

CIENCIA RECREATIVA PARA **ENSEÑANZA SECUNDARIA**







Índice de contenidos del Taller

1. Introducción teórica

- 2. Laboratorio virtual
 "DNA Fingerprinting laboratory"
- 3. Laboratorio presencial Química forense



CIENCIA FORENSE

¿Qué es?

La aplicación de prácticas científicas dentro del proceso legal



Conjunto de ciencias que la ley usa para atrapar a un criminal

Genética

Física

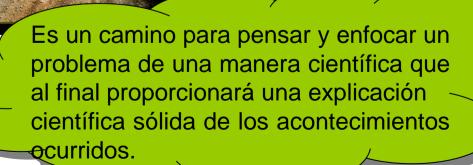
Matemáticas

Química...



CIENCIA FORENSE

La ciencia forense no es simplemente un camino para la determinación de lo que ocurrió en la escena de un crimen.





El trabajo de los investigadores forenses

...recolección de las evidencias, y el proceso de las mismas, hasta la extracción de muestras de ADN, debates extensos, creación de teorías sobre lo ocurrido, comparación de fibras, estrías en una bala...







Tipos de evidencias

FÍSICAS	QUÍMICAS	BIOLÓGICAS
Objetos Plásticos (piezas) Vidrio (piezas) Marcas de huellas Huellas de neumáticos Estrías en balas Armas de fuego, balas, cartuchos, casquillos Herramientas	Drogas y sustancias tóxicas Pinturas y pigmentos Residuos de disparos Sustancias volátiles Acelerantes y disolventes Alcoholes Resinas y plásticos Residuos de explosivos Fibras Suelos, vidrio Evidencias Traza	Sangre Fluidos biológicos Pelo (raíz) Tejidos Polen



El trabajo de los investigadores forenses

Laboratorio de Química forense

Laboratorio de Genética forense



El laboratorio de

QUÍMICA FORENSE

Taller de Ciencia Forense



QUÍMICA FORENSE







Detección de huellas



Spot test

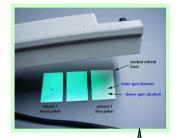


Absorción atómica

Técnicas de Análisis con aplicaciones Forenses



Cromatografía de gases





Cromatografía de capa fina



El laboratorio de

GENÉTICA FORENSE



La Genética Forense ...

Sherlock Holmes: "it has long been an axiom of mine that the little things are infinitely the most important",



pero nunca imaginó que una cosa tan pequeña, como la molécula de ADN pudiera convertirse en una herramienta poderosa para la lucha contra el crimen.

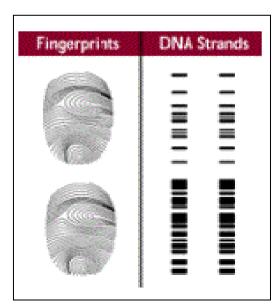
Nat Rev Genet. 2005 Mar;6(3):246. Jobling MA, Gill P. Department of Genetics, University of Leicester, United Kingdom.



¿Qué es la Genética forense?

El uso de ciertas técnicas empleadas en Genética para la identificación de los individuos en base al análisis del DNA.

"HUELLA DACTILAR DE ADN"





La Genética Forense ...

"HUELLA GENÉTICA"

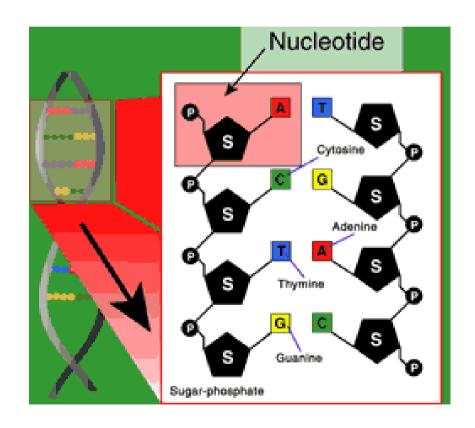
Veintiún años después de haberse desarrollado la técnica de huella digital de ADN, el análisis de ADN es clave para:

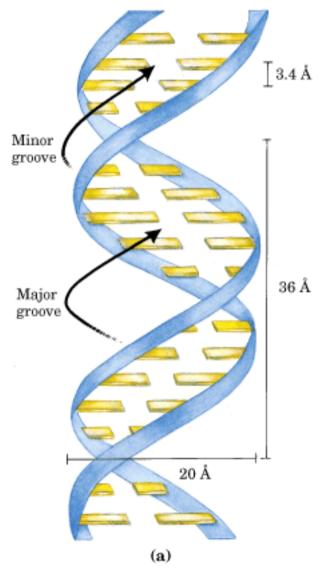
- Identificación de personas desaparecidas a partir del cadaver
- Investigación de la filiación, tanto desde el punto de vista de la reclamación como de la impugnación.
- Criminologia, análisis de restos biológicos que han quedado en la ecena de un crimen o un delito sexual.
- El uso masivo de bancos de datos de inteligencia.



El ADN es un hélice doble

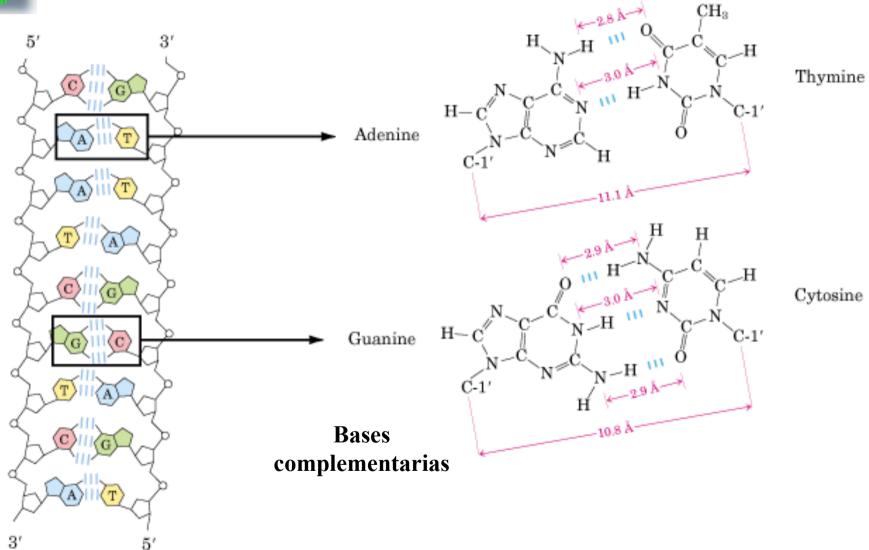
(Watson y Crick, 1953)



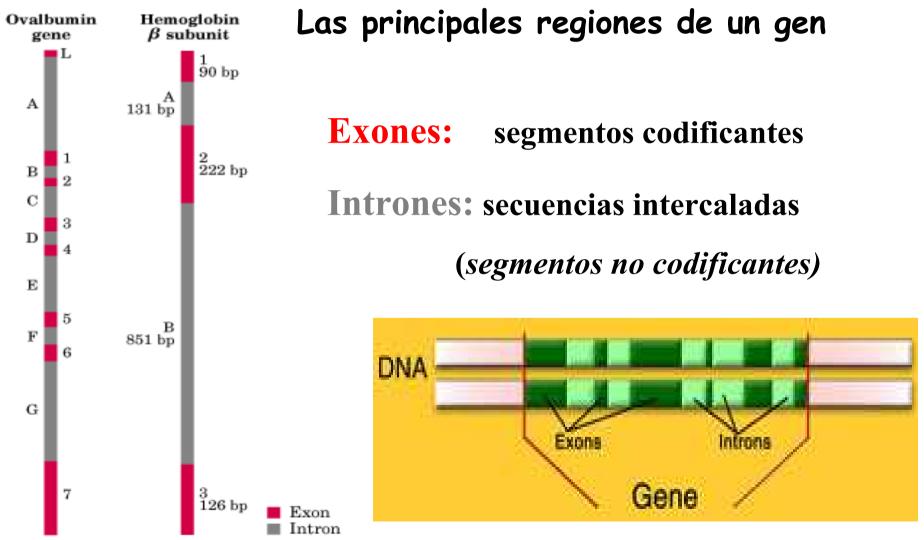


Nelson, D. L. y Cox, M. M. (2009) Lehninger. Principios de Bioquímica . (5ª Ed.) Omega.









Nelson, D. L. y Cox, M. M. (2009) Lehninger. Principios de Bioquímica . (5ª Ed.) Omega.



1.- ADN codificante o esencial

Encargado de almacenar la información genética en los genes

Genes - diferentes sectores de ADN con un orden concreto en la disposición de los nucleótidos que determina la secuencia de aminoácidos de las proteínas que codifican y el grado de expresión del gen en cada tejido y en cada tiempo.

2. ADN no codificante

No guarda información genética. Juega un importante papel en la estructura y en la función de los cromosomas.

ADN espaciador

ADN repetitivo



2. ADN no codificante

ADN espaciador - formado por una secuencia sencilla de bases que se dispone entre regiones codificantes del genoma.

ADN repetitivo - lo forma una secuencia que, al contrario que el espaciador, se dispone por todo el genoma debido a la existencia de múltiples copias.

"Secuencias repetidas en tándem"- secuencia común relativamente corta que se repite en tándem de manera continua (una tras otra) en un fragmento de ADN.

----ATCGG ATCGG ATCGG ATCGG----

"Secuencias repetidas intercaladas" - secuencia larga de bases que aparece repetida, pero no a continuación del primer grupo de secuencia repetitivo, sino en un lugar diferente y distante del genoma

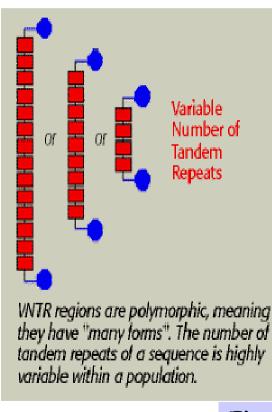
-----ATCCCCGGAATCGATAAACGATC-----ATCCCCGGAATCGATAAACGATC---



restriction endonuclease cutting sites

¿Qué son las huellas de ADN? ...

Secuencias utilizadas en la huella digital de ADN



VNTRs

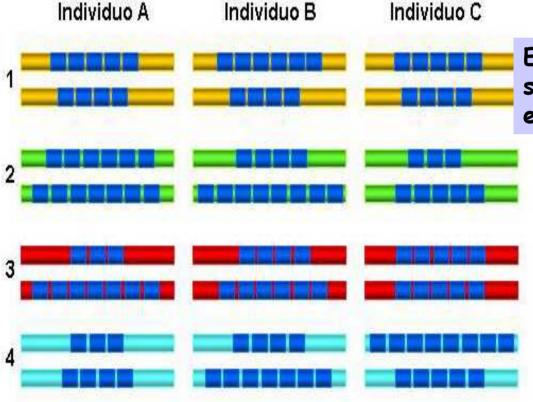
Secuencias repetidas en tándem un número variable de veces.

Secuencias cortas (entre 10 y 100 pb) que pueden estar repetidas 5 veces en un lugar del cromosoma (locus) y estar repetida 4 veces en otro locus distinto y 7 veces en otra posición.

El número de veces que esta repetida varía de un lugar a otro del mismo cromosoma.



VNTRs: 4 pares de cromosomas homólogos en tres personas



El número de veces que la secuencia está repetida varia entre cromosomas distintos.

También varia de unos individuos a otros. Este tipo de secuencias se llaman también "minisatélites".

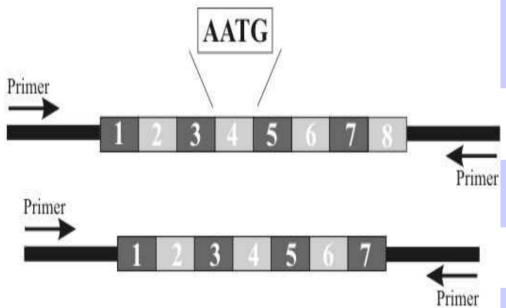
Secuencias repetidas en tandem, utilizadas en la huella digital de ADN



¿Qué son las huellas de ADN? ...

STRs secuencias de 2-7 bp

Short Tandem Repeats



1. Puede realizarse con ADN degradado (se pueden analizar fragmentos más pequeños).

Primer 2. Pueden amplificarse pequeñas cantidades de ADN (PCR)

3. Uso de más loci

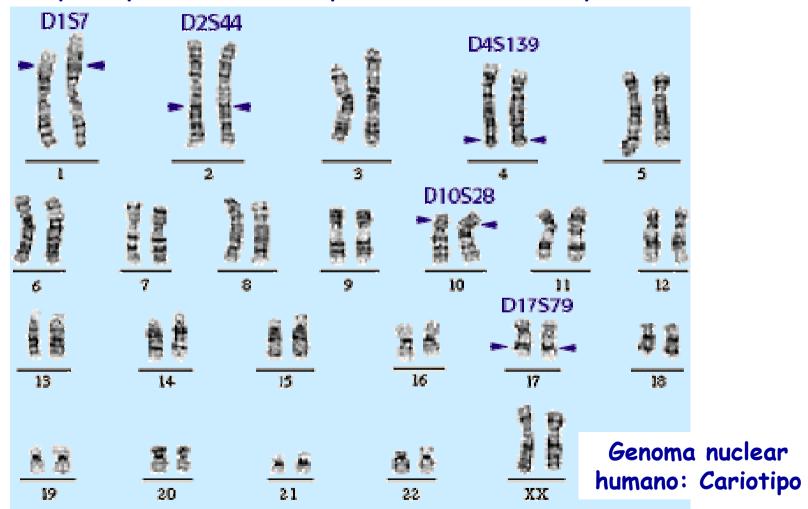
The flanking regions where PCR primers bind are constant

Homozygote = both alleles are the same length Heterozygote = alleles differ and can be resolved from one another

4. Proceso más rápido



Wyman y White, 1980 - primer locus de ADN polimórfico



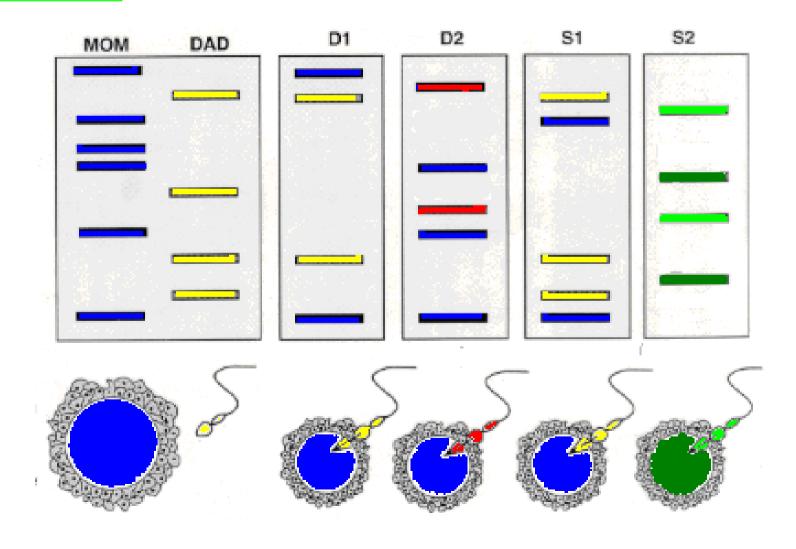
"Chromosomal locations of RFLP markers used in DNA profiling



¿Qué son las huellas de ADN? ...

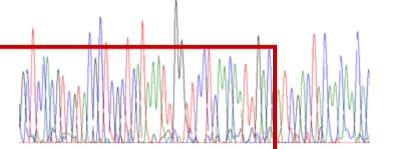
VNTRs

"Variable Number of Tamden Repeat"





1.- Hibridación con sondas



2.- Reacción en cadena de la polimerasa

- 3. Secuenciación
- 4. Futuras tecnología: Biochips





1. - Hibridación con sondas o "Southern blot"

Las etapas experimentales que se emplean en el laboratorio para el análisis de VNTRs son las siguientes:

I. Extracción de DNA

II. Cortar el ADN en fragmentos

III. Separación de fragmentos

IV. Hibridación y autoradiografía



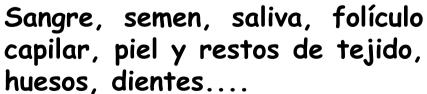
Técnicas de análisis del ADN en genética

forense ...

I. Extracción de DNA

Se puede extraer ADN de casi cualquier evidencia biológica:











II. Cortar el ADN en fragmentos

ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

(Werner Arber, Hamilton Smith y Daniel Nathans)

"reconocen secuencias específicas en el DNA de doble helicoide y cortan ambas hebras en lugares concretos"

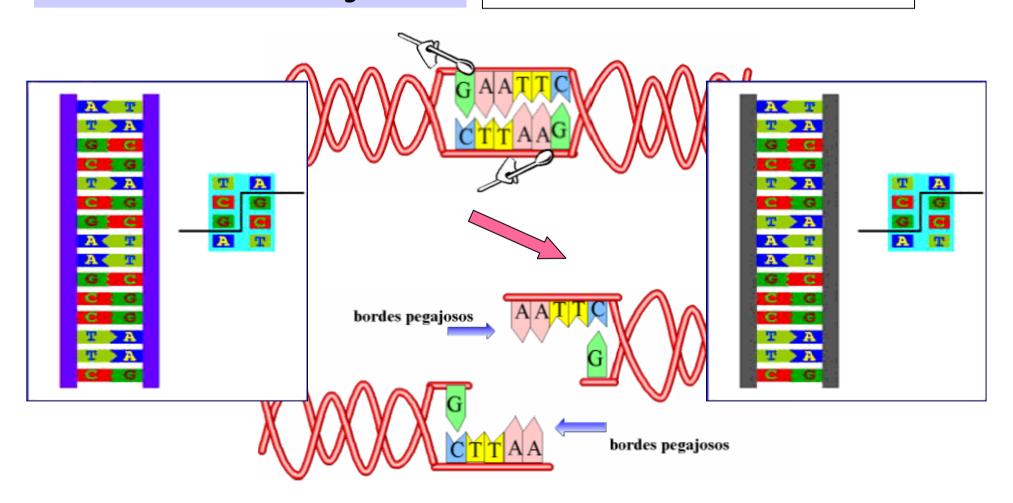
Se utilizan para hidrolizar moléculas de DNA dando fragmentos específicos que se pueden analizar y manipular con más facilidad que la molécula original

Alul and Haelli produce blunt ends



II. Cortar el ADN en fragmentos

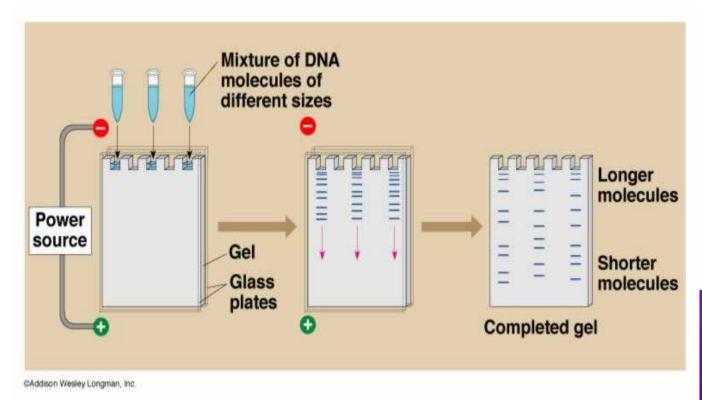
ENZIMAS DE RESTRICCIÓN



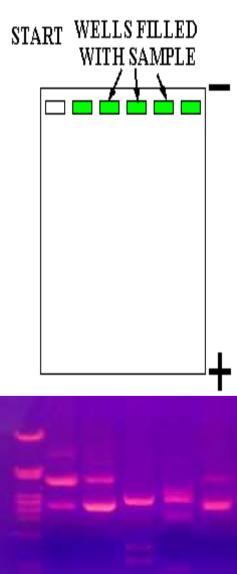


III. Separación de fragmentos

Electroforesis en gel



se pueden detectar fácilmente pequeñas diferencias entre moléculas similares de ADN



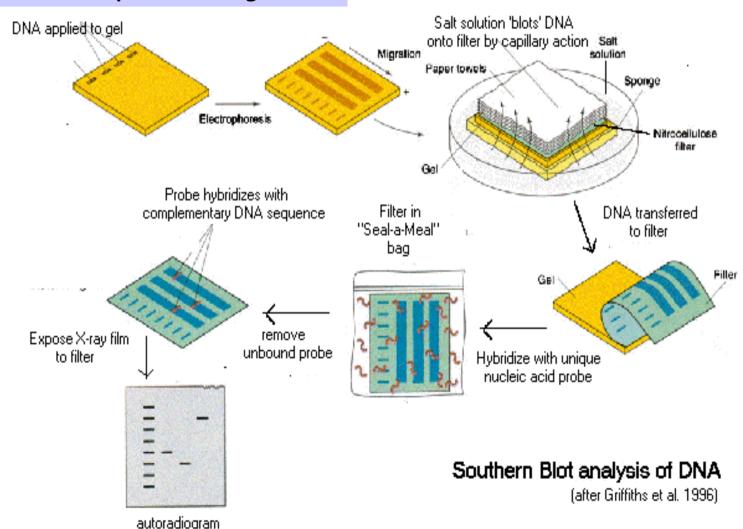


IV. Hibridación y autoradiografía

- a.- <u>Desnaturalización</u> de los fragmentos cortados y separados
- b.- <u>Transferencia</u> de las cadenas simples a una membrana de nitrocelulosa o nylon y fijación de las mismas por medio del calor (80°C)
- c.- <u>Prehibridación</u> con sondas de ADN inespecífico para bloquear los lugares de unión inespecíficos que pudiera haber en la membrana
- d.- <u>Hibridación</u> de la sonda marcada radioactivamente y desnaturalizada, con los fragmentos de ADN fijados a la membrana, y lavado de la membrana para eliminar el exceso de sonda o aquellas que hayan hibridado mal.
- e.- Revelado en placa radiográfica



IV. Hibridación y autoradiografía









DNA cromosómico (p. ej-. Sospechoso 1)

La Transferencia Southern aplicada la determinación de la huella dactilar de DNA

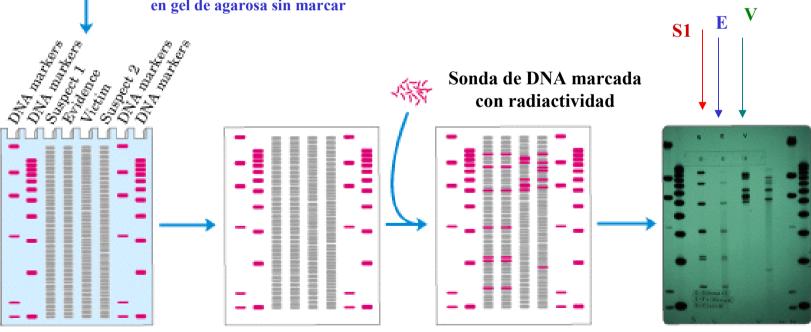
(Polimorfismos de secuencia)

Nelson, D. L. y Cox, M. M. (2009) Lehninger. Principios de Bioquímica . (5ª Ed.) Omega.

Cortar con endonucleasas de restricción

Fragmentos de DNA

Separar los fragmentos por electroforesis en gel de agarosa sin marcar



Desanturalizar el DNA y transferir a una membrana de nylon

Incubar con la sonda y luego lavar Exponer la membrana a una película de rayos X



Hibridación con sondas o "Southern blot"

- 1.- Sondas Mono-locus (SLP): son específicas para una región de un determinado cromosoma. Se unen a secuencias largas de nucleótidos. Como resultado se observan una o dos bandas por individuo. El patrón de bandas obtenido con estas sondas se denomina perfil unilocus de DNA o "DNA profiling"
- 2.- Sondas Multi-locus (MLP): hibridan con secuencias minisatélites presentes en varios loci de diferentes cromosomas. Son sondas de 10 a 15 nucleótidos que se repiten múltiples veces y tras el revelado se observan de 10 a 20 bandas por persona. Este patrón de múltiples bandas se conoce como huella genética multilocus o "DNA fingerprinting"



Hibridación con sondas o "Southern blot"

- Información aportada: las (MLP) tienen una mayor capacidad díscriminativa al aparecer múltiples bandas. No obstante, las (SLP) son más específicas ya que el fragmento de ADN con el que hibridan es de mayor tamaño
- Cantidad y calidad del ADN: cuando se usan sondas (MLP) se requiere aproximadamente un µgramo de ADN sin degradar mientras que en el caso de las (SLP) se necesita menos de 100 ng y este ADN no necesariamente debe estar en perfecto estado, siempre y cuando el fragmento complementario a la sonda esté intacto.
- Especificidad entre especies: las sondas MLP permiten su uso sobre el ADN humano y de cientos de animales superiores, mientras que las SLP son exclusivas de ADN humano.



2.- Reacción en cadena de la polimerasa -PCR

K.B. Mullis (1983)

Permite duplicar (amplificar) un número ilimitado de veces un fragmento de ADN

Se realiza de forma automática, con lo que se consigue un clonaje rápido en un sistema libre de células





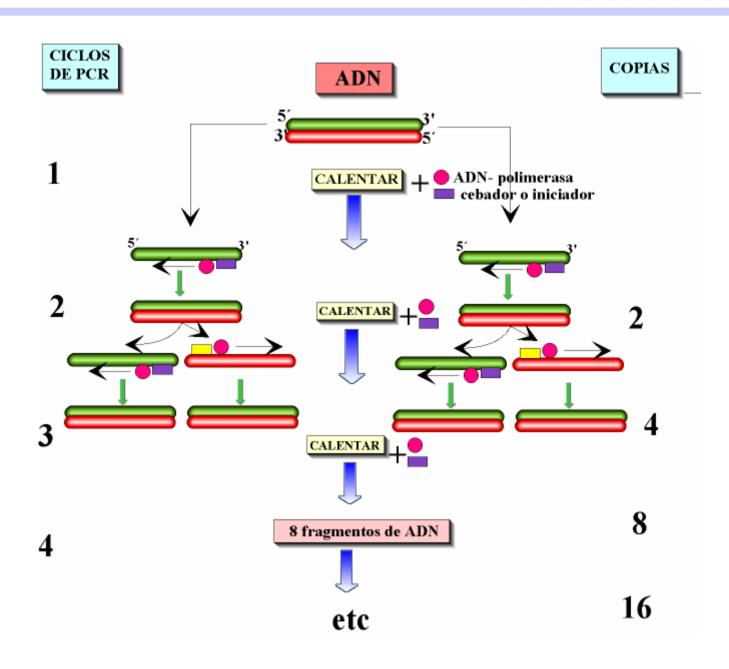


Reacción en cadena de la polimerasa - PCR

- **1°.-** <u>Desnaturalización</u>. El ADN mole debe encontrarse en forma de cadena sencilla. Temperaturas de 90-95°C (rotura de los puentes de hidrógeno intercatenarios)
- **2°.-** <u>Hibridación</u>: fase de "annealing" o de emparejamiento. Temperatura de 40-60°C par la unión de los "primers" a las secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar.
- **3°.-** *Extensión*: La Taq polimerasa incorpora nucleótidos en el extremo 3' del primer utilizando como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada. Temperatura de 72°C.

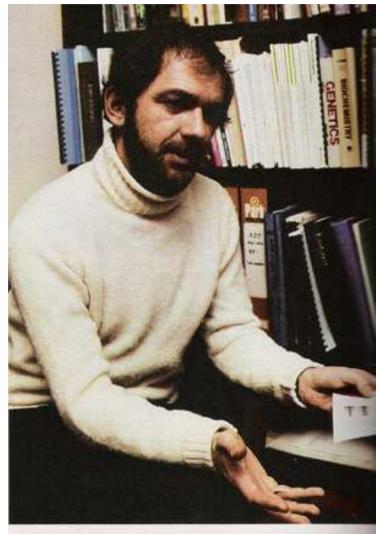








La Genética Forense ...



Geneticist Alec Jeffreys pioneered DNA fingerprinting, which was first used to solve a British rape case.

En la especie humana, la primera secuencia VNTR fue descrita por el genetista Alec Jeffreys

Era una secuencia de 33 pb encontrada en el interior del primer intrón del gen de la Mioglobina

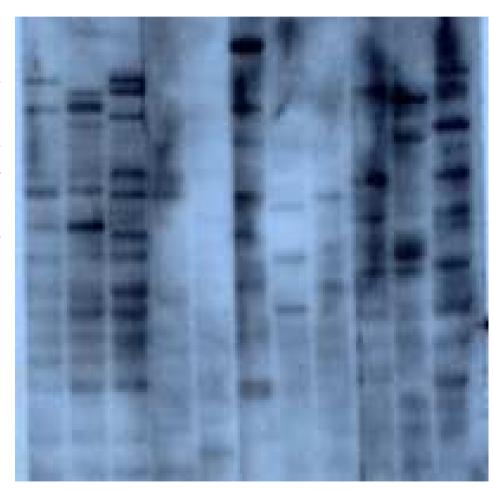
Nature 314, 67 - 73 (07 March 1985); Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA.



Autoradiografía de la primera separación de fragmentos realizada por Alec Jeffrey

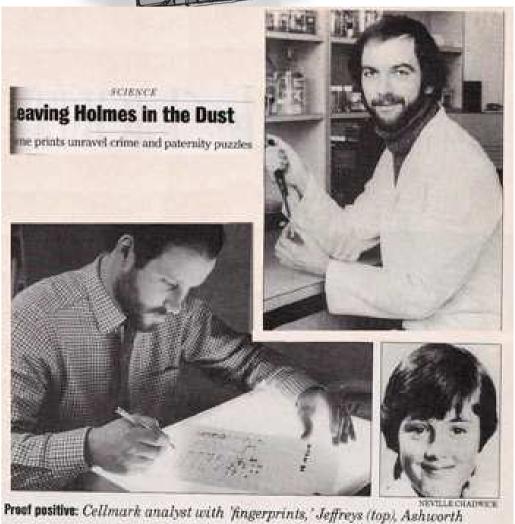
"I took one look, thought 'what a complicated mess', then suddenly realized we had patterns. There was a level of individual specificity that was light years beyond anything that had been seen before...It was a 'eureka!' moment. Standing in front of this picture in the darkroom, my life took a complete turn".

The Wellcome Trust, "Discovering DNA Fingerprinting." 04/02/04 by Giles Newton





EL DNA VA A CORTE

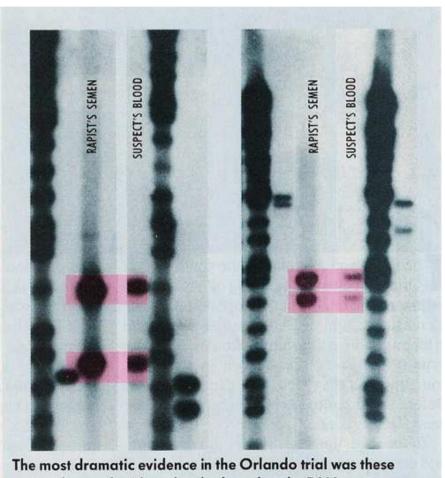


- 1986: Primera aplicación forense de la huella dactilar de ADN en el caso de violación y asesinato de Dawn Ashworth.
- Se solicita que Alec Jeffreys acuda a los tribunales como experto.
- Resultado: Se demostró que el acusado, quien se había confesado culpable del asesinato, era inocente.
- El ADN presente en el semen extraido de la vagina de la víctima no correspondía al del acusado confeso.

"Leaving Holmes in the Dust." Newsweek, 26 October 1987, page 81.



Autoradiograma de un caso criminal



The most dramatic evidence in the Orlando trial was these autoradiographs. They clearly show that the DNA patterns (highlighted areas) in the suspect's blood matched those in the semen found on the rape victim.

Lewis, Ricki. "DNA Fingerprints: Witness for the Prosecution."

Discover, June 1988, pages 44-52



1989- Abogados retan la confiabilidad de la prueba de AND como pieza de evidencia en casos criminales



On the defense: Barry Scheck (left) and Peter Neufeld were concerned about the reliability of DNA typing evidence.

Argumento:

Carece de estándares nacionales en la metodología usada para la pruebas de ADN forense

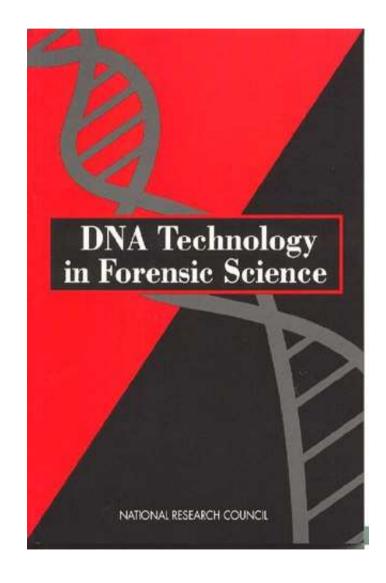
Por lo tanto, la evidencia no es confiable.

Robert, Leslie. "Science in Court: A Culture Clash." Science 257, 7 August 1992, page 732.



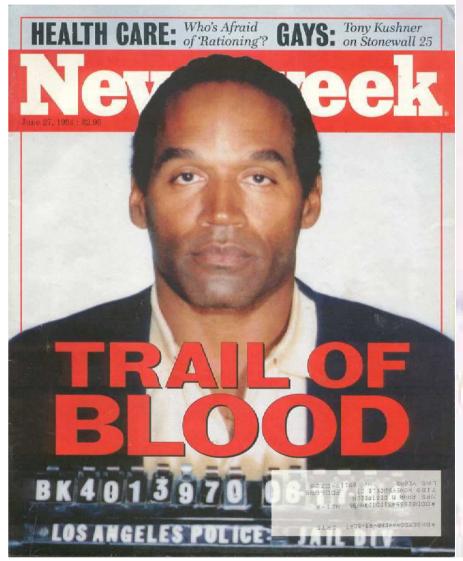
 1992 - El Informe del Consejo Nacional de Investigación de la Academia Nacional de Ciencias de EE.UU. indica que los estándares nacionales y los precedentes legales permiten que la huella digital del ADN sea una herramienta fundamental en las ciencias forenses.

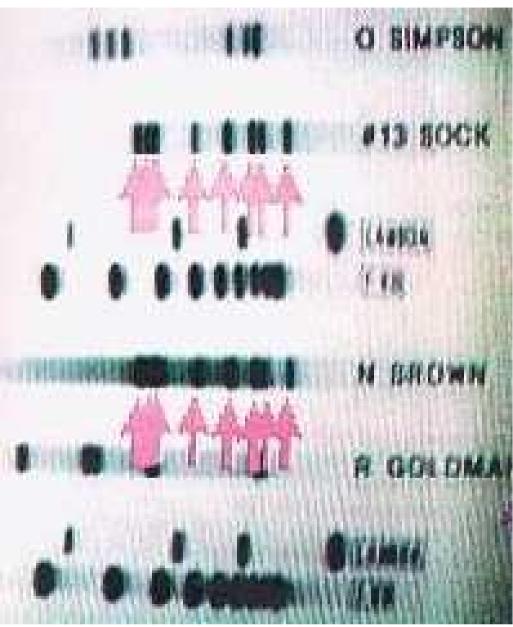
National Research Council. DNA Technology in Forensic Science Washington, DC: National Academy of Sciences.





1995







Links....

http://forensics.rice.edu/

<u>http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articles/643/1/La-huella-genetica-en-Medicina-Legal-ADN-con-fines-forenses.html</u>

http://www-ceprap.ucdavis.edu/ - DNA Fingerprinting lab - demo (libre)

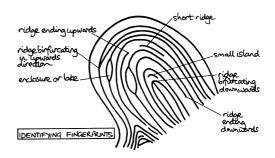


CIENCIA RECREATIVA PARA ENSEÑANZA SECUNDARIA









TALLER DE CIENCIA FORENSE



Impartido por:

Susana Palmero Díaz (Química Analítica)

Mª Dolores Busto Núñez (Bioquímica y Biología Molecular)

ANÁLISIS DE MEDICAMENTOS POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (TLC)

Procedimiento

- 1.- *Disolución estándar de ácido acetilsalicílico*. Disolver 500 mg de ácido acetilsalicílico (o aspirina, en cuyo caso habría que filtrar la disolución) en el tubo con 5 ml de éter de petróleo y 5 ml de etanol.
- 2.- *Disolución estándar de paracetamol*. Disolver 250 mg de paracetamol en el tubo con 5 ml de éter de petróleo y 5 ml de etanol.
- 3.- *Disolución estándar de cafeína*. Disolver 500 mg de cafeína en el tubo con 5 ml de éter de petróleo y 5 ml de etanol.
- 4.- Disolución problema. Mezcla desconocida de analgésicos.

a) Preparación de la placa cromatográfica.

- Dibujar una línea a 1cm del borde de la placa con un lapicero (no utilizar bolígrafo ni rotulador). Trazar sobre la línea un punto donde se vayan a inyectar las muestras y su nombre debajo para identificarlas.
- Pinchar las muestra con un punta de pipeta procurando que caiga un gota muy pequeña en cada caso.
- Dejar secar y pinchar nuevamente sobre la gota anterior.

b) Desarrollo de la placa

- Tomar un vaso de precipitados de y añadir de acetato de etilo hasta una altura de 0.5 cm.
- Introducir la placa procurando que el disolvente no sobrepase la línea de las muestras.

c) Identificación de las muestras

 Visualizar las marcas bajo luz ultravioleta de 254 nm (NUNCA ENFOCAR A LOS OJOS NI MIRAR DIRECTAMENTE LA LUZ ULTRAVIOLETA).

ANÁLISIS DE COMPUSTOS POR ENSAYO A LA GOTA (SPOT TEST)

INTRODUCCIÓN

- El propósito de estas reacciones es la detección preliminar de drogas/medicamentos de abuso en estado puro o diluido por la adición de un reactivo a una sustancia.
- El producto de la reacción presenta un color final intenso y fácilmente identificable.

Reactivos utilizados:

- A: Disolver 2 g de tiocianato de cobalto en 100 ml de agua destilada.
- **B**: (Reactivo de Mandelin): Disolver 1.g de vanadato de amonio en 100 ml de ácido sulfúrico concentrado.
- **C**: (Reactivo de Marquis): Cuidadosamente añadir 100 ml de ácido sulfúrico concentrado a 5 ml de formaldehído al 40% v:v con agua.

Procedimiento

- Estudiar atentamente la tabla adjunta para utilizar el mínimo número de reactivos posible en la identificación de la muestra problema.
- Colocar 500 μg de muestra en tres huecos de la placa y añadir una gota del reactivo correspondiente con una pipeta Pasteur.

Compuesto	A	В	С
Paracetamol		Oliva	
		moderado	
Apirina		Oliva grisaceo	Rojo
Sal		Naranja	
Azucar			Marrón
			oscuro
Codeina		Oliva oscuro	Purpura
Pseudoefedrina	Azul verdoso	Naranja	

Negro: Sustancia en polvo Azul: Disuelto en cloroformo

ANÁLISIS DE MANCHAS DE SANGRE

Material y reactivos

- Muestras de sustancias rojas (pintura roja , colorante alimentario rojo, tomate fresco o ketchup)
- o Bastoncillo de algodón con sangre real o simulada (basta con untar el bastoncillo con una disolución de $CuSO_4$.
- o Agua oxigenada
- Solución de fenolftaleín

Mezclar cuidadosamente 2g. de fenolftaleína, 20 g. de KOH y 100 ml de agua. Añadir 20 g. de granalla de cinc. Para llevar a cabo la reacción hay dos opciones:

Opción A:

Dejar 48 horas para que se decolore.

Conservar en un frasco coloreado y tapar con papel de aluminio.

Opción B:

Calentar a reflujo en un matraz de fondo redondo durante dos horas (hasta que se decolore). Conservar en un frasco coloreado y tapar con papel de aluminio (se puede dejar parte de la granalla para que no se reoxide.

Una vez decolorado el reactivo, se prepara la disolución de trabajo mezclando 20 ml de la fenolftaleina reducida con 80 ml de etanol.

Experimental

Test del peróxido de hidrógeno

- La primera parte de la práctica consiste en observar el comportamiento de las distintas manchas con el peróxido de hidrógeno
- ➤ La sangre contiene una enzima llamada catalasa que reacciona con el peróxido de hidrógeno:

$$H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$$

➤ Esta reacción provoca un burbujeo que denota la presencia de sangre. Sin embargo esta reacción es muy poco sensible.

Test del fenolftaleín

- Añadir un par de gotas de la solución de la fenolftaleín en cada muestra previamente tratada con el peróxido de hidrógeno y anotar el resultado. La muestra e sangre (o de Cu), dará una coloración rosa intenso.
- La reacción se produce con la hemoglobina de la sangre.

SEPARACION DE COMPONENTES EN TINTAS COMERCIALES

2. Material y reactivos

Bolígrafos

№ N-butanol

♦ Alfileres

♦ Acetico glacial

♣ Agua

∀aso

Placas cromatográficas o papel poroso.

Procedimiento experimental

Separación de los colorantes de tintas comerciales

- Poner 0.5 cm de fase móvil (n-butanol:ácido acético glacial:agua 12:3:5) en un vaso y cerrar herméticamente.
- Mientras el vapor se distribuye por la cámara, preparar las cromatoplacas de la siguiente manera:
 - O Marcar con un lápiz aproximadamente a 1 cm. de la base (borde inferior) una línea paralela a dicho borde y colocar una microgota de cada una de las tintas sobre dicha línea espaciadas un mínimo de 1 cm. Dejar secar.
 - O A los 10 minutos, introducir la cromatoplaca en el vaso y volver a cerrar.
- Sacar el cromatograma, cuando el disolvente llegue a ¾ del final de la placa.

Comentarios:

La tinta verde sale muy bien, pero puede utilizarse cualquier color siempre que sean de distintas marcas y texturas.

En el laboratorio se utilizaron diferentes marcas de bolígrafos verdes (Bic, Pilot, Standler, Pilot gel, etc)

IDENTIFICACIÓN DE HUELLAS

INTRODUCCIÓN

Cada vez que tocamos algo, dejamos nuestras huellas dactilares. Nuestras manos están cubiertas de poros que normalmente mezclan humedad con algún tipo de fluido graso de nuestro cuerpo o incluso suciedad. Esta mezcla deja en los objetos que tocamos la impresión de nuestras huellas digitales.

Estas huellas pueden verse a simple vista o no. Las que no se ven se llaman huellas latentes.

Hay otro tipo de huellas que se denominan huellas plásticas y son las que se dejan en objetos como jabón o arcilla. Se utilizaron por primera vez en un juicio en 1911.

Hay tres tipos básicos de huellas dactilares:







EXPERIMENTAL

A. Revelado mediante vapores de yodo.

- □ Material:
 - Papel de filtro (5 x 5 cm)
 - Pinzas
 - Recipiente con 2 o 3 cristales de yodo.
- □ Utilizar pinzas para coger el papel.
- □ Frotar el dedo índice contra la nariz, y lentamente hacer rodar el dedo sobre el papel solo una vez.
- □ Colocar el papel en un recipiente con tapa y sellar el vaso durante 5 minutos.

B. Re	velado	mediante	vapores	de	cianocrilato	•
-------	--------	----------	---------	----	--------------	---

- □ Material:
 - O Dos vidrios (o transparencias)
 - O Una hoja de papel de aluminio
 - O Una gota de cianocrilato
 - O Vaso de vidrio con tapa
 - o Placa eléctrica
- □ Limpiar los vidrios (o transparencias)
- □ Frotar el dedo índice contra la nariz, y lentamente hacer rodar el dedo sobre el vidrio solo una vez.
- □ Depositar el cianocrilato en el papel de aluminio y colocarlo en el vaso. Calentar en una placa o similar durante hasta que se vean las huellas.

C. Otros métodos de revelado:

Pulverizar la huella con nitrato de plata (2.5 g en 45 ml de agua) y exponer al sol.

TEST DE LUMNOL PARA MUESTRAS DE SANGRE OCULTAS

INTRODUCCIÓN

Uno de los test más utilizados para identificar sangre es el llamado "test del luminol", en el cual se pueden hacer brillar las manchas de sangre con una luz azul, debida a la reacción del luminol con el hierro de la hemoglobina. Este test es lo bastante sensible como para detectar manchas de sangre previamente lavadas. En nuestro caso lo simularemos **con nitrato de cobalto**.

Material y reactivos

- Nitrato de cobalto (0.01g en 100 ml)
- Luminol
- Peróxido de hidrógeno
- Disolución tampón carbonato/bicarbonato (1,1 g de carbonato sódico y 0,9 g de bicarbonato sódico en 100 ml de agua)

Preparación de la disolución de luminol

- Pesar 0.02 g de luminol sólido y añadir 100 ml del tampón carbonato hasta completa disolución.
- Añadir 1 ml de peróxido de hidrógeno justo cuando se vaya a utiliza y mezclar bien (puede durar 1-2 días, según la concentración del peróxido de hidrógeno.

Experimental

Para simular las manchas de sangre se puede pulverizar una superficie con Co(NO₃)₂
 Pulverizar ahora con la solución de luminol y observar el resultado. Cuanto más oscuro este el entorno mejor se verá.

Esta obra está bajo una licencia Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Spain de Creative Commons. Para ver una copia de esta licencia, visite http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/es/

