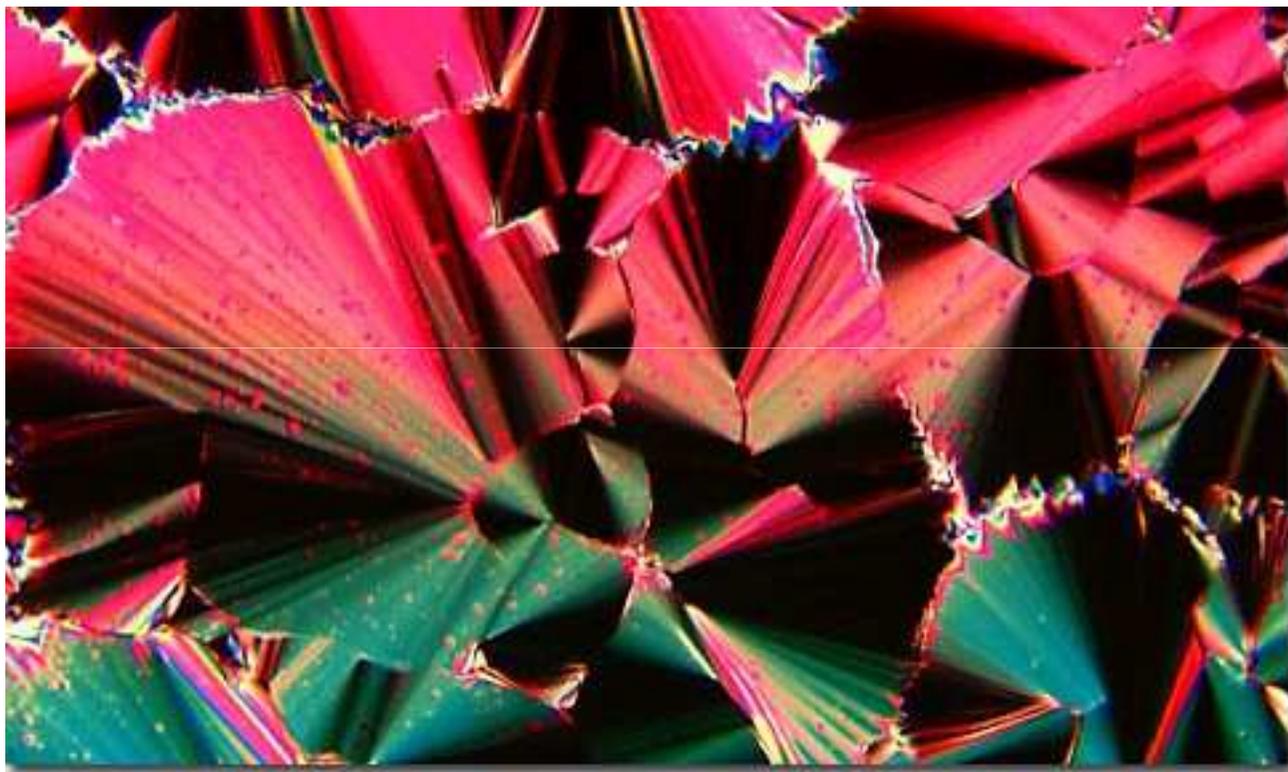


Maestría de Medicina Molecular
Curso de Genética Molecular Forense
Introducción

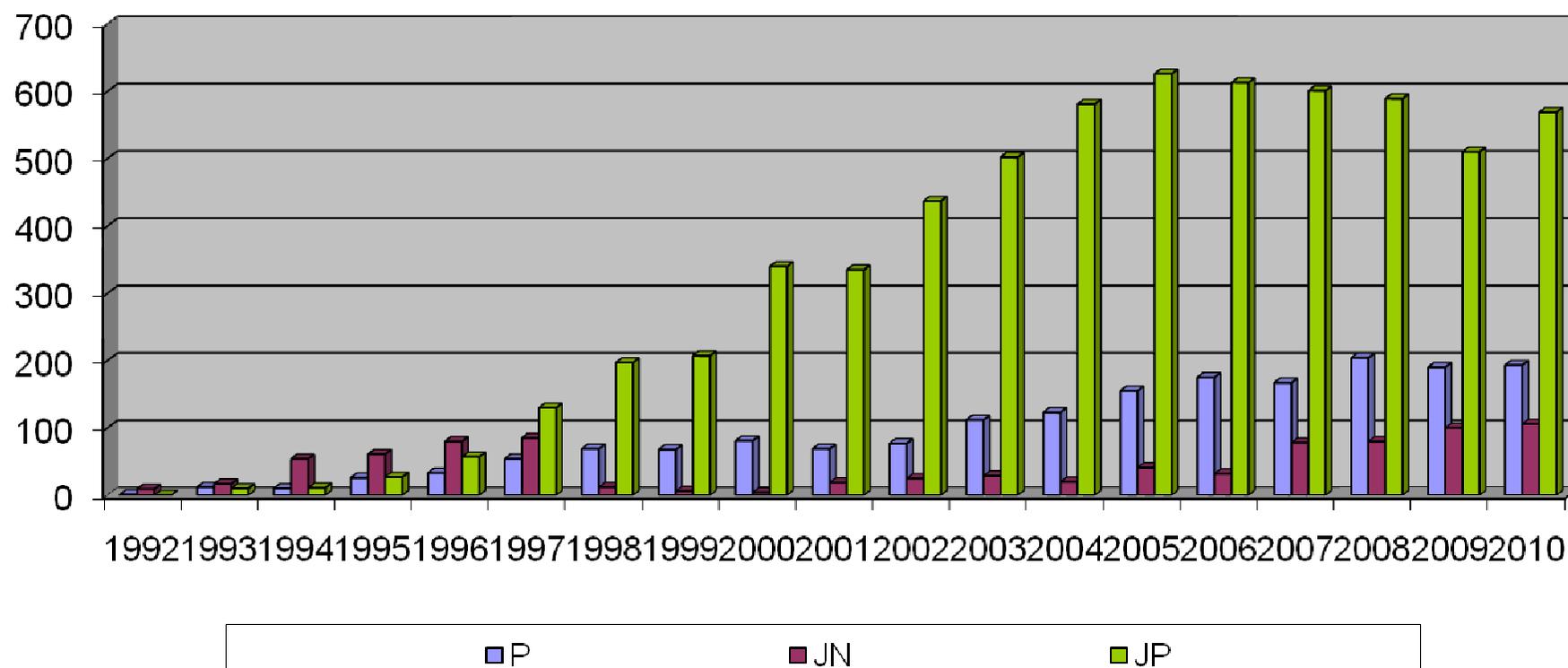
18 de Junio de 2011
Instituto Leloir



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



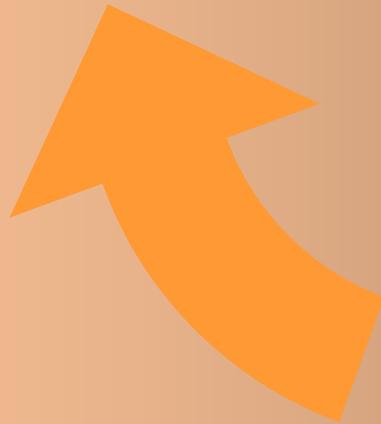
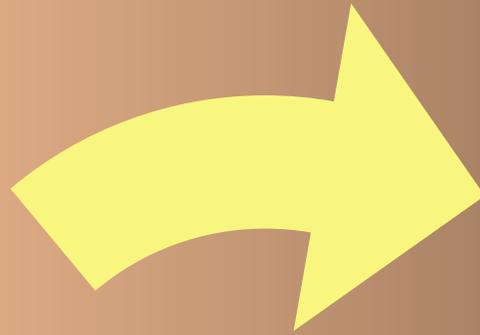
PERFIL
GENÉTICO

BASE DE DATOS
DE REFERENCIA

MUESTRA

GenéticaForense

Genética de Poblaciones



Genética Forense

Biología Molecular

Estadística

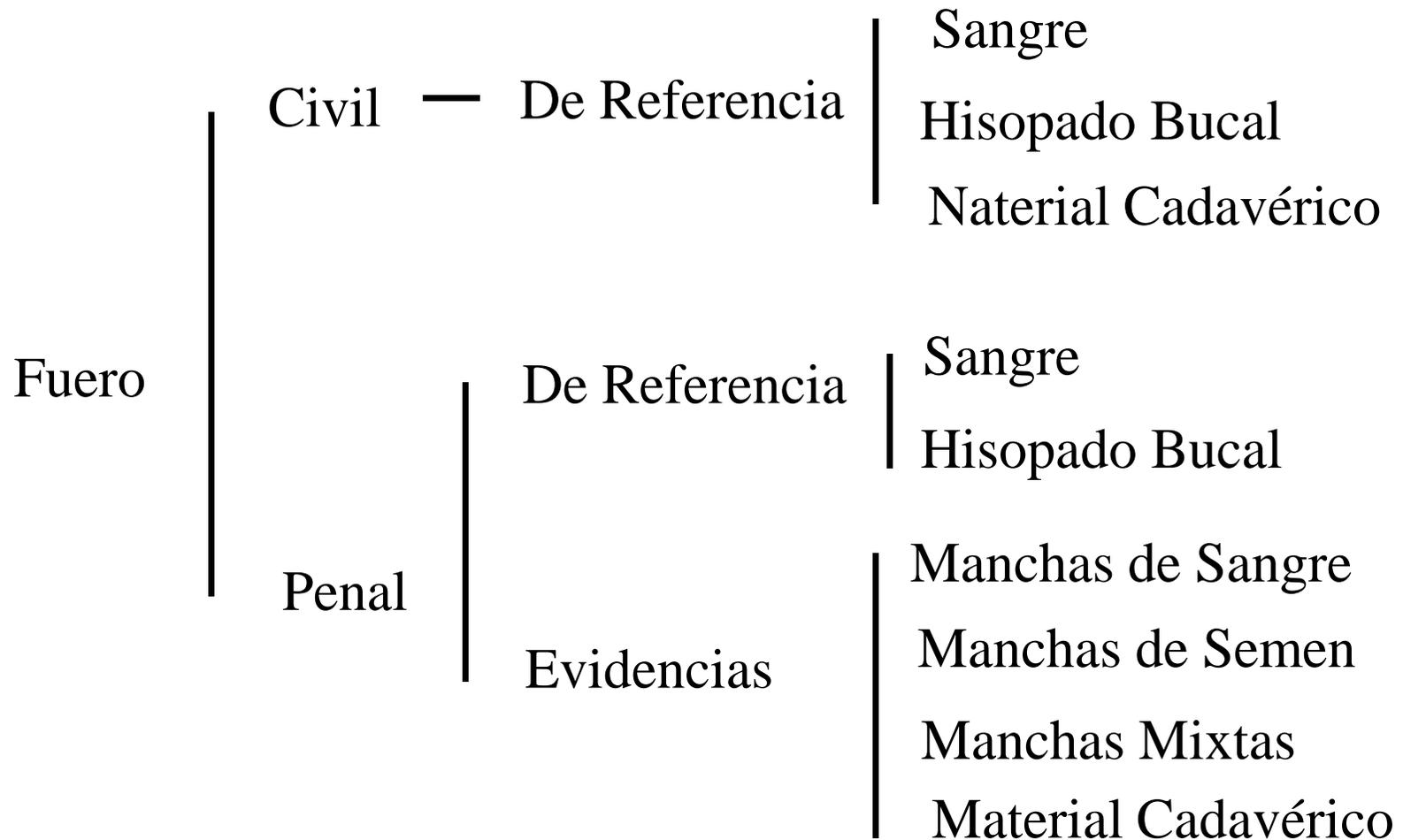
Derecho Civil y Penal

Criminalística

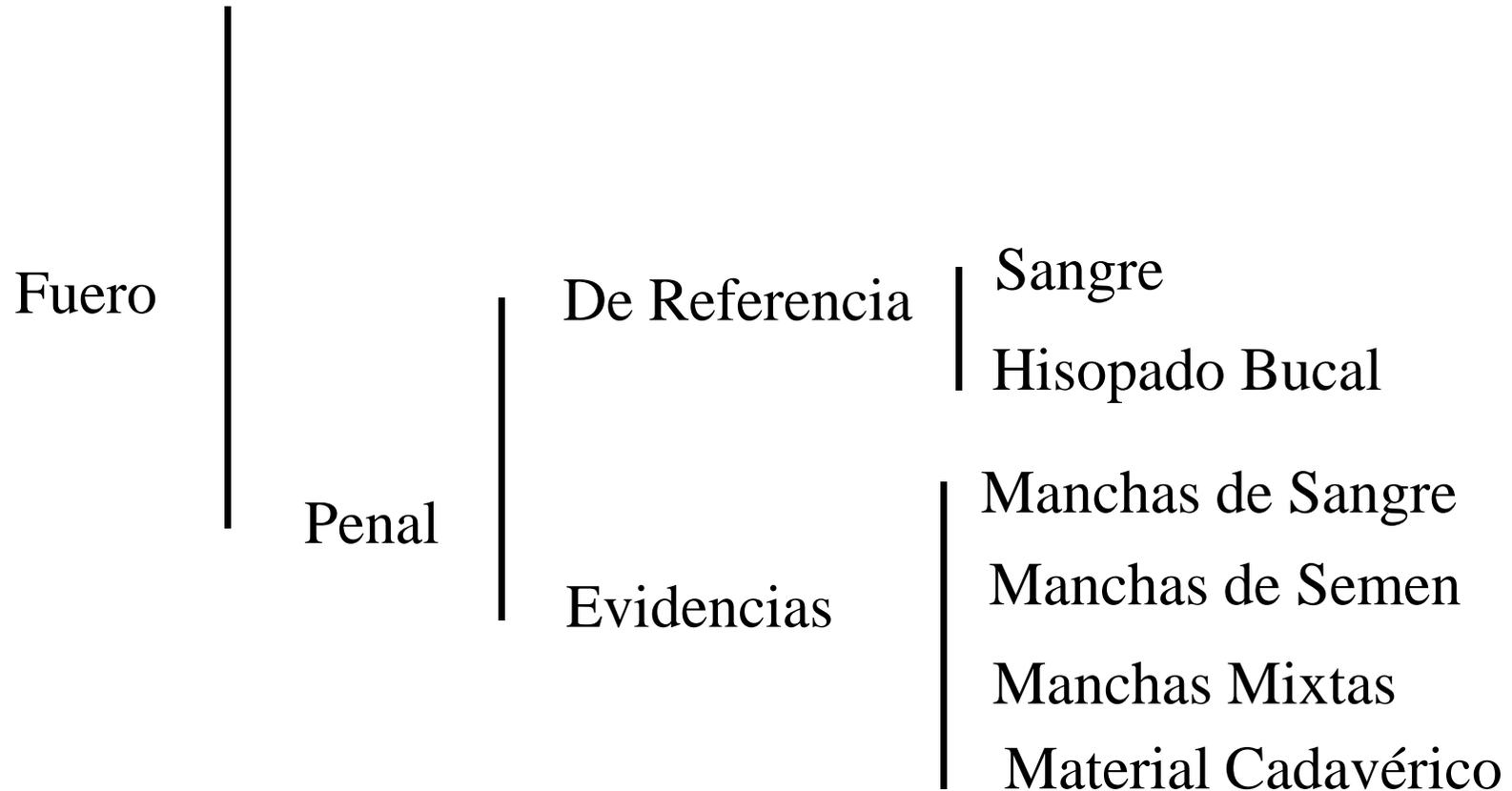
Genética de Poblaciones

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



Lugar del Hecho



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.

Prendas

SI



NO



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.

Denunciante:
Juzgado Interviniente:
Lugar del Hecho:
Fecha:
Hora:
Evidencia #:

Descripcion:

Responsable de la Colecta:
Nombre:
Documento:
Firma:

Denunciante:
Juzgado Interviniente:
Lugar del Hecho: *Km 52 IDCA*
Fecha: *20/06/2001*
Hora: *2:50 pm*
Evidencia #: *4*

Descripcion: *Prenda Intima de
tubo Cota Blanca
paucando de Sastre*

Responsable de la Colecta:
Nombre: *William Zabala*
Documento:
Firma: *[Signature]*

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

Serología

- Analisis de sangre
- Prueba de Hexagon OBTI
Prueba Hemastix
- Prueba presuntivas



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..

Vestigios y Rastros de Interés Forense



Evidencias Más Frecuentemente Empleadas.

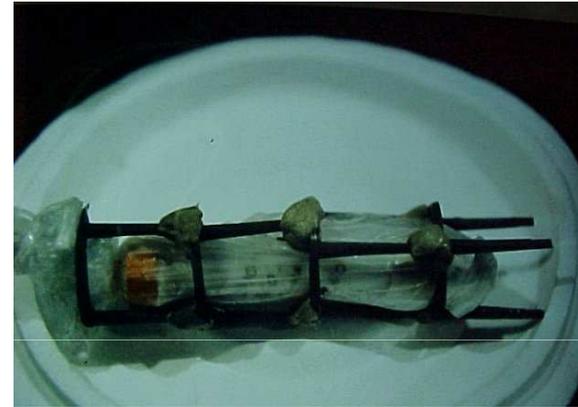
- Sangre
- Hisopados y Apósitos
- Pelo
- Mancha de Fluidos Biológicos Sobre materiales absorbentes: tela, papel, etc.
- Tejido Cadavérico Tejidos Blandos, Hueso y Dientes.

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.

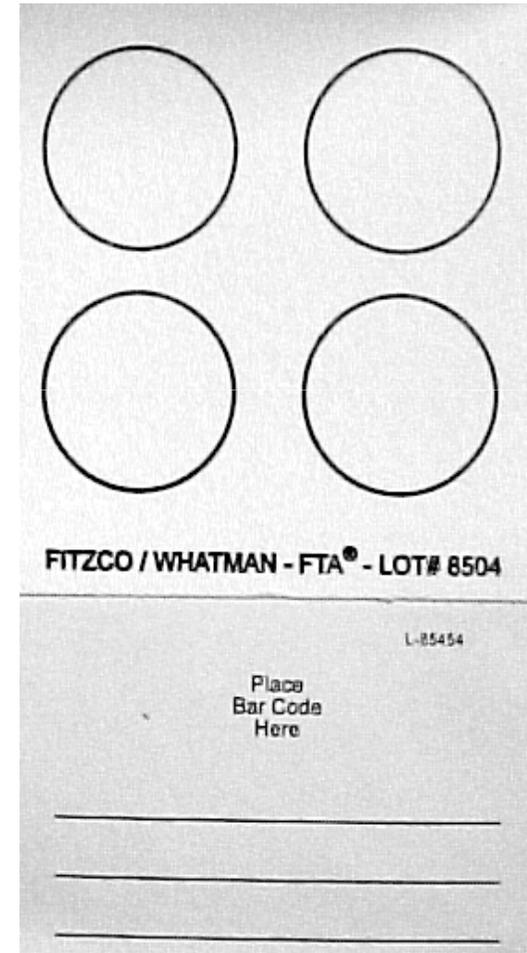
La muestra no supera los 100 microlitros.

Permite repetir el ensayo varias veces.

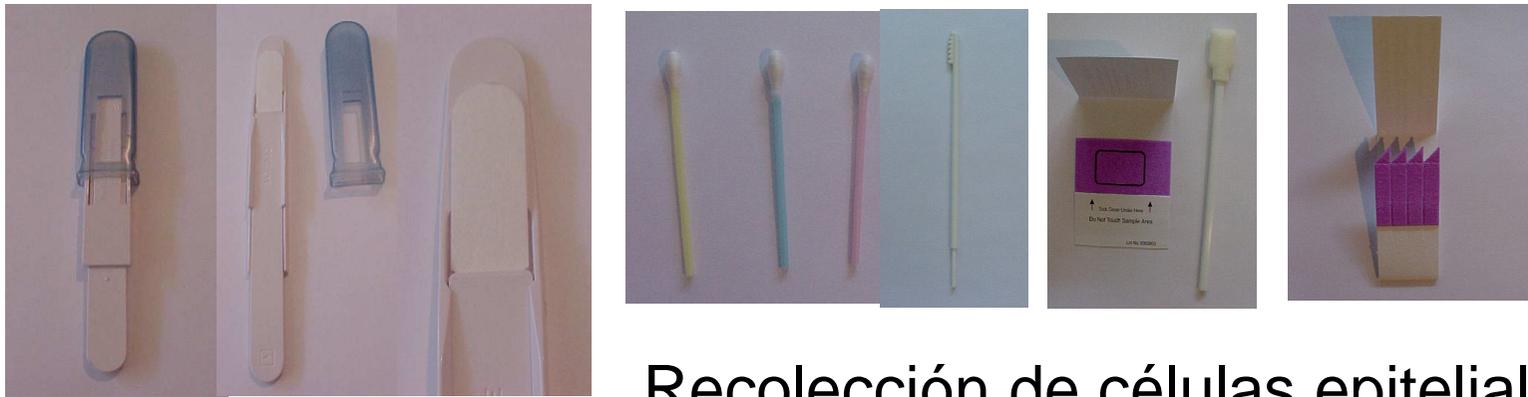


Conservación de muestras de sangre.

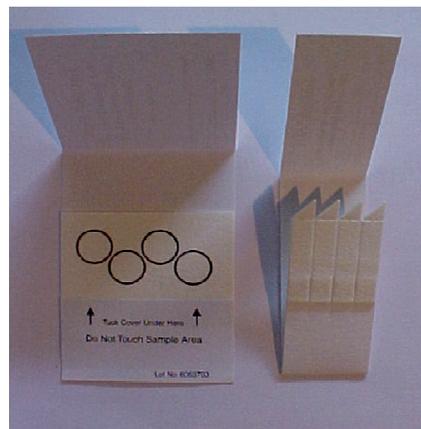
- Soportes adsorbentes.
- Conservación a temperatura ambiente.
- Largo tiempo de conservación.
- Permite generar un banco de muestras.



Nuevas alternativas



Recolección de células epiteliales



Recolección de Sangre

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

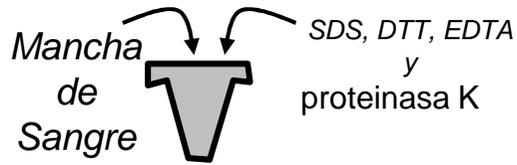
Extracción a partir de sangre sobre papel de filtro e hisopados bucales

- 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



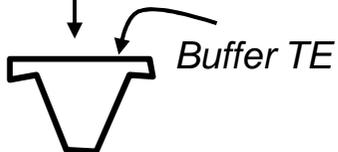
INCUBAR (56 °C)



VORTEX



TRANSFERIR face acuosa (superior) a tubo nuevo



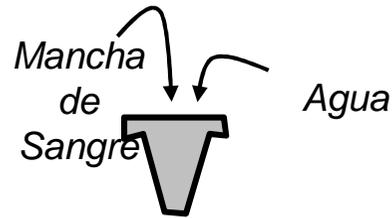
CONCENTRAR la muestra (Centricon/Microcon-100 o precipitación con etanol)



QUANTIFICAR DNA

Amplificar por PCR

CHELEX



INCUBAR (T ambiente)



SACAR sobrenadante



INCUBAR (56 °C)

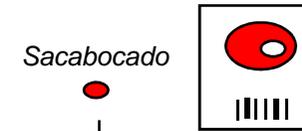
INCUBAR (100 °C)



QUANTIFICAR DNA

Amplificar por PCR

Papel FTA



Lavar varias veces con Buffer de extracción

Descartar sobrenadante



(NO se Cuantifica las muestras son uniformes)

Amplificar por PCR

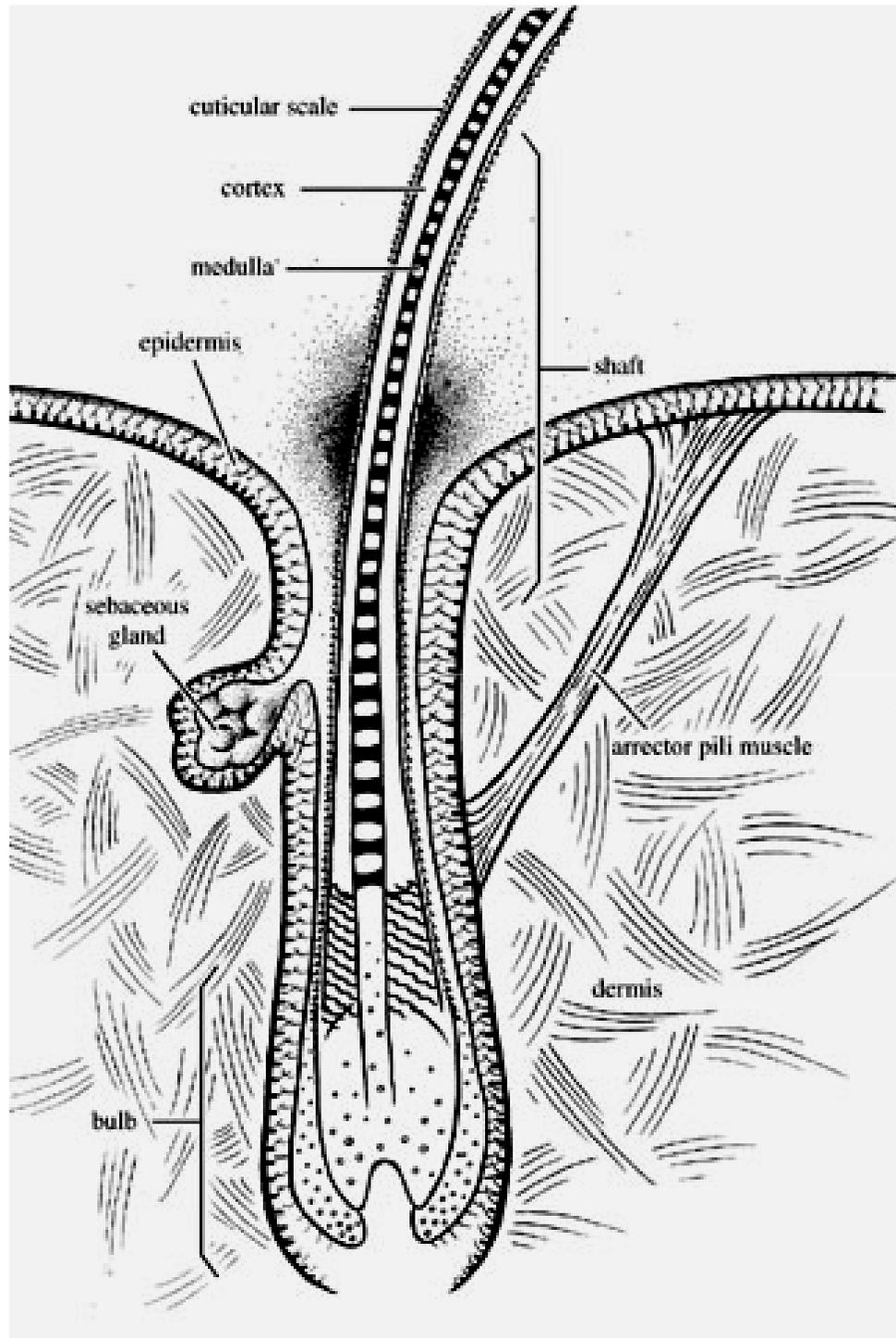
Pelo

- 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

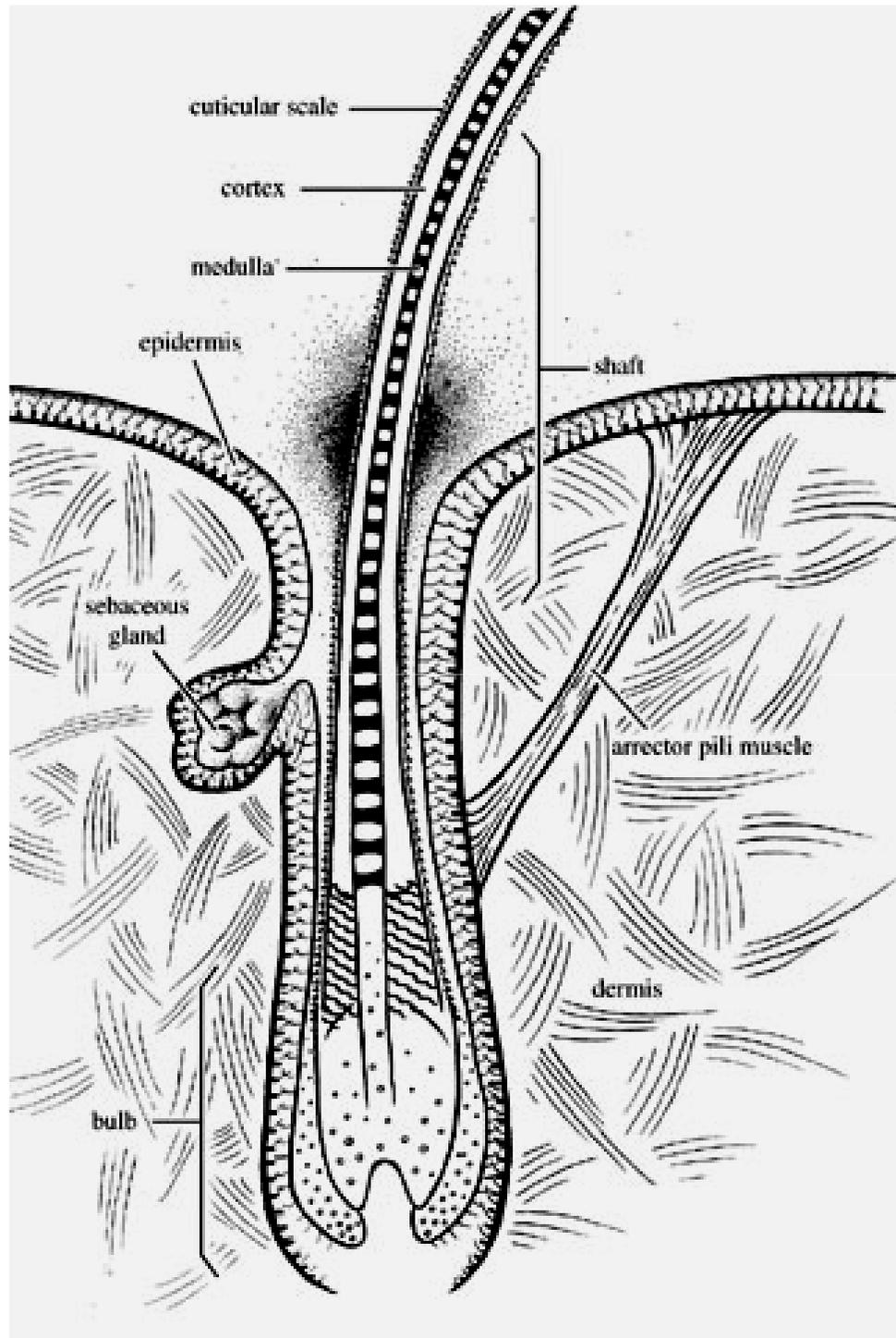
- En caso de violación resulta necesario el peinado pubiano de la víctima con el objeto de rescatar pelos del victimario.
- En la escena del crimen también suelen hallarse pelos de los criminales. Se deberán tomar precauciones para evitar coleccionar las de los investigadores!.

Pelo



- Si el pelo cae espontáneamente aunque exhiba un engrosamiento semejante a un bulbo piloso, se encuentra queratinizado y sólo contiene restos de ADNmt.

Pelo



- Sólo los pelos *en crecimiento activo* contienen gran cantidad de células nucleadas.
- Para obtenerlo es necesario arrancarlo del cuero cabelludo.



Pelo

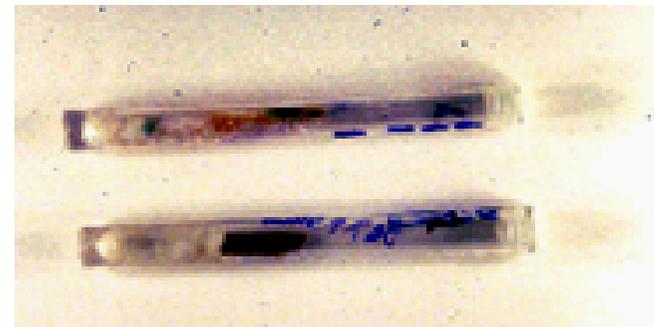
- Si bien mayoritariamente proteico incluye en su médula restos de mitocondrias y sus genomas

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.

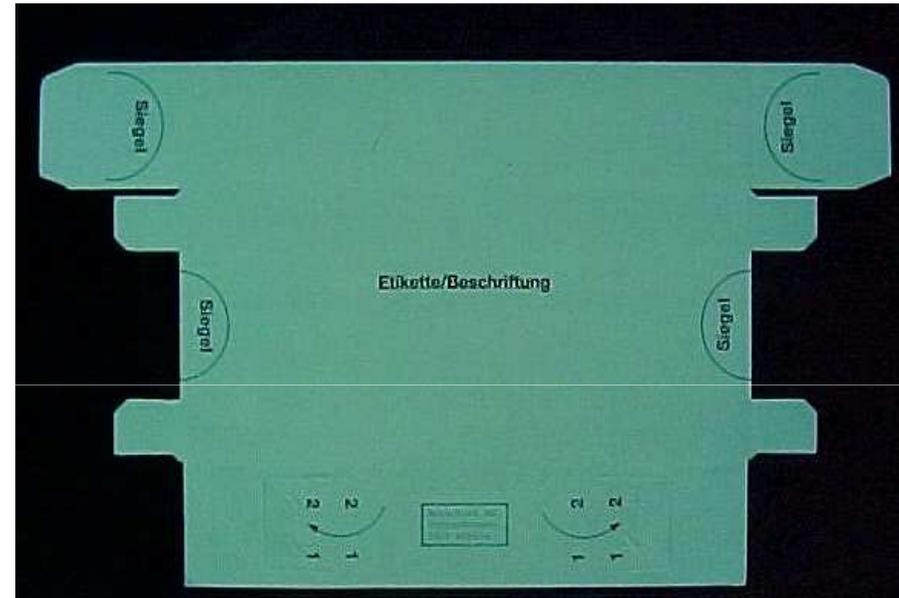
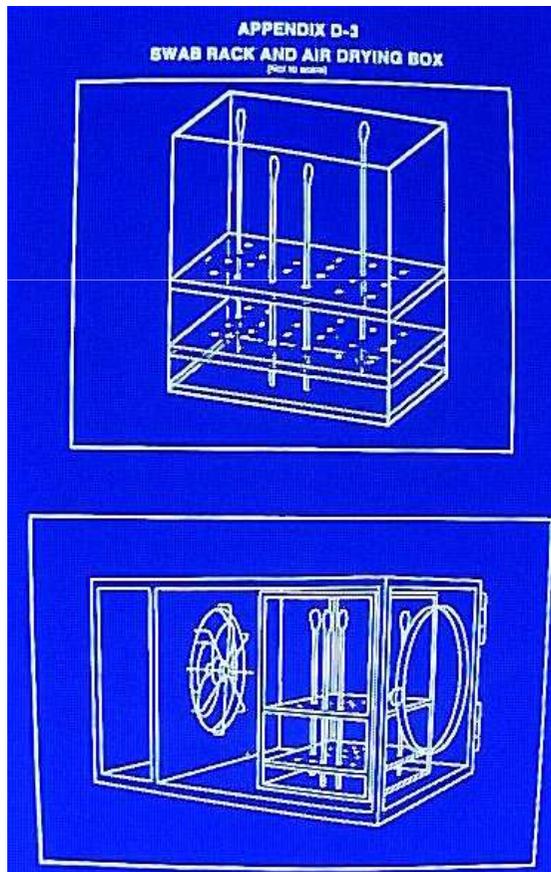




Espermatozoides

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

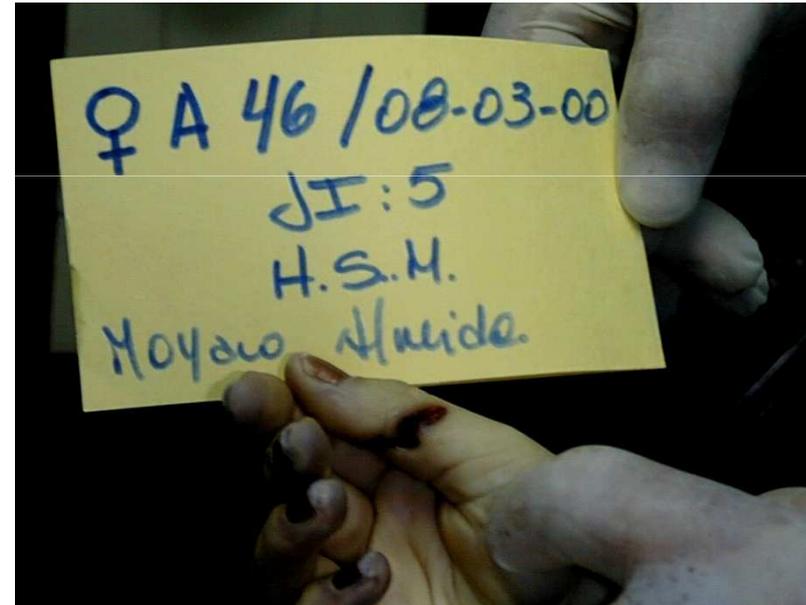
Evolución de los Conceptos de secado de Hisopados



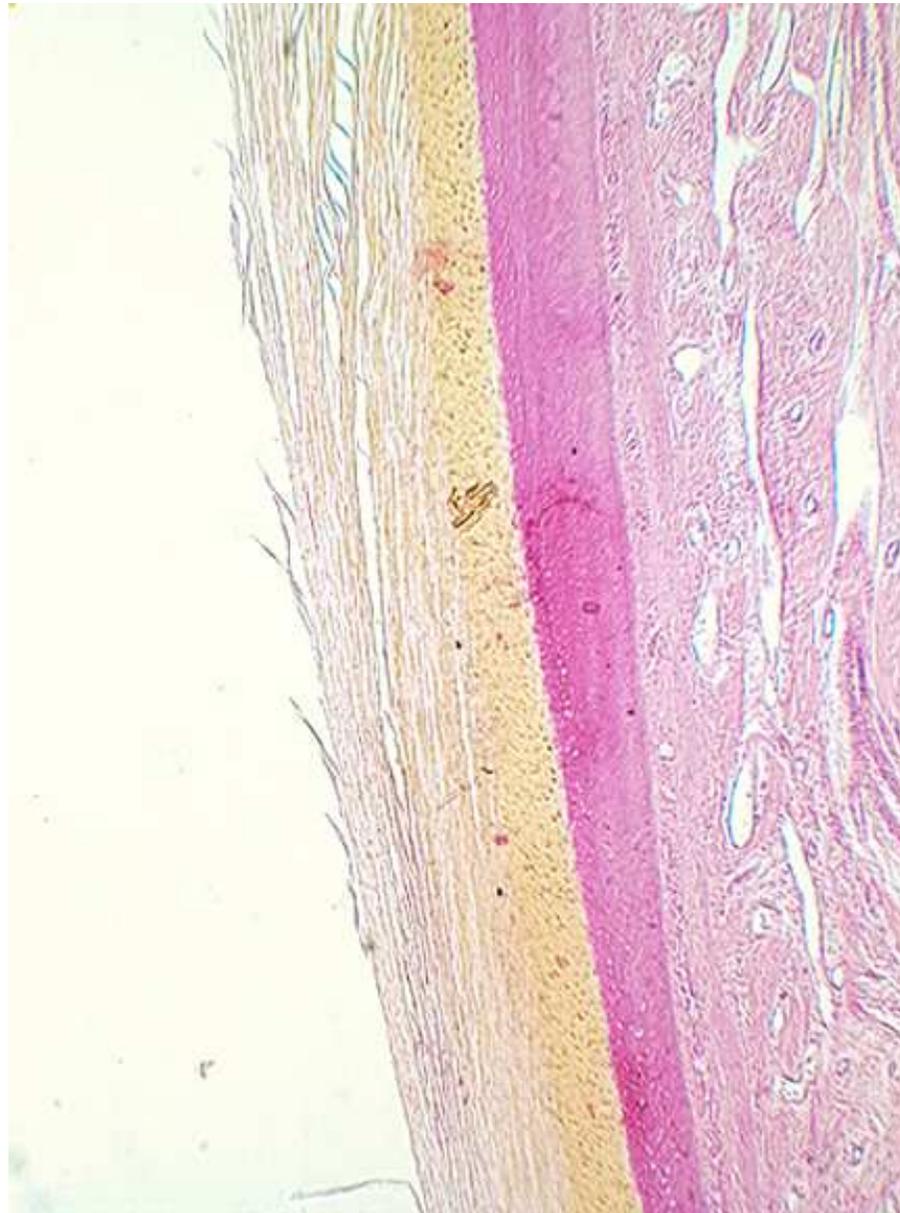
Materiales Fijados



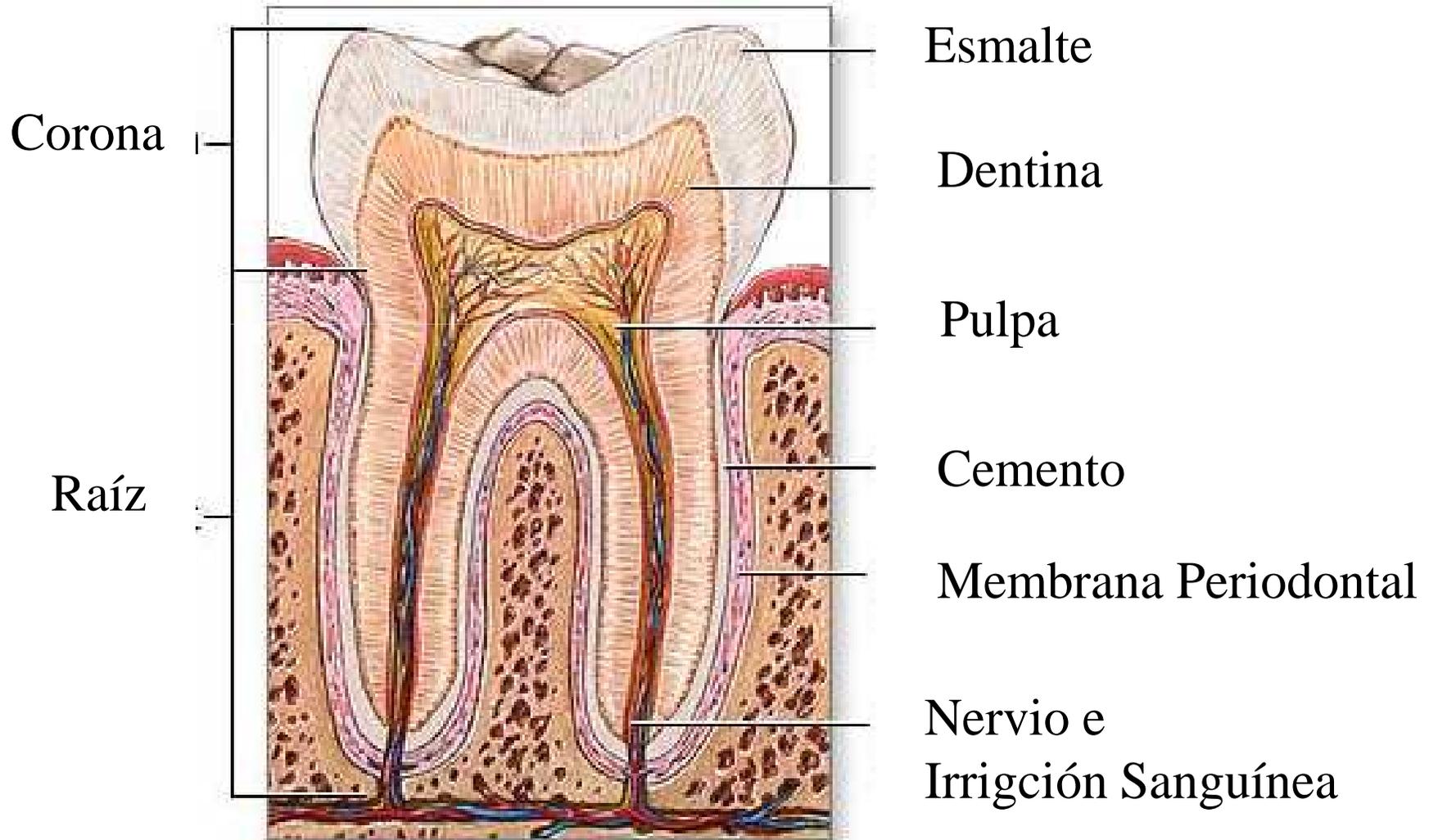
Uñas



Uñas



Dientes



Dientes

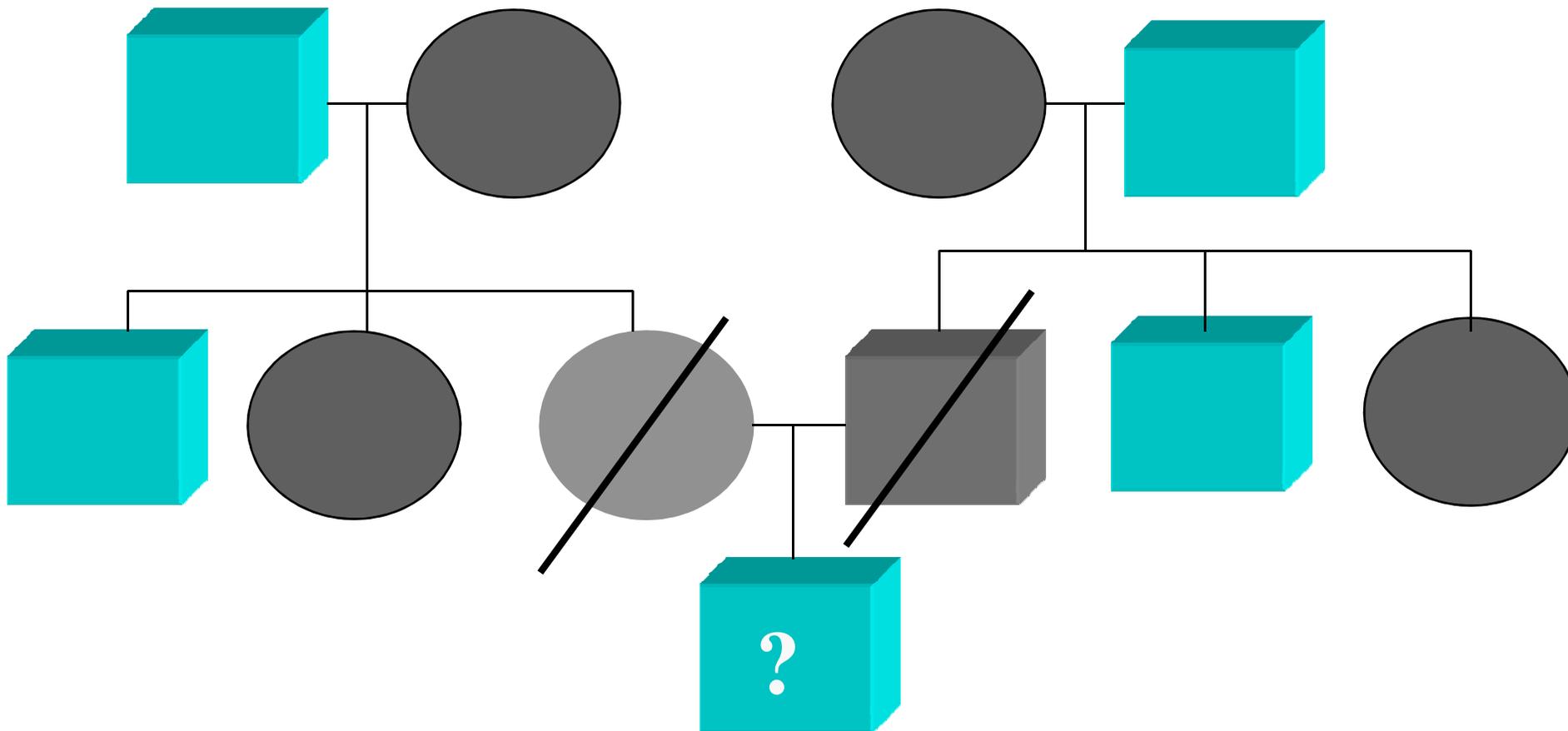


Material Cadavérico

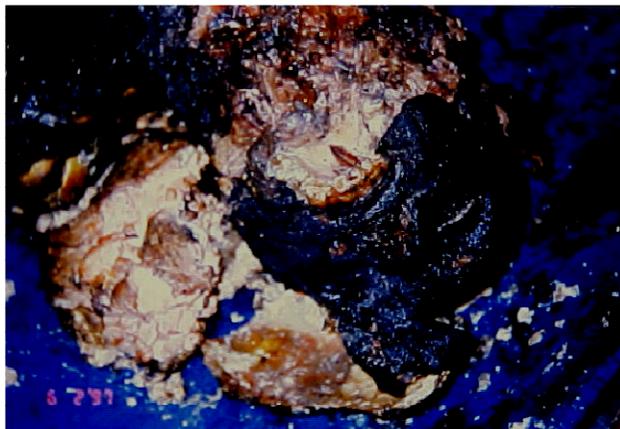
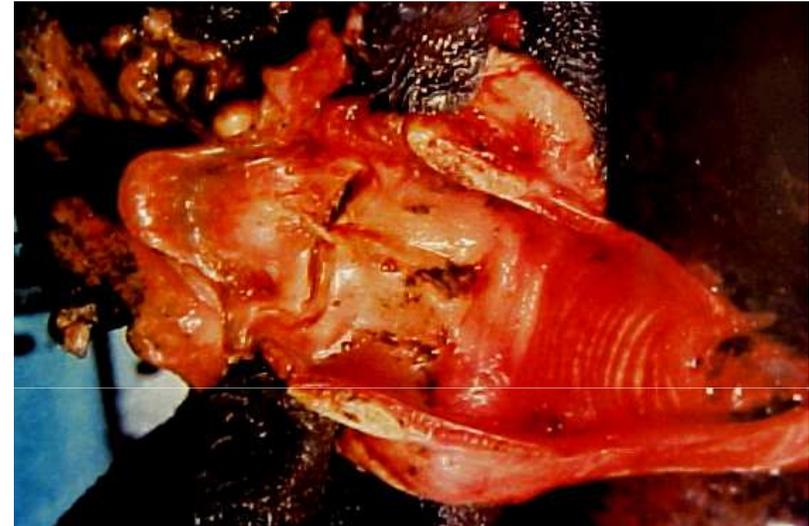
- En casos de estudios de paternidad “*Post Mortem*”, si en la familia existe un número considerable de parientes del fallecido se puede evitar la exhumación.
- El éxito del análisis de este material depende en gran medida del estado de conservación del material a analizar.

Análisis de Paternidad:

En Ausencia de Progenitores Directos



Cadáveres Quemados



Material Cadavérico Descompuesto

Efectos Ambientales



Cadáveres Saponificados



Tiempo de muerte aprox 8 años



Tiempo de muerte aprox 1,5 años

Cadáver conservado

- Conservado desde su muerte en cámara fría (8 meses).



Cadáver Momificado

- Tiempo de muerte aprox. 16 años.
- Inhumado en nicho.
- Proceso de momificación espontáneo.



Cadáveres en los Primeros Estadios de Descomposición



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

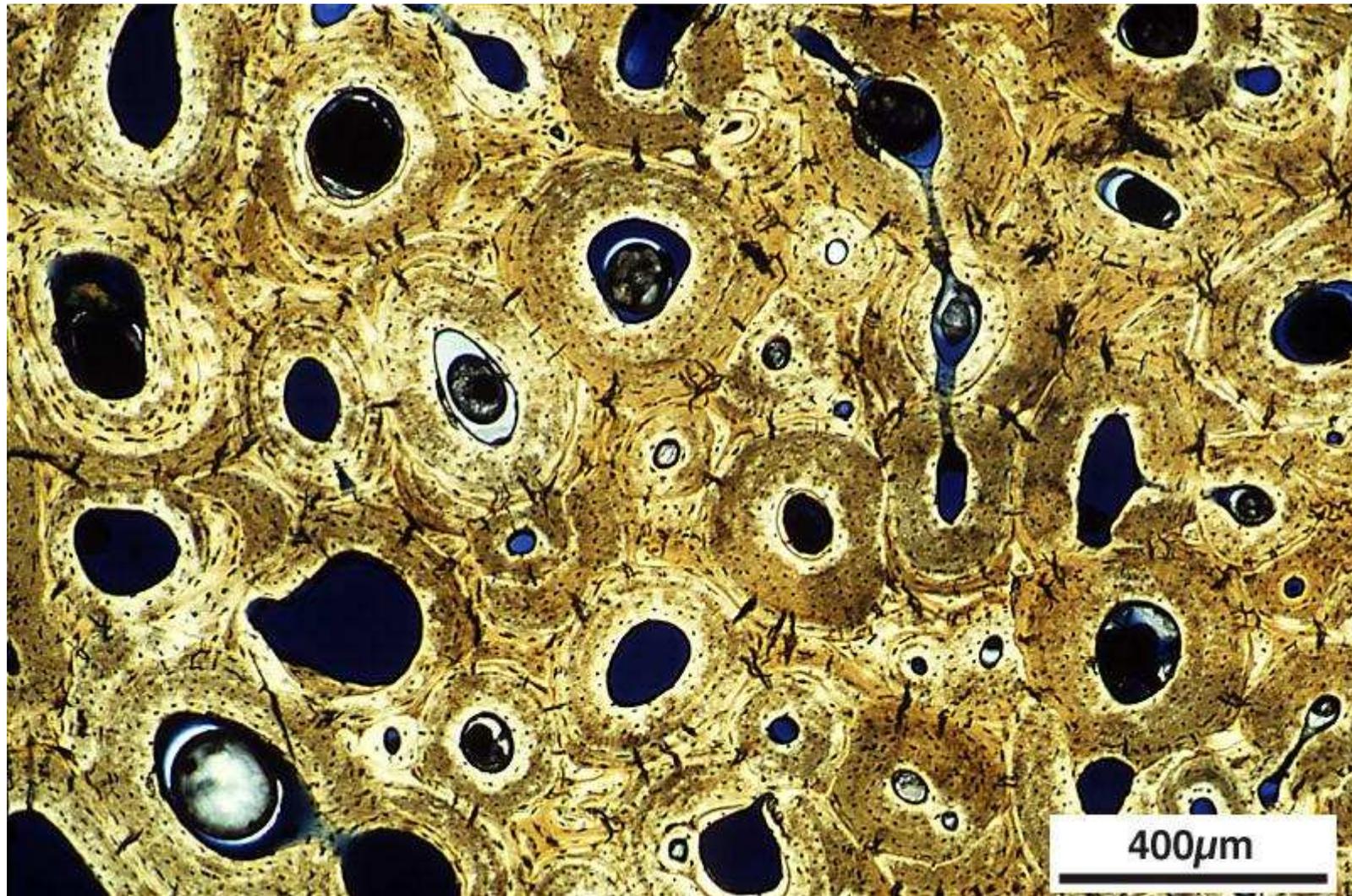
- Si el material se encuentra descomuesto un fragmento de 2 x 4 cm se debe colocar en un tubo de 50 ml (polipropileno) con sal de mesa.
- Si el material está seco o esqueletizado se podrá conservar a temperatura ambiente en sobres de papel Manila.

Tejidos Conservados

- Ciertos tejidos se conservan debido a condiciones ambientales durante periodos prolongados.
- Material muscular con más de 10 meses entre escombros de una explosión.



Hueso



Hueso

- El tejido óseo mineralizado es escaso en los recién nacidos.

El proceso de mineralización facilita la conservación de material genético.



Hueso



Hueso



Tiempo de muerte aproximado: 1,5 años

Huesos quemados con más de 10 Años

Recibidos



En proceso

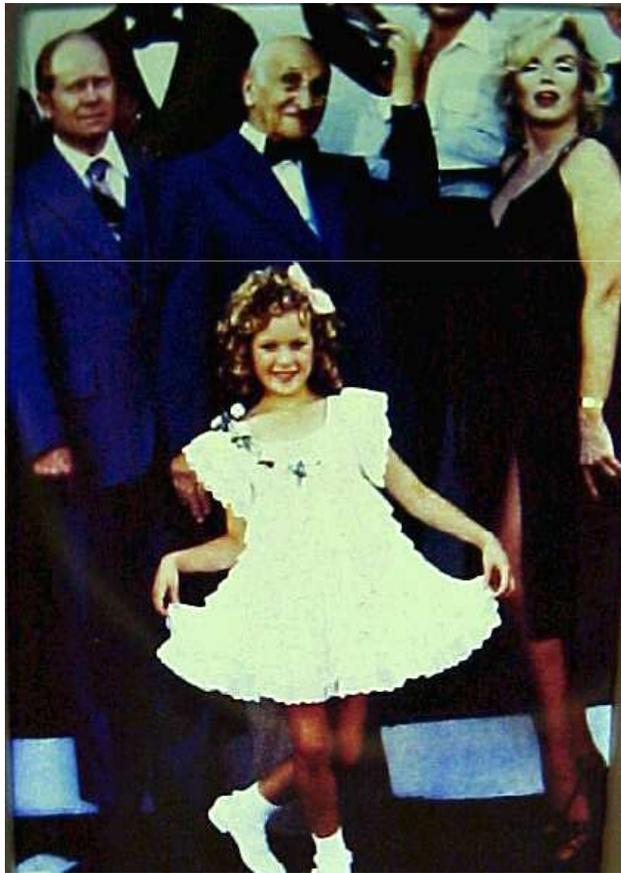




Armas

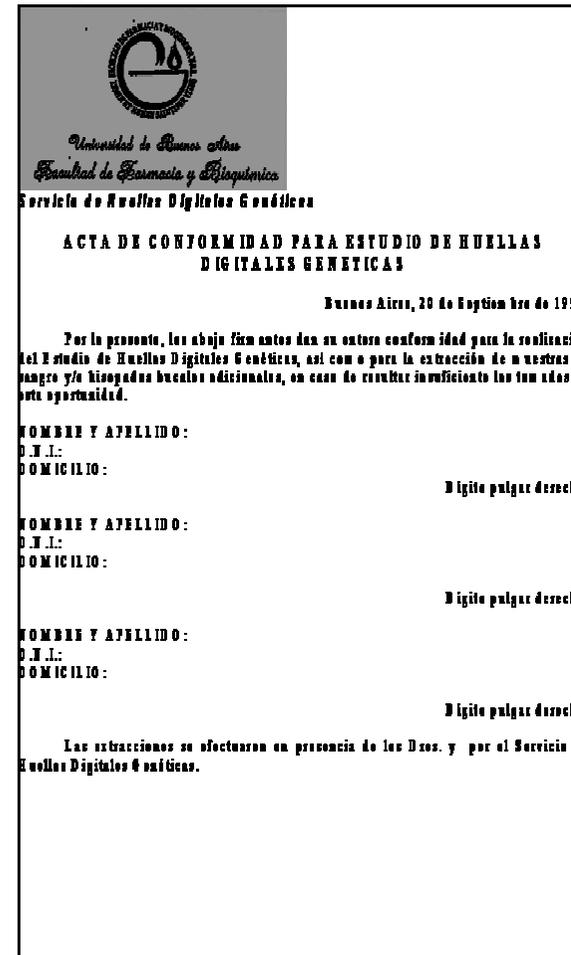
Investigación de Vínculos de Parentesco: Análisis Forense Simple

Cuál Será?



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 del 2019.

Por lo presente, los abajo firmes antes 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 las tomadas en esta oportunidad.

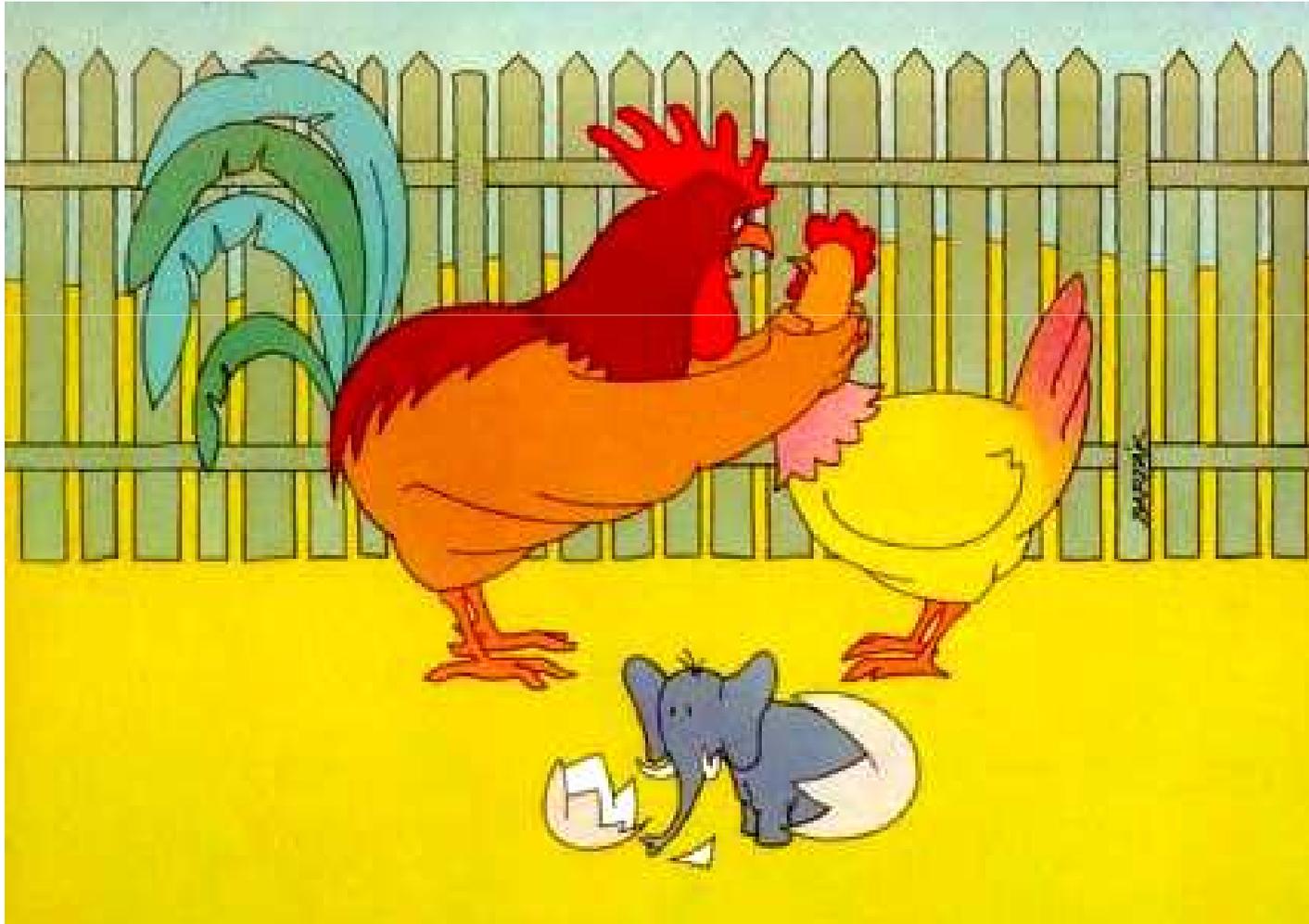
NOMBRE Y APELLIDO:
D.N.I.:
DOMICILIO: Dígite pulgar derecho:

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

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

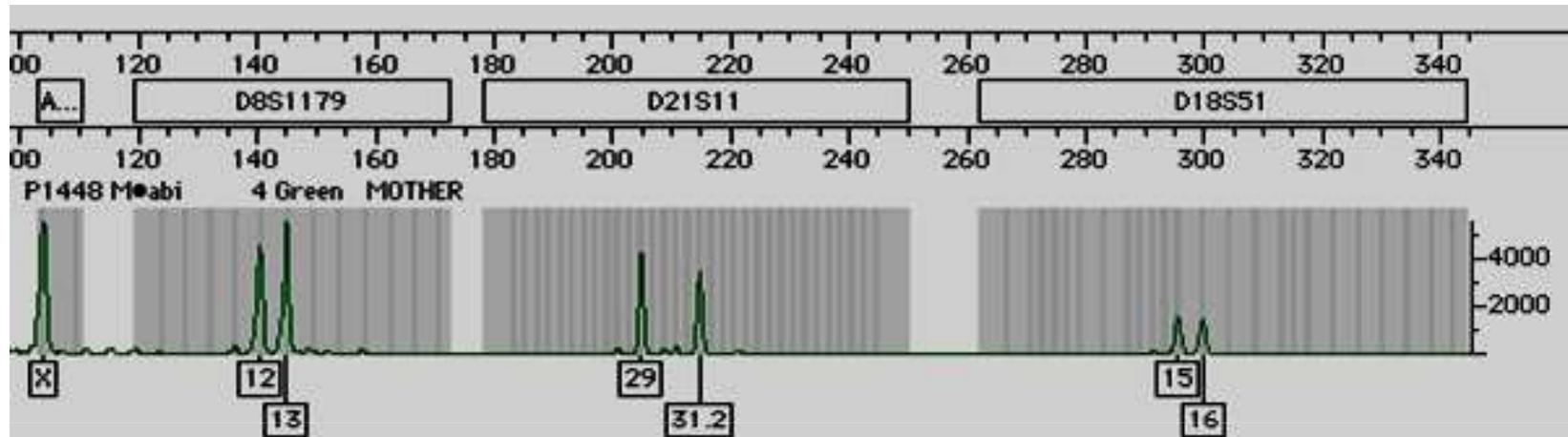
Las extracciones se efectuaron en presencia de los Dcos. y por el Servicio de Huellas Digitales Genéticas.

Menos Políticamente Correcto, Aunque Más Realista

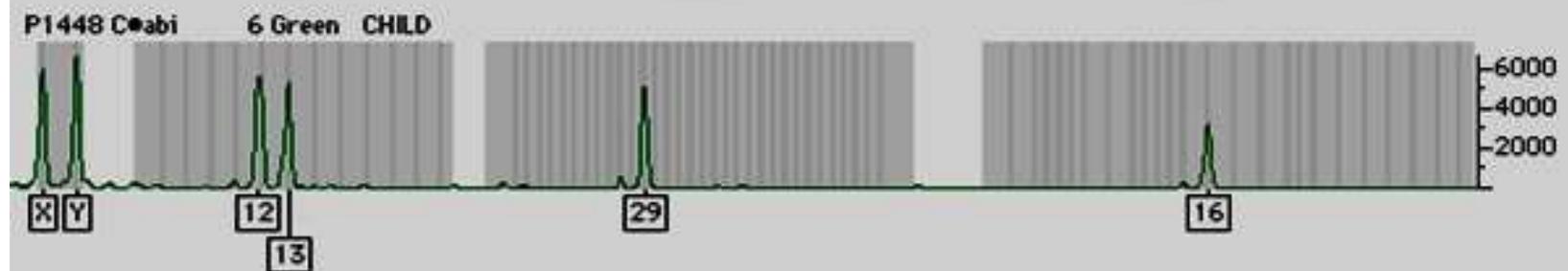


Cuatro STRs amplificados en Multiplex detectados simultáneamente

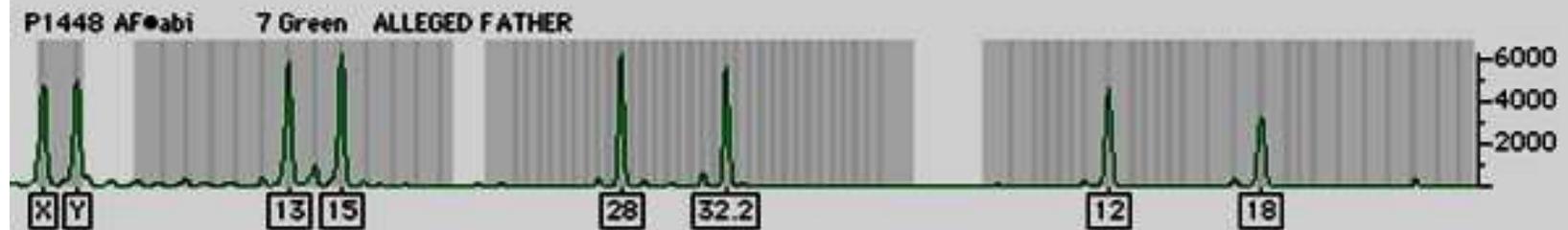
Gallina



Huevo

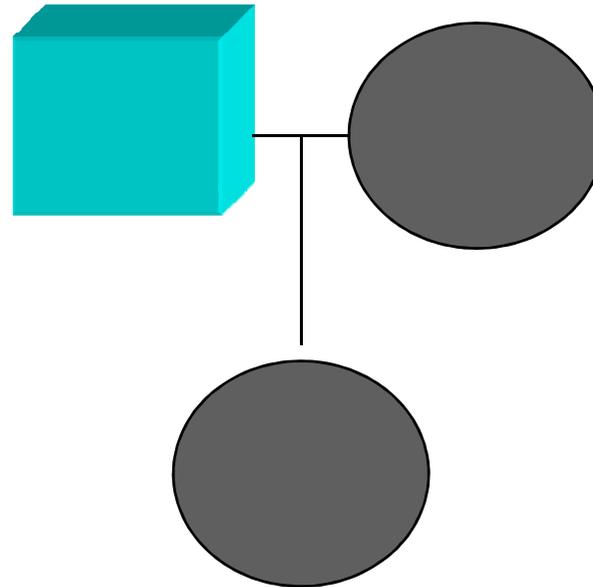


Gallo



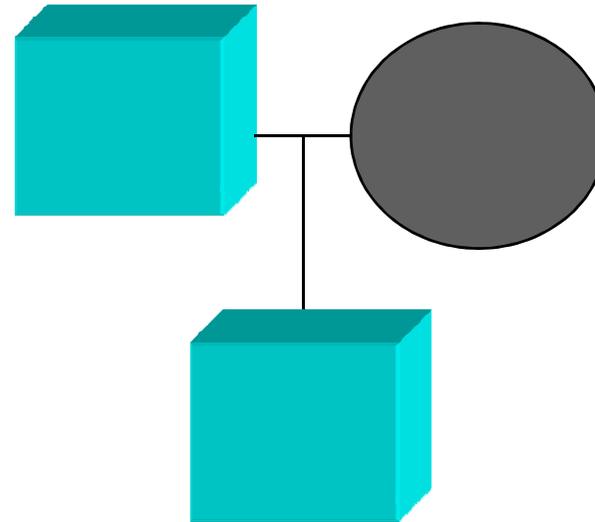
Criterios Empleados

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



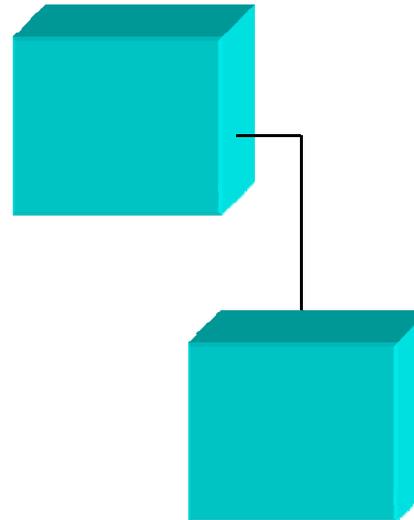
Criterios Empleados.

- 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.

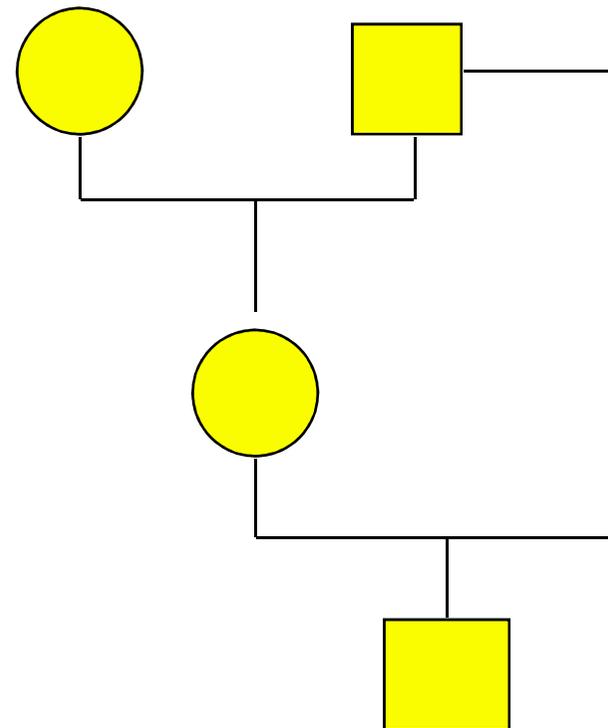


Características del Análisis.

- 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”



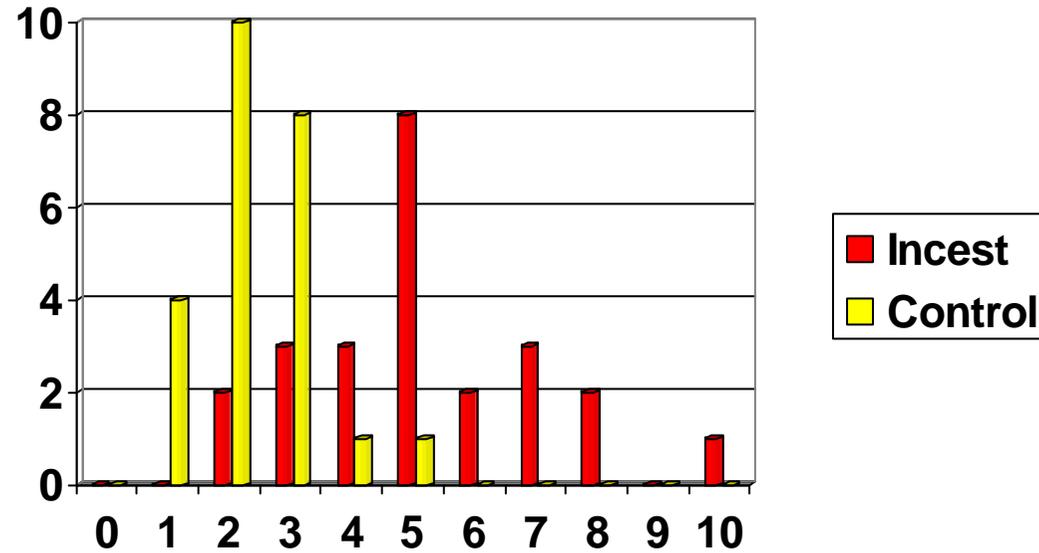
Código Penal, Cap. II “Violación y estupro”-
Art.122 y Cap. III “Corrupción, abuso
deshonesto y ultrajes al pudor” Art 125.
(Ley 20509 y 23077)

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)

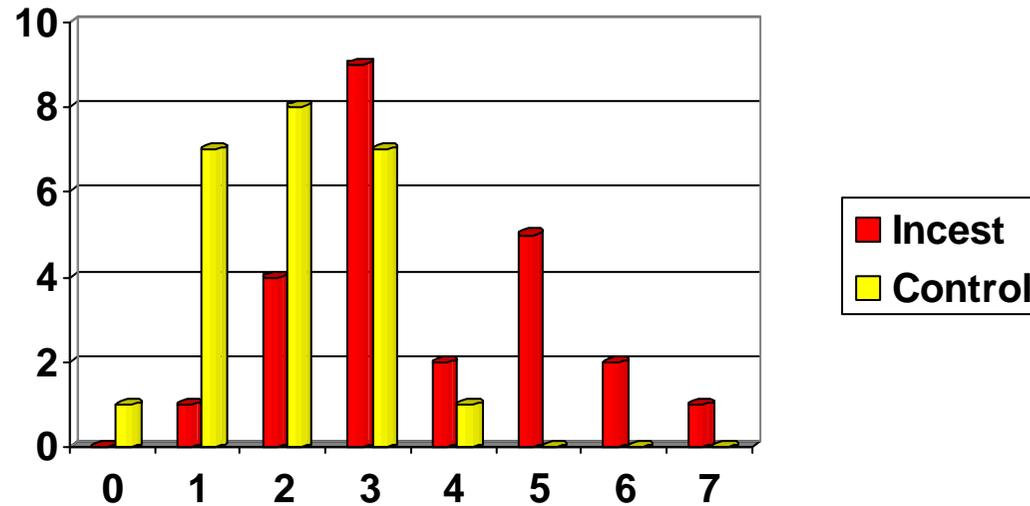
Perfiles homocigotas



Frecuencias de Heterocigótas Iguales

((n=24))

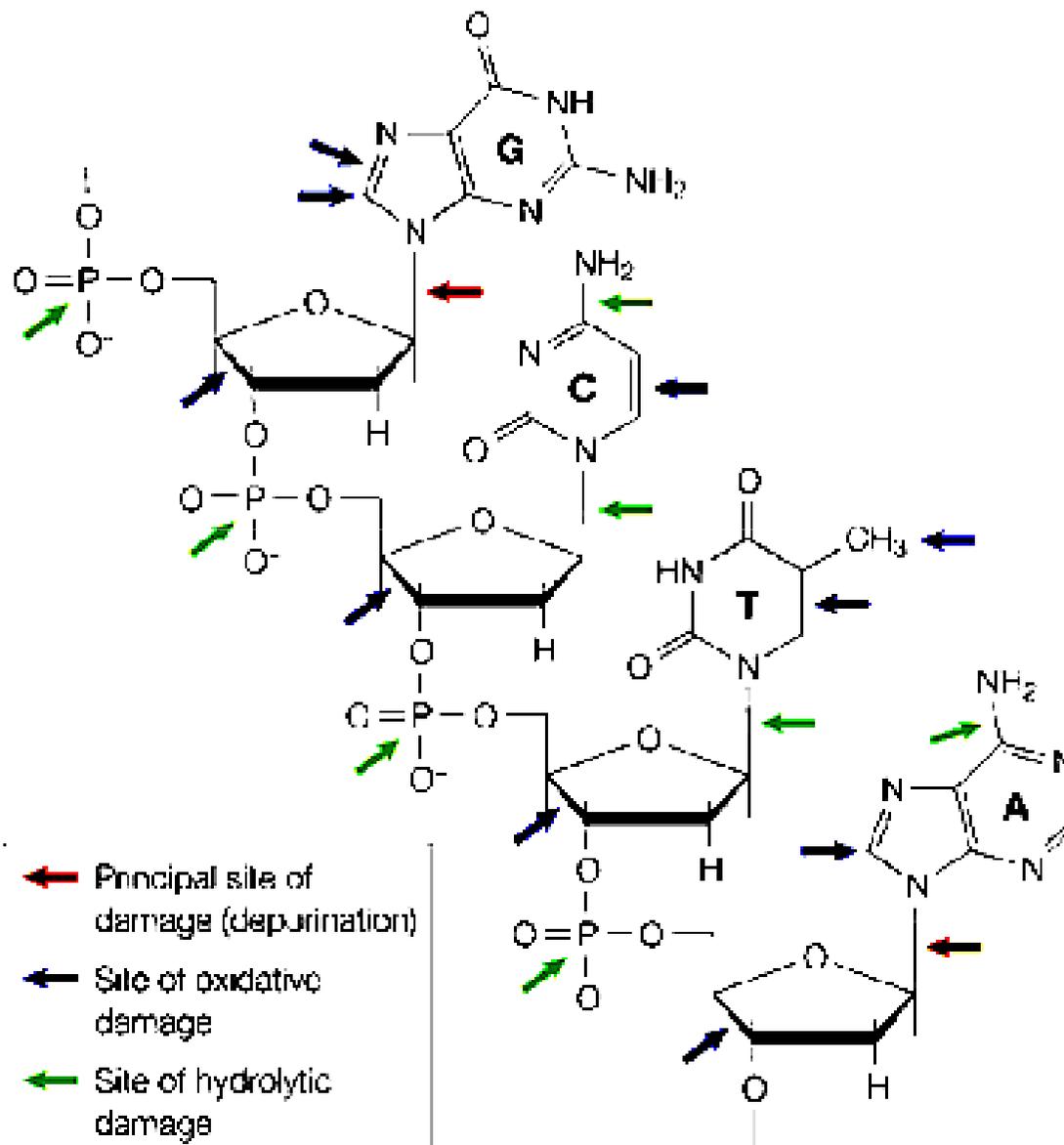
Perfiles heterocigotas e iguales



Situaciones Analíticas Complejas

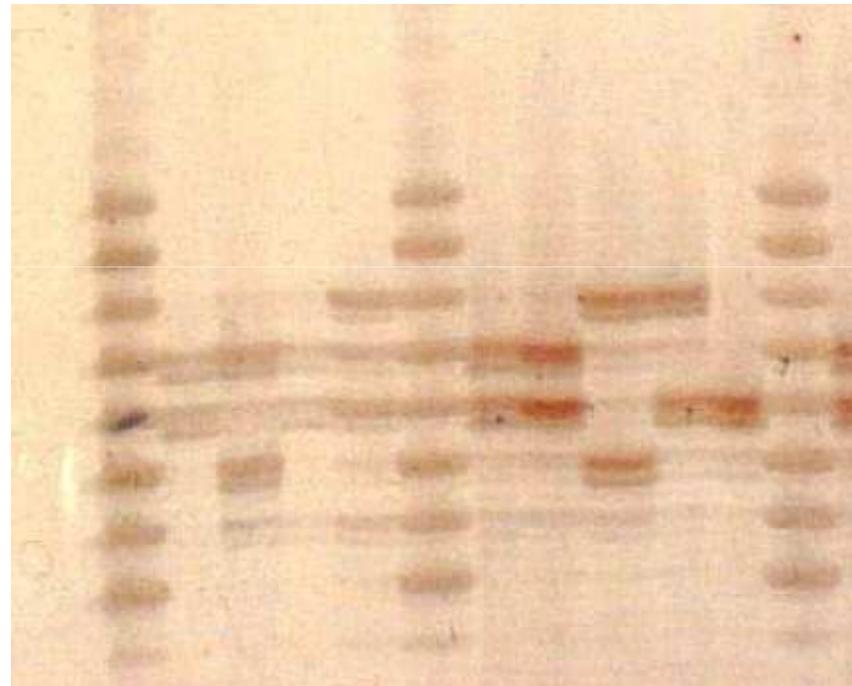
Hueso





Analisis de Microsatélites

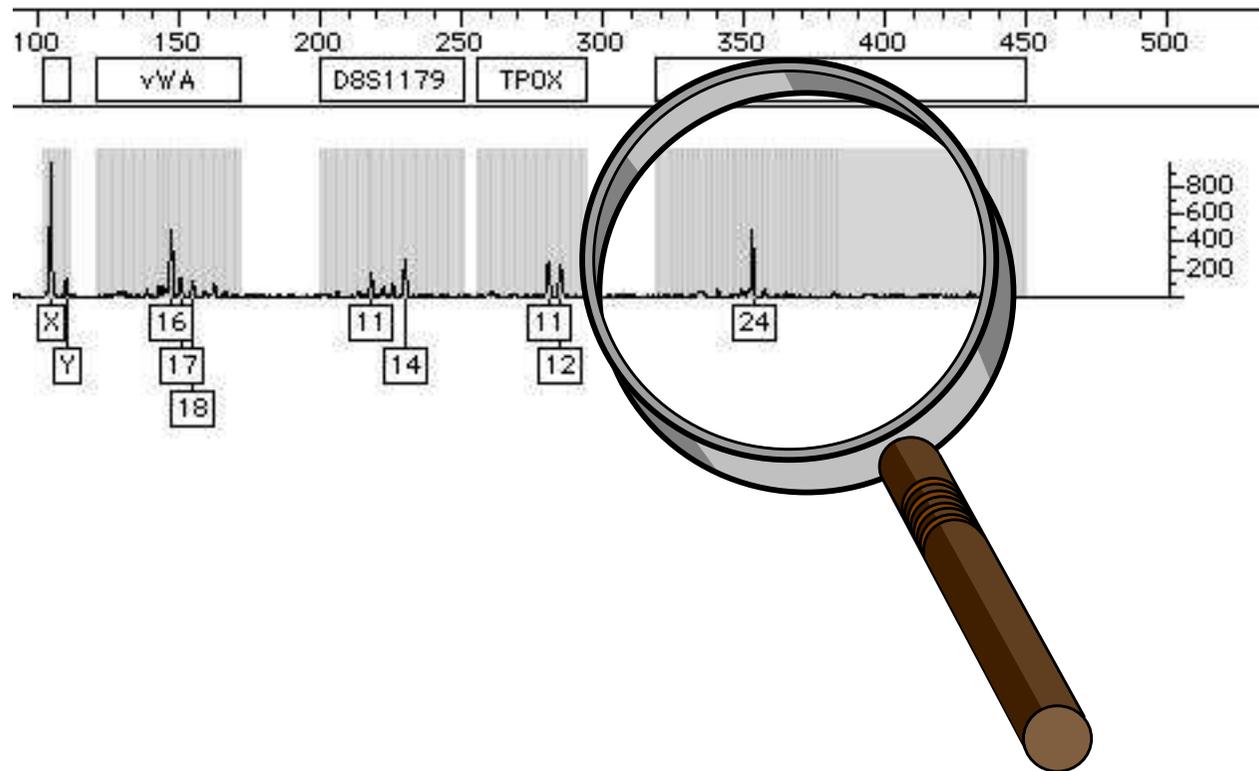
- Algunos STRs requieren particular atención en el momento del análisis.
- El sistema VWA es uno de ellos.



Análisis de Material Cadavérico.

Resultados Sin Editar.

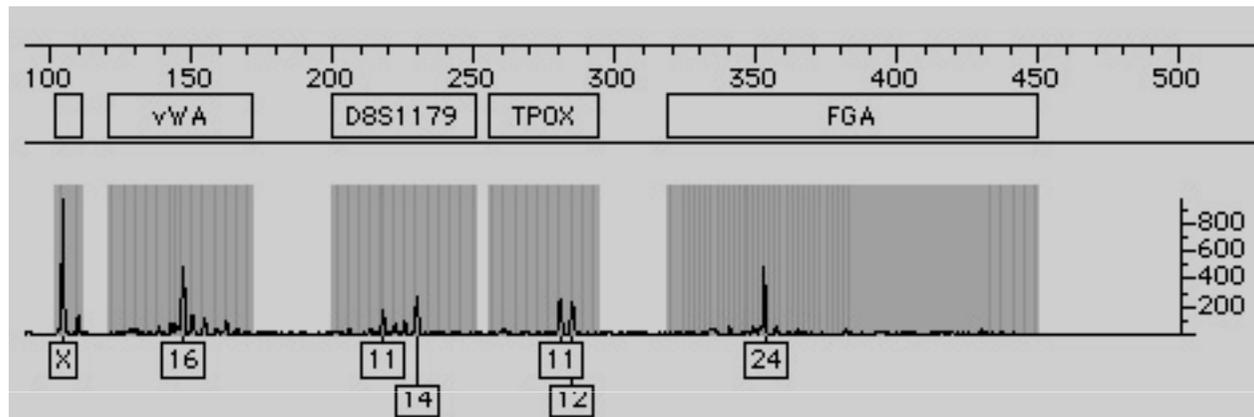
Hueso



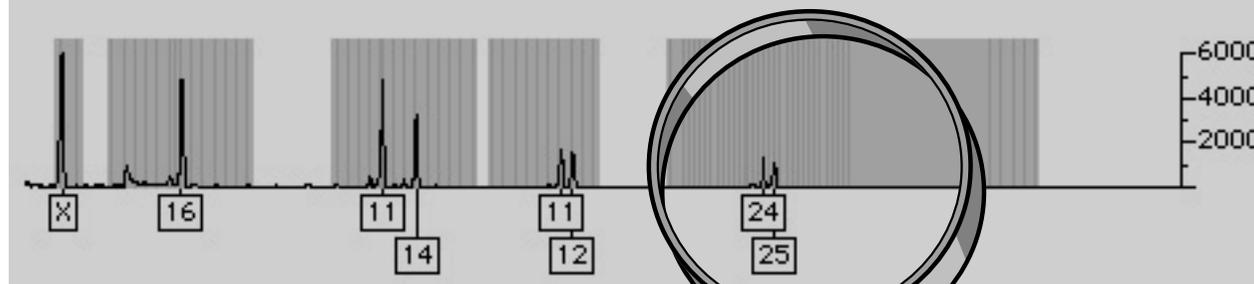
Análisis de Material Cadavérico.

Resultados Editados.

Hueso

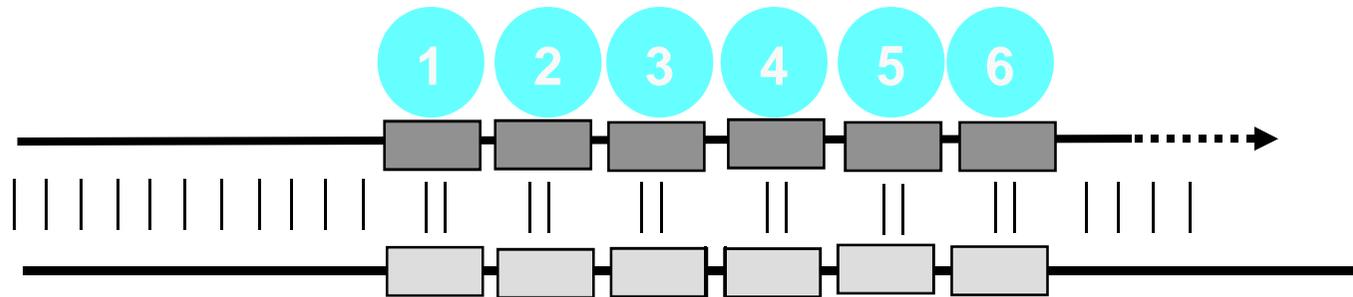


Cordón Umbilical

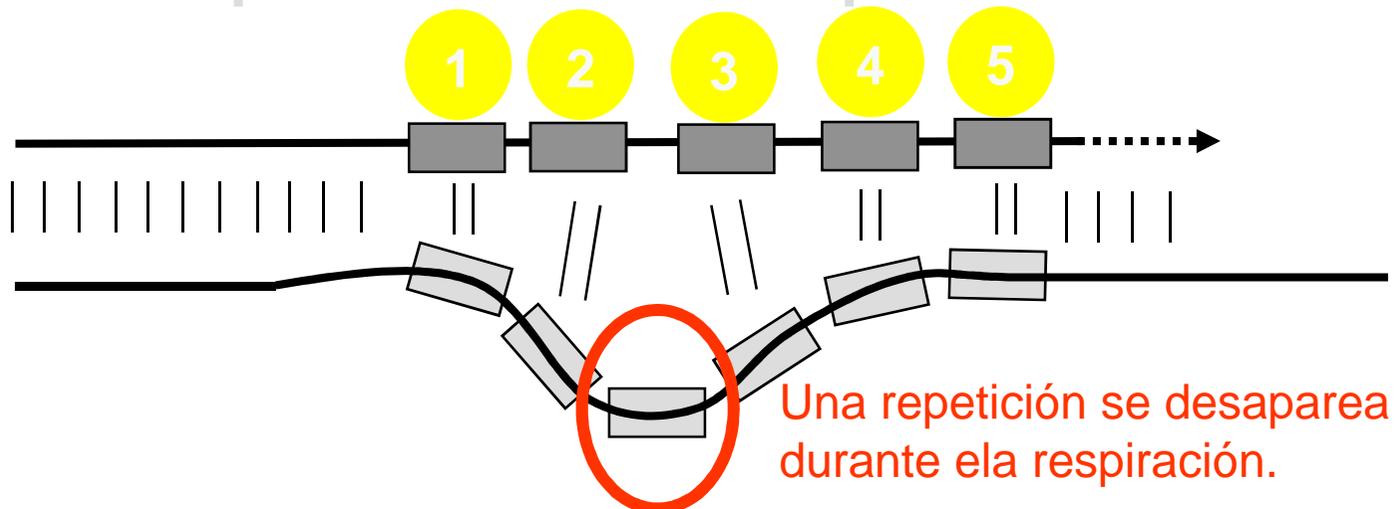


Esquema del Proceso de Formación de Productos “Stutter”

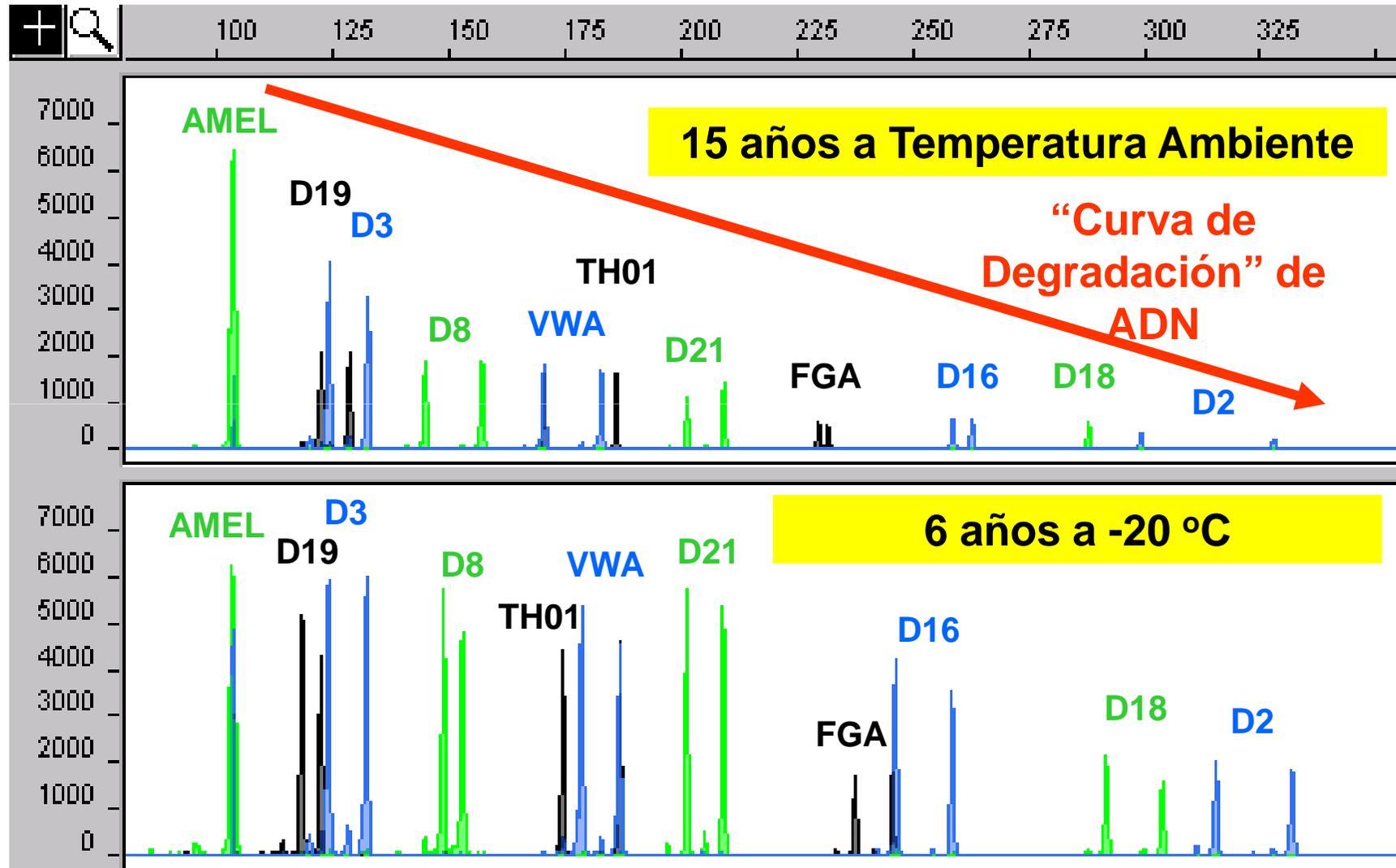
Normal STR Allele Replication



Cadena desplazada Modelo de Apareado incorrecto



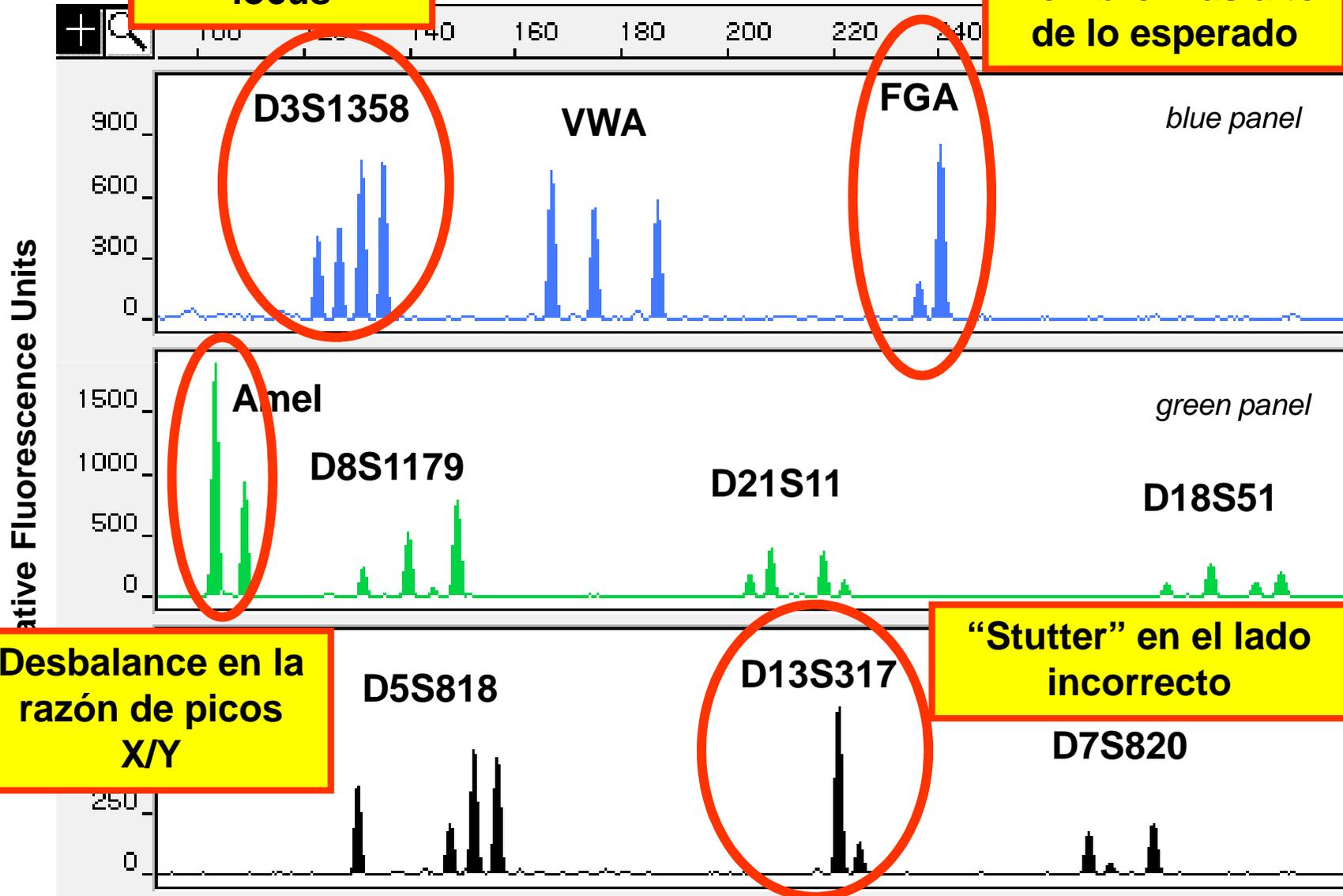
Resultados con ADN Degradado



Ejemplo de Muestra Mezclada

4 picos en un locus

Hombro más alto de lo esperado



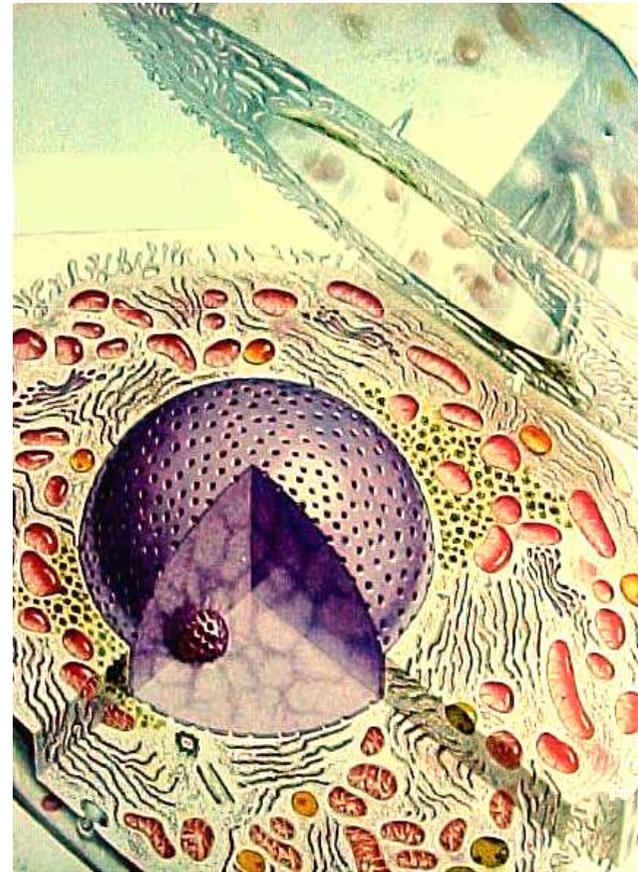
Desbalance en la razón de picos X/Y

“Stutter” en el lado incorrecto

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

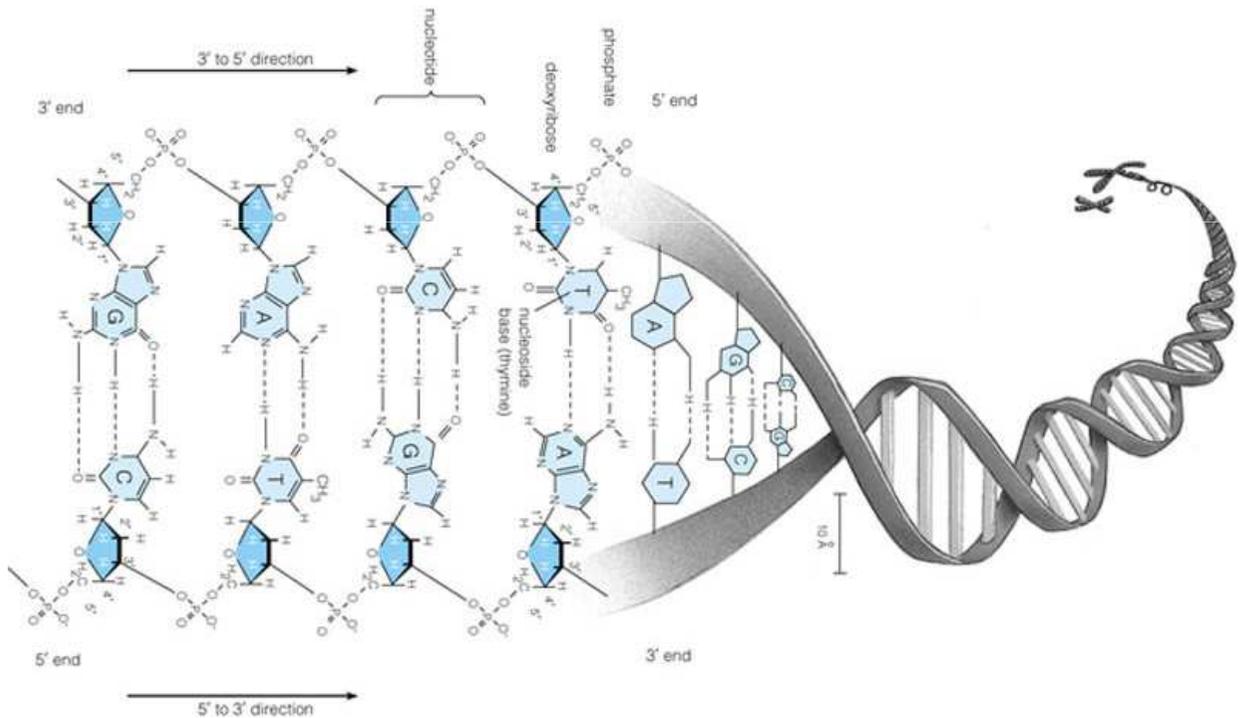
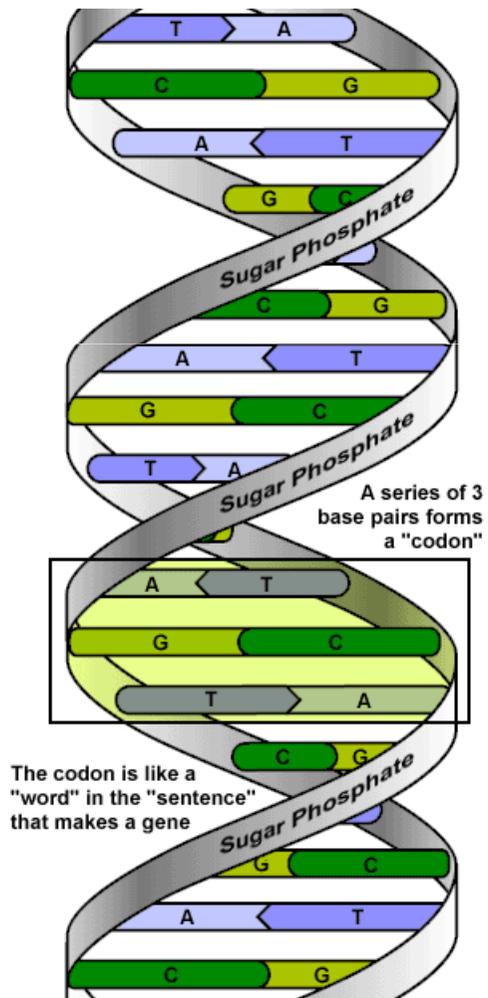
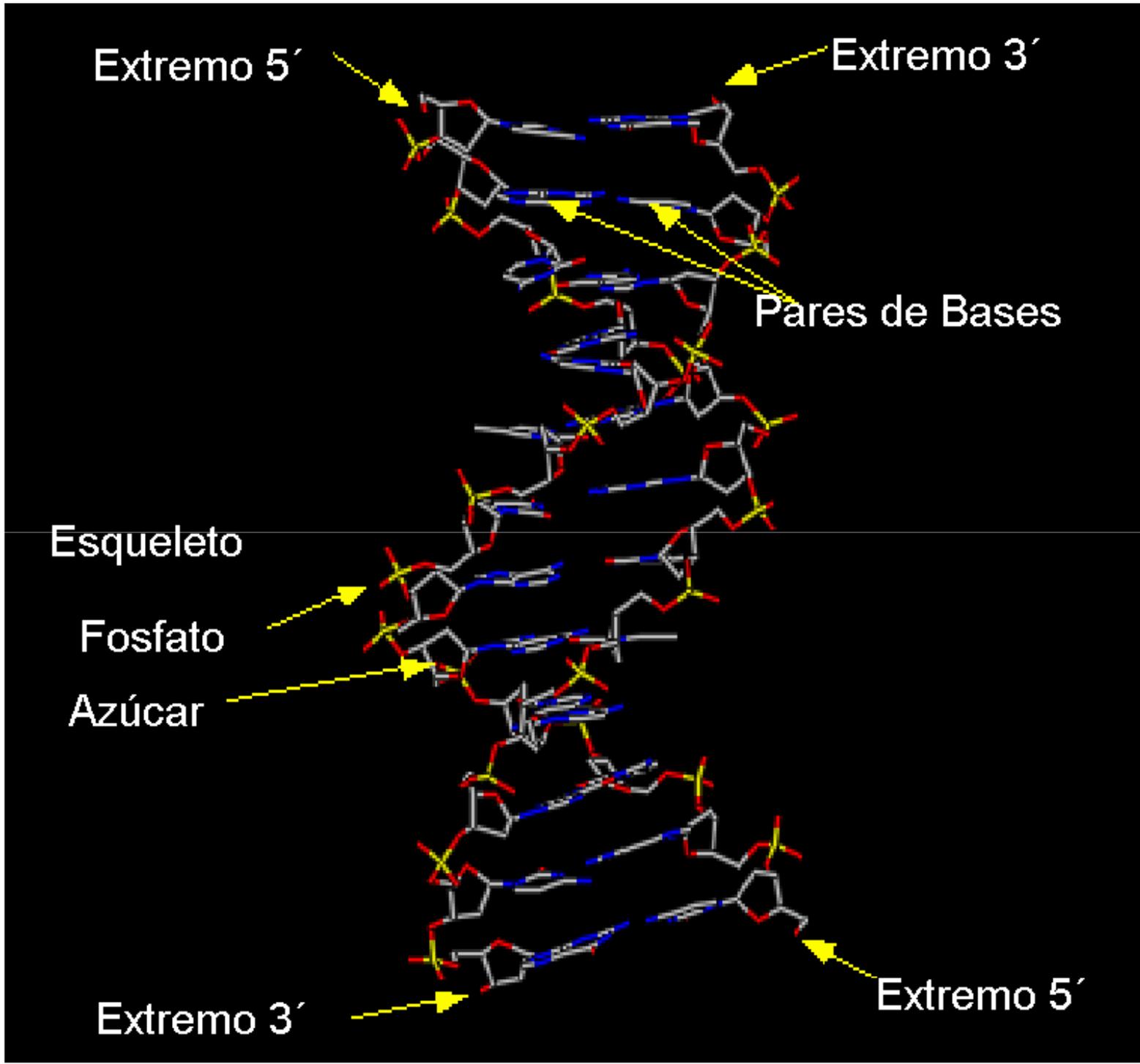


FIGURE 2.10 The double-strand structure of DNA illustrating the nucleotides, each composed of a deoxyribose sugar, a phosphate, and a nitrogen-containing base.

Vista lateral
de una
Molécula de
ADN



Extremo 5'

Extremo 3'

Pares de Bases

Esqueleto

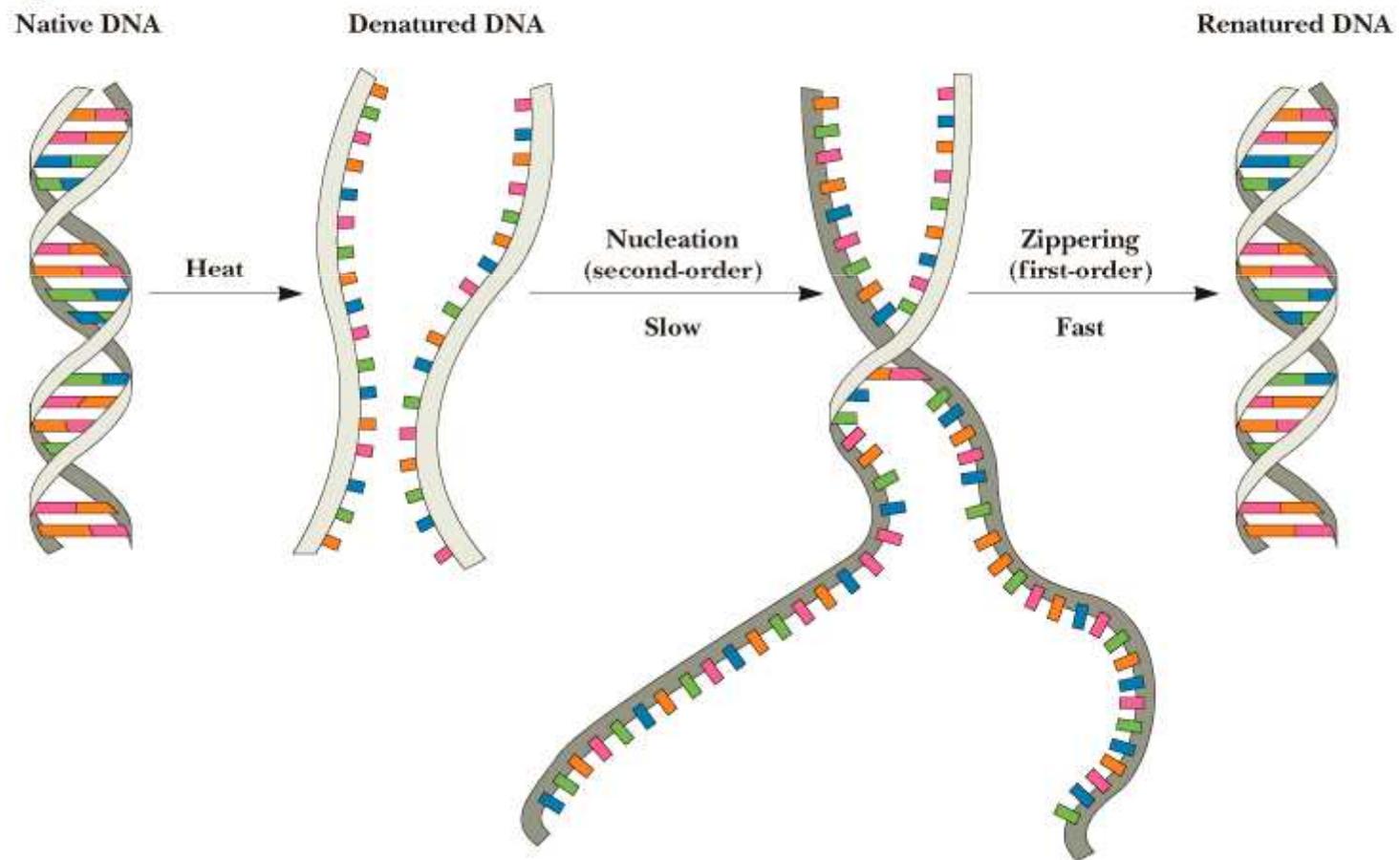
Fosfato

Azúcar

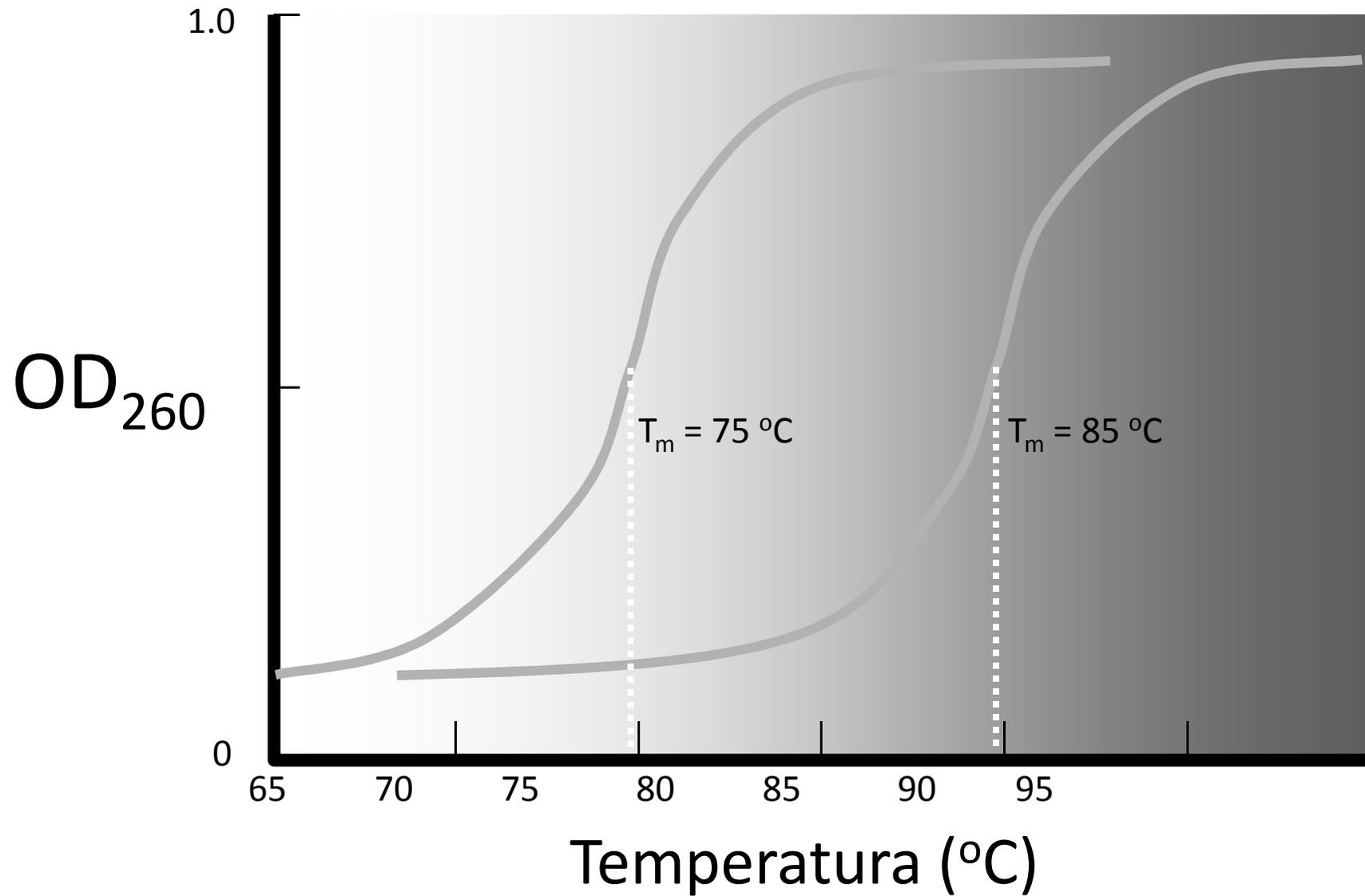
Extremo 3'

Extremo 5'

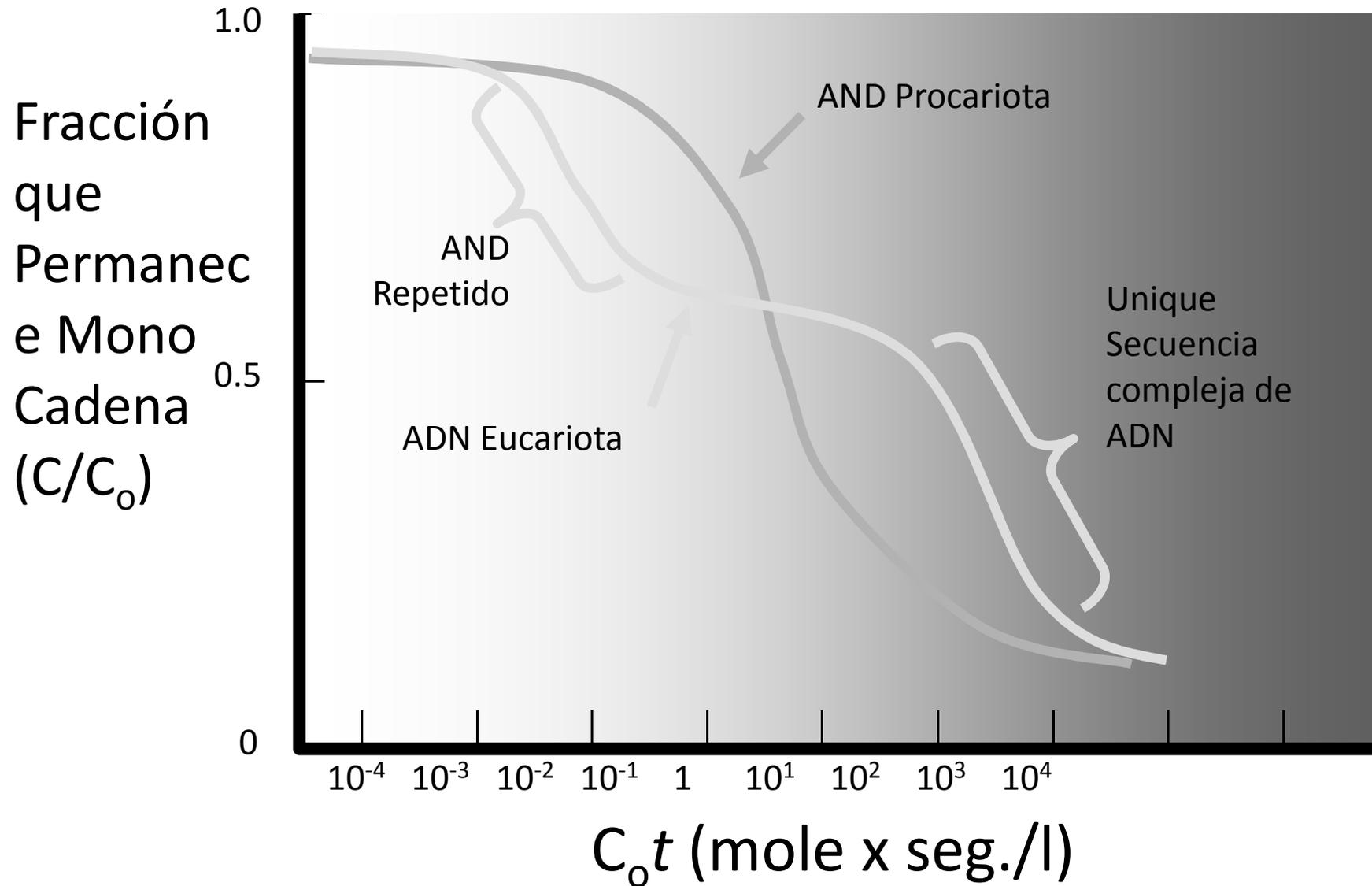
Cambios Estructurales Durante la desnaturalización



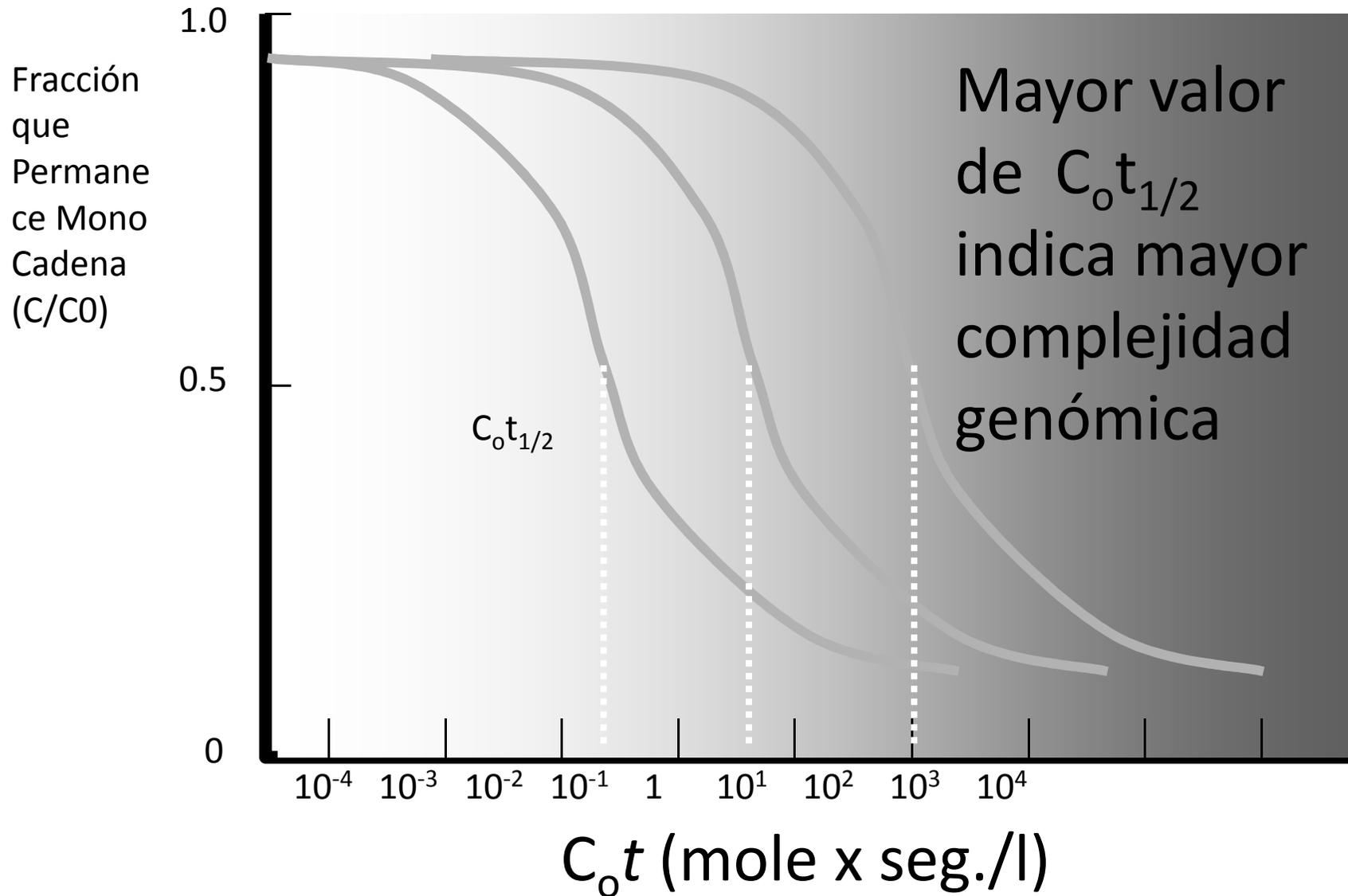
Seterminación del Contenido en GC



Cinética de Reasociación



Cinética de Reasociación



Hibridación

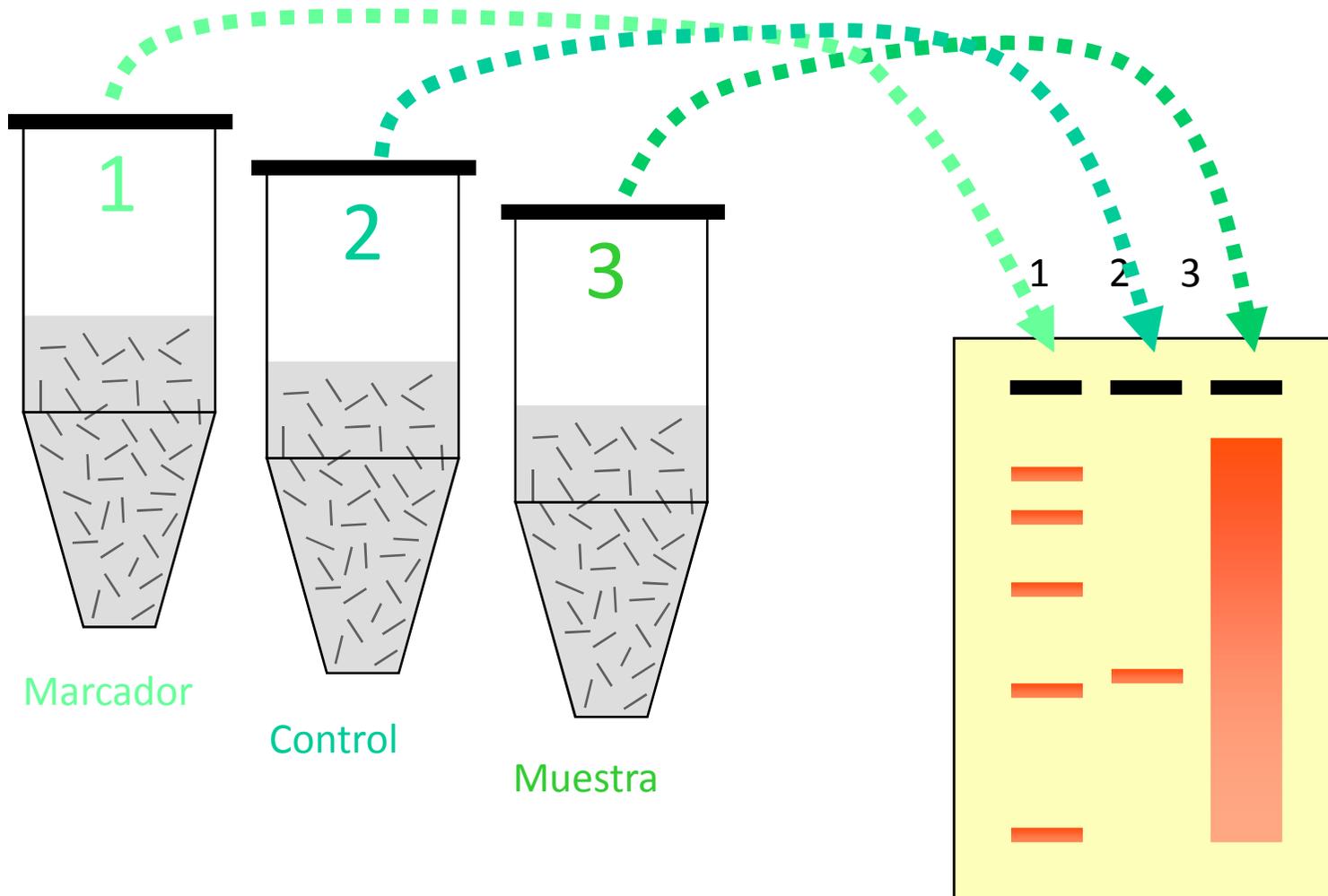
AND Templado



Primer

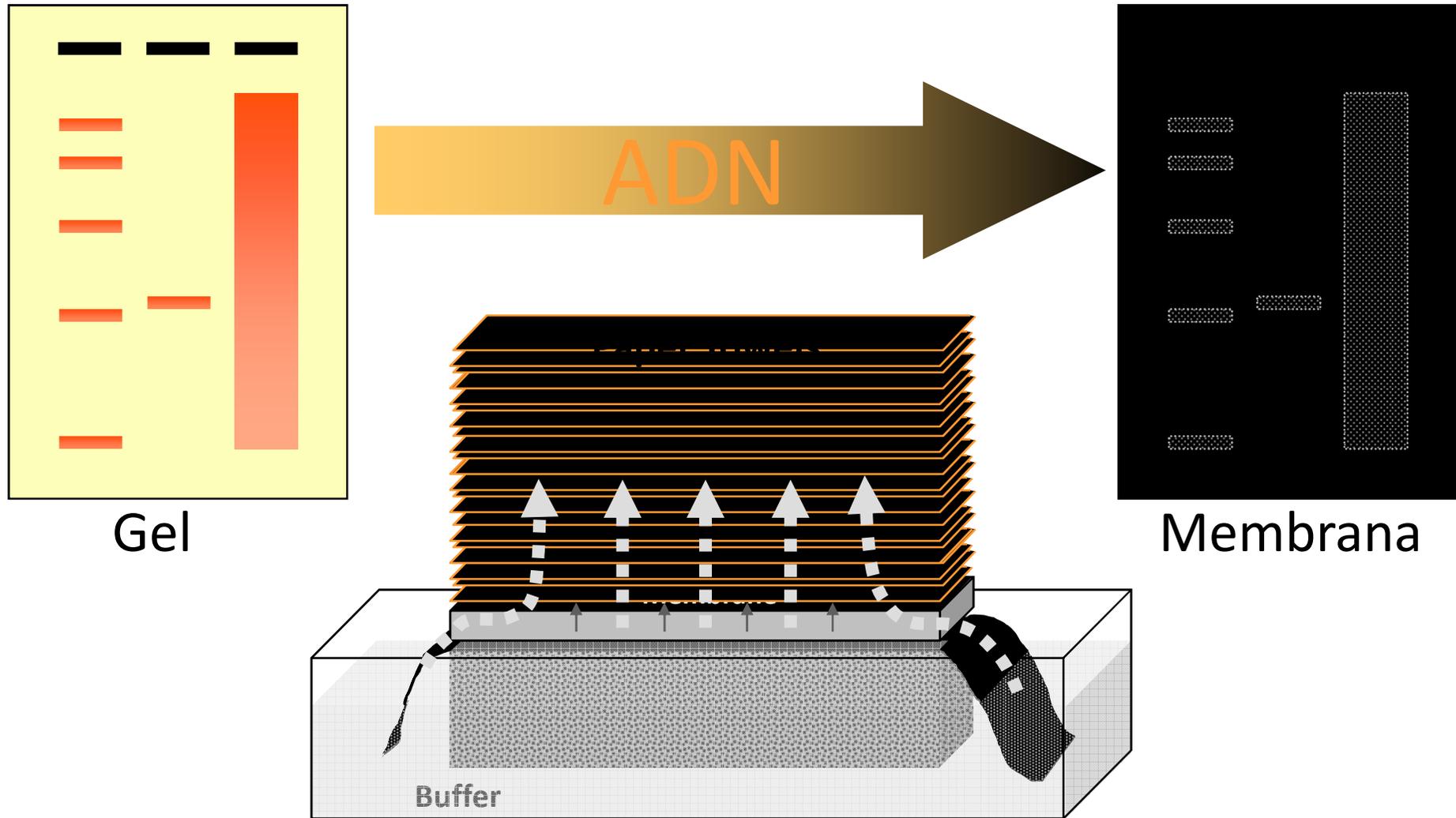
Análisis de Southern:

Restricción y Separación Electrofrética

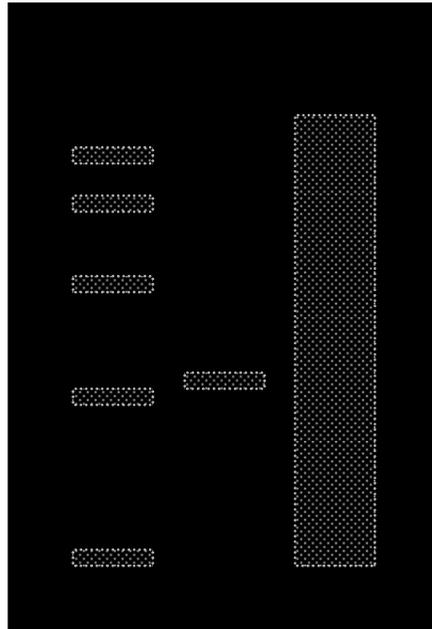


Análisis de Southern

Transferencia del ADN a la Membrana

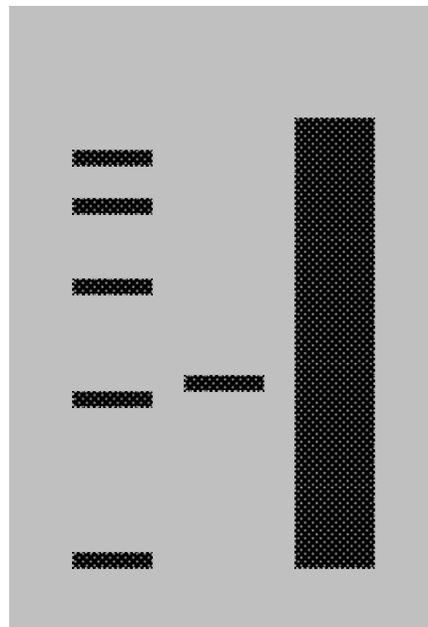


Análisis de Southern Hibridación con la Sonda



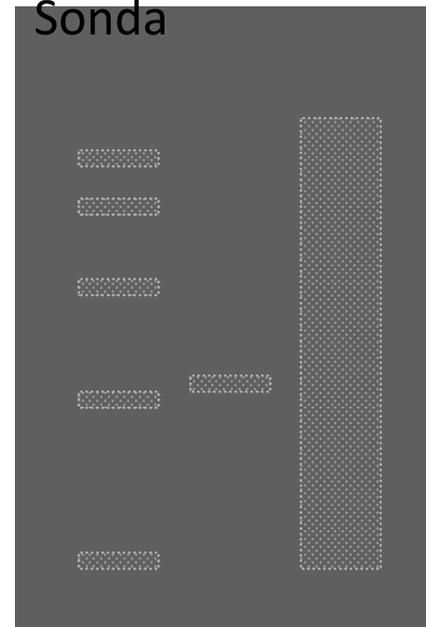
Membrana con
AND fijado

Agregado de
Bloqueante



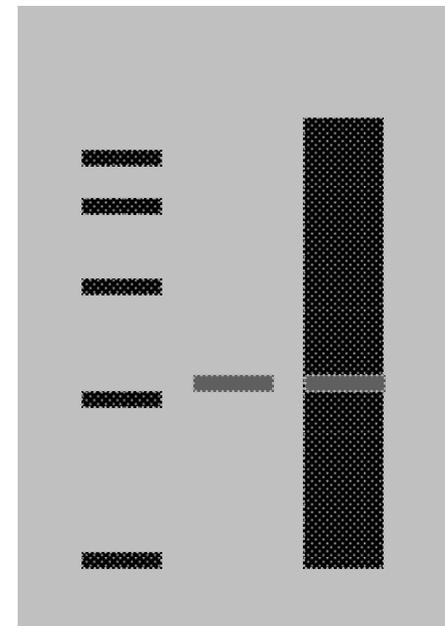
El AND
bloqueante se une
al ADN

Agregado de la
Sonda



La sonda cubre a
la membrana
pero sólo se une
a lo
complementario

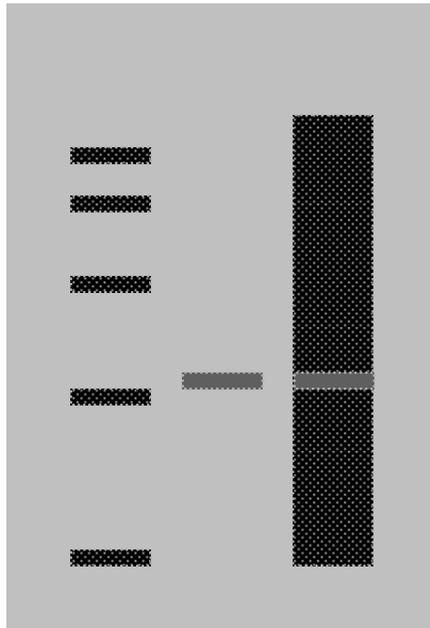
Luego del lavado



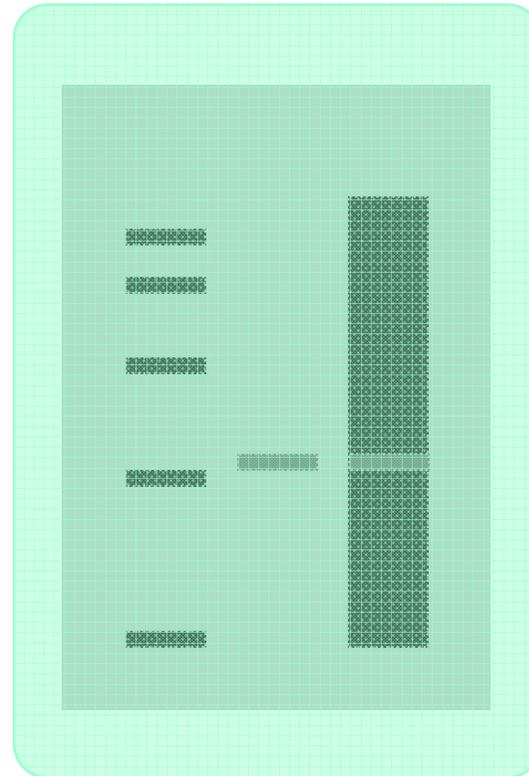
Sólo se detecta la
señal en las zonas
específicas

Análisis de Southern

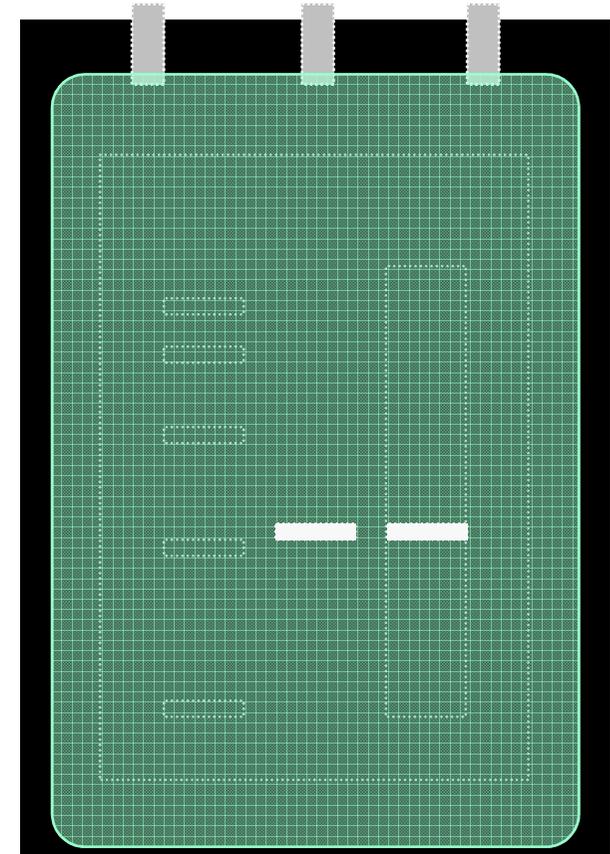
Revelado de Autorradiografías



Membrana con la sonda marcada hibridizada



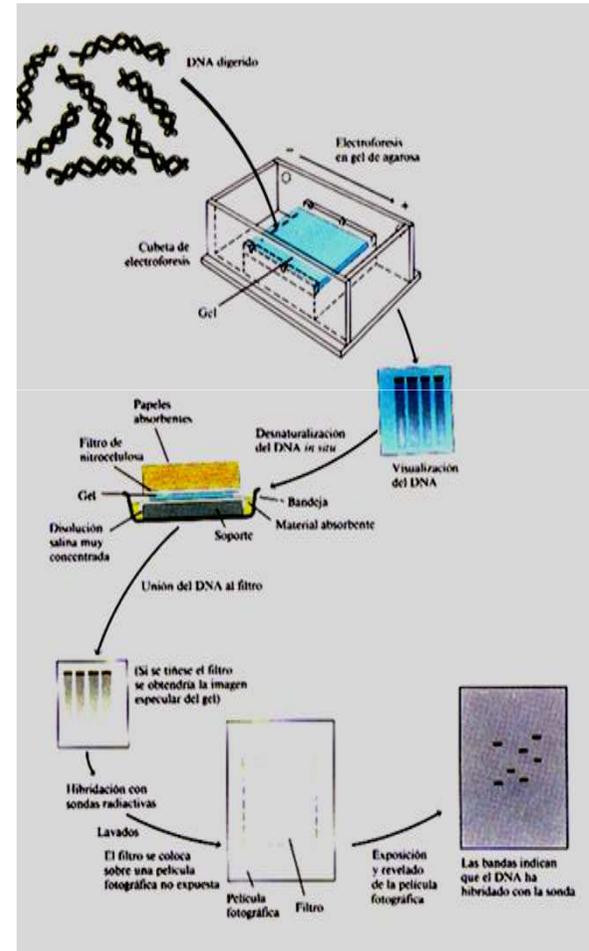
Exposición a placas d Rx



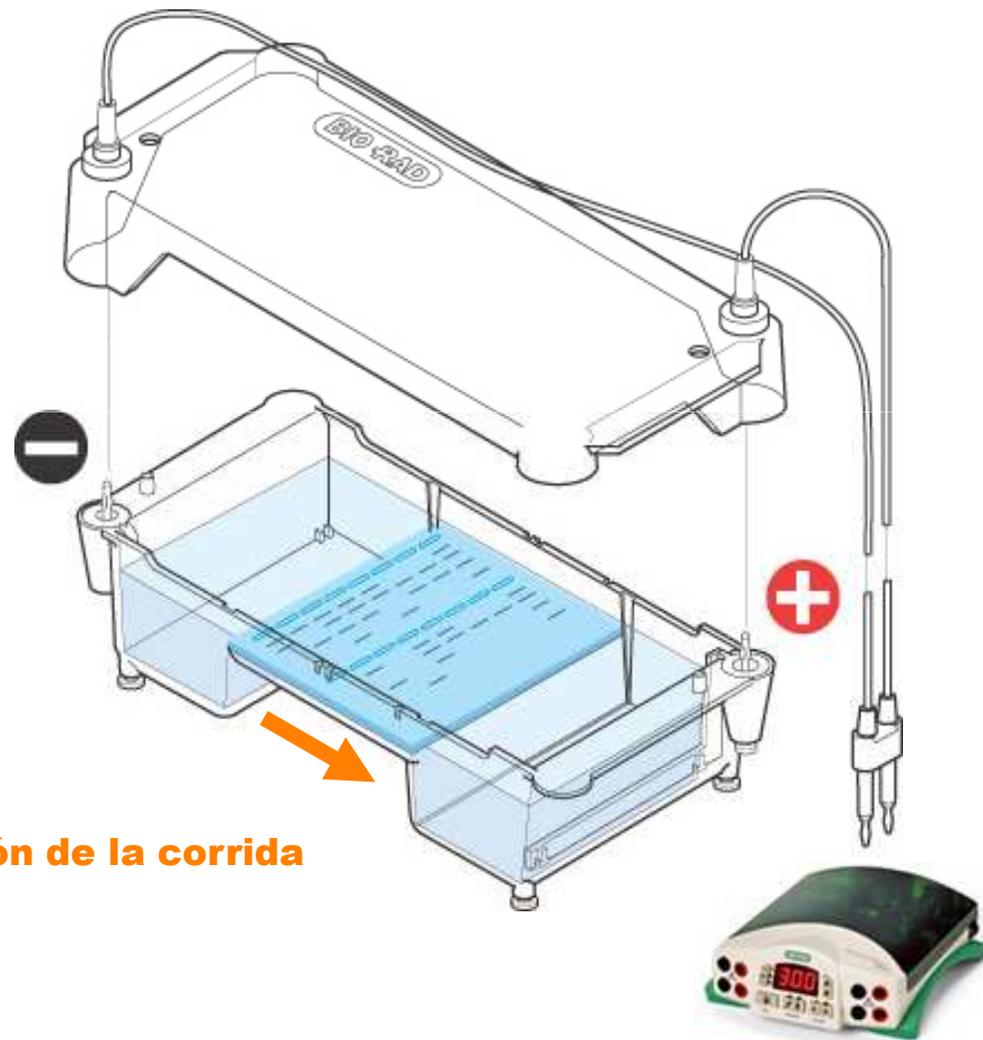
Se detectan los fragmentos específicos

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

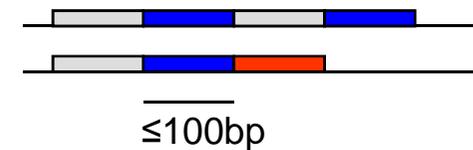
Tipos de Polimorfismos

- 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 $\leq 10^{-1}$

TGCATTGCGTAGGC
TGCATTCCGTAGGC

TGCATT---TAGGC
TGCATTCCGTAGGC

TGCTCATCATCAGC
TGCTCATCA-----GC



Análisis de Minisatélites por RFLP

- Permite el análisis de vínculo biológico de parentesco.

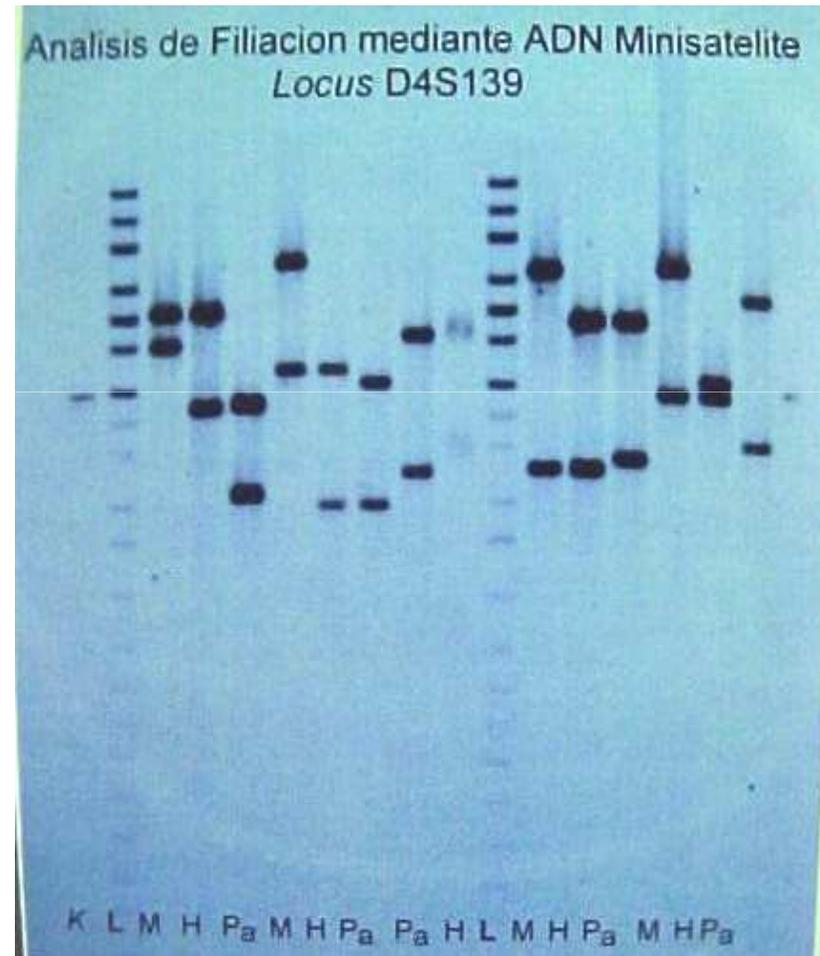
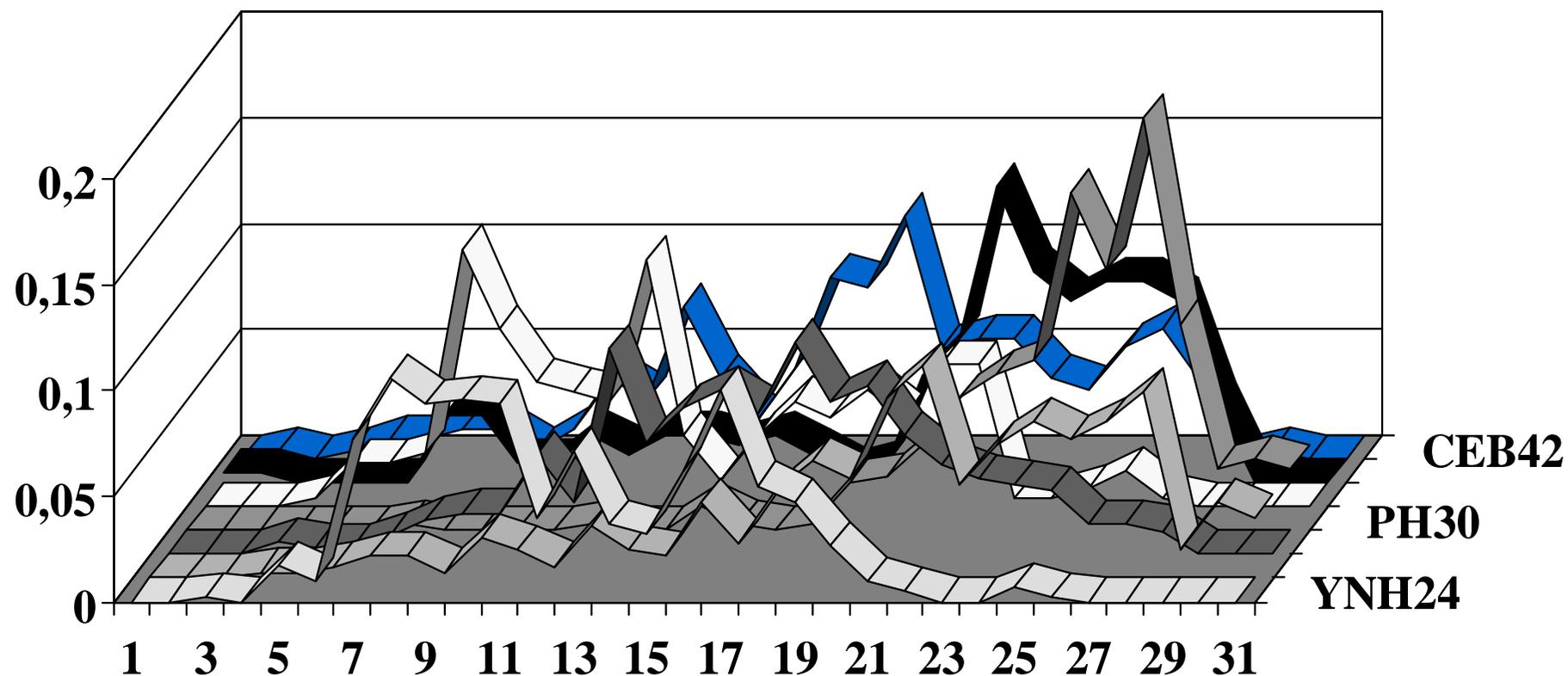


Table 1. Binned Population Distribution for *HaeIII*, Buenos Aires Metropolitan Population^a

<i>Bin</i>	<i>Range (bp)</i>	<i>D2S44l</i> <i>YNH24</i>	<i>D1S7l</i> <i>MSI</i>	<i>D5S110l</i> <i>LHI</i>	<i>D4S139l</i> <i>PH30</i>	<i>D10S28l</i> <i>TBQ7</i>	<i>D17S26l</i> <i>EFD52</i>
1	0-639	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0045
2	640-772	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0045
3	773-871	0.0025	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
4	872-963	0.0000	0.0027	0.0055	0.0000	0.0042	0.0000
5	964-1077	0.0173	0.0027	0.0027	0.0000	0.0210	0.0000
6	1078-1196	0.0100	0.0055	0.0027	0.0000	0.0210	0.0000
7	1197-1352	0.0767	0.0110	0.0083	0.0028	0.0252	0.0318
8	1353-1507	0.1060	0.0110	0.0160	0.0000	0.1218	0.0318
9	1508-1637	0.0940	0.0027	0.0194	0.0000	0.0840	0.0090
10	1638-1788	0.0960	0.0193	0.0194	0.0000	0.0590	0.0090
11	1789-1924	0.0940	0.0138	0.0470	0.0000	0.0546	0.0227
12	1925-2088	0.0396	0.0055	0.0250	0.0028	0.0500	0.0136
13	2089-2351	0.0710	0.0248	0.0970	0.0000	0.1170	0.0227
14	2352-2522	0.0371	0.0138	0.0530	0.0000	0.0336	0.0227
15	2523-2692	0.0321	0.0110	0.0690	0.0114	0.0126	0.0180
16	2693-2862	0.0620	0.0359	0.0780	0.0028	0.0336	0.0227
17	2863-3033	0.1000	0.0165	0.0670	0.0000	0.0500	0.0136
18	3034-3329	0.0550	0.0410	0.1000	0.0029	0.0420	0.0045
19	3330-3674	0.0470	0.0552	0.0720	0.0229	0.0550	0.0090
20	3675-3979	0.0270	0.0469	0.0800	0.0258	0.0420	0.0500
21	3980-4323	0.0100	0.0856	0.0560	0.0400	0.0670	0.0680
22	4324-4821	0.0049	0.1000	0.0420	0.0630	0.0670	0.1400
23	4822-5219	0.0000	0.0440	0.0360	0.0740	0.0042	0.1000
24	5220-5685	0.0000	0.0630	0.0330	0.0800	0.0042	0.0860
25	5686-6368	0.0074	0.0740	0.0300	0.1600	0.0084	0.0950
26	6369-7241	0.0024	0.0660	0.0140	0.1230	0.0168	0.0950
27	7242-8452	0.0000	0.0740	0.0140	0.1950	0.0042	0.0860
28	8453-10093	0.0000	0.0880	0.0110	0.0977	0.0000	0.0360
29	10094-11368	0.0000	0.0138	0.0000	0.0287	0.0000	0.0000
30	11369-12829	0.0000	0.0359	0.0000	0.0340	0.0000	0.0000
31	12830-	0.0000	0.0280	0.0000	0.0287	0.0000	0.0000

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



Análisis de un Southern Blot

Muestras

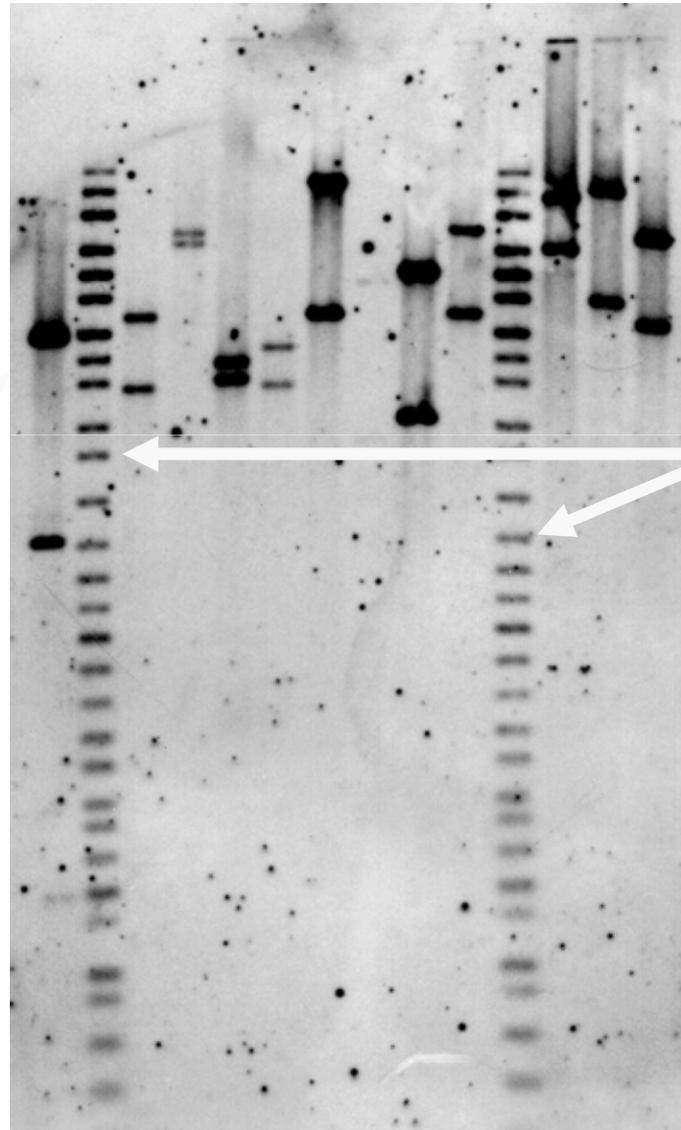
Punto de Siembra

Control Interno
K-562

12 Kb

Marcador de Peso
Molecular

1 Kb



Resultados en un estudio de paternidad

M

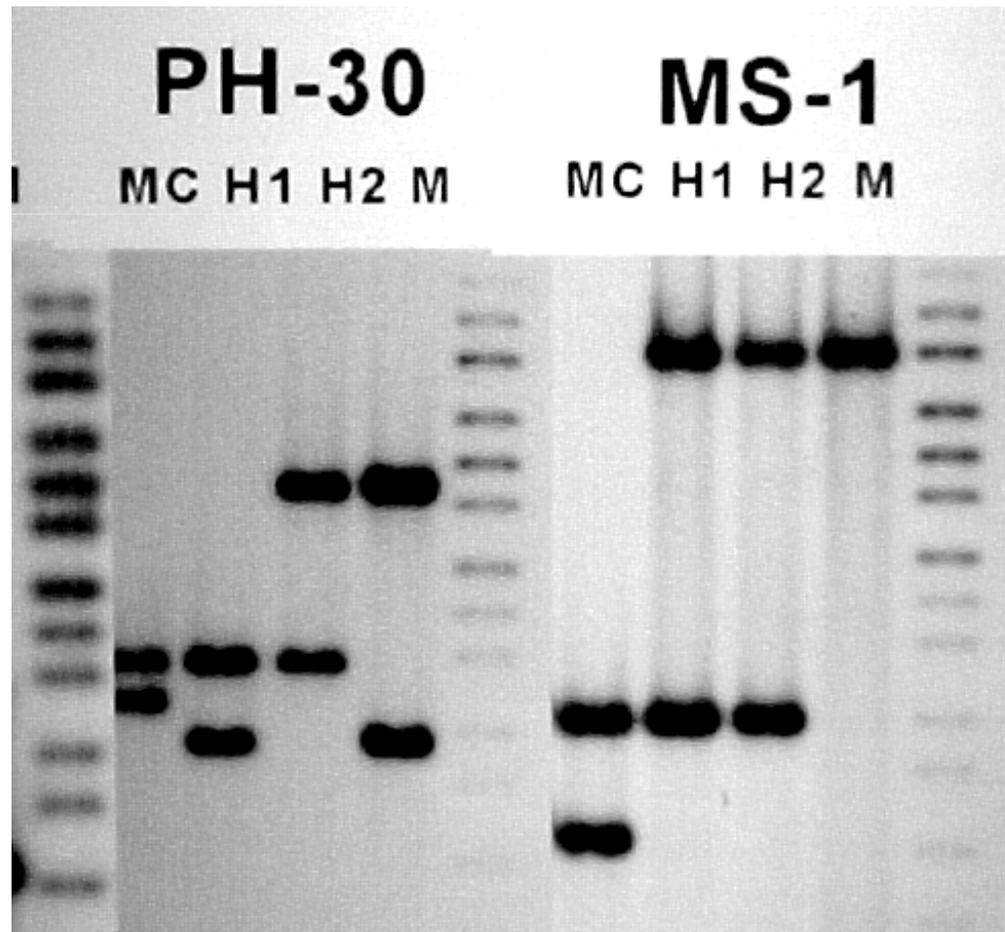
H

PA



INCLUSION

Tipo de perfil observado en una inclusión de vínculo



Resultados en un estudio de paternidad

M

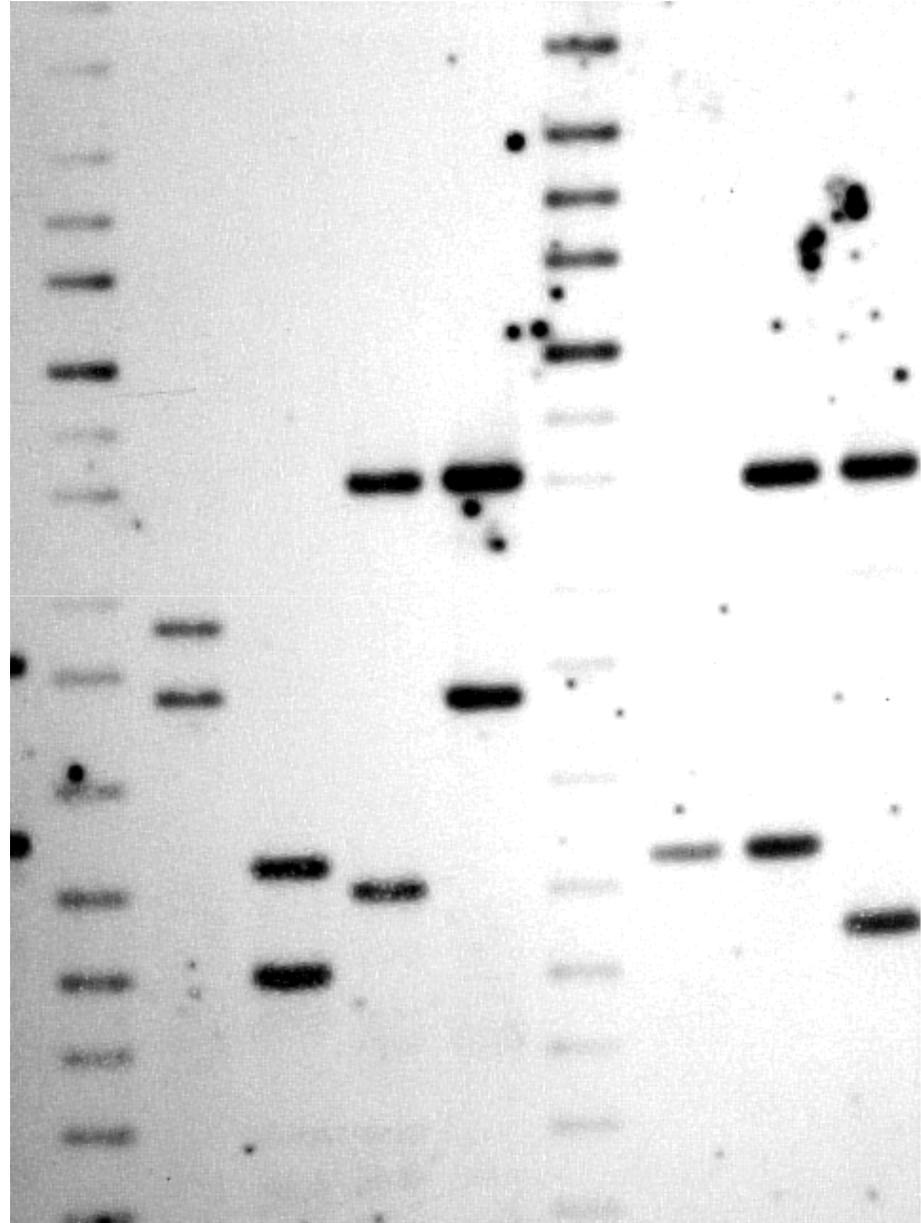
H

PA



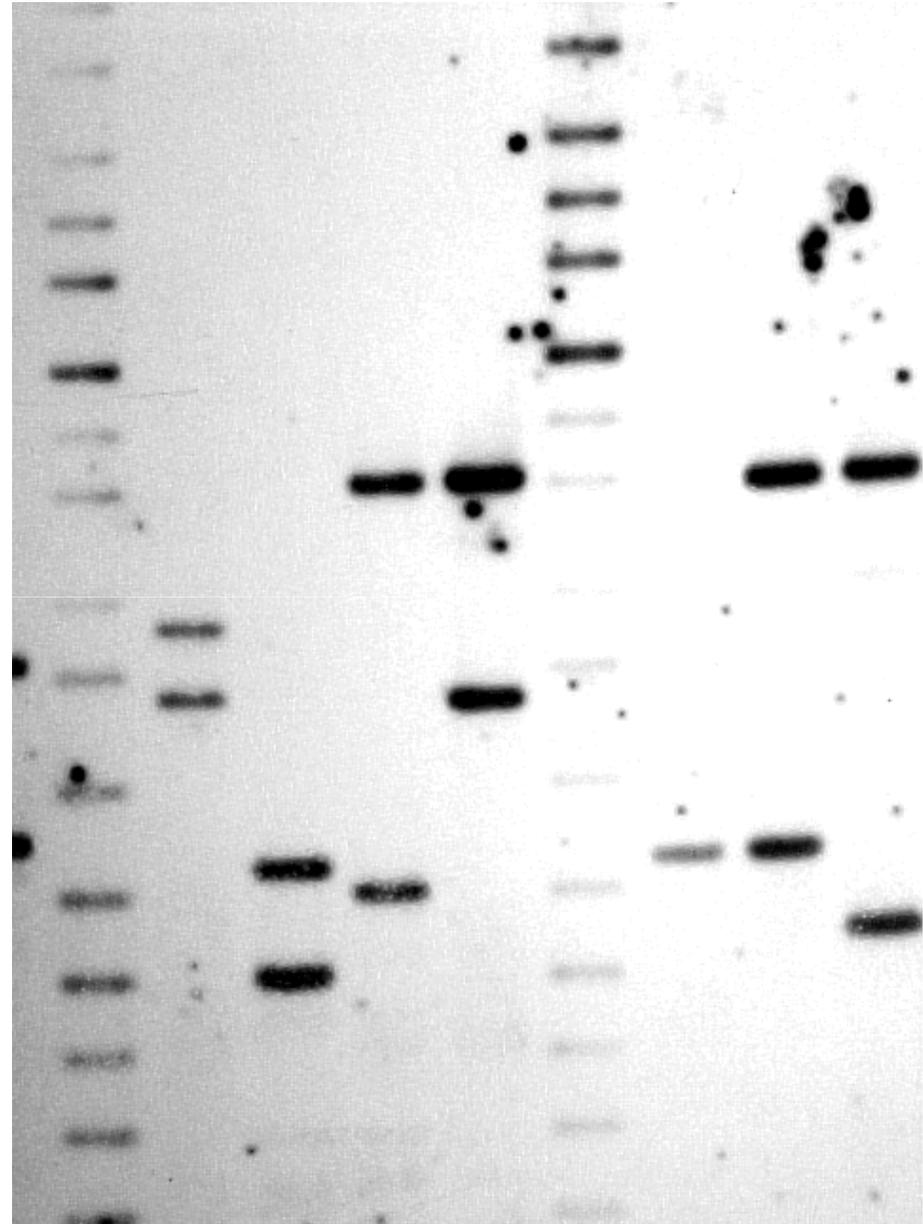
EXCLUSION

Exclusión?



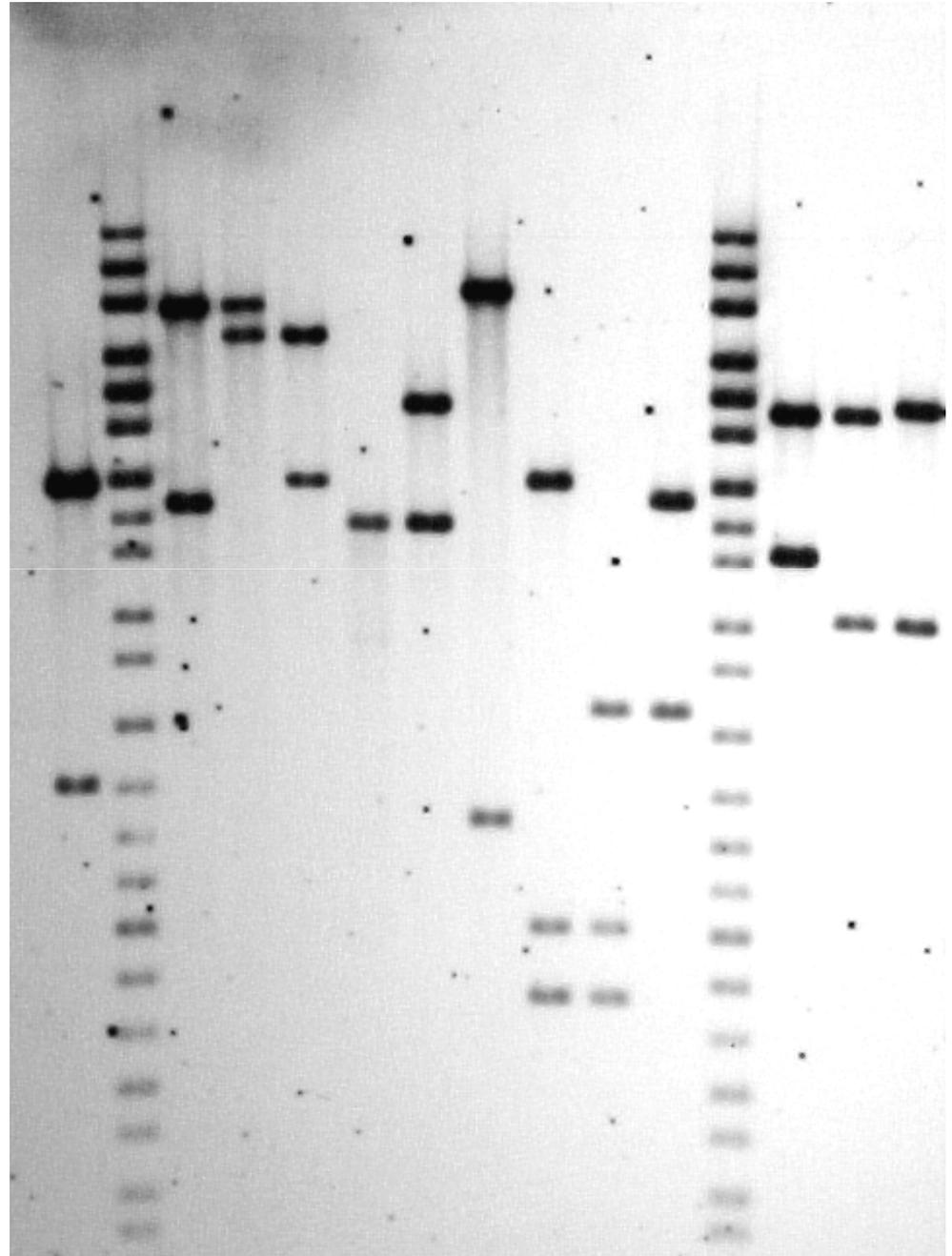
MUTACION!

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.

Fin