

INVESTIGACIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN
DE RESTOS ÓSEOS

PERFIL DE ADN

Solicitud: **EQUIPO ARGENTINO DE ANTROPOLOGÍA FORENSE**
(EAAF)

Estudio# **220645**

Fecha: 4 de Mayo de 2010

FORMULARIO DE ADMISIÓN PARA INVESTIGACIÓN DE PERFILES DE ADN

CODIGO:	220645
Observaciones	La muestra ósea 220645 fue procesada por el laboratorio The Bode Technology Group ("Bode"), USA. Se utilizará la información que surge de los perfiles genéticos obtenidos por dicho laboratorio para la comparación con las muestras de referencia.

CODIGO:	300542
Supuesto parentesco con 220645	HERMANO
Muestra perteneciente a	Eric DOMERGUE
Observaciones	La muestra de referencia 300542 fue procesada por el laboratorio The Bode Technology Group ("Bode"), USA. Se utilizará la información que surge de los perfiles genéticos obtenidos por dicho laboratorio para la comparación con la muestra ósea.

CODIGO:	303002
Supuesto parentesco con 220645	MADRE
Muestra perteneciente a	Odile DOMERGUE
Material biológico	Discos de papel absorbente con manchas de sangre de 4x4 mm
Provisos por	EAAF
Observaciones	Muestra procesada en el laboratorio LIDMO-EAAF

CODIGO:	303004
Supuesto parentesco con 220645	PADRE
Muestra perteneciente a	Jean DOMERGUE
Material biológico	Discos de papel absorbente con manchas de sangre de 4x4 mm
Provisos por	EAAF
Observaciones	Muestra procesada en el laboratorio LIDMO-EAAF

INTRODUCCIÓN:

EL ADN codifica para las características genéticas de un individuo. El almacenamiento de la información codificada en el ADN se encuentra en los cromosomas. Existen 22 pares de cromosomas homólogos autosómicos y un par de cromosomas sexuales (X e Y).

La herencia genética de un individuo se compone por el ADN paterno y materno, recibiendo la mitad de información por parte de cada progenitor, de este modo las secuencias de ADN en un individuo permiten investigar vínculos de parentesco biológico entre diferentes miembros de un grupo familiar.

El ADN nuclear tiene la característica de estar presente en el núcleo de todas las células de organismo, y es idéntico en todos los tejidos de un mismo individuo, de modo que es posible analizar e identificar las secuencias de ADN en diferentes tejidos y fluidos biológicos. Asimismo, existe otro tipo de ADN que se encuentra fuera del núcleo, pero dentro de las mitocondrias, denominado ADN mitocondrial que se hereda solo por vía materna.

Existen determinadas secuencias en el ADN de gran variabilidad (hipervariables) que varían entre diferentes individuos de una población. Dentro de éstas, se encuentran diferentes categorías de ADN variable, entre ellas los denominados polimorfismos de longitud, ya que dichos segmentos son más cortos o más largos dependiendo de la variante que posee cada individuo. El estudio de múltiples de estos segmentos permite construir lo que se denomina perfil de ADN, o perfil genético, el cual es casi único y distintivo para cada individuo. Esto ha permitido utilizar estos sistemas genéticos como una herramienta de enorme utilidad en análisis de parentesco biológico así como en genética forense identificando restos biológicos de un individuo con una precisión nunca antes descrita.

Dentro de los polimorfismos de longitud, existen secuencias cortas (microsatélites) denominados STR y que han ganado la máxima popularidad en el ambiente médico-legal por su poder de reproductividad, así como por permitir obtener perfiles de ADN en muestras diminutas y/o degradadas. Los sistemas STR (short tandem repeats) poseen variables en tamaño que se denominan alelos y se analizan amplificando el sistema STR que se desea analizar, mediante la técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction). Últimamente, se han desarrollado metodologías llamadas miniSTR que permiten amplificar tamaños menores de fragmentos para los sistemas STR convencionales, lo cual permite amplificar más eficazmente ADN parcialmente degradado, común en restos óseos de años de antigüedad. La sumatoria de alelos obtenidos en diferentes sistemas analizados de un individuo produce el perfil genético o de ADN.

Disponemos de los siguientes sistemas STR autonómicos, además de Amelogenina para la determinación del sexo:

CSF1PO	D16S539	D5S818	F13A01	LPL
Penta E	D21S11	D7S820	F13B	TH01
D13S317	D3S1358	D8S1179	FGA	TPOX
vWA	FESFPS	D18S51	D2S1338	D19S433
Penta D	Amelogenina			

Polimorfismo del Cromosoma Y

Además de los 22 pares de cromosomas autosómicos, la dotación cromosómica humana incluye una pareja de cromosomas sexuales. Los individuos femeninos están dotados de un par de cromosomas X (XX), y los individuos masculinos por un cromosoma X y otro Y (XY). Como los demás cromosomas, los sexuales proceden de los progenitores: en el caso de una mujer un cromosoma X procede de la madre y el otro del padre; en el caso de un varón, el cromosoma X procede de la madre y el cromosoma Y (CrY) siempre procede del padre. Por tal motivo la herencia del CrY se caracteriza por:

El padre transmite el cromosoma Y a sus hijos varones y así sucede a lo largo de toda la línea paterna, por lo que todos los varones emparentados por línea paterna poseen el mismo cromosoma Y.

De la misma manera que para los autosomas, existen sistemas STR localizados en el CrY que se pueden amplificar mediante PCR.

En la meiosis la mayor parte del CrY no recombina con el cromosoma X, por lo que no se produce el intercambio de información genética típica en este proceso, de modo que los marcadores situados en esta zona no recombinante se heredan en forma de haplotipos (en grupo).

A continuación se detallan los sistemas STR del cromosoma Y disponibles para el análisis:

DYS448	DYS389I	DYS389II	DYS390	DYS19
DYS385a/b	DYS391	DYS392	DYS393	DYS437
DYS438	DYS439	DYS456	DYS458	DYS635
GATAH4				

ADN mitocondrial:

A diferencia con los sistemas residentes en el ADN nuclear, el ADN mitocondrial que se localiza dentro de la mitocondria -una organela subcelular que se encuentra en el citoplasma de la célula-, puede aportar entre 2000 y 10000 copias por célula. Esta característica del ADNmt permite la posibilidad de que algunas copias permanezcan intactas aún en muestras antiguas o severamente degradadas. Existe una región de aproximadamente 1100 pares de bases (pb) en la región de control (D-loop) en la que se encuentran dos regiones hipervariables, HVR1 (16024-16365 bp) y HVR2 (73-340bp), en las que residen la mayor parte de las variaciones entre individuos y por este motivo esta zona tiene interés forense. No obstante, dado que el poder de discriminación del ADNmt es muy inferior al que se obtiene al analizar sistemas STR nucleares, el estudio ADNmt se realiza solamente cuando ha fallado la analítica del ADN nuclear. Asimismo, el ADNmt se hereda exclusivamente por vía materna, es decir que todos los individuos relacionados biológicamente por vía materna, compartirán las mismas secuencias de ADNmt.

CALCULOS ESTADISTICOS PARA ANALIZAR EL VÍNCULO BIOLÓGICO

Los perfiles genéticos hallados en los restos óseos se comparan con los del supuesto familiar y se ensayan dos hipótesis alternativas y excluyentes:

H1: Los restos óseos pertenecen a (persona desaparecida)

H2: Los restos óseos NO pertenecen a (persona desaparecida)

A tal fin se calculan las siguientes probabilidades:

X: Probabilidad de los perfiles hallados en las muestras estudiadas bajo la hipótesis H1.

Y: Probabilidad de los perfiles hallados en las muestras estudiadas bajo la hipótesis H2.

Con estos valores se calcula una razón de verosimilitud (RV) o Índice de Parentesco (IP=X/Y)

IP (RV)= $\frac{H1}{H2}$ = $\frac{\text{Los restos analizados pertenecen a (persona desaparecida)}}{\text{Los restos analizados NO pertenecen a (persona desaparecida)}}$

Del Índice de Parentesco deriva el valor de Probabilidad de Parentesco (PP) de acuerdo a la fórmula:

$$PP = [IP / IP + 1] \times 100$$

Para realizar los cálculos estadísticos necesarios se toman las frecuencias alélicas y mutacionales obtenidas en LIDMO tipificando 640 individuos provenientes de la región central de Argentina.

Los cálculos estadísticos se realizan siguiendo los procedimientos de Evett y Weir en *"Interpreting DNA evidence, Statistical Genetic for Forensic Scientists"*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Los cálculos estadísticos fueron realizados con software Familias 1.5, desarrollado por Petter Mostad and Thore Egeland del Norwegian Computing Center, y Bjørnar Olaisen, Margurethe Stenersen, Bente Mevåg del Institute of Forensic Medicine, Oslo, Noruega.

Los valores probabilísticos que se realizan en ADN mitocondrial son diferentes a los realizados con sistemas STR del ADN nuclear. En caso de que se encuentre una coincidencia entre las secuencias comparadas (restos y familiar alegado), y a los efectos de dar información de la probabilidad de match por azar de la secuencia hallada en la población general, se utiliza la fórmula $(x+1/n+2)$ donde X es el número de veces que aparece el haplotipo hallado y n es el tamaño de la base de datos utilizada. De este modo, se provee una estima de la probabilidad de match por azar del haplotipo mitocondrial hallado en las muestras analizadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Armed Forces DNA Identification Laboratory, "Effect of Ultraviolet Irradiation on DNA Contamination and PCR Amplification Efficiency," Validation Folder, 1996.
2. Anderson S, Baker AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperin IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Scheier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290: 457-465
3. Balding DJ, Nichols RA (1994) DNA profile match probability calculation: how to allow for population stratification, relatedness, database selection and single bands. *Forensic Sci Int* 64:125-140.
4. Balding DJ, (1995) Estimating products in forensic identification using DNA profiles. *J. Am. Stat. Assoc.* 90:839-844.
5. Barros F, Lareu MV y Carracedo A (1992) Detection of polymorphisms of human DNA after PCR by miniaturized SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Forensic Science International*, 55:27-36.
6. Fisher, D.L., Holland, M. M., Mitchell, L., Sledzik, P.S., Wilcox, A.W., Wadhams, M., and Weedn, V.W., "Extraction, Evaluation, and Amplification of DNA from Decalcified and Undecalcified United States Civil War Bone." *Journal of Forensic Sciences*, JFSCA, Vol. 38, No. 1, January 1993, pp. 60-68.
7. Hagelberg, E. and Clegg, J., "Isolation and Characterization of DNA from Archaeological Bone," *Proc. of Roy. Soc. Of London*, 224, 45, 199 1.
8. Hochmeister, M.N., Budowle, B., Borer, U.V., Eggmann, U., Comey, C.T., and Dimhofer, R., "Typing of Deoxyribonucleic Acid (DNA) Extracted from Compact Bone from Human Remains," *Journal of Forensic Sciences*, JFSCA, Vol. 36, No. 6, December 199 1, pp. 1649-1661.
9. Holland M and Parson TJ. Mitochondrial DNA sequence analysis – Validation and use for forensic casework. *Forensic Science Review*, 11 (1), 1999.
10. Holland, M.M., Fisher, D.L., Mitchell, L.G., Rodriguez, W.C., Canik, J.J., Merrill, C.R., and Weedn, V.W., "Mitochondrial DNA Sequence Analysis of Human Skeletal Remains: Identification of Remains from the Vietnam War," *Journal of Forensic Sciences*, JFSCA, Vol.38, No. 3, May 1993, pp. 542-553.
11. Hopgood R, Sullivan KM, Gill P (1992): Strategies for automated Sequencing of Human Mitochondrial DNA directly from PCR products. *Biotechniques* 14(1): 82-92.
12. Ian Ewert and Bruce Weir. *Interpreting DNA evidence. Statistical Genetics for Forensic Scientists - Sinauer Associates , Inc , Sunderland, Massachussets (1998) – ISBN 0-87893-155-4.*
13. Lee, H. C., Pagliaro, E. M., Berka, K. M., Folk, N. L., Anderson, D. T., Ruano, G., Keith, T. P., Phipps, P., Herrin, G. L., Gamer, D. D., and Gaensslen, R. E., "Genetic Markers in Human Bone: 1. Deoxyribonucleic Acid (DNA) Analysis," *Journal of Forensic Sciences*, JFSCA, Vol.36, No. 2, March 1991, pp. 320-330.
14. Smith, B.C., Fisher, D.L., Weedn, V.W., Wamock, G.R., Holland, M.M., "A Systematic Approach to the Sampling of Dental DNA," *Journal of Forensic Sciences*, JFSCA, Vol. 38, No.5, September 1993, pp. 1194-1209.
15. Sullivan KM, Hopgood R y Gill P (1992) Identification of human remains by amplification and automated sequencing of mitochondrial DNA. *International Journal of Legal Medicine* 105:83-86.
16. Wilson M, Stonekin M, Holland M, Dizino J, publicado en "Guidelines for the mitochondrial DNA sequencing in forensic"- *Crime Laboratory Digest*, 1993, vol 20, #4, pp 68-77.
17. Wilson MR, DiZinno JA, Polanskey D, Reploge J, Budowle B.(1995): Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. *International Journal of Legal Medicine*, 108:68-74.
18. *Forensic DNA Typing - John M Butler (Ed)- Academic Press (2000)- ISBN 0-12-147951-X.*
19. *La Prueba del ADN en Medicina Forense - B Martinez Jarreta (Ed) – Masson SA Editorial (1999) – ISBN 84-458-0816-8.*
20. Butler, J.M., Shen, Y., McCord, B.R. (2003) The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *J. Forensic Sci* 48(5) 1054-1064.
21. Chung, D.T., Drabek, J., Opel, K.L., Butler, J.M., McCord, B.R. (2004) A study on the effects of degradation and template concentration on the efficiency of the STR miniplex primer sets. *J. Forensic Sci.* 49(4): 733-740.
22. Drabek, J., Chung, D.T., Butler, J.M., McCord, B.R. (2004) Concordance study between miniplex STR assays and a commercial STR typing kit, *J. Forensic Sci.* 49(4): 859-860.
23. Coble, M.D. and Butler, J.M. (2005) Characterization of new miniSTR loci to aid analysis of degraded DNA. *J. Forensic Sci.* 50(1):43-53.
24. Tully G, Bar W, Brinkmann B, Carracedo A, Gill P, Morling N, Parson W and Schneider P. *Forensic Sci Int* 124 (2001); 83-91. Considerations by the European DNA profiling (EDNAP) group on the working practices, nomenclature and interpretation of mitochondrial DNA profiles.
25. Walther Parson et al. *Forensic Science International* 139 (2004) 215–226. The EDNAP mitochondrial DNA population database (EMPOP) collaborative exercises: organisation, results and perspectives.
26. Buckleton J, Triggs C, Walsh S. 2005. *Forensic DNA evidence interpretation. Chapter 8: Low copy number* (Buckleton J, Gill P)
27. Buckleton J, Triggs C. 2006. Dealing with allelic dropout when reporting the evidential value in DNA relatedness analysis. *Forensic Science International* 160: 134–139.

MATERIALES y MÉTODOS

Extracción de ADN de muestras de sangre

A las muestras de sangre de referencia provistas de los supuestos familiares consanguíneos a comparar, se les realizaron los protocolos estándar de purificación de ADN mediante digestión con Proteinasa K y SDS, extracción con PCI y filtración con Microcon 100 a partir de manchas sobre papel o hisopados bucales.

Amplificación mediante PCR de sistemas STR autosómicos y/o CrY

El ADN extraído se ensayó para la amplificación mediante PCR de algunos de los sistemas STR autosómicos citados en *Introducción* y Amelogenina mediante los kits comerciales COfiler, Profiler Plus e Identifiler (Applied Biosystems) y Powerplex16 (Promega Corp) utilizando un ciclador térmico MJ Research PTC100. Asimismo, sistemas STR localizados en el CrY pueden ser amplificados con el kit PowerplexY (Promega Corp) y/o el kit Y-Filer (Applied Biosystems). Asimismo se ensayaron sistemas mini-STR para los sistemas D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D18S51, FGA, PentaD, PentaE y Amelogenina.

Los productos amplificados fueron analizados mediante electroforesis capilar utilizando un secuenciador automático para análisis de fragmentos de ADN '*ABI Prism 3130 Genetic Analyzer*', (Perkin-Elmer Applied Biosystems). Los resultados fueron analizados mediante software Genemapper v3.2 (Applied Biosystems).

Recepción de información genética:

En el marco de la Iniciativa Latinoamericana para la identificación de desaparecidos (ILID) realizada durante los años 2008 y 2009, el laboratorio The Bode Technology Group (Bode) recibió por parte del EAAF aproximadamente 600 muestras óseas y más de 5000 muestras de sangre de familiares reclamantes. El laboratorio LIDMO-EAAF participó activamente en el control de calidad de los resultados obtenidos por Bode mediante el análisis de datos crudos utilizando el software GeneMapper así como también controlando electroferogramas y perfiles genéticos informados por Bode. Con la información genética obtenida se generó una base de datos de gran utilidad para la comparación de muestras para el proyecto ILID. Asimismo el laboratorio LIDMO-EAAF agregó a esa base de datos perfiles genéticos de otras 500 muestras de sangre procesadas desde el año 2003. A partir de marzo de 2009 LIDMO-EAAF puede comparar perfiles genéticos obtenidos de muestras óseas y sanguíneas, procesadas tanto dentro del proyecto ILID como en el laboratorio LIDMO-EAAF.

OBJETIVOS:

Se trata de determinar si los restos óseos codificados como **220645** pertenecen a un hijo biológico de Odile Domergue y de Jean Domergue, y a su vez hermano completo de Eric Domergue. A tal fin se analizan muestras indubitadas de sangre de Odile Domergue (**303002**), Jean Domergue (**303004**) y Eric Domergue (**300542**)

Se ensayan las hipótesis:

H1= Los restos analizados pertenecen a un hijo biológico de 303002 y de 303004, y hermano completo de 300542.

H2= Los restos analizados pertenecen a una persona desconocida.

Se calcula la Razón de Verosimilitud (RV) de acuerdo a:

RV= $\frac{\text{probabilidad de los perfiles de ADN bajo la hipótesis H1}}{\text{probabilidad de los perfiles de ADN bajo la hipótesis H2}}$

RESULTADOS PARA ADN NUCLEAR

Tabla1: PERFILES STR

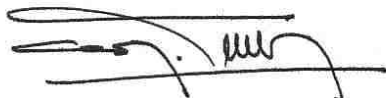
SISTEMA	220645	300542	303002	303004
D8S1179	13/14	14/16	14	13/16
D21S11	32/32.2	30/32.2	30/32.2	32/32.2
D7S820	7/11	11/12	7/12	11
CSF1PO	11	11	10/11	10/11
D3S1358	17/18	17/18	16/18	17/18
TH01	6/8	7/8	7/8	6/8
D13S317	11/13	11/13	9/13	11/12
D16S539	12	12	12	12/13
D2S1338	20/24	20/24	16/24	20/24
D19S433	13	13	13/14	13
VWA	16/17	17/19	16/17	17/19
TPOX	9/10	8/9	8/10	8/9
D18S51	12/14	14/18	12/18	14/17
D5S818	11	11	11/12	11
FGA	19	19/20	19/20	19/26
Amelogenina	XY	XY	X	XY

1. Alelos medidos en número de repeticiones.
2. Frecuencias STR: Frecuencias locales generadas a partir de 640 individuos no emparentados de La Región Central de Argentina. (A.Borosky, L. Catelli and C. Vullo, Analysis of 17 STR loci in different provinces of Argentina, Forensic Science International: Genetics- 3 (2009) e93–e9).

CONCLUSIONES:

Sistemas STR:

1. En la tabla 1 de resultados se muestran los perfiles genéticos obtenidos en las muestras 220645, 300542, 303002 y 303004.
2. El resultado obtenido en el marcador Amelogenina indica que los restos 220645 pertenecen a una persona de sexo masculino por presentar un perfil XY.
3. Se ensayó la hipótesis de que la muestra 220645 pertenezca a un hijo biológico de Odile Domergue (303002) y de Jean Domergue (303004), y a su vez hermano completo de Eric Domergue (300542).
4. En todos los sistemas analizados los alelos hallados no permiten excluir el vínculo biológico entre 220645, 300542, 303002 y 303004 bajo la hipótesis de parentesco ensayada en el punto anterior.
5. La razón de verosimilitud (RV) o Índice de parentesco (IP) obtenido mediante el análisis de sistemas STR es de 220.253.035.383.352, indicando que los perfiles genéticos son 220.253.035.383.352 veces contra 1 más probables si los restos analizados (220645) pertenecen a un hijo de 303002 y de 303004 y a su vez hermano completo de 300542, que a una persona de la población al azar.
6. Asumiendo una chance “a priori” de 1/71 indicada por el EAAF, la probabilidad de que la muestra 220645 pertenezca a un hijo biológico de Odile Domergue (303002) y de Jean Domergue (303004), y a su vez hermano completo de Eric Domergue (300542) es de 99,99999999997%.



Carlos María Vullo
Doctor en Ciencias Químicas, UNC
Bioquímico, MP 1311
LIDMO-EAAF