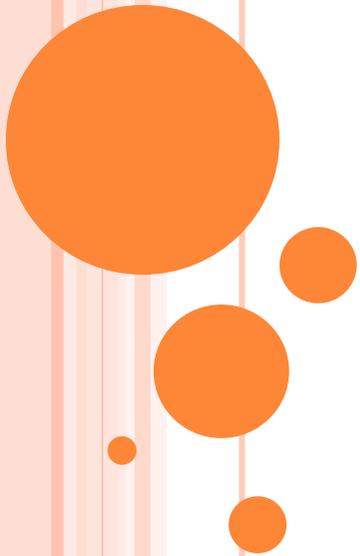


# TOMA, TRASLADO, TRATAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS

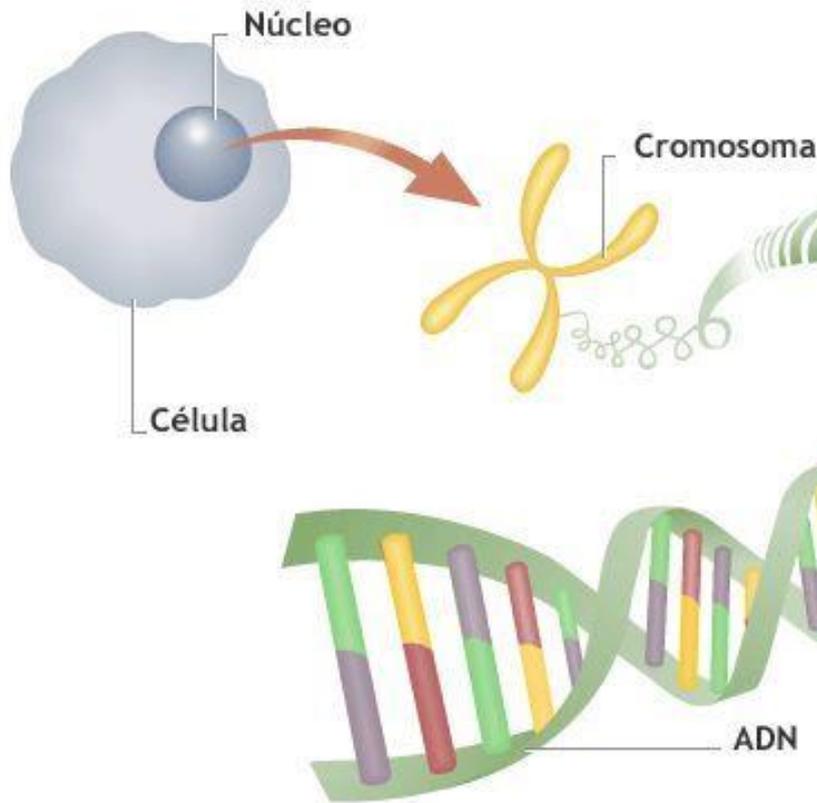
Bioq. Antonella Belén Penacino  
COFYB- Capital Federal  
Fundación INGEN



# ADN NUCLEAR

## CROMOSOMAS AUTOSÓMICOS

HERENCIA: EL 50% DE CADA PROGENITOR



## CROMOSOMAS SEXUALES X e Y

HERENCIA: EL CROMOSOMA Y ES HEREDADO EXCLUSIVAMENTE POR LOS HOMBRES A PARTIR DE SU PROGENITOR MASCULINO; EN CAMBIO, EL CROMOSOMA X HEREDADO ES UNA RECOMBINACIÓN DEL CROMOSOMA X MATERNO Y SÓLO SE TRANSMITE SIN CAMBIOS DEL PROGENITOR MASCULINO A SUS HIJAS MUJERES



# ¿ Qué analizamos en ellos?

MARCADORES

SECUENCIA

STRs

Nuclear

SNPs

Mitochondrial

Indels



# STRs AUTOSÓMICOS

Elevado polimorfismo.

Gran poder de discriminación. Permite, con gran fiabilidad (>99,9%), excluir a individuo de ser falsamente acusado en un crimen o, en casos de paternidad, permitir su inclusión o exclusión

Tasa de mutación relativamente baja.

Generan amplicones pequeños. Son valiosos en los casos donde existe la necesidad de analizar huesos, cabellos, dientes, manchas de sangre y otros materiales en los cuales podemos encontrar el ADN degradado o en pequeñas cantidades.

Su ubicación cromosómica está bien establecida. Estandarización y fácil cotejo de datos entre laboratorios.

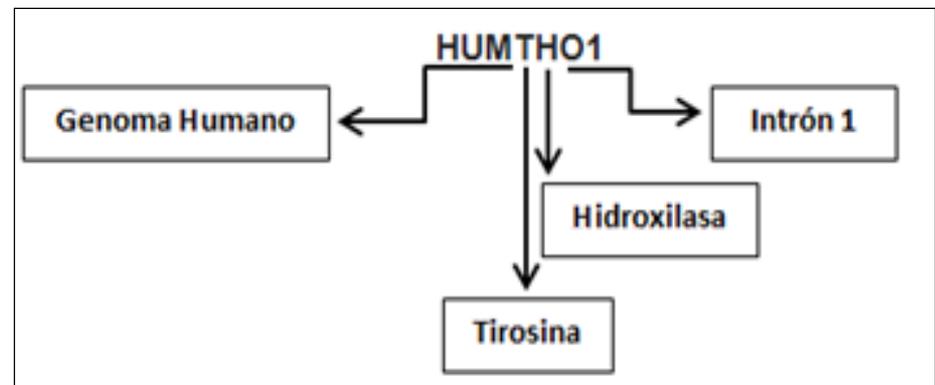
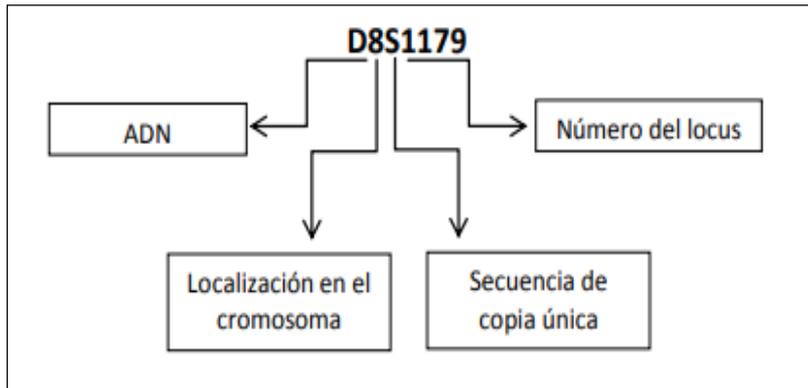
# CLASIFICACIÓN DE LOS STRs

Repeticiones sencillas, que contienen una repetición de secuencia y longitudes iguales [(CA)<sub>10</sub>];

Repeticiones compuestas, que consisten en dos o más repeticiones sencillas adyacentes con diferentes motivos de repeticiones [(TA)<sub>7</sub>(TG)<sub>18</sub>]

Los marcadores genéticos más utilizados en el contexto forense son los microsatélites tetranucleotídicos.

# NOMENCLATURA DE LOS STRs



# VARIACIONES EN LOS ALELOS Y MUTACIONES

Los STRs presentan una gran inestabilidad, con altas tasas de mutaciones, ya sea por ganancia o pérdida de repeticiones, variando entre  $2,1 \times 10^{-2}$  a  $2,7 \times 10^{-5}$  eventos

Se produce por recombinación entre las moléculas de ADN por crossing-over desigual o conversión génica, o

en el proceso de replicación del ADN, donde ocurre un mecanismo denominado “*slippage*” durante la síntesis de ADN cuando una de las hebras de ADN microsatélite forma un bucle, y los microsatélites varían en extensión debido a inserciones o deleciones que ocurren en **una o más repeticiones**.

# PARÁMETROS BÁSICOS EN LA INTERPRETACIÓN DE PERFILES

“Exclusión” de paternidad: tres *loci* donde se demuestre una incompatibilidad entre el presunto padre y el hijo se asumen suficientes

Calcular una razón de verosimilitud o LR (*Likelihood ratio*) o IP (índice de paternidad)

La casi totalidad de los eventos son ganancias o pérdidas de una unidad de repetición, solo ocasionalmente se observan diferencias de dos o más unidades entre los alelos del padre y el hijo para el mismo locus.

Existe además otra circunstancia que debe tenerse en cuenta en el análisis de vínculos biológicos, como la observación de alelos silentes o “*nulls*” (mutación en el sitio de anclaje de los *primers*)

# KITS UTILIZADOS EN LA ACTUALIDAD

PowerPlex Fusion System - cinco colores - 23 *loci*

PowerPlex Fusion System 6C - seis colores - 27 *loci*,

El GlobalFiler PCR Amplification Kit - seis colores - 26 *loci*

Investigator 24plex GO - seis colores - 23 *loci*

# CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos son compatibles con la existencia de VÍNCULO BIOLÓGICO PATERNO de “XXX (Supuesto Padre)” respecto de “XXX (Hija)” con una Probabilidad de Paternidad Superior al 99,999 % y un Índice de Paternidad de  $3,70 \times 10^{12}$ .

# STRs DEL CROMOSOMA Y

- EL CROMOSOMA Y ES HEREDADO EXCLUSIVAMENTE POR LOS HOMBRES A PARTIR DE SU PROGENITOR MASCULINO



## ESTUDIO DE LA PATRILÍNEA:

- COMPLEMENTO DE LOS STRs AUTOSÓMICOS EN CASOS DE FILIACIÓN
- IDENTIFICACIÓN DE PATRILÍNEA EN DELITOS SEXUALES

# STRs DEL CROMOSOMA X

- EL CROMOSOMA X HEREDADO ES UNA RECOMBINACIÓN DEL CROMOSOMA X MATERNO Y SÓLO SE TRANSMITE SIN CAMBIOS DEL PROGENITOR MASCULINO A SUS HIJAS MUJERES



UTILIDAD PRINCIPAL EN CASOS DE FILIACIÓN:

- DOS MUJERES QUE INTENTAN SABER SI COMPARTEN PADRE
- PADRE AUSENTE Y DISPONIBILIDAD DE LA SUPUESTA ABUELA PATERNA

# STRs DEL CROMOSOMA X

**PRECAUCIÓN!:** EN CASOS EN LOS QUE LAS MUJERES SON HIJAS DE LA MISMA MADRE Y QUIEREN SABER SI COMPARTEN PADRE, ES FUNDAMENTAL QUE PARTICIPE LA MADRE INDUBITADA EN EL ESTUDIO:



EXISTEN CASOS DONDE EL X MATERNO NO RECOMBINA, POR LO QUE LAS HIJAS COMPARTIRÁN AL MENOS 1 ALELO EN CADA MARCADOR, PERO ESTA CONCORDANCIA SE DEBE AL X MATERNO Y NO AL PATERNO

**SIN EMBARGO, EN  
LA ACTUALIDAD  
CONTAMOS CON  
OTRO TIPO DE  
MARCADORES...**



# SNPs

- Se trata de variaciones que afectan a UN SOLO NUCLEÓTIDO en la secuencia
- Son principalmente SUSTITUCIONES
- Dos tercios corresponden a la sustitución de una C por una T
- Debe darse al menos en el 1% de la población para considerarse SNP, de lo contrario será una mutación puntual
- Generan los llamados polimorfismos BIALÉLICOS



En una determinada posición del genoma se presentan dos alelos posibles



Ancestral (no mutado)



Mutado

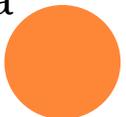


# SNPs autosómicos

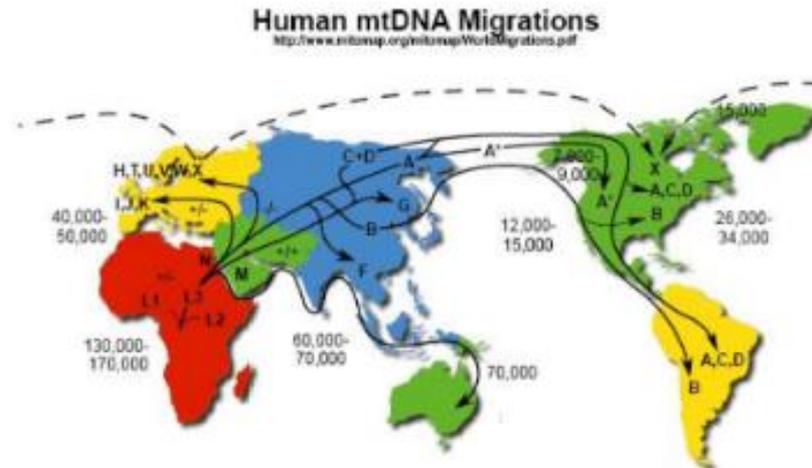
- Muy baja informatividad individual → Necesidad de estudiar un número MAYOR → 35-50 SNPs con una frec. Alélica entre 0,3 y 0,7 ≈ 13-16 STRs
- Constituyen el 90% de las variaciones humanas
- Aparecen cada 1000 bases aproximadamente
- Marcadores muy estables → Tasas de mutación en el orden de  $10^{-9}$
- Debido al pequeño tamaño de sus amplicones, ofrecen la posibilidad de obtener perfiles completos en casos de ADN degradado
- Alta heterogenicidad entre poblaciones → ANCESTRÍA
- Técnica SNaPshot= MINISECUENCIACIÓN. La DNAPol extiende un primer complementario a la secuencia nucleotídica, cuyo extremo 3' finaliza en la base anterior a la posición polimórfica, incorporando un ddNTP marcado fluorescentemente a la sonda, de modo que ésta será complementaria al SNP en estudio.
- Actualmente: Panel de 52 SNPs autosómicos para análisis por EC, análisis por NGS y BASES DE DATOS de SNPs.

# SNPs del cromosoma Y

- Se heredan en bloque por vía PATERNA Permite construir un árbol filogenético a partir del haplogrupo mas ancestral
  - ORIGEN DE POBLACIONES
  - CORRIENTES MIGRATORIAS
  - INTERACCIÓN ENTRE POBLACIONES
- NOMENCLATURA: el “Y Chromosome Consortium” estableció el origen del árbol por comparación de regiones NRY de especies cercanas.
- De allí derivan los grandes grupos de linajes que se nombran con letra mayúscula (de la A a la R).
- Dentro de cada uno existen “paragrupos”, es decir, linajes que estando incluidos dentro del grupo no pertenecen a ninguno de los haplogrupos ya existentes.
- Sistema alternativo de nomenclatura: El YCC propone un sistema alternativo en el que el nombre del haplogrupo está formado por la letra mayúscula que define a los clades (linajes) principales, seguido de un guión (-) y el nombre de la mutación terminal que lo define.



# SNPs del ADN mitocondrial



- El análisis de diversas posiciones polimórficas estables ha llevado a la agrupación de individuos que las comparten en HAPLOGRUPOS
- Muchos de esos haplogrupos son continente- específicos
- Haplogrupo L es característico de poblaciones africanas
- Haplogrupo D es característico de poblaciones asiáticas
- Haplogrupos A2, B2, C1 y D1 son característicos de poblaciones amerindias
- En caucasoides se presentan principalmente 10 haplogrupos: : H, I, J, K, M, T, U, V, W y X, de los cuales siete son exclusivos de la población europea.



# Características de los Indels

- Se trata de variaciones que pueden afectar a uno o más nucleótidos
- Representan entre el 16- 20% del total de polimorfismos
- La mayoría son bialélicos e involucran entre 3- 15 pb
- Aparecen cada 7200 bases aproximadamente
- Baja tasa mutacional ( $10^{-8}$ )
- Tamaño pequeño de amplicón
- Con bajas concentraciones de ADN se pueden obtener perfiles completos (0,062 ng/ul)

➤ *Short Tandem Repeats (STRs)*

GCTAGTCGT(GATA)(GATA)(GATA)GCGATCGT

➤ *Single Nucleotide Polymorphism (SNPs)*

GCTAGTCGT(G/A)GCGATCGTTATACGACGTATG-

➤ *Insertions-Deletions (InDels)*

GCTAGTCGT+GCGATCGTTATACGACGTATGCTCA-  
GCTAGTCGT(N<sub>x</sub>)GCGATCGTTATACGACGTATGCA

Comparación entre variaciones del genoma: STR, SNP e InDels.



# Aplicaciones de los Indels

- Baja tasa mutacional ( $10^{-8}$ ) → HERENCIA
  - Tamaño pequeño de amplicón
  - Con bajas concentraciones de ADN se pueden obtener perfiles completos (0,062 ng/ul)
  - Estudios de vínculos biológicos donde el valor del LR obtenido analizando STRs resulta deficiente
  - Poder discriminatorio: 30 Indels  $\approx$  13 STRs
  - Los datos de InDels autosómicos ya están disponibles para poblaciones europeas, africanas, asiáticas y americanas nativas
  - Respecto al cromosoma X, se han publicado varios paneles en los últimos años
  - Además, existe un sistema formado por 47 InDels autosómicos y 2 InDels para cromosoma Y que se encuentra en validación
- RESTOS ÓSEOS,  
HISOPADOS DE  
SUPERFICIES (ADN DE  
CONTACTO)
- COMPLEMENTO  
de los STRs
- NO SE  
ENCUENTRAN  
DISPONIBLES  
COMERCIALMENTE

# Aplicaciones de los Indels

- Recientemente se han publicado trabajos científicos en los que se caracterizan genéticamente diferentes poblaciones con el uso de InDels y donde se obtienen datos de frecuencias alélicas que podrán ser usados en nuestros estudios de Genética Forense
- A la fecha también se han publicado estudios que utilizan a los indels como herramientas para la distinción de especies de plantas y animales

	<b>STRs</b>	<b>SNPs</b>	<b>InDels</b>
Frecuencia de aparición	1 cada 15000 pb	1 cada 500 pb	1 cada 7200 pb
Tasa de mutación promedio	$10^{-3}$	$10^{-9}$	$10^{-8}$
Número típico de alelos	de 5 a 20	de 2 (a 4)	2
Tamaño de amplicones	100-400 pb	Aprox. 50-100 pb	Aprox. 50-150 pb
Aplicaciones:			
Identificación de individuos	Si	Limitada	Limitada
Inferencia de ancestría	Limitada	Si	Si
Inferencia fenotípica	No	Si	Si
Muestras degradadas	No	Si	Si

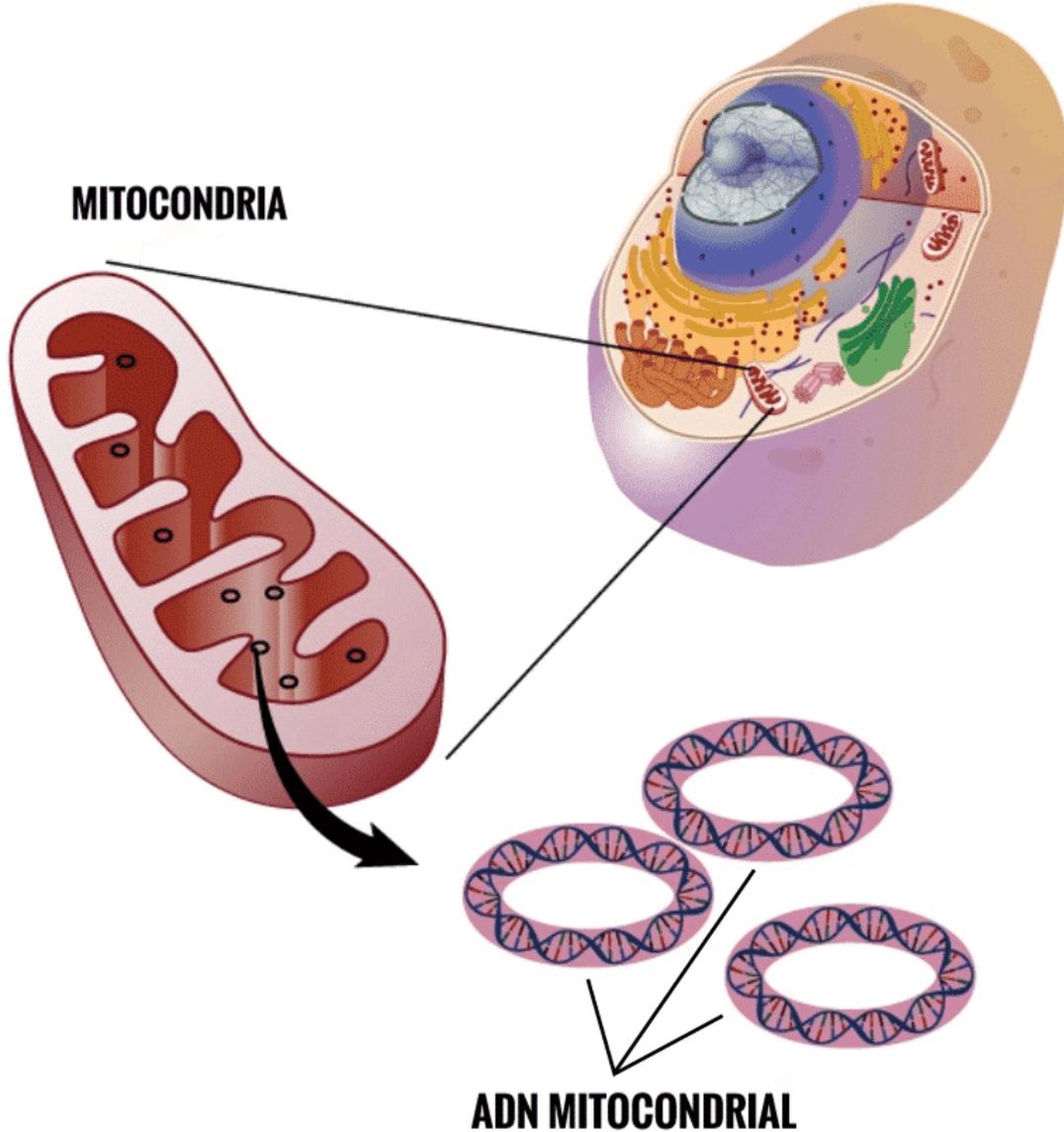
Comparación entre diferentes tipos de marcadores utilizados en análisis de ADN en genética forense.



# ADN MITOCONDRIAL

CÉLULA

MITOCONDRIA



DEBIDO A SU UBICACIÓN EN EL ESPERMATOZOIDE LAS MITOCONDRIAS PATERNAS SE PIERDEN AL MOMENTO DE LA FECUNDACIÓN; EL NUEVO CIGOTO TENDRÁ LAS MITOCONDRIAS MATERNAS Y POR LO TANTO, SE HEREDA DE MADRES A HIJOS, CUALQUIERA SEA SU SEXO.

¿QUÉ ANALIZAMOS?  
SU SECUENCIA



# Características

- Molécula Circular
  - Cerrada
  - Doble cadena
- } MAYOR ESTABILIDAD
- 16.569 pb
  - Diferente proporción de G y C
    - CADENA PESADA (rica en A y G)
    - CADENA LIVIANA (rica en T y C)
  - 2 regiones
    - CODIFICANTE: 37 GENES
    - CONTROL (D-loop)
      - REGIÓN HIPERVARIABLE 1: 16024-16365
      - REGIÓN HIPERVARIABLE 2: 73-340
  - Alto número de copias: 1000 a 10000/célula
  - Transmisión por vía materna
  - No recombina; herencia haploide: todas las células de un individuo y todos los individuos de una misma matrilinea tendrán el mismo ADNmt (exceptuando mut. Puntuales y heteroplasmías)
  - Alta tasa de mutación promedio: 5 a 10 veces mayor que el ADN nuclear
- 

# Características

	<b>GENOMA NUCLEAR</b>	<b>GENOMA MITOCONDRIAL</b>
Tamaño aproximado	3000 MB	16.6 MB
Número de moléculas distintas	23 en mujeres 24 en hombres	1
Número de copias por célula diploide	2	>1000
Tipo de molécula	Lineal	Circular
Proteínas asociadas	Histonas y proteínas no histonas	Libre de proteínas
Número de genes	22000	37
Densidad génica	~1/40 kb	1/0.45 kb (alta)
ADN repetitivo	~ 20%	Casi no existe
ADN codificante	~2%	90%
Recombinación	> 1 por cromosoma y meiosis	No
Tasa de mutación	Baja	Alta
Herencia	Mendeliana, con la excepción del cromosoma Y	Monoparental materna

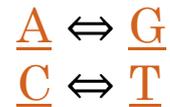
Principales diferencias entre el ADN nuclear y el ADN mitocondrial.



# Polimorfismos



- Las transiciones son el TIPO PREDOMINANTE de sustitución:



- Las purinas (A y G) tienden a estar sustituidas en la cadena pesada (cantidad?)
- Variaciones principalmente en REGIÓN CONTROL
- En el ADN mitocondrial las sustituciones se acumulan mucho más rápido que las mutaciones similares en el ADN nuclear



# Polimorfismos

De  
Secuencia

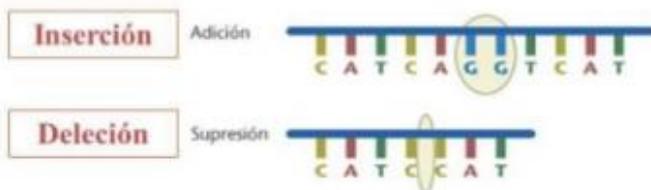
De  
Longitud

Heteroplasmas

- Existen trectos homopoliméricos donde es habitual encontrar INSERCIONES o DELECCIONES de una o más bases
- Se ha descrito un microsatélite corto en la posición 514 (de la región D-loop)

STR dinucleotídico  $(AC)_n$  con un bajo grado de heterocigocidad

LIMITA SU APLICACIÓN EN FORENSE



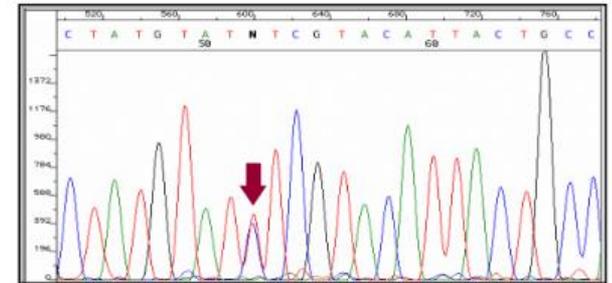
# Polimorfismos

De  
Secuencia

De  
Longitud

Heteroplasmas

- Existencia de una mezcla de ADN mitocondriales que difieren en su secuencia y se encuentran en una misma mitocondria, en una misma célula, en un único tejido o en un solo individuo
- Es un suceso bastante frecuente
- Hay de dos tipos
  - De secuencia: en una posición determinada de la secuencia hay más de una base
  - De longitud: variación en el número de bases existentes en un fragmento homopolimérico
- Herencia: al azar. Tras la ovogénesis, un número reducido de moléculas de ADNmt determinará el genotipo citoplasmático de la siguiente generación. Después de varios ciclos de división, la proporción de ADNmt normal y mutante puede derivar hacia el mutante puro o hacia el normal puro



Secuencia de ADNmt con heteroplasma de secuencia.

SEGREGACIÓN  
REPLICATIVA

# Criterios de nomenclatura

- Se utiliza la versión revisada de la secuencia de Anderson como referencia
  - Se reportan sólo las diferencias respecto a esta secuencia, que se corresponde con la cadena Liviana
  - Sustituciones: el número de la posición en el que se ha detectado la variante, seguido por el nucleótido correspondiente (Ej: 73G). Si existe ambigüedad en el nucleótido se reporta “N”
  - Deleciones: Se reportan indicando la posición faltante seguida de la letra “d” en minúscula. (Ej: 220d)
  - Inserciones: Se describen indicando la posición adyacente al lugar de la inserción y luego “.1base insertada”; donde “1” es la cantidad de bases insertadas. (Ej: 315.1C)
  - Heteroplasmías: Se reporta la posición en la que ocurre y posteriormente las bases involucradas entre “/”.(Ej: 16170C/T)
  - Caracterizar perfiles utilizando el menor número posible de diferencias.
  - A igual número de diferencias, priorizar las inserciones/ deleciones sobre las transiciones y éstas sobre las transversiones
  - Los indels deben estar situados en posición 3´ con respecto a la cadena L (posición más cercana al ligamiento del primer), y contiguas.
  - PRECAUCIÓN: UN ALINEAMIENTO INCORRECTO PUEDE LLEVAR A ERRÓNEAS ASIGNACIONES DE VARIANTES Y A LA NO IDENTIFICACIÓN EN EL ÁMBITO CRIMINAL.
- 

# Interpretación de perfiles

- EXCLUSIÓN: Diferencias en dos o más sitios nucleotídicos
- INCLUSIÓN: Las secuencias son idénticas. Es decir, no se puede descartar que tengan el mismo origen; por lo que esta coincidencia debe valorarse estadísticamente en el informe (<https://empop.online/>)
- RESULTADO INCONCLUSO: Secuencias que difieren en una sólo posición nucleotídica y no existe heteroplasmia (evaluar los tejidos de procedencia)



NO USAR CRITERIOS DEMASIADO RÍGIDOS PARA LA INTERPRETACIÓN YA QUE HAY MUCHOS FACTORES COMO LA SEGREGACIÓN Y LAS TASAS DE MUTACIÓN EN DIFERENTES TEJIDOS QUE INFLUYEN EN LA MISMA



# Técnica de secuenciación



## SANGER

- El método comienza luego de la obtención de los amplicones
- Utiliza dideoxinucleótidos modificados (sin el OH- en la posición 3', por lo que no permite la unión de más nucleótidos a la cadena → TERMINADORES)
- Los ddNTPs están marcados con fluorocromos y compiten con los normales por la unión a la cadena  
→ generan fragmentos que difieren en 1 base
- En el equipo de electroforesis capilar, los productos de secuenciación se separan por TAMAÑO y se identifica el nucleótido terminador a través de la FLUORESCENCIA emitida al excitar los fluorocromos con un láser



# Aplicaciones

A pesar de la mayor información que puede aportar el estudio del ADN nuclear, en ocasiones su estudio es imposible cuando la muestra de la que se dispone es insuficiente o tiene excesiva degradación.



RECORDEMOS QUE EL ADNmt ES MÁS ESTABLE QUE EL NUCLEAR Y, POR LO TANTO, MENOS PROPENSO A DEGRADACIÓN

- Pelos sin bulbo
- Material muy degradado como huesos antiguos o piezas dentarias antiguas
- Análisis de restos de personas desaparecidas donde los familiares disponibles están relacionados por vía materna



# EJEMPLOS PRÁCTICOS

CASO 1: UN HOMBRE RECURRE AL LABORATORIO DE GENÉTICA FORENSE PARA DETERMINAR SI ES PADRE O NO DE UN MENOR RECIÉN NACIDO: **STRs AUTOSÓMICOS**

CASO 2: EN LA ESCENA DE UN HOMICIDIO SE ENCUENTRAN PELOS SIN BULBO: **ADN MITOCONDRIAL**

CASO 3: UNA MUJER DESEA SABER SI SU HIJO ES HIJO BIOLÓGICO DE UN SEÑOR QUE NO ESTÁ DISPUESTO A PARTICIPAR EN EL ESTUDIO; SIN EMBARGO, ACEPTA PARTICIPAR EL HERMANO INDUBITADO DEL SEÑOR AUSENTE: **STRs AUTOSÓMICOS + STRs CROMOSOMA Y**

CASO 4: EN LA ESCENA DE UN CRIMEN SE TOMAN HISOPADOS DE DOS COPAS COLOCADAS SOBRE UNA MESADA CERCANA AL LUGAR DEL HECHO: ADN DE CONTACTO (MATERIAL DE ESCASA CONCENTRACIÓN Y DEGRADADO): **STRs AUTOSÓMICOS + SNPs+ INDELS**



# EJEMPLOS PRÁCTICOS

CASO 5: DOS MUJERES, HIJAS DE DISTINTA MADRE, SOSPECHAN QUE SON MEDIO HERMANAS POR VÍA PATERNA: STRs AUTOSÓMICOS + STRs CROMOSOMA X

CASO 6: DEBIDO A UN ACCIDENTE AÉREO, MUEREN 200 PERSONAS Y SE LE ASIGNA AL LABORATORIO DE GENÉTICA FORENSE LA TAREA DE IDENTIFICAR LOS CADÁVERES ENCONTRADOS EN LA ESCENA PARA QUE CADA FAMILIA RECIBA A SU FAMILIAR FALLECIDO: MUESTRAS ÓSEAS (DE “BUENA CALIDAD”): STRs AUTOSÓMICOS

CASO 7: UNA MUJER CONCURRE AL LABORATORIO DE GENÉTICA FORENSE CON LA SOSPECHA DE QUE SU SOBRINA (HIJA DE SU HERMANA) HA SIDO CAMBIADA POR OTRA BEBA EN EL HOSPITAL AL MOMENTO DE SU NACIMIENTO: STRs AUTOSÓMICOS + SECUENCIA DE ADN MITOCONDRIAL

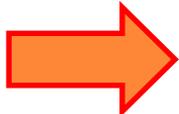


# TIPO DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS DE ADN

## PENALES



## CIVILES

- HISOPADOS BUCALES O SANGRE (MUESTRAS DE REFERENCIA) DE SOSPECHOSOS/VÍCTIMA,
- HISOPADOS VAGINALES, URETRALES, ANALES (VICTIMA-IMPUTADO)
- MATERIAL CADAVÉRICO
- HISOPADOS SUBUNGUEALES, UÑAS (VICTIMA- IMPUTADO)
- PELOS RECOGIDOS EN LA ESCENA DEL CRIMEN, O EN EL CUERPO DE LA VÍCTIMA O EL IMPUTADO
- ELEMENTOS LEVANTADOS EN LA ESCENA DEL CRIMEN: ARMA HOMICIDA, PRESERVATIVOS, COLILLAS DE CIGARRILLOS, ROPA, SABANAS, ETC.
- **HISOPADOS DE LOS ELEMENTOS** 

- HISOPADOS BUCALES/ SANGRE EN PAPEL DE LOS PARTICIPANTES DEL ESTUDIO
- MUESTRAS PRENATALES (LÍQUIDO AMNIÓTICO/ VELLOSIDADES CORIÓNICAS)
- MATERIAL CADAVÉRICO



# HISOPADOS DE LOS ELEMENTOS EN LA ESCENA DEL CRIMEN: CRITERIO



MANGO/ → MATERIAL DEL HOMICIDA  
HOJA/FILO → MATERIAL DE LA VÍCTIMA

LA RELEVANCIA DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA QUE APORTE CADA MUESTRA DEPENDERÁ TAMBIÉN DEL SITIO DONDE HALLA SIDO LEVANTADO EL ELEMENTO.

NECESIDAD DE TOMAR LAS MUESTRAS CON **DIFERENTES HISOPOS.**

¿CUÁNTOS?: 1 O 2 HISOPOS PARA CADA ÁREA DEL ARMA ES SUFICIENTE. NO HACE FALTA TOMAR MÁS.



# HISOPADOS DE LOS ELEMENTOS EN LA ESCENA DEL CRIMEN: CRITERIO



EMPUÑADURA: MATERIAL DE QUIEN SOSTUVO EL ARMA

CARGADOR: MATERIAL DE QUIEN CARGÓ EL ARMA

BALAS: MATERIAL DE QUIEN CARGÓ EL ARMA

CORREDERA: MATERIAL DE QUIEN DISPARÓ EL ARMA

1 O 2  
HISOPOS  
POR  
CADA  
PARTE



¿SE TRATA DE QUIÉN COMETIÓ EL DELITO?: NO LO SABEMOS, NUESTRA PRUEBA APORTA INFORMACIÓN QUE DEBE SER ESTUDIADA EN UN CONTEXTO POR EL JUEZ.



# HISOPADOS DE LOS ELEMENTOS EN LA ESCENA DEL CRIMEN: CRITERIO

VASOS/COPAS (ADN DE CONTACTO): HISOPAR LA REGIÓN QUE PUEDA HABER ESTADO EN CONTACTO CON LA PERSONA QUE TOMÓ DE DICHA COPA.



¿CUÁNTOS HISOPOS?: 1 O 2 HISOPOS. RECORDAR QUE EL ADN DE CONTACTO SE ENCUENTRA EN ESCASA CANTIDAD



CUANTOS MAS HISOPOS SE TOMEN, MENOS CHANCES HABRÁ DE RECOLECTAR EL POCO MATERIAL GENÉTICO QUE PUEDA HABER.

**CUIDADO! EVALUAR SI HAN TOMADO MÁS PERSONAS**



SI AL MIRARLA A CONTRALUZ PARECE HABER MÁS DE UNA HUELLA BUCAL, USAR **DISTINTOS** HISOPOS PARA RECOLECTAR CADA UNA.



# HISOPADOS DE LOS ELEMENTOS EN LA ESCENA DEL CRIMEN: CRITERIO



PAREDES O SUPERFICIES: HISOPAR LA MANCHA.



¿CUÁNTOS HISOPOS?: DEPENDERÁ DEL TAMAÑO DE LA MANCHA.

IMPORTANTE: HISOPAR TODA LA SUPERFICIE DE LA MANCHA PORQUE PUEDE HABER MEZCLA DE FLUIDOS.

PRESERVATIVOS: SI SE PROCEDE A HISOPARLO, DEBEN USARSE **DISTINTOS** HISOPOS PARA EL INTERIOR Y EL EXTERIOR



INTERIOR: MATERIAL DEL SUSPECHOSO

EXTERIOR: MATERIAL DE LA VÍCTIMA



# CADAVERES EN LA ESCENA DEL CRIMEN

EN BUEN  
ESTADO DE  
CONSERVACION

- RECIEN FALLECIDOS
- CADAVERES SOMETIDOS A PROCESOS CONSERVADORES (NATURALES O ARTIFICIALES)



¡¡OJO CON EL FORMOL!!:  
DEGRADA EL ADN

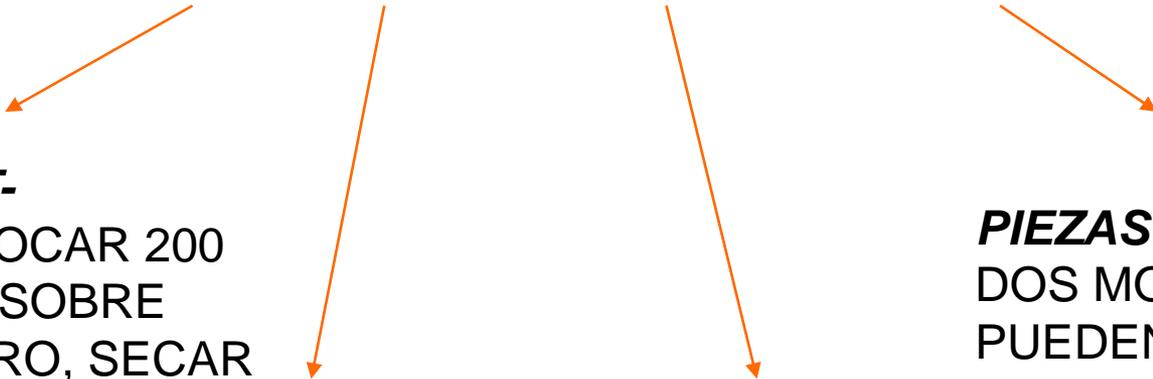
EN AVANZADO  
ESTADO DE  
PUTREFACCION  
○  
ESQUELETIZAD  
OS

CREMADOS

QUEMADOS O  
PARCIALMENTE  
CARBONIZADOS

- EL FUEGO ACTÚA COMO UN PRESERVANTE DE ÓRGANOS Y TEJIDOS (SIEMPRE QUE LA CARBONIZACIÓN NO SEA COMPLETA)

## EN BUEN ESTADO DE CONSERVACION



### **SANGRE POST-**

**MORTEM:** COLOCAR 200 MICROLITROS SOBRE PAPEL DE FILTRO, SECAR AL AIRE Y COLOCARLO EN UN SOBRE DE PAPEL

### **HISOPADOS BUCALES:**

COLOCAR 2 O 3 HISOPADOS EN UN SOBRE DE PAPEL

### **MÚSCULO ESQUELÉTICO:**

COLOCAR 1 GRAMO APROXIMADAMENTE EN UN FRASCO, TAPA ROSCA. CONSERVAR EN FREEZER.

### **PIEZAS DENTALES:**

DOS MOLARES; SE PUEDEN RESERVAR A TEMPERATURA AMBIENTE, CON EL FIN DE EVITAR POSTERIORES EXHUMACIONES.



# CADAVERES



EN BUEN  
ESTADO DE  
CONSERVACION

- RECIEN FALLECIDOS
- CADAVERES SOMETIDOS A PROCESOS CONSERVADORES (NATURALES O ARTIFICIALES)



¡¡OJO CON EL FORMOL!!:  
DEGRADA EL ADN

EN AVANZADO  
ESTADO DE  
PUTREFACCION  
O  
ESQUELETIZADOS

CREMADOS

QUEMADOS O  
PARCIALMENTE  
CARBONIZADOS

- EL FUEGO ACTÚA COMO UN PRESERVANTE DE ÓRGANOS Y TEJIDOS (SIEMPRE QUE LA CARBONIZACIÓN NO SEA COMPLETA)



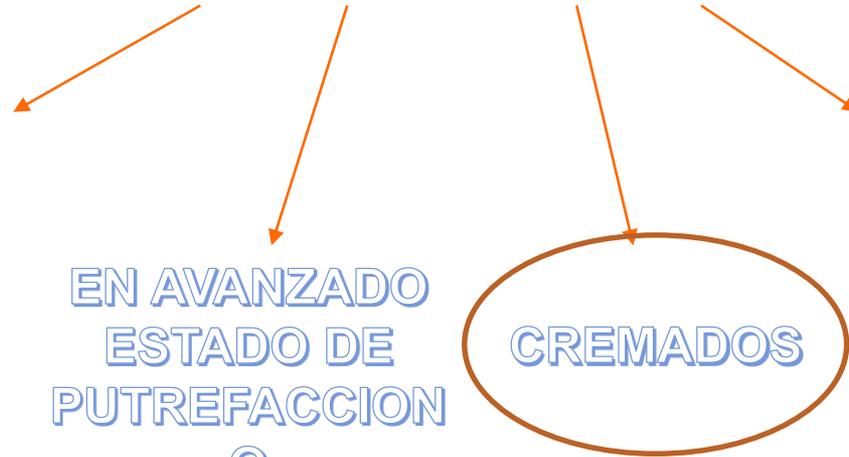
# EN AVANZADO ESTADO DE PUTREFACCION O ESQUELETIZADOS

**HUESOS LARGOS:**  
IDEALMENTE FÉMUR;  
TOMAR COMO  
MÍNIMO UNA  
PORCIÓN ÓSEA DE 10  
CENTÍMETROS.  
TAMBIÉN PUEDE SER  
HÚMERO.

**PIEZAS DENTALES:**  
IDEALMENTE DOS  
MOLARES;  
CHEQUEAR QUE NO  
ESTÉN DAÑADOS  
EXTERNAMENTE Y  
QUE NO HAYAN SIDO  
SOEMTIDOS A  
ENDODONCIAS. EN  
CASO DE NO PODER  
OBTENER MOLARES,  
TOMAR 3 PIEZAS  
DENTALES.

**NUNCA TEJIDOS BLANDOS: LA INTENSA ACCIÓN BACTERIANA QUE  
ATRAVIESA UN CADÁVER EN ESTADO DE PUTREFACCIÓN HARÁ QUE  
TODO EL MATERIAL GENÉTICO EN ESTOS TEJIDOS SE ENCUENTRE  
DEGRADADO**

# CADAVERES



EN BUEN  
ESTADO DE  
CONSERVACION

- RECIEN FALLECIDOS
- CADAVERES SOMETIDOS A PROCESOS CONSERVADORES (NATURALES O ARTIFICIALES)



¡¡OJO CON EL FORMOL!!:  
DEGRADA EL ADN

EN AVANZADO  
ESTADO DE  
PUTREFACCION  
○  
ESQUELETIZAD  
OS

CREMADOS

QUEMADOS O  
PARCIALMENTE  
CARBONIZADOS

- EL FUEGO ACTÚA COMO UN PRESERVANTE DE ÓRGANOS Y TEJIDOS (SIEMPRE QUE LA CARBONIZACIÓN NO SEA COMPLETA)



CADAVÉR  
CREMADO



CADAVÉR  
CALCINADO

EN ESTAS CONDICIONES  
(CADAVÉR TOTALMENTE  
REDUCIDO A CENIZAS) NO  
ES POSIBLE OBTENER  
MATERIAL GENÉTICO A  
**PARTIR DEL CADÁVER**



¿SIGNIFICA ESTO QUE ES  
IMPOSIBLE OBTENER  
MATERIAL GENÉTICO DEL  
FALLECIDO?

SI EL INDIVIDUO ESTUVO  
HOSPITALIZADO Y EL  
FALLECIMIENTO ES RECIENTE,  
PROBABLEMENTE SE PUEDA  
RECURRIR A MUESTRAS DE  
SANGRE, BIOPSIAS EN PARAFINA O  
PREPARACIONES HISTOLÓGICAS.

ÁMBITO FAMILIAR: PEINES,  
MAQUINAS DE AFEITAR, SALIVA EN  
SOBRES

**EVITAR PREPARACIONES  
EN FORMOL**



# CADAVERES



## EN BUEN ESTADO DE CONSERVACION

- RECIEN FALLECIDOS
- CADAVERES SOMETIDOS A PROCESOS CONSERVADORES (NATURALES O ARTIFICIALES)



## EN AVANZADO ESTADO DE PUTREFACCION O ESQUELETIZADOS

## CREMADOS

## QUEMADOS O PARCIALMENTE CARBONIZADOS

- EL FUEGO ACTÚA COMO UN PRESERVANTE DE ÓRGANOS Y TEJIDOS (SIEMPRE QUE LA CARBONIZACIÓN NO SEA COMPLETA)



¡¡OJO CON EL FORMOL!!:  
DEGRADA EL ADN

CADAVER PARCIALMENTE  
QUEMADO



LOS ÓRGANOS INTERNOS SE ENCUENTRAN  
PERFECTAMENTE CONSERVADOS



MUESTRA DE ELECCIÓN: PORCIÓN DE  
MÚSCULO INTERNO



# MUESTRAS LEVANTADAS EN LA ESCENA DEL CRIMEN: PRECAUCIONES

- NO HABLAR DURANTE EL PROCESO DE RECOLECCIÓN: LAS CÉLULAS DE DESCAMACIÓN DE LA MUCOSA BUCAL SON ALTAMENTE CONTAMINANTES. IDEALMENTE USAR BARBIJO.
- USAR GUANTES, GORRA, CUBRE BOTAS
- SI SE REALIZAN HISOPADOS EN LA ESCENA, QUE SEAN PREFERENTEMENTE ESTÉRILES.
- NO INGRESAR A LA ESCENA CON ELEMENTOS EXTERNOS QUE NO VAYAN A SER USADOS PARA LA RECOLECCIÓN DEL MATERIAL (COMIDA, ELEMENTOS PERSONALES COMO EL CELULAR)



**ADN DE CONTACTO!!**



# MUESTRAS LEVANTADAS EN LA ESCENA DEL CRIMEN: RECOMENDACIONES

- OJO CON EL LUMINOL! CUANDO CONTIENE AGUA OXIGENADA EN SU COMPOSICIÓN, DEGRADA EL ADN.
  - HAY ESTUDIOS QUE MUESTRAN MAYOR EFECTIVIDAD EN LA OBTENCIÓN DE ADN CUANDO SE UTILIZAN HISOPOS EMBEBIDOS EN DETERGENTE (SDS). SI NO ES POSIBLE LLEVAR ESTO A CABO, SE PUEDEN USAR HISOPOS EMBEBIDOS EN AGUA DESTILADA ESTÉRIL.
  - LOS HISOPADOS EN SOBRES DE PAPEL DEBIDAMENTE ROTULADOS
  - CUANDO SE TRATE DE MUESTRAS EN TELA (SÁBANAS, ROPA INTERIOR, PANTALONES) ENVIAR AL LABORATORIO LA PORCIÓN DE MATERIAL QUE SE QUIERE ANALIZAR (NO ENVIAR LA SÁBANA O EL PANTALÓN COMPLETO)
  - CUANDO SE RECOLECTEN PELOS, SUGERIMOS PEGARLOS EN UNA HOJA BLANCA Y NUMERARLOS. IDEALMENTE SE UTILIZAN PELOS CON BULBO YA QUE NOS PERMITEN OBTENER ADN NUCLEAR; CUANDO LOS PELOS NO TIENEN BULBO SE RECURRE AL ADN MITOCONDRIAL.
  - EVALUAR LA UTILIDAD DE ENVIAR CADA MUESTRA: TODAS PUEDEN SER ÚTILES, PERO LA ELECCIÓN DEPENDE DEL **CONTEXTO DEL CASO**
- 

# MUESTRAS PENALES: CADENA DE CUSTODIA

PGR		REGISTRO CADENA DE CUSTODIA	
PROCURADURÍA GENERAL DE LA REPÚBLICA		ENTREGA DE LOS INDICIOS O EVIDENCIAS AL AMPF	
		Averiguación Previa No.	
Unidad Admiva.	Entidad Federativa	Del. o Mpio.	No. de registro (folio o llamado)
Fecha	Hora	Nombre de la persona que entrega	Cargo
1. TIPO DE INDICIO O EVIDENCIA			
2. TIPO DE EMBALAJE Y CONDICIONES EN QUE SE ENTREGA EL EMBALAJE			
3. DOCUMENTOS (FORMATOS, PARTES POLICIALES, OTROS)			
4. OBSERVACIONES AL ESTADO EN QUE SE RECIBEN LOS INDICIOS O EVIDENCIAS			
Fecha	Hora	Nombre de la persona que recibe	Cargo
NOMBRE Y FIRMA DE QUIEN ENTREGA		NOMBRE Y FIRMA DE QUIEN RECIBE	

Anexo dos del Acuerdo por el que se establecen los lineamientos que deberán observar todos los servidores públicos para la debida preservación y procesamiento del lugar de los hechos o del hallazgo y de los indicios, huellas o vestigios del hecho delictuoso, así como de los instrumentos, objetos o productos del delito.

ADEMÁS DE LA **DESCRIPCIÓN** DE LA EVIDENCIA Y LOS DATOS DE QUIEN TOMA **CONTACTO** CON LA MISMA, ES FUNDAMENTAL CONTAR CON EL DATO DE **DÓNDE** FUE LEVANTADA ESA EVIDENCIA



SERÁ UTILIZADO EN LA INTERPRETACIÓN FINAL DEL ESTUDIO



POR EJEMPLO: NO ES LO MISMO ENCONTRAR MATERIAL GENÉTICO DEL IMPUTADO EN UNA SÁBANA DE SU PROPIA CASA QUE ENCONTRARLO EN LA SÁBANA DE LA CASA DE LA VÍCTIMA DE VIOLACIÓN.

# MUESTRAS PENALES: TRASLADO



## HISPAPADOS

- EN SOBRES DE PAPEL CORRECTAMENTE

## PELOS

- PEGARLOS EN UNA HOJA DE PAPEL CON CINTA

## ELEMENTOS

TELAS, ARMAS, ELEMENTOS PERSONALES

- EMBOLSARLOS

**SIEMPRE ACOMPAÑADOS POR SU CADENA DE CUSTODIA**

BACTERIAS QUE DEGRADAN EL ADN)  
• PREVIO SECADO A TEMPERATURA AMBIENTE (NO SECAR EN ESTUFA YA QUE LAS ALTAS TEMPERATURAS DEGRADAN EL ADN)

SOBRE DE PAPEL ROTULADO, DISTINTO AL RESTO DE LAS MUESTRAS.  
• PREFERENTEMENTE CON BULBO

BACTERIAS QUE DEGRADAN EL ADN)  
• EVITAR EL CONTACTO DE LOS DISTINTOS ELEMENTOS ENTRE SÍ

# MUESTRAS PENALES: TRASLADO



**COLILLAS/  
PRESERVATIVOS/  
CHICLES**

**MATERIAL  
CADAVÉRICO**

• EN SOBRES DE PAPEL

• DIFE

CHICI

SOBR

QUE F

USÓ)

• ES CONVENIENTE QUE LOS PRESERVATIVOS SEAN ENVIADOS AL LABORATORIO EN SOBRES DE PAPEL; SI SE LOS HISOPA, PROSEGUIR COMO FUE DETALLADO

• TEMPERATURA AMBIENTE

**SIEMPRE ACOMPAÑADOS POR SU CADENA DE CUSTODIA**

COLOCARSE EN UN FRASCO CON SAL O CONSERVADORAS DE TELGOPOR

• IDEALMENTE MANTENER Y TRANSPORTAR EN FRÍO PARA EVITAR QUE CONTINÚE LA DEGRADACIÓN

L;  
E



# MUESTRAS FORENSES: TRASLADO



MUCHAS VECES LAS MUESTRAS DEBEN RECORRER LARGAS DISTANCIAS HASTA LLEGAR AL LABORATORIO.



¿QUIÉN LAS TRASLADA?: ESO LO DECIDE CADA PODER JUDICIAL PROVINCIAL, MUCHAS VECES ES A TRAVÉS DEL CORREO Y OTRAS VECES SON TRANSPORTADAS POR **FUNCIONARIOS JUDICIALES**



MÉTODO DE ELECCIÓN



# CASOS CIVILES: FILLACIONES

## PASOS A SEGUIR:

- ASESORAMIENTO TELEFÓNICO EN CUANTO AL TIPO DE CASO (PATERNIDAD, MEDIO HERMANDAD, TIO-SOBRINO, ABUELO- NIETO, LAS IMPLICANCIAS DE QUE PARTICIPE UN MENOR EN EL ESTUDIO)
- SOLICITUD DE TURNO
- EL DÍA DE LA TOMA DE MUESTRA: CONCURREN LOS PARTICIPANTES DEL ESTUDIO CON UNA NOTA DE PEDIDO FIRMADA POR UN PROFESIONAL (ABOGADO, MÉDICO, BIOQUÍMICO) EN DONDE FIGURA CLARAMENTE:
  - NOMBRE DE LOS PARTICIPANTES
  - DOCUMENTO DE IDENTIDAD DE LOS PARTICIPANTES
  - VÍNCULO A DETERMINAR
- SE VERIFICA LA IDENTIDAD DE CADA UNO Y SE FIRMA UN ACTA DE CONSENTIMIENTO PARA LA TOMA DE MUESTRA
- SE TOMAN LAS MUESTRAS DE HISOPADO BUCAL (2 POR CADA PACIENTE), QUE SE COLOCAN EN SOBRES IDENTIFICADOS
- EN 20 DÍAS PASAN A RETIRAR EL INFORME: ¿QUIÉN LO RETIRA?
  - CUALQUIERA DE LOS PARTICIPANTES DEL ESTUDIO O UNA PERSONA AUTORIZADA, QUE HAYA QUEDADO REGISTRADA EN EL ACTA

# CASOS CIVILES: FILIACIONES

## NOTA DE PEDIDO EXTRAJUDICIAL

FECHA

Buenos Aires, 03 de septiembre de 2018.

Sr. Director

COLEGIO DE FARMACEUTICOS  
DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES

DIRIGIDO A NUESTRO LABORATORIO

S / D:

Tengo el agrado de dirigirme a ud. a fin de solicitarle proceda a realizar el estudio de ADN respecto de las personas que a continuación se detalla:

- 1) \_\_\_\_\_, DNI \_\_\_\_\_
- 2) \_\_\_\_\_, DNI \_\_\_\_\_ nacido el 13/03/2011
- 3) \_\_\_\_\_, DNI \_\_\_\_\_, y en consecuencia determinar la paternidad de menor \_\_\_\_\_, respecto de \_\_\_\_\_

VÍNCULO A  
PROBAR

Se solicita expedida dos copias firmadas del resultado de cuyo estudio se requiere y proceda a entregar una copia de la Sra. \_\_\_\_\_ y otra al Sr. \_\_\_\_\_

Se adjunta copia de documento nacional de identidad de las tres personas involucradas y certificado de nacimiento del menor.

Desde ya muchas gracias.

FIRMA DEL PROFESIONAL  
RESPONSABLE DEL PEDIDO



NOMBRE  
COMPLETO DE  
LOS  
PARTICIPANTES  
Y DNI

# CASOS CIVILES: FILLACIONES

OFICIO JUDICIAL

DIRIGIDO A NUESTRO  
LABORATORIO

CARÁTULA

Nº DE EXPEDIENTE

DATOS SOBRE LAS  
MUESTRAS EXTRAÍDAS  
(POSIBLES  
CONTRAPRUEBAS)

Juzgado de Primera Inst. en lo Civil

\_\_\_\_\_, 15 de Agosto de 2018.-

AL COLEGIO OFICIAL DE BIOQUIMICOS  
Y FARMACEUTICOS DE CAPITAL FEDERAL.-  
S \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ D \_\_\_\_\_

FECHA

Me dirijo a Ud. En los autos caratulados: "\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_, EXPTE. N°  
\_\_\_\_\_" ; que tramitan por ante el Juzgado de Primera  
Instancia en lo Civil \_\_\_\_\_, a  
cargo de la Dra. \_\_\_\_\_, Juez, Secretaria de  
la Dra. \_\_\_\_\_, sito en \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_. Provincia de \_\_\_\_\_ en los  
que se ha dispuesto librar el presente a fin de notificarle  
la providencia que a continuación se transcribe para su  
cumplimiento:

\_\_\_\_\_, 17 de Abril de 2018.-

DATOS DEL  
JUZGADO

II.- Téngase presente y RESERVESE en Secretaria  
las muestras de hisopados realizados a las partes (2) sobres  
por cada una de las partes conteniendo cada sobre (2) hisopos  
bucales para el juzgado (resguardo) y (3) hisopos bucales  
para Bs. As., dejándose debida constancia en autos y libros  
pertinentes.-

III.-Atento al estado de autos y conforme  
disposición de Administración del Poder Judicial de \_\_\_\_\_,  
LIBRESE OFICIO al Colegio Oficial de Bioquímicos y  
Farmacéuticos de la Capital Federal, a los fines de que se  
proceda a la realización de la prueba pericial de ADN con el  
objetivo de determinar la existencia o no de vinculo

FINALIDAD DEL  
OFICIO

# CASOS CIVILES: FILIACIONES

OFICIO JUDICIAL

biológico entre el Sr. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ y la joven \_\_\_\_\_. A sus efectos adjunto los sobres que contienen los papeles de filtro impregnados con muestras de hisopado bucal pertenecientes a:

FINALIDAD DEL OFICIO

VÍNCULOS DUBITADOS E INDUBITADOS, TIPO DE MUESTRA Y FECHA DE EXTRACCIÓN

- INTEGRANTE N°1: \_\_\_\_\_
  - a. Nombre y Apellido: \_\_\_\_\_
  - b. Condición: Titular
  - c. Tipo de Muestra Remitida: 3 hisopos bucales
  - d. Fecha de Atracción: 16/04/18.-
- INTEGRANTE N°2: \_\_\_\_\_
  - a. Nombre y Apellido: \_\_\_\_\_
  - b. Condición: Titular
  - c. Tipo de Muestra Remitida: 3 hisopos bucales
  - d. Fecha de Atracción: 16/04/18.-
- INTEGRANTE N°3: \_\_\_\_\_
  - a. Nombre y Apellido: \_\_\_\_\_
  - b. Condición: Madre de Integrantes N°1 y N° 2 (Vínculo Biológico Indubitado)
  - c. Tipo de Muestra Remitida: 3 hisopos bucales
  - d. Fecha de Atracción: 16/04/18.-
- INTEGRANTE N°4: \_\_\_\_\_
  - a. Nombre y Apellido: \_\_\_\_\_
  - b. Condición: Supuesto padre de Integrantes N°1 y N° 2 (Vínculo Biológico indubitado)
  - c. Tipo de Muestra Remitida: 3 hisopos bucales
  - d. Fecha de Atracción: 16/04/18.-

\_\_\_\_\_. Asimismo, hágase conocer que el resultado pertinente deberá remitirse a este Juzgado. Fdo. Dra. \_\_\_\_\_  
Juez y Dra. \_\_\_\_\_ -Secretaría.-

RECEPCIÓN DEL INFORME

# CASOS CIVILES: FILLACIONES

## ACTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA TOMA DE MUESTRA:

MEMBRETE  
CON LOS  
DATOS DEL  
LABORATORIO

COLEGIO OFICIAL DE FARMACÉUTICOS Y BIOQUÍMICOS DE CAPITAL FEDERAL  
UNIDAD DE ANÁLISIS DE ADN – ROCAMORA 4045 – CAP. – TEL 4862-1142

FECHA DE LA  
TOMA DE  
MUESTRA

### ACTA

DIRECTOR  
TÉCNICO DEL  
LABORATORIO  
(responsable por  
este acto y por el  
análisis)

En Buenos Aires, al día \_\_\_\_ del mes de \_\_\_\_\_ de 201\_\_\_\_, el  
Dr. Gustavo A. Penacino, Director de la Unidad de Análisis de ADN del  
COFyBCF, hace constar con la participación del Asistente de Laboratorio  
\_\_\_\_\_, DNI \_\_\_\_\_,  
que se presentan en este Laboratorio

PROFESIONAL  
QUE FIRMA LA  
NOTA DE  
PEDIDO DEL  
ESTUDIO

\_\_\_\_\_, DNI \_\_\_\_\_,  
\_\_\_\_\_, DNI \_\_\_\_\_,

DATOS DE  
QUIENES  
PARTICIPAN  
EN EL  
ESTUDIO

ACLARACIONES:  
POR EJEMPLO,  
PERSONA  
AUTORIZADA AJENA  
AL ESTUDIO QUE  
PUEDE RETIRAR EL  
INFORME

quienes prestan conformidad para la realización de un ESTUDIO mediante  
ANÁLISIS DE ADN de las muestras biológicas tomadas en este acto para  
determinar el vínculo de \_\_\_\_\_,  
a pedido de \_\_\_\_\_. Es todo,  
terminado el mismo, los presentes firman al pie para constancia que certifico.

VÍNCULO A  
PROBAR

FIRMA, ACLARACIÓN Y HUELLA DIGITAL DE LOS  
PARTICIPANTES (PUEDE INCLUIRSE FOTO), Y FIRMA  
DEL ENCARGADO DE TOMAR LAS MUESTRAS.



# CASOS CIVILES: FILLACIONES



UNA VEZ QUE SE HA LEÍDO EN VOZ ALTA EL ACTA DE CONSENTIMIENTO Y TODOS DECLARAN HABER ENTENDIDO LA MISMA, SE PROCEDE A LA TOMA DE MUESTRA:

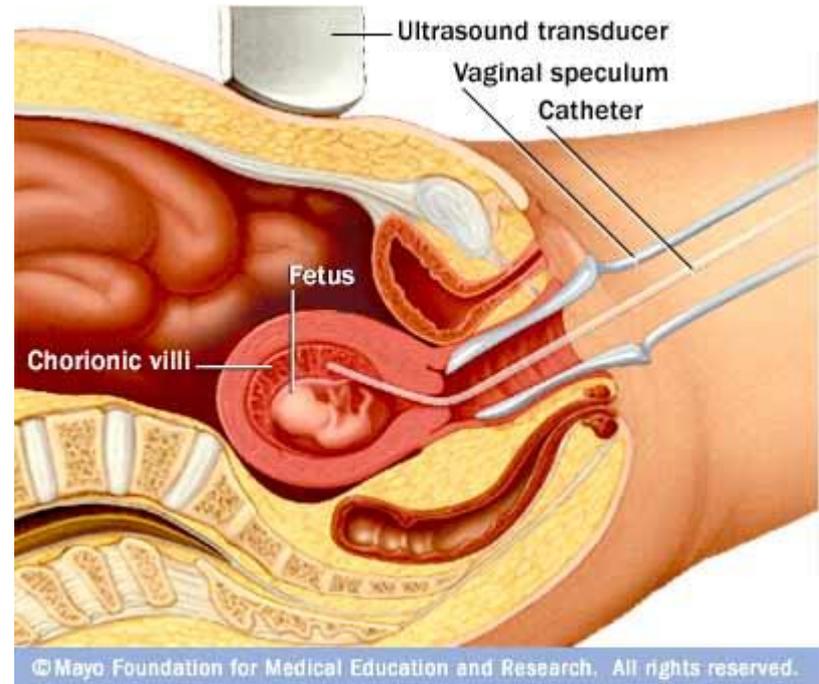
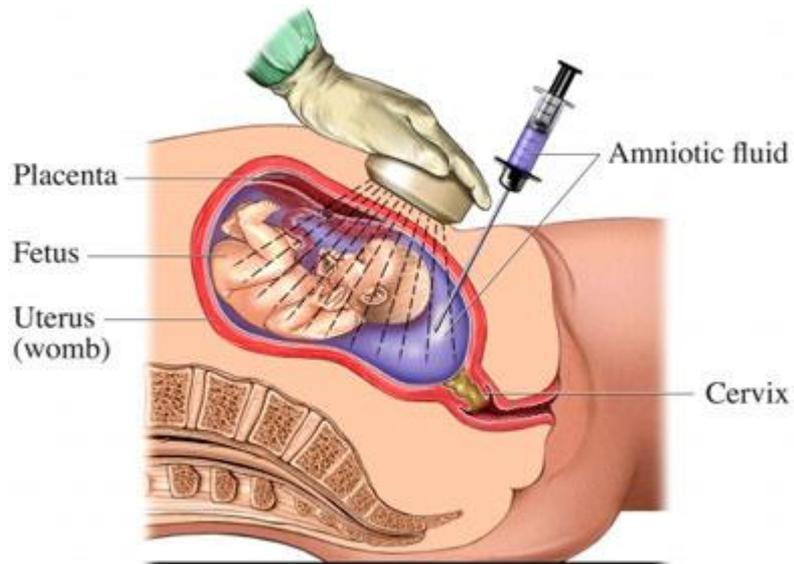
- SE TOMAN 2 HISOPOS (1 DE CADA MEJILLA)
- 30 SEGUNDOS, ROTANDO EL HISOPO, MOVIÉNDOLO HACIA ARRIBA O HACIA ABAJO
- LOS 2 HISOPOS CORRESPONDIENTES A UN MISMO INDIVIDUO SE COLOCAN EN UN SOBRE QUE FUE IDENTIFICADO CON SU NOMBRE PREVIAMENTE.

## **IMPORTANTE:**

- SE TRABAJA DE A UNA PERSONA POR VEZ (NO SE TOMAN AL MISMO TIEMPO HISOPOS CORRESPONDIENTES A DIFERENTES INDIVIDUOS)
- EL RESTO DE LOS PARTICIPANTES NO HABLA CUANDO SE ESTÁ TOMANDO UNA MUESTRA. PREGUNTAS AL FINALIZAR LA TOMA DE MUESTRA.

# CASOS CIVILES: FILLACIONES

## MUESTRAS PRENATALES: PUEDEN ESTAR CONTAMINADAS CON MATERIAL MATERNO



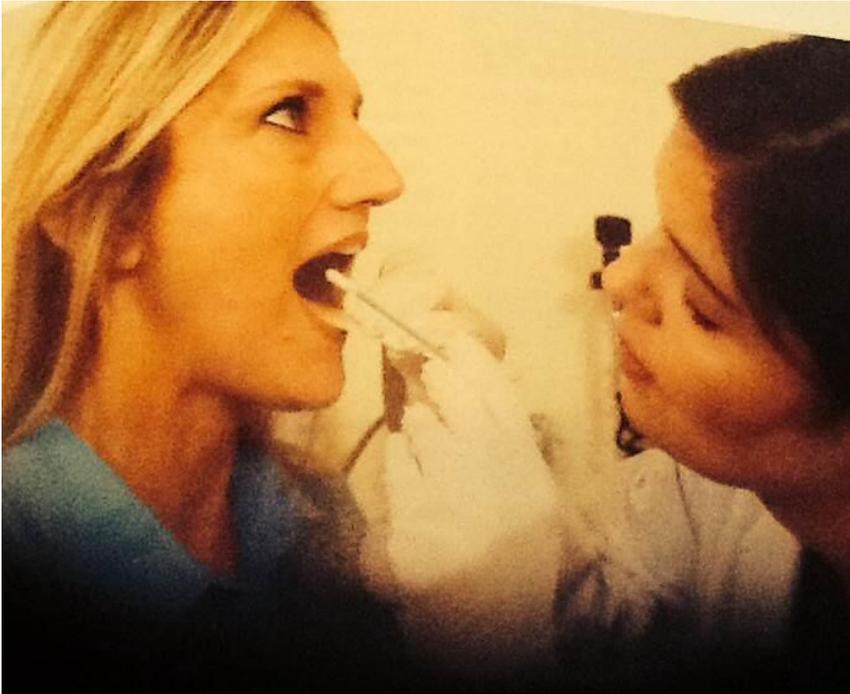
- **Líquido amniótico (luego sem 16)**

- **Vellosidad Coriónica (sem 12 a 16)**



# CASOS CIVILES: FILIACIONES

## MUESTRAS: MADRE BIOLÓGICA + BEBÉ



- SANGRE O SALIVA U OTRA MUESTRA DE LA MADRE, SANGRE EN EDTA, TARJETAS FTA, WHATMAN



- VELLOSIDAD O LÍQUIDO AMNIÓTICO O
- CORDÓN UMBILICAL



# CASOS CIVILES: FILIACIONES

## VOLUMEN DE MUESTRAS PRENATALES

- Depende el estudio
- Si es solo para STR con 15-20 ml. de líquido amniótico en tubo estéril BD es suficiente. Si requiere pruebas más complejas consultar al laboratorio cantidad necesaria
- Si es solo para STR con 10-20 vellosidades limpias (disgregadas con aguja estéril de posible sangre), y llevada a volumen de 15-20 ml de solución fisiológica estéril es suficiente. Si requiere pruebas más complejas consultar al laboratorio cantidad necesaria



# CASOS CIVILES: FILIACIONES

## RIESGOS

- Nosotros no recomendamos este estudio ya que los riesgos son elevados y el resultado no se modificará si se espera al nacimiento
  - De todas maneras hay pacientes que sienten urgencia y deciden hacerlo
  - Se sugiere solicitar previamente ecografías anteriores, junto a los estudios serológicos de Hepatitis B y C, HIV, Toxoplasmosis, VDRL (sífilis), rubeola, y si es necesario otros estudios serológicos que puedan afectar al embrión. Se solicita también grupo y factor de sangre
  - Se sugiere realizar a los 7 días una ecografía de control en la zona de la toma de muestra
  - La toma de muestra debe ser realizada por un médico que monitoree el procedimiento a través de una ecografía
  - La madre debe firmar un consentimiento informado donde se le hace saber que esta practica podría ocasionarle la pérdida del embarazo
  - En caso de haber problemas puede suspenderse la práctica o esperar una semana o dos mas, por ejemplo en el caso que existan hematomas
- 

# CASOS CIVILES: FILLACIONES

**THE  
SCIENCE  
OF**

NONINVASIVE PRENATAL  
TESTING OPTIONS FOR ALL



**MaterniT**<sup>®</sup>  
GENOME  
Totalmente validada



**MaterniT**<sup>®</sup>  
21 PLUS  
Claramente revolucionaria

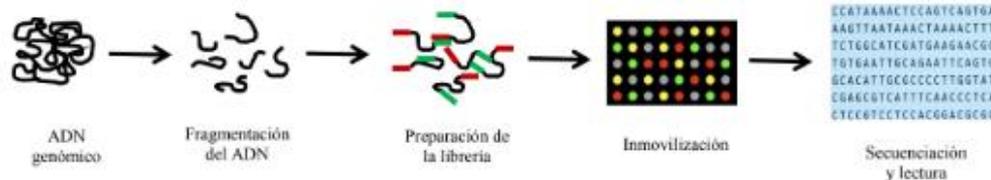
Con la Tecnología de

**sequenom**

ANÁLISIS DE ADN LIBRE FETAL CIRCULANTE EN **SANGRE MATERNA**  
UTILIZANDO **SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN**: CADA  
ESTUDIO CUESTA ENTRE 850 Y 1000 DÓLARES, SEGÚN LA COMPLEJIDAD  
ELEGIDA

# MPS: Secuenciación Masiva en Paralelo

- La ADNpol cataliza la unión de nucleótidos a una cadena de ADN en ciclos de síntesis
- En cada ciclo, los nucleótidos son identificados de diferentes formas (dependiendo de la tecnología y la química utilizadas)
- Diferencia con electroforesis capilar: En vez de secuenciarse una cadena simple de un fragmento de ADN, el proceso se extiende a través de millones de fragmentos en forma paralela y masiva
- 3 pasos críticos: Preparación de la muestra, inmovilización y secuenciación



# Plataformas para Genética Forense

ILLUMINA

ION- TORRENT

1. PREPARACIÓN DE LA BIBLIOTECA: Fragmentación del ADN por sonicación o nebulización, obteniendo fragmentos de aprox. 500pb. → Dos etapas de amplificación

→ Utiliza CEBADORES ESPECÍFICOS que se pegan a los extremos del fragmento de interés

→ Se incorporan INDEXES y ADAPTADORES

↓  
Permiten  
identificar  
cada  
muestra

↓  
Permiten  
generar  
los  
clusters

2. GENERACIÓN DE CLUSTERS: Las muestras se hibridan a una superficie a través de los adaptadores; se amplifican en puente y se linearizan. La celda contiene primers complementarios a la secuencia de los adaptadores. El proceso se repite generando grupos de clones.



# Plataformas para Genética Forense

ILLUMINA

ION- TORRENT

3. SECUENCIACIÓN: Utiliza terminadores reversibles marcados. En cada ciclo, un terminador se une a la secuencia e impide la unión de nuevos nucleótidos (grupo 3'OH bloqueado). Luego de la incorporación, se realiza un lavado y se determina la fluorescencia emitida por excitación del fluorocromo específico. El sistema toma imágenes de cada ciclo

4. ANÁLISIS DE DATOS: Lectura simultánea de grandes cantidades de secuencias. El muestreo en profundidad y una cobertura uniforme asegura una alta precisión en la determinación de diferencias genéticas. Cada lectura de base tiene una puntuación asignada según la calidad por lo que el software de Illumina puede marcar diferencias y generar puntuaciones seguras. Se pondera la contribución de cada base a la secuencia y se detectan las variantes de la secuencia



# Plataformas para Genética Forense

ILLUMINA

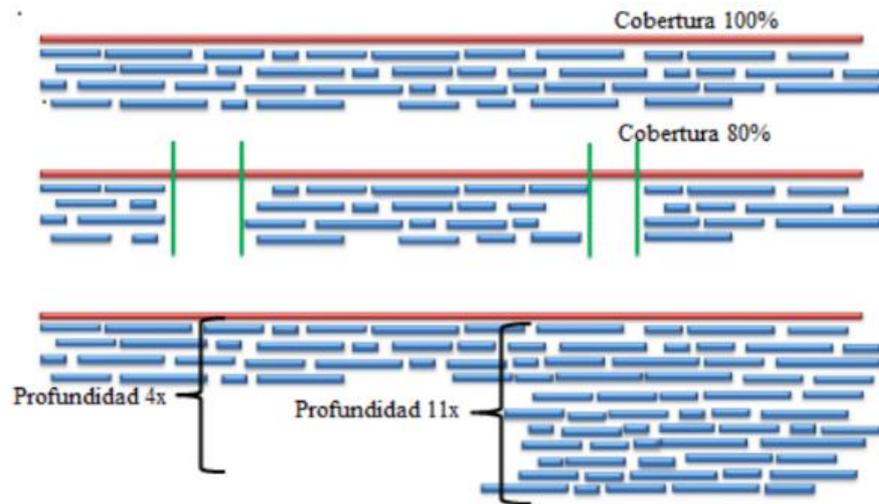
ION- TORRENT

1. **PREPARACIÓN DE LA BIBLIOTECA:** La fragmentación se puede lograr mediante cizallamiento ultrasónico, nebulización o métodos enzimáticos. Luego se unirán los ADAPTADORES a los fragmentos generados
2. **PCR DE EMULSIÓN:** La amplificación se lleva a cabo en una mezcla oleosa que contiene microesferas con adaptadores complementarios al de los fragmentos obtenidos en el paso anterior y reactivos para llevarla a cabo, generando así en cada esfera un grupo de clones
3. **SECUENCIACIÓN:** Las esferas se colocan en pocillos que serán bañados con una solución de un nucleótido específico. Si el nucleótido es incorporado, se libera un protón que será detectado por la base del pocillo que actúa como Phmetro. Una placa sensora traducirá esos cambios en picos de voltaje, y un microprocesador los convierte en ionogramas. El proceso se repite cada 15 segundos con el resto de los nucleótidos, previo lavado del chip
4. **ANÁLISIS DE DATOS:** Los ionogramas son traducidos a secuencias de bases

# Conceptos de COBERTURA y PROFUNDIDAD

COBERTURA= CAPACIDAD de secuenciar cada una de las bases a lo largo del genoma o de un subconjunto definido, es decir, el NÚMERO PROMEDIO DE SECUENCIAS que representan a un determinado nucleótido en la secuencia total

PROFUNDIDAD= NÚMERO DE VECES que se secuencia un mismo subconjunto



# Ventajas de MPS vs EC

- La tipificación se basa tanto en LONGITUD como en SECUENCIA
- Cada molécula se lee INDEPENDIENTEMENTE
- Amplicones más pequeños → Buenos resultados en muestras con escasa cantidad de ADN o ADN degradado
- El mantenimiento de los equipos de MPS es MÁS SIMPLE que los de electroforesis capilar
- Se detectan variantes en regiones amplificadas dentro y fuera del STR →

IDENTIFICACIÓN PRECISA DE LOS ALELOS Y DE LAS VARIACIONES INTRA-ALÉLICAS  
ANÁLISIS SIMULTÁNEO DE DIFERENTES TIPOS DE MARCADORES (SNPs, Y-STRs, X-STRs, STRs AUTOSÓMICOS)

Eleva el poder de discriminación de los STRs y favorece el análisis de MEZCLAS

PERMITE DIFERENCIAR ISOALELOS (Alelos del mismo tamaño pero con diferente secuencia interna)

# Aplicaciones

- ESTUDIOS DE PREDICCIÓN FENOTÍPICA Y ANCESTRÍA: Un perfil compuesto por una batería de SNPs informativos respecto a las características físicas de un individuo y a su ancestralidad geográfica podría ser útil en investigaciones criminales.
  - Pigmentación del iris: Puede ir desde el azul al marrón pasando por tonalidades verdes y doradas (dependiendo de la población estudiada). Sin embargo, se ha observado que el nivel de precisión de las predicciones suele ser alto para colores MARRÓN o AZUL, pero no así para los tonos intermedios.
  - Pigmentación del cabello: Tal como ocurre con el iris, la precisión es alta para cabello oscuro o rojizo, pero no así para diferenciar cabello castaño de rubio.
  - Coloración de la piel: es el rasgo de la apariencia física más difícil de examinar genéticamente y de dilucidar debido a las migraciones y adaptaciones ambientales lo que conduce a una restricción en los estudios de mapeo genético.

**NECESIDAD DE SEGUIR INVESTIGANDO**

# Aplicaciones

- **ANÁLISIS EPIGENÉTICOS:** Estudian a los elementos que regulan la expresión génica de una célula y no a su secuencia. Los cambios epigenéticos **NO SON ESTÁTICOS** y pueden modificarse a lo largo de la vida de la célula. La metilación diferencial de ADN entre tejidos e individuos se ha utilizado en genética forense para distinguir gemelos monocigóticos, diferenciar tejidos, y determinar con bastante exactitud la edad del donante. Sin embargo, requieren de gran cantidad de ADN lo que al momento constituye una limitación.
- **ANÁLISIS DE ARNm Y microARN:** El análisis de ARNm permite identificar el origen de un determinado fluido, lo que puede resultar muy útil para establecer un vínculo entre la evidencia y la escena del crimen. Más reciente es la introducción del análisis de microARN, involucrado en el control de la expresión génica; al ser moléculas más pequeñas que el ARNm, su estabilidad in vitro es mucho mayor, siendo adecuadas no solo para la determinación de fluidos corporales, sino también para determinar el intervalo post mórtem.



# Limitaciones

- Es aún una técnica costosa para muchos laboratorios
- En las plataformas de Ion Torrent se producen errores de lectura en los intervalos de nucleótidos repetitivos (regiones homopoliméricas)
- En las plataformas de Illumina, ocurren errores en las sustituciones
- Requiere el desarrollo de herramientas analíticas, de la infraestructura necesaria para el tratamiento de los datos y de un mejor conocimiento del genoma
- Los recursos bioinformáticos necesarios son costosos ya que deben ser rápidos y eficientes en el procesamiento y almacenamiento de los datos
- Falta de mano de obra capacitada y conocimiento especial de bioinformática para recopilar información precisa y para analizar e interpretar datos



# CASOS CIVILES: FILIACIONES

## ACLARACIONES:

- MUCHOS LABORATORIOS TODAVÍA RECURREN A LA TOMA DE MUESTRA SANGUÍNEA; EN ESE CASO LA SANGRE DEBE COLOCARSE EN UN PAPEL DE FILTRO PARA CONSERVARSE DE ESTA MANERA, YA QUE LA **SANGRE LÍQUIDA SE DEGRADA RÁPIDAMENTE**
- EN PERSONAS TRANSFUNDIDAS EVITAR LA TOMA DE SANGRE, PODRÍA DETECTARSE EL ADN PROCEDENTE DE LA SANGRE TRANSFUNDIDA AL MENOS EN UN CORTO PERÍODO DE TIEMPO DESPUÉS DE LA TRANSFUSIÓN Y SI ÉSTA ES MASIVA
- NO HACE FALTA INDICAR AYUNO CUANDO SE TOMA MUESTRA DE SANGRE O HISOPADO BUCAL
- PARA CASOS DE FILIACIONES NO SE RECOMIENDA REMITIR AL LABORATORIO OTRO TIPO DE MUESTRAS QUE LAS MENCIONADAS, COMO SER PELOS



## PREGUNTA FRECUENTE

RECORDAMOS QUE LOS PELOS SERÁN ÚTILES EN ESTE TIPO DE CASOS CUANDO TENGAN BULBO QUE NOS PERMITA ANALIZAR EL ADN NUCLEAR

## EJERCICIOS:

TENDRÁN 30 MINUTOS PARA RESPONDER A LAS SIGUIENTES PREGUNTAS, QUE CORREGIREMOS A CONTINUACIÓN:

1- A través de la secuenciación masiva en paralelo es posible estudiar el ADN fetal a partir de \_\_\_\_\_

2- ¿En cuál o cuáles de las siguientes situaciones es necesaria la firma del consentimiento informado antes de proceder a tomar la muestra?

A- Toma de vellosidades coriónicas

B- Extracción sanguínea materna para análisis de ADN fetal

C- Toma de líquido amniótico

3- El análisis de ADN fetal circulante en sangre materna se recomienda a partir de la \_\_\_\_\_ semana de gestación

4- La muestra de 10 centímetros de fémur se recomienda para cuerpos que:

A- Han sido quemados

B- Se encuentran en un período de putrefacción profunda

C- Han fallecido en las últimas 72 hs.

## 5- VERDADERO O FALSO.

A- Cuando se desea realizar un análisis de ADN prenatal es ideal hacerlo mediante vellosidades coriónicas o líquido amniótico ya que la muestra de partida es de fácil acceso y, además, permite evitar la contaminación del material genético fetal con ADN materno, que es muy frecuente en el análisis.

B- El formol es una sustancia conservante del material genético.

C- Es recomendable secar las muestras de hisopado bucal o sangre en papel en estufa a 56°C.

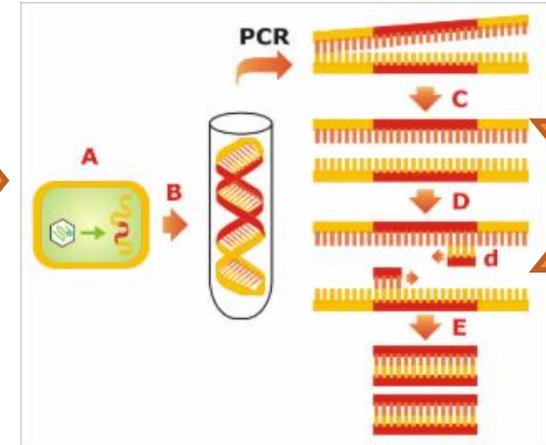
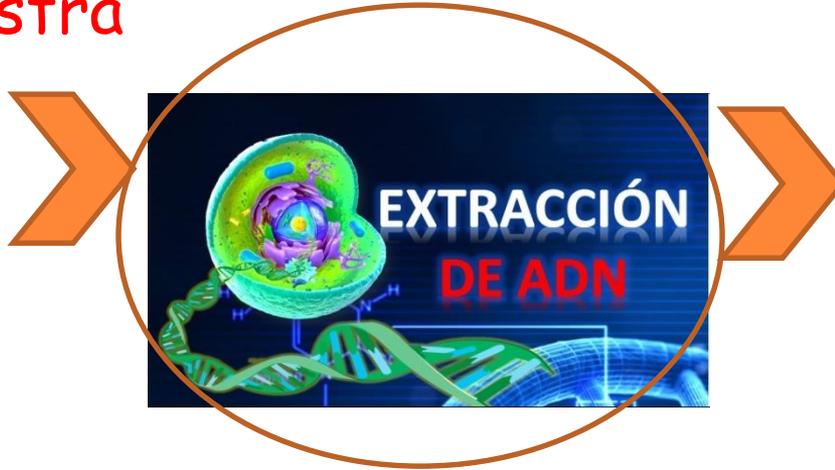
D- Es obligatorio realizar un monitoreo mediante ecografía cuando se procede a tomar líquido amniótico o vellosidades coriónicas para realizar un estudio prenatal

E- En un cadáver embalsamado sería recomendable tomar una muestra de músculo esquelético para realizar un análisis de ADN.

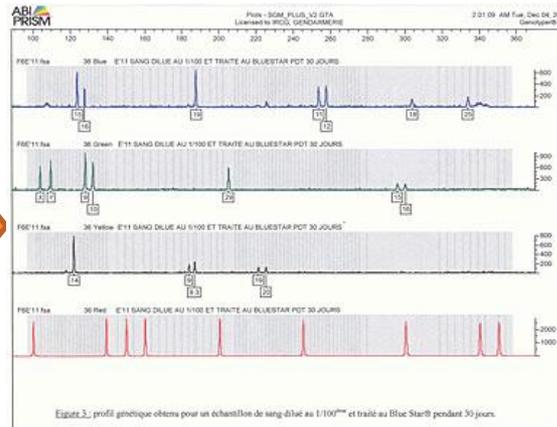


# RECORDATORIO: ETAPAS DEL ANÁLISIS DE ADN

## Toma de Muestra



## Análisis en el secuenciador



## Obtención del perfil genético

### Paternity Screening Report

Relationship: Child  
Alleged Father: Race: Caucasian

#### DNA ANALYSIS RESULTS: Allele and number of repeats

Alleles	Child	Alleged Father	Paternity Index
D3S1358	15	15, 17	1.972
THO1	9, 3	9, 3	3.439
D21S11	27, 29	29, 32, 2	1.221
D18S51	14, 18	16, 18	3.230
Penta E	13, 14	5, 13	2.336
D5S818	11, 12	11, 13	0.653
D13S317	8, 15	8, 11	2.053
D7S820	9, 12	10, 12	1.694
D16S539	12, 13	9, 12	0.827
CSF1PO	11	11, 12	1.572
Penta D	9, 11	11, 12	1.712
VWA	14, 15	14, 17	3.008
D8S1179	10, 16	12, 16	9.191
TPOX	10, 11	9, 10	5.814
FGA	21, 24	24	3.636
Amelogenin	XY	XY	

Combined Paternity Index: 184,619 to 1  
Probability of Paternity: 99.999458%

#### Conclusion:

The alleged father cannot be excluded as the biological father of the child since they share genetic markers. Based on the results obtained from the analysis of the alleles, D3S1358, THO1, D21S11, D18S51, Penta E, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, Penta D, VWA, D8S1179, TPOX, FGA and Amelogenin, the probability of paternity is 99.999458% (prior probability = 0.5) as compared to an untested, unrelated man of the Caucasian population.

## Informe

# EXTRACCIÓN DE ADN: DIFERENCIAS SEGÚN EL TIPO DE MUESTRA

## HISOPADOS BUCALES/ SANGRE EN PAPEL

RECORTE DE LA CAPA SUPERFICIAL DE LOS HISOPOS: LA TIJERA DEBE LIMPIARSE ENTRE CADA MUESTRA. SE COLOCAN EN TUBOS EPPENDORF



**TEC-SDS:** DETERGENTE; DESESTABILIZA A LOS LÍPIDOS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA



**PK:** RUPTURA DE LAS PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA PLÁSMATICA. SE LIBERA EL CONTENIDO CELULAR



INCUBACIÓN A 56°C (MÍN. 2 HS., MÁX. ON)

AGREGADO DE **NaCl** 3M, QUE SALINIZA EL MEDIO FAVORECIENDO LA SEPARACIÓN DE FASES



AGREGADO DE **FENOL**, QUE LIMPIA LOS RESTOS DE DETERGENTE Y COAGULA LAS PROTEÍNAS, SEPARÁNDOLAS DE LA FASE ACUOSA



RESUSPENSIÓN EN H2O DESTILADA ESTÉRIL



VOLCADO DEL ETANOL Y SECADO POR 2 HS



SE TOMA LA FASE ACUOSA Y SE AGREGA EL DOBLE DE VOLUMEN DE **ETANOL**, INCUBÁNDOSE 30 MIN. EN FREEZER



UNA VEZ SEPARADA LA FASE ACUOSA, SE AGREGA **CLOROFORMO**, QUE ARRASTRA TODOS LOS RESTOS CELULARES

# EXTRACCIÓN DE ADN: DIFERENCIAS SEGÚN EL TIPO DE MUESTRA

## HISOPADOS VAGINALES/ANALES/ROPA INTERIOR

EN 2 TUBOS (A PARA LAS CÉLULAS EPITELIALES Y B PARA LA FRACCIÓN ESPERMÁTICA)

**TEC-SDS:** DETERGENTE; DESESTABILIZA A LOS LÍPIDOS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

RESUSPENSIÓN EN H<sub>2</sub>O DESTILADA ESTÉRIL

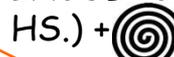
VOLCADO DEL ETANOL Y SECADO POR 2 HS

SE TOMA LA FASE ACUOSA Y SE AGREGA EL DOBLE DE VOLUMEN DE **ETANOL**, INCUBÁNDOSE 30 MIN. EN FREEZER

UNA VEZ SEPARADA LA FASE ACUOSA, SE AGREGA **CLOROFORMO**, QUE ARRASTRA TODOS LOS RESTOS CELULARES

AGREGADO DE **FENOL**, QUE LIMPIA LOS RESTOS DE DETERGENTE Y COAGULA LAS PROTEÍNAS, SEPARÁNDOLAS DE LA FASE ACUOSA

**PK:** RUPTURA DE LAS PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA PLÁSMATICA. SE LIBERA EL CONTENIDO CELULAR

INCUBACIÓN A 56°C (MÁX. 2 HS.) + 

LÍQUIDO SUPERIOR:  
TUBO A

PELLET: TUBO B

**TEC-SDS + PK + DTT**

ROMPE LOS PUENTES DISULFURO DE LOS ESPERMATOZOIDES

AGREGADO DE **NaCl** 3M, QUE SALINIZA EL MEDIO FAVORECIENDO LA SEPARACIÓN DE FASES

INCUBACIÓN A 56°C (O.N.)

# EXTRACCIÓN DE ADN: DIFERENCIAS SEGÚN EL TIPO DE MUESTRA

## PELOS

RECORTE DEL BULBO



TEC-SDS + PK + DTT

ROMPE LOS PUENTES  
DISULFURO DEL PELO  
INCUBACIÓN A 56°C (MÁX. 2  
HS.)



REFUERZO DE PK



INCUBACIÓN A 56°C (O.N.)

AGREGADO DE NaCl 3M, QUE  
SALINIZA EL MEDIO  
FAVORECIENDO LA SEPARACIÓN  
DE FASES



AGREGADO DE FENOL, QUE LIMPIA  
LOS RESTOS DE DETERGENTE Y  
COAGULA LAS PROTEÍNAS,  
SEPARÁNDOLAS DE LA FASE  
ACUOSA



RESUSPENSIÓN EN H2O DESTILADA ESTÉRIL



VOLCADO DEL ETANOL Y SECADO POR 2 HS



SE TOMA LA FASE ACUOSA Y SE AGREGA EL  
DOBLE DE VOLUMEN DE ETANOL,  
INCUBÁNDOSE 30 MIN. EN FREEZER



UNA VEZ SEPARADA LA FASE ACUOSA, SE  
AGREGA CLOROFORMO, QUE ARRASTRA  
TODOS LOS RESTOS CELULARES

# EXTRACCIÓN DE ADN: DIFERENCIAS SEGÚN EL TIPO DE MUESTRA

## UÑAS

DEBE CORTARSE EN FRAGMENTOS MUY PEQUEÑOS UTILIZANDO UN BISTURÍ SOBRE UNA HOJA A4 PARA AUMENTAR LA SUPERFICIE DE CONTACTO EFECTIVA DE LA MUESTRA CON LOS REACTIVOS

TEC-SDS + PK + DTT

ROMPE LOS PUENTES DISULFURO

INCUBACIÓN A 56°C (MÁX. 2 HS.)

RESUSPENSIÓN EN H2O DESTILADA ESTÉRIL

REFUERZO DE PK

INCUBACIÓN A 56°C (O.N.)

VOLCADO DEL ETANOL Y SECADO POR 2 HS

AGREGADO DE NaCl 3M, QUE SALINIZA EL MEDIO FAVORECIENDO LA SEPARACIÓN DE FASES

SE TOMA LA FASE ACUOSA Y SE AGREGA EL DOBLE DE VOLUMEN DE ETANOL, INCUBÁNDOSE 30 MIN. EN FREEZER

AGREGADO DE FENOL, QUE LIMPIA LOS RESTOS DE DETERGENTE Y COAGULA LAS PROTEÍNAS, SEPARÁNDOLAS DE LA FASE ACUOSA

UNA VEZ SEPARADA LA FASE ACUOSA, SE AGREGA CLOROFORMO, QUE ARRASTRA TODOS LOS RESTOS CELULARES

# EXTRACCIÓN DE ADN: DIFERENCIAS SEGÚN EL TIPO DE MUESTRA

## SEPARACIÓN DE MATERIAL SUBUNGUEAL Y UÑAS

EN 2 TUBOS (A PARA EL MATERIAL SUBUNGUEAL Y B PARA EL MATERIAL UNGUEAL). LAS UÑAS SE COLOCAN EN EL TUBO B PARA EMPEZAR.

➔ **TEC-SDS**: DETERGENTE; DESESTABILIZA A LOS LÍPIDOS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

RESUSPENSIÓN EN H<sub>2</sub>O DESTILADA ESTÉRIL

➔ **PK**: RUPTURA DE LAS PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA PLÁSMATICA. SE LIBERA EL CONTENIDO CELULAR

VOLCADO DEL ETANOL Y SECADO POR 2 HS

SE TOMA LA FASE ACUOSA Y SE AGREGA EL DOBLE DE VOLUMEN DE **ETANOL**, INCUBÁNDOSE 30 MIN. EN FREEZER

INCUBACIÓN A 56°C (MÁX. 2 HS.) + 

UNA VEZ SEPARADA LA FASE ACUOSA, SE AGREGA **CLOROFORMO**, QUE ARRASTRA TODOS LOS RESTOS CELULARES

➔ **TODO EL LÍQUIDO: TUBO A**      ➔ **SE CORTAN LAS UÑAS: TUBO B**

AGREGADO DE **FENOL**, QUE LIMPIA LOS RESTOS DE DETERGENTE Y COAGULA LAS PROTEÍNAS, SEPARÁNDOLAS DE LA FASE ACUOSA

➔ **TEC-SDS + PK + DTT**  
ROMPE LOS PUENTES DISULFURO DE LOS ESPERMATOZOIDES

➔ AGREGADO DE **NaCl 3M**, QUE SALINIZA EL MEDIO FAVORECIENDO LA SEPARACIÓN DE FASES

➔ INCUBACIÓN A 56°C (2 HS) + REFUERZO DE PK) + INCUBACIÓN O.N.

# EXTRACCIÓN DE ADN: DIFERENCIAS SEGÚN EL TIPO DE MUESTRA

## MATERIAL BLANDO

CORTAR CON BISTURÍ EL MATERIAL, DESCARTANDO LA PORCIÓN DE MUESTRA EN CONTACTO CON EL EXTERIOR Y ELIGIENDO EL CENTRO

**TEC-SDS:** DETERGENTE; DESESTABILIZA A LOS LÍPIDOS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

RESUSPENSIÓN EN H<sub>2</sub>O DESTILADA ESTÉRIL

**PK:** RUPTURA DE LAS PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA PLÁSMATICA. SE LIBERA EL CONTENIDO CELULAR

VOLCADO DEL ETANOL Y SECADO POR 2 HS

INCUBACIÓN A 56°C (MÍN. 2 HS., MÁX. ON)

SE TOMA LA FASE ACUOSA Y SE AGREGA EL DOBLE DE VOLUMEN DE **ETANOL**, INCUBÁNDOSE 30 MIN. EN FREEZER

AGREGADO DE **NaCl** 3M, QUE SALINIZA EL MEDIO FAVORECIENDO LA SEPARACIÓN DE FASES

UNA VEZ SEPARADA LA FASE ACUOSA, SE AGREGA **CLOROFORMO**, QUE ARRASTRA TODOS LOS RESTOS CELULARES

AGREGADO DE **FENOL**, QUE LIMPIA LOS RESTOS DE DETERGENTE Y COAGULA LAS PROTEÍNAS, SEPARÁNDOLAS DE LA FASE ACUOSA

# CAMINO AL PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN EN HUESOS

ANTES DE COMENZAR: LIMPIEZA DE TODOS LOS ELEMENTOS Y MESADAS CON HIPOCLORITO DE SODIO 10%, ETANOL ABSOLUTO Y ENJUAGUE FINAL CON AGUA DESTILADA.

10 MUESTRAS ÓSEAS (FÉMUR): LIMPIEZA CON BISTURÍ, PAPEL DE LIJA Y TORNO (SIEMPRE SUMERGIR PREVIAMENTE EL HUESO EN NITRÓGENO LÍQUIDO)



OBTENCIÓN DE 8 GRS. DE POLVO CON TORNO (SUMERGIR PREVIAMENTE EL HUESO EN NITRÓGENO LÍQUIDO)



LIMPIEZA DEL POLVO CON ETOH Y EDTA

DIGESTIÓN (250 ul TEC-SDS Y 25 ul PROTEINASA K; INCUBAR EN BAÑO TÉRMICO A 56°C 2 HS. REFUERZO DE TEC-SDS Y PK DESPUÉS DE 1 HORA)



EXTRACCIÓN CON 500 ul DE FENOL (Y AGREGADO DEL 10% DE SOLUCIÓN DE NaCl 3M) Y POSTERIORMENTE CON 500 ul DE CLOROFORMO

50 ul PROCESADOS MEDIANTE EL KIT QIAAMP DNA INVESTIGATOR

**EXTRACTO 1**

EL RESTO DEL VOLUMEN FUE PURIFICADO EN COLUMNA AMICON, CENTRIFUGANDO DURANTE 15 MIN. HASTA OBTENER 50 ul

5 ul SE  
AMPLIFICAN  
DIRECTAMENTE  
A PARTIR DEL  
CONCENTRADO  
**EXTRACTO 2**

EL RESTO SE  
PRECIPITA CON  
ETANOL  
ABSOLUTO; SE  
MIDE EL VOLUMEN  
DE EXTRACTO  
RESTANTE, Y SE  
AGREGA  
EXACTAMENTE EL  
DOBLE DE  
VOLUMEN DE  
ETANOL ABSOLUTO

PCR



SECUENCIADOR

30 MIN. EN  
FREEZER.  
CENTRIFUGAR 10  
MIN. A MÁXIMA  
VELOCIDAD,  
VOLCAR Y DEJAR  
SECAR AL MENOS 2  
HORAS.

RESUSPENDER EN  
10 ul DE AGUA  
DESTILADA  
**EXTRACTO 3**

# CAMINO AL PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN EN HUESOS

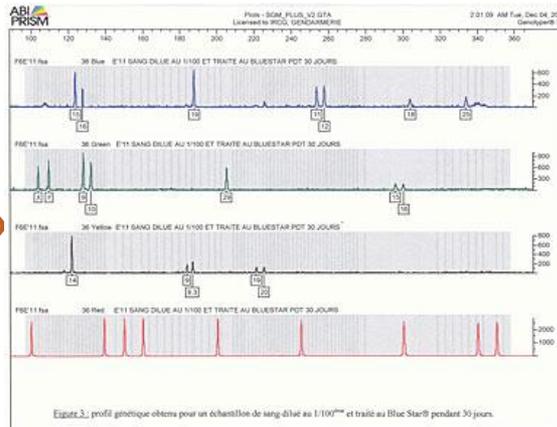
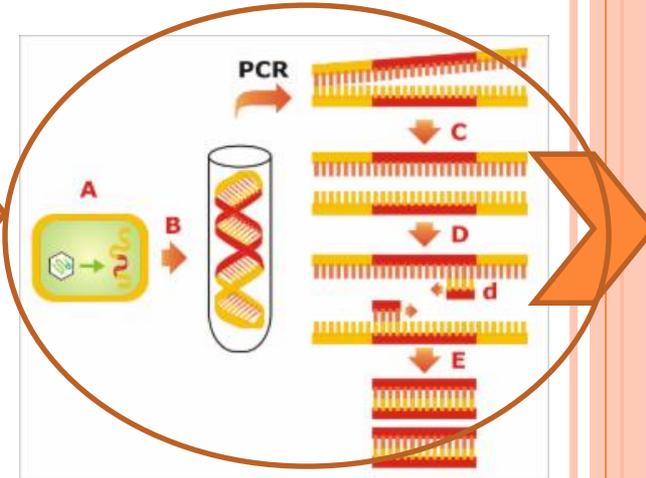
**Cuadro 3:** Comparación de metodologías en base al porcentaje de eficiencia en la visualización de alelos, a la cantidad de marcadores con evidencia de ADN degradado y al rango de altura de los picos.

	PORCENTAJE DE EFICIENCIA EN LA VISUALIZACIÓN DE ALELOS (%)			PORCENTAJE DE MARCADORES CON EVIDENCIA DE ADN DEGRADADO			ALTURA DE PICOS (UA)		
	EXTRA CTOS 1	EXTRA CTOS 2	EXTRA CTOS 3	EXTRA CTOS 1	EXTRA CTOS 2	EXTRA CTOS 3	EXTRA CTOS 1	EXTRA CTOS 2	EXTRA CTOS 3
M1	100,00	100,00	100,00	0/16 0,00%	0/16 0,00%	0/16 0,00%	1000- 6000	1000- 6000	1000- 6000
M2	62,50	93,75	100,00	3/10 30,00%	2/15 13,33%	1/16 6,25%	100- 600	100- 1500	200- 2000
M3	56,25	93,75	100,00	3/9 33,33%	3/15 20,00%	0/16 0,00%	100- 600	100- 1000	200- 2000
M4	100,00	100,00	50,00	0/16 0,00%	0/16 0,00%	0/8 0,00%	100- 1500	400- 4000	100- 1500
M5	100,00	100,00	56,25	0/16 0,00%	0/16 0,00%	0/9 0,00%	800- 6000	300- 6000	200- 3000
M6	87,50	62,50	81,25	3/14 21,43%	0/10 0,00%	0/13 0,00%	100- 1000	300- 4000	500- 4000
M7	56,25	100,00	62,50	3/9 33,33%	4/16 25,00%	6/10 60,00%	50-600	100- 2000	100- 900
M8	62,50	87,50	87,50	2/10 20,00%	2/14 14,29%	1/14 7,14%	100- 400	50-300	100- 400
M9	81,25	100,00	100,00	2/13 15,38%	0/16 0,00%	0/16 0,00%	100- 400	300- 4000	300- 4000
M10	75,00	87,50	100,00	3/12 25,00%	0/14 0,00%	0/16 0,00%	100- 300	100- 800	200- 2000
Rango	56%- 100%	62%- 100%	50- 100%	0%- 34%	0%- 25%	0%- 60%	50-6000	50-6000	100- 6000
X	78,125 %	92,5%	83,75%	17,85%	7,26%	7,34%	255- 1740	280- 2960	290- 2580
Mo da	100%	100%	100%	0%	0%	0%	100-600	100- 4000	200- 2000



# RECORDATORIO: ETAPAS DEL ANÁLISIS DE ADN

## Toma de Muestra



### Paternity Screening Report

Relationship: Child  
Alleged Father: Race: Caucasian

#### DNA ANALYSIS RESULTS: Allele and number of repeats

Alleles	Child	Alleged Father	Paternity Index
D3S1358	15	15, 17	1.972
THO1	9, 3	9, 3	3.439
D21S11	27, 29	29, 32, 2	1.221
D18S51	14, 18	16, 18	3.230
Penta E	13, 14	5, 13	2.336
D5S818	11, 12	11, 13	0.653
D13S317	8, 15	8, 11	2.053
D7S820	9, 12	10, 12	1.694
D16S539	12, 13	9, 12	0.827
CSF1PO	11	11, 12	1.572
Penta D	9, 11	11, 12	1.712
vWA	14, 15	14, 17	3.008
D8S1179	10, 16	12, 16	9.191
TPOX	10, 11	9, 10	5.814
FGA	21, 24	24	3.636
Amelogenin	XY	XY	

Combined Paternity Index: 184,619 to 1  
Probability of Paternity: 99.999458%

Conclusion:  
The alleged father cannot be excluded as the biological father of the child since they share genetic markers. Based on the results obtained from the analysis of the alleles, D3S1358, THO1, D21S11, D18S51, Penta E, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, Penta D, vWA, D8S1179, TPOX, FGA and Amelogenin, the probability of paternity is 99.999458% (prior probability = 0.5) as compared to an untested, unrelated man of the Caucasian population.

## Análisis en el secuenciador

## Obtención del perfil genético

## Informe

# AMPLIFICACIÓN POR PCR: DIFERENCIAS SEGÚN EL TIPO DE MUESTRA

**INICIO:** 94-96 °C. Esto sólo es necesario para ADN polimerasas que requieran activación por calor.

**DESNATURALIZACIÓN:** Se separan las dos cadenas de ADN (94-95 °C).

**ALINEAMIENTO O UNIÓN DEL CEBADOR:** El cebador se unirá a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para ello es necesario bajar la temperatura a 40-68 °C durante 20-40 segundos (según el caso), permitiendo así el alineamiento.

**EXTENSIÓN O ELONGACIÓN DE LA CADENA:** La polimerasa toma el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria, añadiendo los dNTP complementarios en dirección 5' → 3', uniendo el grupo 5'-fosfato de los dNTP con el grupo 3'-hidroxilo del final de la hebra de ADN creciente (la cual se extiende). La Taq polimerasa presenta máxima actividad a los 75-80 °C (comúnmente 72 °C).

**ELONGACIÓN FINAL:** 70-74 °C durante 5-15 minutos tras el último ciclo de PCR. Con ella se asegura que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente ampliado.

**CONSERVACIÓN:** Este paso que se lleva a cabo a 4-15 °C durante un tiempo indefinido para conservar la reacción a corto plazo.



# AMPLIFICACIÓN POR PCR: DIFERENCIAS SEGÚN EL TIPO DE MUESTRA

**EN MUESTRAS CON POCO ADN (PELOS, HISOPADOS DE ELEMENTOS, MATERIAL CADAVÉRICO):**

- SE AUMENTA EL NÚMERO DE CICLOS DE PCR
- ES POSIBLE QUE LAS MUESTRAS MÁS EXPUESTAS A LA DEGRADACIÓN (MATERIAL CADAVÉRICO O HISOPADOS DE LOS ELEMENTOS EN LA ESCENA DEL CRIMEN) CONTENGAN INTERFERENTES.

EN ESTOS CASOS SE PUEDEN REALIZAR DILUCIONES A PARTIR DEL EXTRACTO (YA QUE, SI BIEN DISMINUYE LA CONCENTRACIÓN DE ADN, TAMBIÉN LO HACE EL INTERFERENTE Y, AL HACER LA AMPLIFICACIÓN POR PCR, LA CANTIDAD DE ADN AUMENTARÁ Y EL INTERFERENTE DEJARÁ DE VISUALIZARSE EN EL ELECTROFEROGRAMA).

**EN MUESTRAS CON MUCHO ADN (HISOPADOS BUCALES, SANGRE EN PAPEL):**

- SE PUEDE SOLUCIONAR REALIZANDO DILUCIONES A PARTIR DEL AMPLIFICADO



# ANÁLISIS EN EL SECUENCIADOR



AMPLIFICADO



FORMAMIDA:  
DESNATURALIZAR (TENER  
FRAGMENTOS EN  
CADENA SIMPLE)



STD INTERNO (NARANJA): INDICA EL PESO MOLECULAR, QUE SE ASOCIA CON UNA DETERMINADA CANTIDAD DE BASES (INDICADO POR EL FABRICANTE DEL STD INTERNO)

LADDER



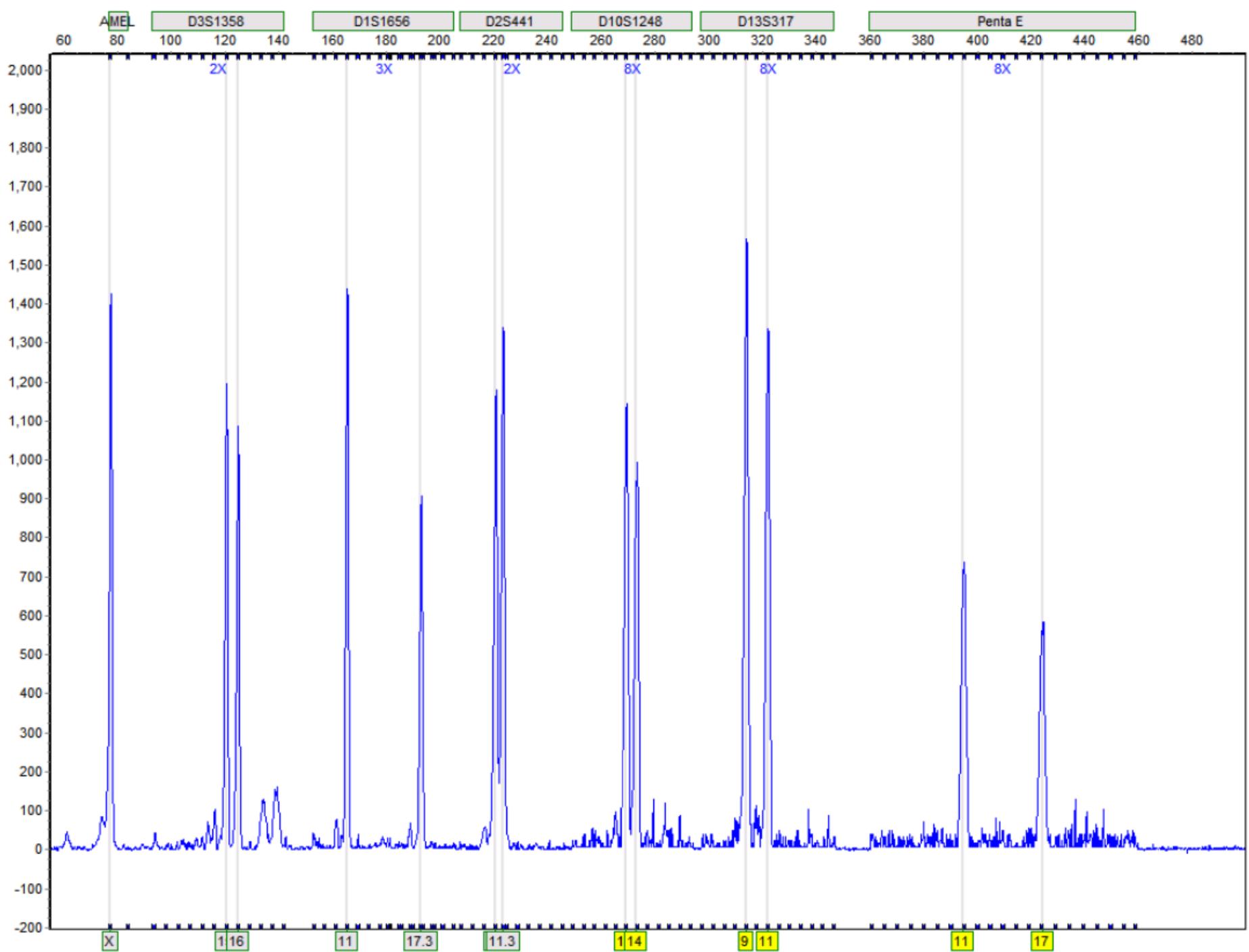
FORMAMIDA:  
DESNATURALIZAR (TENER  
FRAGMENTOS EN  
CADENA SIMPLE)

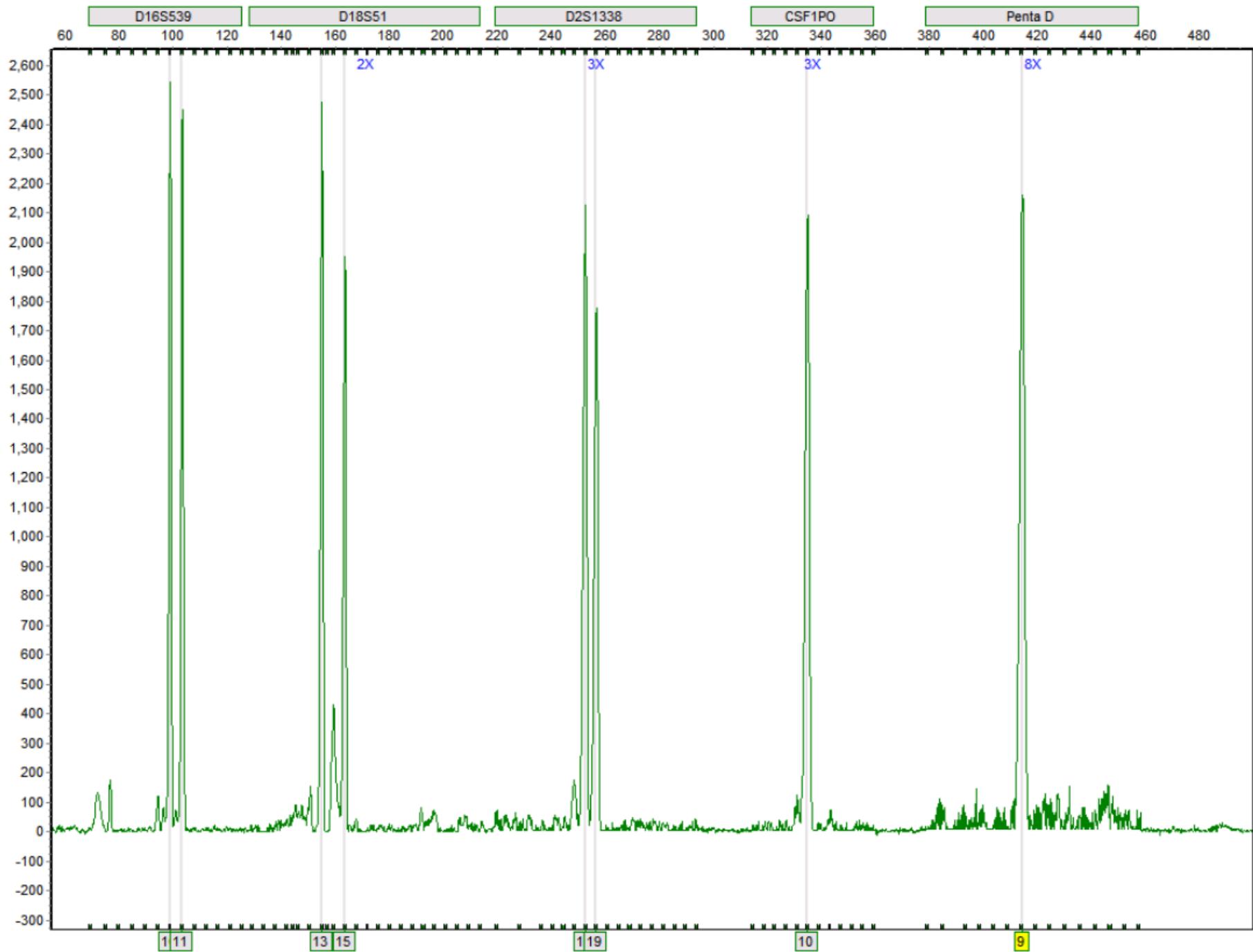


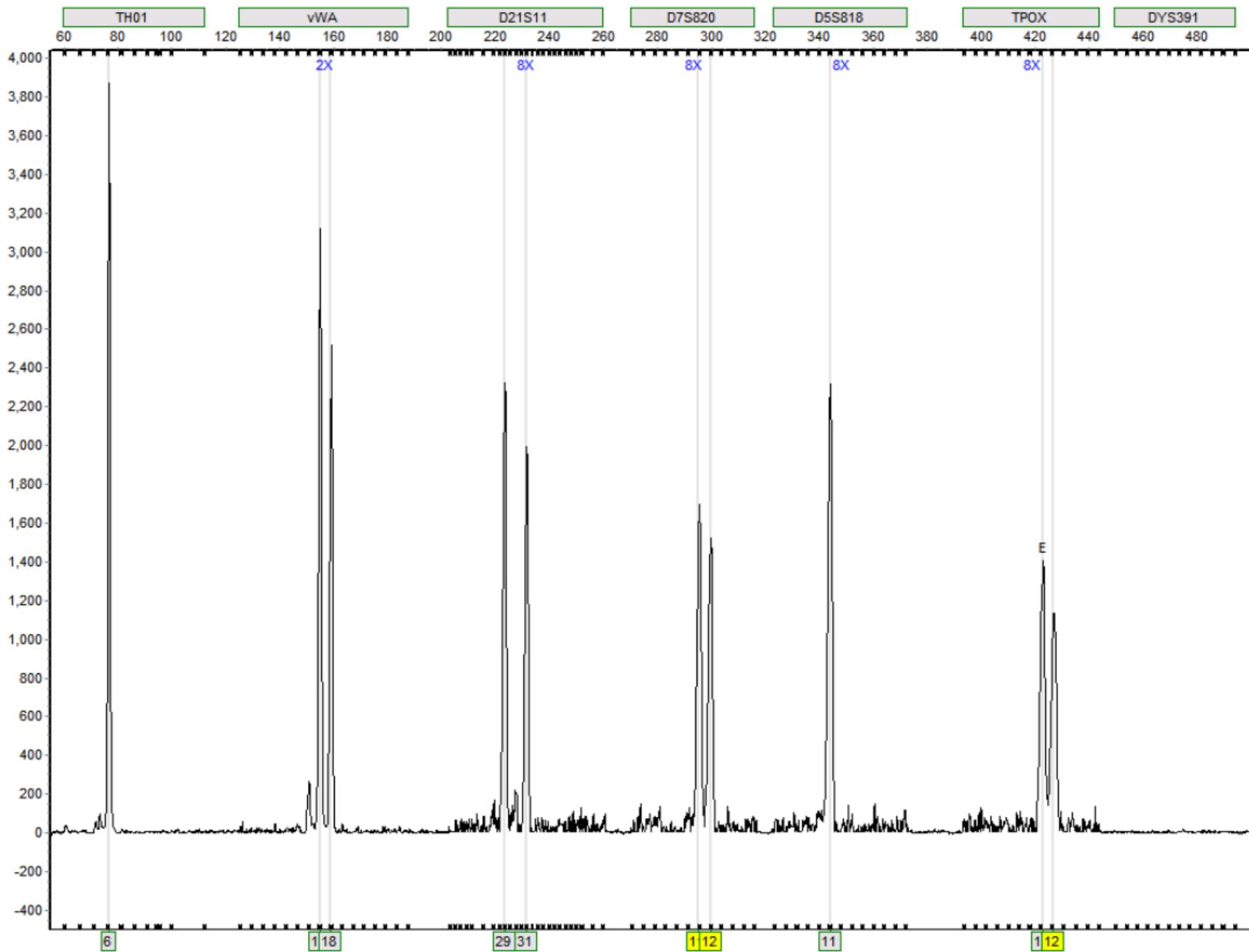
STD INTERNO (NARANJA)

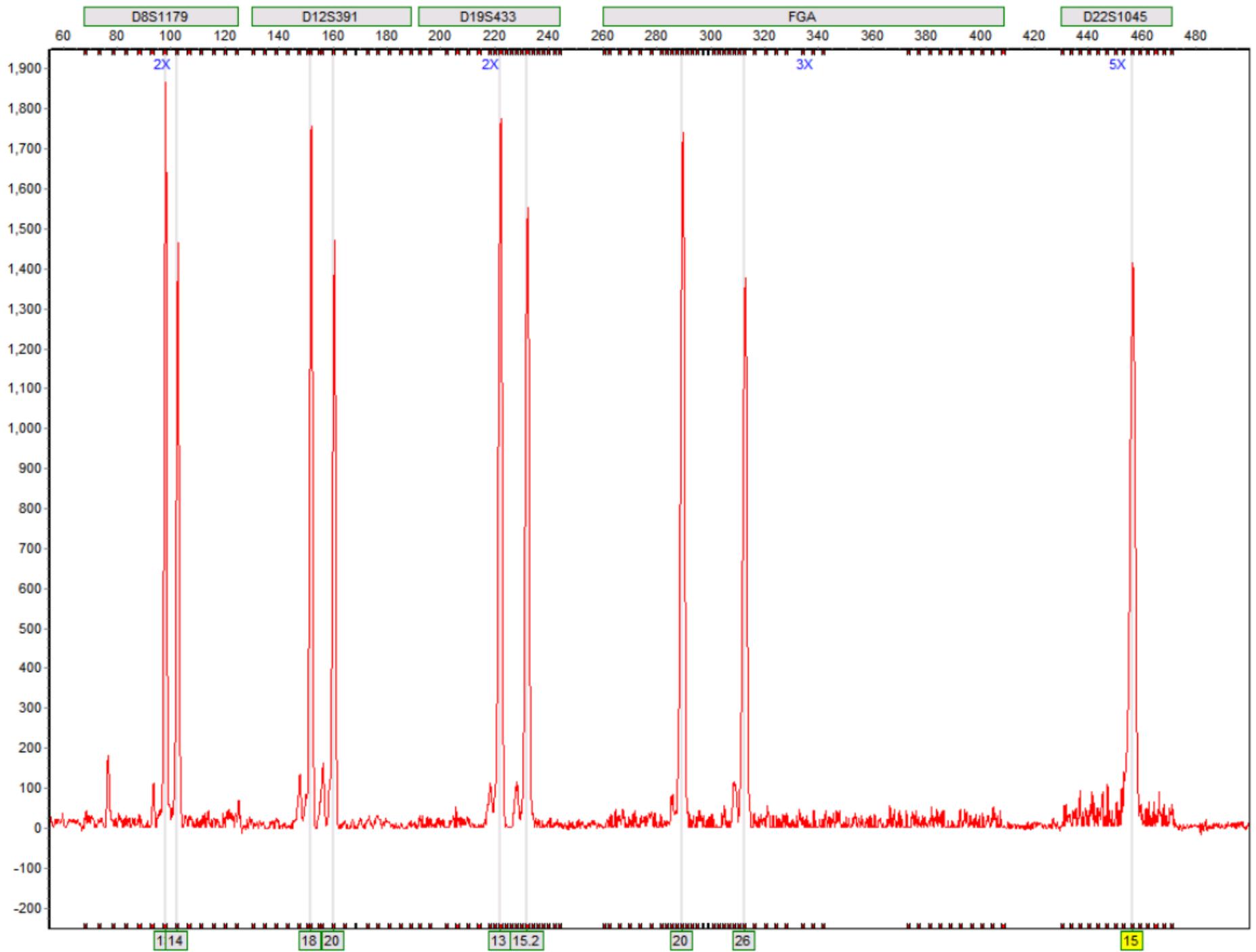


PERMITE RELACIONAR EL COLOR Y LA CANTIDAD DE BASES CON UN ALELO (NÚMERO DE VECES QUE SE REPITE UN FRAGMENTO DETERMINADO)









¡MUCHAS GRACIAS!

abpenacino@gmail.com

