



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea
SCIENZE BIOLOGICHE

Sessione Estiva
A.A. 2022/2023

ANALISI FDP PER LA PREVISIONE DEL COLORE DEGLI OCCHI, CAPELLI E PELLE IN CORPI ALTAMENTE DECOMPOSTI

Tesi di Laurea di:
Laura Costante

Docente referente:
Chiar.mo Prof. Marco Barucca

INTRODUZIONE

Per l'identificazione di un cadavere umano attualmente vengono utilizzati metodi che permettono la ricerca di indicazioni fisiche, impronte digitali, impronte dentali, analisi del DNA e analisi antropologiche basate su short tandem repeats (STR) o su altri marcatori polimorfici a singolo nucleotide (SNP).

Spesso, però, a causa delle cattive condizioni di conservazione dei resti umani trovati questi caratteri non sono valutabili e l'indagine antropologica permette solo una valutazione dei dati ante e post mortem.

Nei casi in cui non siano disponibili campioni biologici con cui effettuare confronti e l'analisi avviene su corpi altamente decomposti che non dispone di campioni precedenti alla sua morte, è necessario svolgere altri tipi di analisi.

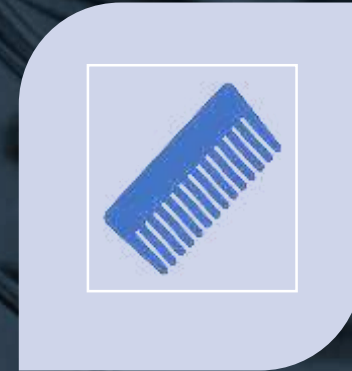




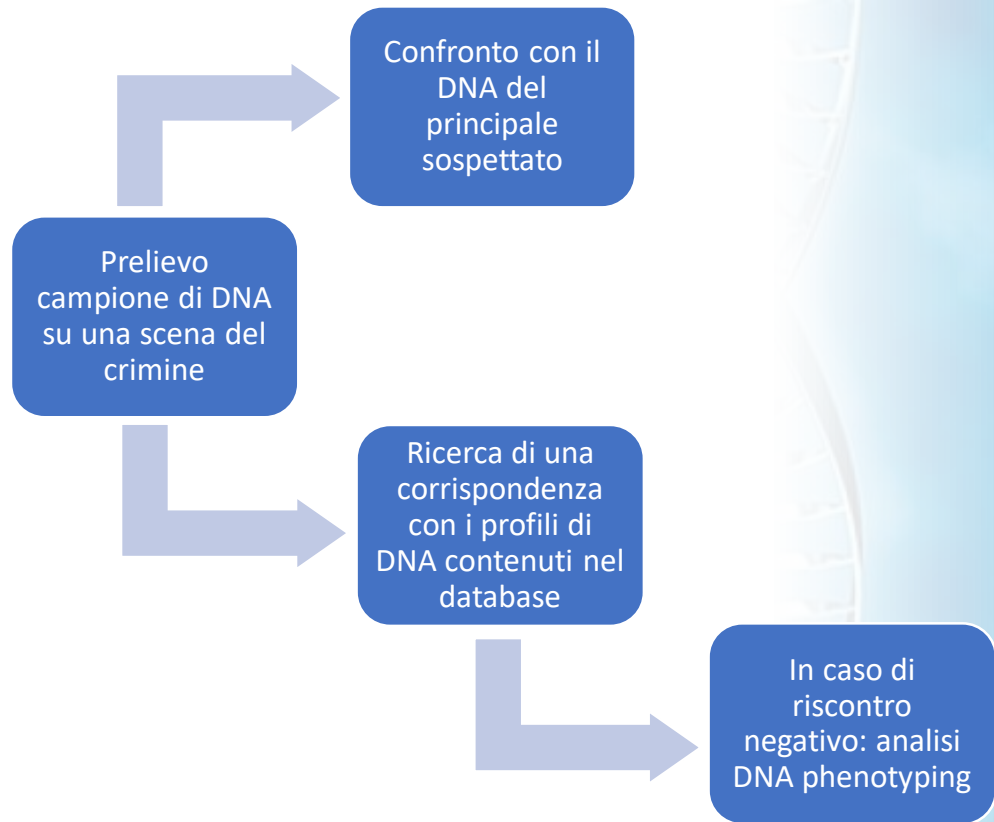
Una delle principali conseguenze relativa ai processi degenerativi che si verificano nel periodo post mortem è relativo alla disgregazione cellulare che determina una conseguente degradazione del DNA.



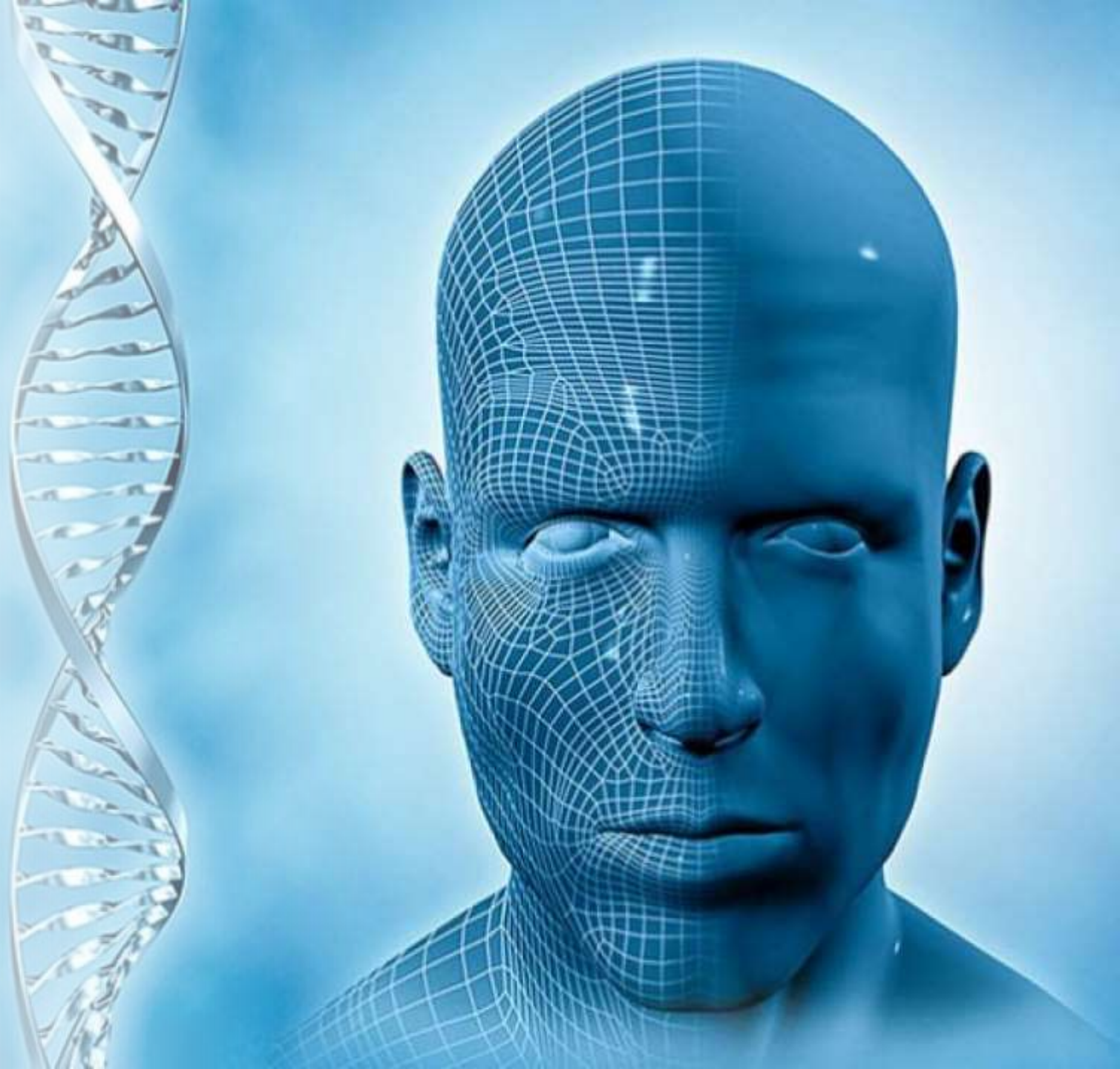
L'utilizzo di tecniche FDP (forensic DNA phenotyping) permette di prevedere caratteristiche visibili esternamente (EVC) per quanto riguarda l'età, l'ascendenza biogeografica e l'aspetto.



Tre le EVC sono inclusi il colore della pelle, degli occhi e dei capelli, caratteri in cui solo pochi geni contribuiscono all'informazione fenotipica.



Per DNA Phenotyping si intende quel processo analitico che permette di predire le caratteristiche fenotipiche di una persona usando solo i dati ottenuti dalla genotipizzazione o dal sequenziamento del DNA. Le varianti genetiche significative vengono scoperte utilizzando un approccio di studio di associazione dell'intero genoma (GWAS), in cui centinaia di migliaia o milioni di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) vengono testati per la loro associazione con ciascun tratto di interesse.



STUDIO



Sono stati presi in esami 20 resti scheletrici appartenenti a persone scomparse che erano stati precedentemente identificati in laboratorio tramite analisi delle STR in modo da testare fedeltà e accuratezza della tecnica.



I cadaveri analizzati mostravano un intervallo post mortem (PMI) variabile compreso tra pochi giorni e circa 30 anni e i campioni presi in esame sono relativi a matrici ossee, in particolare a 14 femori e 6 tibie.



L'analisi effettuata consiste nella combinazione di tecniche di PCR multiplex e reazione SNaPshot single base extension (SBE) in modo da analizzare un maggior numero di SNP in campioni diversi.

ANALISI DEL DNA

La tecnica prevede:

 Estrazione acidi nucleici tramite utilizzo di candeggina diluita e luce UV sui campioni di matrice ossea

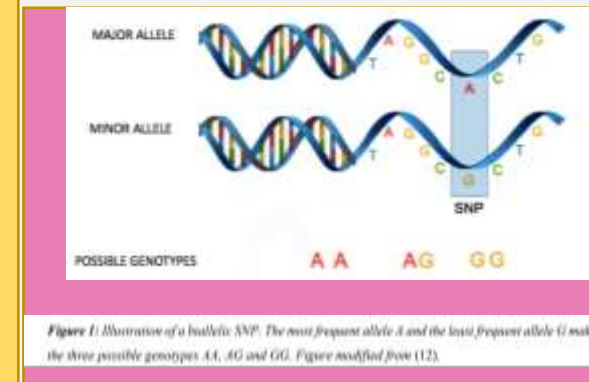
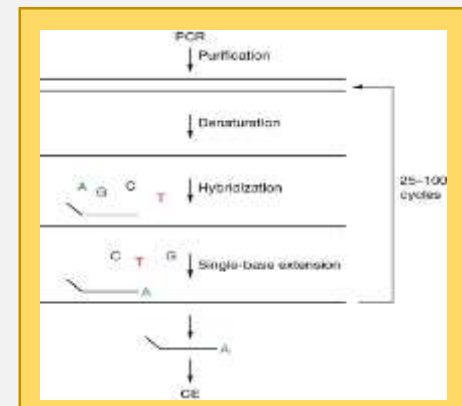
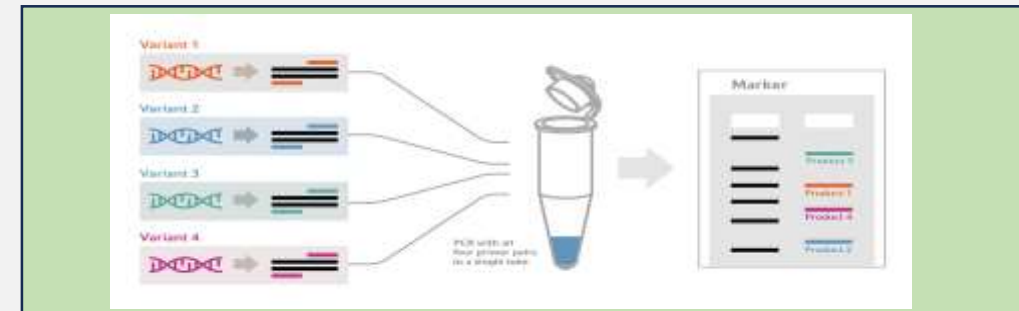
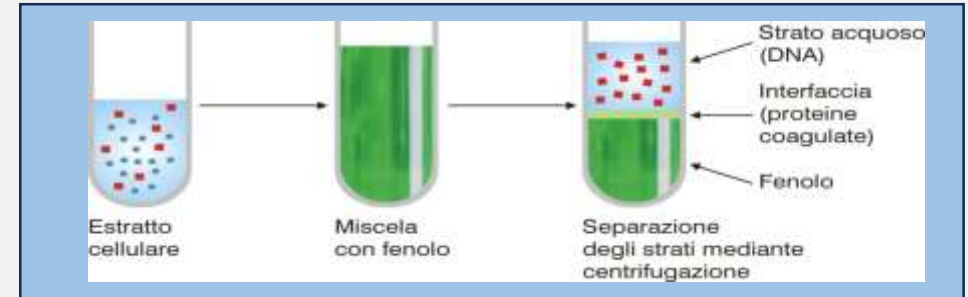
 Amplificazione SNP marcati tramite PCR multiplex: varianti polimorfiche associate al colore degli occhi, capelli e pelle

 Purificazione dei prodotti di PCR

 Reazione SBE (Single Base Extension)

 Purificazione dei prodotti estesi

 Applicazione sistema HirisPlex-S: individuazione SNP posizionati nei geni coinvolti nella determinazione del colore di occhi, capelli e pelle.



ANALISI HIRIPLEX-S E RISULTATI

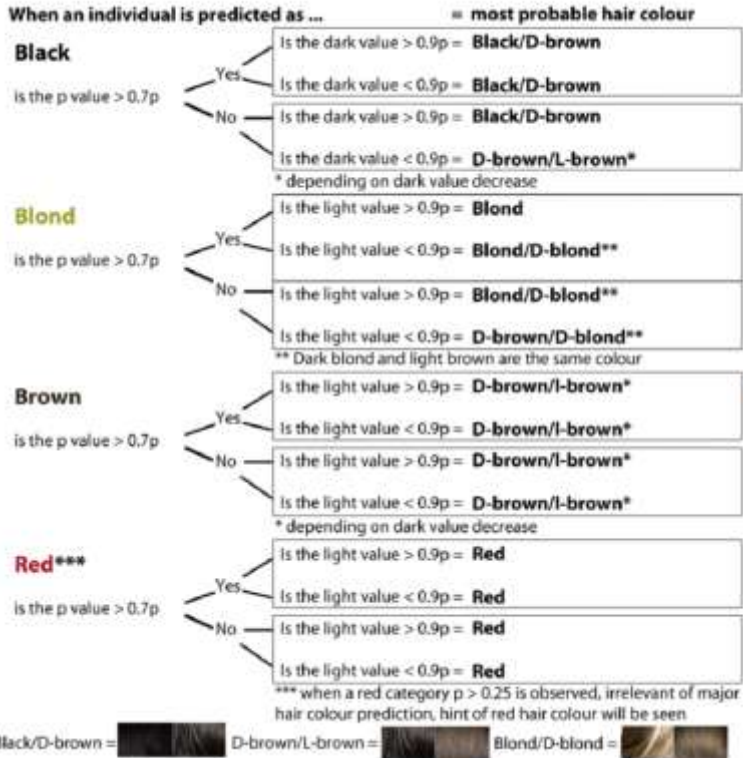
HirisPlex-S rappresenta un'estensione del sistema IrisPlex precedentemente sviluppato per il colore degli occhi e del precedente sistema HirisPlex per la previsione del colore di occhi e capelli.

Il sistema permette di valutare probabilità di predizione per 3 colori dell'iride, 4 colori dei capelli e 5 categorie di colore della pelle. I risultati hanno mostrato un'accuratezza complessiva del 91,6%, 90,4% e 91,2% rispettivamente per il colore dell'iride, dei capelli e della pelle.

Tramite questa tecnica è possibile, quindi, risalire alle caratteristiche fenotipiche dei campioni inserendo nello strumento il valore «0» se l'allele non è presente, «1» se in eterozigosi, «2» se in omozigosi e «NP» in caso di SNP mancante.

Solo due campioni sono risultati includenti in quanto relativi a caratteristiche del colore degli occhi e della pelle intermedie e caratterizzati da un elevato stato di degradazione a causa del lungo PMI.

Tramite confronto con le fotografie delle vittime che si hanno a disposizione è stato possibile verificare l'affidabilità e l'accuratezza dei risultati fenotipici ottenuti



The HirisPlex-S System				
				
Gene	SNP	Allele	No. of Alleles	
1 MC1R	rs312262906	A	0 1 2 NA	
2 MC1R	rs11547464	A	0 1 2 NA	
3 MC1R	rs885479	T	0 1 2 NA	
4 MC1R	rs1805008	T	0 1 2 NA	
5 MC1R	rs1805005	T	0 1 2 NA	
6 MC1R	rs1805006	A	0 1 2 NA	
7 MC1R	rs1805007	T	0 1 2 NA	
8 TUBB3	rs1805009	C	0 1 2 NA	
9 MC1R	rs201326893	A	0 1 2 NA	
10 MC1R	rs2228479	A	0 1 2 NA	

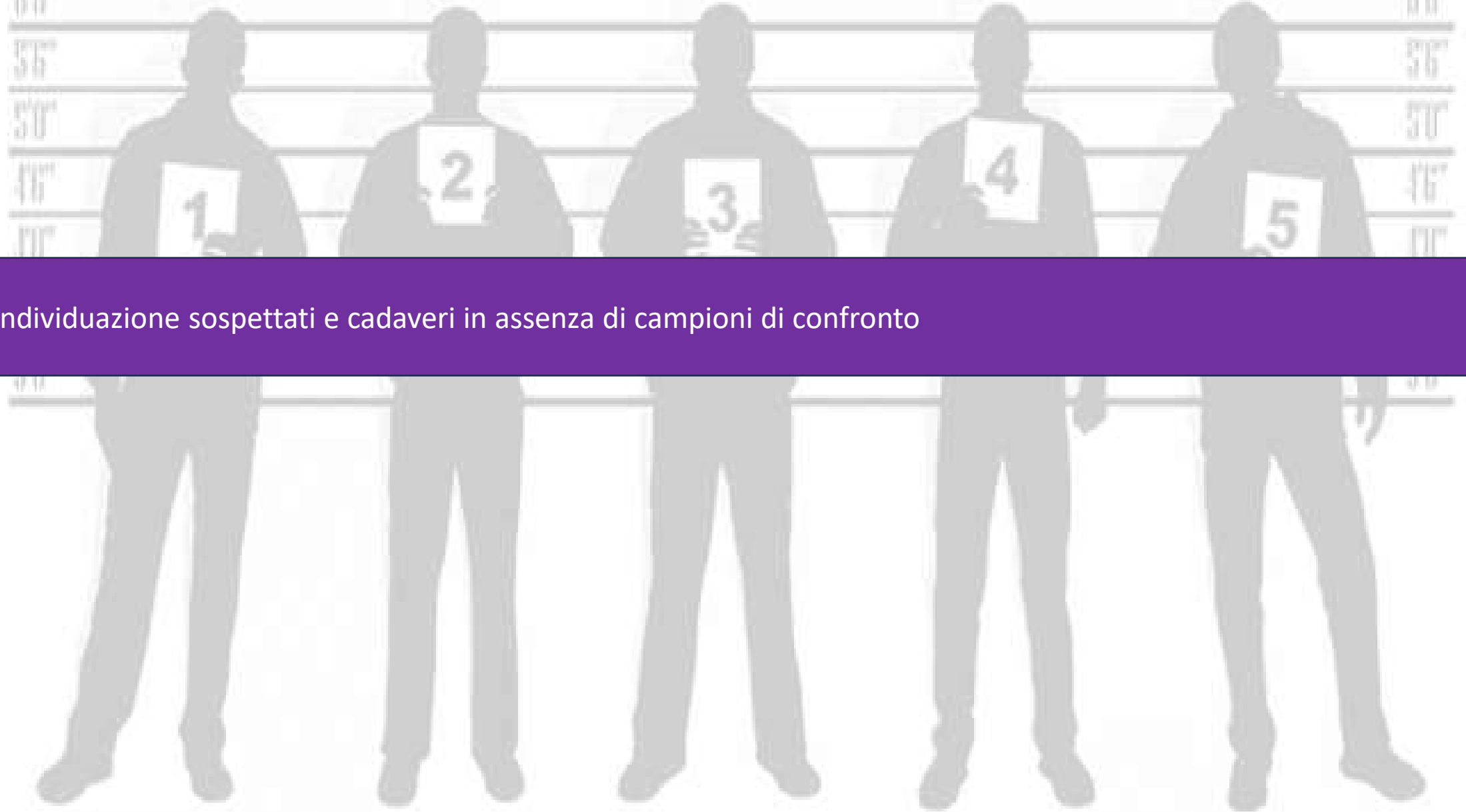
APPLICAZIONI

The background of the slide features a light blue background with numerous dark blue silhouettes of people. These silhouettes are scattered across the frame, some standing, some walking, and some in groups, creating a sense of a large crowd or a public gathering. The silhouettes are semi-transparent, allowing the background color to show through them.

Tecniche di FDP forniscono importanti aiuti nei processi investigativi relativi alla ricerca di persone scomparse o di autori di crimini in quanto capace di ridurre il numero di sospettati ad un gruppo di individui caratterizzati da EVC definite. L'individuazione di EVC permette di fornire indicazioni più precise rispetto a testimoni oculari che spesso forniscono informazioni soggettive e variabili nel tempo.

APPLICAZIONI

Individuazione sospettati e cadaveri in assenza di campioni di confronto



APPLICAZIONI

The background of the slide is a dense, overlapping pattern of fingerprints in various shades of gray. A single fingerprint, located in the upper-left quadrant, is highlighted in a vibrant red color, making it stand out from the rest of the pattern.

Ampio utilizzo negli studi evoluzionistici, antropologici e forensi

numero di potenziali sospettati al solo gruppo di persone che rispettano le EVC previste

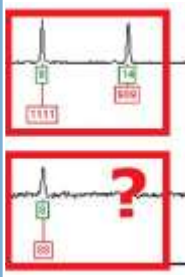
Ridurre numero di potenziali sospettati al solo gruppo di persone che rispettano le EVC previste

APPLICAZIONI

A hand with a light-colored sleeve cuff is pointing its index finger at a specific point on a dense, multi-colored transit map. The map features various colored lines (blue, red, yellow, green, purple) representing different transit routes. The background is slightly blurred, showing more of the map and a person's arm.

Le EVC previste che risultano essere meno frequenti all'interno della regione in cui è avvenuto il crimine permettono di ridurre maggiormente il numero di sospettati rispetto a EVC previste caratterizzate da tratti comuni. Le EVC comuni, allo stesso modo, permettono di escludere individui privi di caratteri comuni, come individui appartenenti a gruppi minoritari.

LIMITI



Non si eliminano completamente dropout e dropin in allelici



Incostanza nell'identificazione delle categorie intermedie.



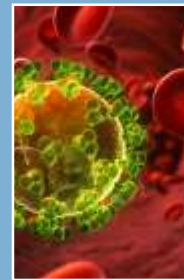
Difficoltà determinazione fenotipica di caratteri variabili nel tempo



Problemi etici e sociali



Stime probabilistiche e non deterministiche



Esclusione malattie genetiche.

BIBLIOGRAFIA

- Kayser, Manfred et al. "Recent advances in Forensic DNA Phenotyping of appearance, ancestry and age." *Forensic science international. Genetics* vol. 65 (2023): 102870. doi:10.1016/j.fsigen.2023.102870
- Sari O, Ilksen et al. "Predicting Eye and Hair Color in a Turkish Population Using the HirisPlex System." *Genes* vol. 13,11 2094. 11 Nov. 2022, doi:10.3390/genes13112094
- Alshehhi, Aamer et al. "Advancement in Human Face Prediction Using DNA." *Genes* vol. 14,1 136. 3 Jan. 2023, doi:10.3390/genes14010136
- Fabbri, Matteo et al. "Application of Forensic DNA Phenotyping for Prediction of Eye, Hair and Skin Colour in Highly Decomposed Bodies." *Healthcare (Basel, Switzerland)* vol. 11,5 647. 23 Feb. 2023, doi:10.3390/healthcare11050647

RIASSUNTO ESTESO

Le tecniche di fenotipizzazione del DNA forense (FDP) permettono di risalire alle caratteristiche esterne di una persona relative all'aspetto, ascendenza biogeografica ed età a partire da frammenti di DNA prelevati su una scena del crimine. Tramite questa tecnica, infatti, è possibile comporre una descrizione del sospetto sconosciuto per cui può avere un ruolo fondamentale nell'identificazione di resti umani o nell'individuazione di responsabili di crimini di cui non sono presenti indizi utili o di cui non sono stati individuati corrispondenze nei profili delle autorità investigative.

L'analisi forense standard si basa su short tandem repeats (STR) e altri marcatori polimorfici del DNA come gli SNP che rappresentano le fonti più comuni di variabilità genetica: la pigmentazione di pelle, occhi e capelli dipende da una complessa interazione tra numerosi geni ma, anche se i colori degli occhi, dei capelli e della pelle sono poligenici in natura, rappresentano fenotipi complessi piuttosto atipici rispetto a molti altri tratti umani poligenici, come l'altezza, dove sono coinvolti centinaia di geni con piccoli effetti.

Lo studio è stato effettuato analizzando SNPs, ovvero ripetizioni di migliaia di singoli polimorfismi del DNA sparsi per tutto il genoma, studiati in campioni di DNA estratti da resti umani in uno stato avanzato di decomposizione causata dalle particolari condizioni del decesso o per tentativi di occultamento del cadavere. Tramite analisi del DNA è stato possibile giungere ad una corretta identificazione dei cadaveri analizzati tramite confronto con i dati archiviati nel registro delle persone scomparse e di cui erano presenti foto dei volti per effettuare un confronto. Il sistema utilizza lo strumento fornito dal sito HirisPlex e permette di predire con un'accuratezza del 91,6%, 90,4% e 91,2% rispettivamente il colore dell'iride, dei capelli e della pelle.

La problematica principale riguarda l'efficacia in quanto il DNA Phenotyping fornisce una probabilità e non una certezza: le caratteristiche fisiche ottenute mediante fenotipizzazione del DNA non sono specifiche ad un solo individuo e quindi non possono essere attribuite in modo univoco ad una persona precisa; per questo viene definito più uno strumento investigativo che non uno strumento per identificare una specifica persona. Nonostante ciò, i risultati possono incoraggiare l'applicazione di queste tecniche per risalire ad altre caratteristiche del soggetto che si sta analizzando risultando fondamentale in numerosi ambiti.