

Maestría de Medicina Molecular  
Curso de Genética molecular Forense

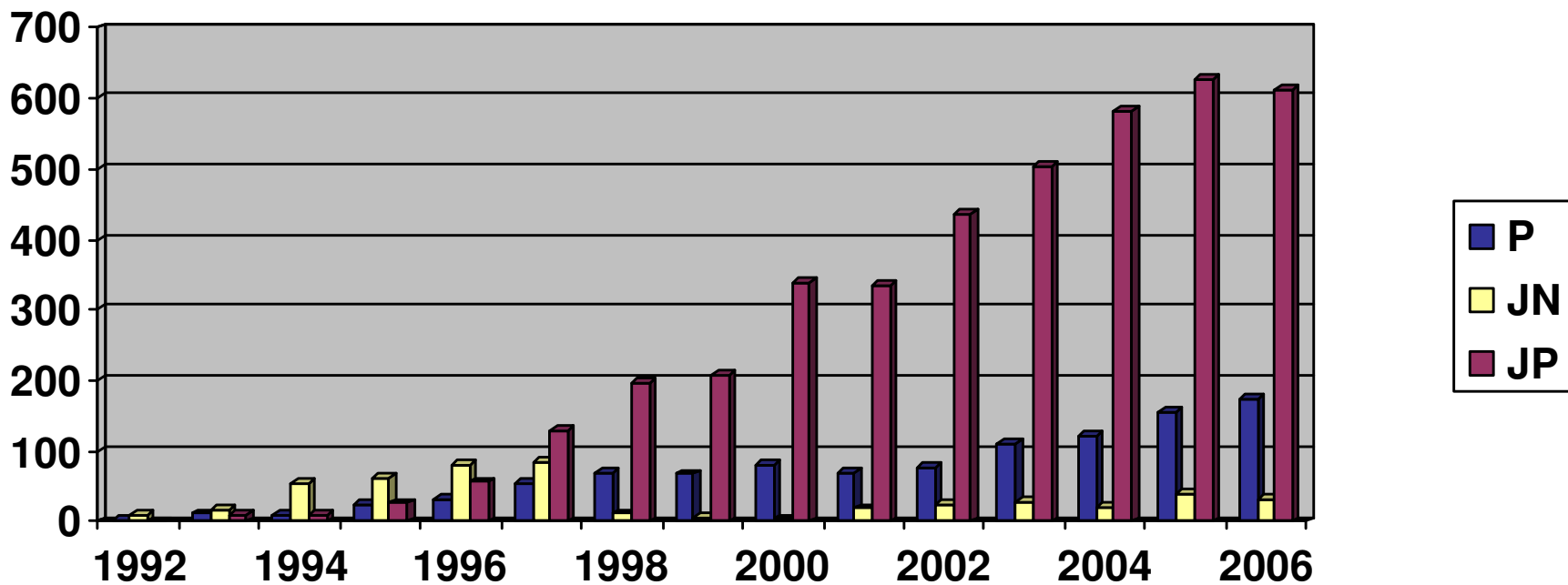
21 DE JUNIO de 2008  
Instituto Leloir

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

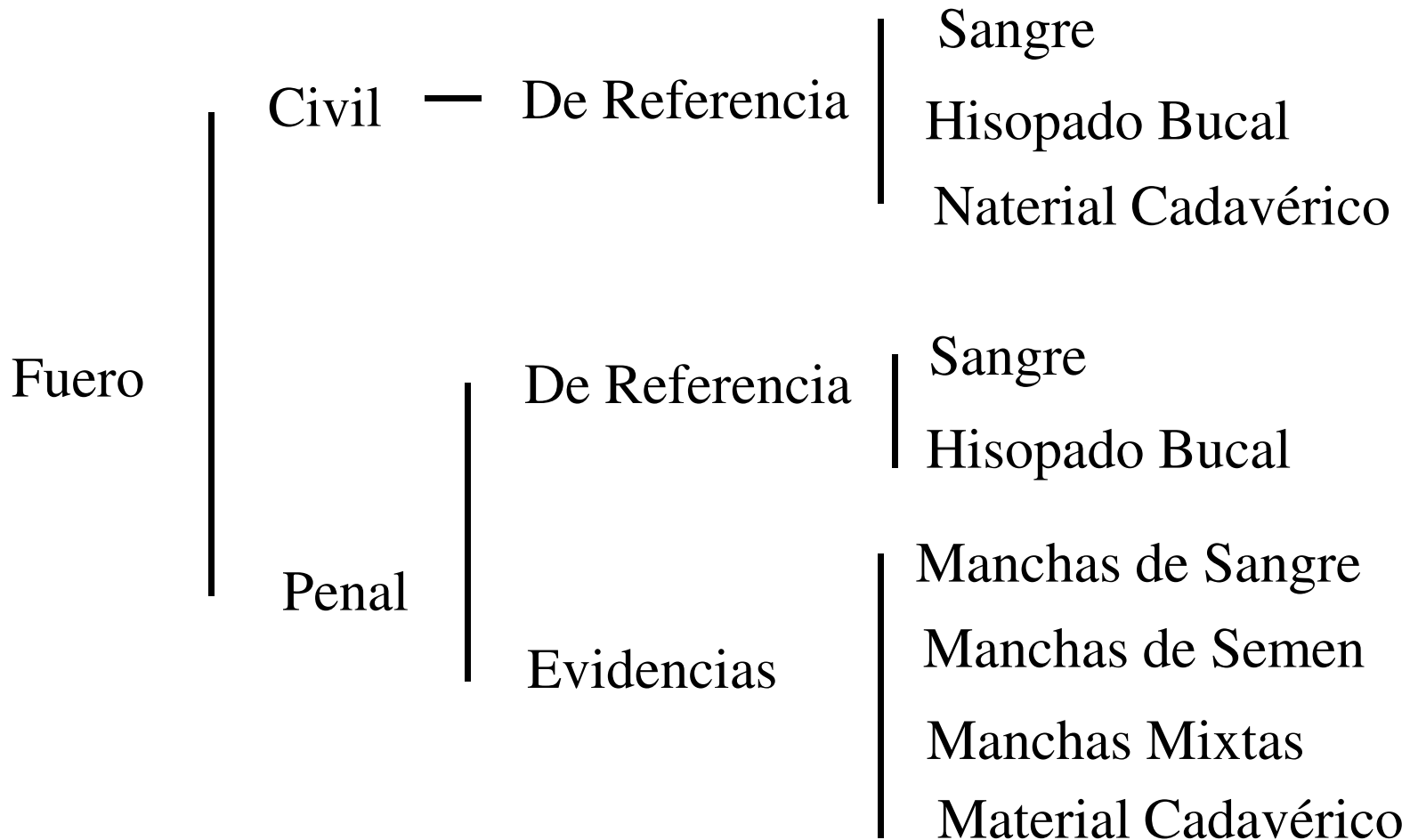
Derecho Civil y Penal

Criminalística

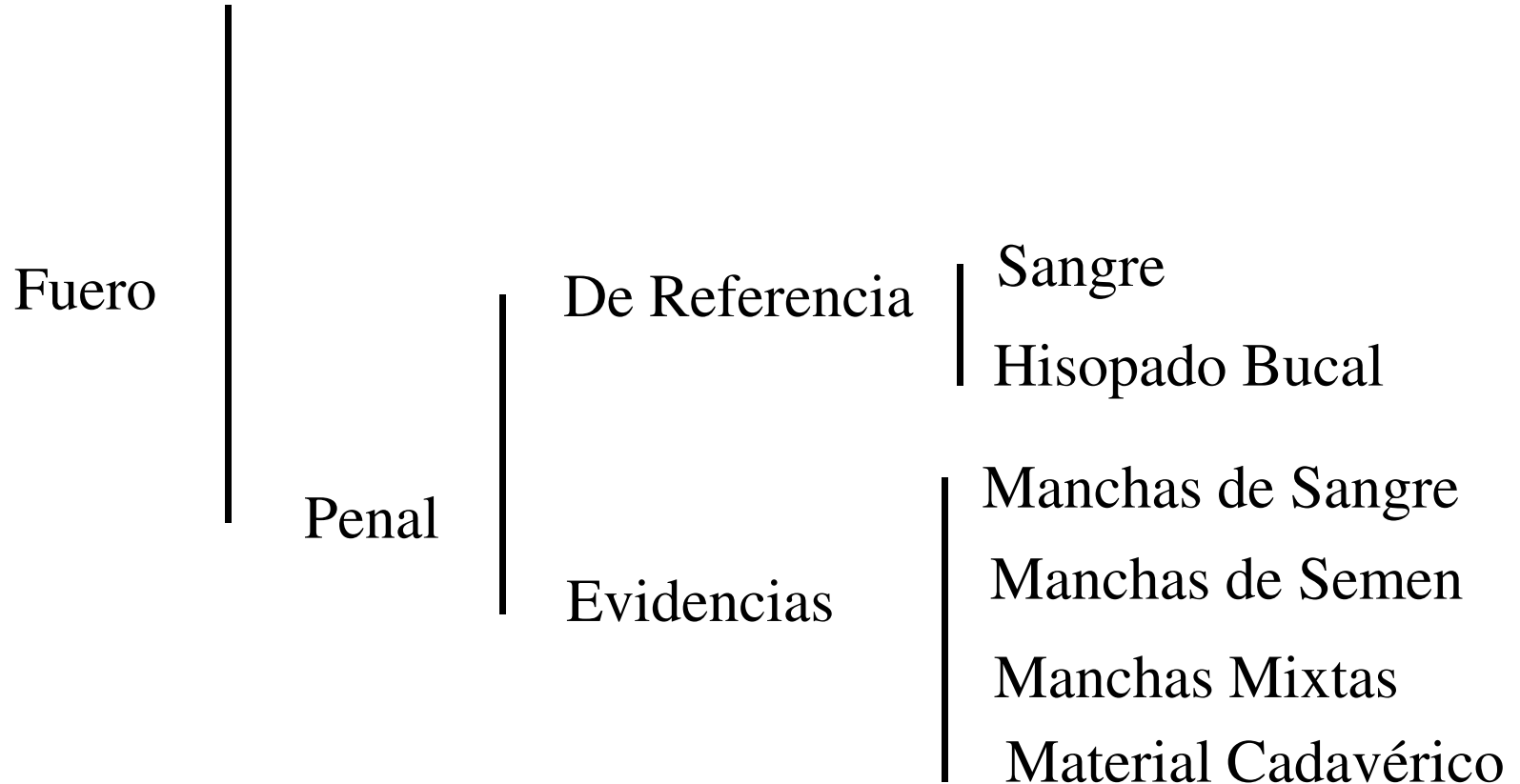
Genética de Poblaciones

# 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



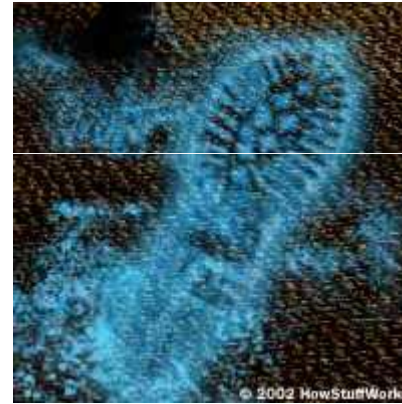
# Historia del Caso y Especímenes

- 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
- Analisis 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

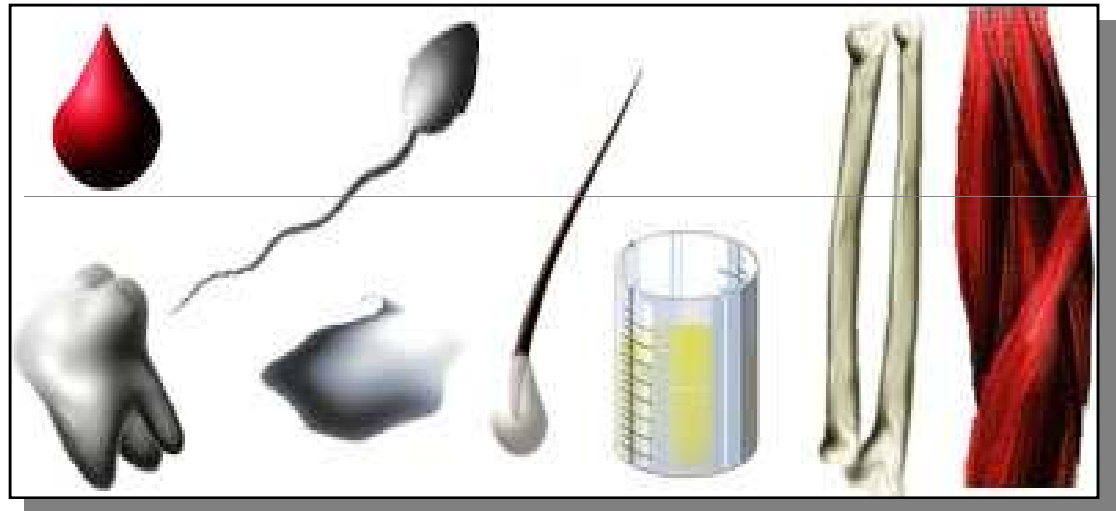
- Usar material descartable para cada muestra
- No añadir conservantes a las muestra tomadas.
- Dejar secar a temperatura ambiente, en un lugar protegido, antes de empaquetar.
- Empaquetar cada muestra por separado.
- Utilizar bolsas de papel evitando siempre el plástico.

# 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 $\mu$ l de saliva    | 30ng            |
| 1 $\mu$ l de sangre    | 45ng            |
| 1 $\mu$ 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

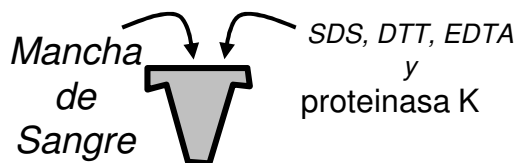
# Extracción a partir de sangre sobre papel de filtro e hisopados bucales

- 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.

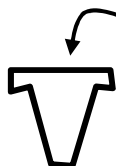
## ORGANICA



INCUBAR (56 °C)



Centrifugar

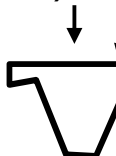


VORTEX



Centrifugar

**TRANSFERIR** fase acuosa (superior) a tubo nuevo



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

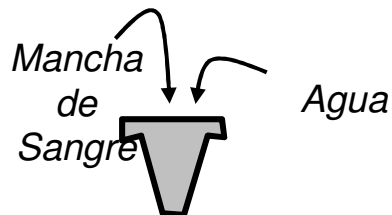


Centrifugar

QUANTIFICAR DNA

Amplificar por PCR

## CHELEX

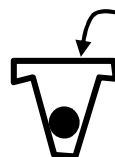


INCUBAR (T ambiente)



Centrifugar

SACAR sobrenadante



INCUBAR (56 °C)

INCUBAR (100 °C)

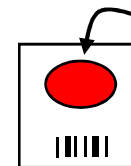


Centrifugar

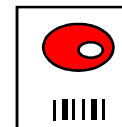
QUANTIFICAR DNA

Amplificar por PCR

## Papel FTA



Sacabocado



Lavar varias veces con Buffer de extracción

Descartar sobrenadante



Reactivos de PCR

(NO se Cuantifica las muestras son uniformes)

Amplificar por PCR

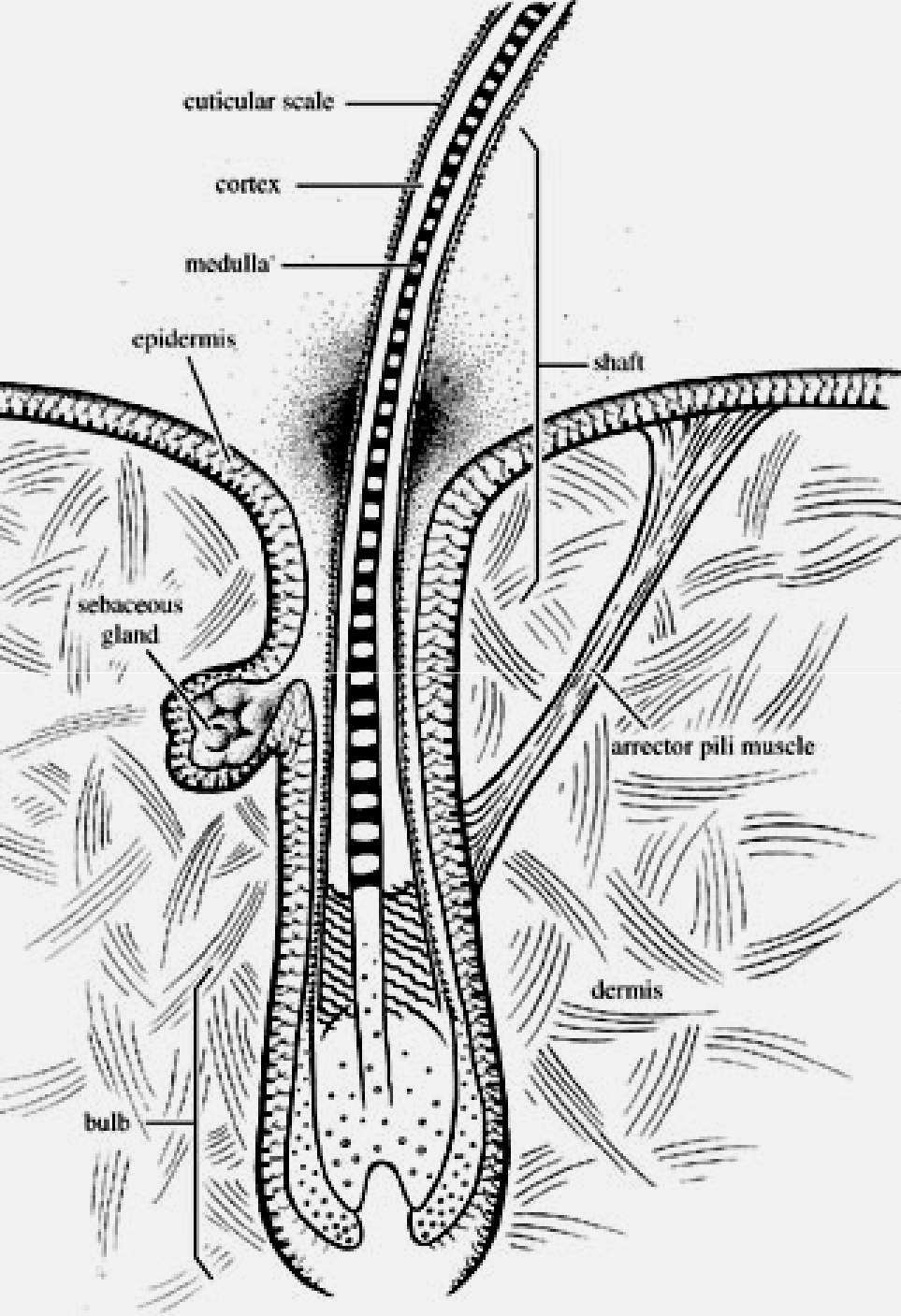
# Pelo

- 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 aveces 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.



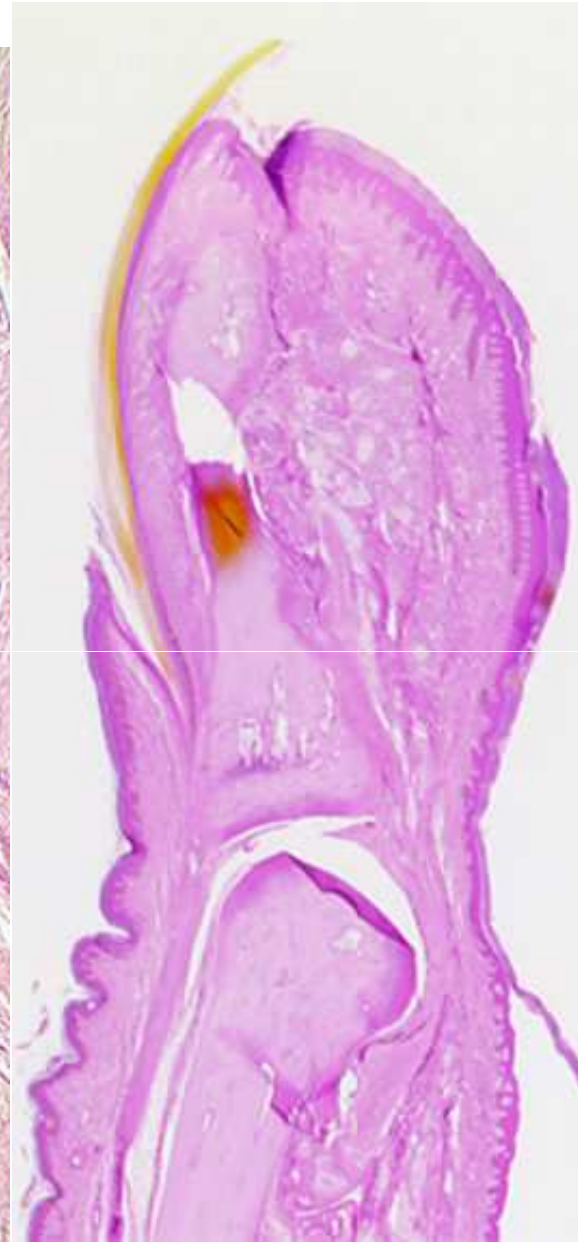
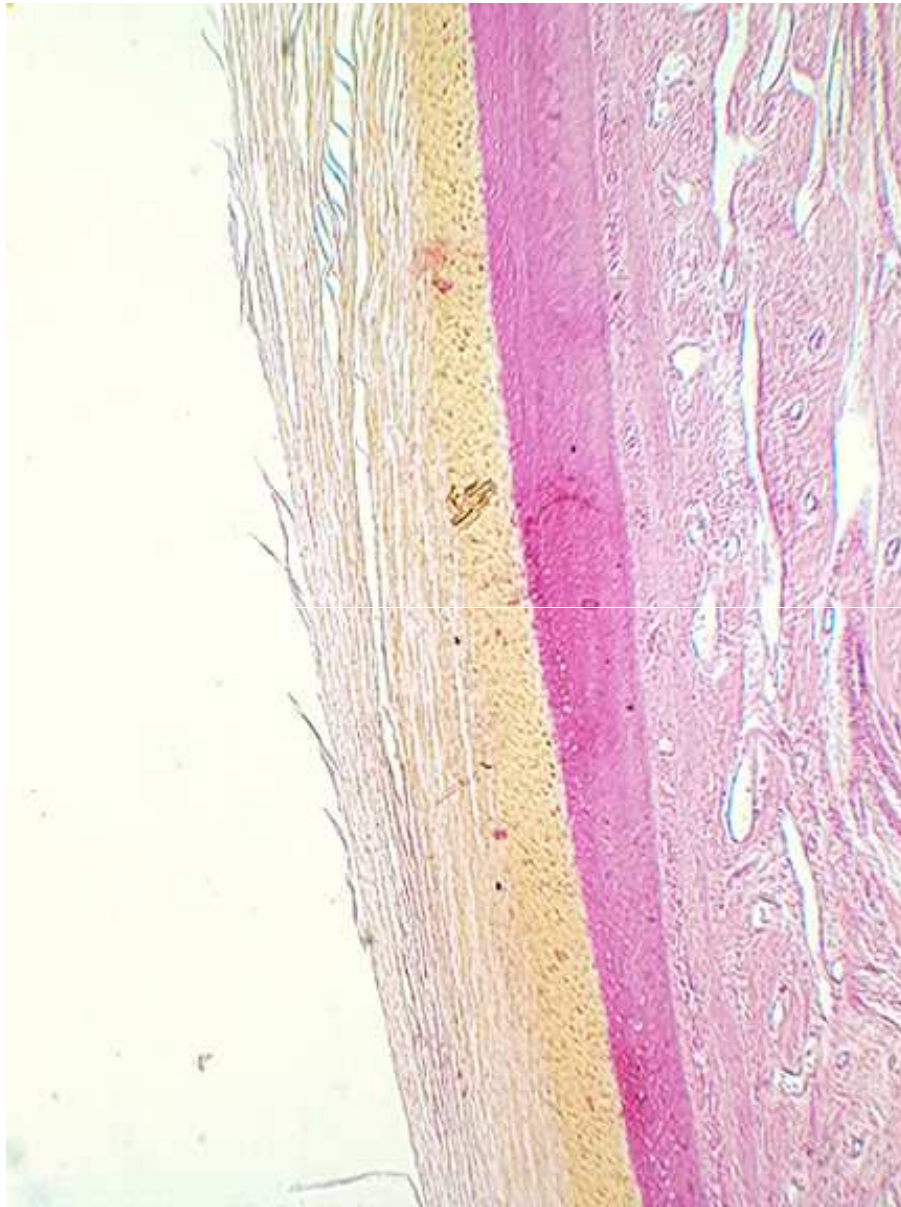
# Violaciones

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

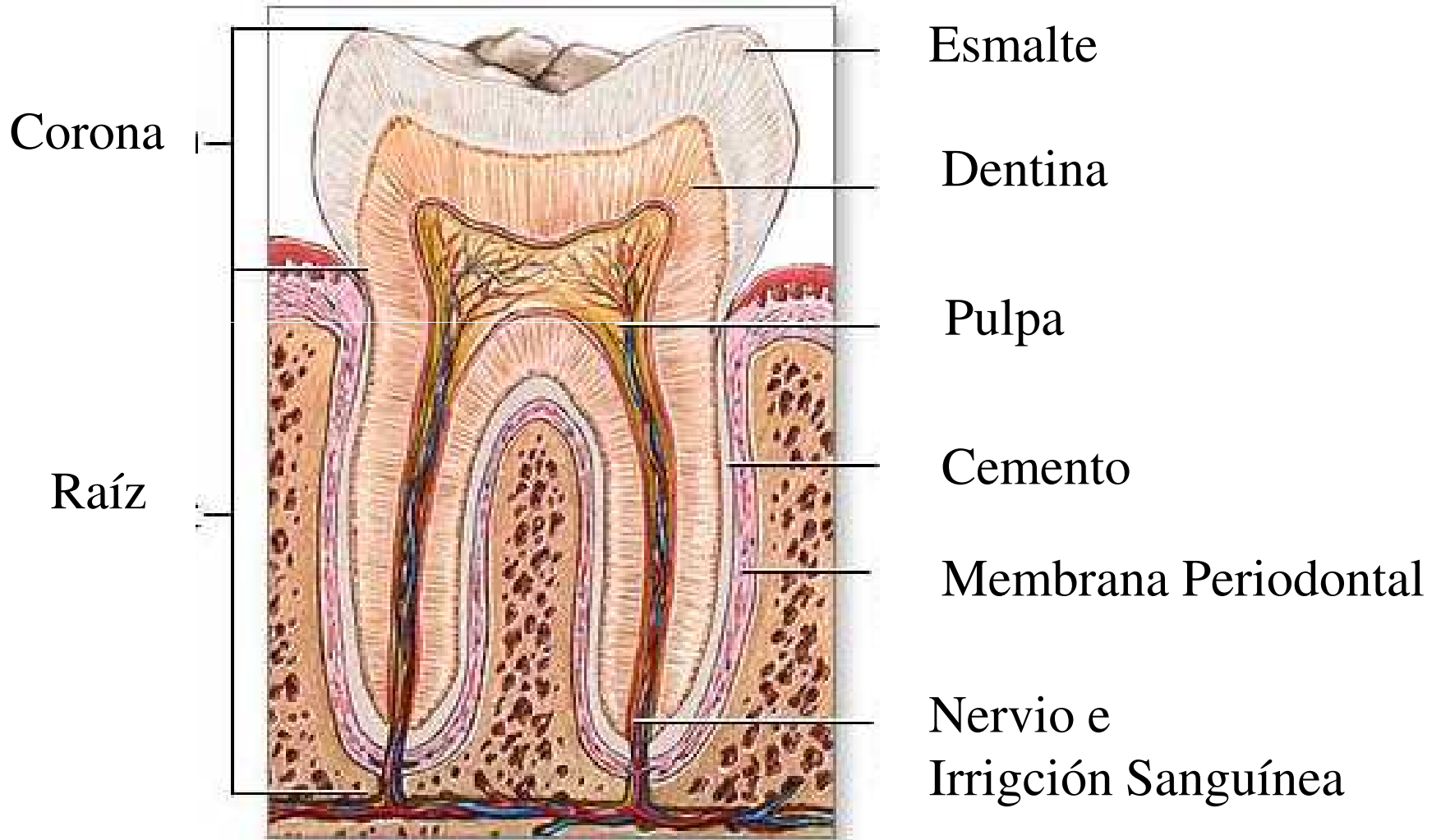
# Espermatozoides

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

# Uñas



# Dientes

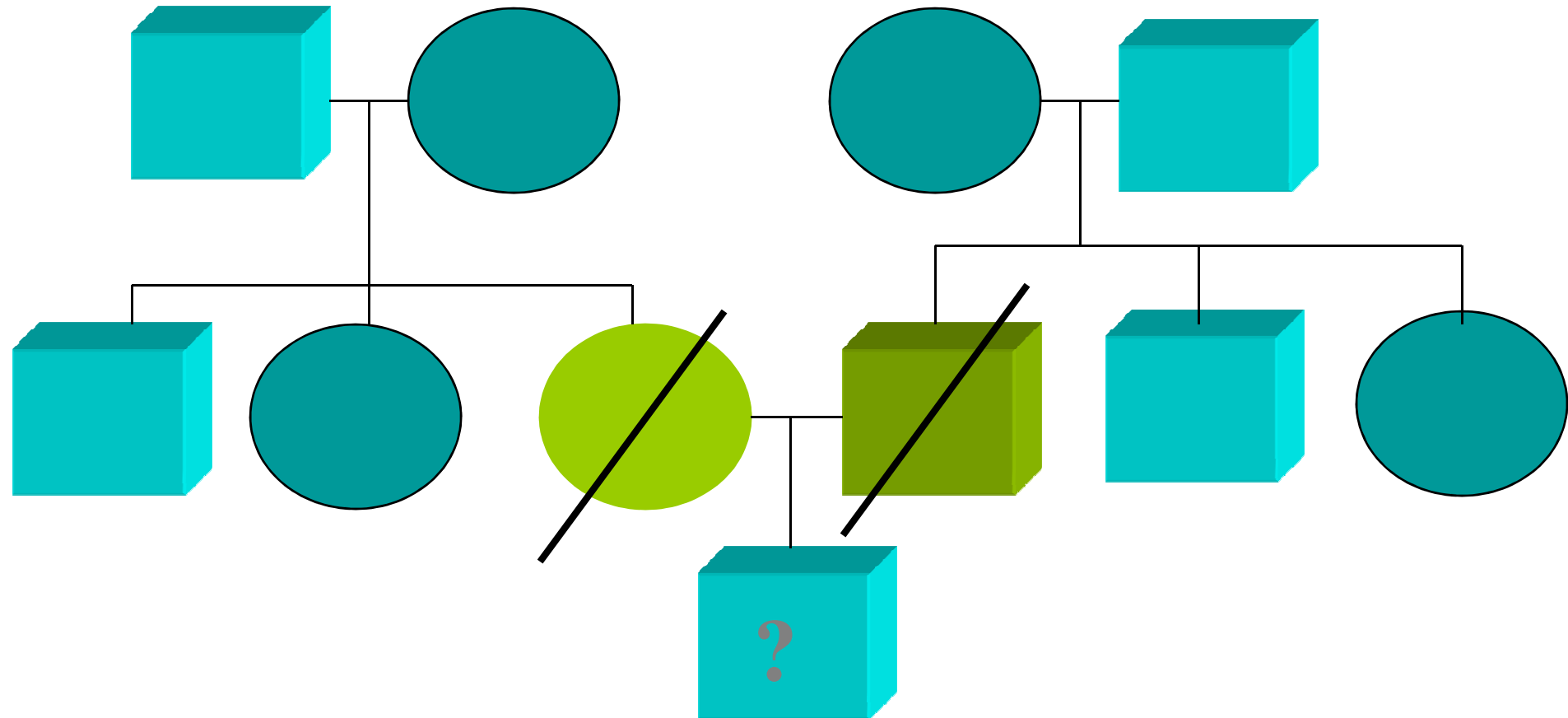


# Material Cadavérico

- 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.

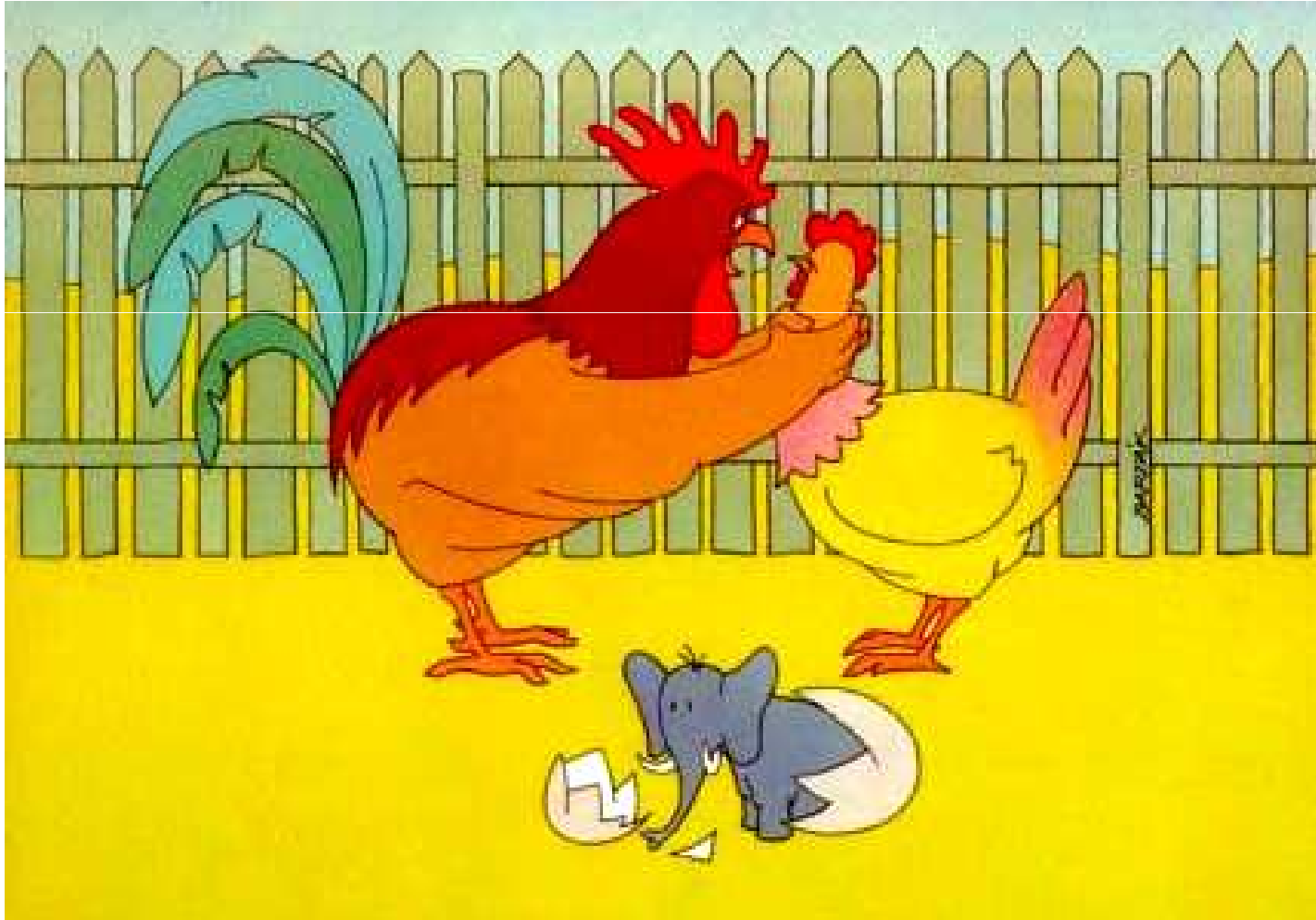
NOMBRE Y APELLIDO:  
D.N.I.:  
DOMICILIO: Dígito pulgar derecho:

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

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

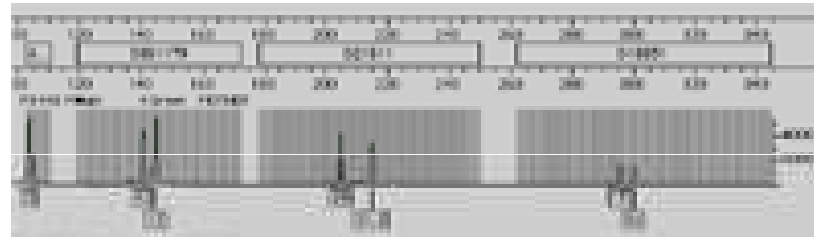
Las extracciones se efectuaron en presencia de los Dres. y por el Servicio de Huellas Digitales Genéticas.

# Menos Políticamente Correcto, Aunque Más Realista



# Cuatro STRs amplificados en Multiplex detectados simultáneamente

**Gallina**



**Huevo**

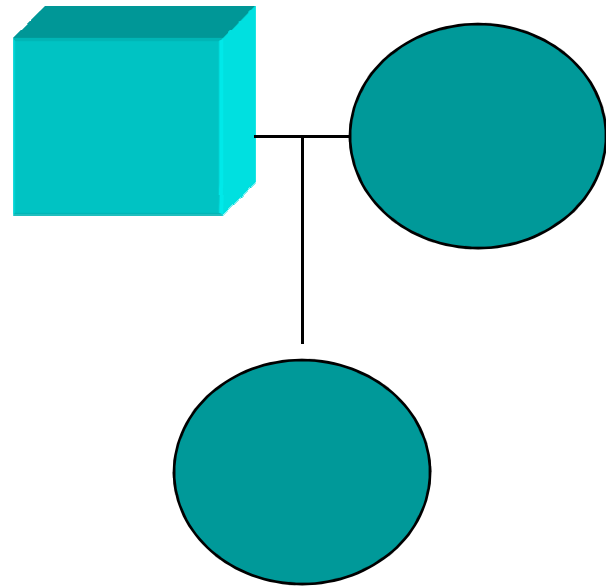


**Gallo**



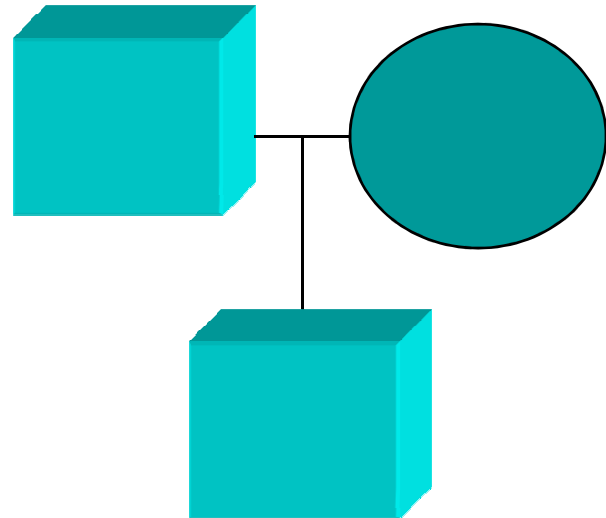
# Criterios Empleados

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



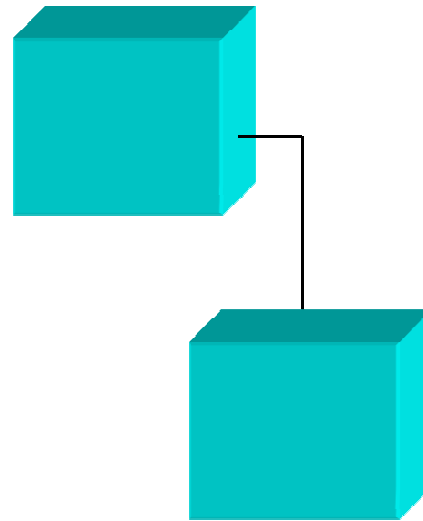
# Criterios Empleados.

- 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.



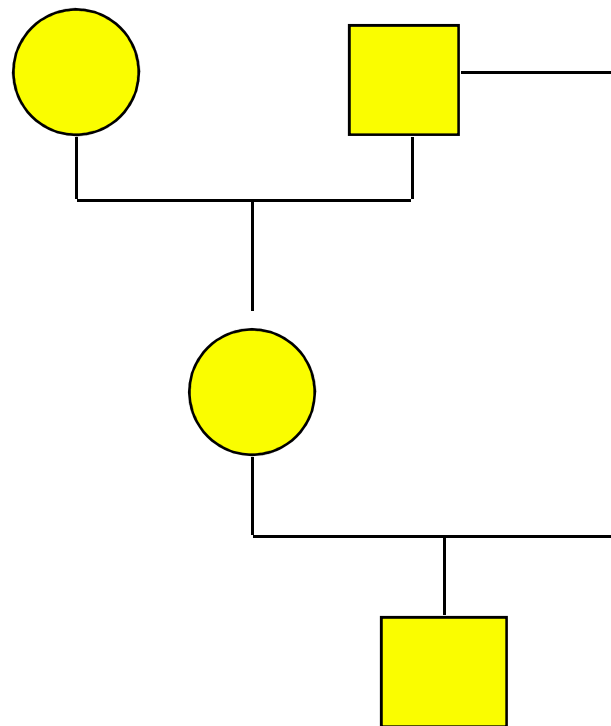


# Características del Análisis.

- 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”*



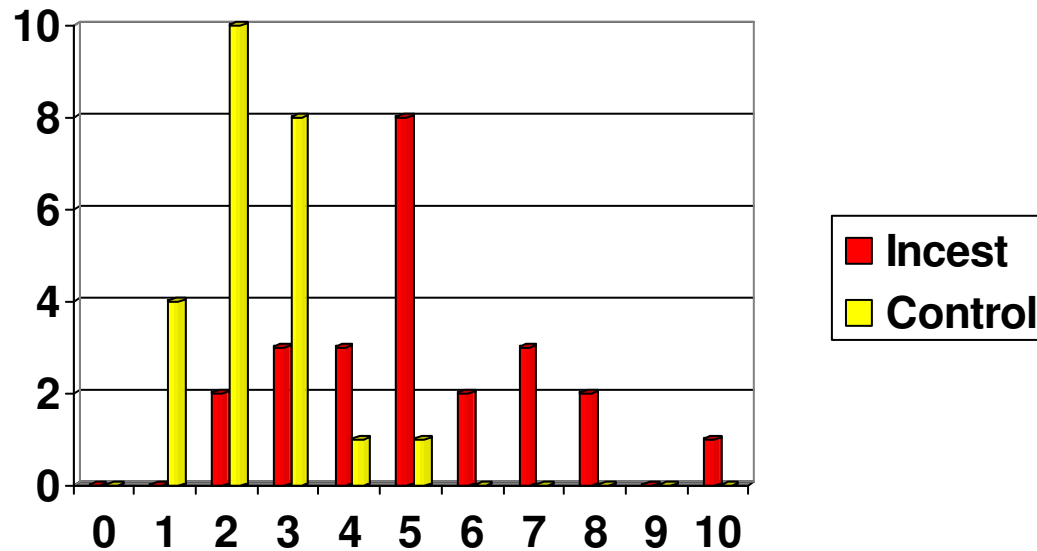
Código Penal, Cap. II “Violación y estupro”-Art.122 y Cap. III “Corrupción, abuso deshonesto y ultrajes al pudor” Art 125. (Ley 20509 y 23077)

# *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.

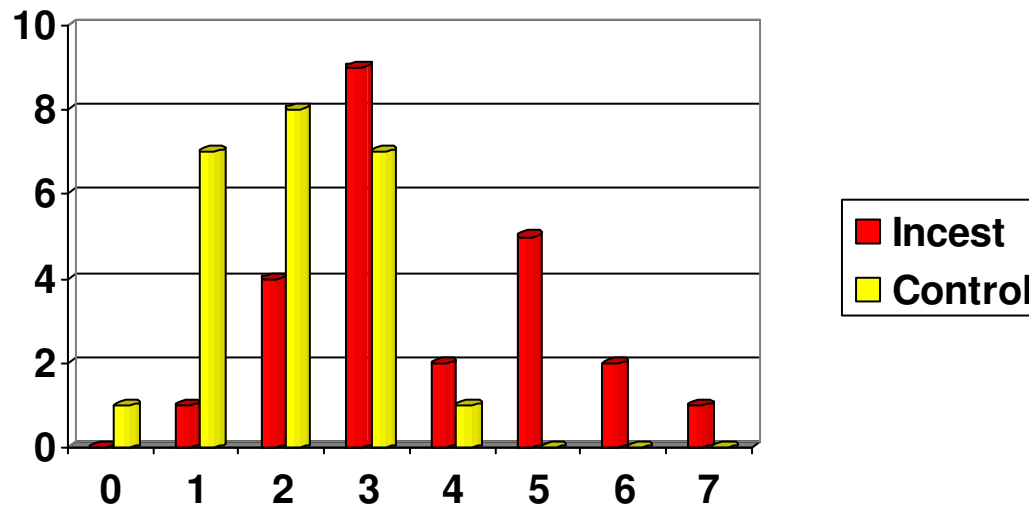
# *Frecuencias de Homocigocis* (n=24)

## Perfiles homocigotas



# *Frecuencias de Heterocigótas Iguales ((n=24))*

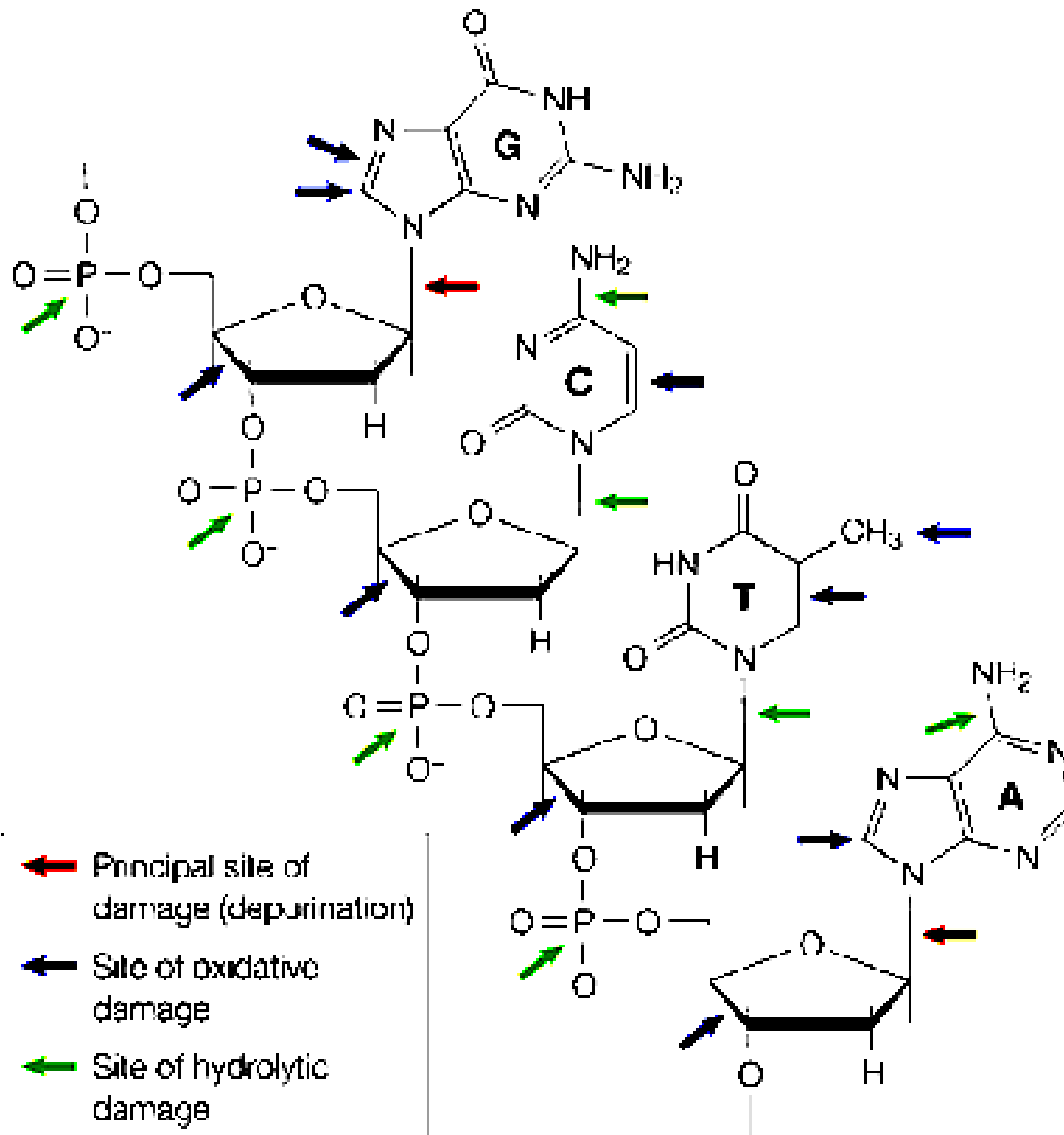
## Perfiles heterocigotas e iguales



# Situaciones Analíticas Complejas

# Hueso

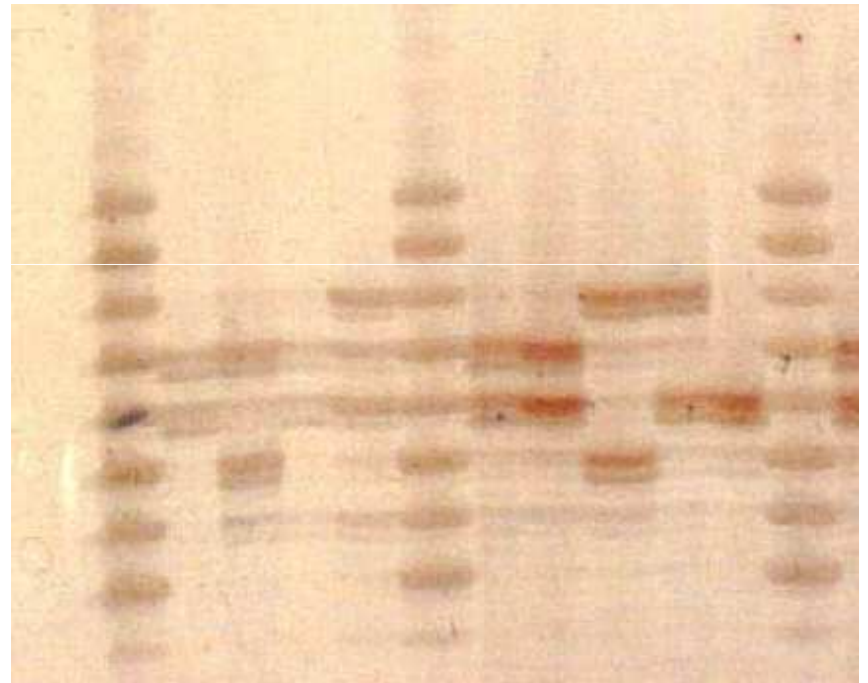






# Analisis de Microsatélites

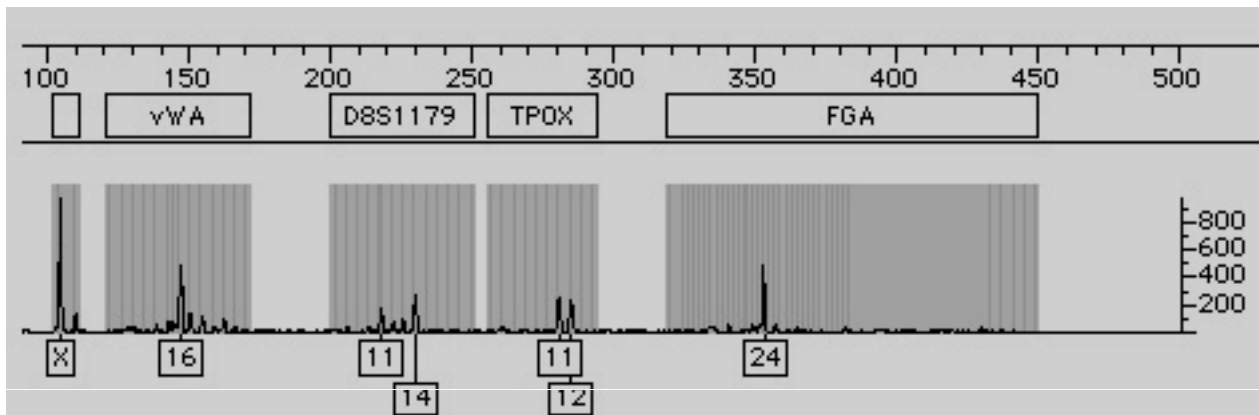
- Algunos STRs requieren particular atención en el momento del análisis.
- El sistema VWA es uno de ellos.



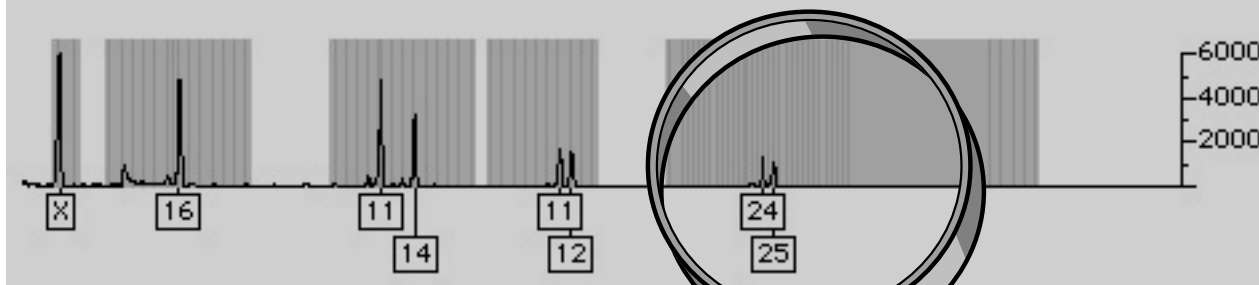
# Análisis de Material Cadavérico.

Resultados Editados.

**Hueso**

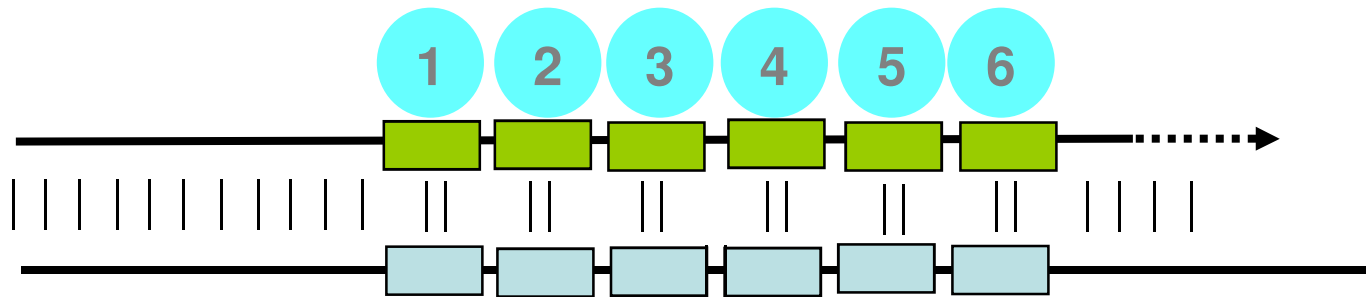


**Cordón Umbilical**

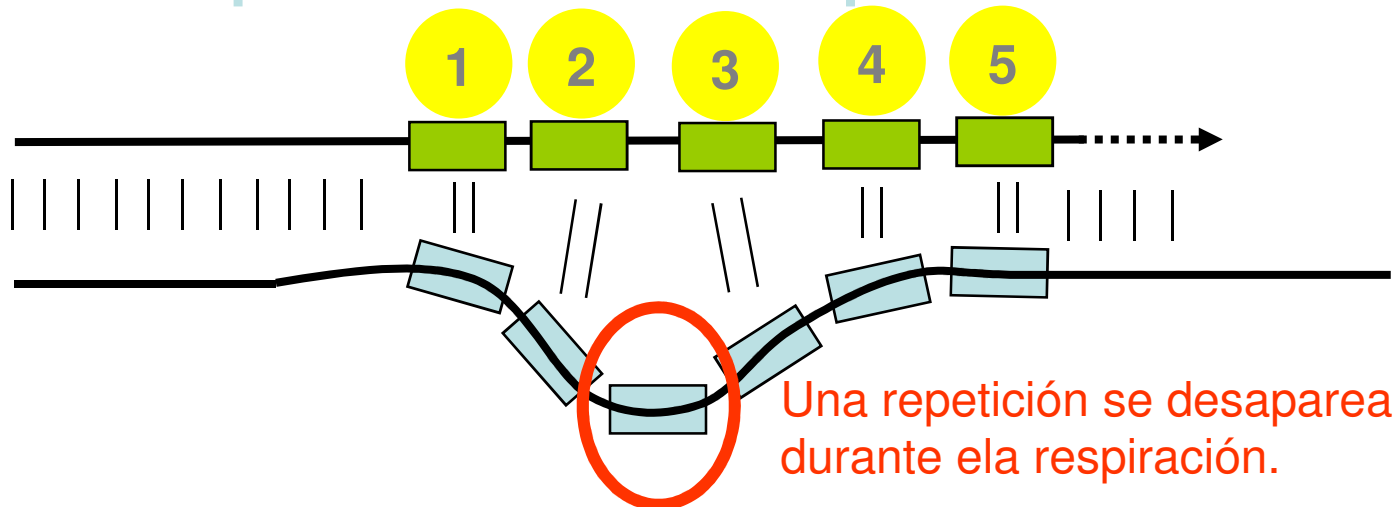


# Esquema del Proceso de Formación de Productos “Stutter”

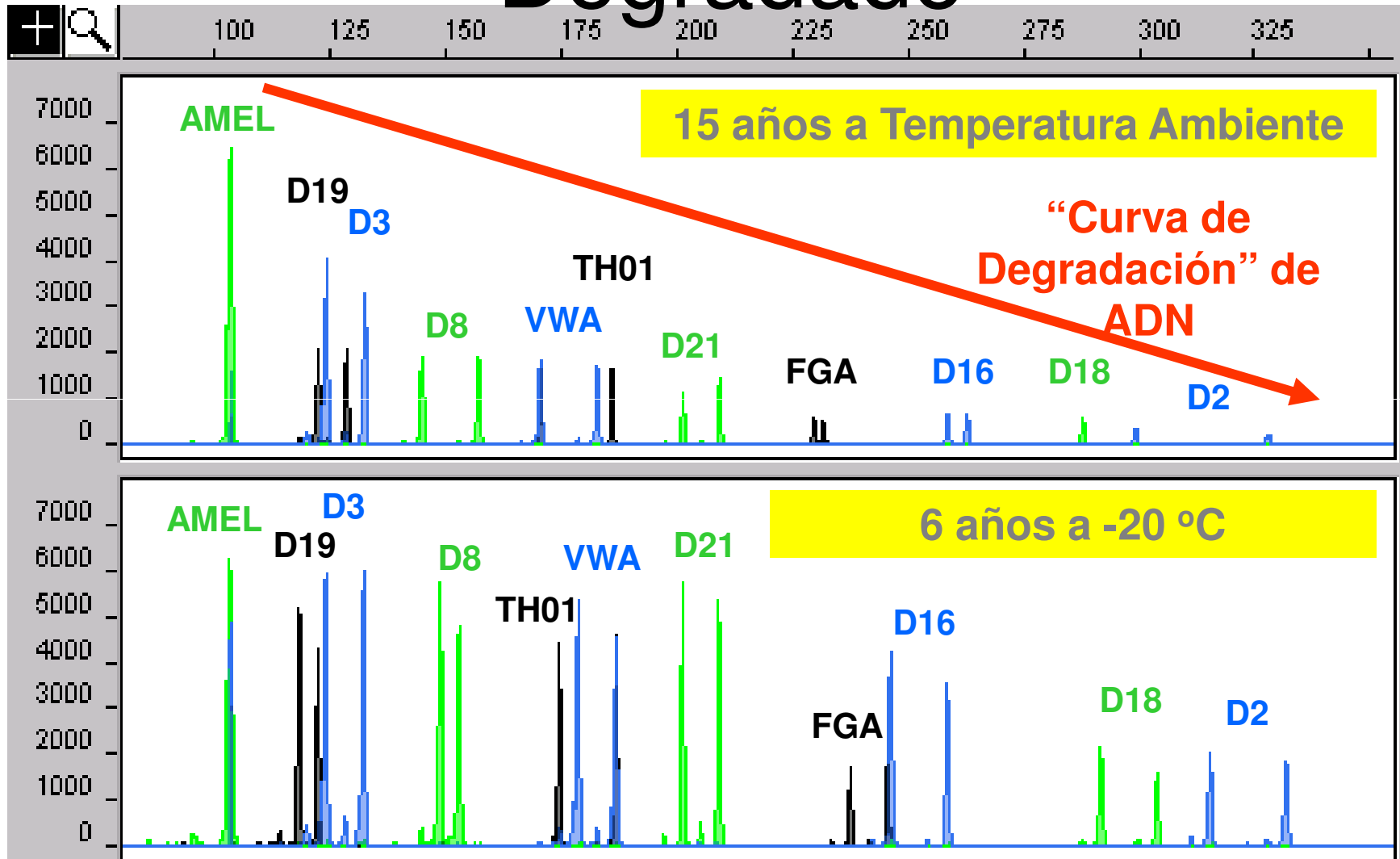
## Normal STR Allele Replication



## Cadena desplazada Modelo de Apareado incorrecto



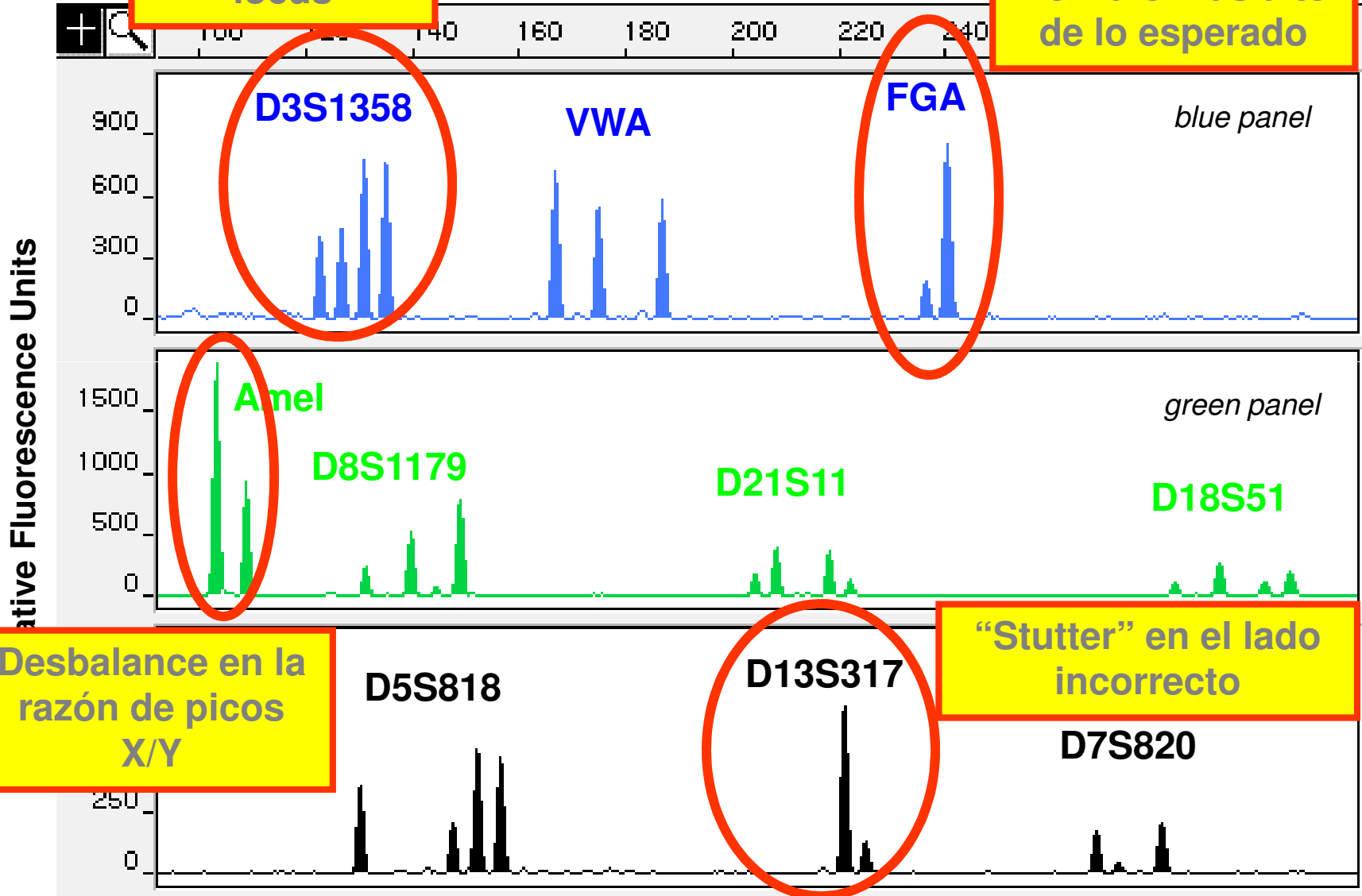
# Resultados con ADN Degradado



# Ejemplo de Muestra Mezclada

4 picos en un locus

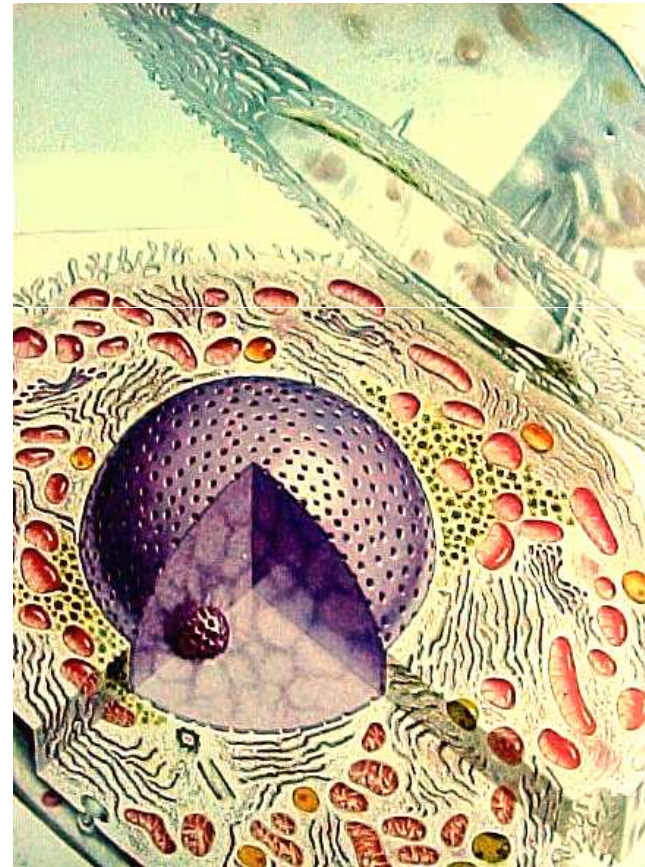
Hombro más alto de lo esperado



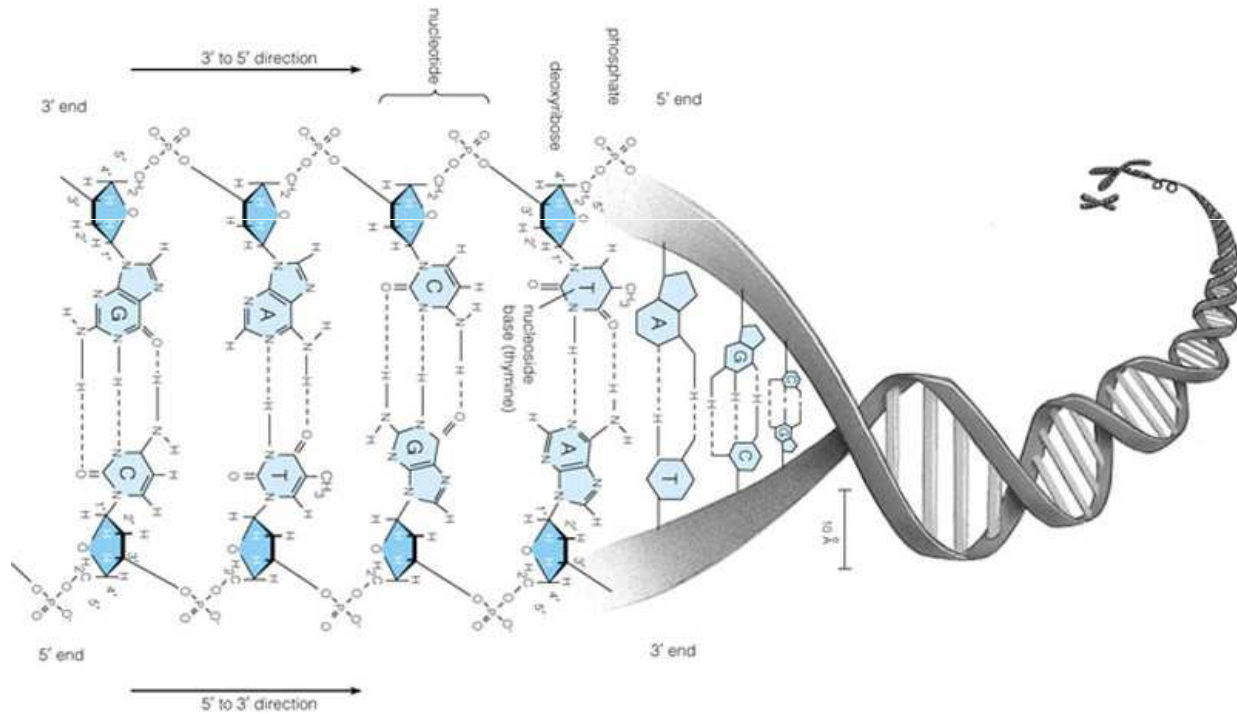
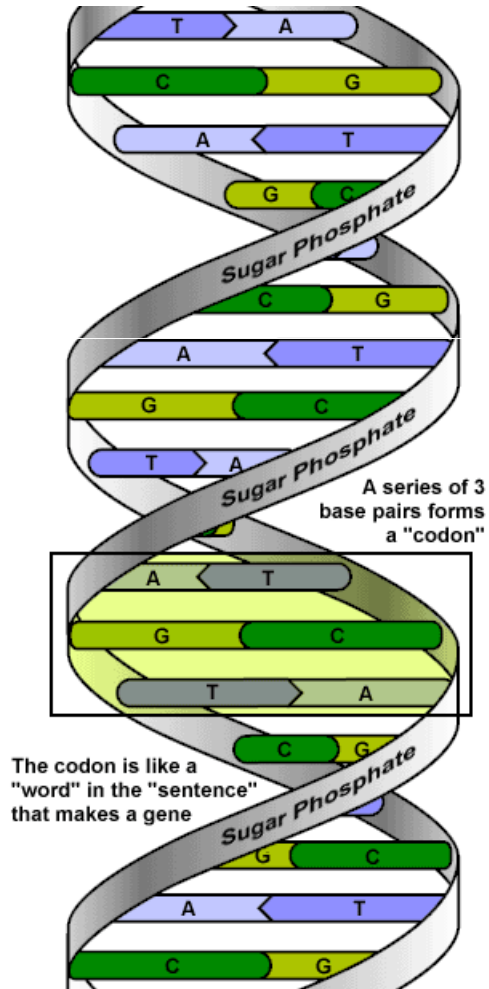
# Marcadores Genéticos

# 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.



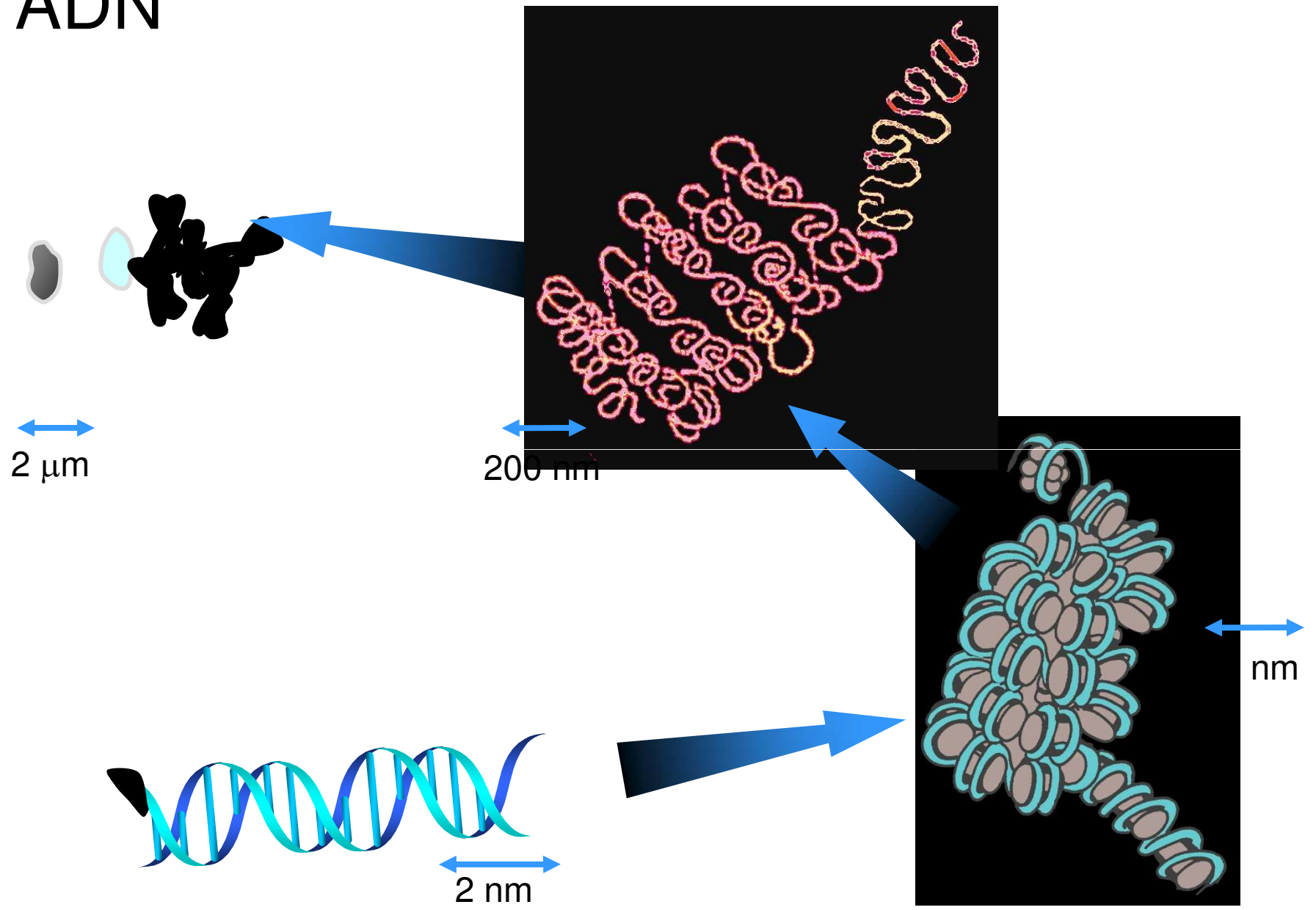
# ADN



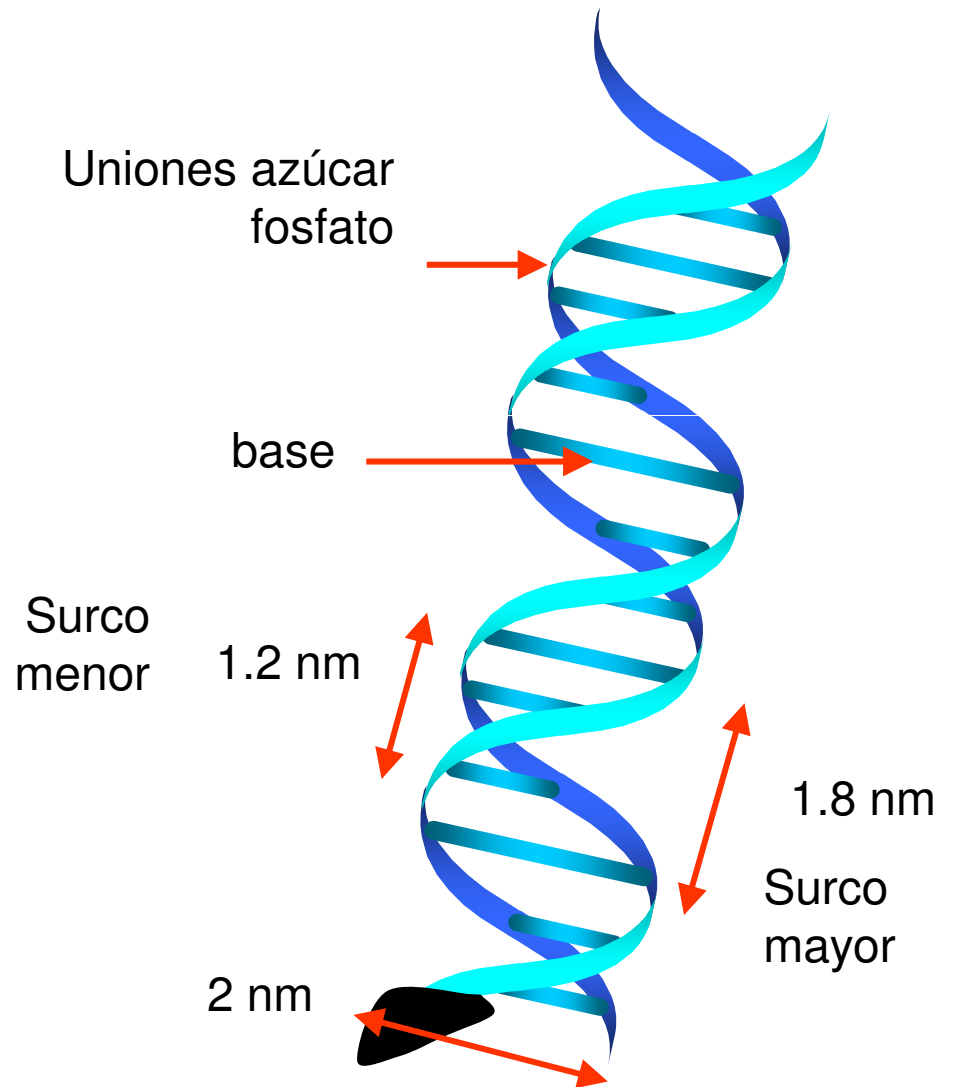
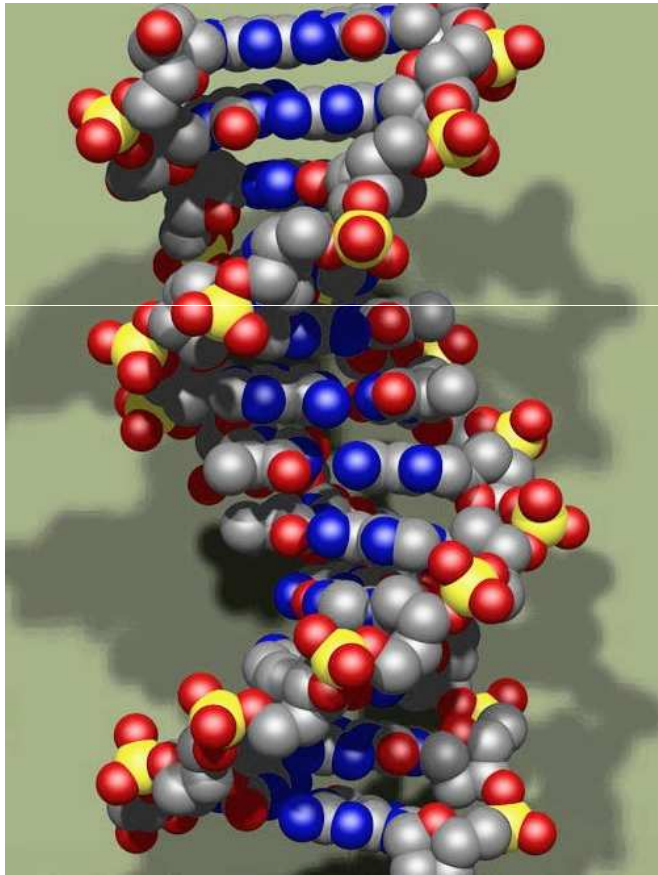
**FIGURE 2.10** The double-strand structure of DNA illustrating the nucleotides, each composed of a deoxyribose sugar, a phosphate, and a nitrogen-containing base.



# ADN

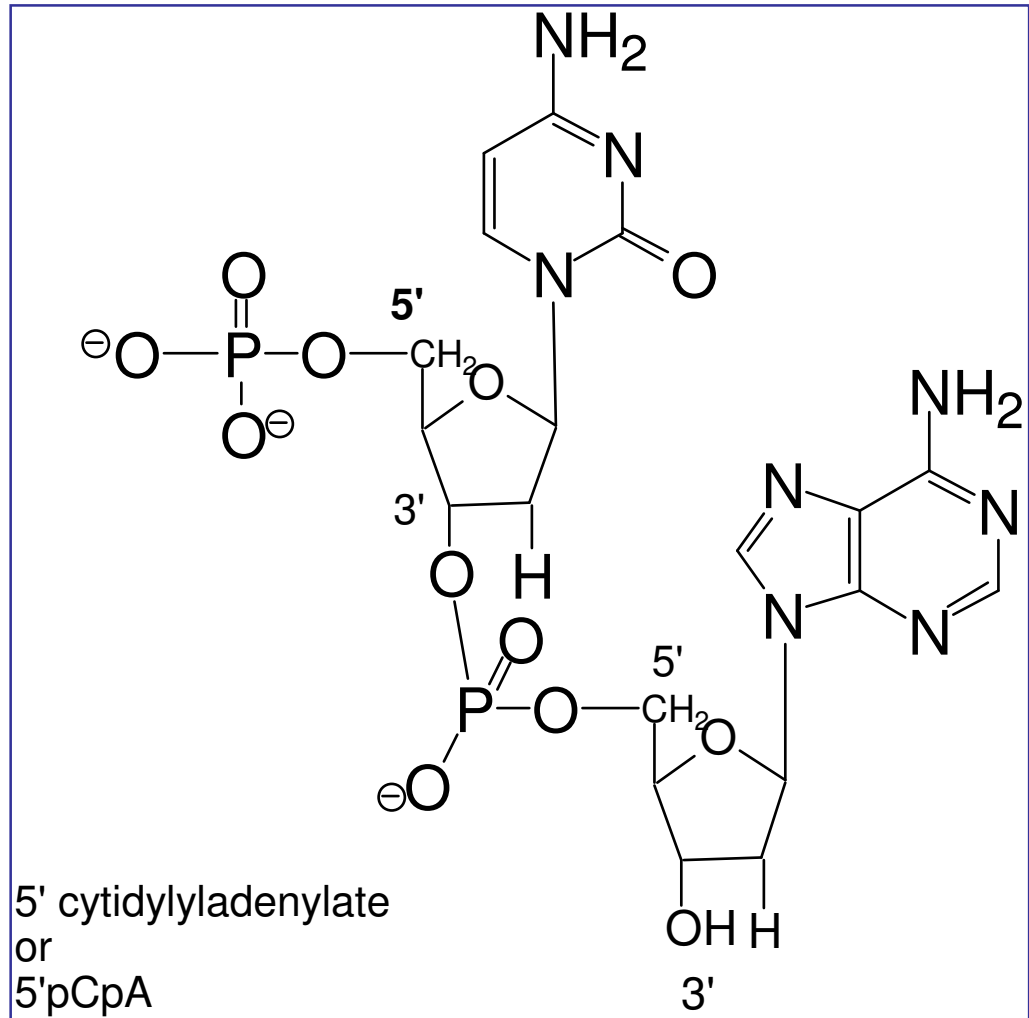


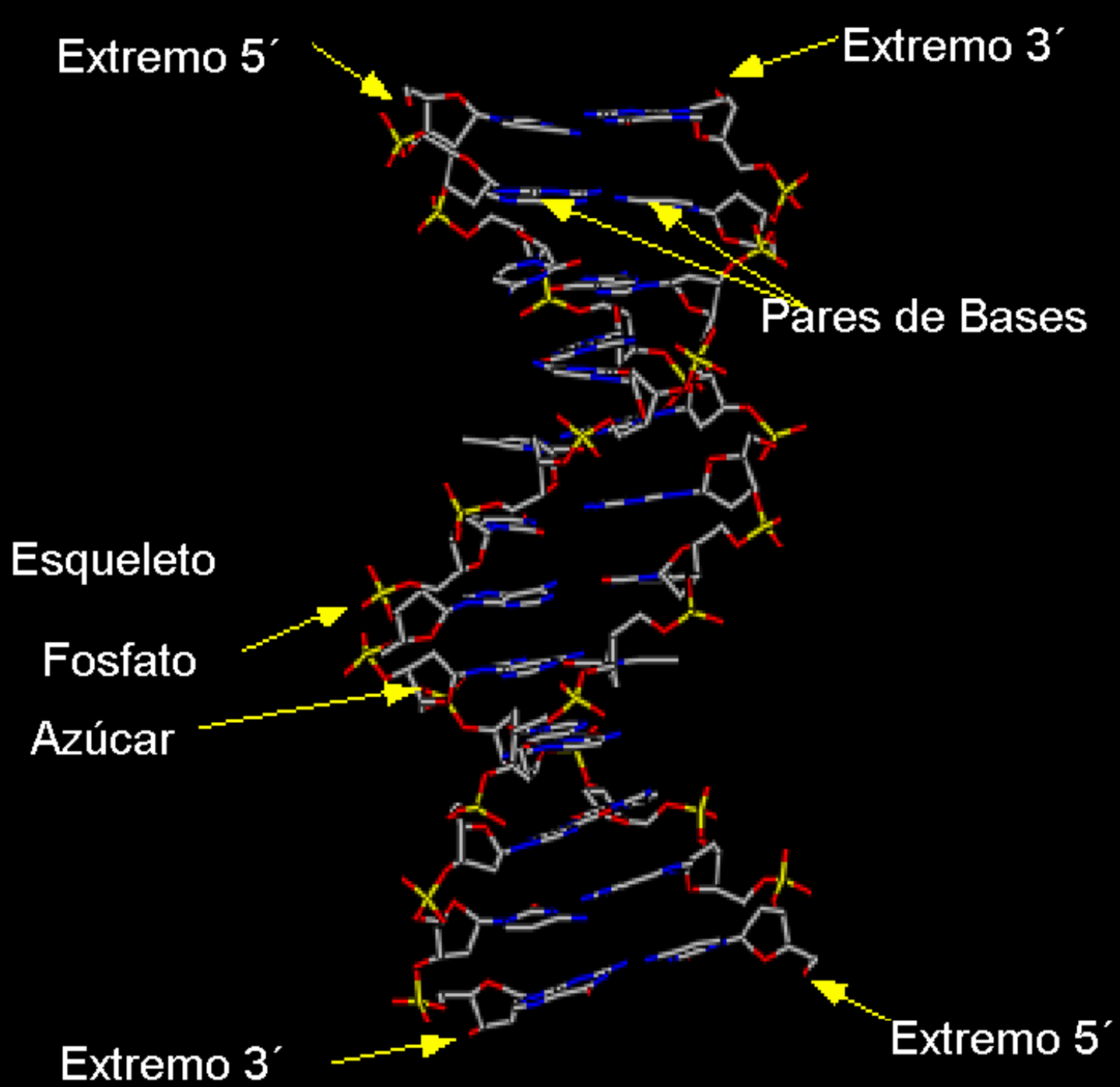
# ADN



# Estructura de un Nucleótido.

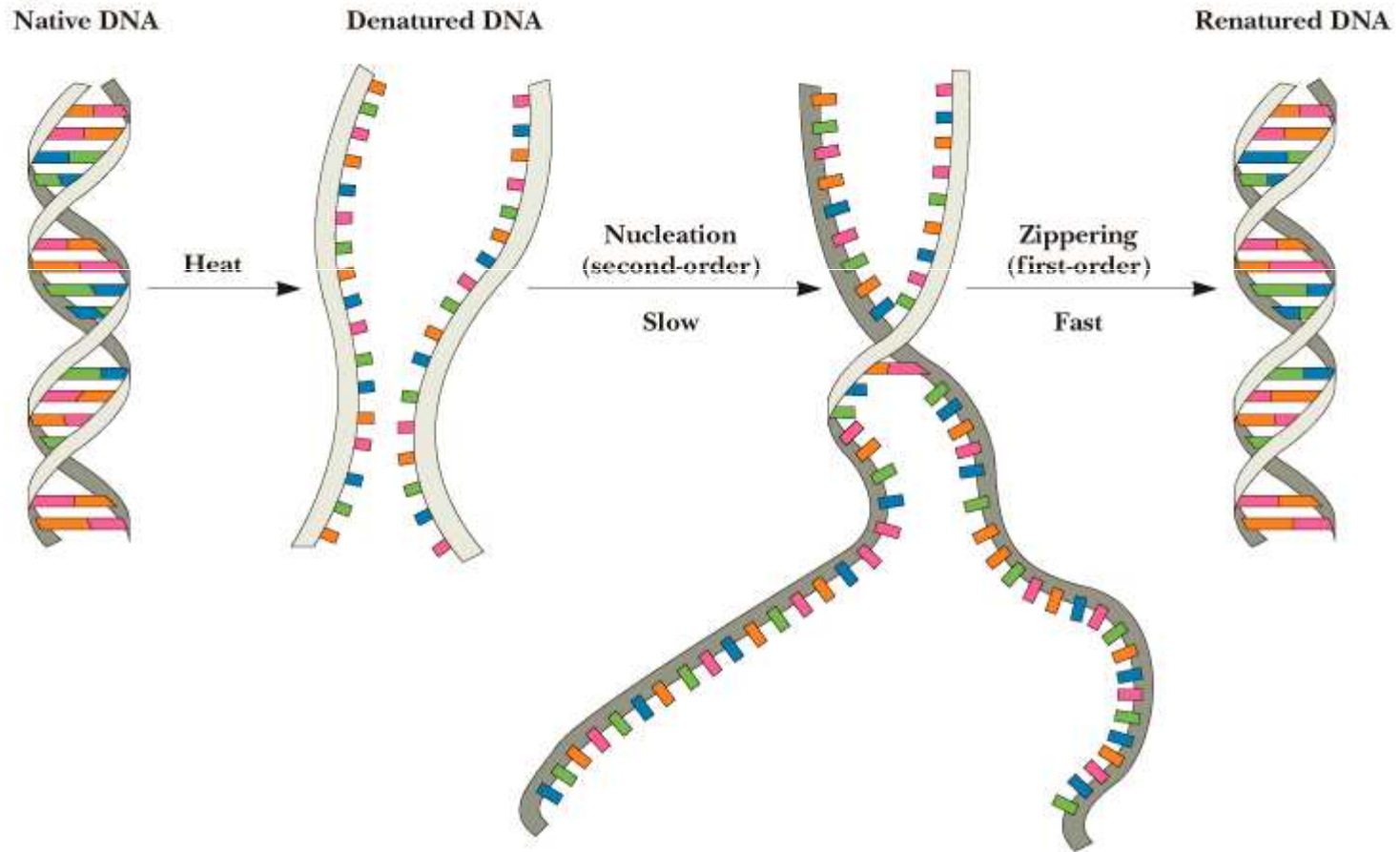
El 3' C de un nucleótido está unido al 5' C del siguiente nucleótido a través de una unión fosfodiéster.



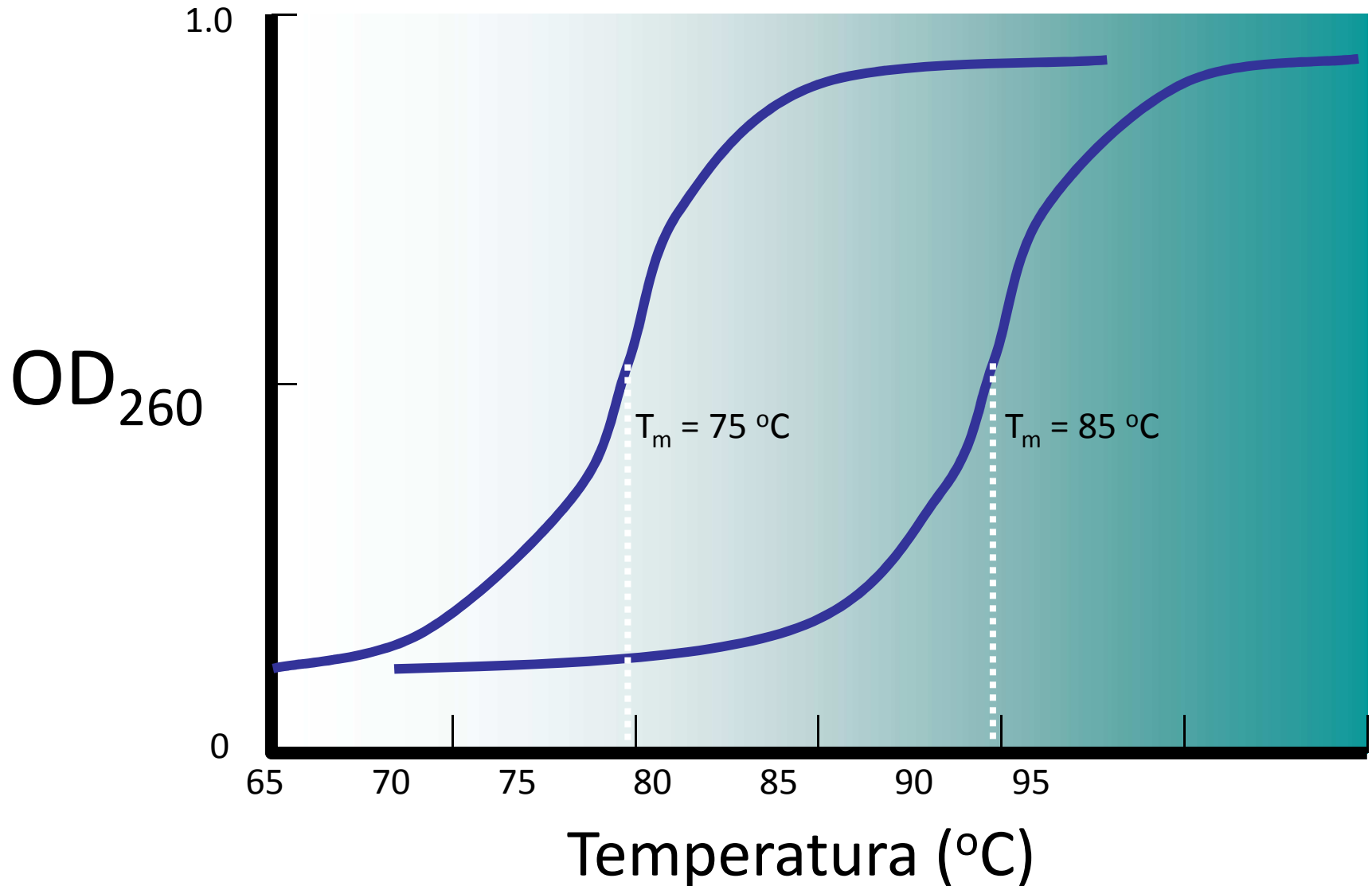


Vista lateral  
de una  
Molécula de  
ADN

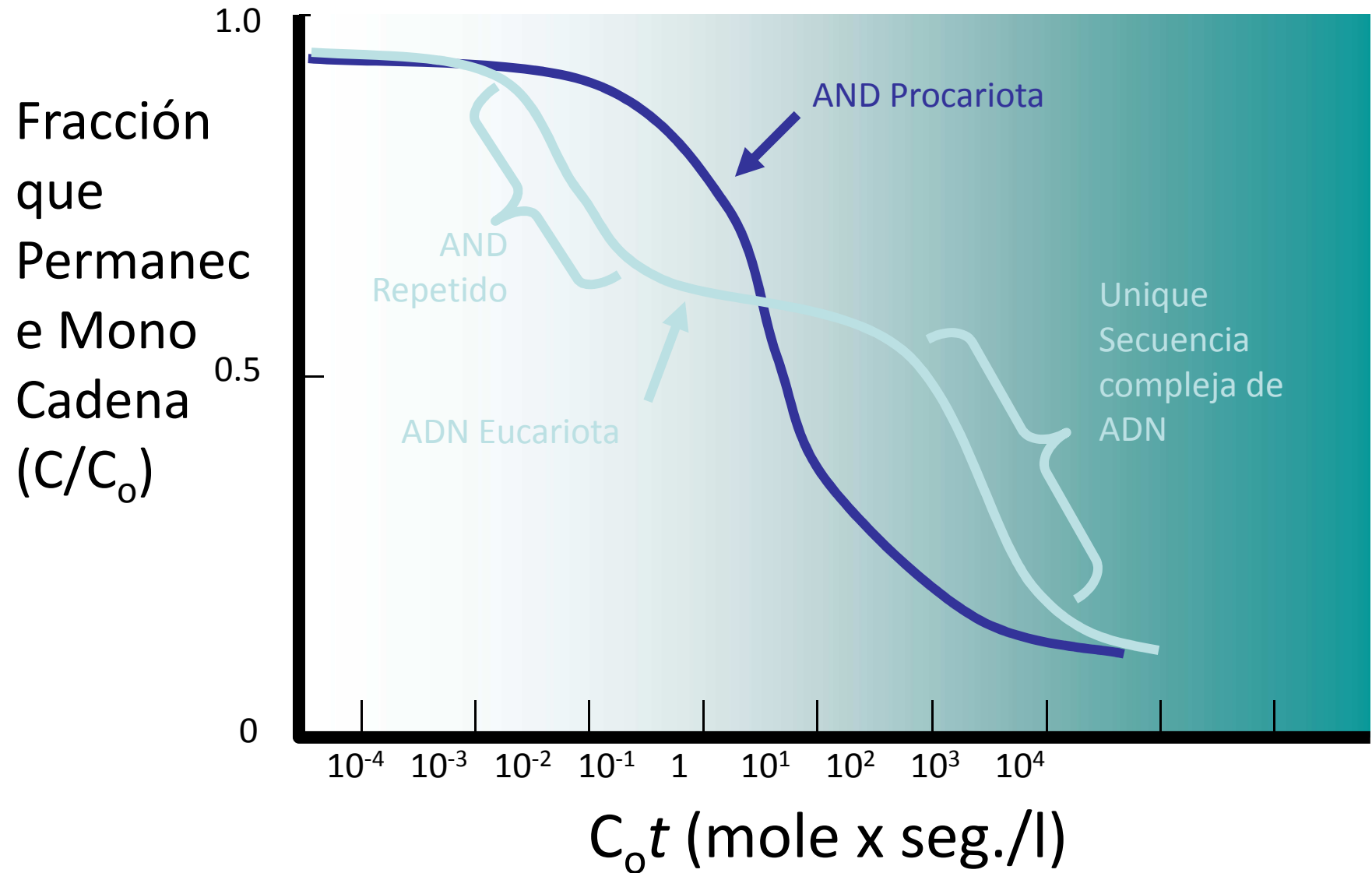
# Cambios Estructurales Durante la desnaturalización



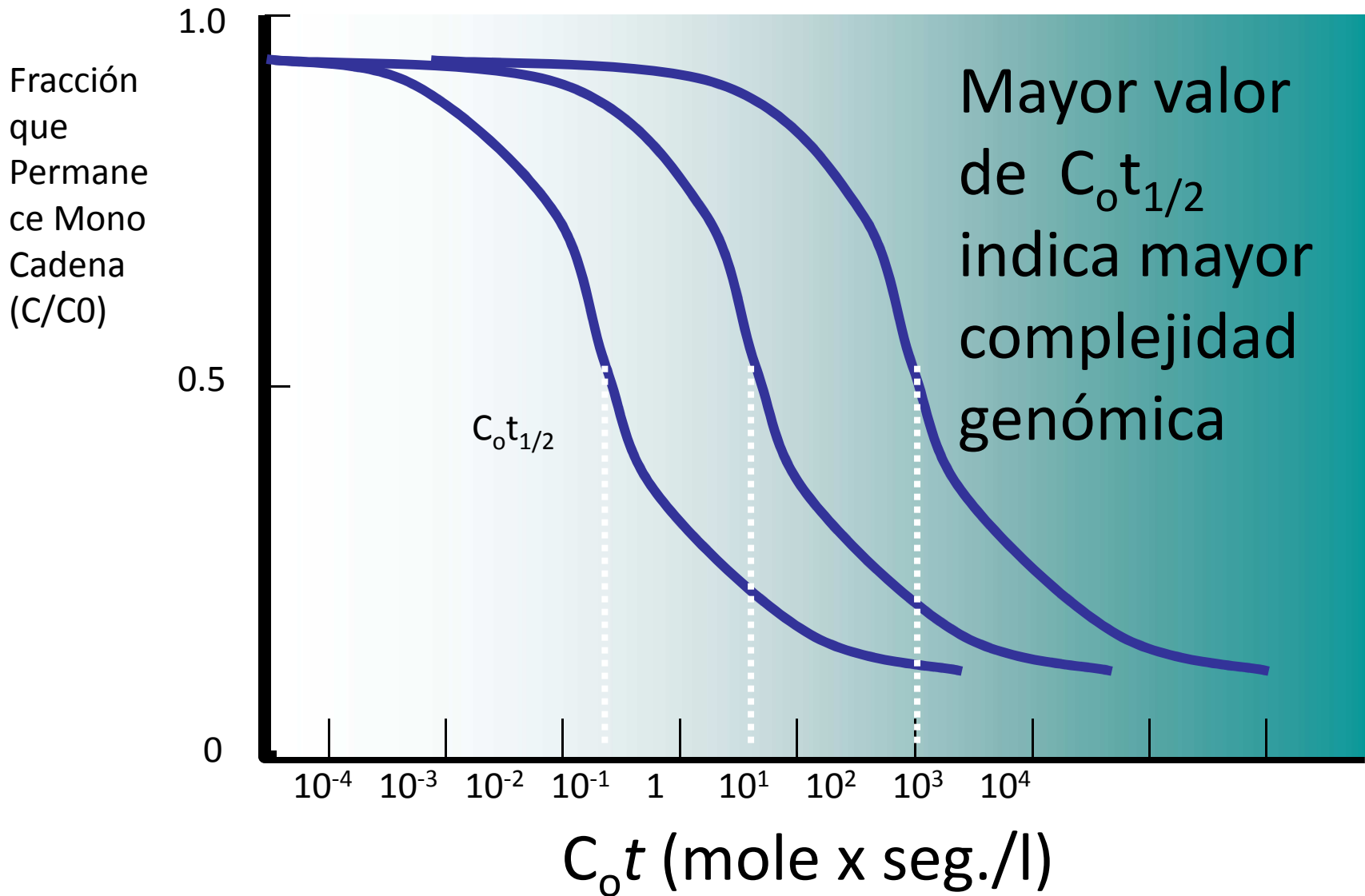
# Seterminación del Contenido en GC



# Cinética de Reasociación



# Cinética de Reasociación





# Hibridación

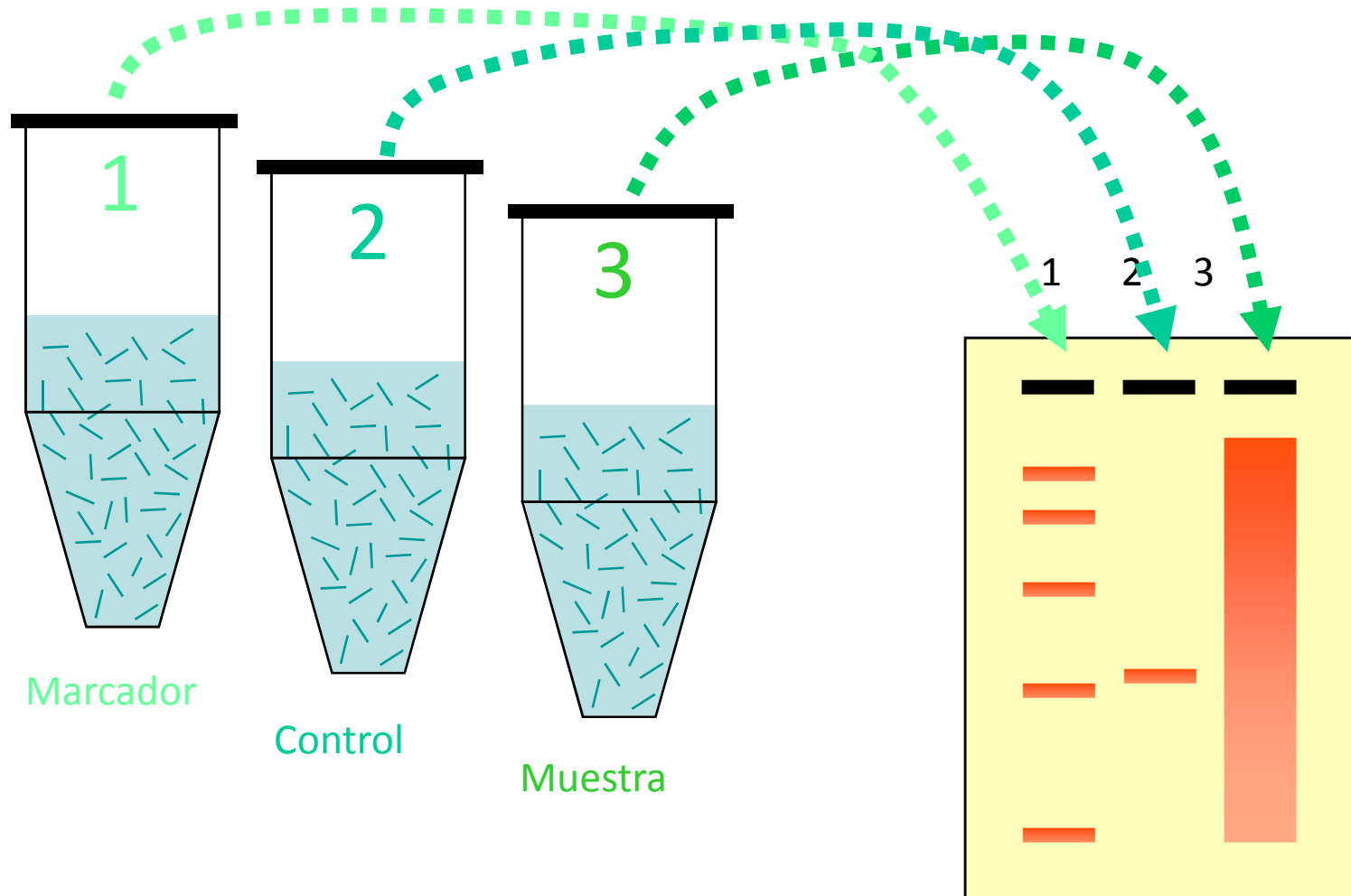
AND Templado



Primer

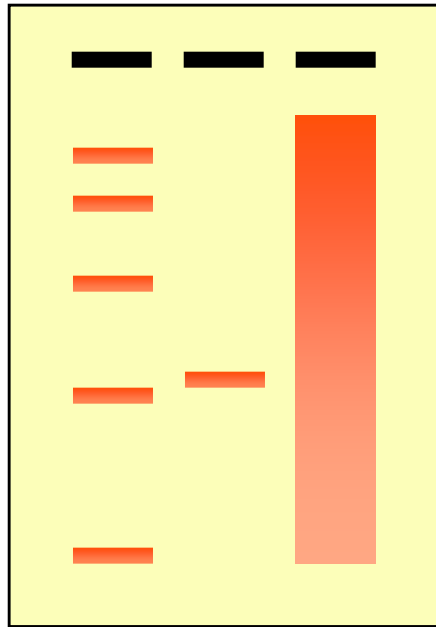
# Análisis de Southern:

## Restricción y Separación Electrofrética

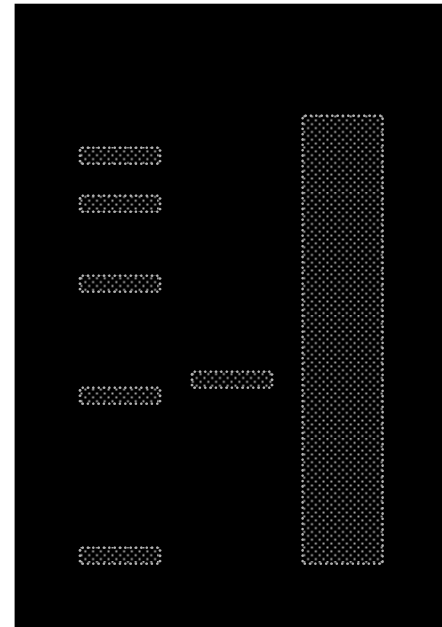


# Análisis de Southern

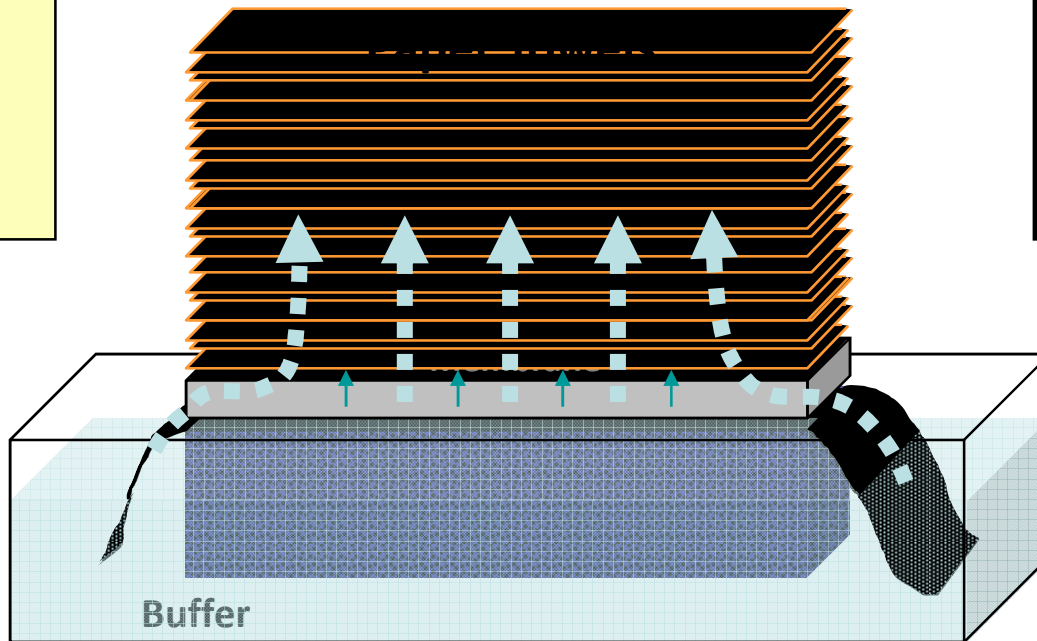
## Transferencia del ADN a la Membrana



Gel

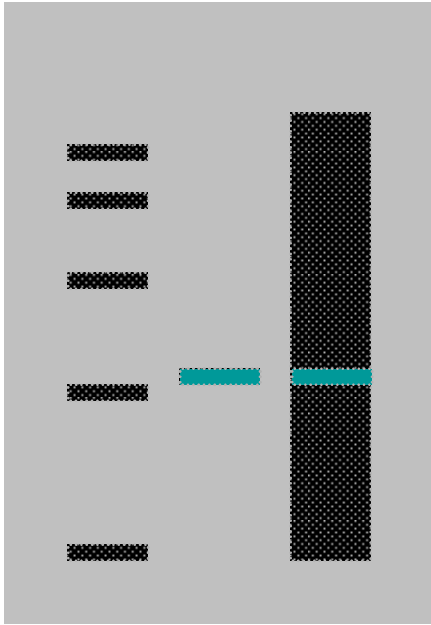


Membrana

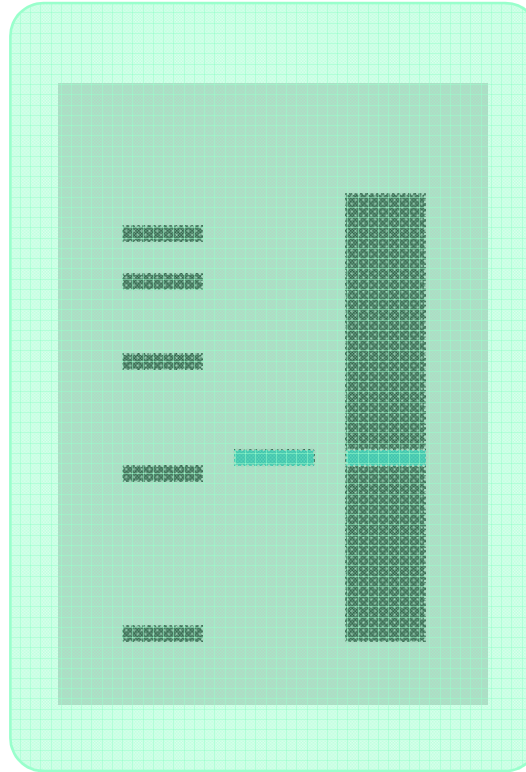


# Análisis de Southern

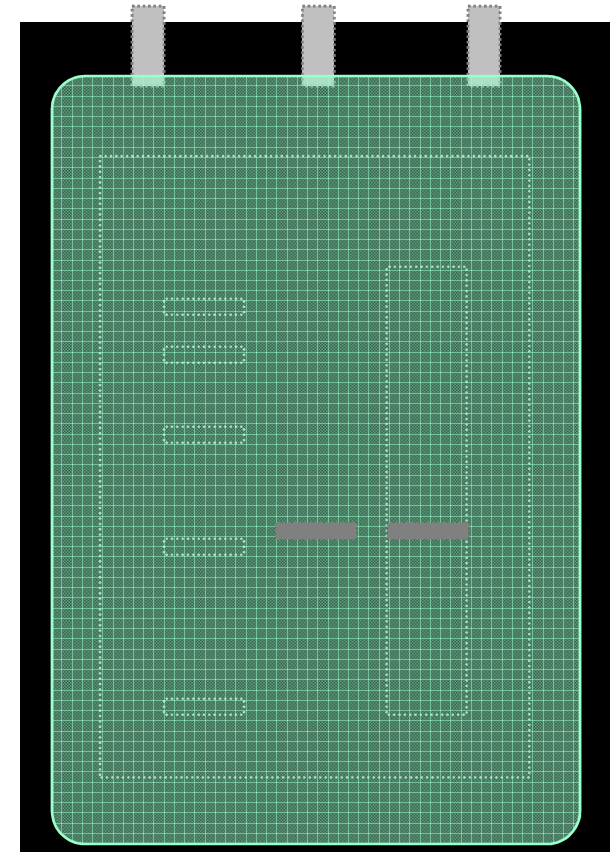
## Revelado de Autorradiografías



Membrana con la sonda marcada hibridizada



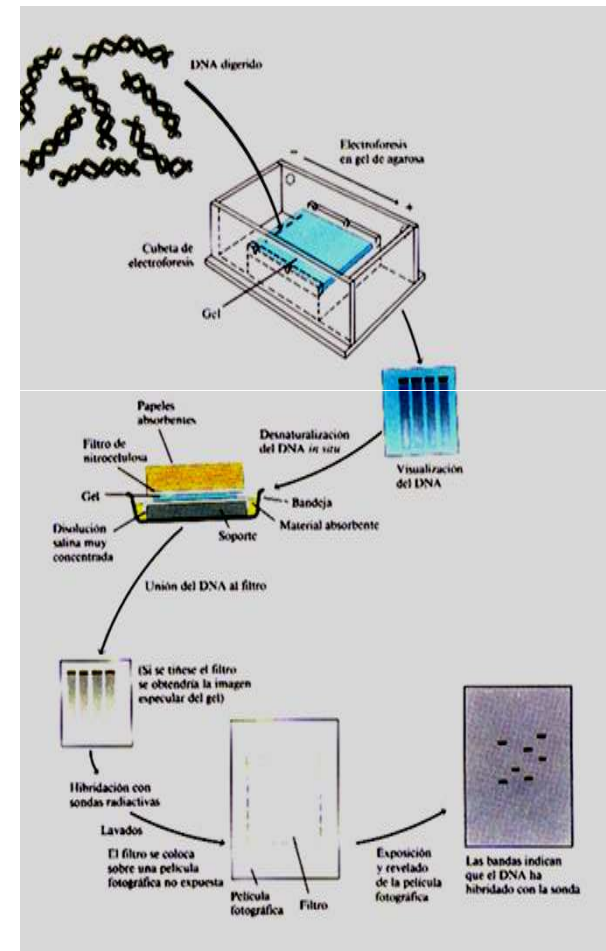
Exposición a placas de Rx



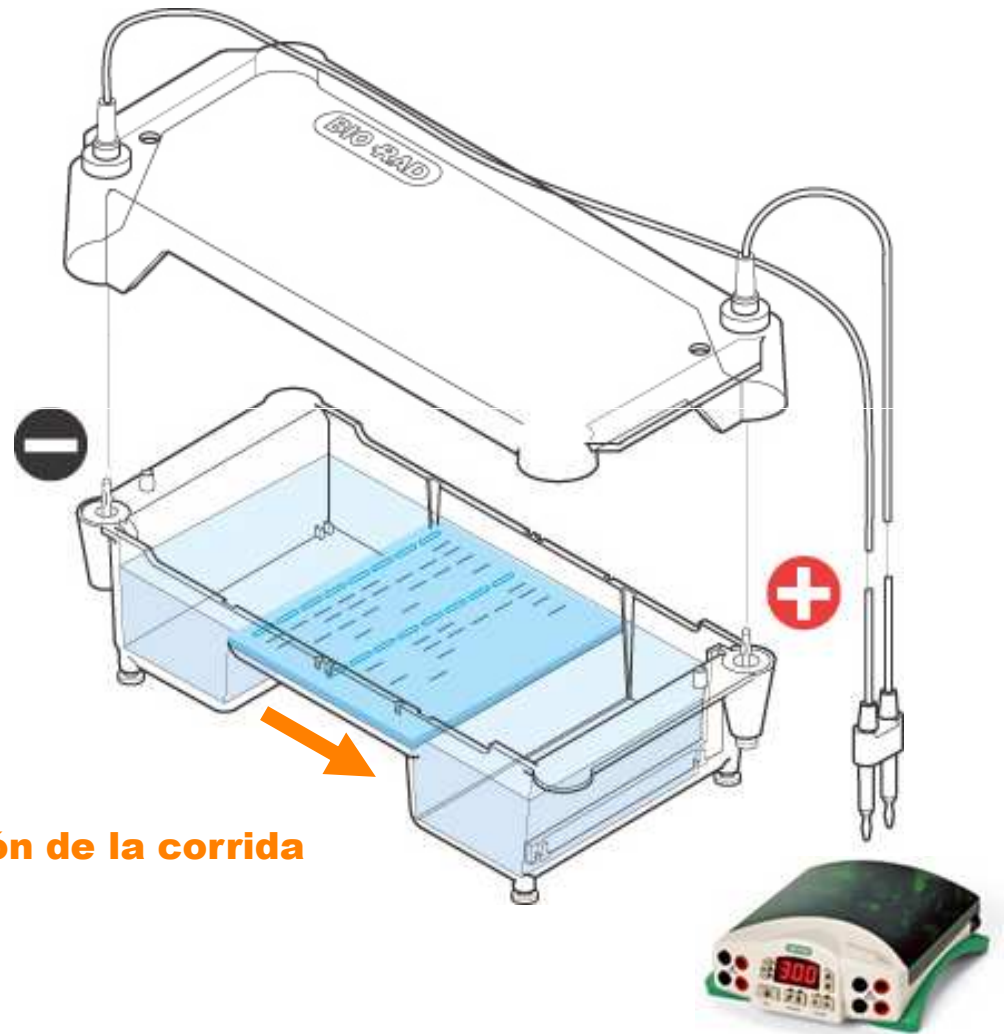
Se detectan los fragmentos específicos

# 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**

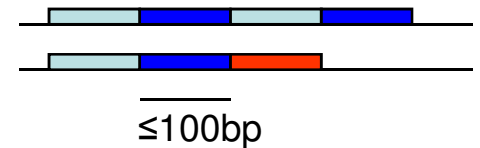
# Tipos de Polimorfismos

- 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

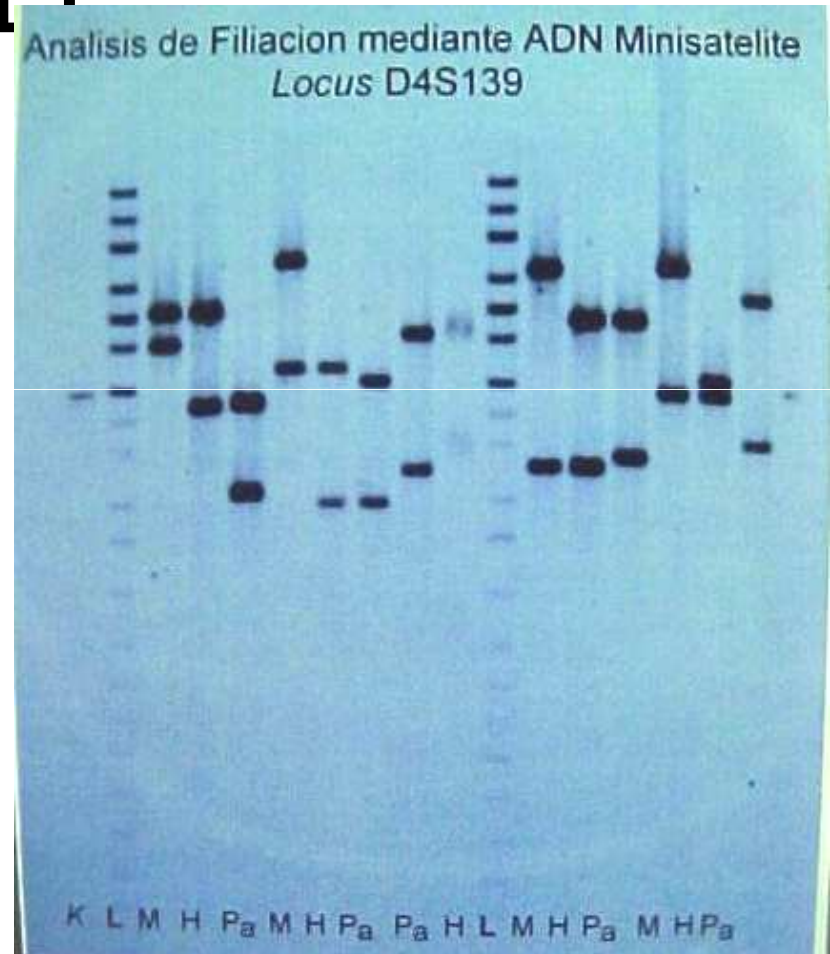
TGCATT----TAGGC  
TGCATT**CCG**TAGGC

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



# Análisis de Minisatélites por RFLP

- Permite el análisis de vínculo biológico de parentesco.

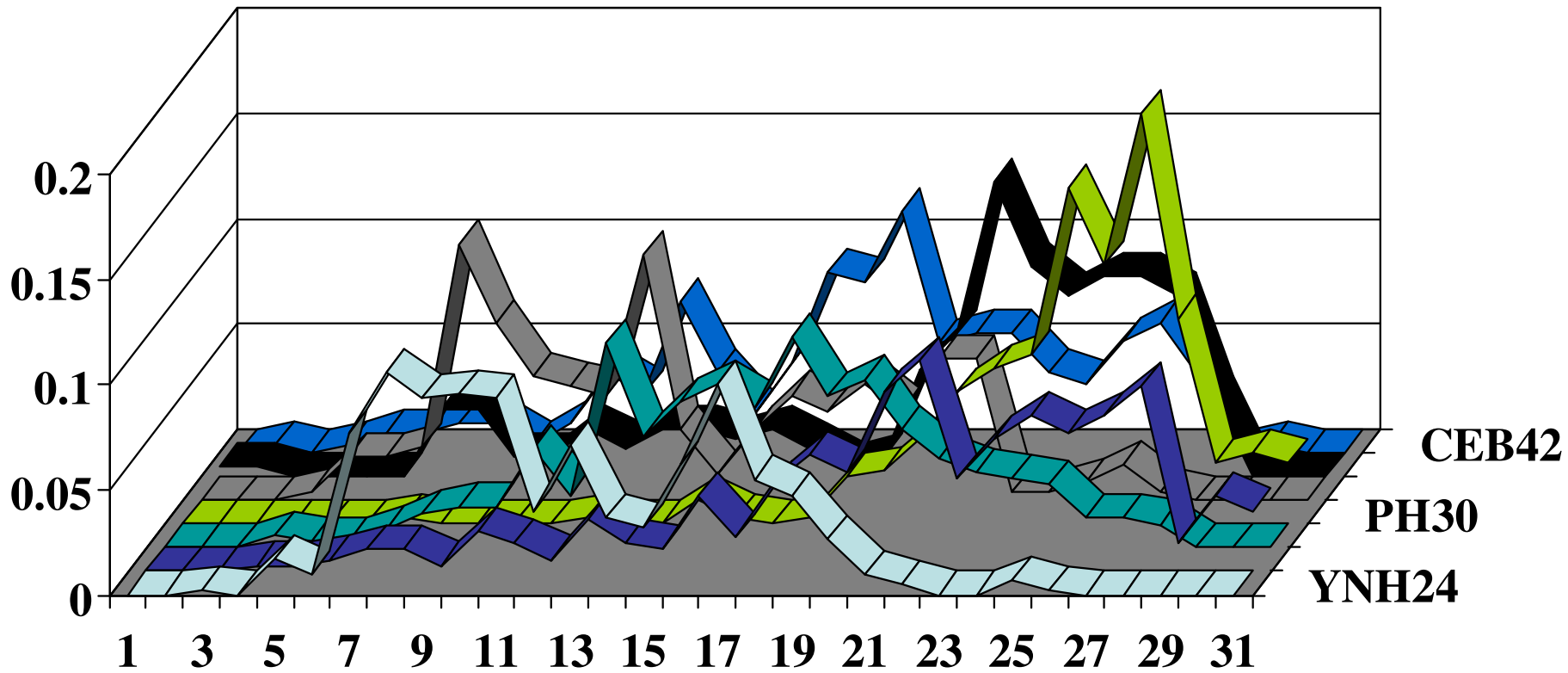




**Table 1. Racial Population Distribution for Madrid, Buenos Aires Metropolitan Population\***

| 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

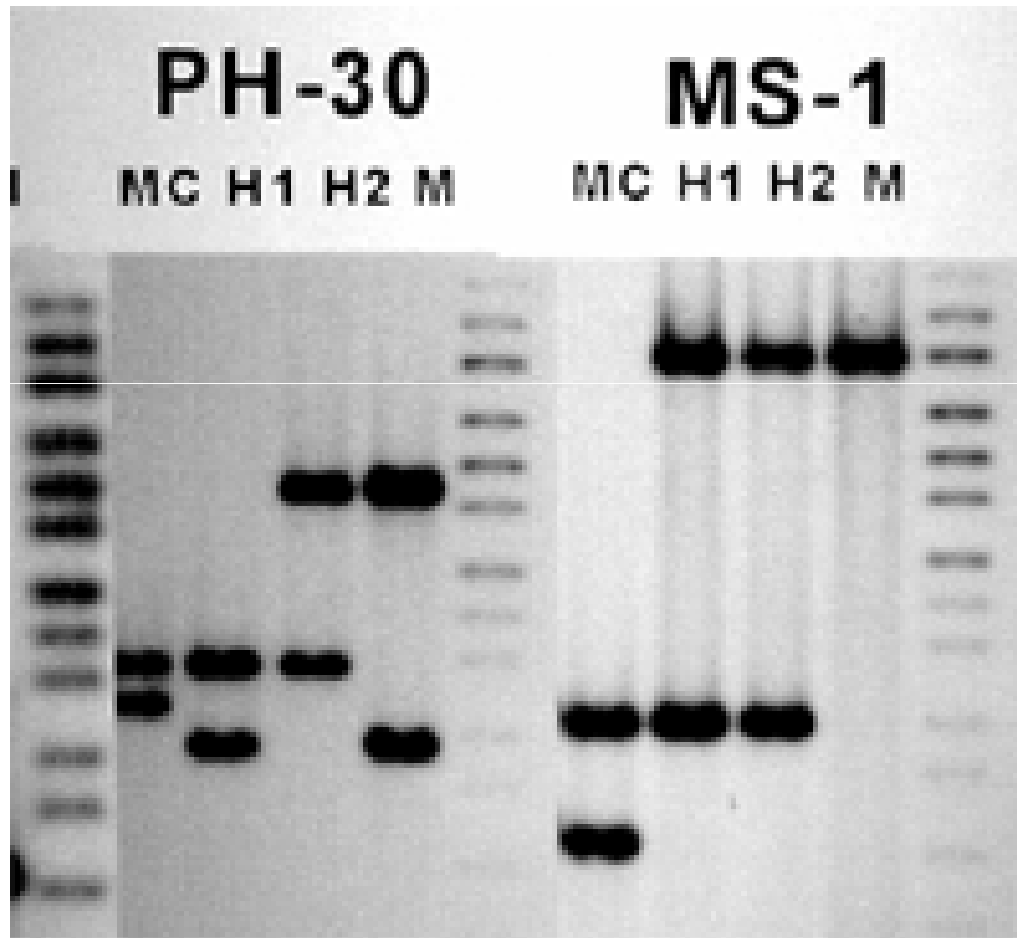
H

PA



*INCLUSION*

# Tipo de perfil observado en una inclusión de vínculo



# Resultados en un estudio de paternidad

M

H

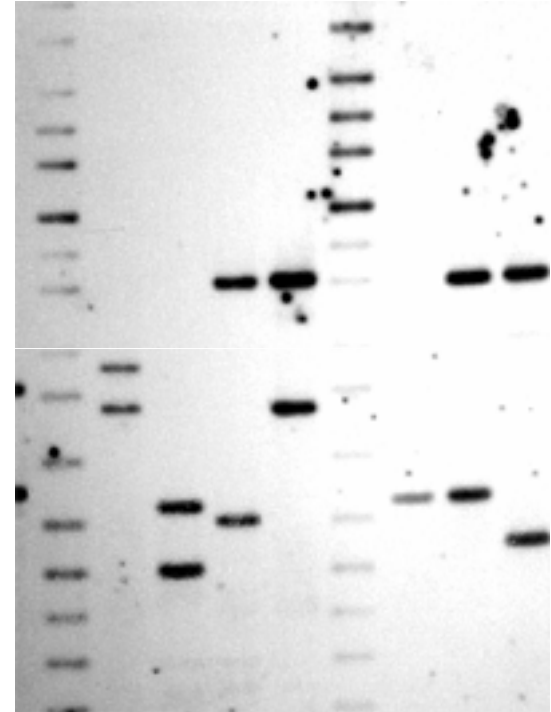
PA



***EXCLUSION***

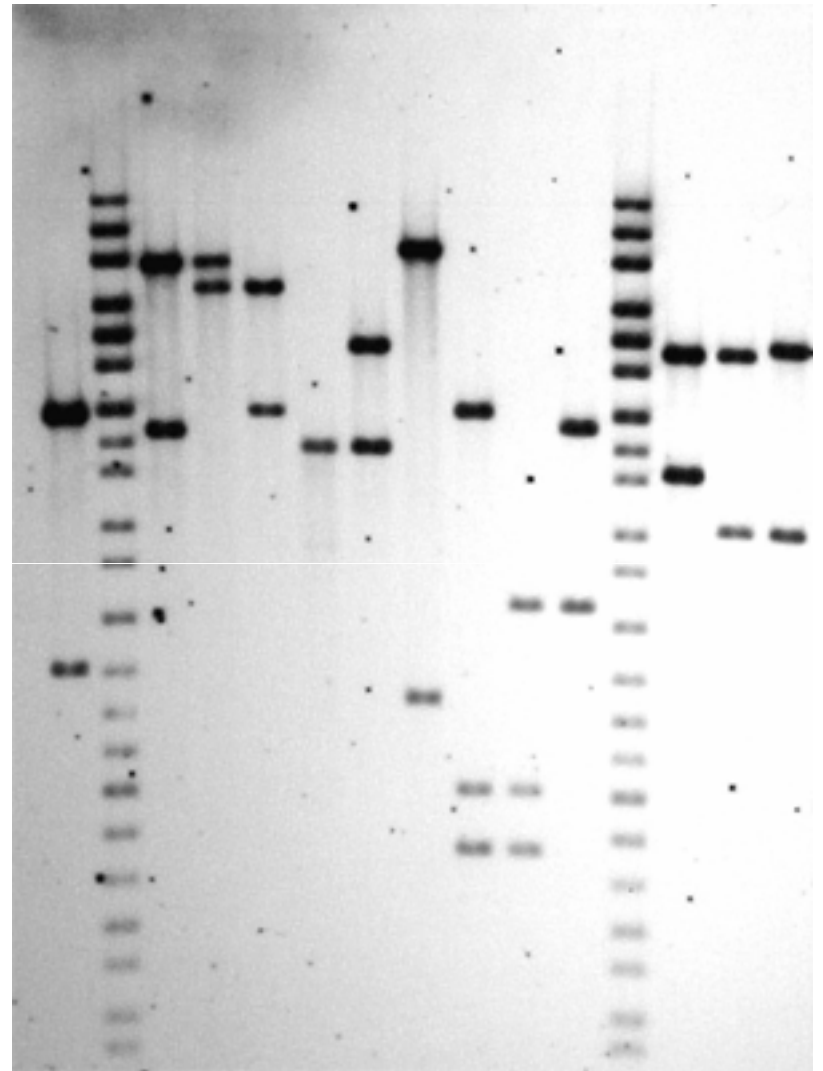
# MUTACION!

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

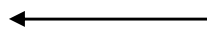


Alelo 1



Alelo 2

Iniciador Reverso

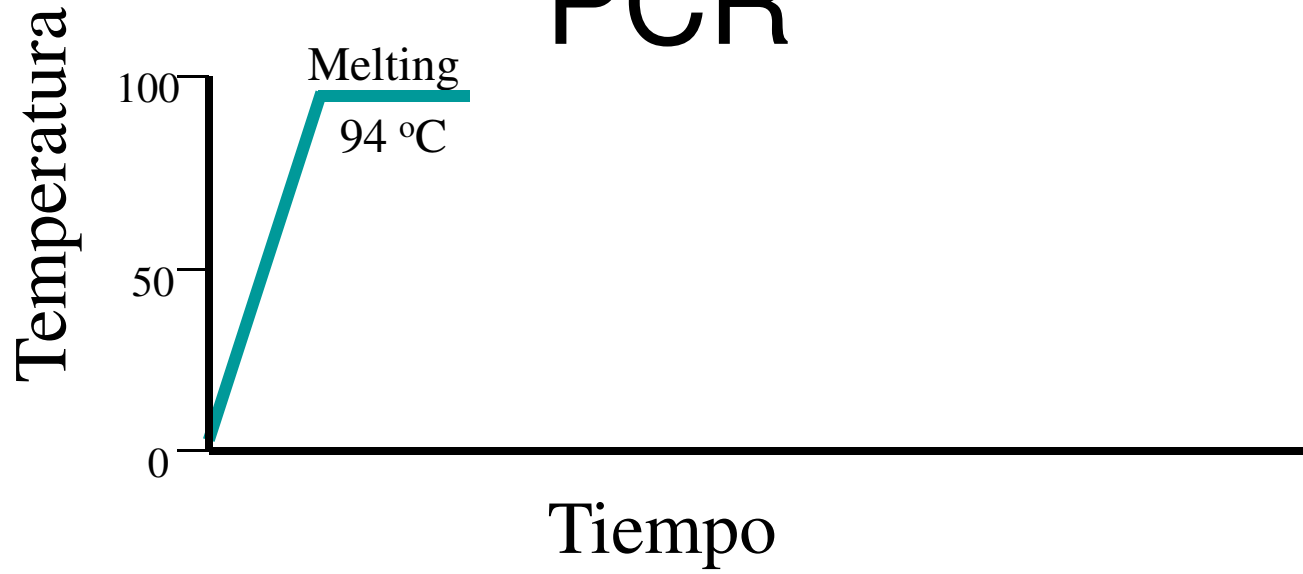


Unidad de Repetición (2 a 7 pb)

## 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

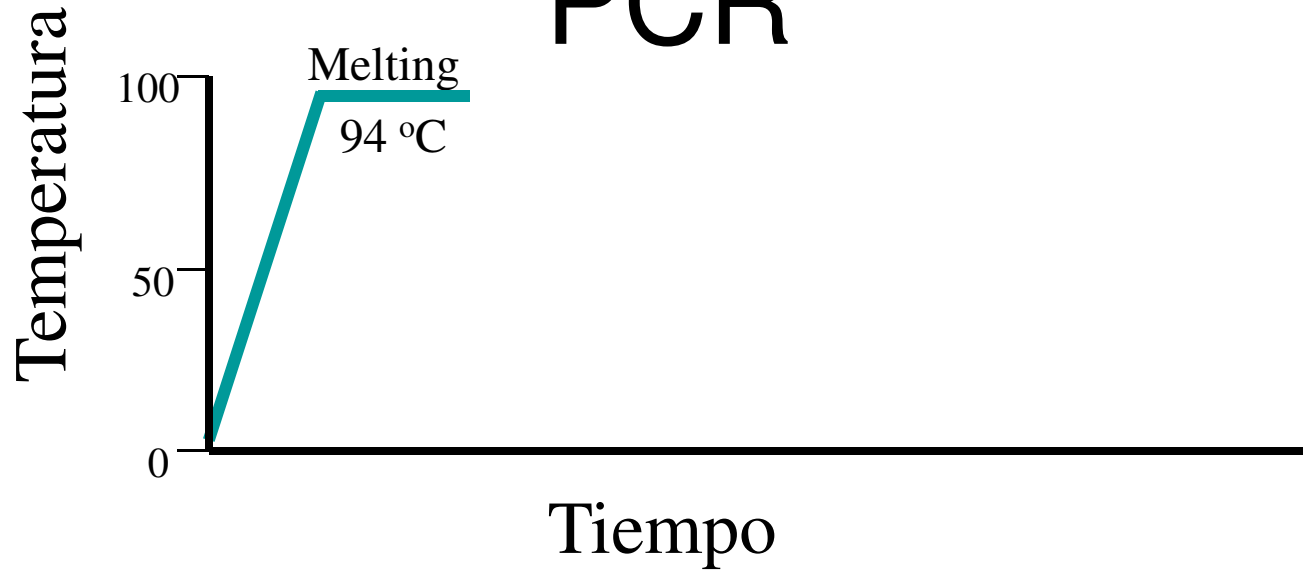
# PCR



DNA de cadena  
doble



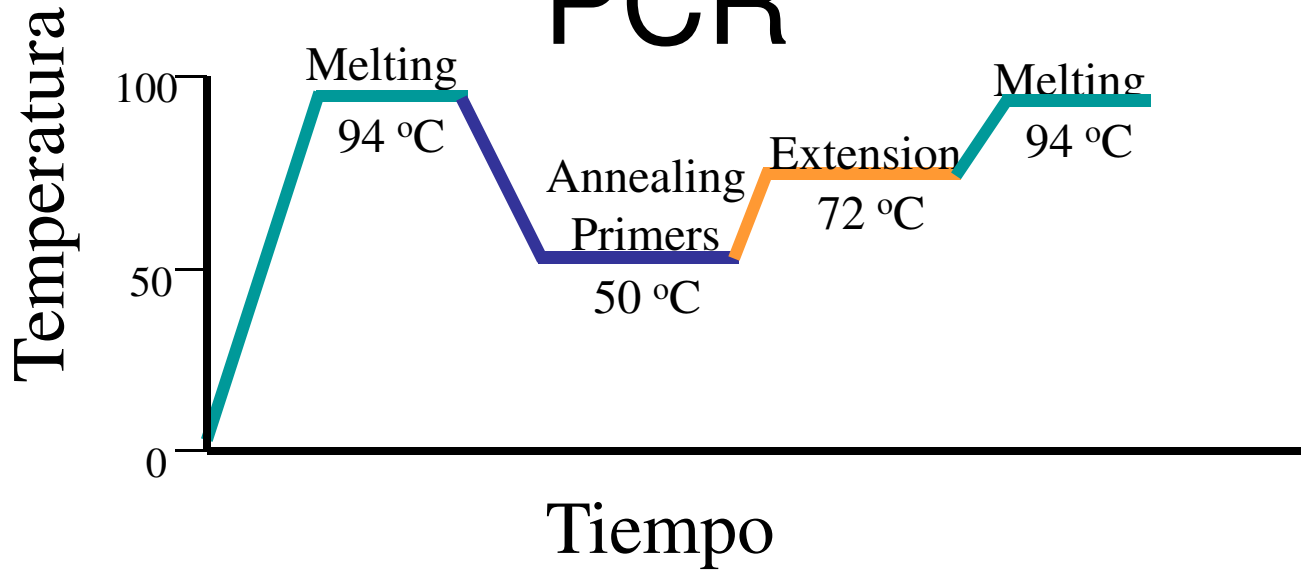
# PCR



DNA de  
cadena simple



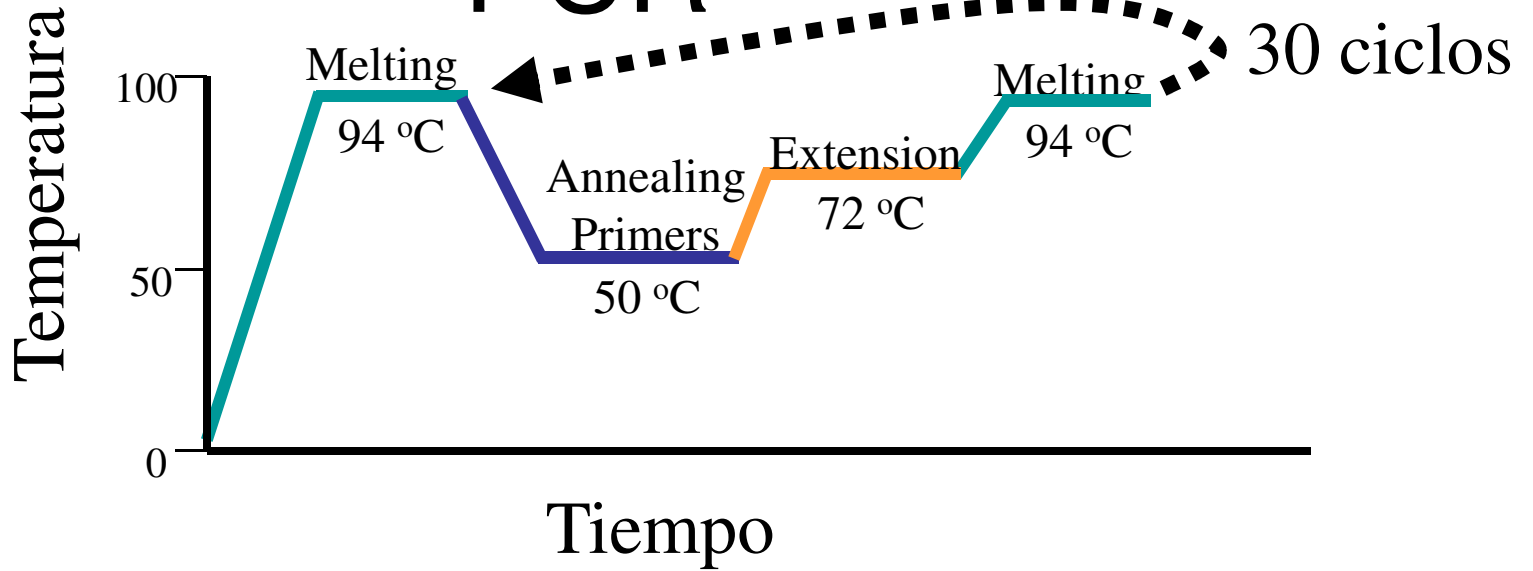
# PCR



Hibridación  
de primers



# PCR



3' ————— 5'

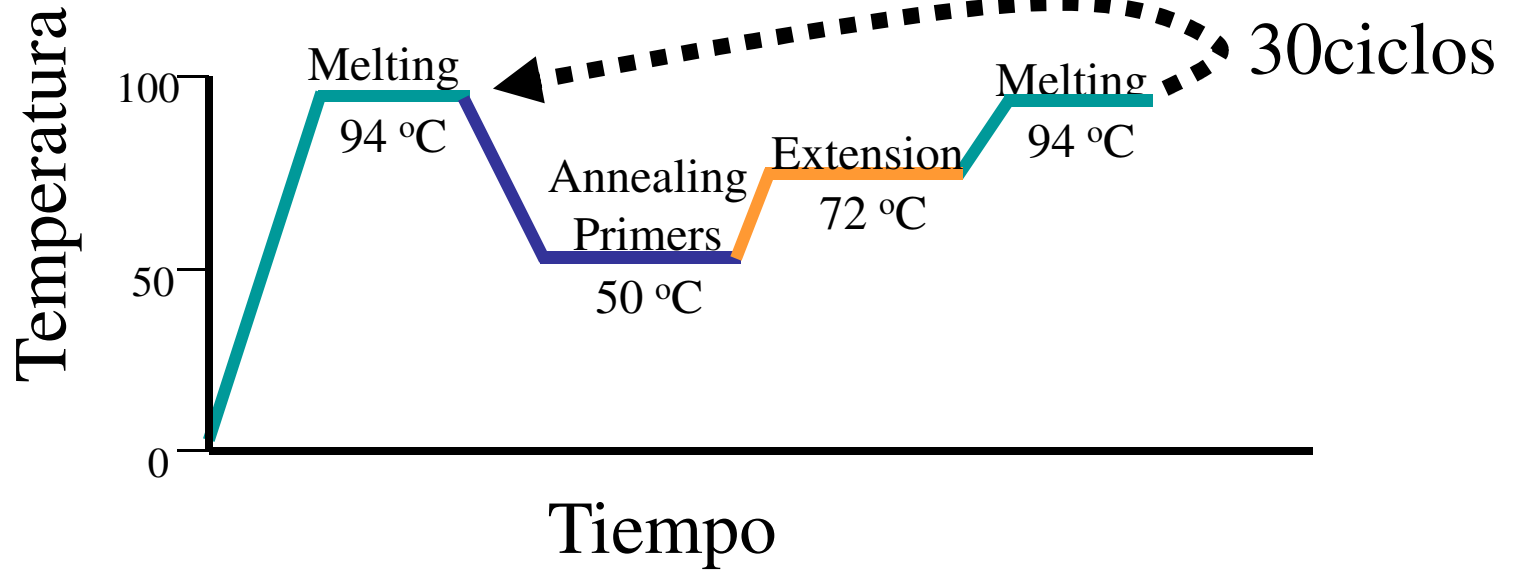


←————— 5'



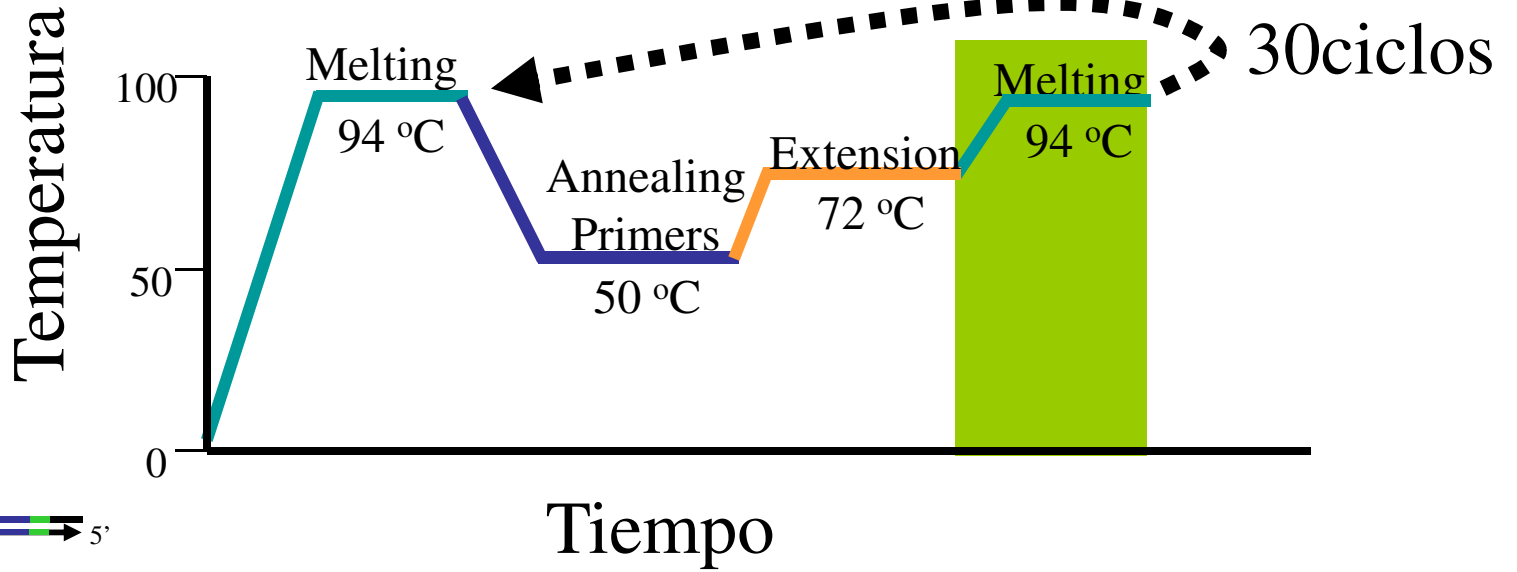
5'  
5' ————— 3'

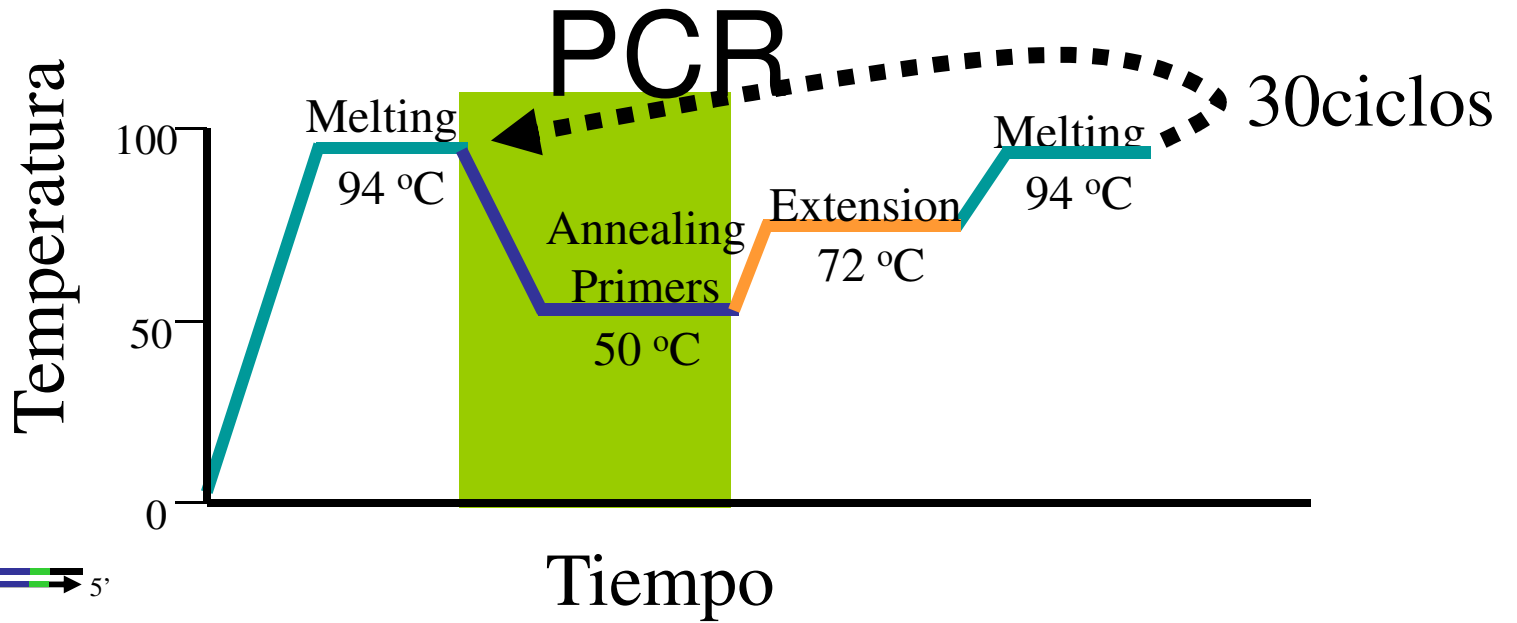
# PCR



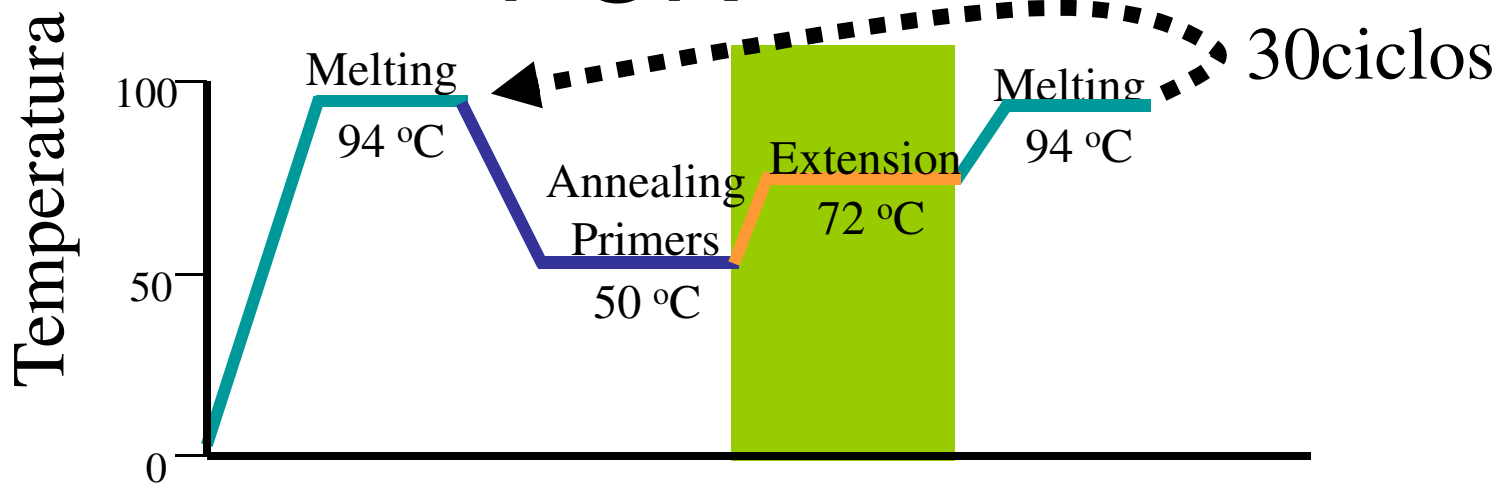


# PCR





# PCR



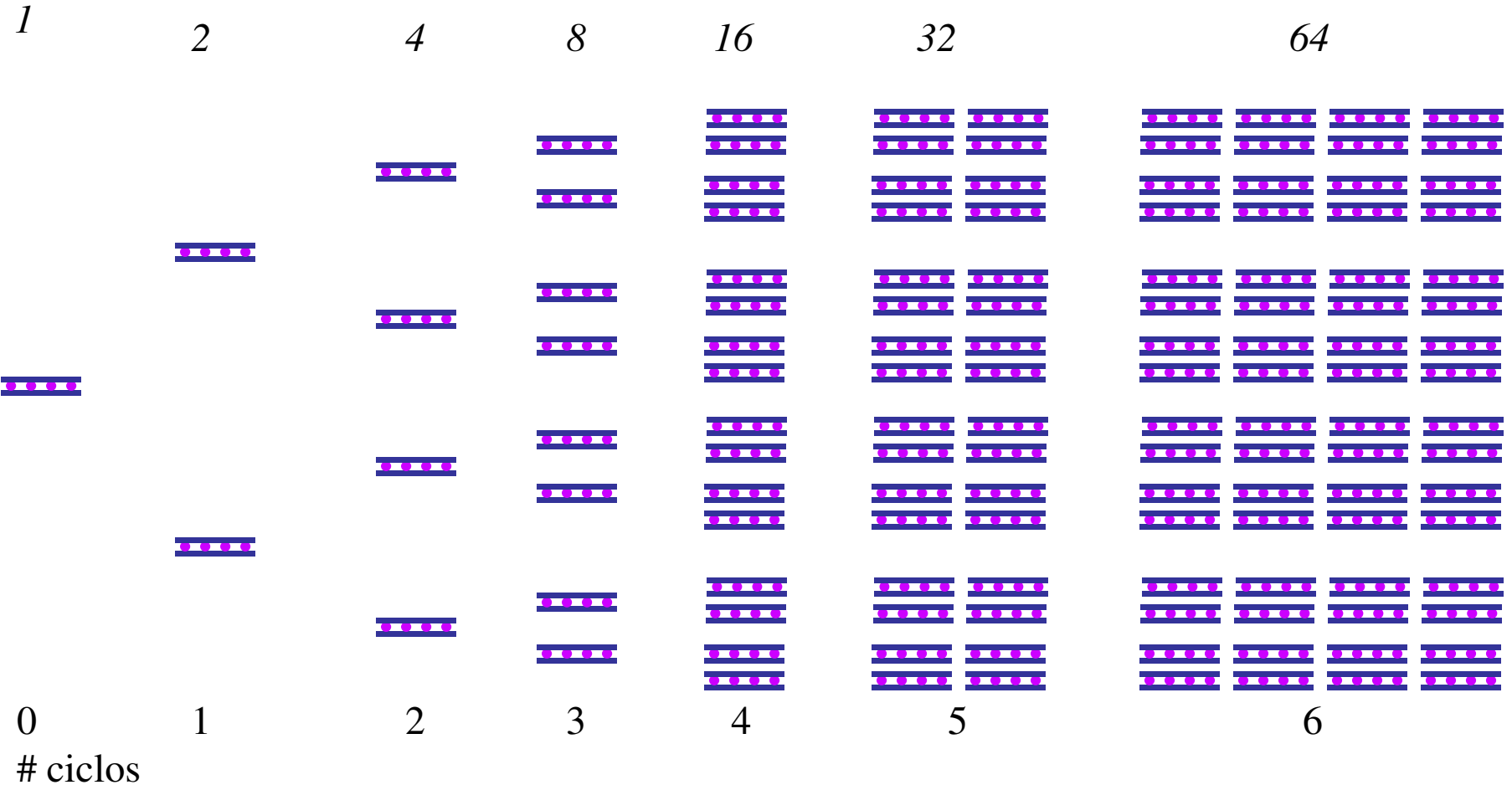
Fragmentos de tamaño definido

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

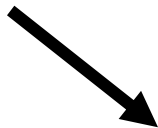
Separación y Detección de los Productos de PCR (Alelos deSTR)



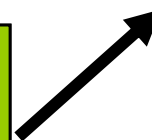
Determinación del Genotipo.

## 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

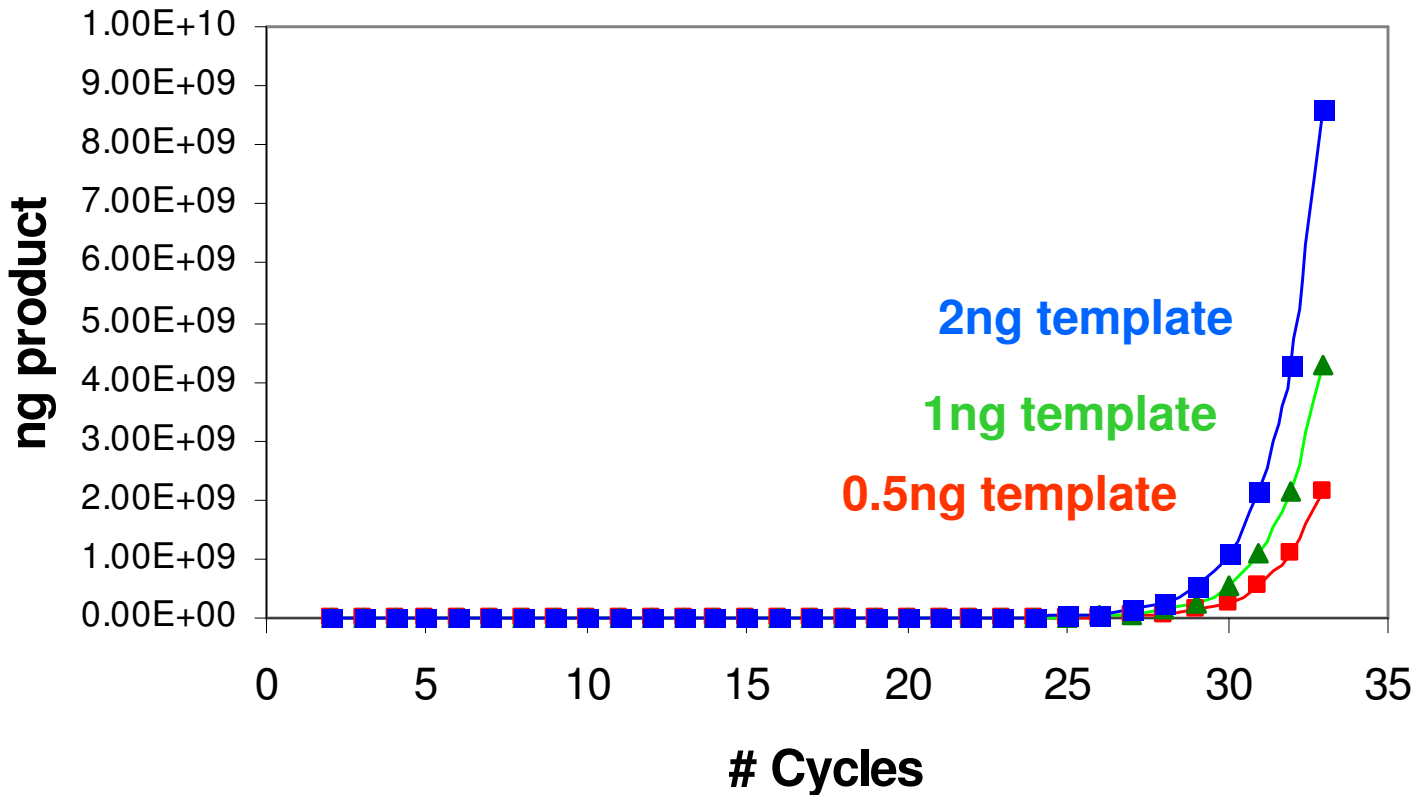
- Cuarificación del ADN Humano
- Detección de ADN Masculino
- Detección de Inhibidores
- Análáís de STRs
- Secuenciación
- Detección de SNPs

| 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



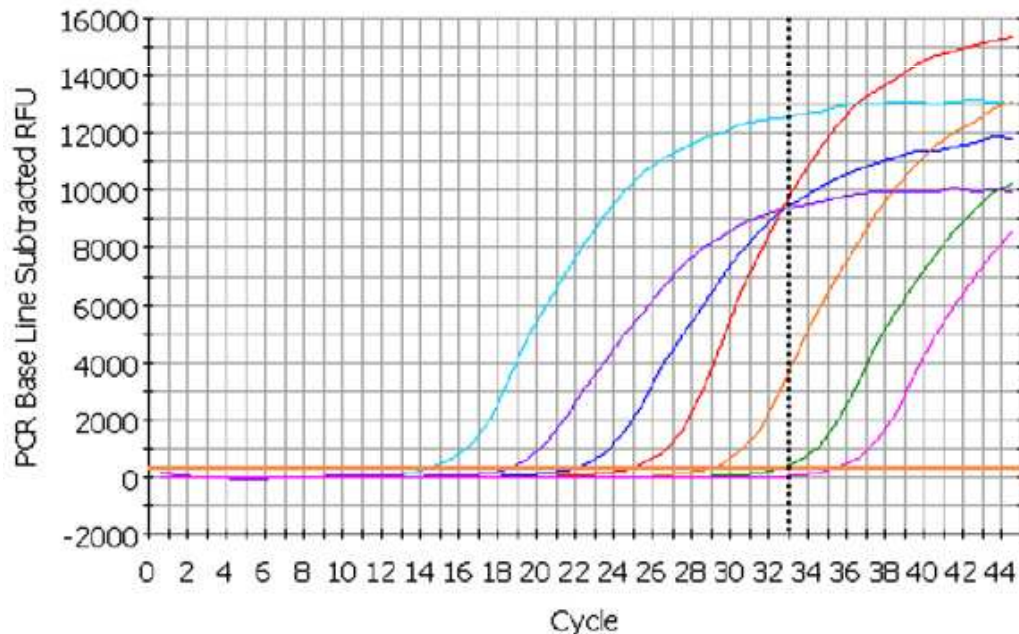
# PCR plateau

- 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

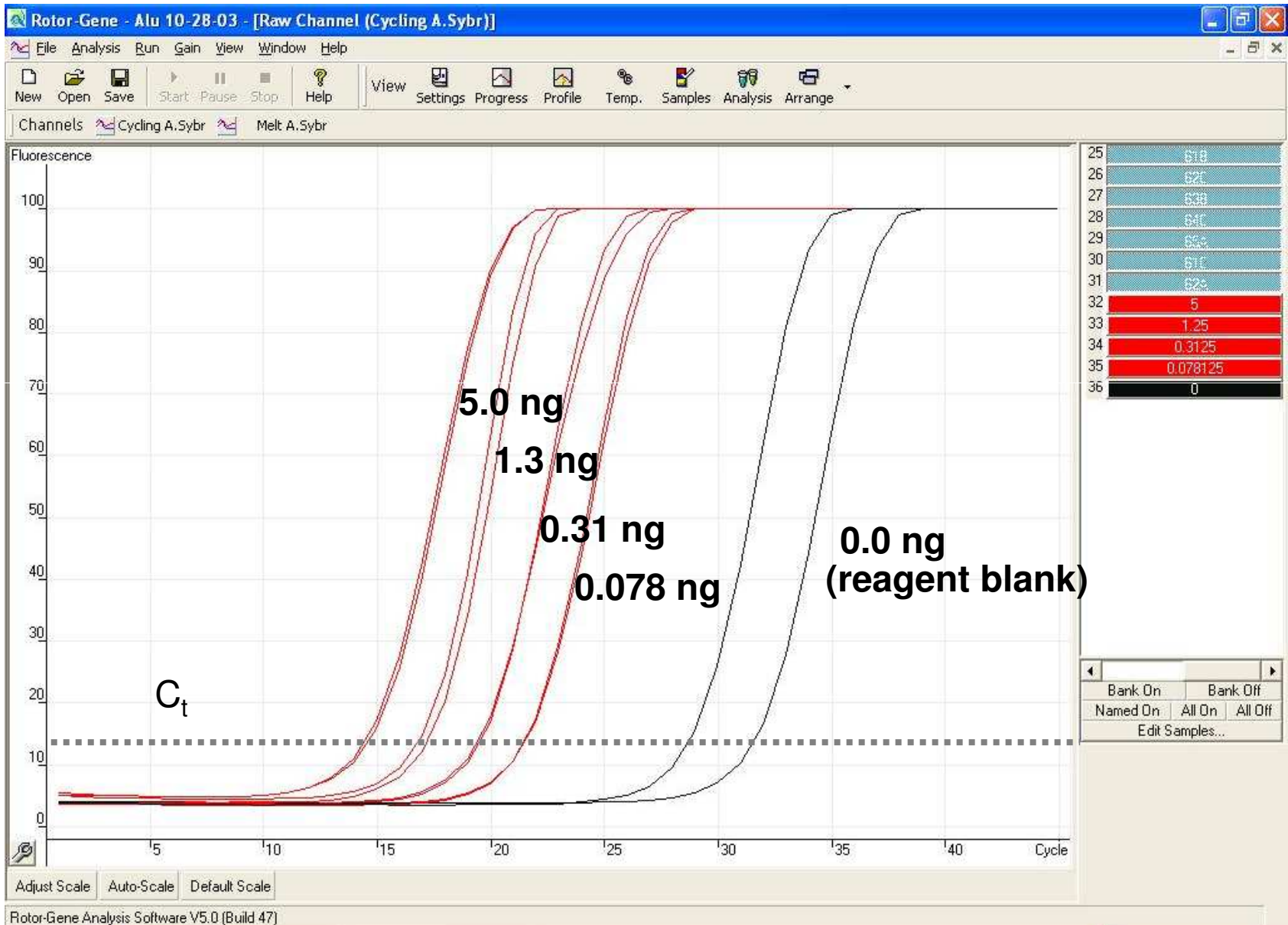
- Cuantificación de DNA se basa en el # de ciclos necesarios para alcanzar una intensidad umbral,  $C_t$ .
- Cuanto mayor sea la cantidad de ADN de partida tanto más rápido se alcanzará el umbral.



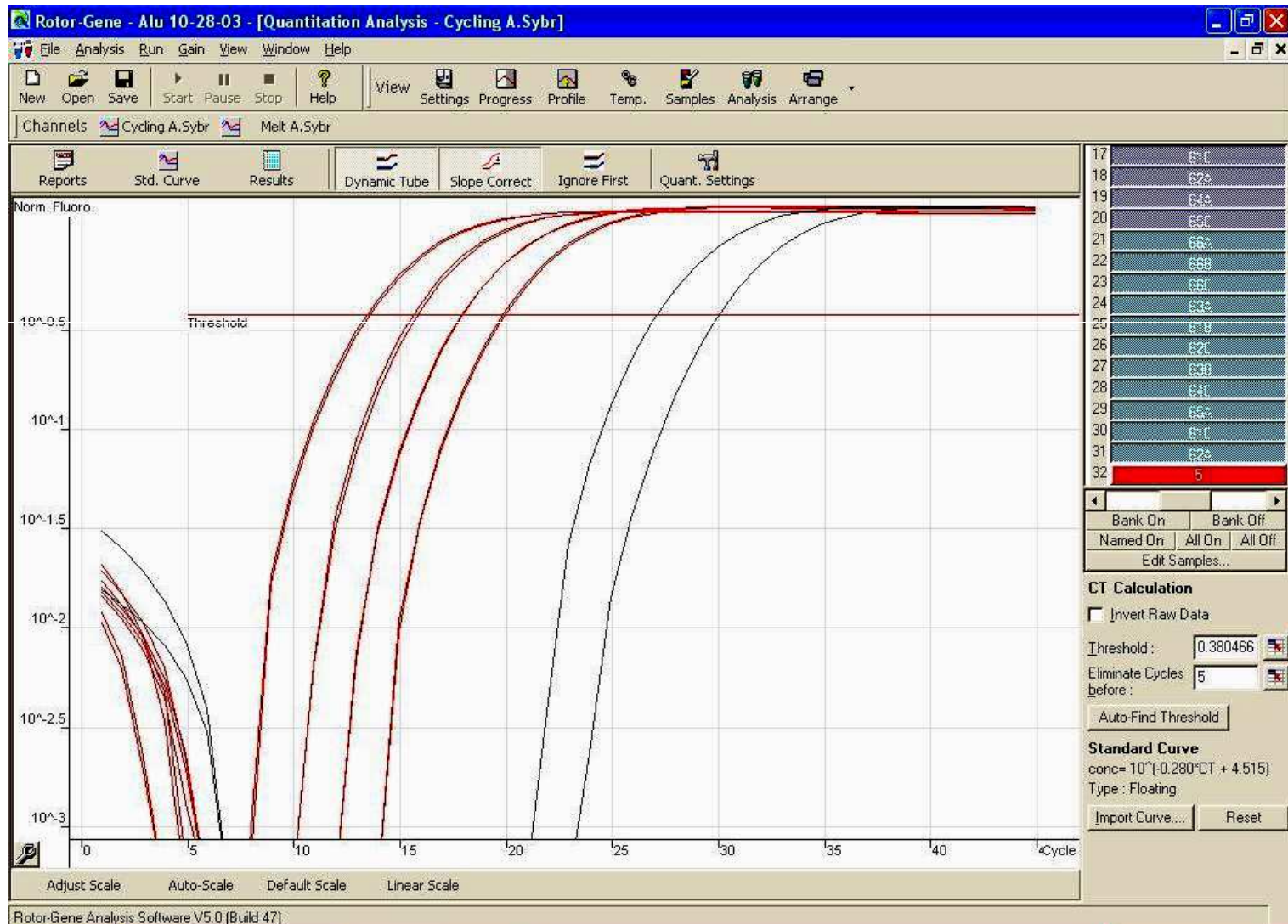
$C_t$

SERIES OF 10-FOLD DILUTIONS

# Desarrollo de una Curva Standard

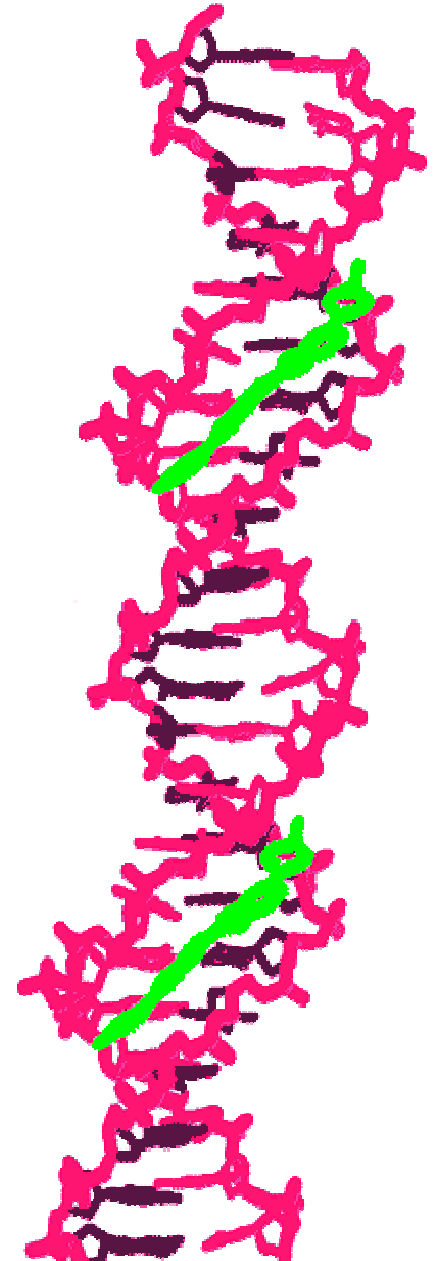


# Los datos se grafican en escala Log y el # de ciclos requeridos para alcanzar el $C_t$ .

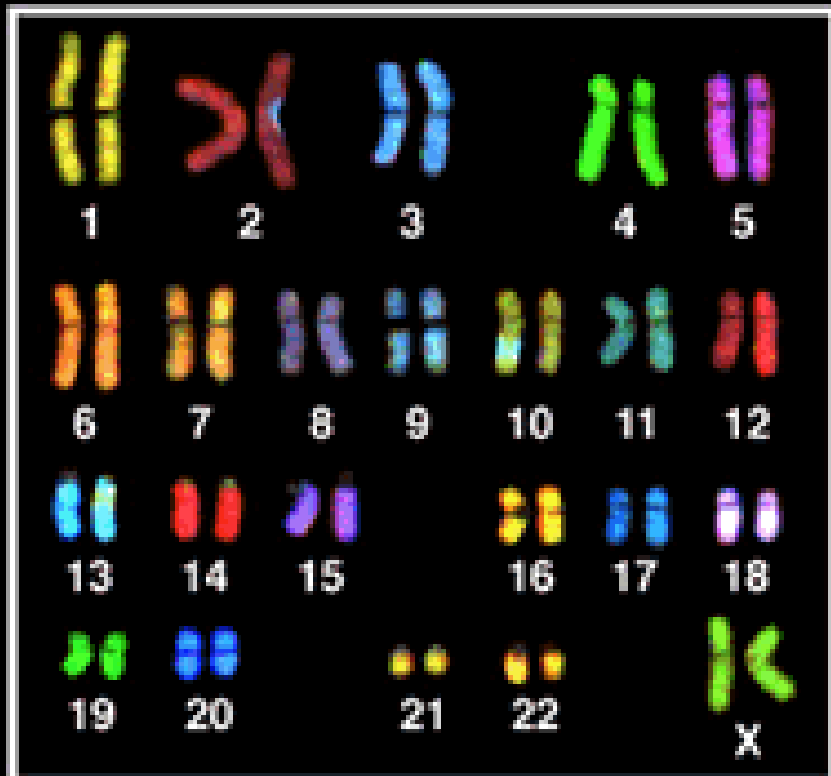
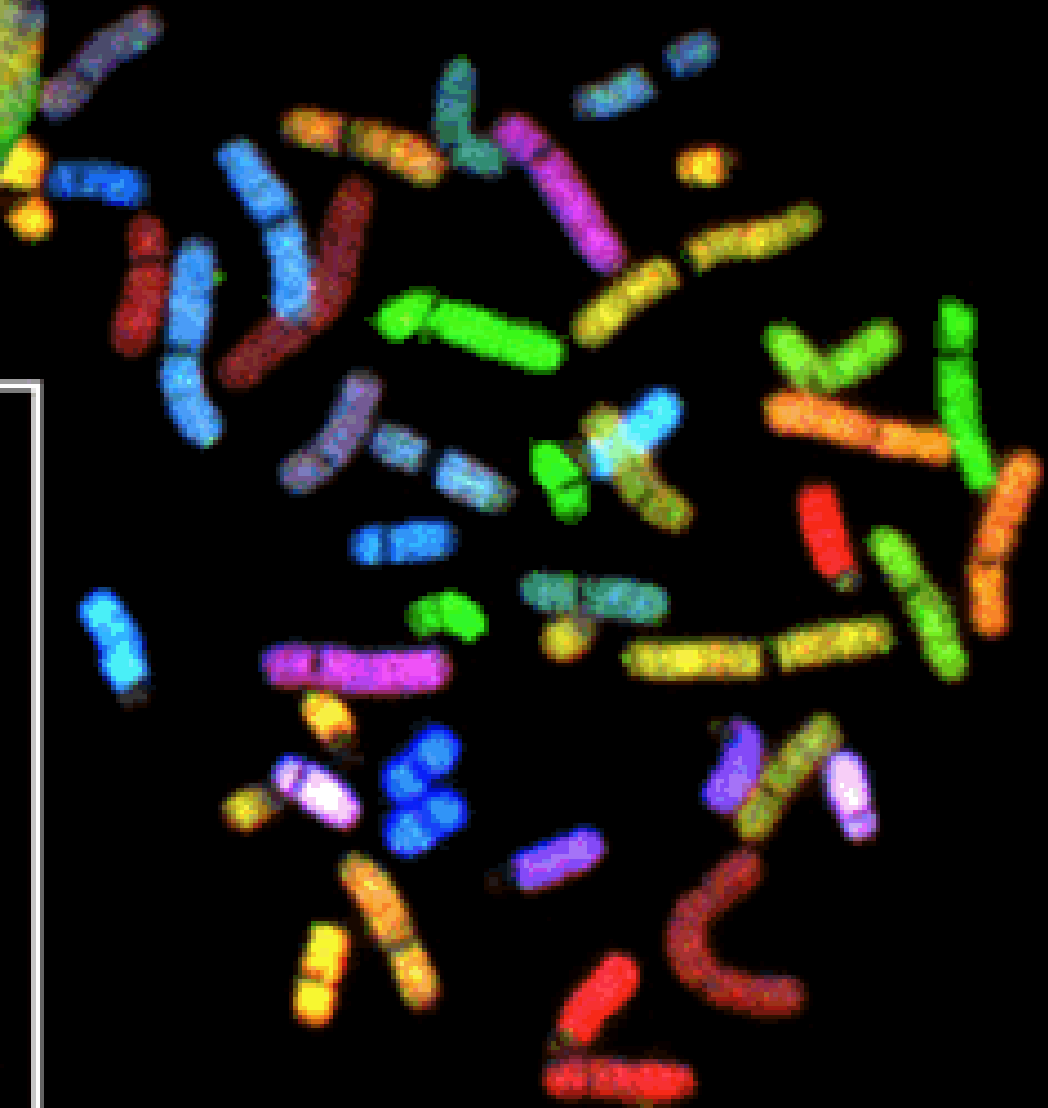
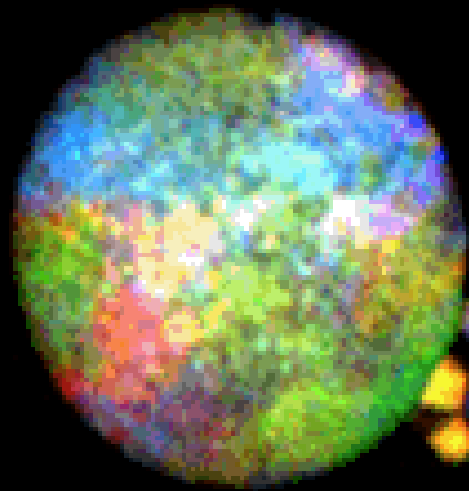


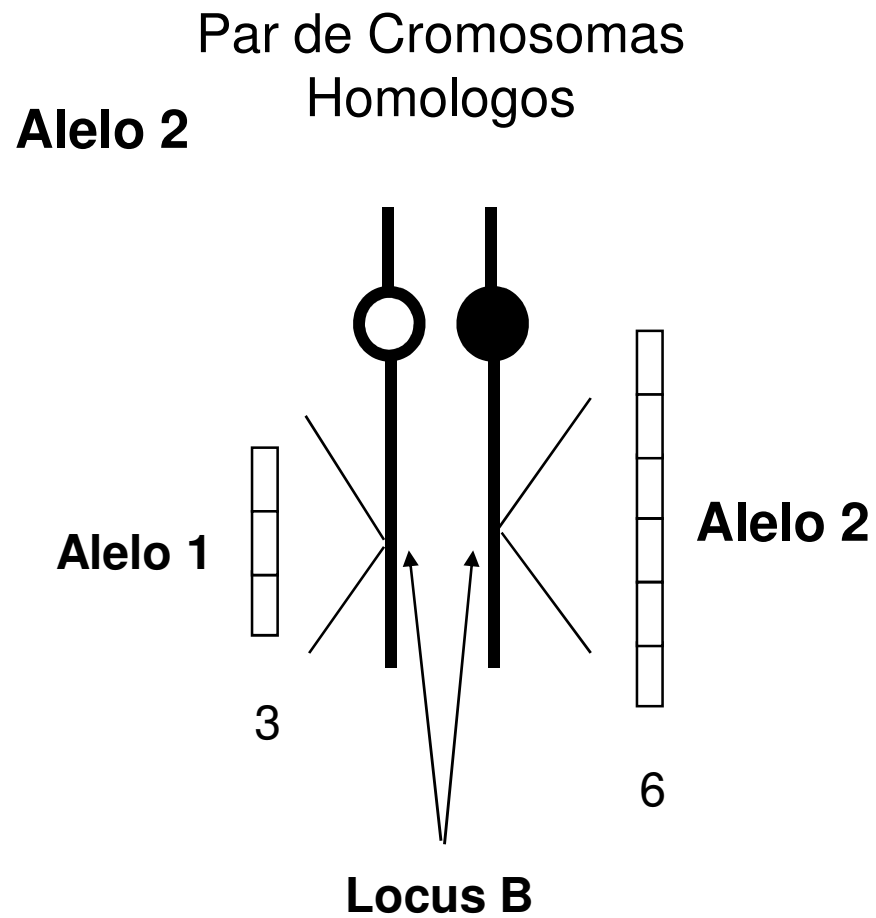
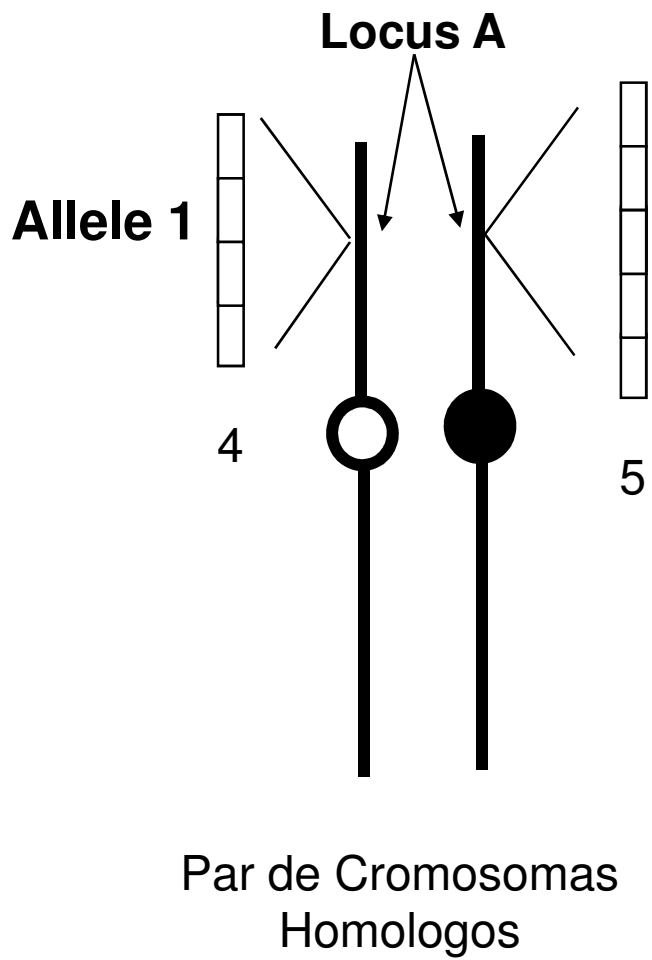
# SYBR<sup>TM</sup> Green I

- ⊕ 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





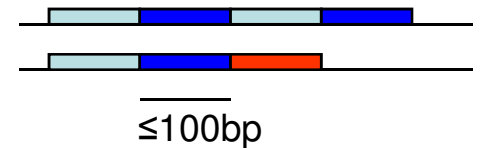
# Tipos de Polimorfismos

- 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

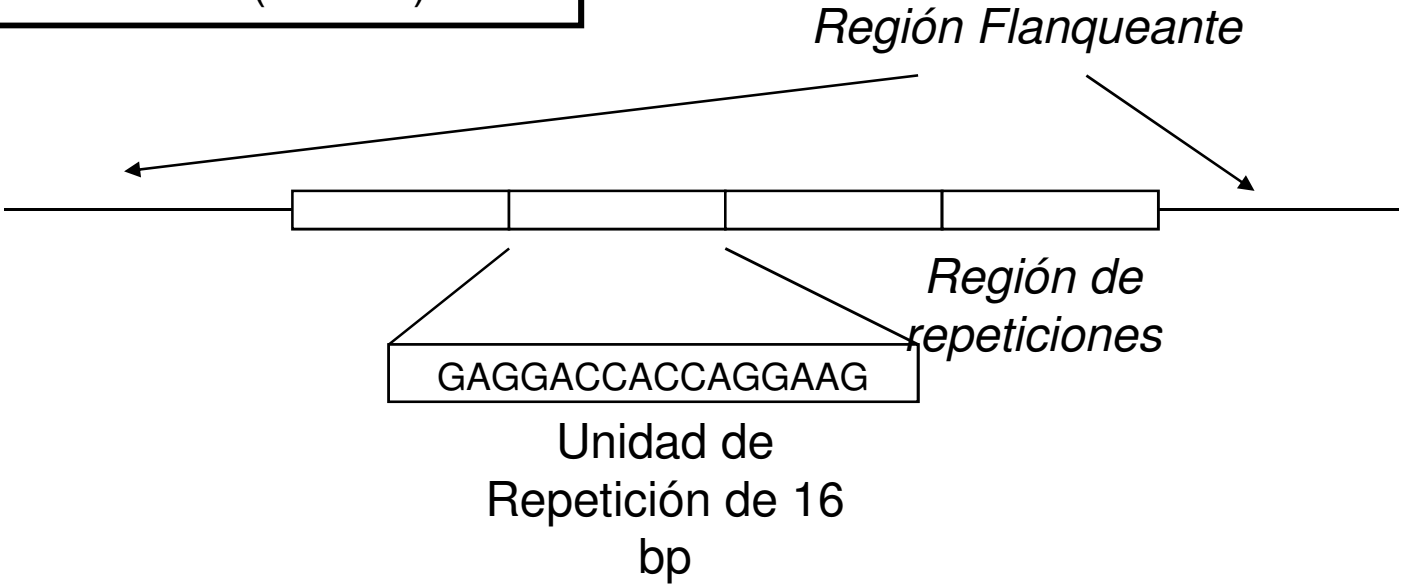
-----**(AATG)**(AATG)(AATG)-----  
*3 repeats*

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

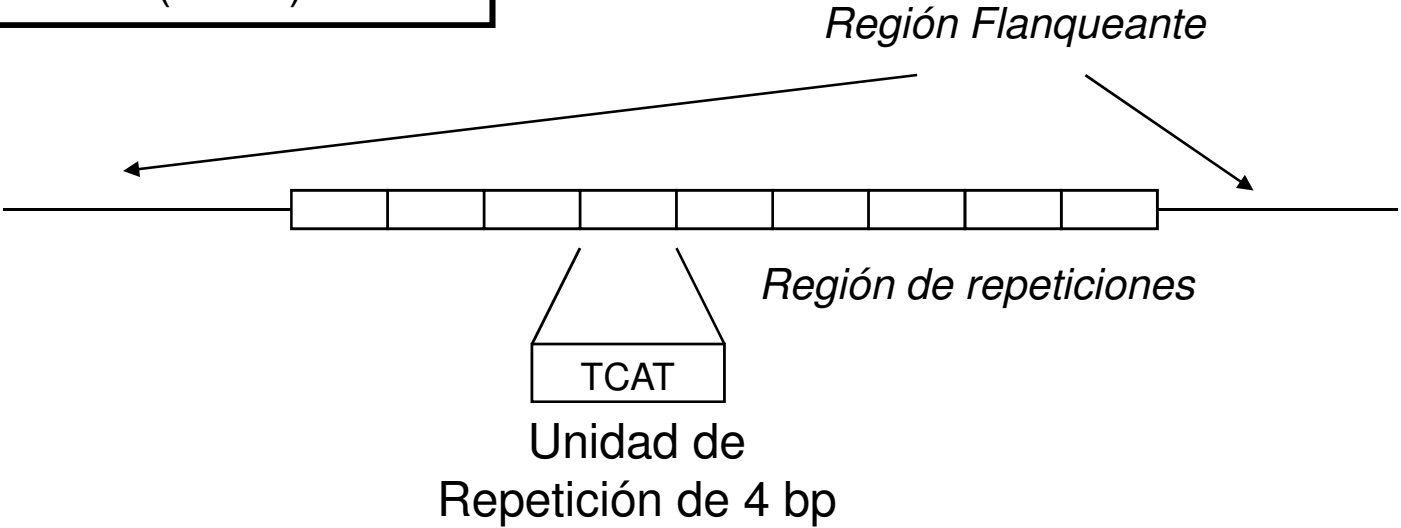
## (B) Polimorfismos de Secuencia

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

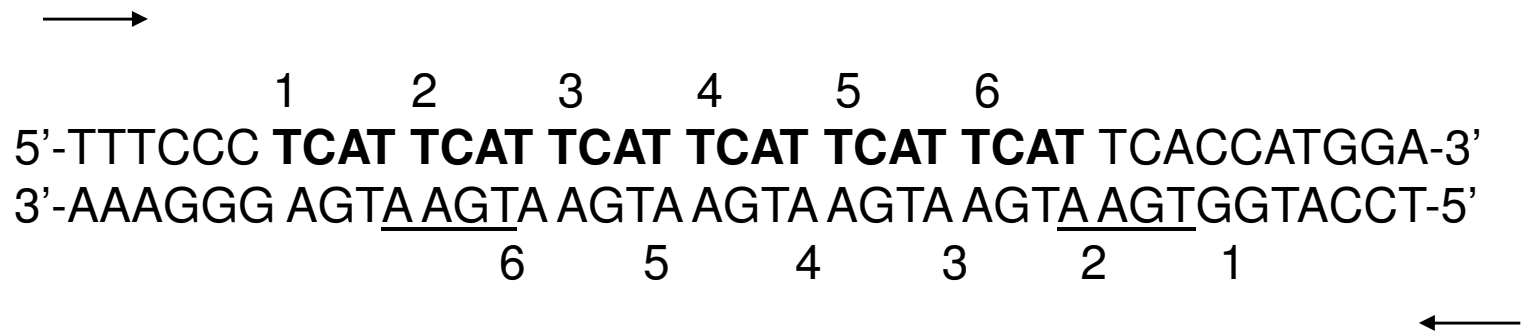
Minisatelite (D1S80)

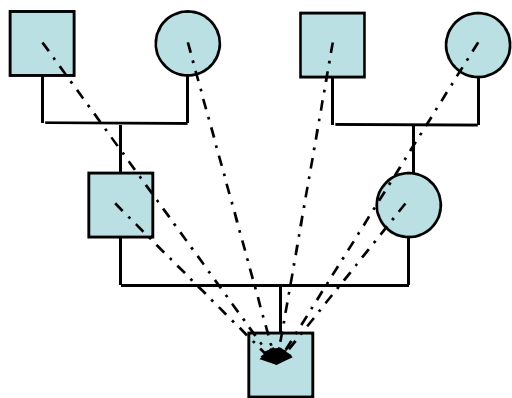


STR (TH01)

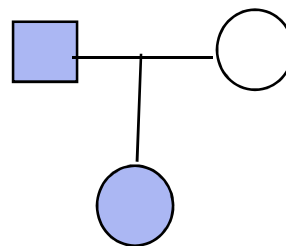
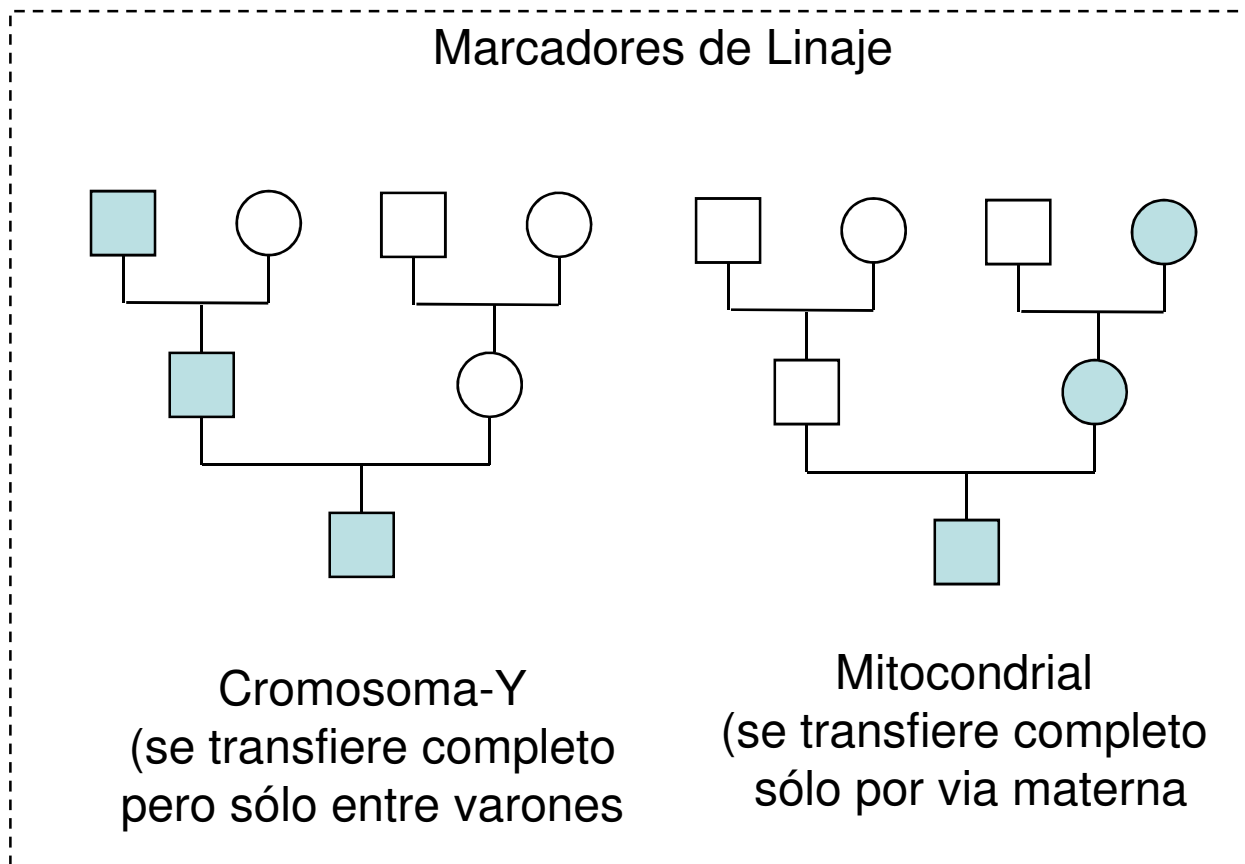


# Polimorfismo de Longitud (STR) Unidad de Repetición Tetranucleótido



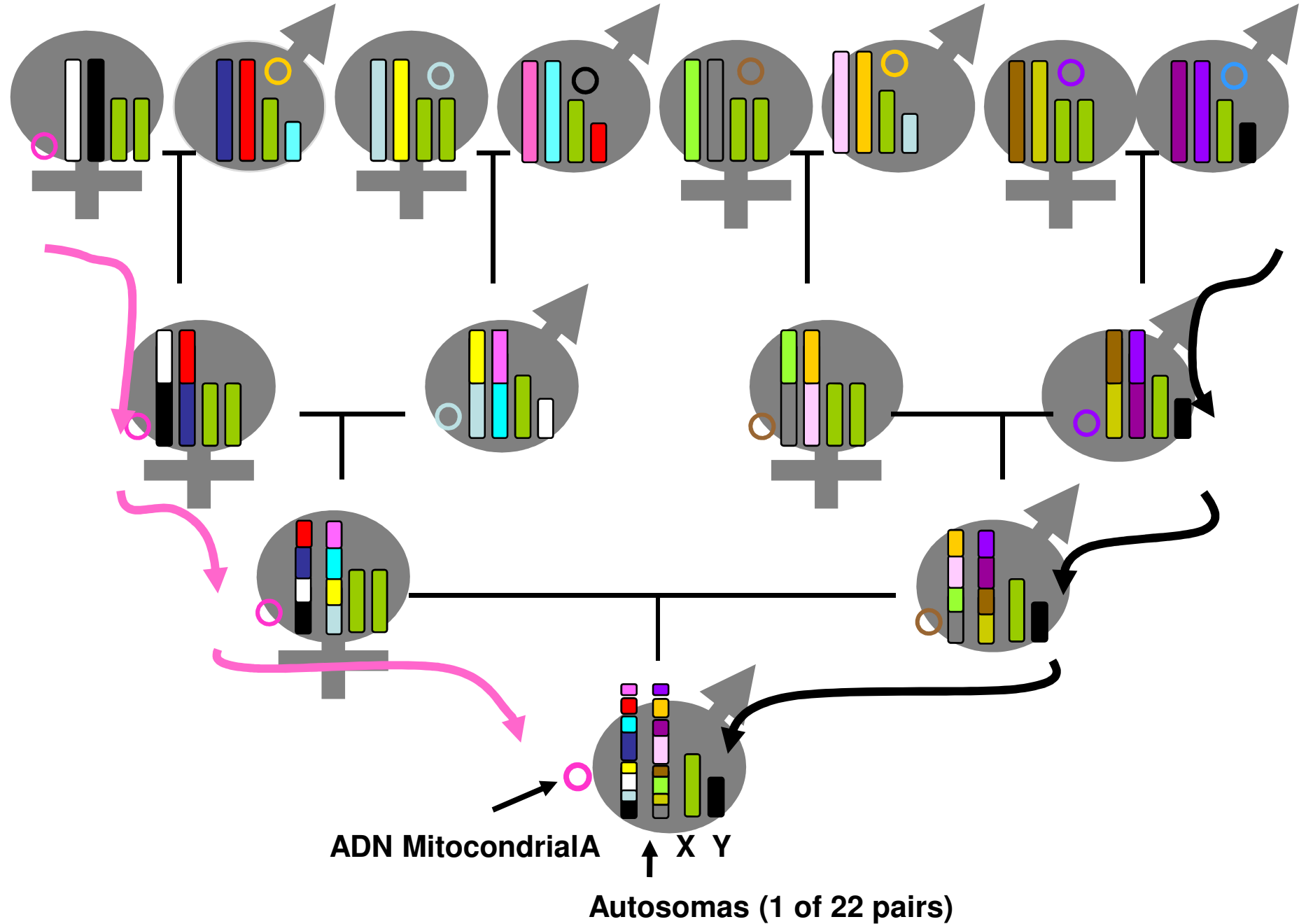


Autosomicos  
(se transfiere, en parte  
desde los ancestros)

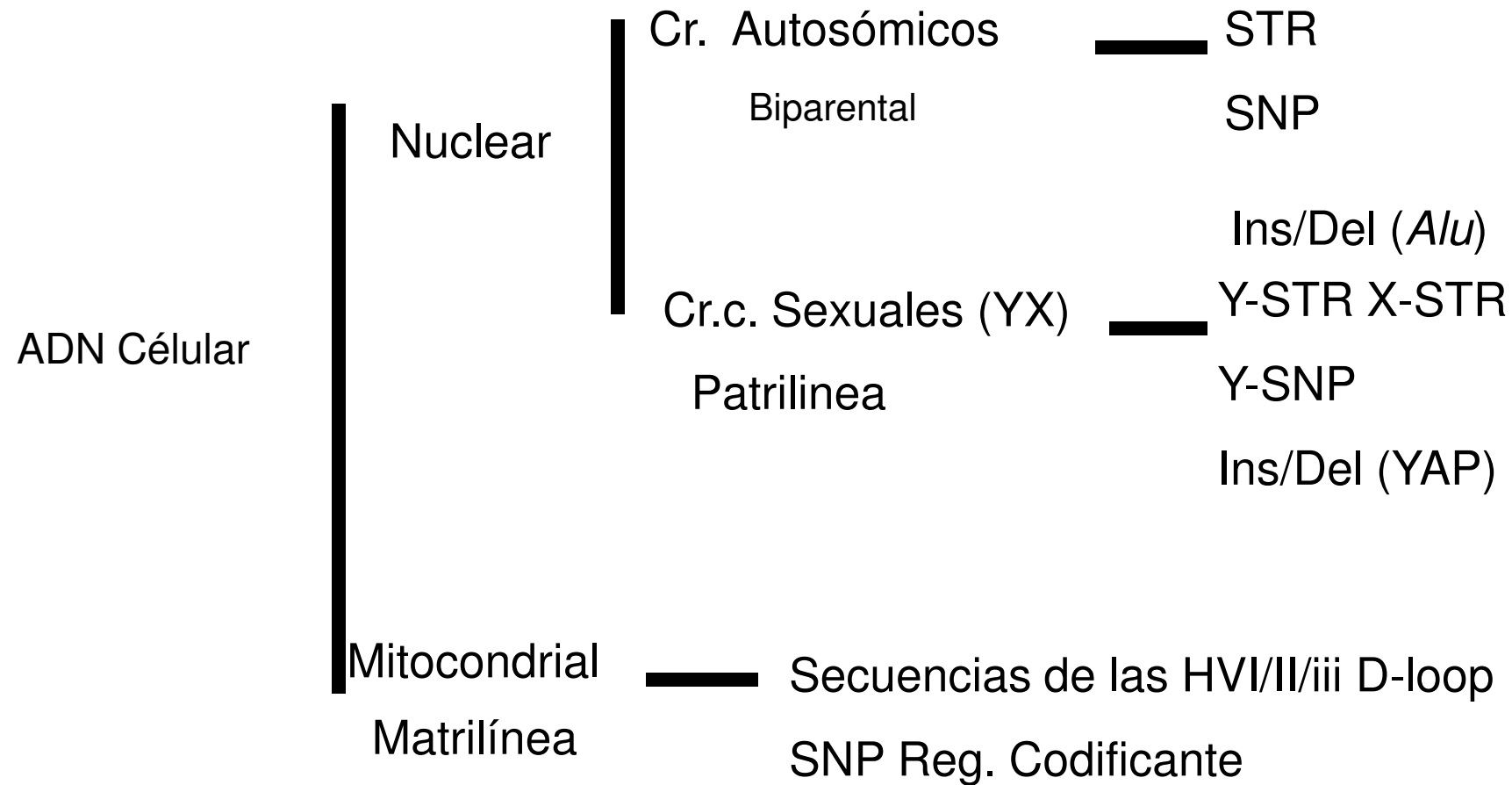


Cromosoma-X

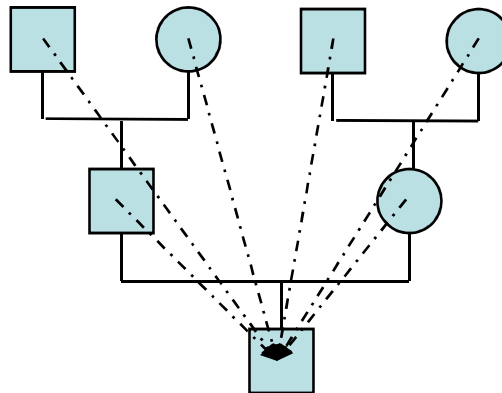
# Modos de heredabilidad de los ADNs celulares



# Marcadores Polimórficos en el ADN Celular

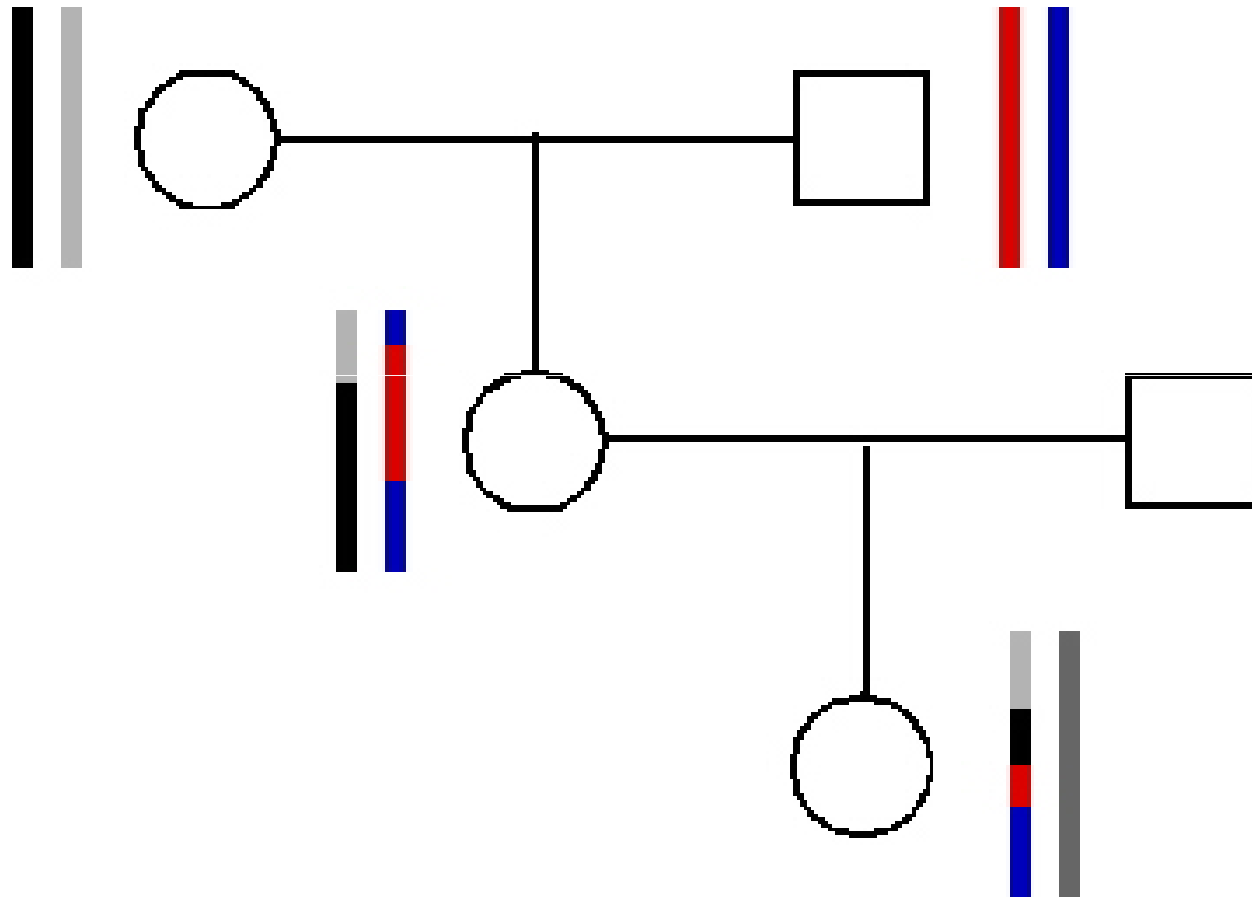


# Cromosomas Autosómicos



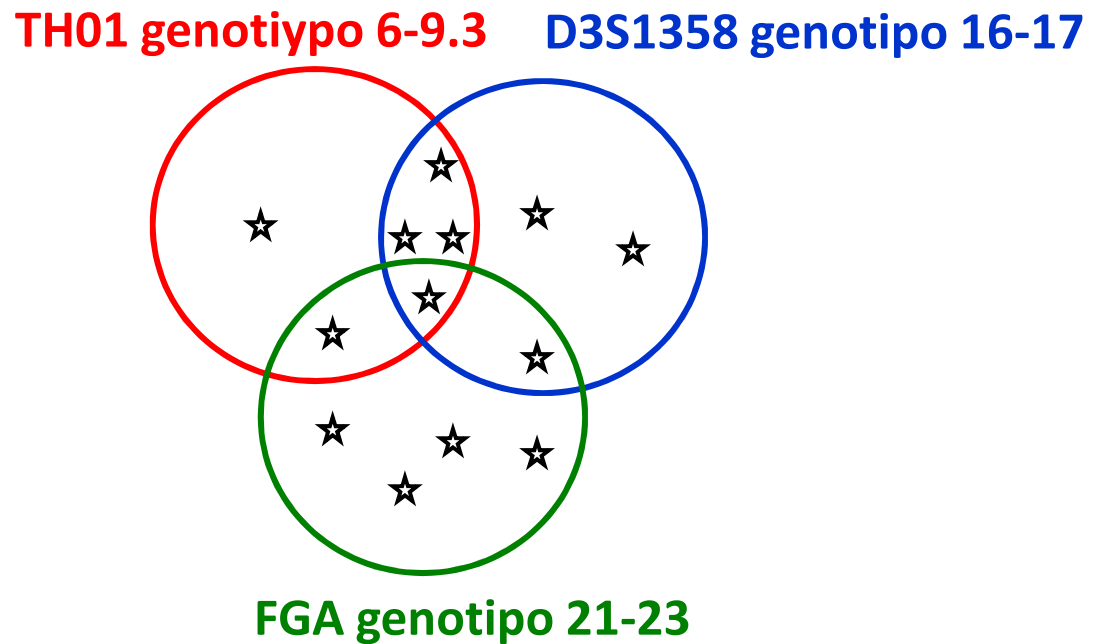
Se transfiere, en parte  
desde los ancestros

# La Meiosis Reordena los Cromosomas





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



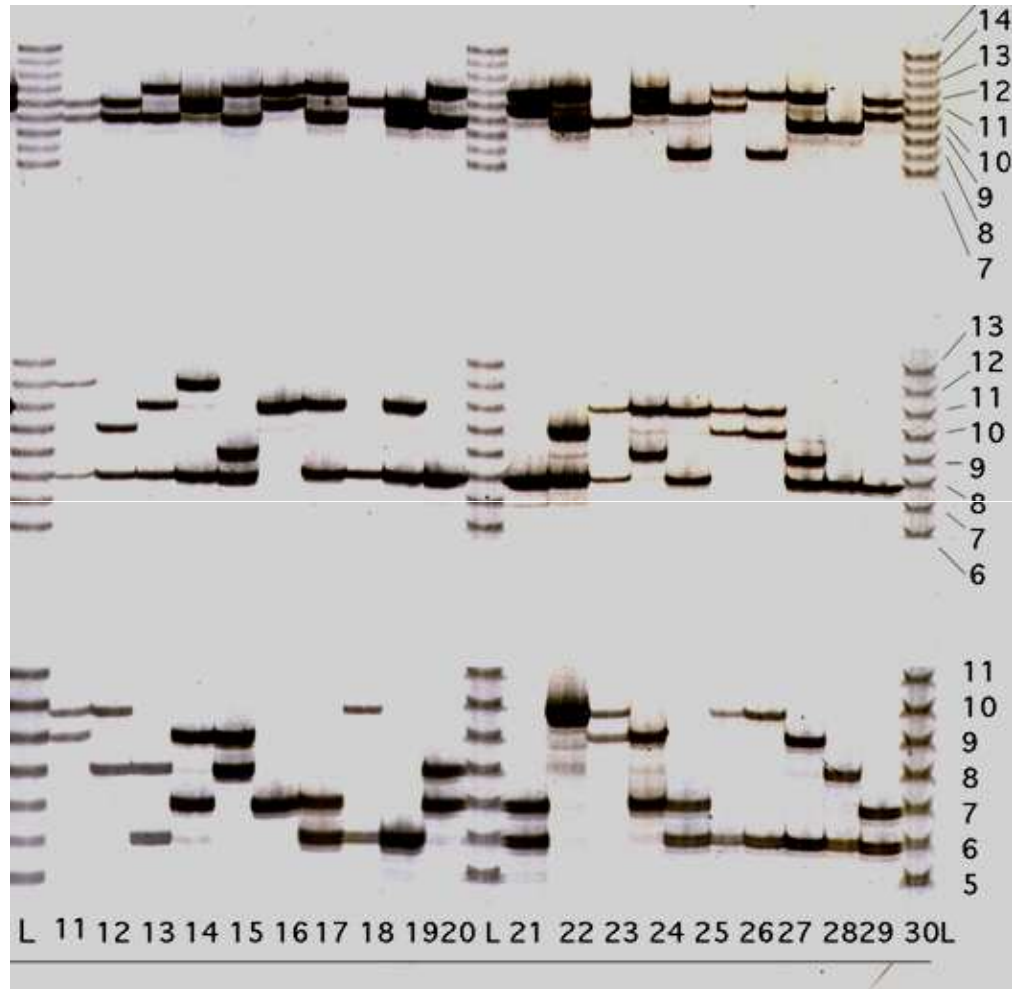
# Sistemas de microsatélites (STRs) autosómico

## Detección Argénticas

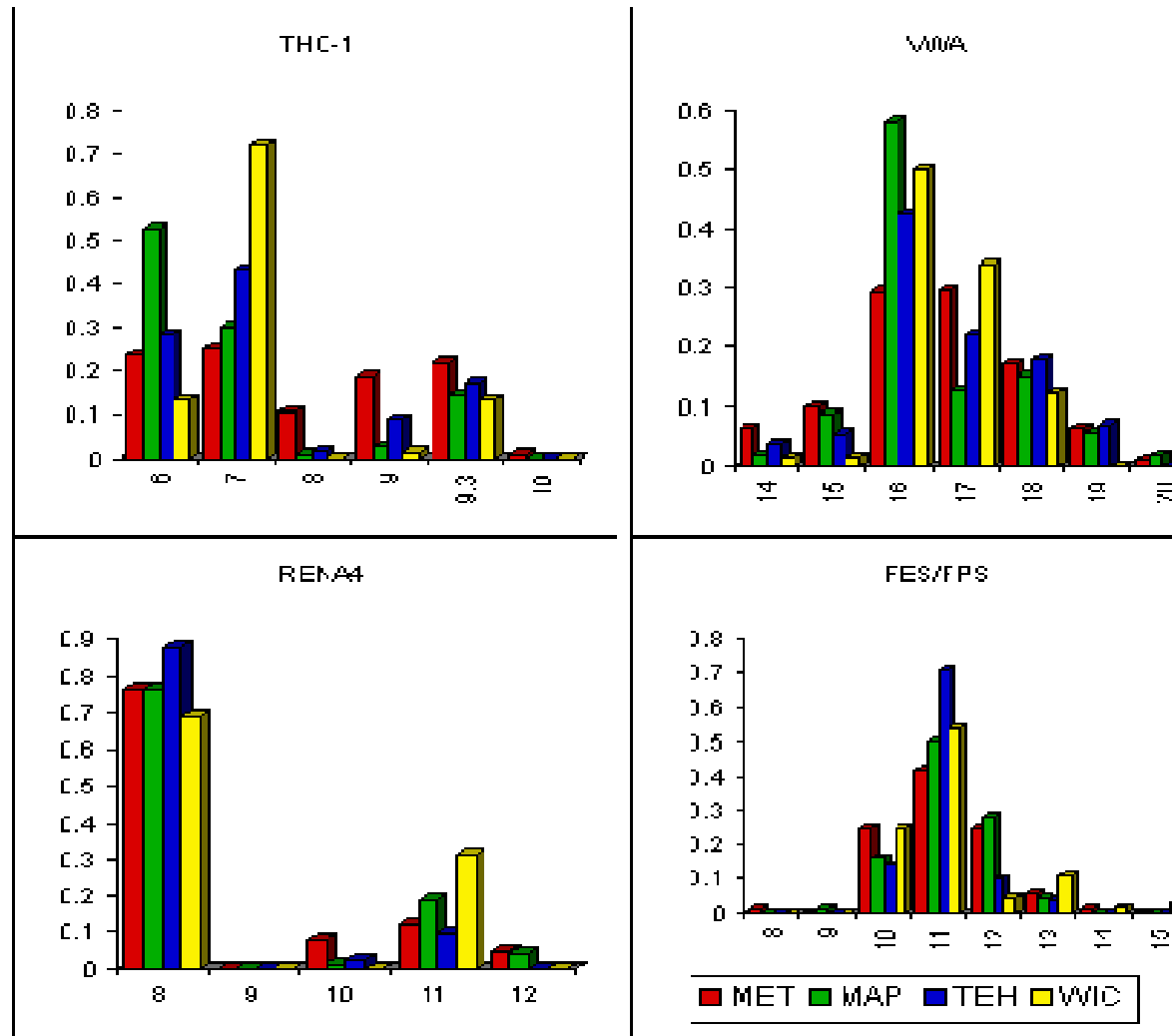
CSF1PO

TPOX

THO-1



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





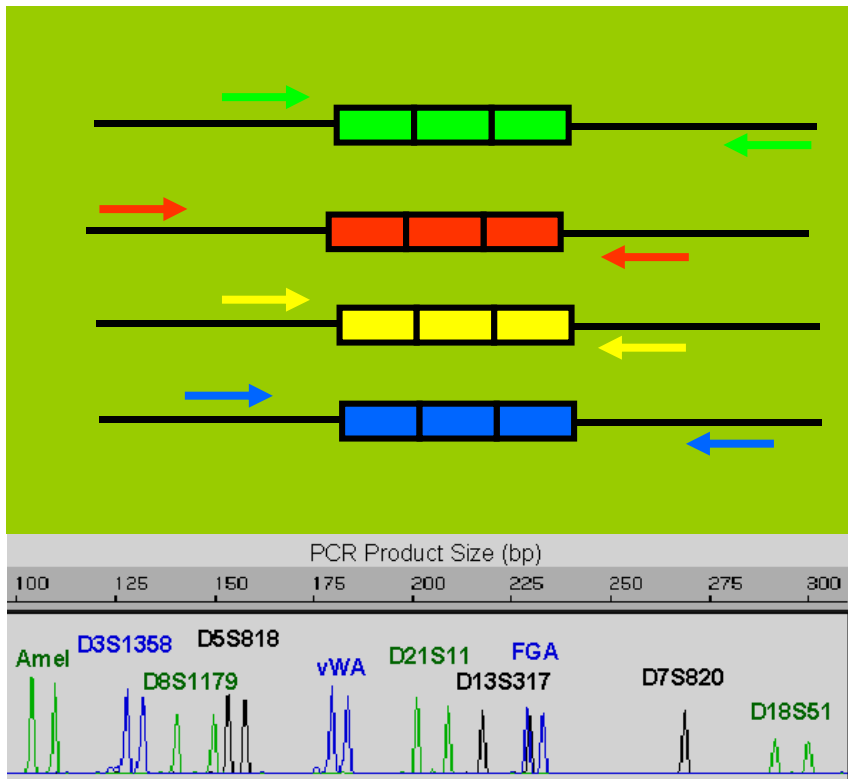
# PCR Multiplex

- 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 ( **$^{32}\text{P}$  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**

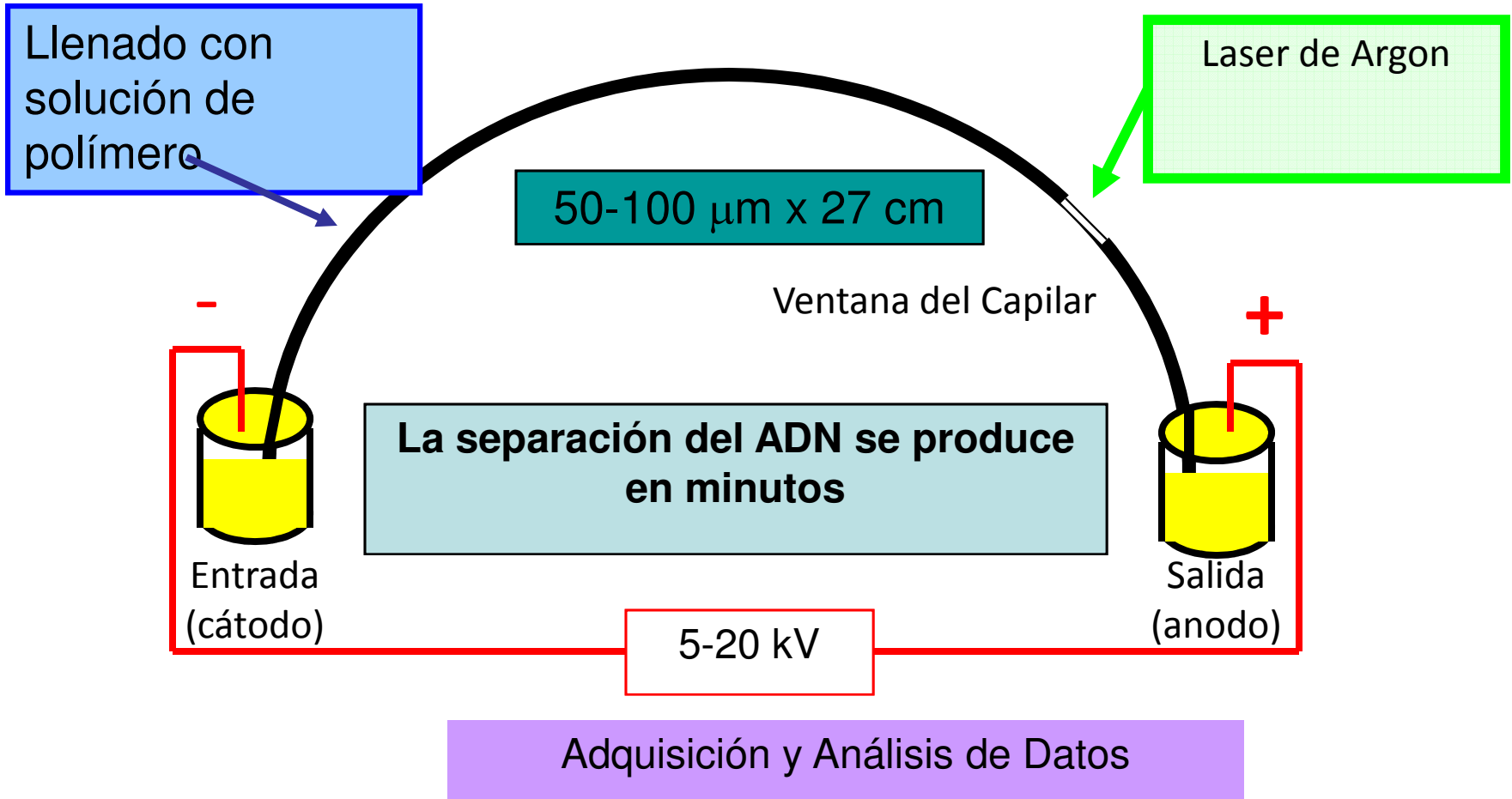
### Desafíos de la PCR Multiplex

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

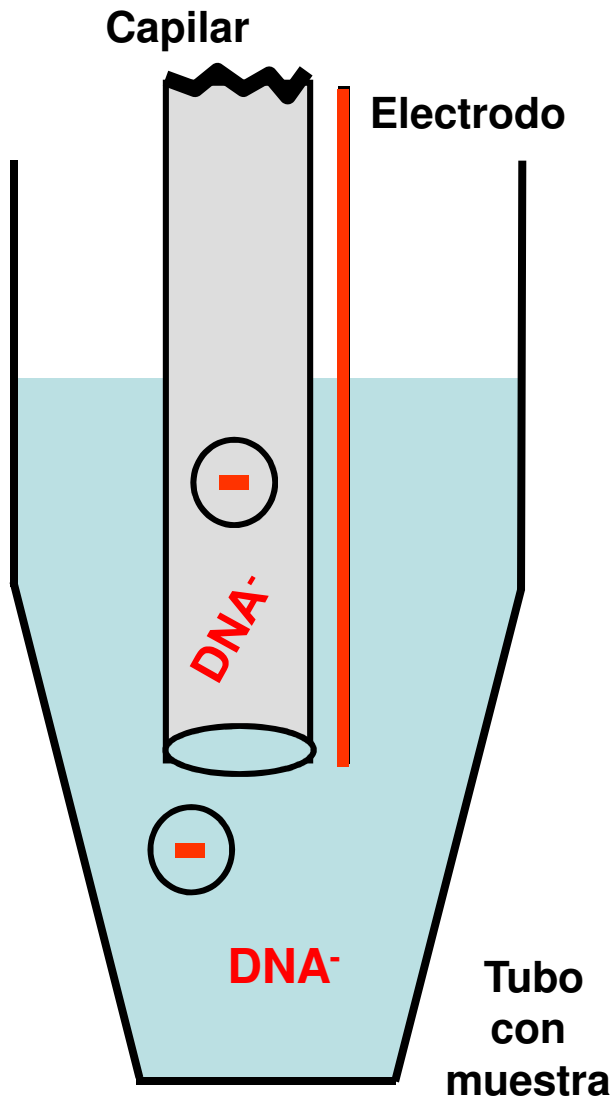
### Ventajas de la PCR Multiplex

- 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

$\lambda_s$  es la conductividad de la muestra

$\lambda_b$  es la conductividad del buffer

$\mu_{ep}$  es la movilidad de las moléculas de la muestra

$\mu_{eo}$  es la movilidad electroosmótica

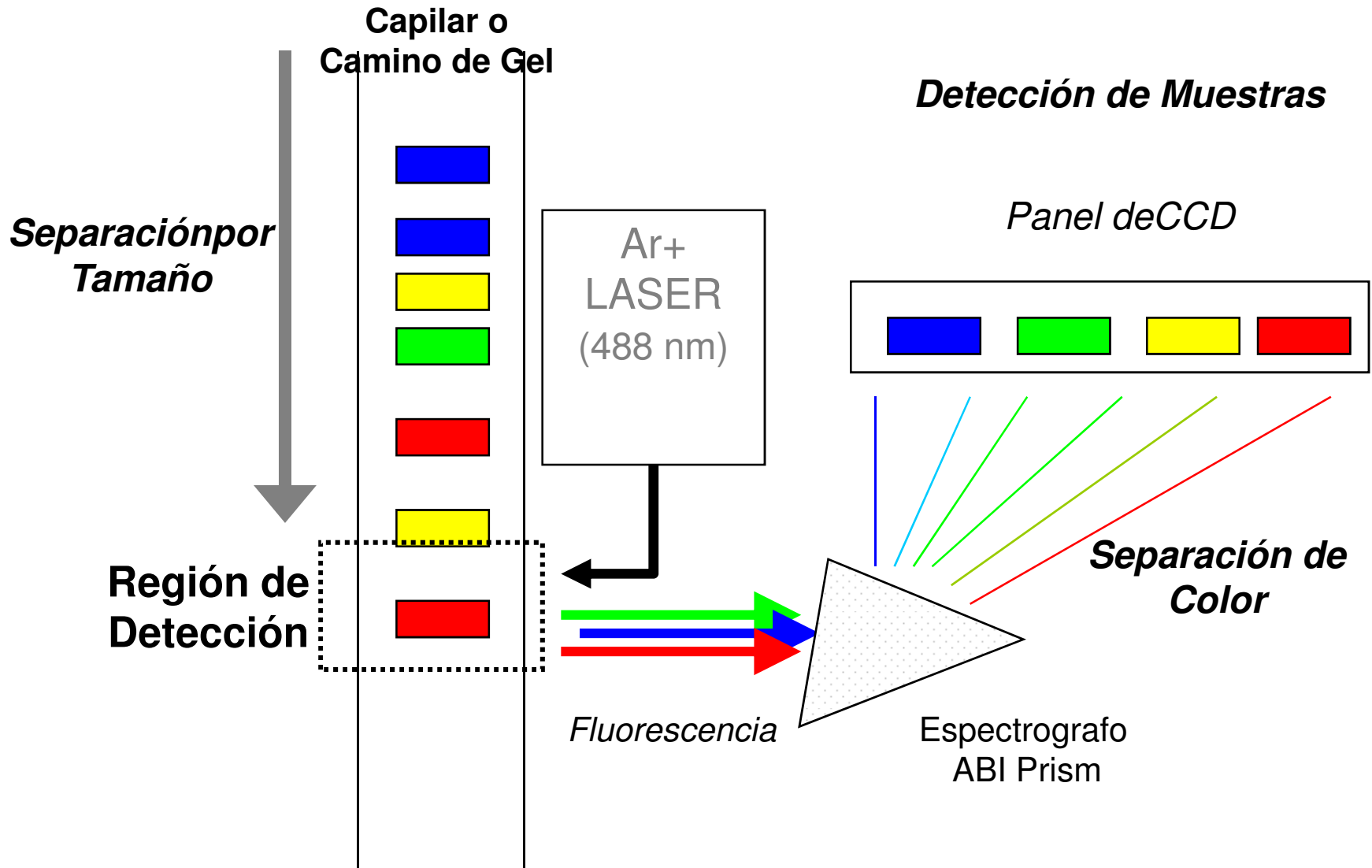


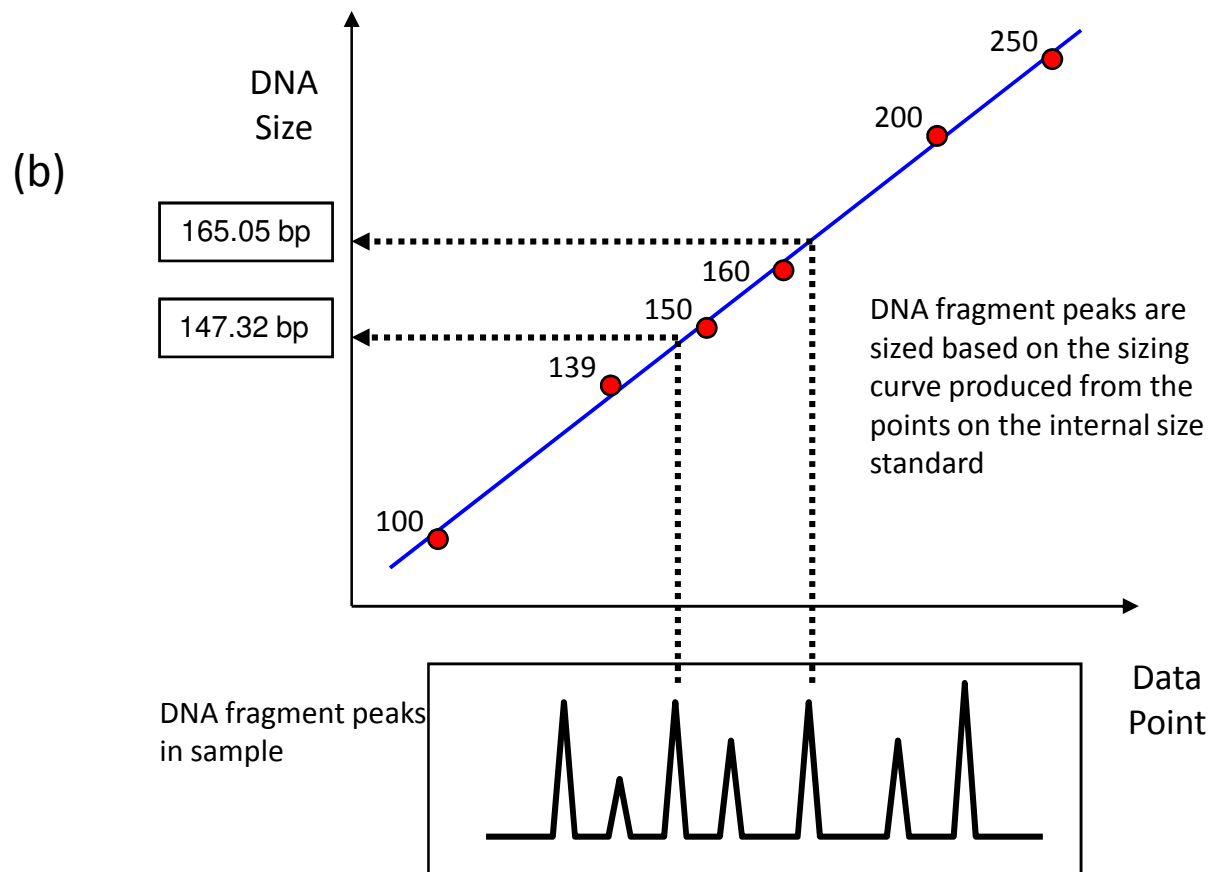
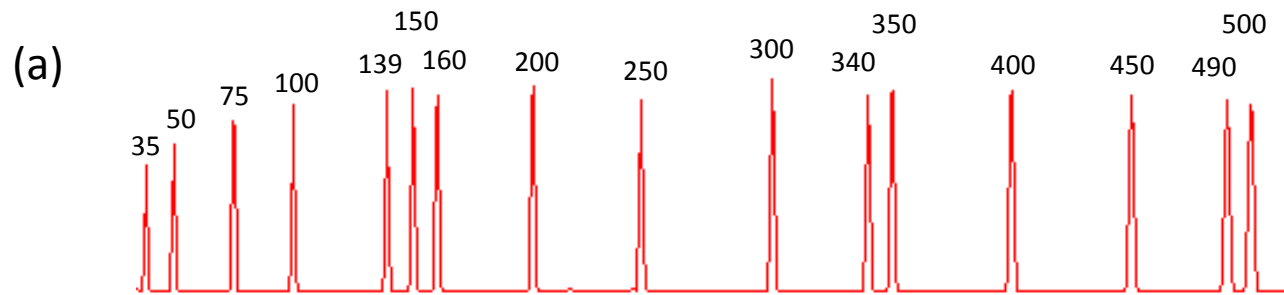
# Sistemas Automatizados

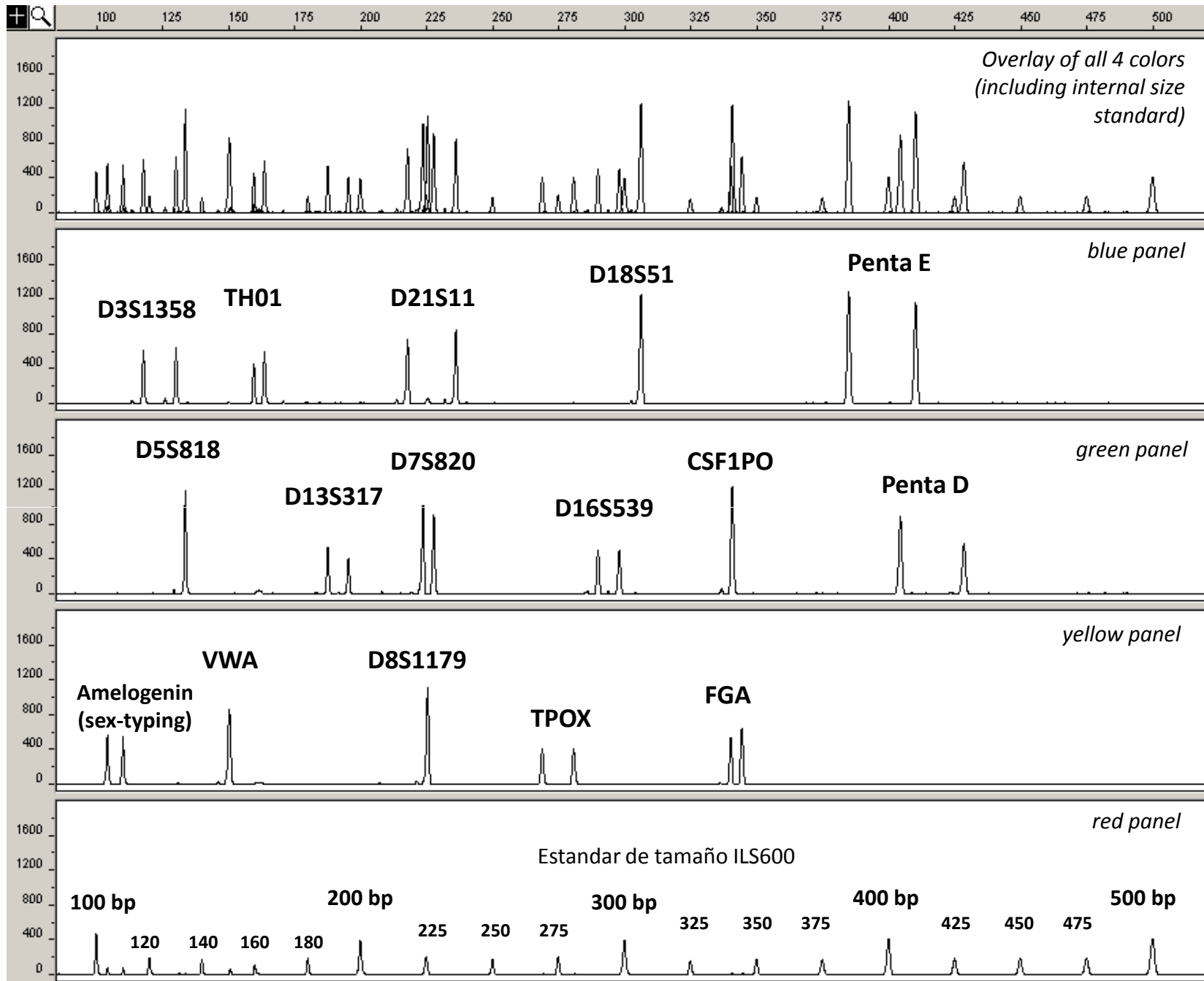


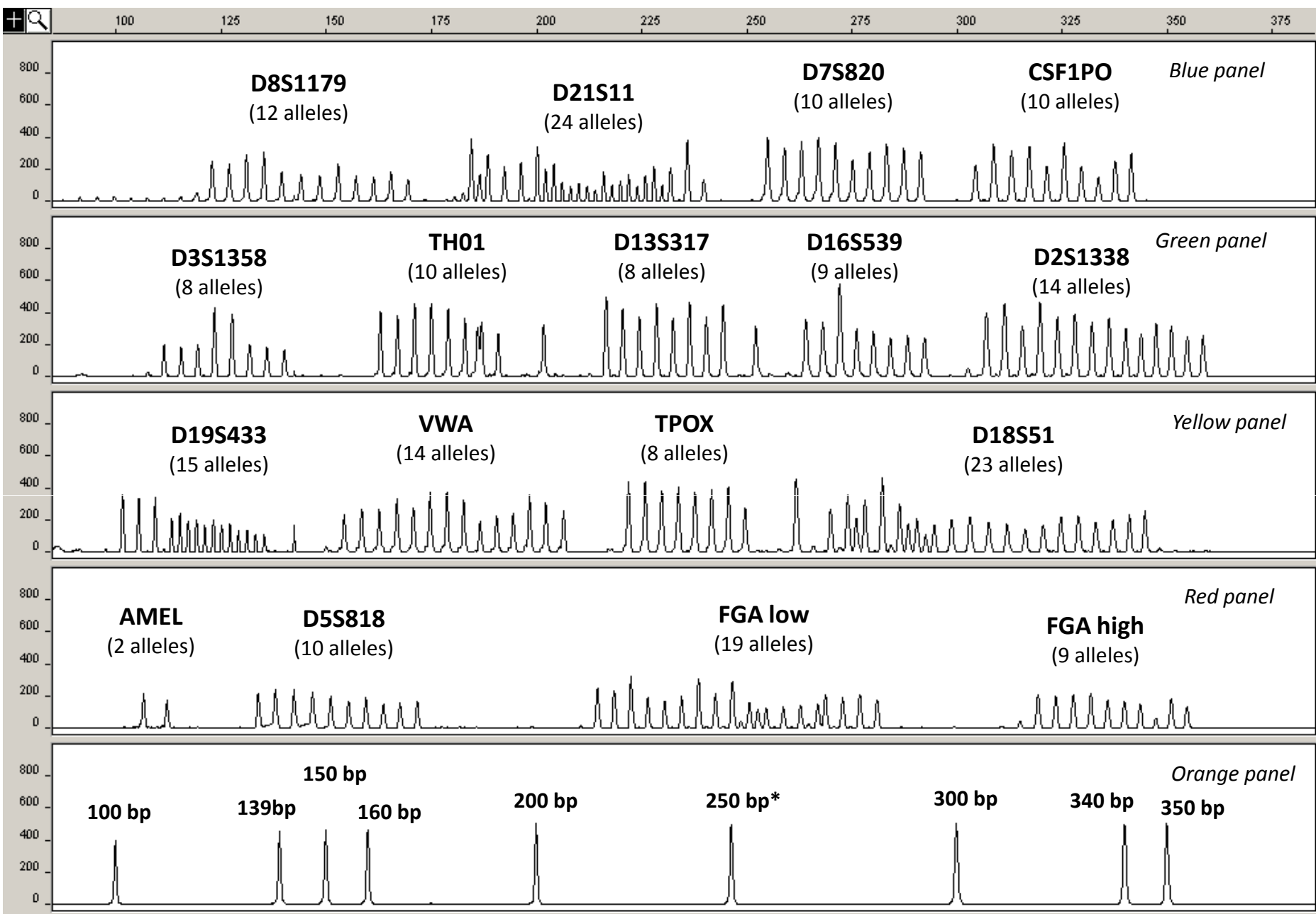
# Fragmentos de ADN Marcados (productos de PCR)

## Principios de Separación y Detección de Muestras







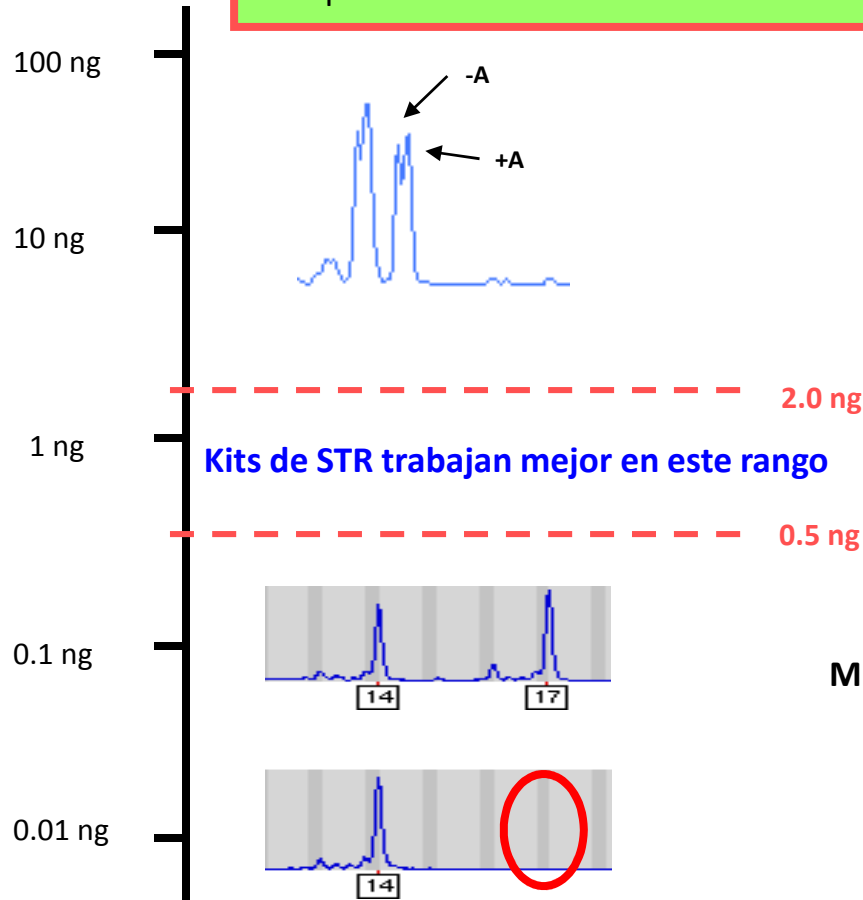


LIZ-labeled GS500 DNA sizing standard

# Importancia de la Cuantificación de DNA

(Previo a la PCR multiplex )

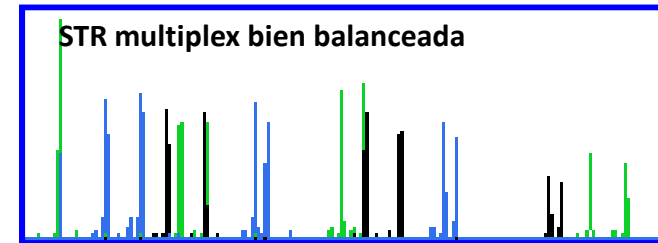
**Cantidad de DNA**  
(escala log)



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

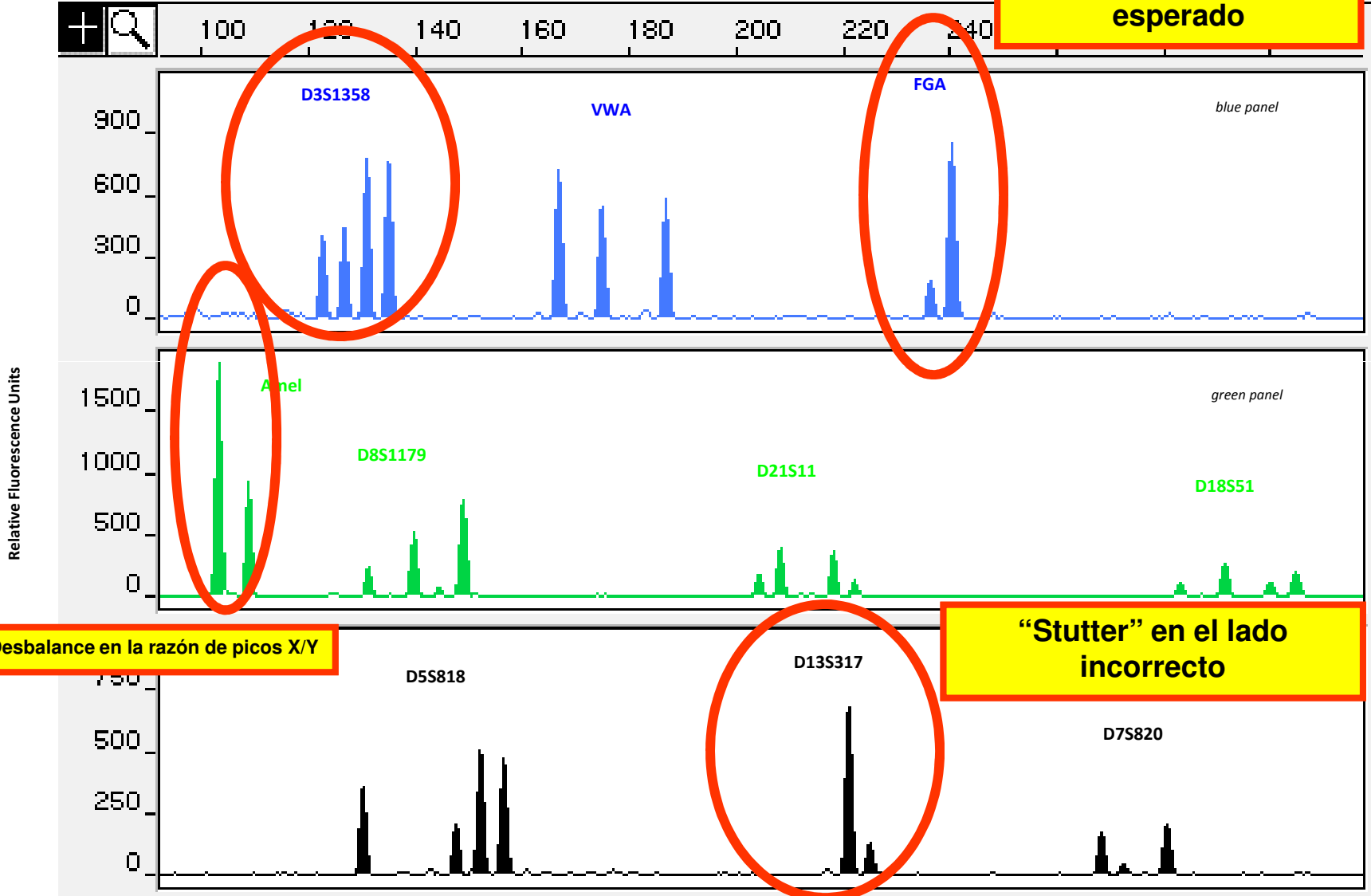
- Desbalance de picos heterocigotas.
- Perdiada alelica
- Imbalance de locus a locus

Efectos estocásticos determinan alelos nulos al amplificar bajas concentraciones de ADN

# Ejemplo de Muestra Mezclada<sup>a</sup>

4 picos en un locus

Hombro más alto de lo esperado

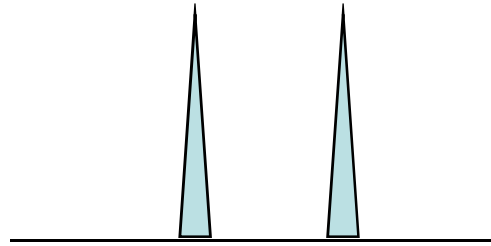


Desbalance en la razón de picos X/Y

“Stutter” en el lado incorrecto

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

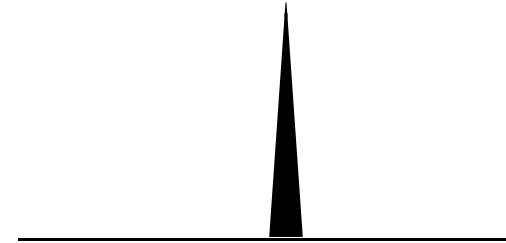
Perfil de ADN de la Víctima



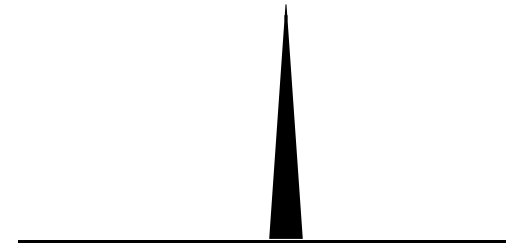
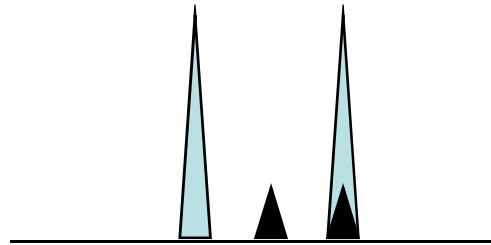
*No se observa señal*



Perfil genético del Perpetrador



Perfil de ADN Dde una muestra de la escena del crimen

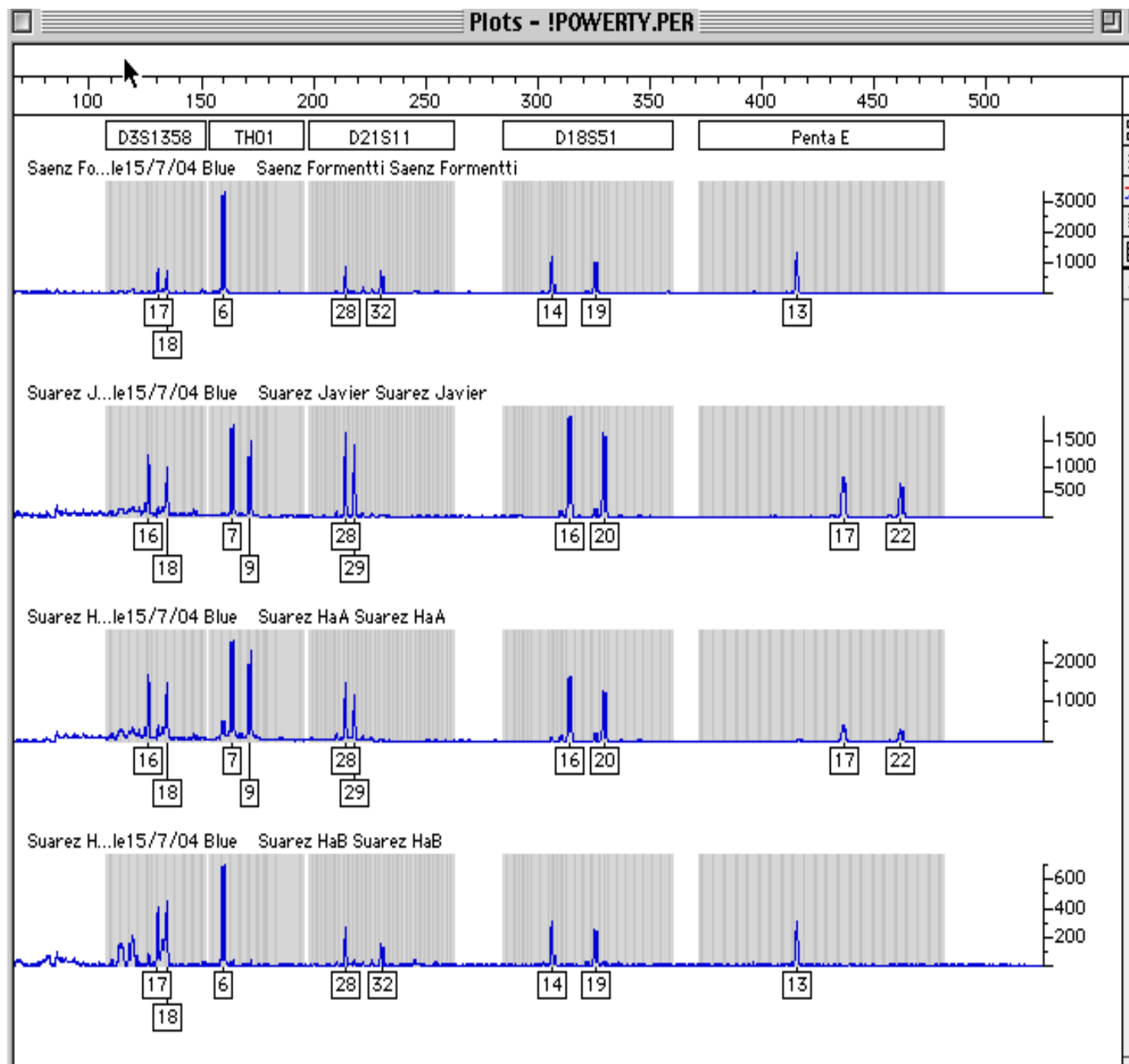


**Perfil de STRs Autosómicos**

**Perfil de Y-STRs**



# VIOLACION HOMBRE/HOMBRE



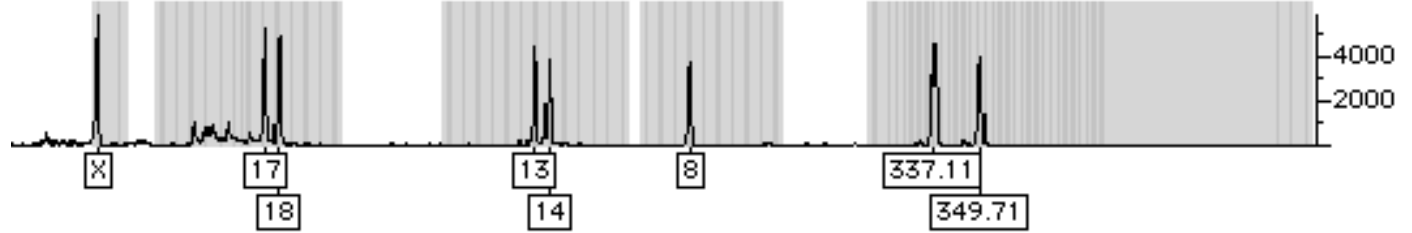
# VIOLACION HOMBRE/MUJER

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

vWA D8S1179 TPOX FGA

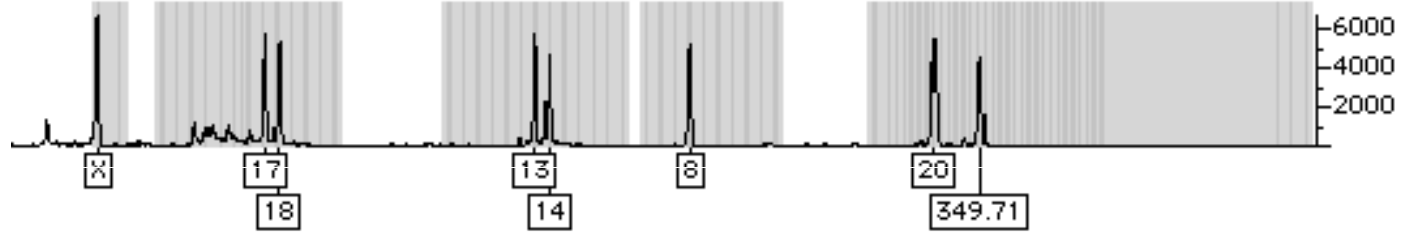
1...le17/7/04 Yellow OGAS ROMINA OGAS ROMINA

VMA



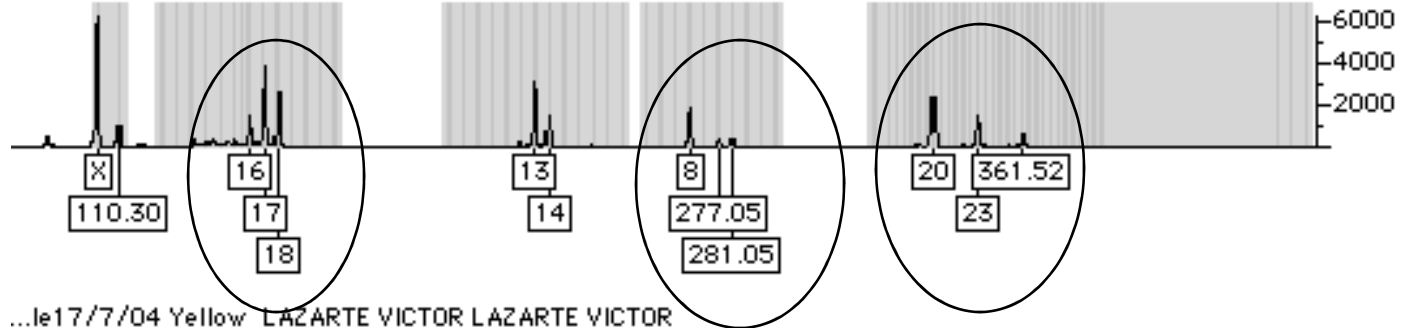
...le17/7/04 Yellow LAZARTE HvA LAZARTE HvA

HvA



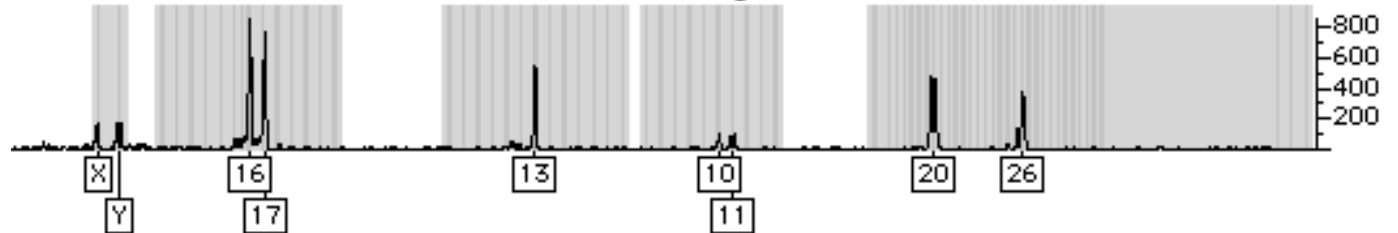
...le17/7/04 Yellow LAZARTE HvB LAZARTE HvB

HvB



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

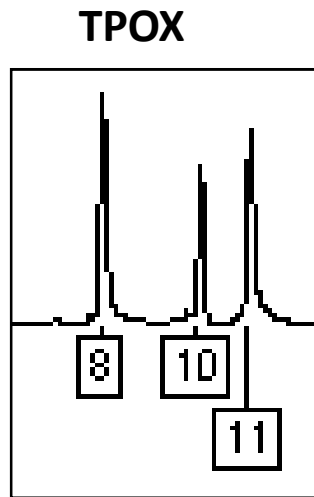
S



# 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)

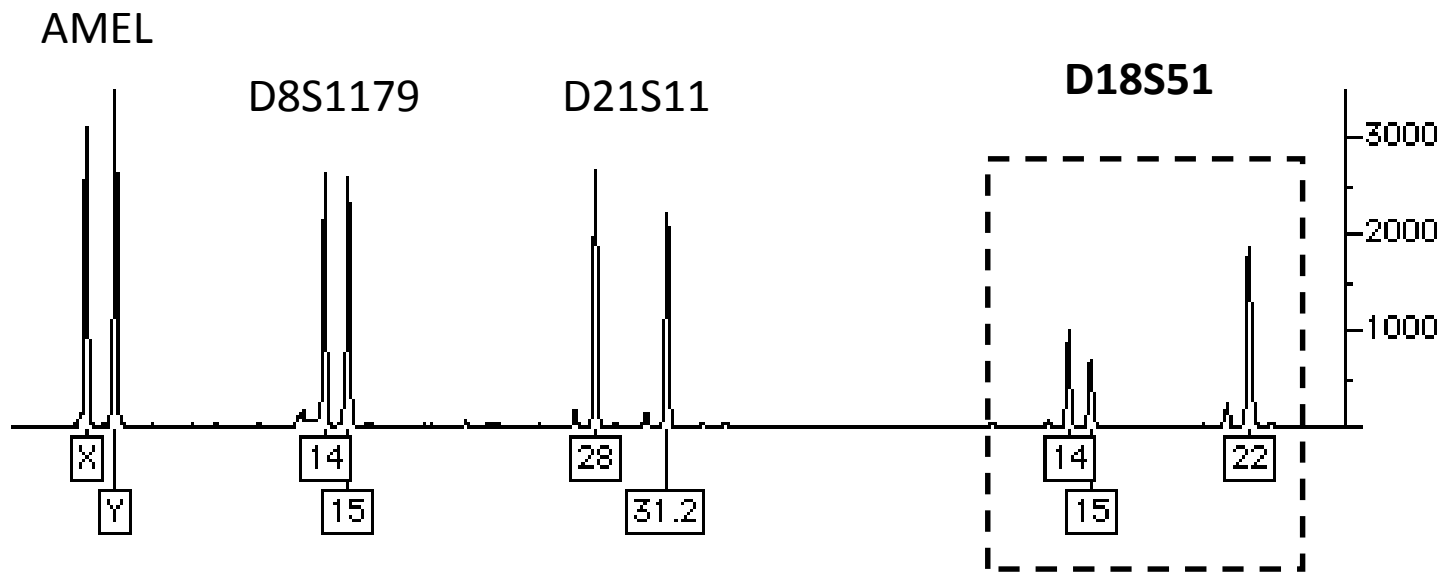
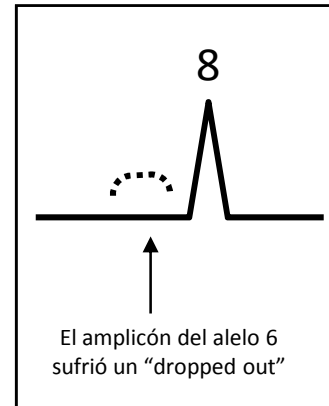
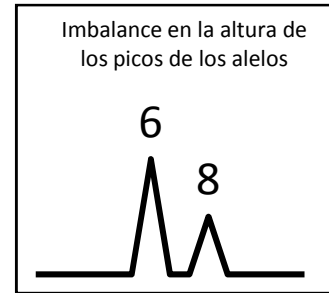
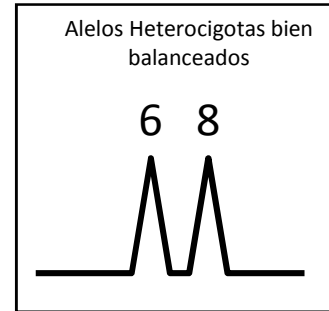
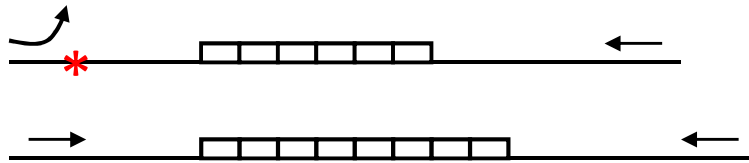
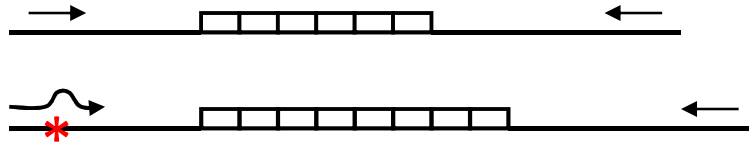
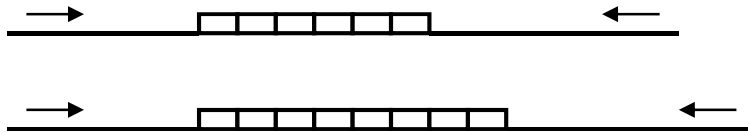


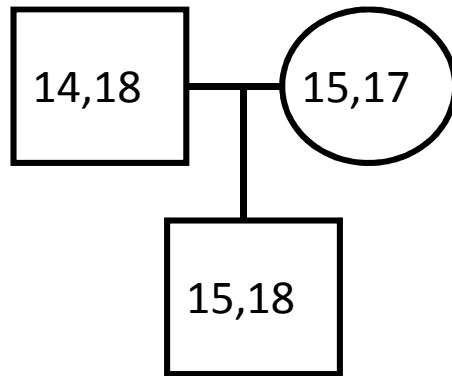
Figure 6.7, J.M. Butler (2005) *Forensic DNA Typing*, 2<sup>nd</sup> Edition © 2005 Elsevier Academic Press

# Mutaciones

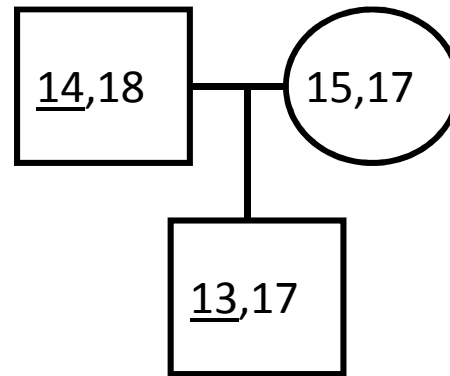


# Mutaciones

(a)



(b)

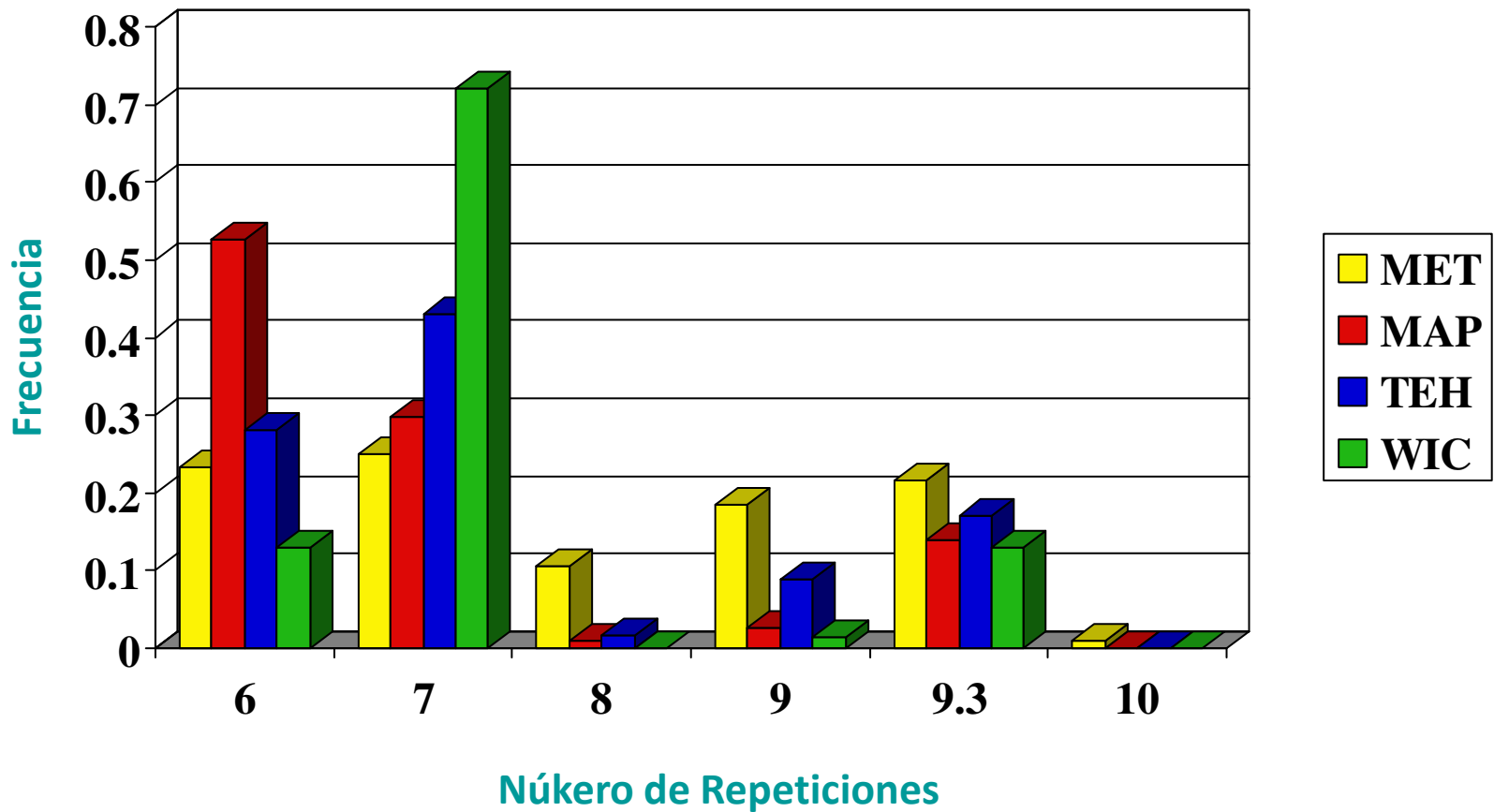


# Tasas de Mutación para STRs de Uso Forense

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

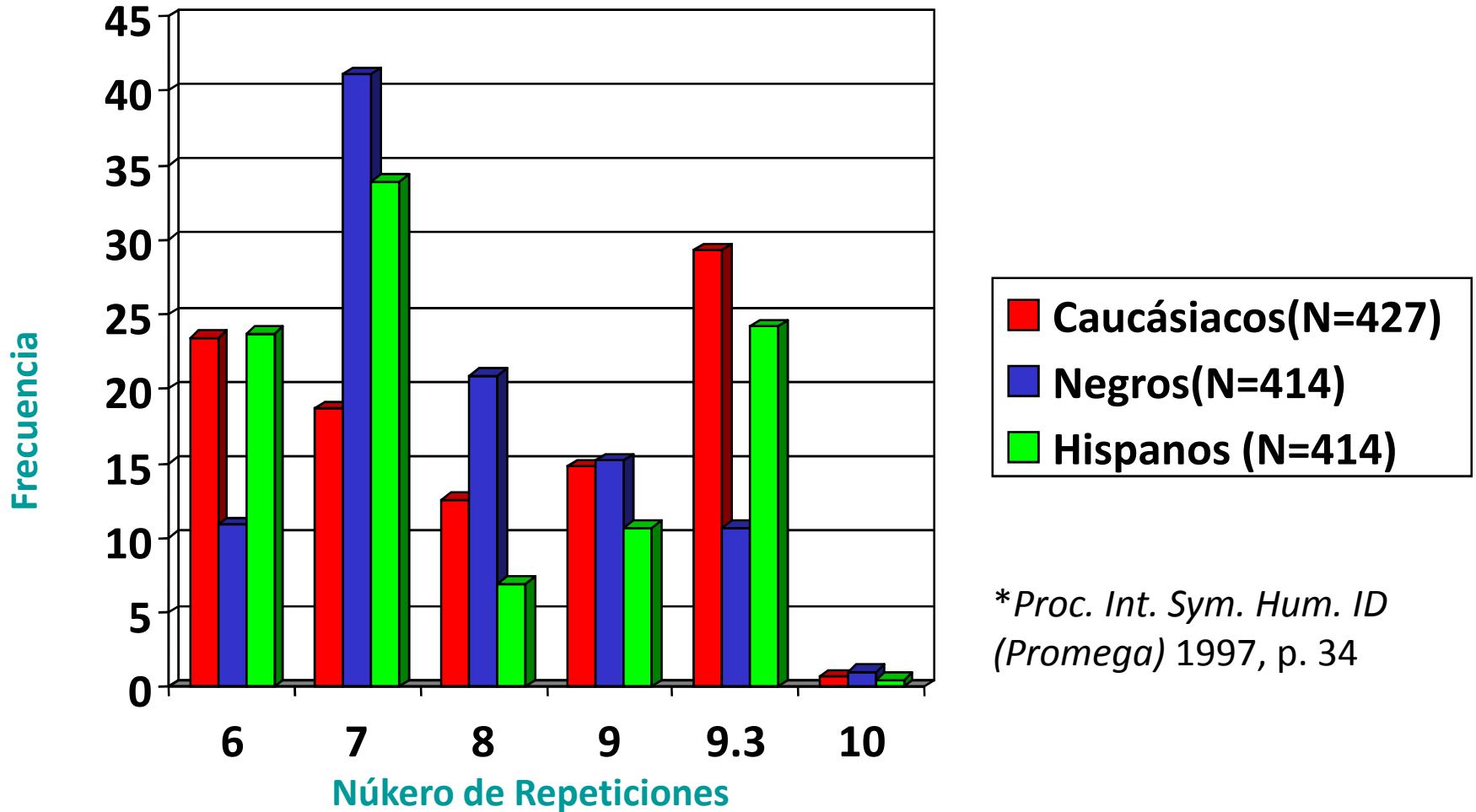
| STR System           | Maternal Meioses (%) | Paternal Meioses (%) | Number from either | Total Number of Mutations | Mutation Rate |
|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------|---------------------------|---------------|
| <b>CSF1PO</b>        | 95/304,307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

*Distribución de Frecuencias Alélicas*  
*Población Argentina*  
*Marcador: HUMTHO-1*



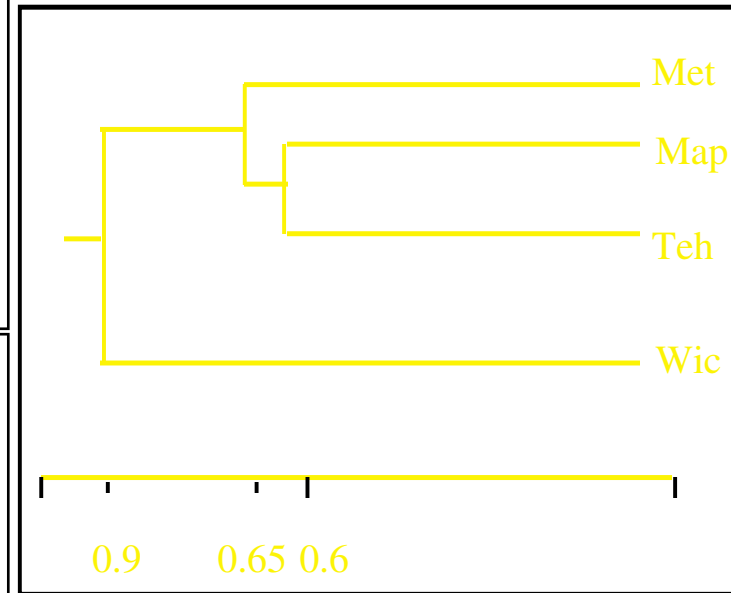
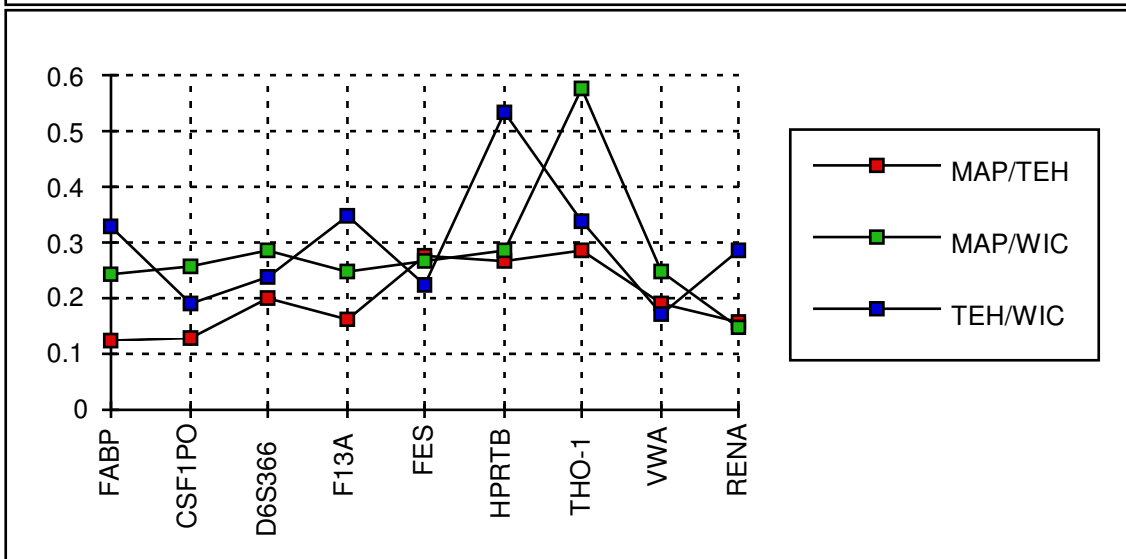
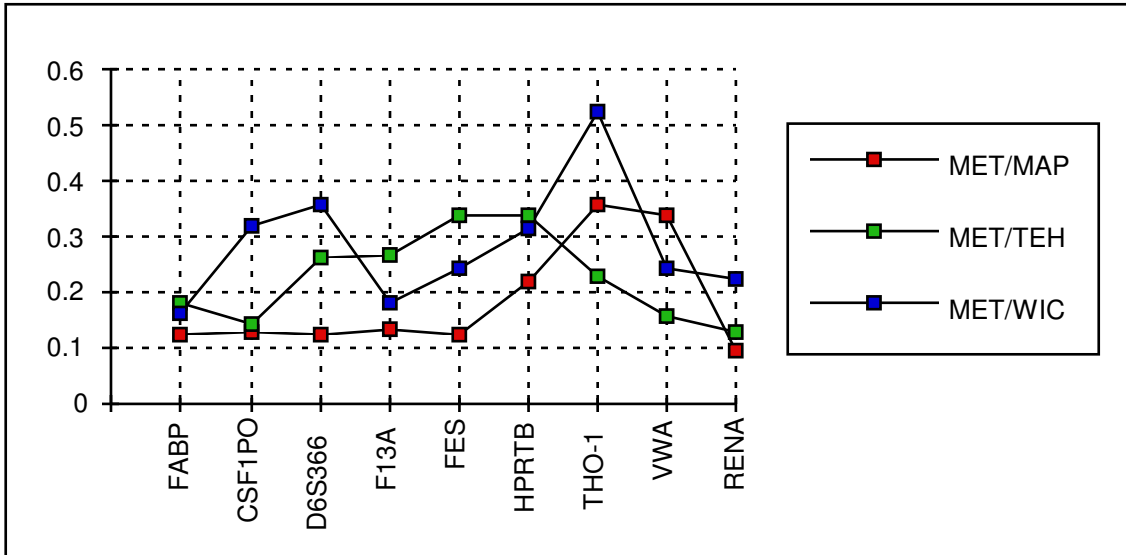


*Distribución de Frecuencias Alélicas  
Población de Estados Unidos de América  
Marcador: HUMTHO-1*



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

*Interpopulation Comparison.*



**Genetic Distance  
(UPGMA)**