

ANÁLISIS FILIATORIOS de ADN CON PADRE AUSENTE, ALCANCES Y LIMITACIONES.

Gómez MA¹; Pena, MA²; Beltramo, J³; Carini, GM⁴; Lojo MM⁵.

Laboratorio de Análisis comparativo de ADN de Asesoría Pericial La Plata. SCJBA.

Introducción

El análisis comparativo de ADN permite aportar una fuerte evidencia en las causas de filiación. El estudio se realiza por comparación de perfiles genéticos obtenidos estudiando distintos microsátélites, que son secuencias hipervariables, por lo que aportan un alto poder de discriminación.

Los perfiles se comparan teniendo en cuenta las compatibilidades que se esperan de acuerdo a las leyes de la herencia. Este estudio no permite distinguir entre las variantes que son iguales por descendencia de las que coinciden por azar. Por lo tanto, para definir el valor probatorio de la evidencia es necesario estimar la probabilidad de las coincidencias observadas en los perfiles que se comparan, bajo dos hipótesis diferentes: Existe el vínculo alegado (probabilidad según Leyes de Mendel) ó no existe el vínculo alegado (probabilidad según las frecuencias poblacionales de las variantes compatibles) [1- 3]. A la relación entre estas dos probabilidades se la conoce como índice de parentesco [4]. Cuanto mayor sea este valor, mayor será el peso de la evidencia de ADN. En cada caso particular, el valor del índice está condicionado, no sólo por el número de secuencias analizadas, sino también por la frecuencia de las variantes puestas en juego [5].

El análisis de ADN en el marco de causas de filiación con padre ausente (generalmente filiaciones post- mortem) puede realizarse el análisis a través de familiares directos del padre alegado y las compatibilidades esperadas dependen del vínculo biológico que exista entre ellos [5].

1 Perito II; 2 Perito I; 3 y 4 Tecnico; 5 Jefe de Servicio. Laboratorio de Análisis Comparativo de ADN de Asesoría Pericial La Plata. SCJBA.

En la figura 1 se presenta a modo de ilustración un pedigrí teórico donde se marcan los

posibles genotipos de los consanguíneos directos del padre alegado. Cuando se cuenta con los dos abuelos paternos alegados se puede dar una respuesta sin mayores inconvenientes, ya que los genotipos de ambos progenitores permiten inferir los cuatro genotipos probables para el padre alegado. De este modo no surgen indeterminaciones y se pueden detectar las exclusiones [6].

Sin embargo, no siempre se cuenta con ambos abuelos y se debe recurrir a otros familiares directos. La información aportada puede ser incompleta, por lo que surgen indeterminaciones que le otorgan carácter no excluyente al análisis [5]. Siguiendo el ejemplo de la figura 1, un tío paterno alegado puede compartir con el padre alegado las dos variantes, una (que puede no ser la heredada por el hijo), o ninguna.

El disponer del análisis adicional de marcadores del cromosoma Y (coincide para todos los integrantes del pedigrí de sexo masculino) y del cromosoma X (trasmitido a las hijas mujeres por el padre sin cambios), permite confirmar exclusiones, aún trabajando con grupos familiares muy incompletos.

Cuando a partir del estudio de familiares directos del padre alegado no se alcanzan valores aceptables para el índice de parentesco se debe recurrir a la instancia de exhumación. El objetivo del análisis de restos cadavéricos se centra en obtener un perfil completo a partir de un material de partida de difícil abordaje, en el que la degradación es uno de los principales inconvenientes. A lo largo de estos años se han optimizado los protocolos de extracción de ADN y de análisis posterior, logrando de este modo disminuir en forma considerable el número de casos en los que los resultados se interpretan como inconcluyentes.

En el presente trabajo, analizamos los resultados obtenidos en nuestro laboratorio en los casos de filiaciones post mortem, tomando como referencia los registros electrónicos de realización de pericias y de los resultados obtenidos.

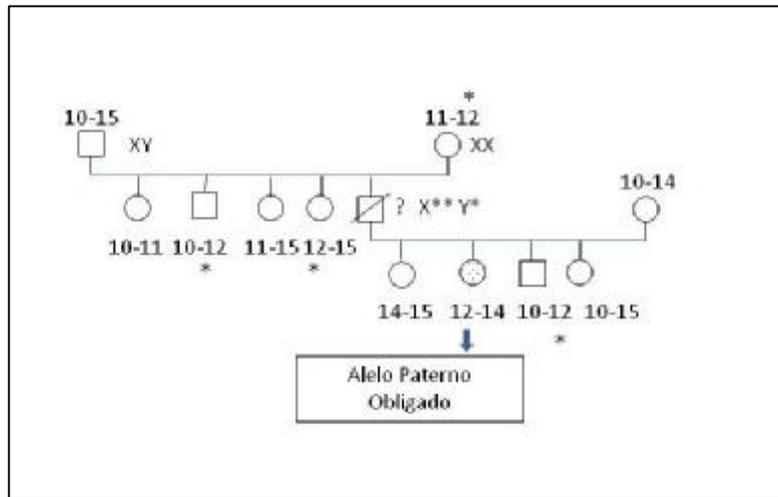


Figura 1: Coincidencia por herencia del alelo paterno en el pedigrí familiar

Materiales y Métodos

Extracción de ADN: Para los estudios con individuos vivos se reciben muestras sanguíneas en soporte FTA classic card (Whatman corp), la extracción de ADN de las muestras se realizó siguiendo los procedimientos estandarizados de nuestro Manual de Laboratorio [7].

En caso de los restos cadavéricos se seleccionaron los protocolos de acuerdo a la muestra a procesar [7]:

Huesos: Se procesaron 2 gr. de hueso descalcificado utilizando el Protocolo DNA IQ™ (Promega).

Piezas Dentarias. Se procesaron las muestras rotas mediante fractura, sin descalcificar, utilizando el Protocolo DNA IQ™ (Promega).

Tejidos: Se procesaron en forma directa según Protocolo de Minikit Qiagen (Columnas).

Una vez finalizado el procesamiento, se realiza la Cuantificación por medio del Ciclador automatico PCR-7500 de Applied Biosystems, de la cual surgen resultados de obtención de ADN. Si el mismo es óptimo, según criterios internos validados y preestablecidos en el laboratorio, la muestra será amplificada.

Resultados y Discusión

En la Tabla 1 se muestran los resultados de un relevamiento de pericias no excluyentes realizadas con un único consanguíneo del padre alegado.

Cosanguíneo	Abuelo		Tío		Hermano		Medio hermano	
	N=55		N=40		N=57		N=40	
Madre	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
IP (% de casos)								
<1	3,6	0,0	22,5	10,0	10,5	10,5	5,0	27,5
1-100	36,4	25,5	35,0	20,0	17,5	10,5	15,0	10,0
1-1000	20,0	7,3	5,0	2,5	17,5	3,5	17,5	5,0
1000-10000	1,8	1,8	5,0	0,0	8,8	1,8	5,0	10,0
>100000	1,8	1,8	0,0	0,0	14,0	5,3	2,5	2,5

Tabla 1: Distribución porcentual para los valores de Índice de Parentesco alcanzados en un relevamiento de casos con un único consanguíneo del padre alegado y 17 marcadores analizados

El valor del índice de parentesco depende en gran medida de la herencia al azar, que no siempre permite identificar el alelo paterno alegado en el consanguíneo usado como referencia (Fig.1). En estas situaciones no es posible excluir el vínculo porque la información con que contamos es incompleta. Aunque no se puede predecir de antemano, tal como surge del análisis de la tabla 1, el análisis puede aportar una evidencia de peso en apoyo de la existencia de vínculo (IP>1000), aún en casos en los que se cuenta con un solo abuelo o un tío (ver Tabla 1). Esto depende no sólo del número de indeterminaciones (fruto de la herencia al azar de marcadores), sino también de la frecuencia que tengan las variantes compatibles en la población general.

La distribución de valores en el caso de los hermanos es muy variable, pero en más del 20% de los casos en los que la madre fue incluida en el análisis se alcanzaron valores aceptables para la prueba.

En la tabla 2 se reproducen algunos ejemplos donde se pone de manifiesto las variables que afectan el valor del índice. En dos grupos constituidos por madre, Hijo y 2 hermanos completos alegados, con 17 marcadores, sólo se detectaron 2 indeterminaciones. Claramente en este caso, las diferencias en los índices pueden atribuirse a la rareza en la población de las variantes compartidas.

El efecto del modo de herencia se puede ver comparando el caso analizado con un único tío (3 indeterminaciones) y el caso con 3 tíos (7 indeterminaciones).

Grupo Humano	IP	Indeterminaciones	Marcadores	Cromosoma Y ¹	Cromosoma X ²
M-H-2Hnos	135.053.253	2	15	Inclusión	
M-H-2Hnos	91272	2	15	Inclusión	NC
M-H-TIO	217	3	17	Inclusión	NC
M-H-2TIO	17.522	6	17	Inclusión	NC
M-H-3TIO	21	7	17	Exclusión	NC
H-2MHNO	**		17		Exclusión
M-H-AA	28	6	17		Exclusión

Tabla 2 Algunos ejemplos de Filiaciones Complejas resueltos con marcadores sexuales

**Los dos mediohermanos muestran las cuatro variantes, ninguna de las cuales coincide con las del hijo alegado

¹ Solo para línea masculina; ² Solo para hijas mujeres.

Otro ejemplo muy ilustrativo lo brinda el caso analizado con dos medio hermanos como referencia, con madre ausente. Para dos marcadores, se logró identificar las cuatro variantes diferentes, que estaban ausentes en el hijo alegado, poniendo en evidencia la no existencia de vínculo. Observación confirmada por el análisis de marcadores sexuales.

El último ejemplo se refiere a un grupo familiar en el que sólo se contaba con la abuela paterna. El análisis del cromosoma X permitió confirmar una exclusión en una pericia que con los marcadores autosómicos resultaba no informativa.

Cuando no fue posible resolver la pericia con familiares vivos del padre alegado se debió recurrir al análisis de restos cadavérico. En nuestro laboratorio se realizaron 67 pericias con restos en el área de filiación durante el período 2011-2013. Se obtuvieron Perfiles completos en 50 casos (74.73%), en 17 (25.37%) no pudo obtenerse ADN de calidad, para la obtención de un perfil, debido a los procesos de degradación que sufren este tipo de muestras.(Tabla 3).

RESULTADOS	N	%
<i>INCLUSION</i>	43	64.18
<i>EXCLUSION</i>	7	10.45
<i>SIN ADN (No informativa)</i>	17	25.37
TOTAL	67	100

Tabla 3: Resultados obtenidos en Filiaciones realizadas con restos cadavéricos

Conclusiones

- Si bien existen alguna excepciones, para resolver las filiaciones complejas resulta muy importante el número de familiares paternos aportados y el grado de vínculo de los mismos con el padre alegado.
- El complemento de los STR s de los cromosomas sexuales X e Y es una herramienta que ha sumado una importante información.
- El valor del LR esta en proporción inversa al numero de *loci* no informativos o indeterminaciones. Pero también influye en gran medida la rareza en la población de las variantes compatibles.
- En el caso de los restos cadavéricos es crucial la conservación de los mismos y el envío de las piezas adecuadas que proveen un mejor rendimiento en la obtención de ADN.

Referencias

1. Pena, M.A., Bozzo, W.R., Ortíz, M.I., Lojo, M.M. Frecuencias alélicas y parámetros estadísticos de interés forense para los 13 loci STR del CODIS en población de la provincia de Buenos Aires. XXXII Congreso Argentino de Genética, XXXVI Congreso Chileno de Genética, IV Jornadas Argentino-Chilenas de Genética. Huerta Grande, Córdoba, 21 al 24 de septiembre de 2003.
2. Bozzo, W.R., Pena, M.A., Ortíz, M.I., Lojo, M.M. Penta E, Penta D, D19S433 y D2S1338: Frecuencias alélicas y parámetros estadísticos de interés forense en población de la provincia de Buenos Aires. XXXII Congreso Argentino de Genética, XXXVI Congreso Chileno de Genética, IV Jornadas Argentino-Chilenas de Genética. Huerta Grande, Córdoba, 21 al 24 de septiembre de 2003.
3. Bozzo, W.R.; Pena, M.A.; Ortíz, M.I.; Lojo, M.M. Genetic data from PowerPlex 16 System and Identifiler kits from Buenos Aires Province (Argentina). *Legal Medicine* 9 (2007) 151-153.
4. Evett I.W., B.S. Weir, *Interpreting DNA Evidence*, Sinauer, Sunderland, MA, 1998.
5. Pena, M.A., Gomez, M.A., Percowz,P., Lojo, M.M. DNA profile evidence in complex disputed paternity cases : The análisis of 300 real cases. *Forensic Science Intenational: Genetics supplement Series*. 441: 1-2 . (2009).

6. Bozzo, W., Pena, M.A., Ortiz, MI, Lojo, MM. Determinación del vínculo biológico a través de abuelos alegados mediante el uso de 15 marcadores STRs. 31 Congreso de la Sociedad Argentina de Genética- La Plata, 17-20 de Septiembre 2002
7. Manual de Laboratorio de la Sección Análisis Comparativo de ADN- Última revisión Noviembre de 2011.
8. Bone Extraction Protocol to be Used with the DNA IQ™ System Promega (pag 1-4)