso

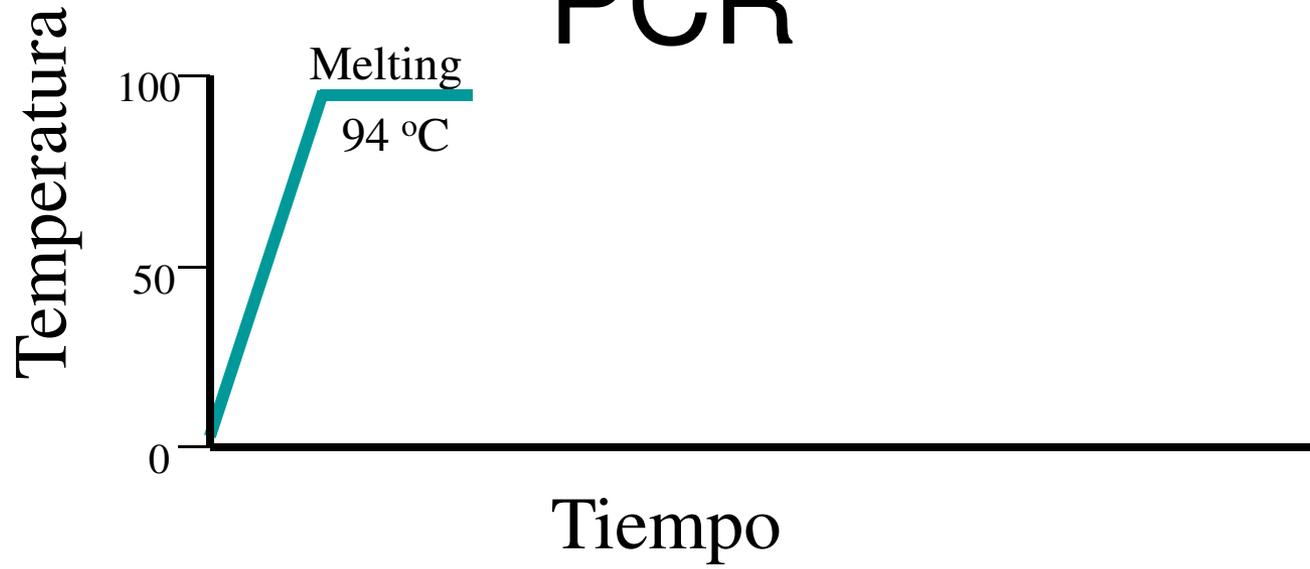


Unidad de Repetición (2 a 7 pb)

ELEMENTOS QUE SE REQUIEREN EN LA SINTESIS DEL DNA POR PCR

- Hebra Templado
- Iniciador (cebador, primer): secuencia corta de nucleótidos complementaria a la hebra templado. La enzima DNA polimerasa sólo puede iniciar la síntesis de una cadena de DNA a partir de un 3'OH libre.
- dNTPs : desoxirribonucleótidos tri-fosfatados
- DNA Polimerasa

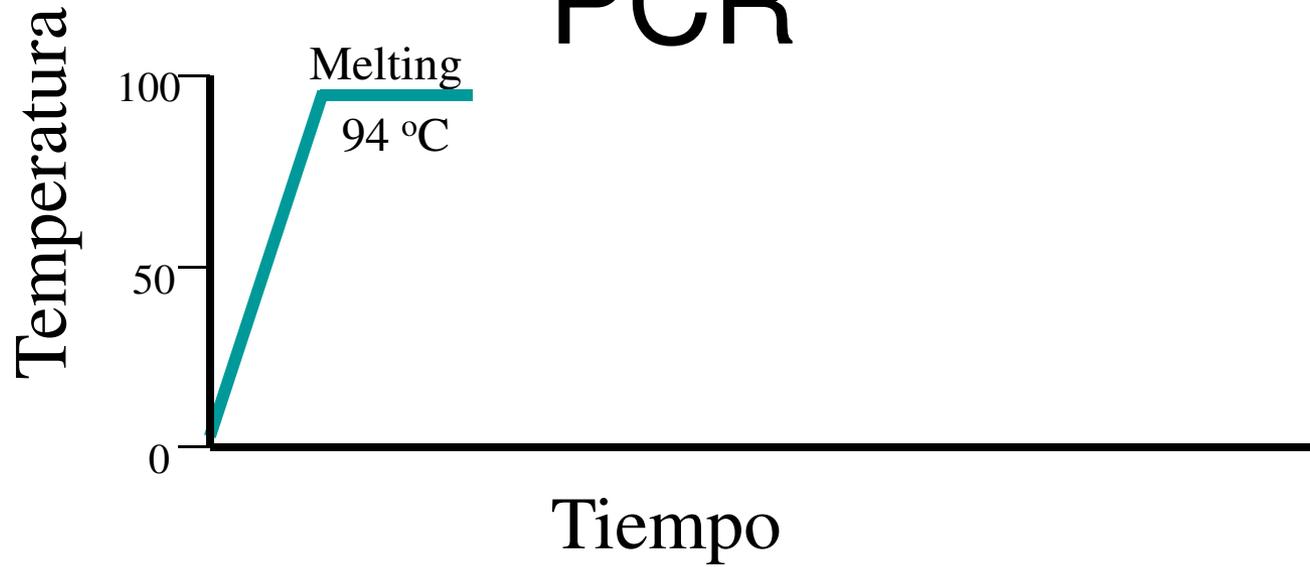
PCR



DNA de cadena
doble



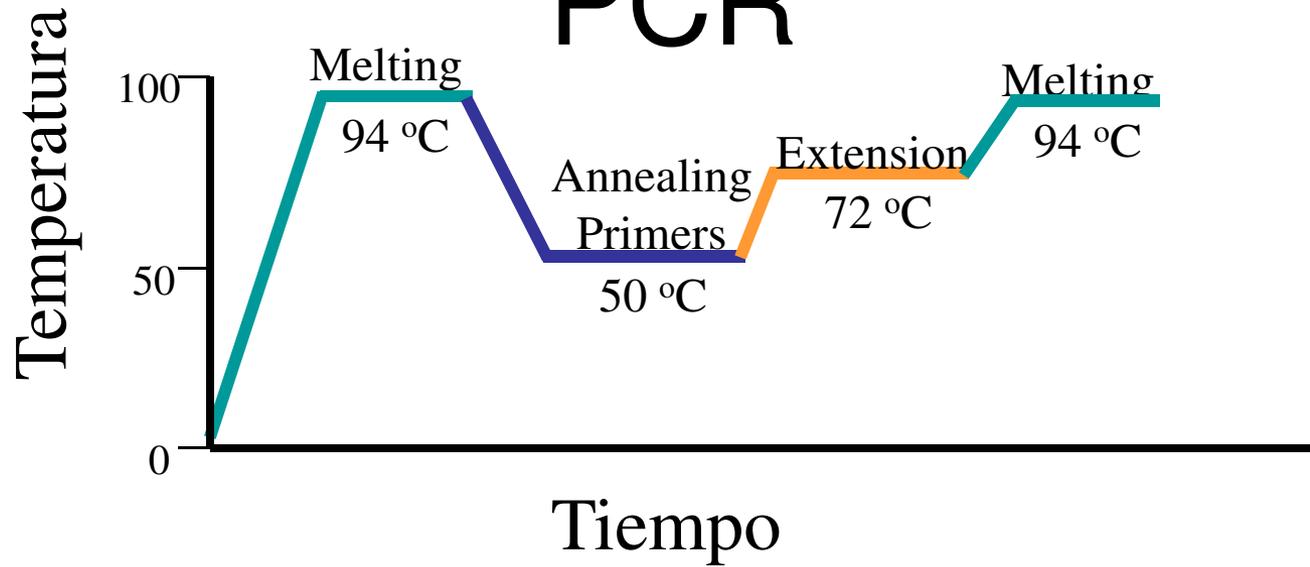
PCR



DNA de
cadena simple



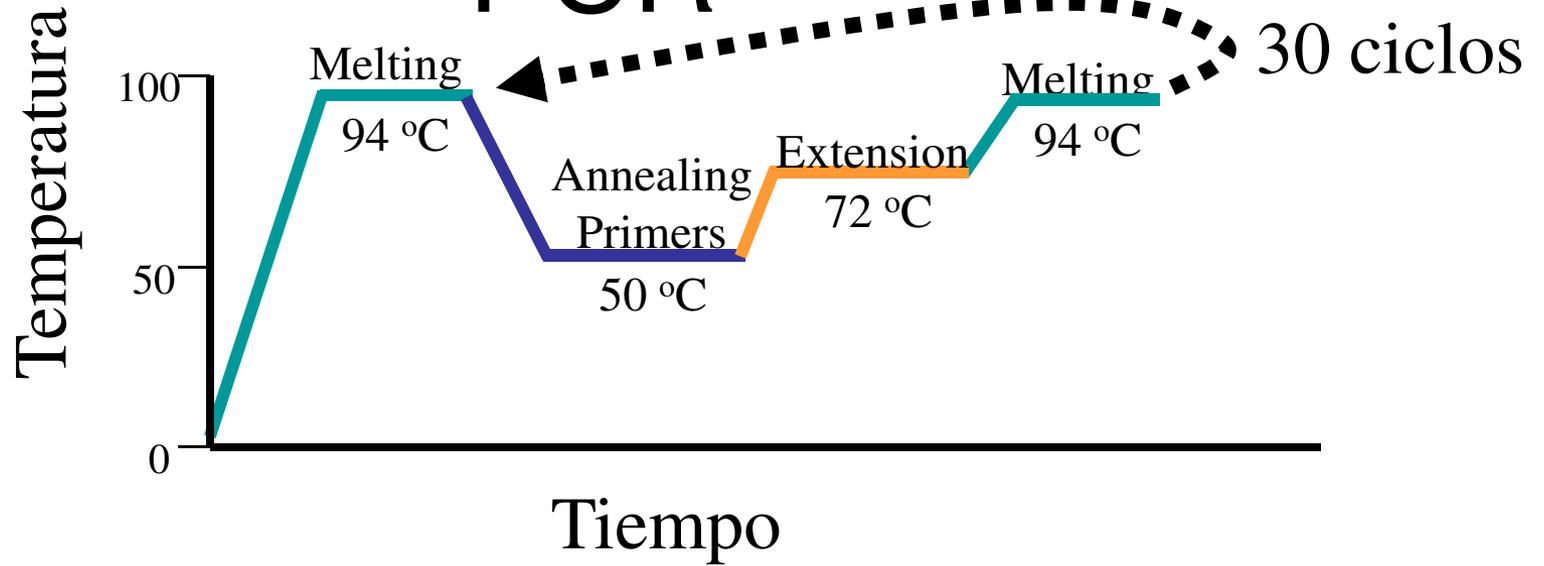
PCR



Hibridación
de primers



PCR



3' ————— 5'

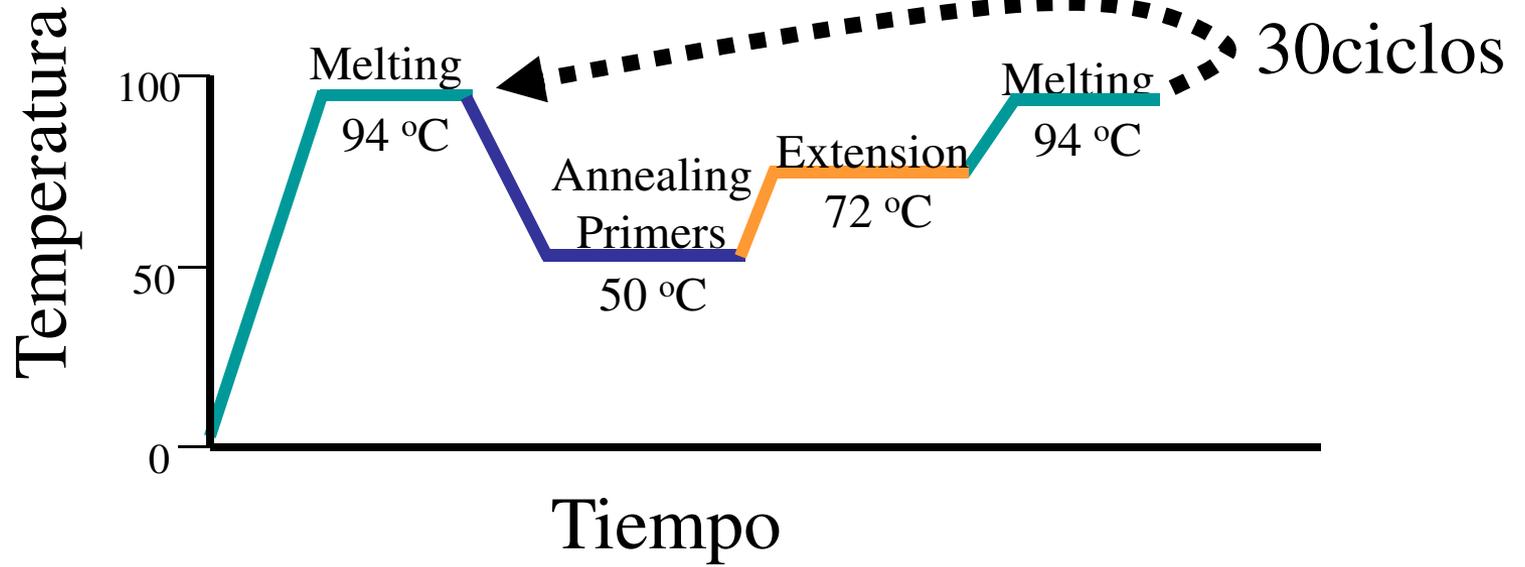


————— 5' ←

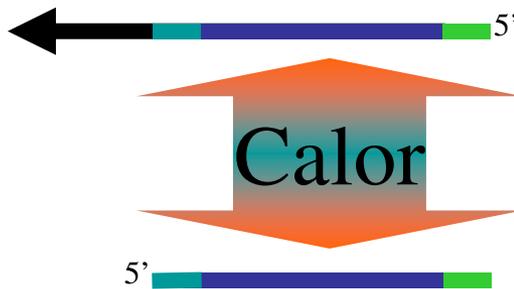
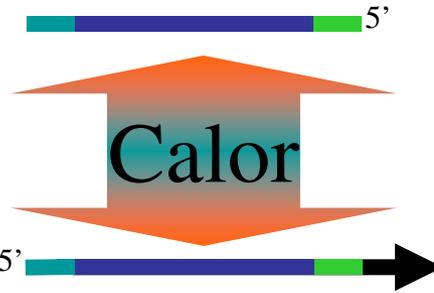
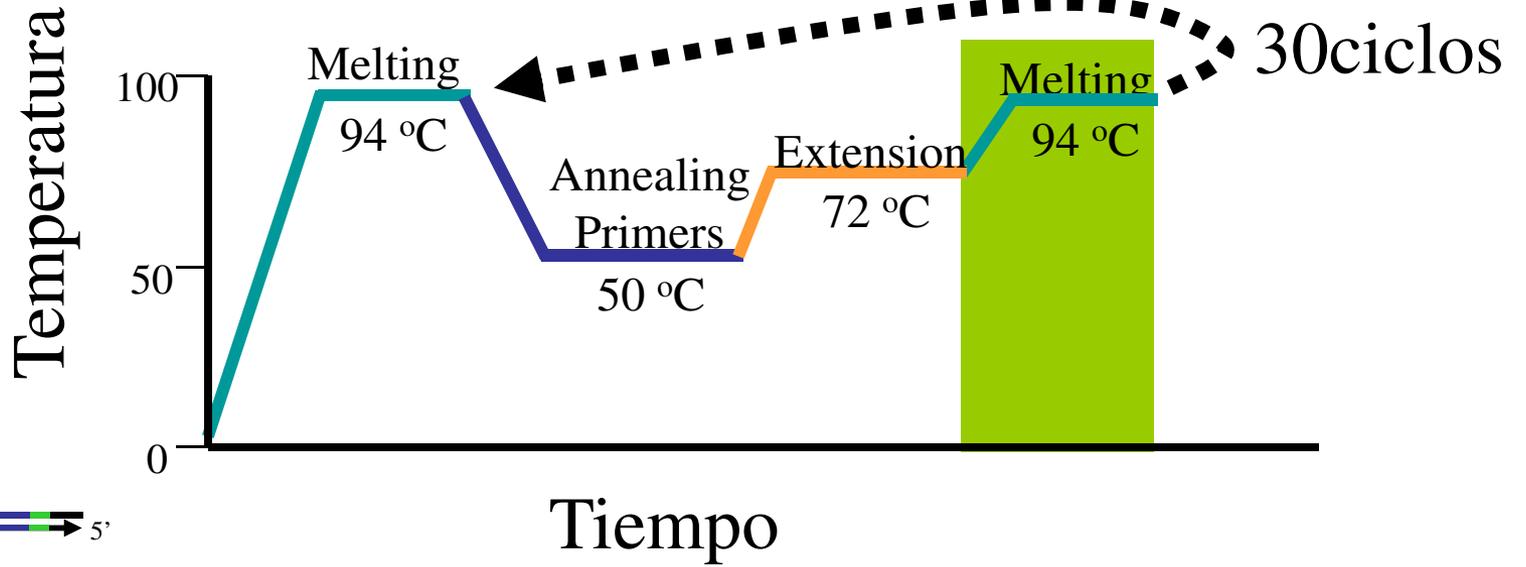


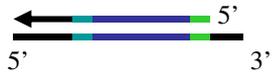
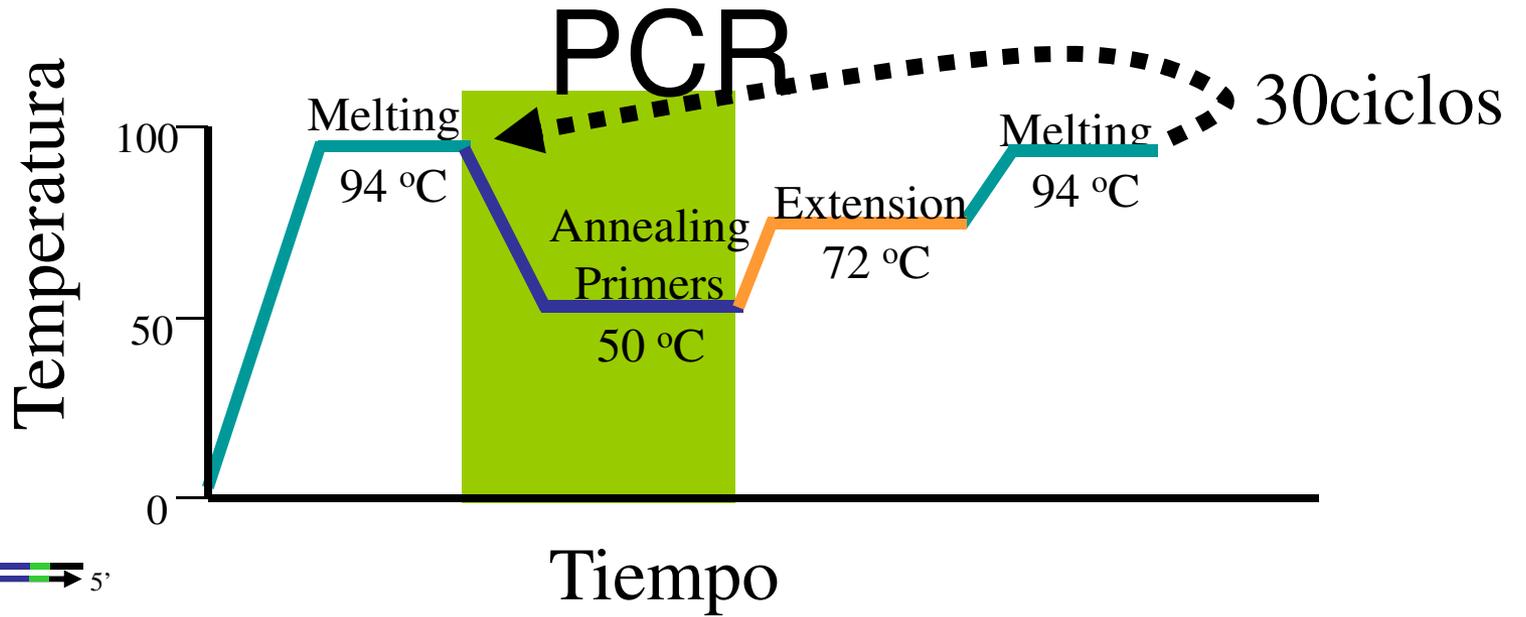
5' ————— 3'

PCR

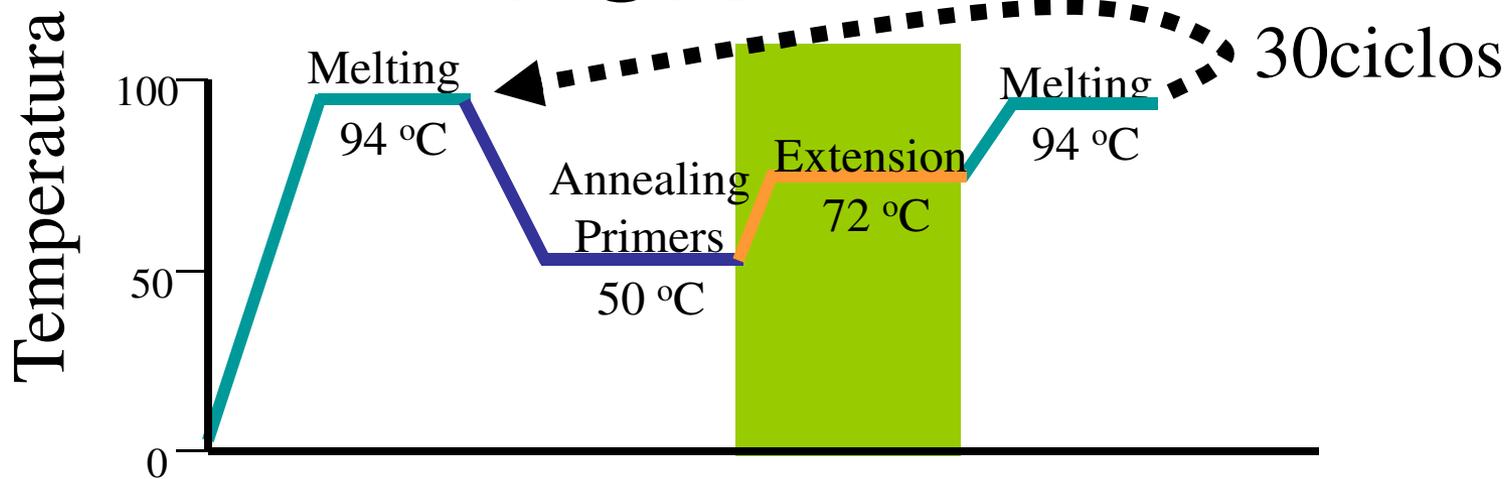


PCR



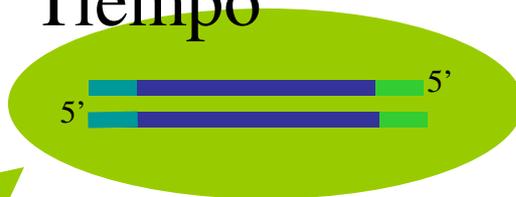


PCR



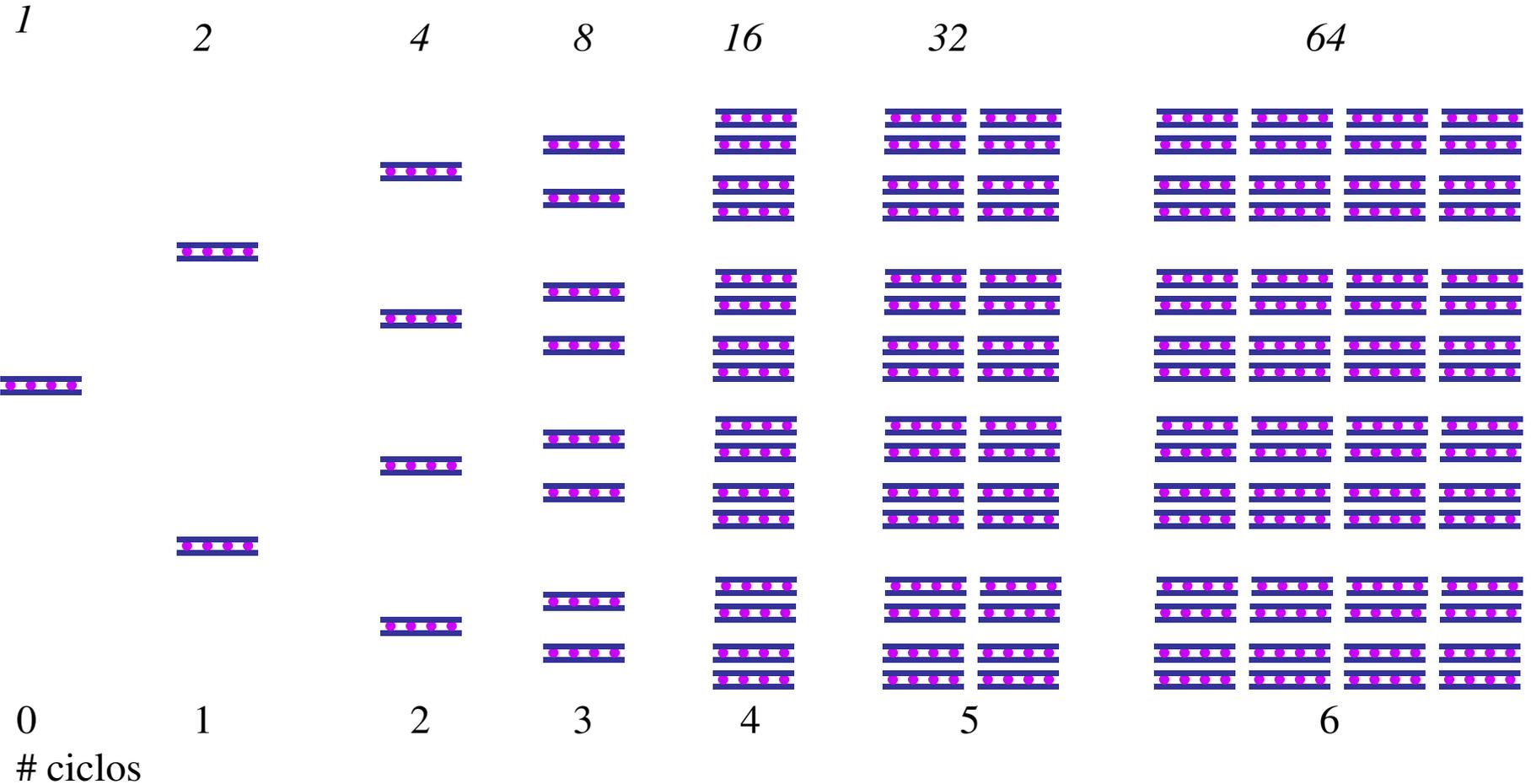
Fragmentos de tamaño definido

Tiempo



El numero de copias del DNA delimitado por los primers se duplica en cada ciclo de PCR.

Numero de copias



Pasos en la en el Análisis de ADN

Muestra Obtenida de la Escena del Crimen o de una Investigación de Paternidad

Extracción de ADN



Cuantificación de ADN



Amplificación por PCR de STR Múltiples

Biología

Tecnología

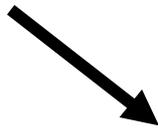
Separación y Detección de los Productos de PCR (Alelos de STR)



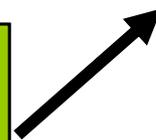
Determinación del Genotipo.

Genética

Comparación de los Genotipos de la Muestras



Si hay coincidencia, comparación de los perfiles de con bases de datos populacionales



Generación del informe incluyendo la Probabilidad de la Coincidencia al Azar

Tipo de Análisis Efectuados Mediante PCR en el Campo Forense

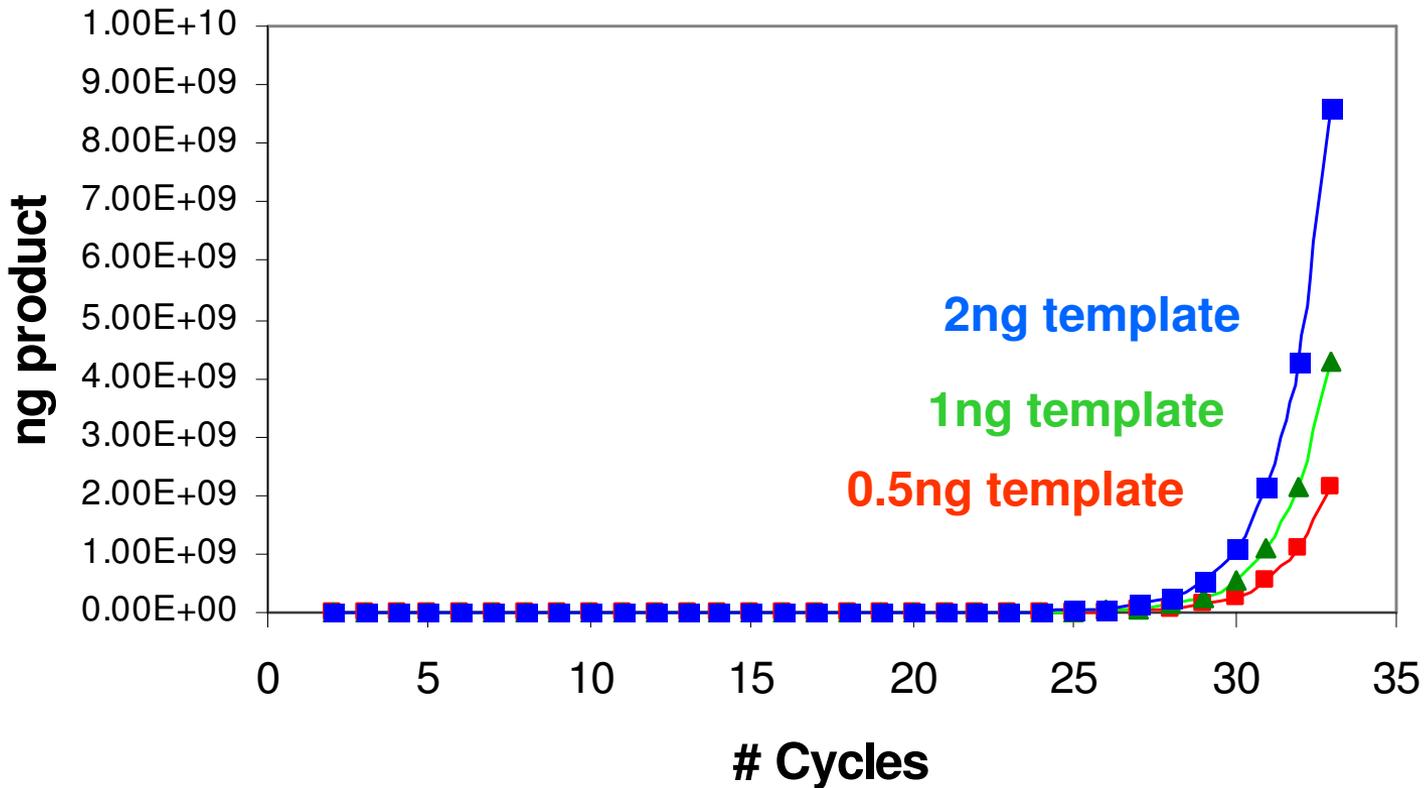
- Cuarificación del ADN Humano
- Detección de ADN Masculino
- Detección de Inhibidores
- Análáís de STRs
- Secuenciación
- Detección de SNPs

N'umero de Ciclos	N'umero de copias
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1.024
11	2.048
12	4.096
13	8.192
14	16.384
15	32.768
16	65.536
17	131.072
18	262.144
19	524.288
20	1.048.576
21	2.097.152
22	4.194.304
23	8.388.608
24	16.777.216
25	33.554.432
26	67.108.864
27	134.217.728
28	268.435.456
29	536.870.912
30	1.073.741.824
31	1.400.000.000
32	1.500.000.000
33	1.550.000.000
34	1.580.000.000

La Cantidad de Productos de PCR es Proporcional al ADN Templado de la Muestra

Durante la fase exponencial la cantidad de producto es proporcional con la de templado. Se muestra aca el producto luego de 32 ciclos

Exponential PCR

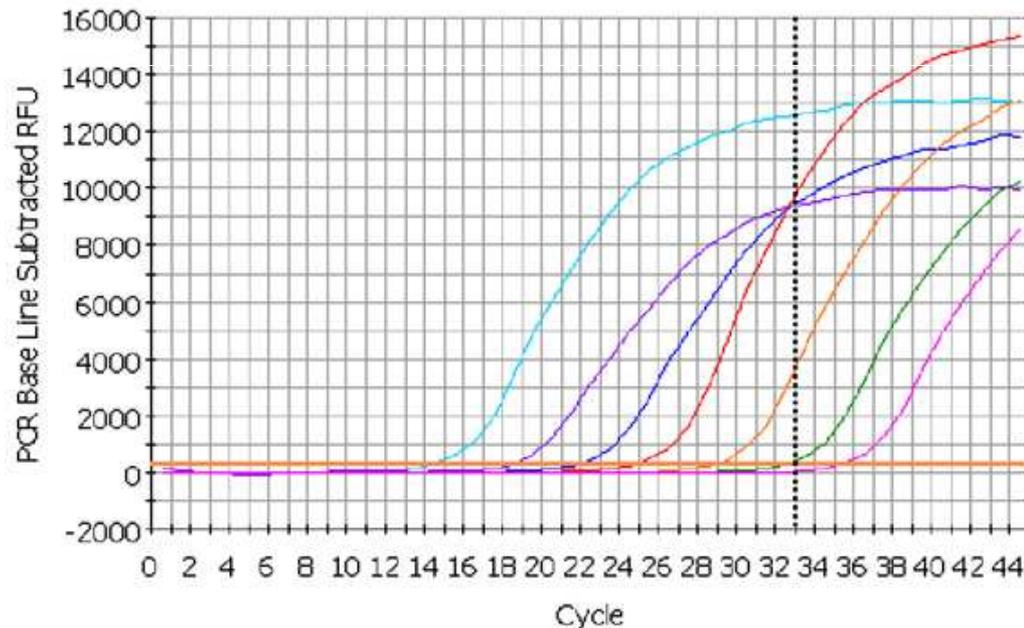


PCR plateau

- Los productos de PCR no se duplican infinitamente
- Limitado por
 - Cantidad de primer
 - Actividad de la Taq polymerasa
 - Reasociación de las cadenas producidas
- Se llega al plateau
 - Cuando no hay más incremento de producto
- Detección de Punto Final
- Corrida con # fijo de ciclos y luego detección con geles de agarosa

Real Time PCR

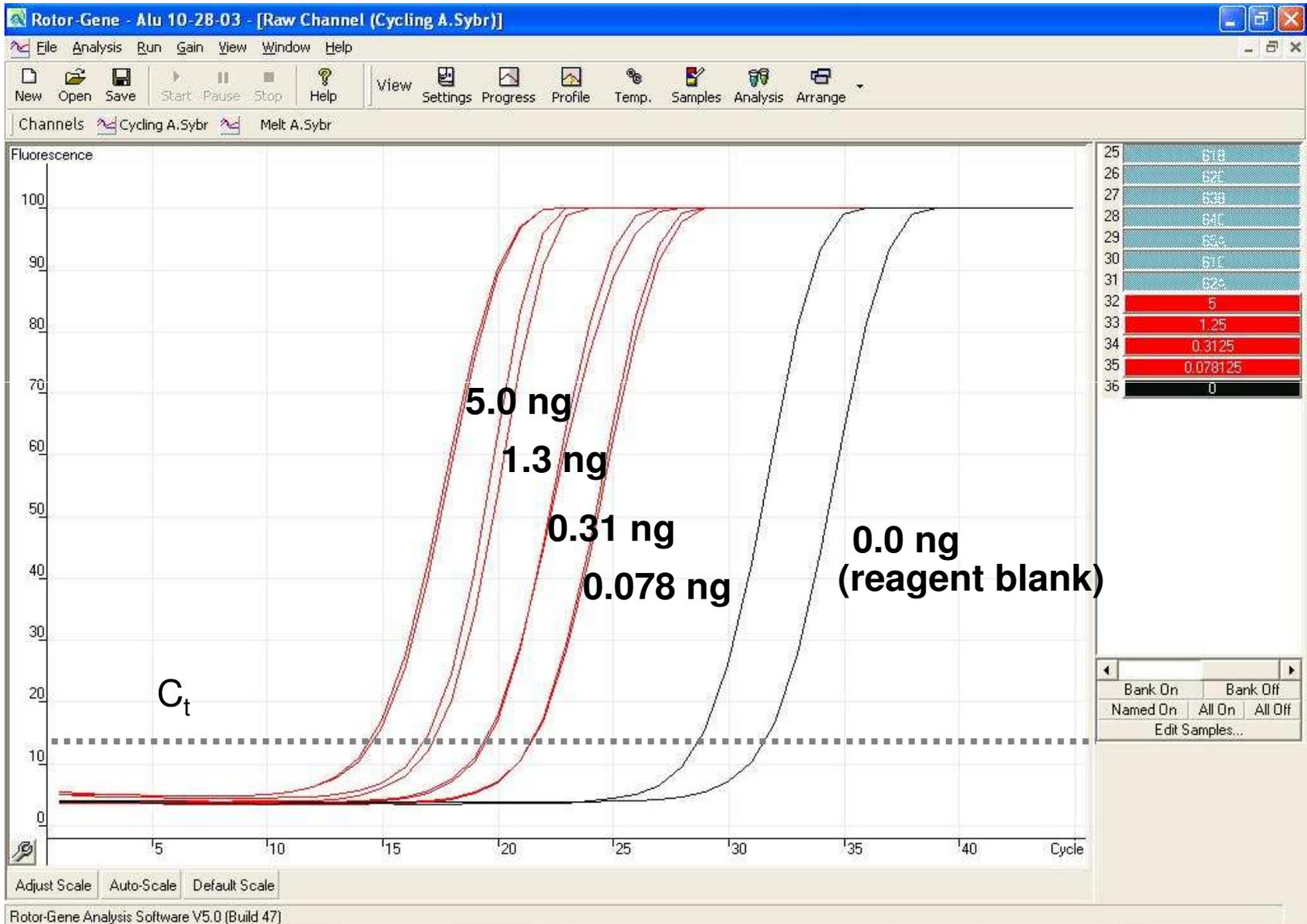
- Cuantificación de DNA se basa en el # de ciclos necesarios para alcanzar una intensidad umbral, C_t .
- Cuanto mayor sea la cantidad de ADN de partida tanto más rápido se alcanzará el umbral.



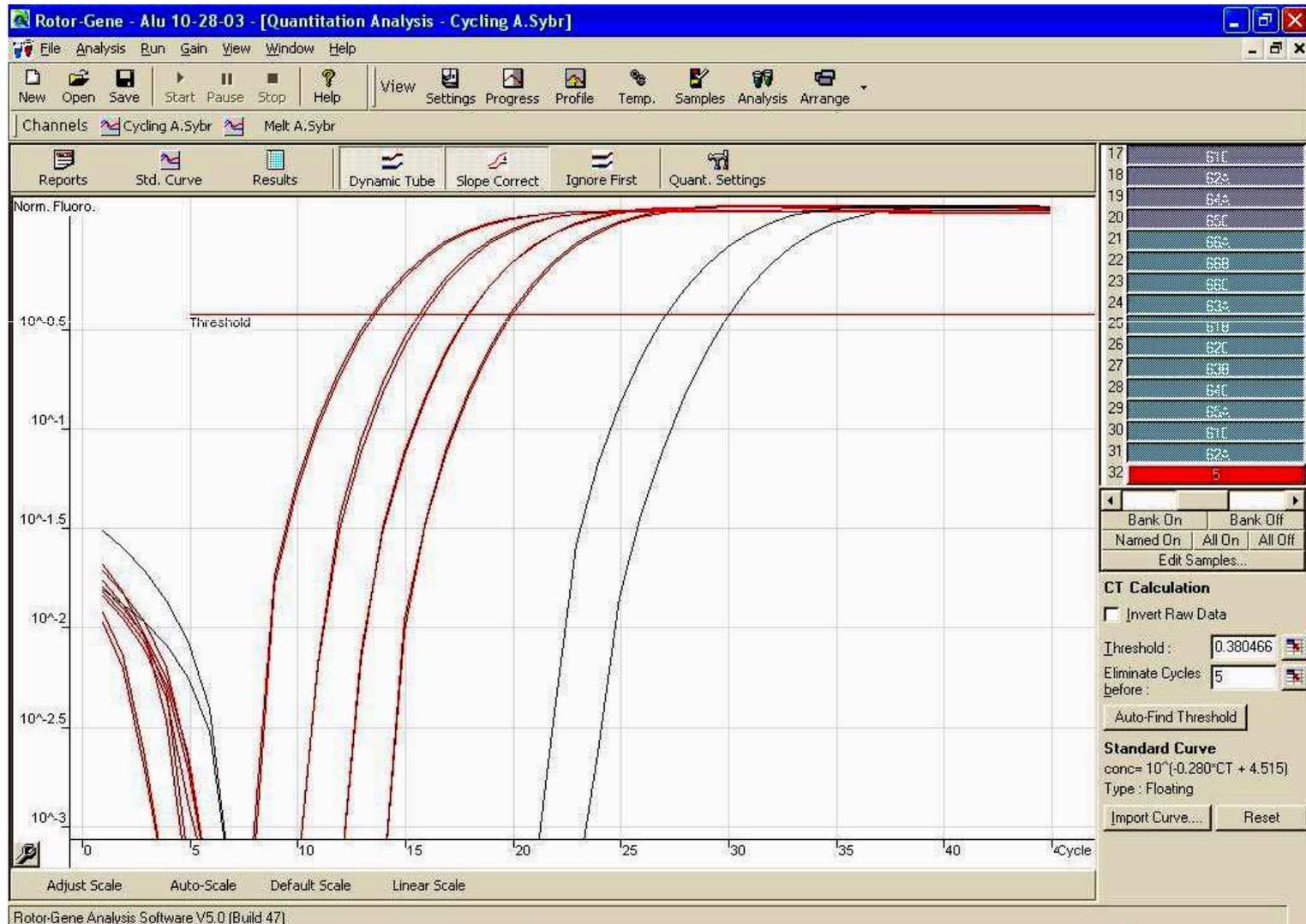
C_t

SERIES OF 10-FOLD DILUTIONS

Desarrollo de una Curva Standard

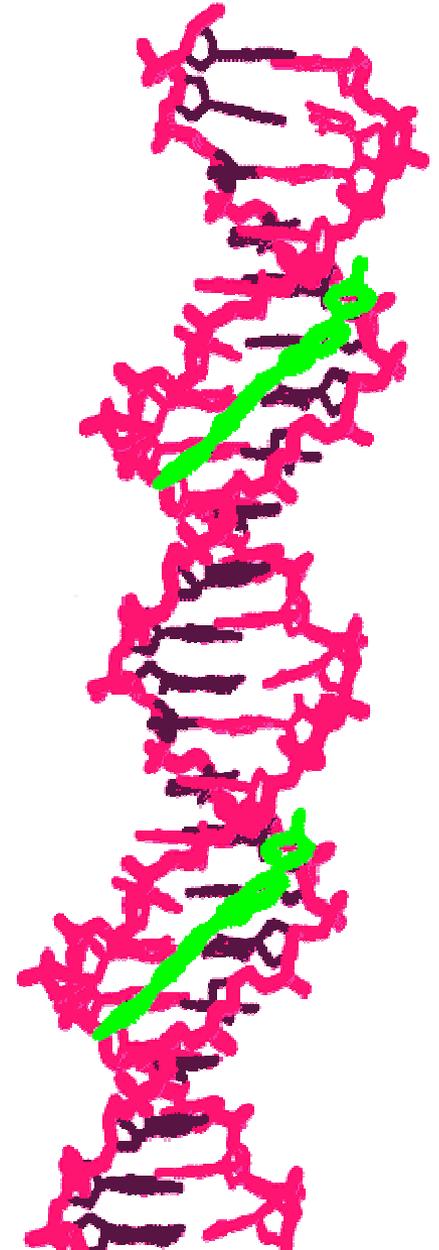


Los datos se grafican en escala Log y el # de ciclos requeridos para alcanzar el C_t .

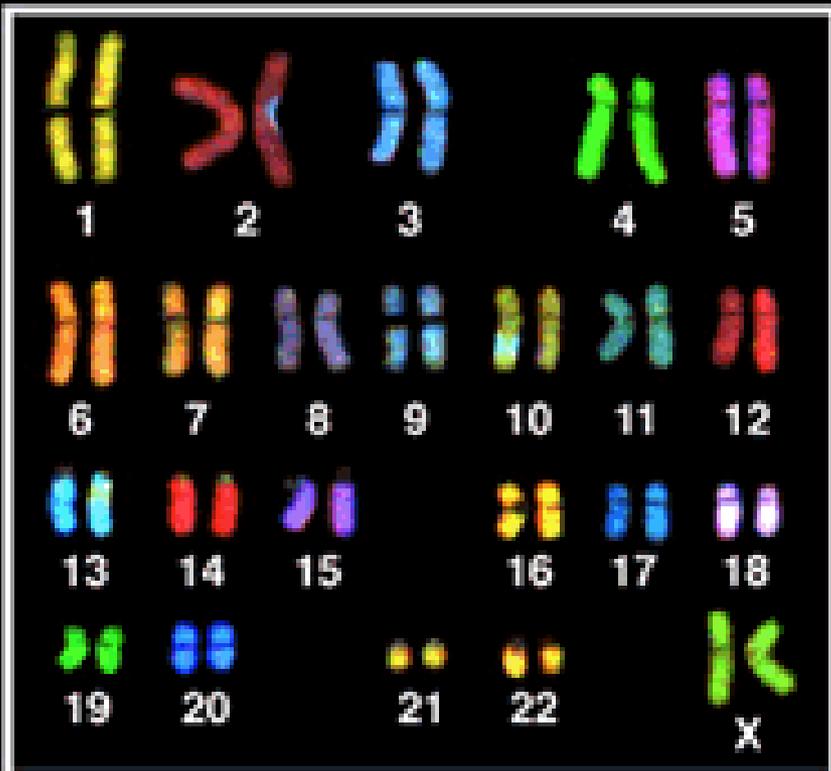
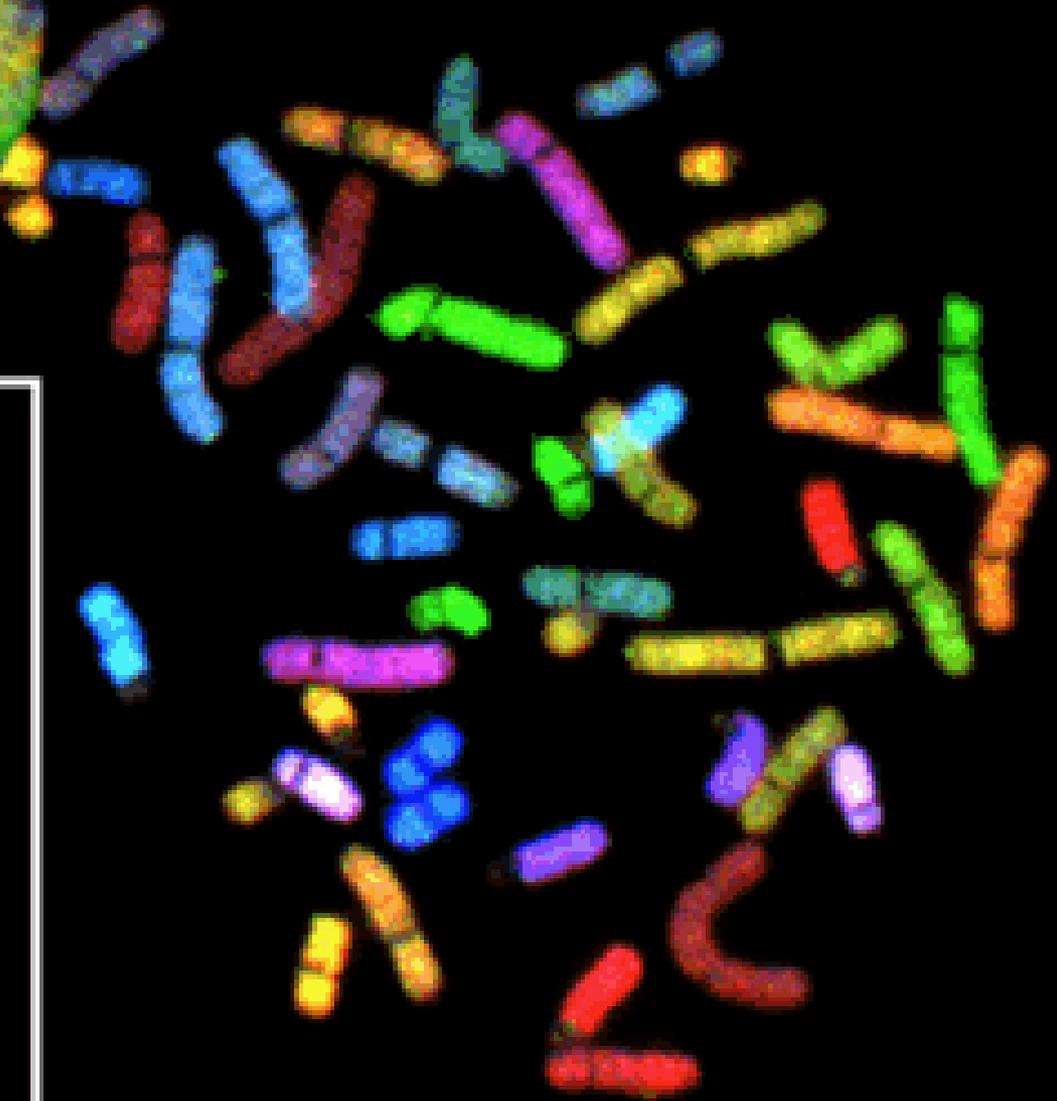
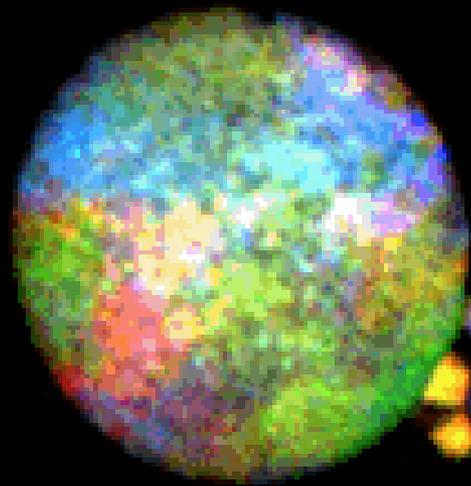


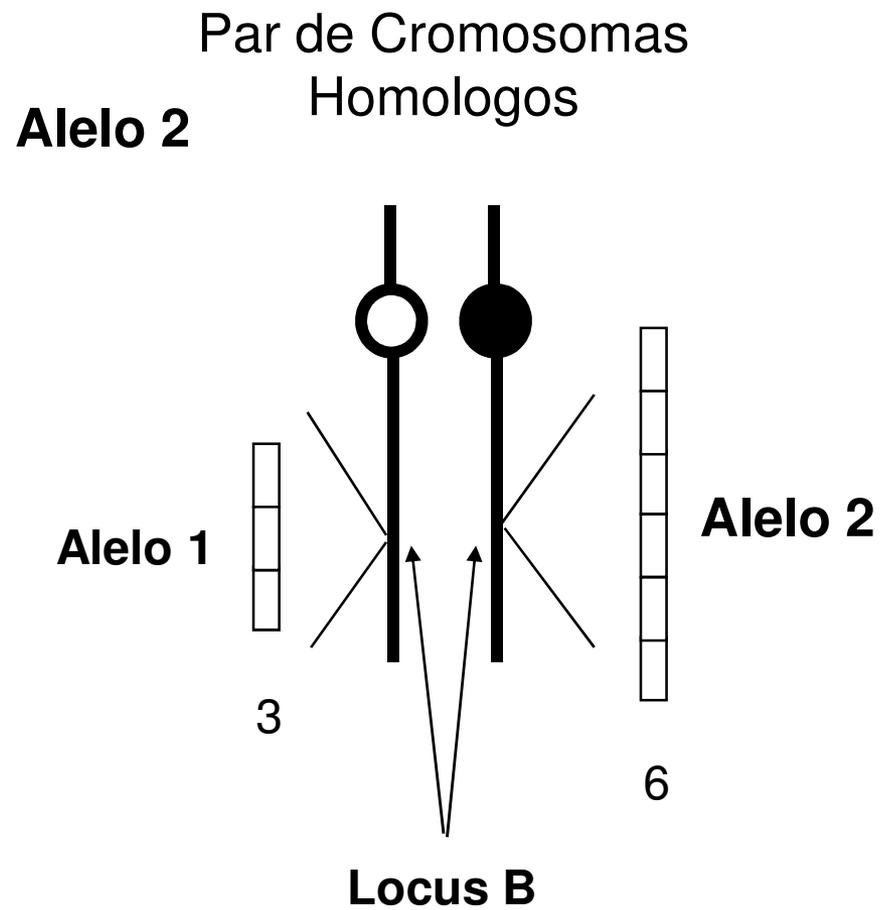
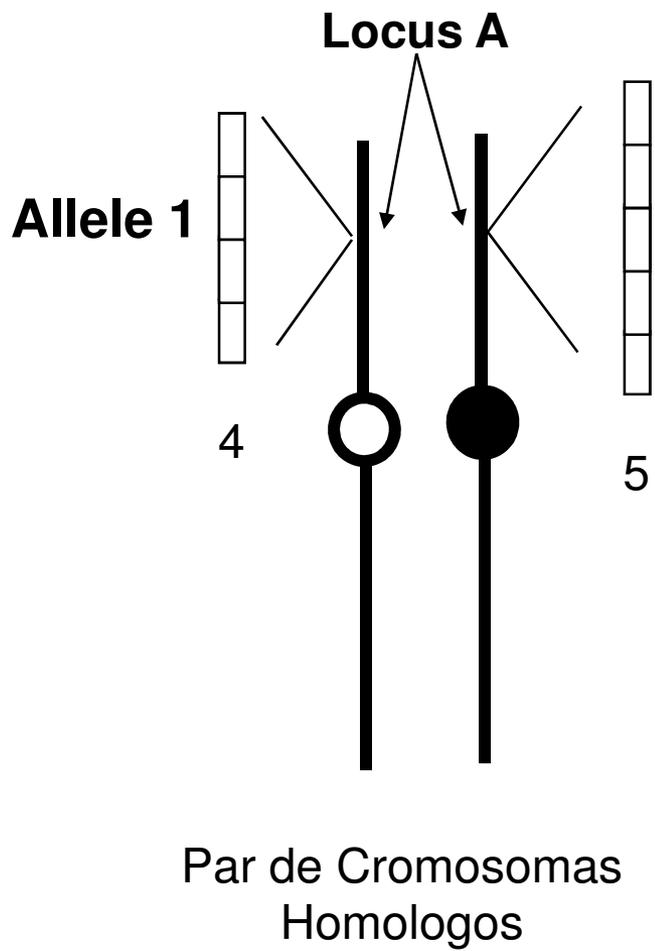
SYBR™ Green I

- ⊕ Colorante Intercalar
- ⊕ Barato & simple
- ⊕ Used for real-time PCR product detection Permite la detección de productos de PCE en Tiempo Real
- ⊕ Permite efectuar análisis de disociación o melting
- ⊕ Muy usado



Marcadores Genéticos





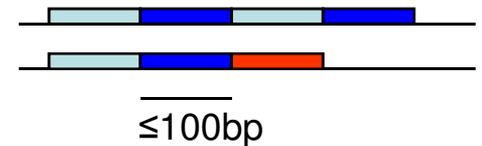
Tipos de Polimorfismos

- Polimorfismos de Sustitución SNPs
 - Single nucleotide polymorphisms
 - 1 cada pocos cientos de pb, tasa de mutación $\approx 10^{-9}$
- Ins/dels cortos (=inserción/delección)
 - 1 cada pocas kb, tasa de mutación muy variable
- Microsatelites (STR) repeticiones repetidas
 - 1 cada pocas kb, tasa de mutación $\leq 10^{-3}$
- Minisatelites
 - 1 cada pocas kb, tasa de mutación $\leq 10^{-1}$

TGCATT**G**CGTAGGC
TGCATT**C**CGTAGGC

TGCATT----TAGGC
TGCATT**CCG**TAGGC

TGCT**CATCATCATCA**GC
TGCT**CATCA**-----GC



Tipos de Polimorfismos

(A) Polimorfismos de Longitud

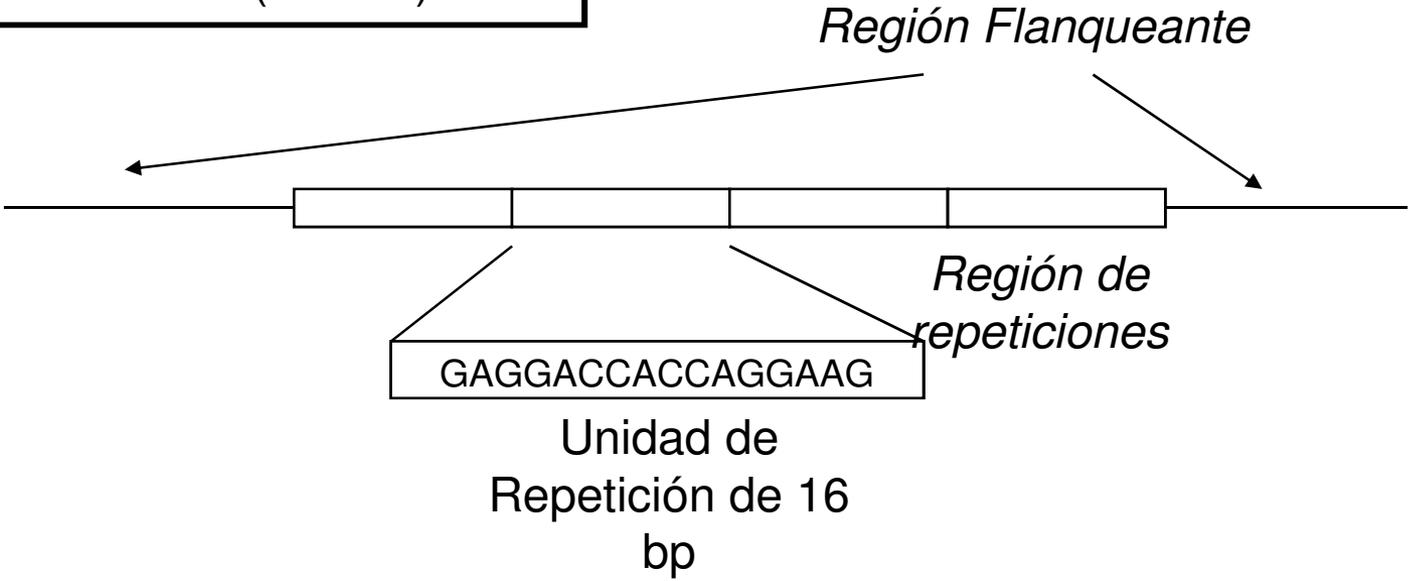
-----**(AATG)**(AATG)(AATG)-----
3 repeats

-----**(AATG)**(AATG)-----
2 repeats

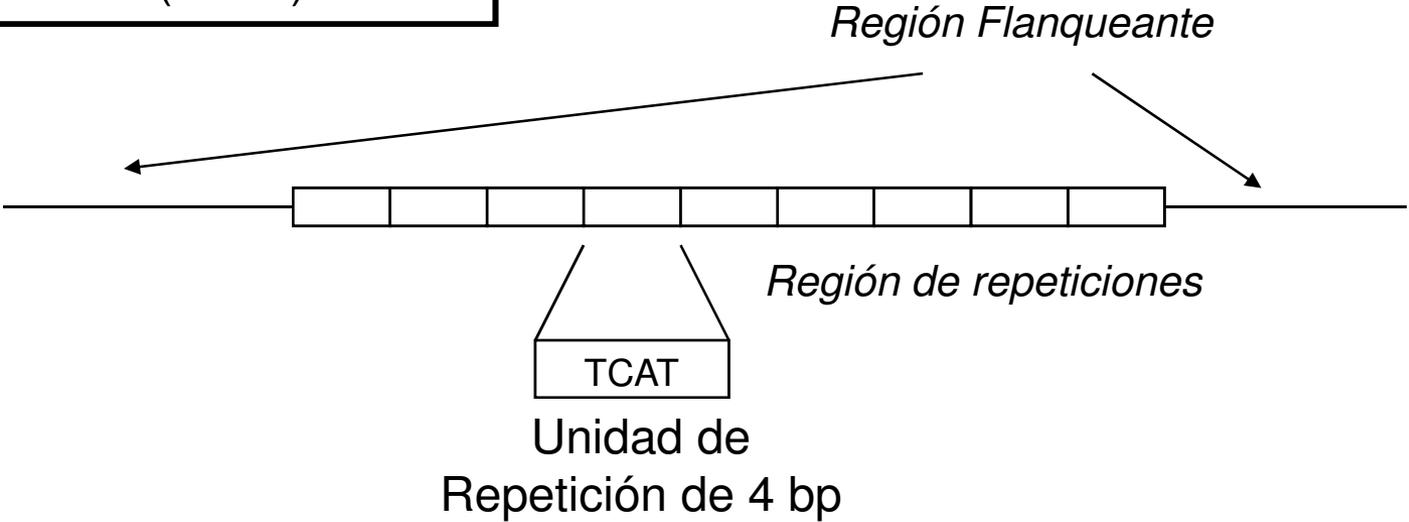
(B) Polimorfismos de Secuencia

-----AGACTAGACATT-----
-----AGATTAGGCATT-----

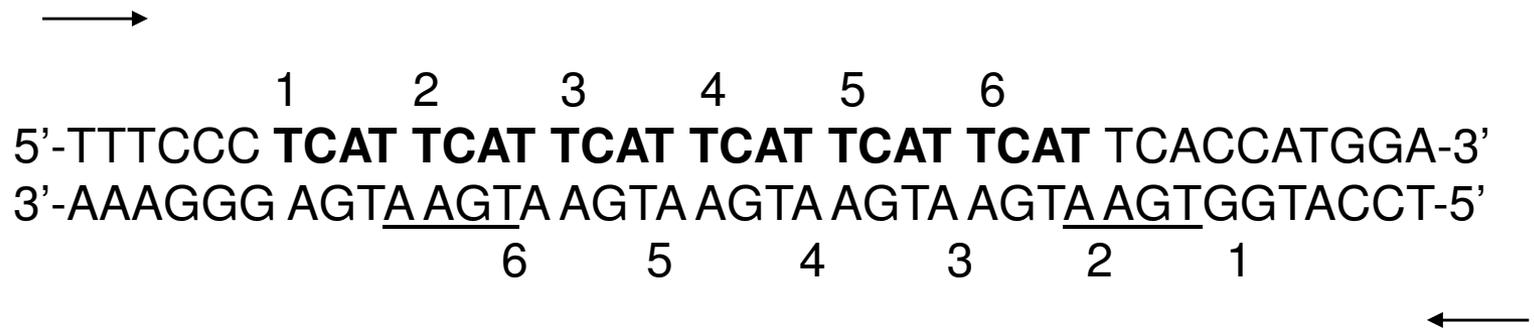
Minisatelite (D1S80)

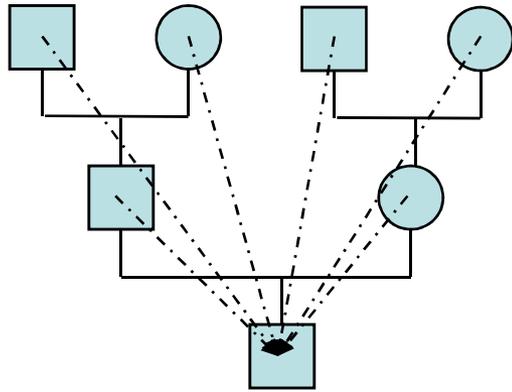


STR (TH01)

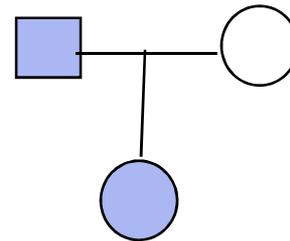
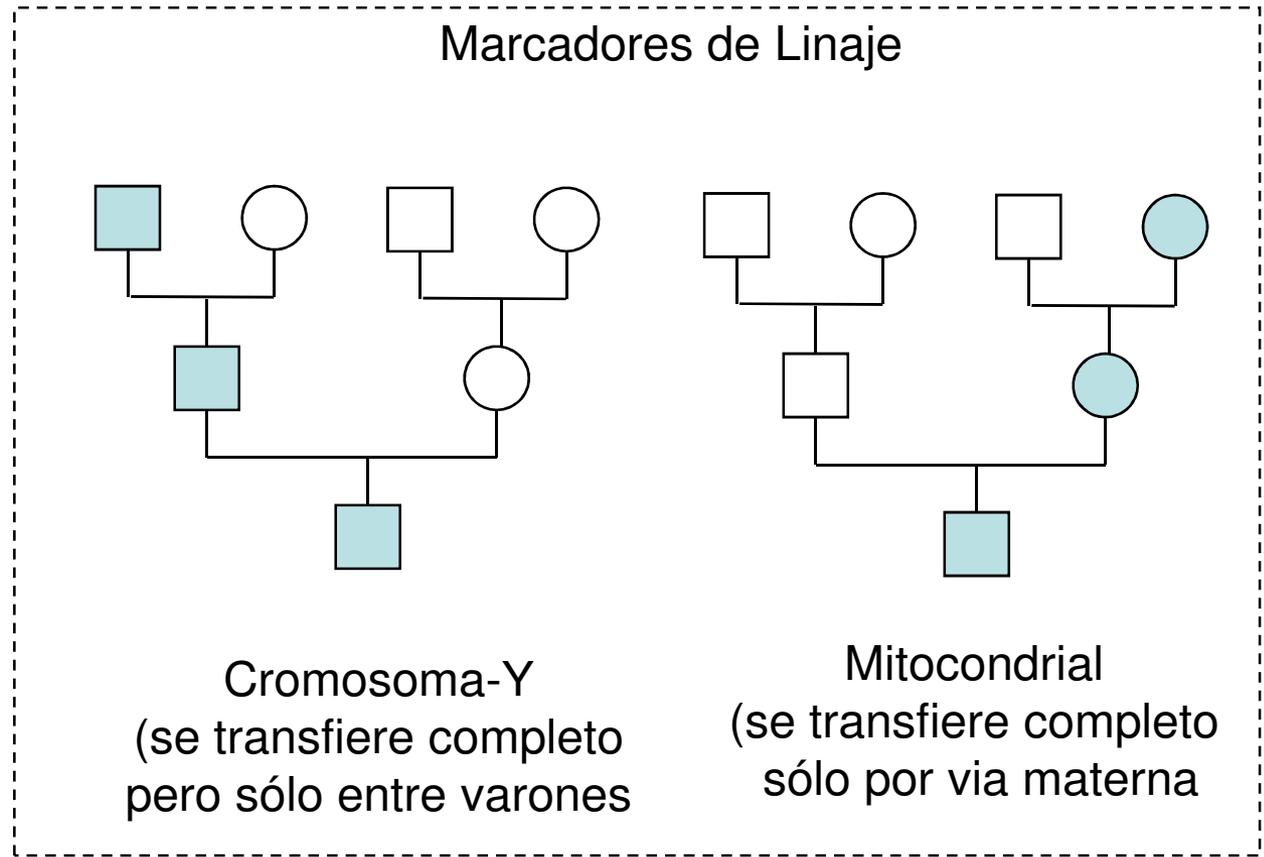


Polimorfismo de Longitud (STR) Unidad de Repetición Tetranucleótido



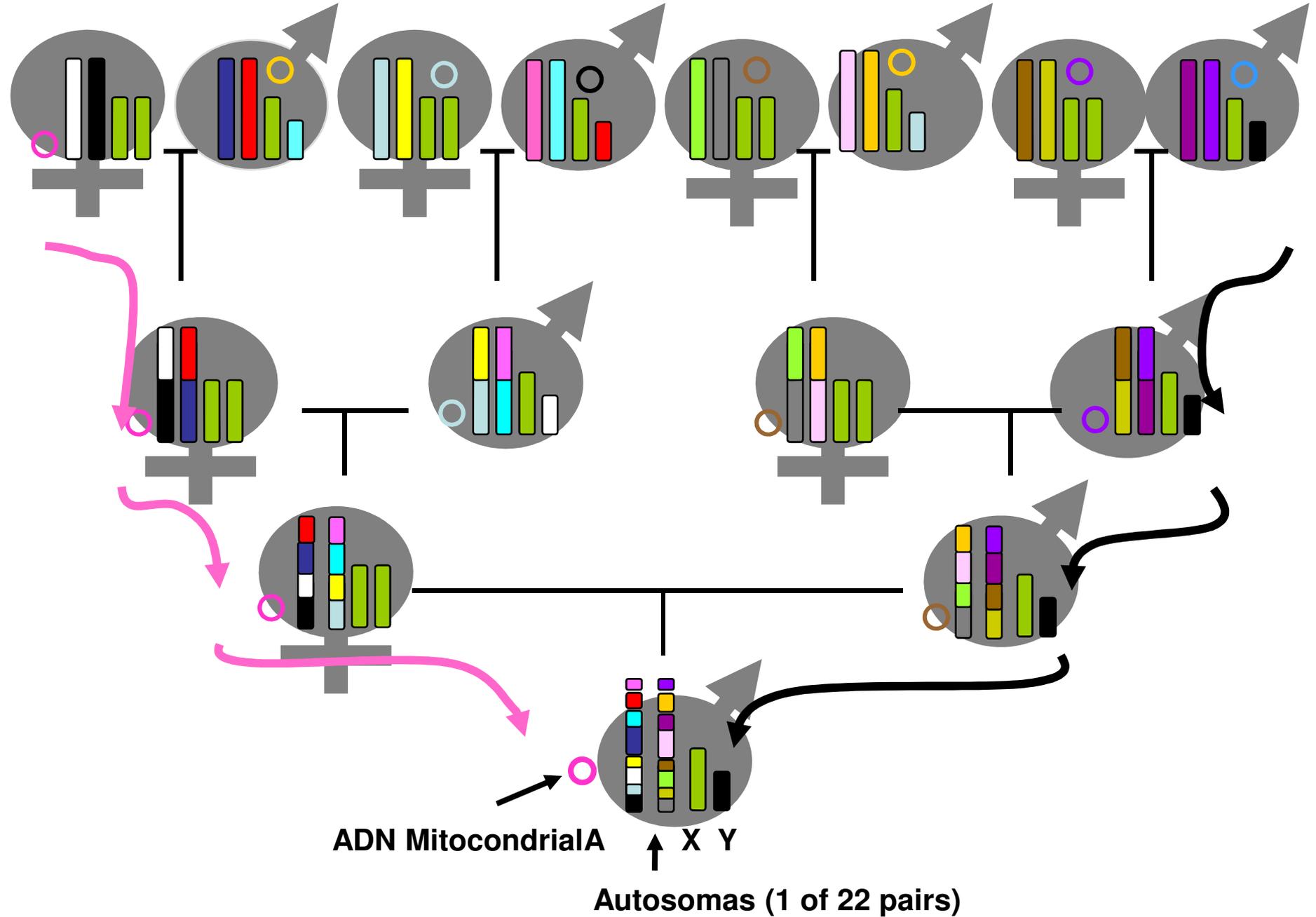


Autosomicos
(se transfiere, en parte desde los ancestros)

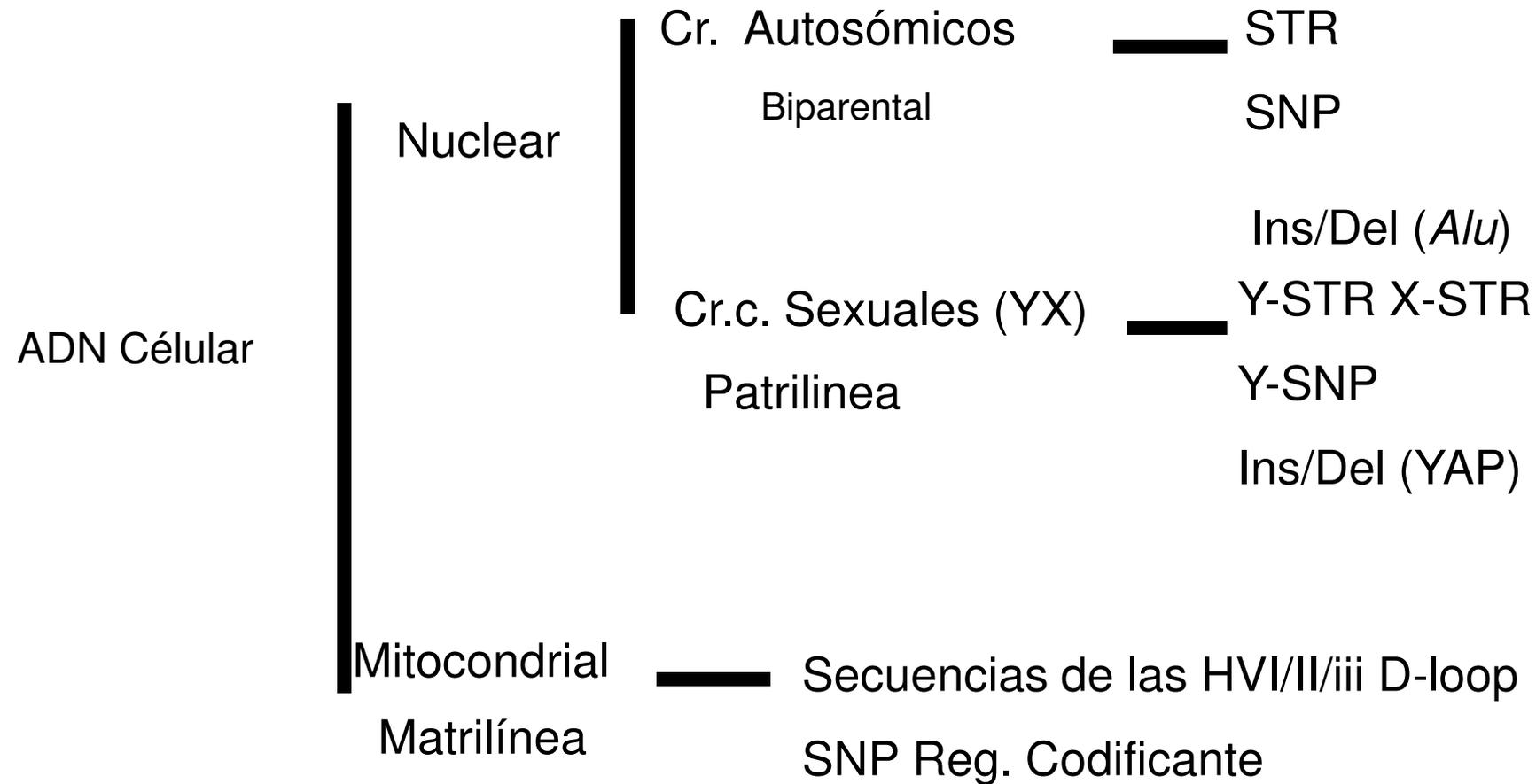


Cromosoma-X

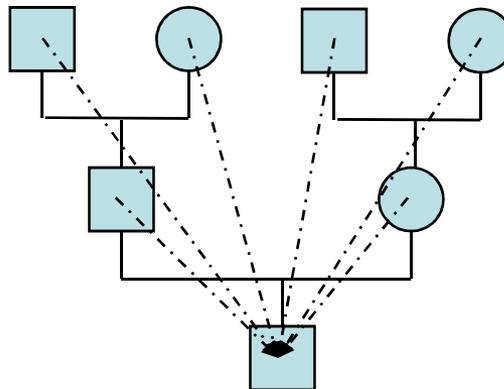
Modos de heredabilidad de los ADNs celulares



Marcadores Polimórficos en el ADN Celular

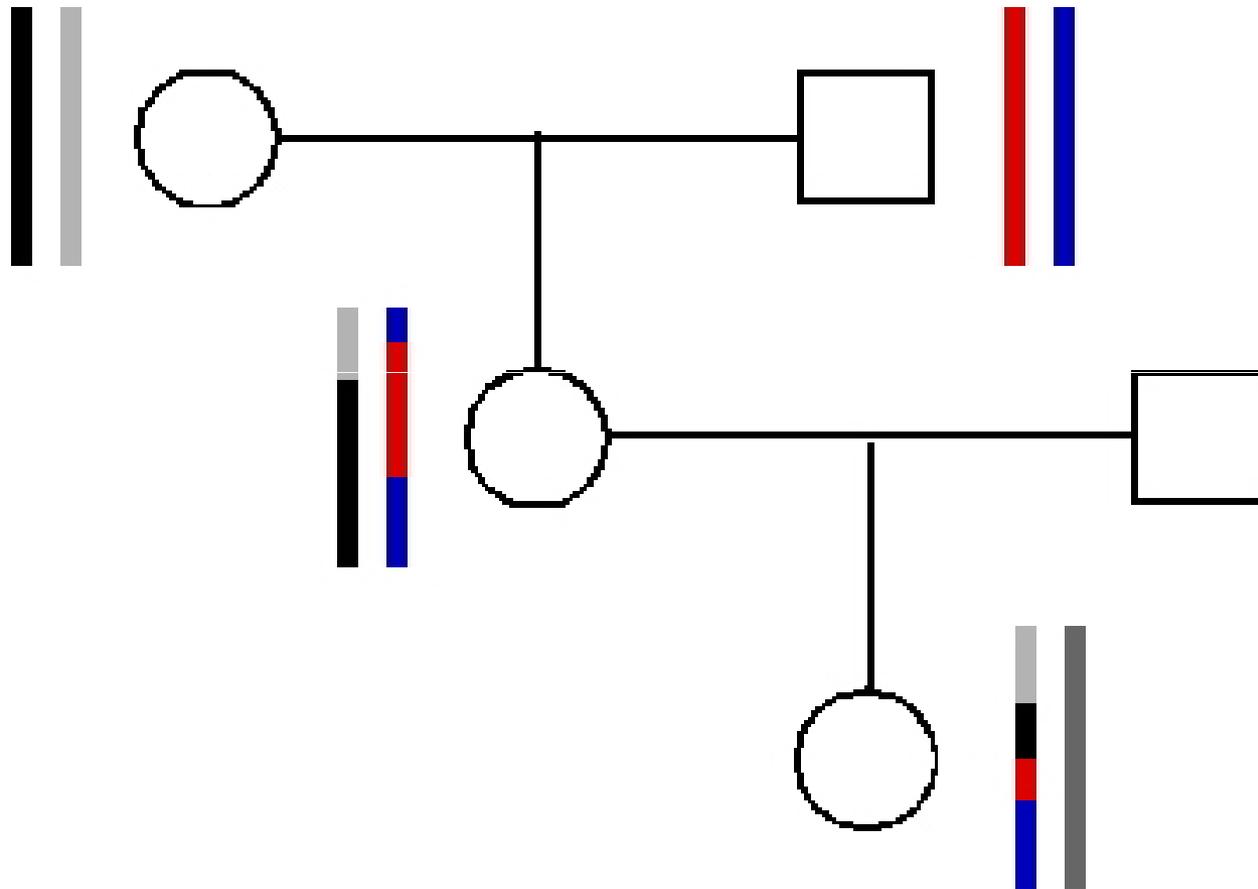


Cromosomas Autosómicos

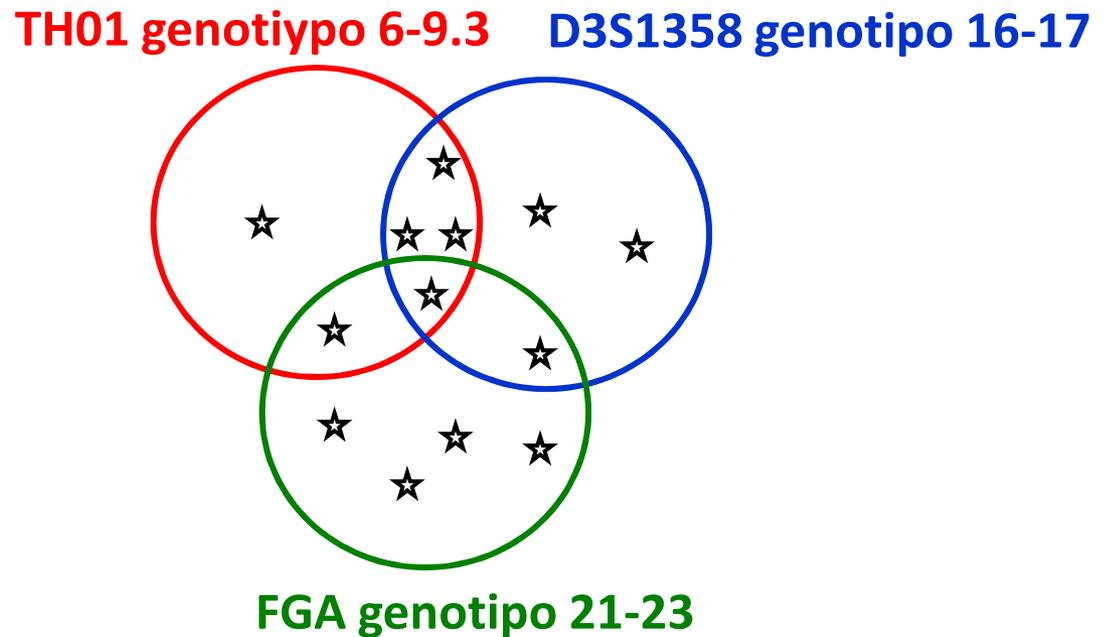


Se transfiere, en parte
desde los ancestros

La Meiosis Reordena los Cromosomas



El Poder
Discriminativo
Combinado se
incrementa
con el número
de loci
analizados



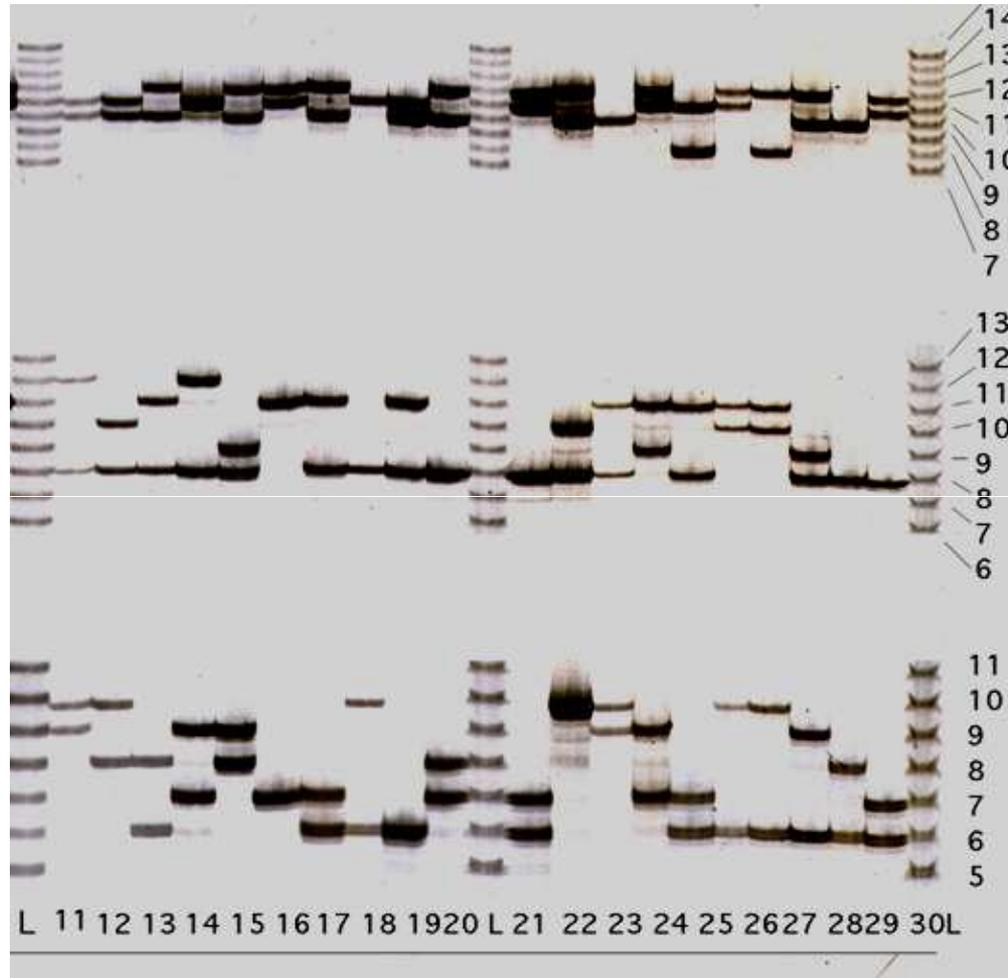
Sistemas de microsatélites (STRs) autosómico

Detección Argénticas

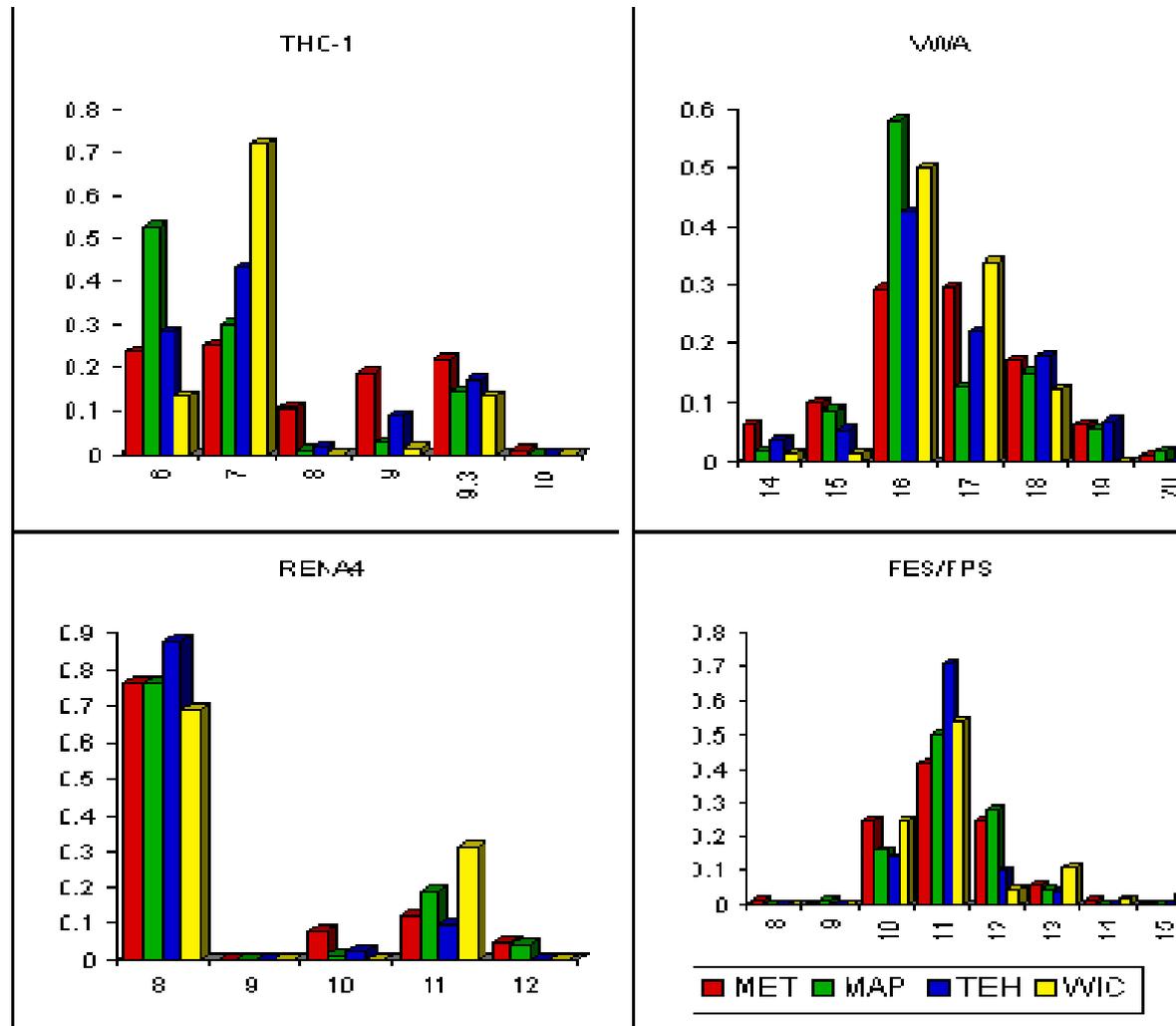
CSF1PO

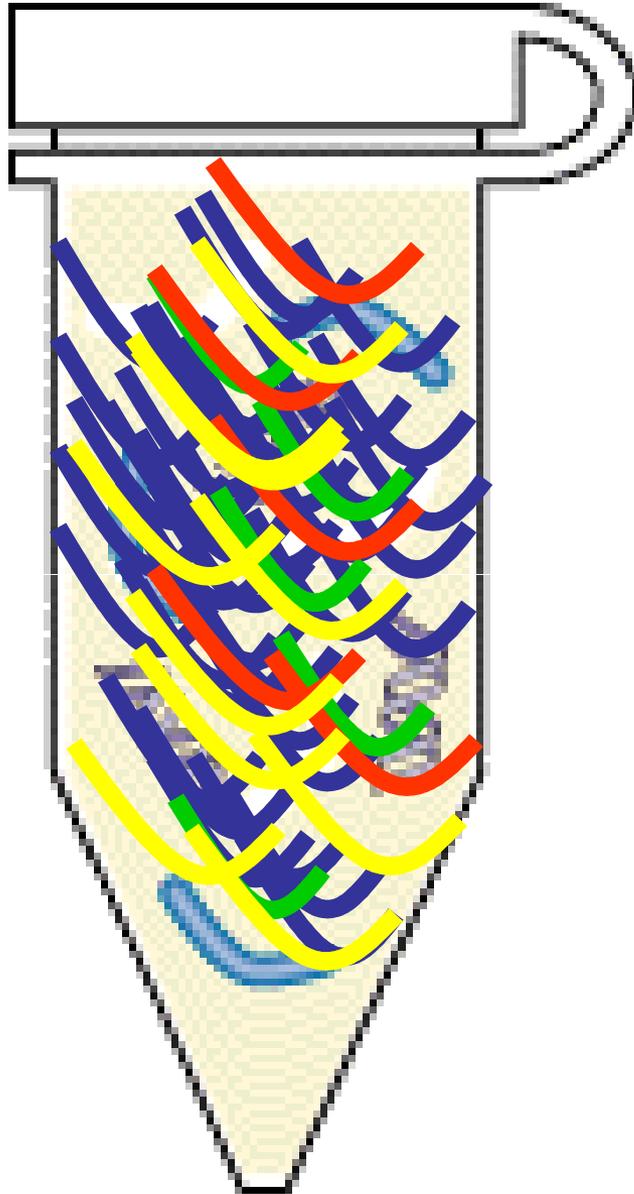
TPOX

THO-1



Distribución de las Frecuencias Alélicas de 4 STRs Autosómicos en 4 Comunidades.





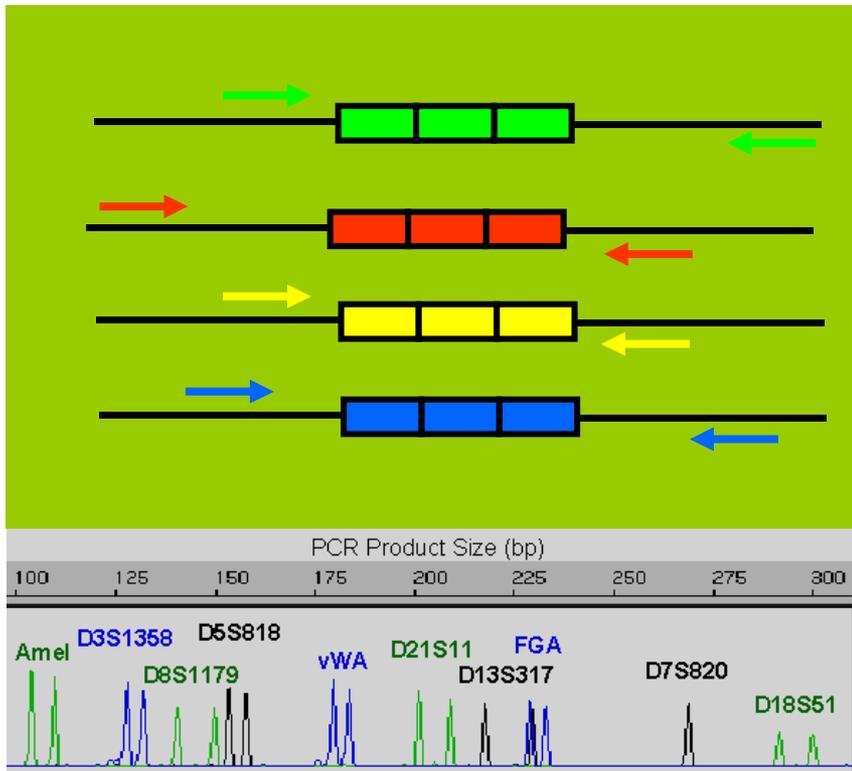
PCR Multiplex

- Se pueden copiar más de 20 marcadores a la vez
- Nivel de Sensitividad < 1 ng de DNA
- Permite analizar muestras mixtas y degradadas
- Se usan diferentes fluorocromos para distinguir alelos de STR de igual tamaño

Sucesión Evolutiva de los Marcadores de ADN Usados en Identificación Humana

- RFLP
 - Sondas de VNTR multilocus
 - Sondas de VNTR de Locus Unico (**^{32}P y quimioluminiscencia**)
- PCR
 - DQ-alfa (**dot-blot reverso**)
 - PolyMarker (**PCR 6 plex; puntos para SNPs**)
 - D1S80 (**AMP-FLPs**)
 - STRs uniplex con tinción argéntica
 - STRs multiplex con colorantes fluorescentes

PCR Multiplex (Procesamiento Paralelo de Muestras)



- **Primers compatibles son la clave para una reacción multiplex exitosa**
- **15 o más STR loci pueden ser amplificados en forma simultánea**
- **Kits de STR multiplex están comercialmente disponibles**

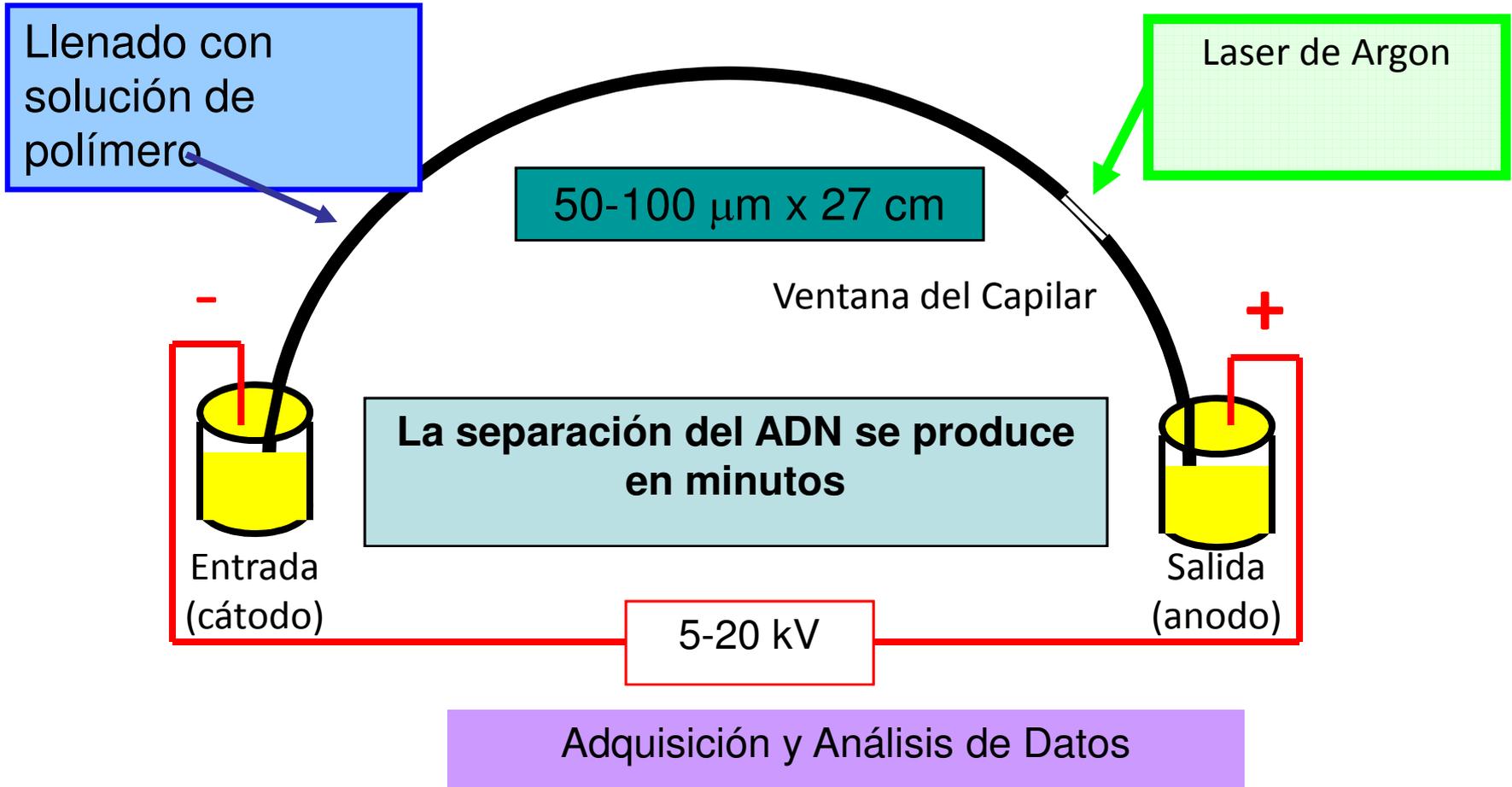
Desafíos de la PCR Multiplex

- Diseño de primers para obtener combinaciones compatibles (no existen programas)
- Optimización de la reacciones empírica requiere meses.

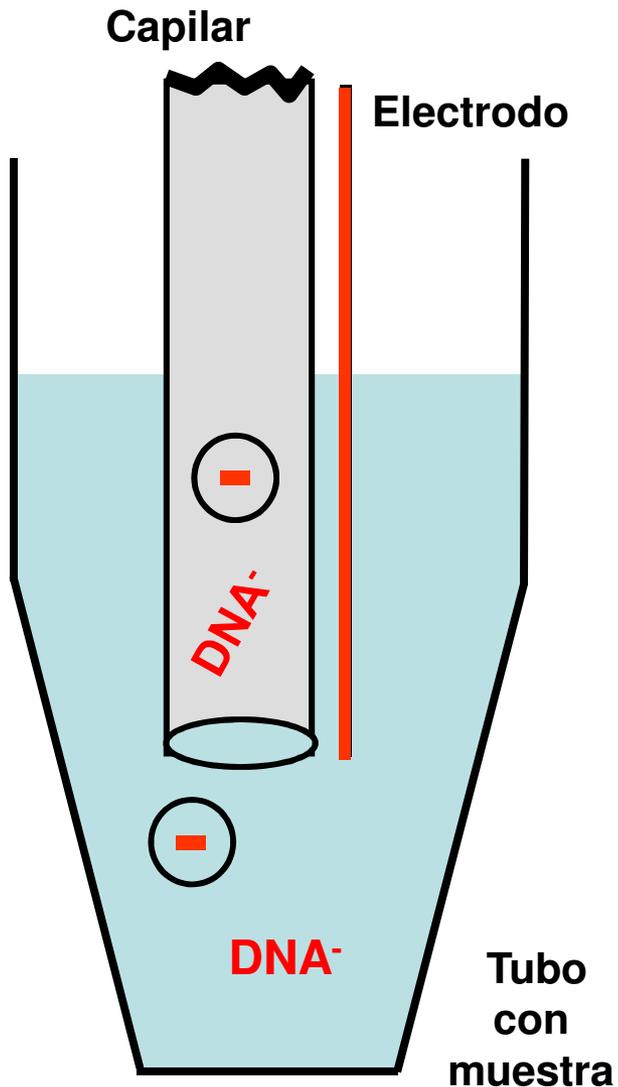
Ventajas de la PCR Multiplex

- Incrementar la información obtenida por unidad de tiempo (incrementa el poder discriminativo)
- Reduce el trabajo para obtener resultados.
- Reduce la cantidad de templado (se reduce el consumo de muestra)

Electroforésis Capilar (CE)



Proceso de Inyección Electrocinética



$$Q = \frac{\pi r^2 c_s (\mu_{ep} + \mu_{eo}) E t \lambda_b}{\lambda_s}$$

Q es la cantidad de muestra inyectada

r es el radio del capilar

c_s es la concentración de la muestra

E es el campo eléctrico aplicado

t es el tiempo de inyección

λ_s es la conductividad de la muestra

λ_b es la conductividad del buffer

μ_{ep} es la movilidad de las moléculas de la muestra

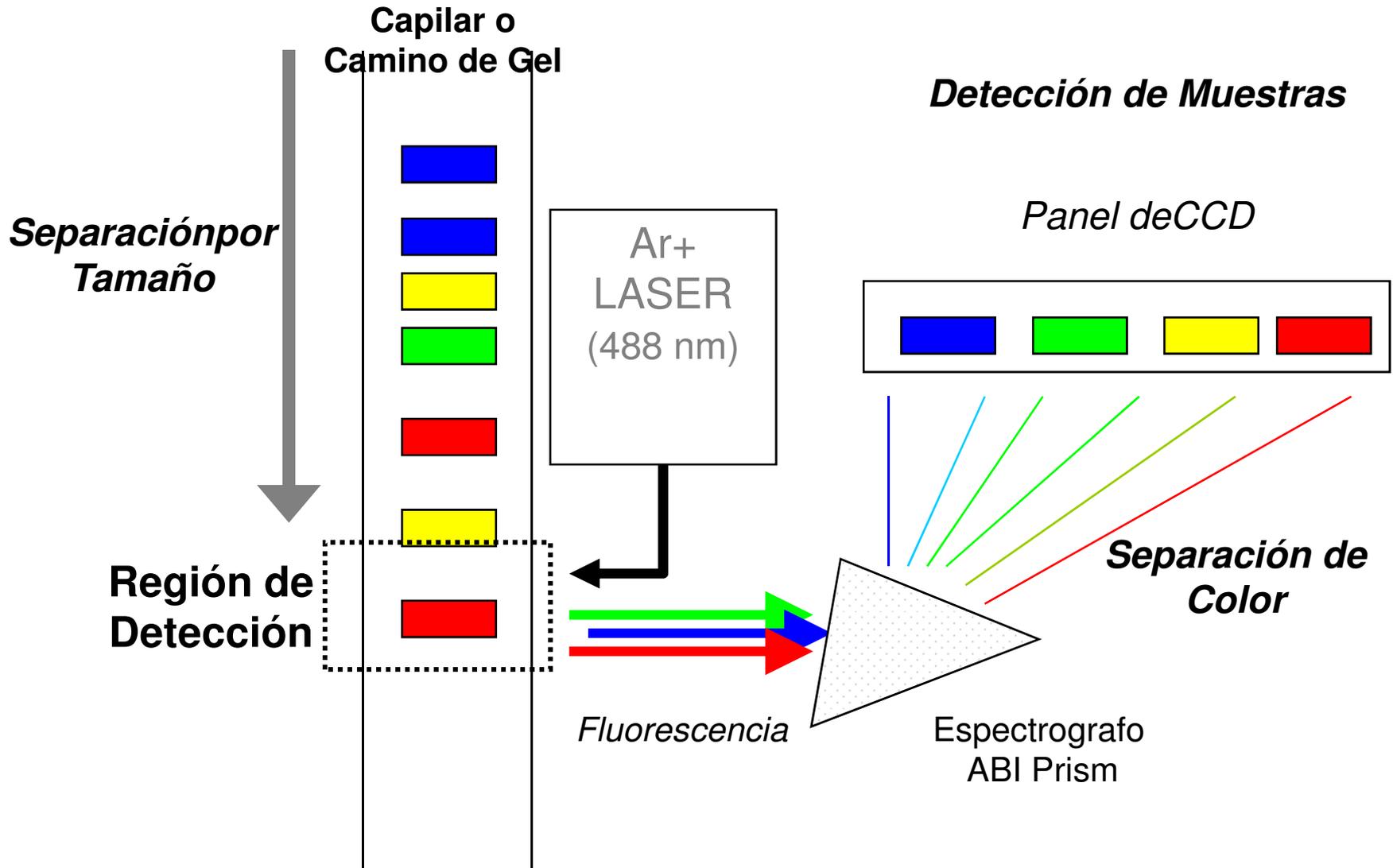
μ_{eo} es la movilidad electroosmótica

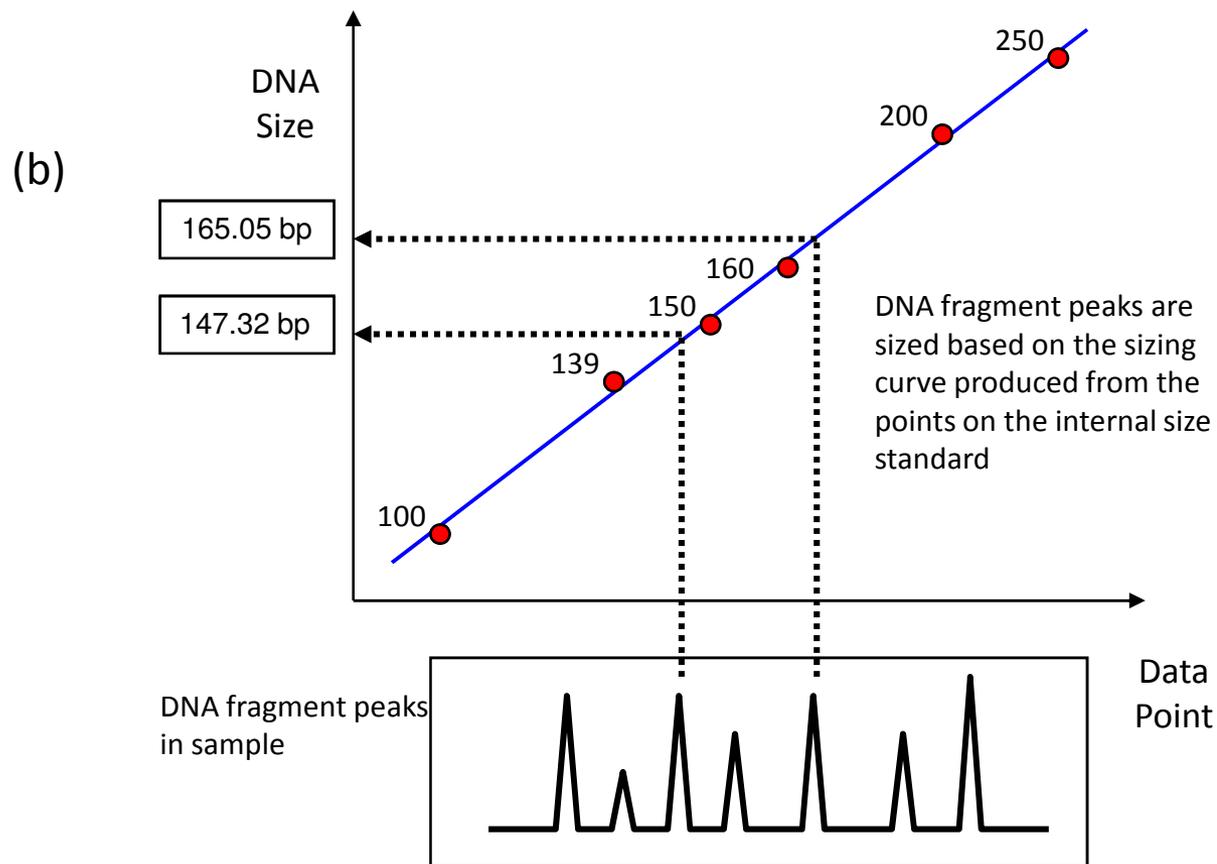
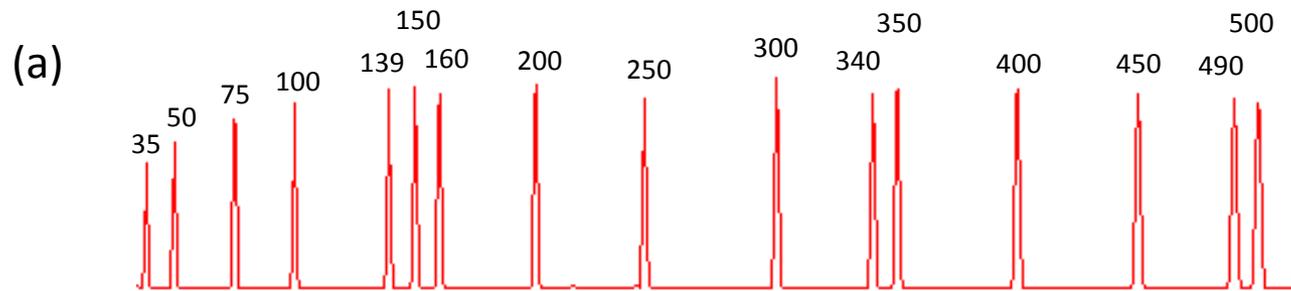
Sistemas Automatizados

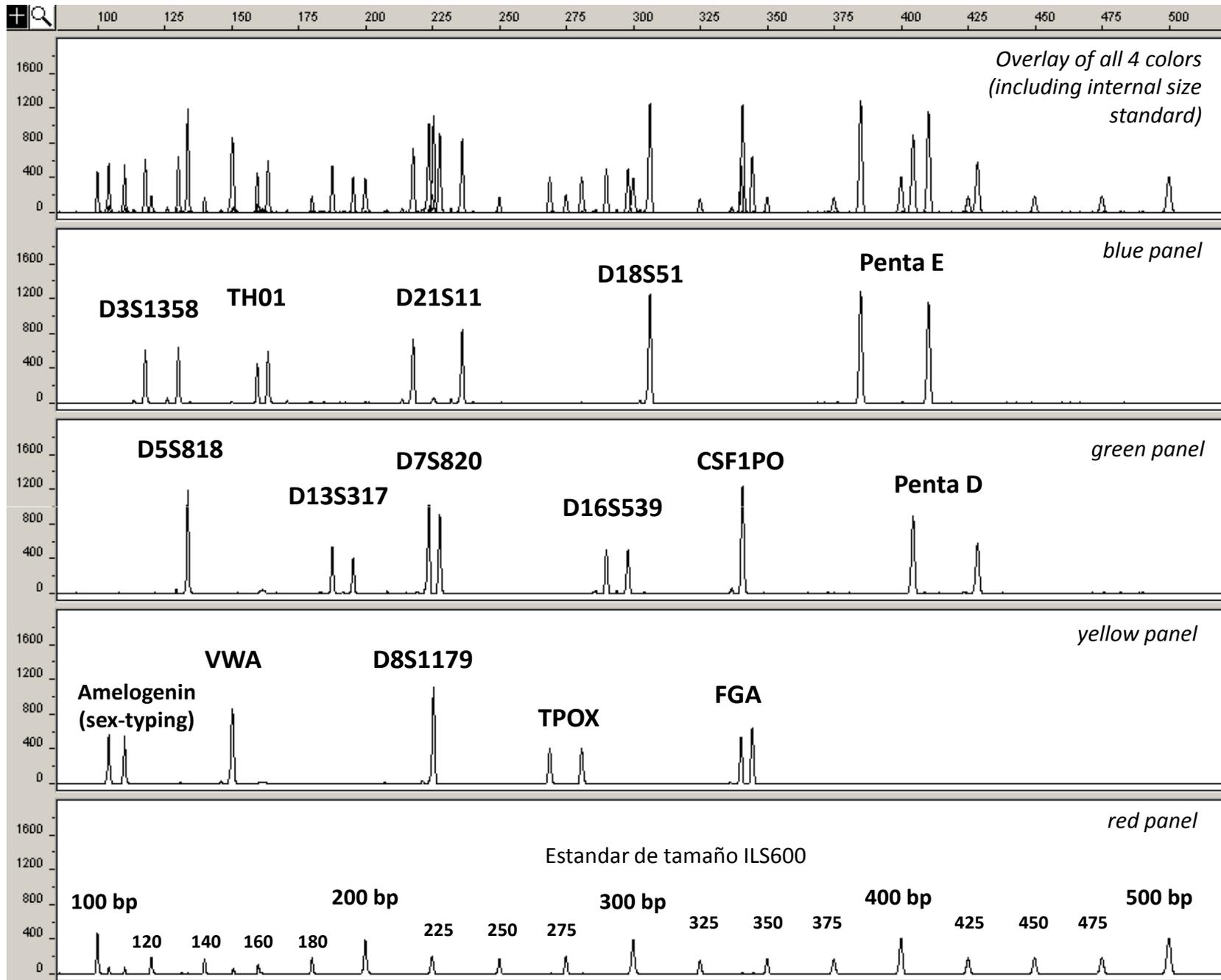


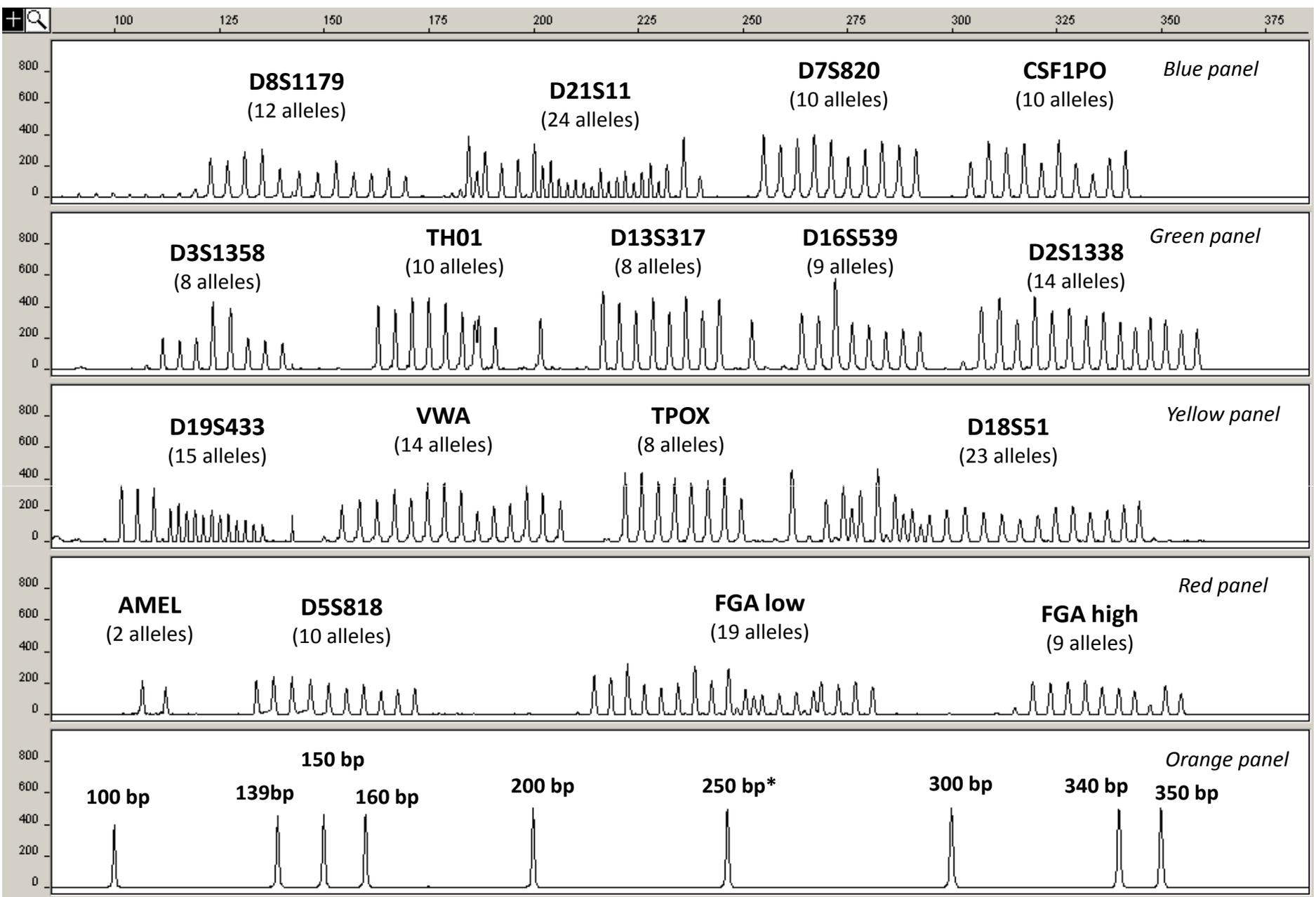
Fragmentos de ADN Marcados (productos de PCR)

Principios de Separación y Detección de Muestras







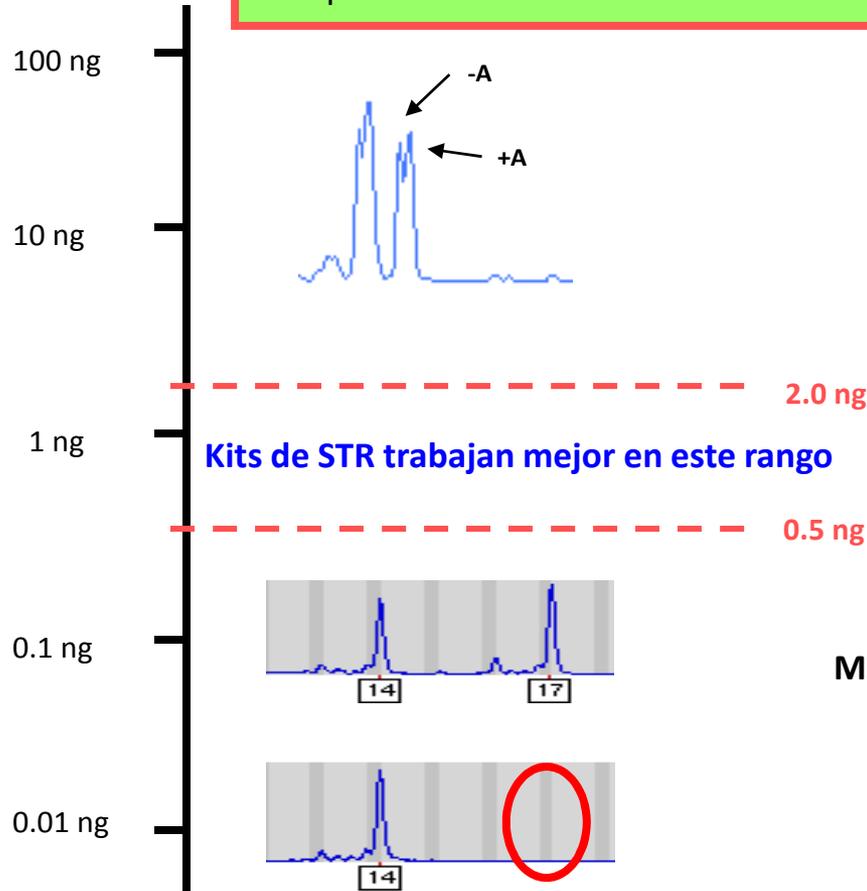


LIZ-labeled GS500 DNA sizing standard

Importancia de la Cuantificación de DNA

(Previo a la PCR multiplex)

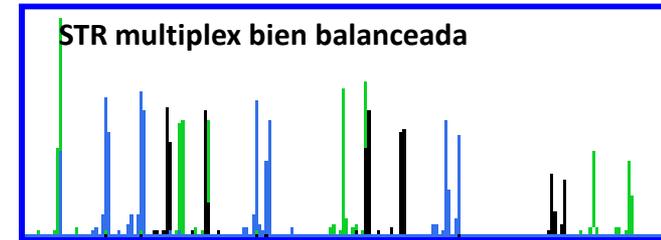
Cantidad de DNA
(escala log)



La concentración de ADN genera problemas de interpretación

Demasiado ADN

- Picos fuera de escala
- Picos partidos(+/-A)
- Imbalance de Locus a locus



Muy poco ADN

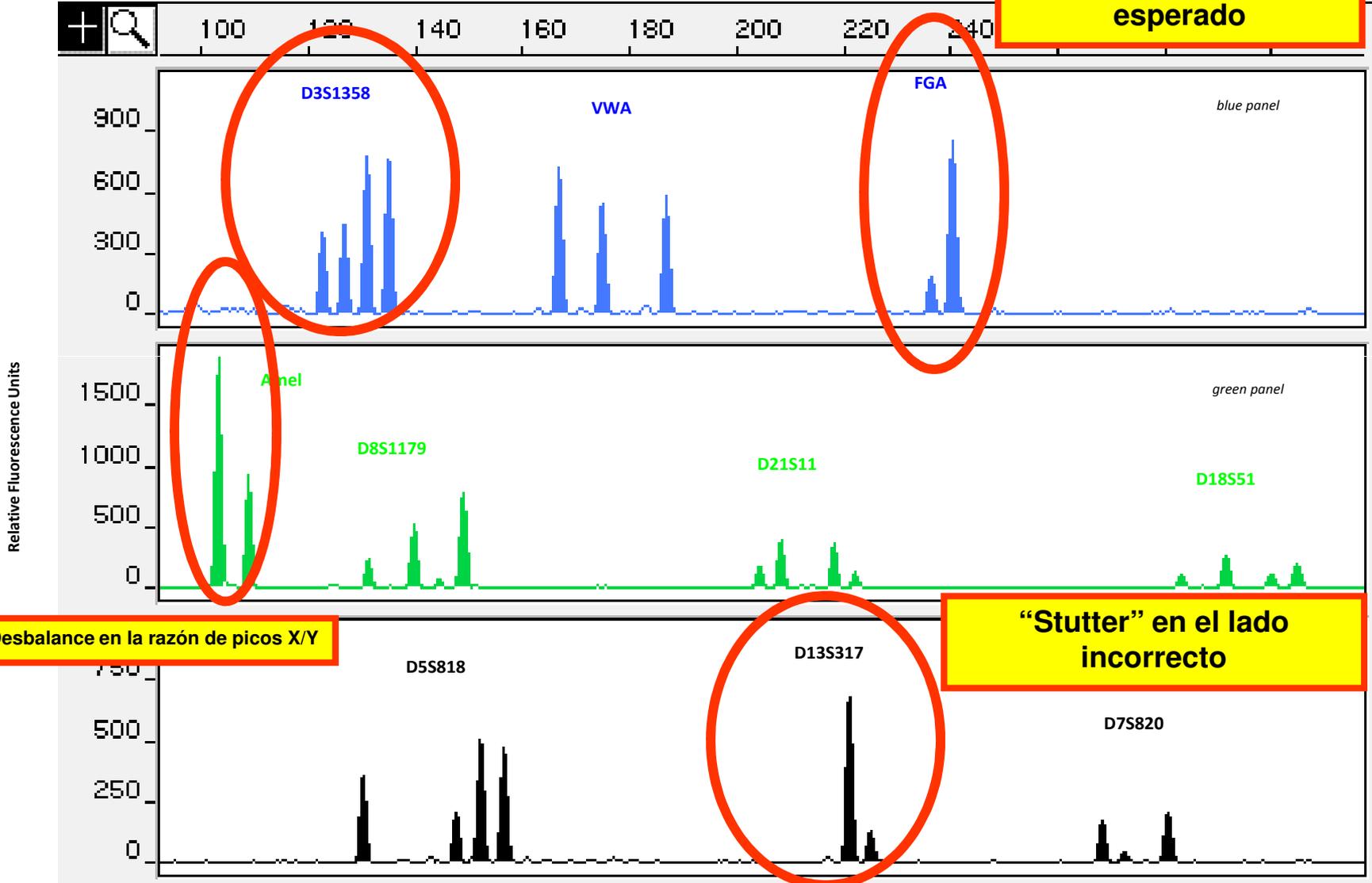
- Desbalance de picos heterocigotas.
- Perdiada alelica
- Imbalance de locus a locus

Efectos estocásticos determinan alelos nulos al amplificar bajas concentraciones de ADN

Ejemplo de Muestra Mezclada^a

4 picos en un locus

Hombro más alto de lo esperado

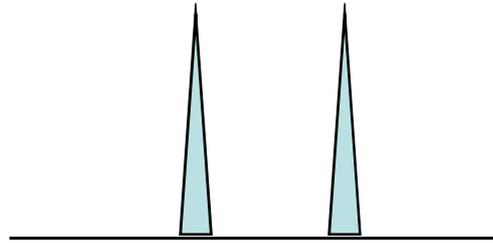


Desbalance en la razón de picos X/Y

“Stutter” en el lado incorrecto

Performance de Mezclas Mujer-Hombre con Marcadores Autosómicos vs de. Cromosoma Y

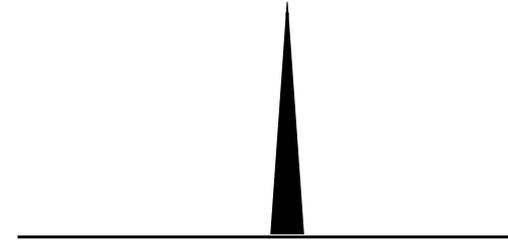
Perfil de ADN de la Víctima



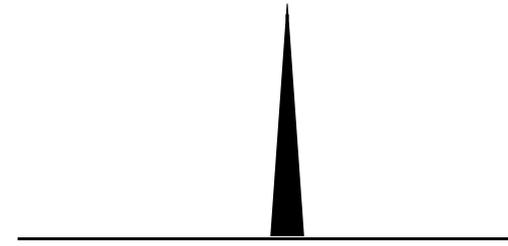
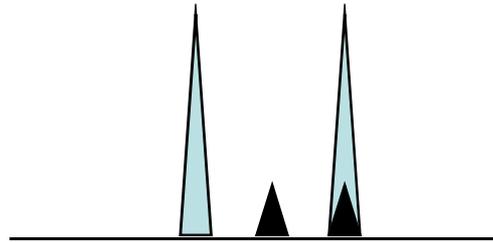
No se observa señal



Perfil genético del Perpetrador



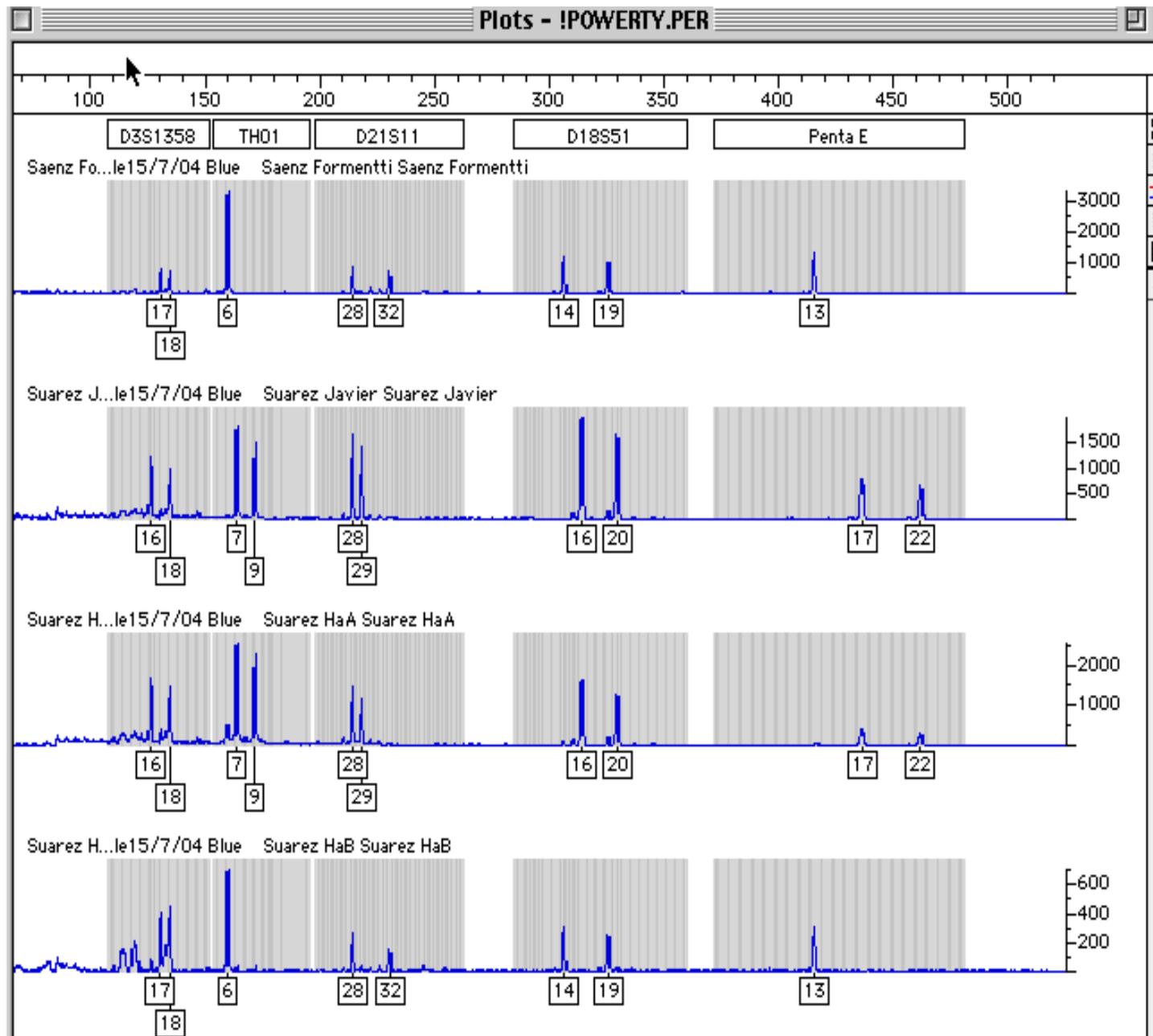
Perfil de ADN Dde una muestra de la escena del crimen



Perfil de STRs Autosómicos

Perfil de Y-STRs

VIOLACION HOMBRE/HOMBRE



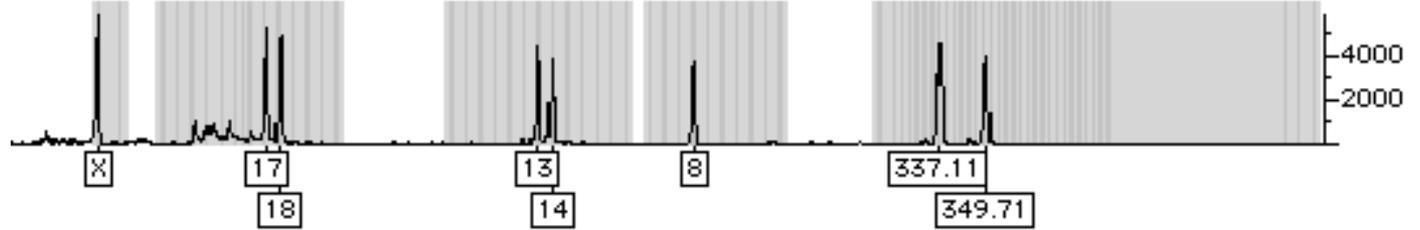
VIOLACION HOMBRE/MUJER

0 100 120 140 160 180 200 220 240 260 280 300 320 340 360 380 400 420 440

vWA D8S1179 TPOX FGA

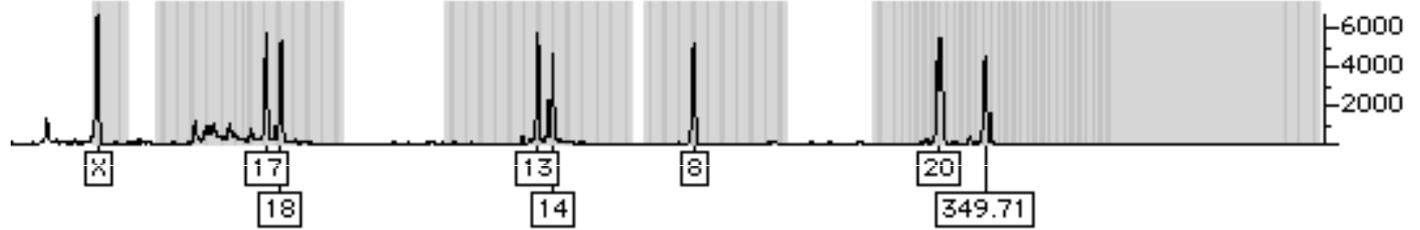
1...le17/7/04 Yellow OGAS ROMINA OGAS ROMINA

VMA



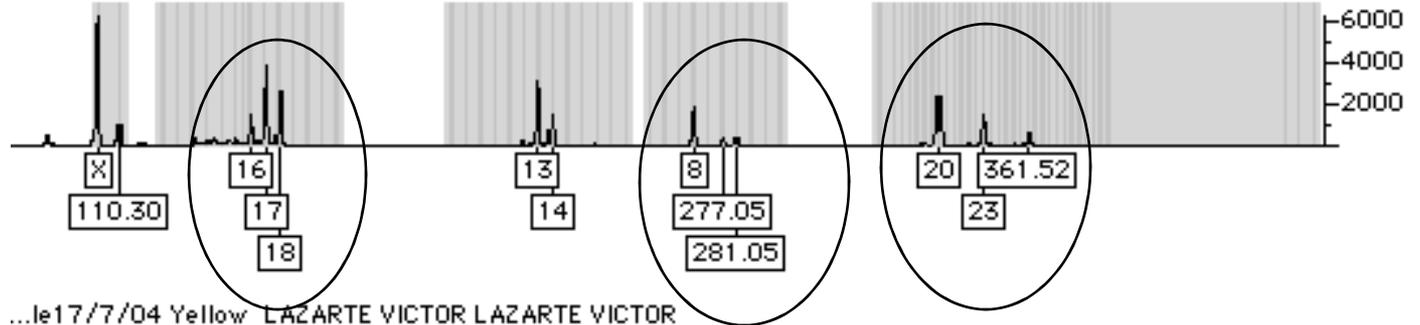
...le17/7/04 Yellow LAZARTE HvA LAZARTE HvA

HvA



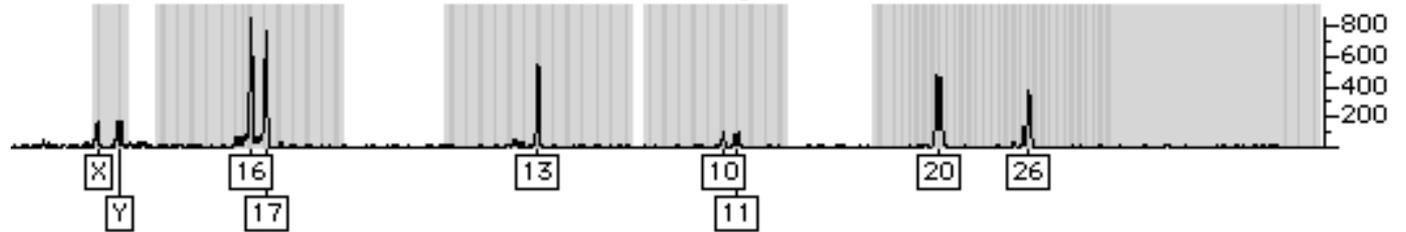
...le17/7/04 Yellow LAZARTE HvB LAZARTE HvB

HvB



...le17/7/04 Yellow LAZARTE VICTOR LAZARTE VICTOR

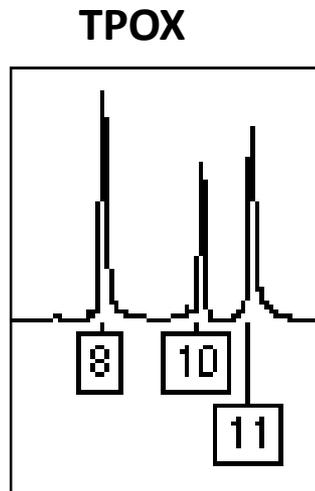
S



Posibles Alteraciones de los Perfiles Genéticos

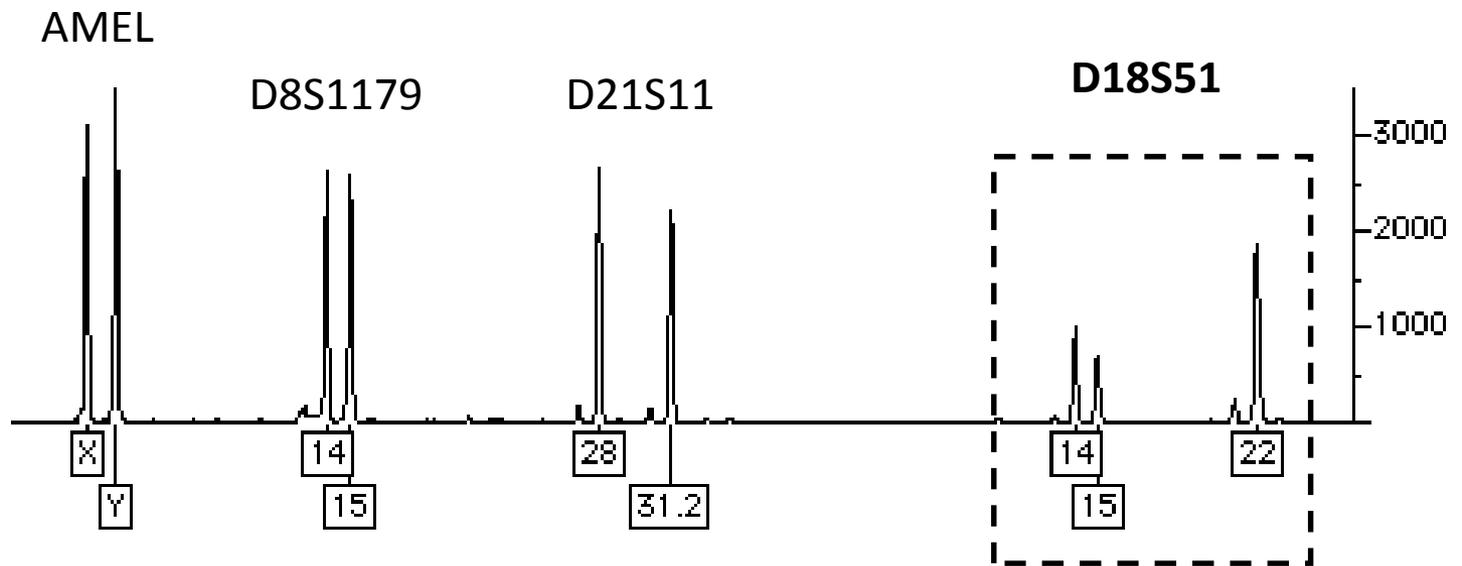
- Mutaciones
 - Mutación producida en la línea germinal de uno de los progenitores (padre o madre)
 - Mutación preexistente en uno de los progenitores que se transfiere a la descendencia.
- Procesos degradativos
 - Artificios producidos por la degradación
 - Por la baja concentración de ADN.

(A)

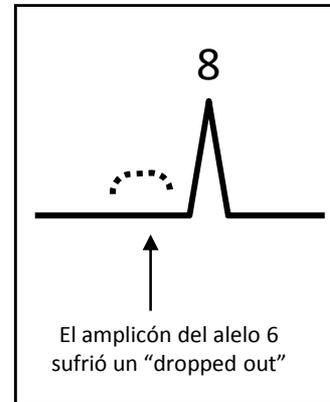
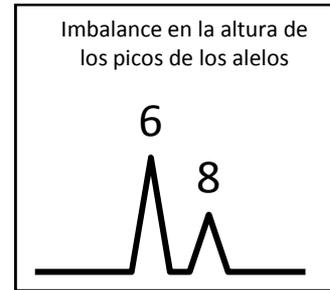
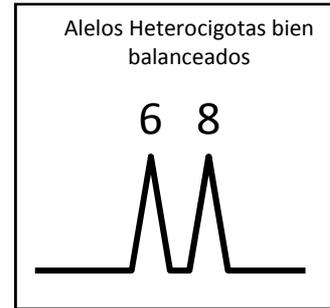
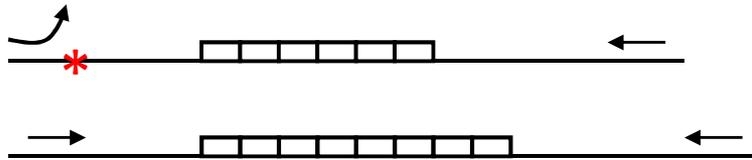
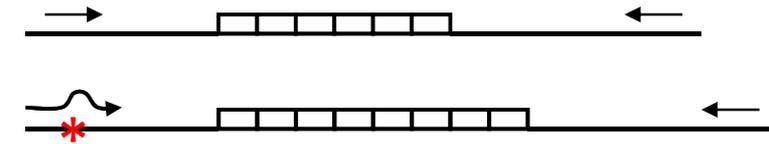
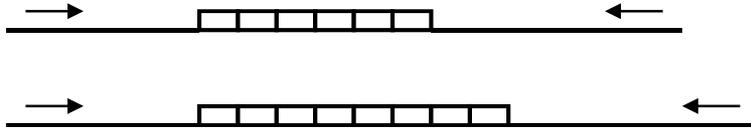


Mutaciones

(B)

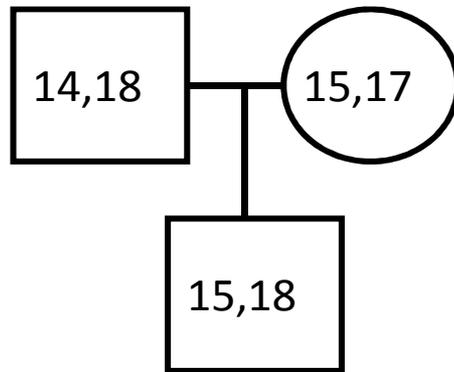


Mutaciones

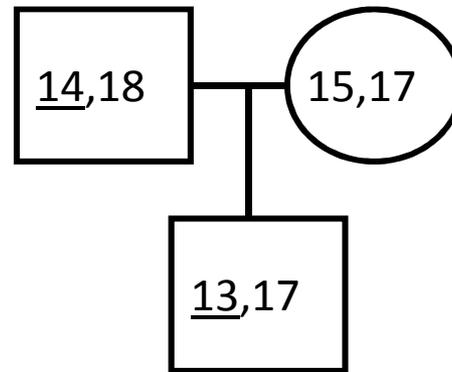


Mutaciones

(a)



(b)

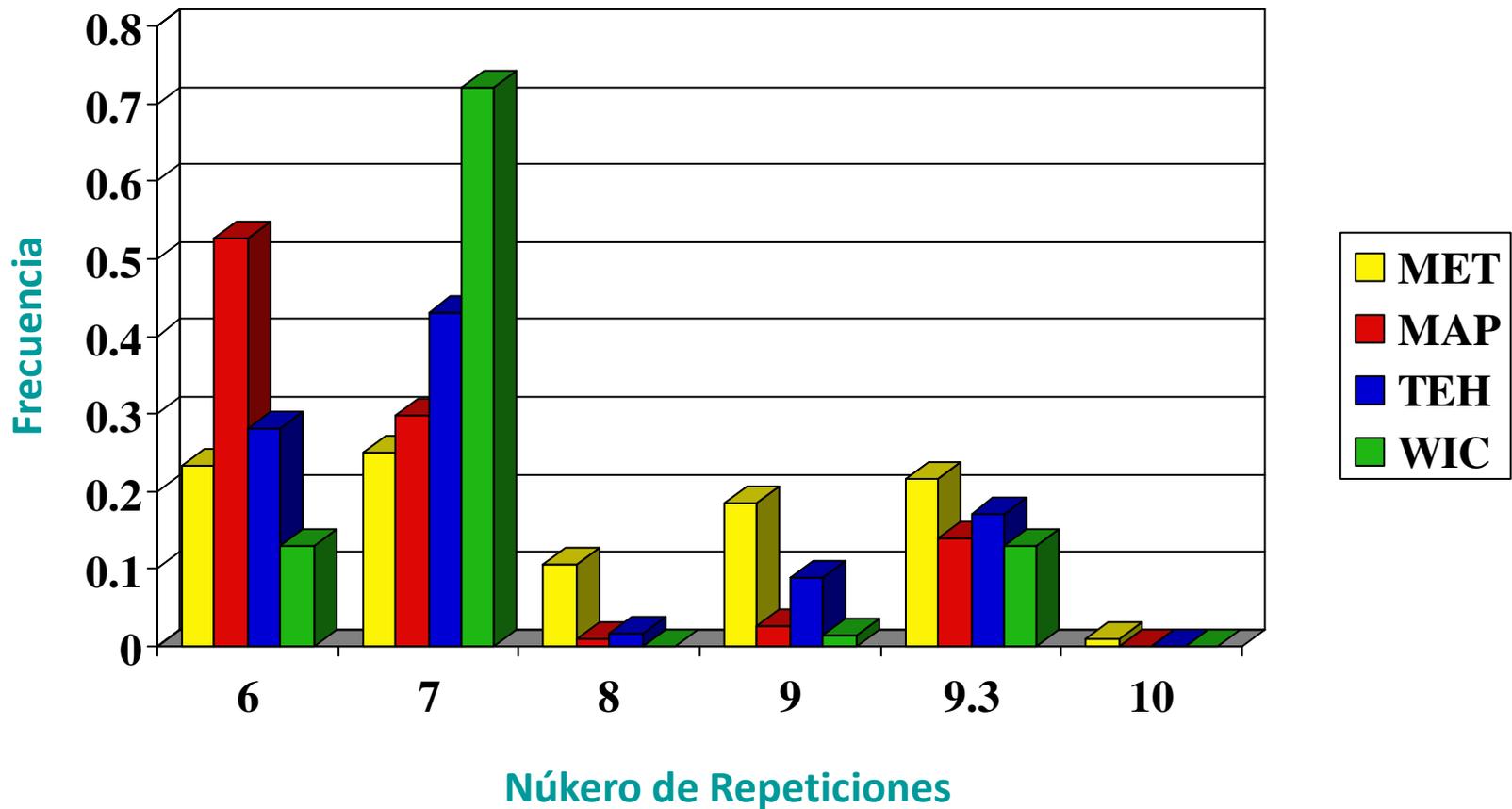


Tasas de Mutación para STRs de Uso Forense

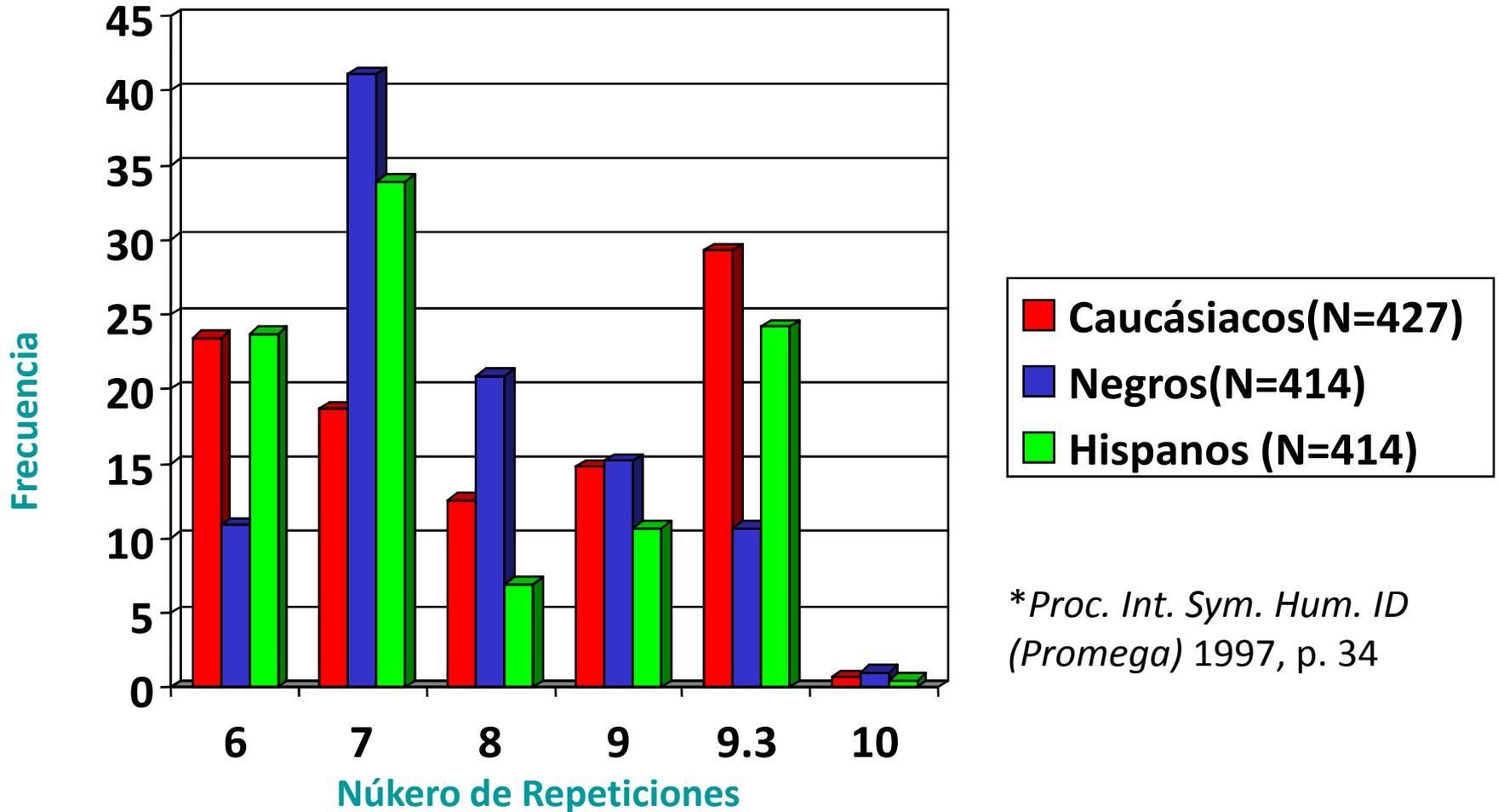
[http://www.aabb.org/About the AABB/Std%20and_Accred/ptannrpt03.pdf](http://www.aabb.org/About_the_AABB/Std%20and_Accred/ptannrpt03.pdf), Appendix 2

STR System	Maternal Meioses (%)	Paternal Meioses (%)	Number from either	Total Number of Mutations	Mutation Rate
CSF1PO	95/304,307 (0.03)	982/643,118 (0.15)	410	1,487/947,425	0.16%
FGA	205/408,230 (0.05)	2,210/692,776 (0.32)	710	3,125/1,101,006	0.28%
TH01	31/327,172 (0.009)	41/452,382 (0.009)	28	100/779,554	0.01%
TPOX	18/400,061 (0.004)	54/457,420 (0.012)	28	100/857,481	0.01%
VWA	184/564,398 (0.03)	1,482/873,547 (0.17)	814	2,480/1,437,945	0.17%
D3S1358	60/405,452 (0.015)	713/558,836 (0.13)	379	1,152/964,288	0.12%
D5S818	111/451,736 (0.025)	763/655,603 (0.12)	385	1,259/1,107,339	0.11%
D7S820	59/440,562 (0.013)	745/644,743 (0.12)	285	1,089/1,085,305	0.10%
D8S1179	96/409,869 (0.02)	779/489,968 (0.16)	364	1,239/899,837	0.14%
D13S317	192/482,136 (0.04)	881/621,146 (0.14)	485	1,558/1,103,282	0.14%
D16S539	129/467,774 (0.03)	540/494,465 (0.11)	372	1,041/962,239	0.11%
D18S51	186/296,244 (0.06)	1,094/494,098 (0.22)	466	1,746/790,342	0.22%
D21S11	464/435,388 (0.11)	772/526,708 (0.15)	580	1,816/962,096	0.19%
Penta D	12/18,701 (0.06)	21/22,501 (0.09)	24	57/41,202	0.14%
Penta E	29/44,311 (0.065)	75/55,719 (0.135)	59	163/100,030	0.16%
D2S1338	15/72,830 (0.021)	157/152,310 (0.10)	90	262/225,140	0.12%
D19S433	38/70,001 (0.05)	78/103,489 (0.075)	71	187/173,490	0.11%
SE33 (ACTBP2)	0/330 (<0.30)	330/51,610 (0.64)	None reported	330/51,940	0.64%

Distribución de Frecuencias Alélicas
Población Argentina
Marcador: HUMTHO-1

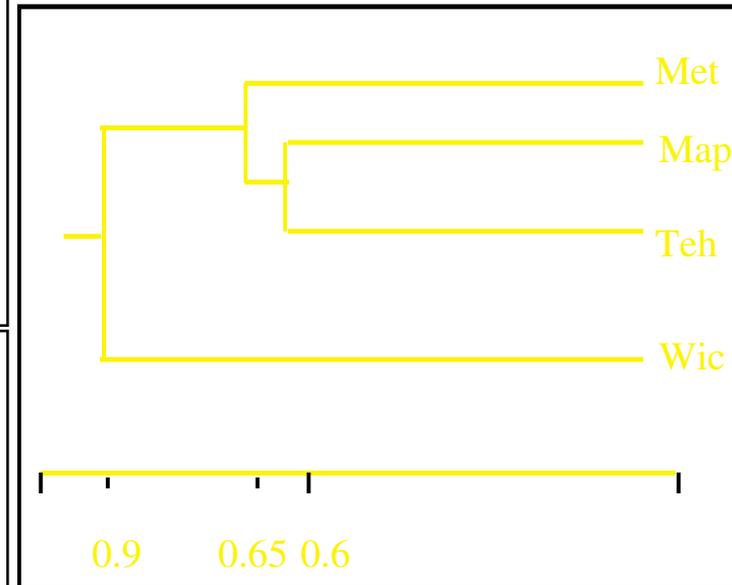
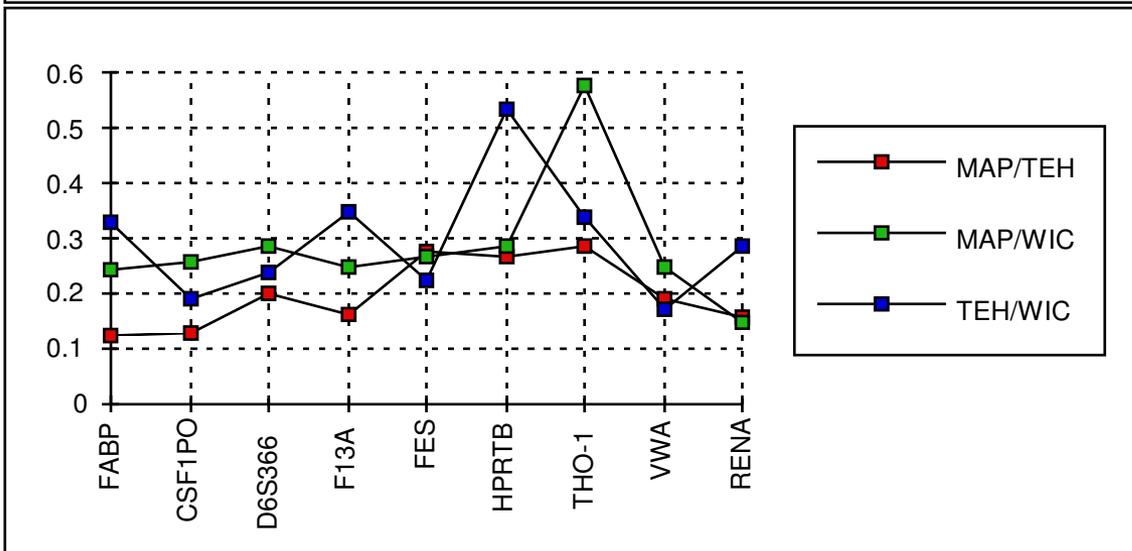
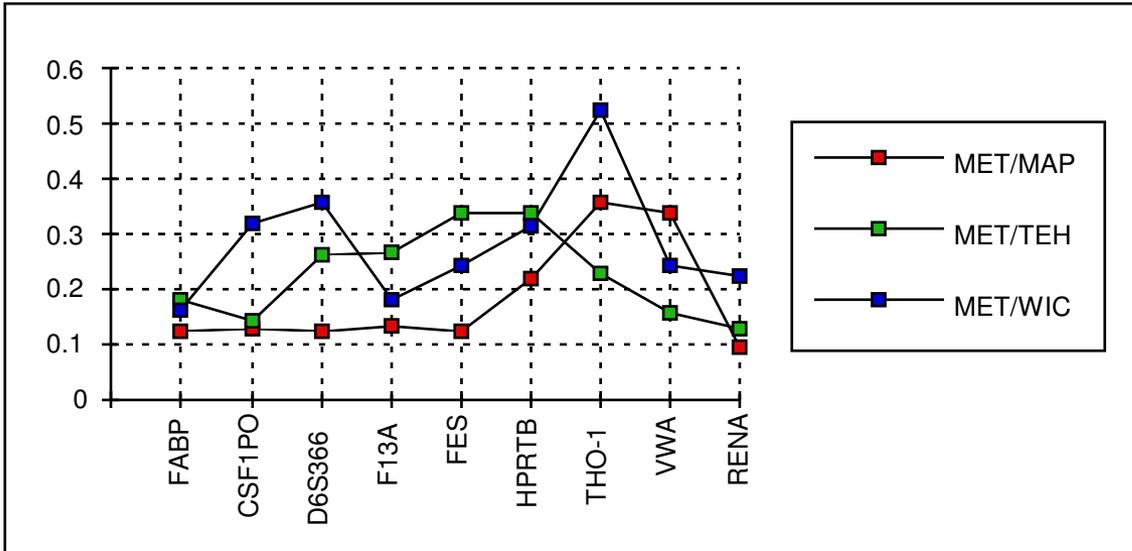


*Distribución de Frecuencias Alélicas
Población de Estados Unidos de América
Marcador: HUMTHO-1*



**Proc. Int. Sym. Hum. ID
(Promega) 1997, p. 34*

Interpopulation Comparison.



**Genetic Distance
(UPGMA)**