

# RICONOSCIMENTO DELLE VITTIME DI CATASTROFI DA CAMPIONI POST MORTEM: SVILUPPO DI NUOVE TECNOLOGIE PER IL RECUPERO DELLE INFORMAZIONI GENETICHE

## IDENTIFICATION OF DISASTER VICTIM FROM POST MORTEM SAMPLES: DEVELOPMENT OF NEW TECHNOLOGIES TO RECOVERY OF GENETIC INFORMATION

Attualmente per l'identificazione di vittime di catastrofi, e non solo ( stupri, omicidi, aggressioni,...), si utilizza il profilo genetico come gold standard. Questo perché ad oggi il profilo genetico risulta estremamente attendibile, rapido, semplice e poco costoso. Infatti, attraverso campioni di buona qualità, prelevati sul posto, è possibile estrarre il DNA e analizzarlo per poterlo comparare con i campioni ante mortem (AM) delle vittime.

Tuttavia in questi casi ottenere campioni integri e tessuti facili da prelevare può risultare complesso, quindi su campioni deteriorati ottenere un DNA quantitativamente e qualitativamente adatto alle analisi molecolari risulta spesso complesso.

Fortunatamente lo sviluppo tecnologico ha permesso di utilizzare nuove matrici tissutali su cui prelevare il DNA e di ottenere, attraverso nuove tecniche molecolari, un profilo genetico anche su DNA frammentato.

Pertanto, lo scopo di questa presentazione è quello di illustrarvi come le tecniche molecolari e di estrazione si siano evolute con lo sviluppo di nuove tecnologie. Andremo, quindi, a comparare gli approcci attuali con quelli emergenti analizzando il progresso per quanto riguarda le fonti utili per estrarre il DNA, il profilo genetico, i marcatori genetici e i criteri analitici.

### Fonti di DNA:

Il DNA viene recuperato da diverse fonti dove, a seconda delle circostanze di una catastrofe, si considerano ideali alcune fonti rispetto ad altre. Questo perché si tiene conto di fattori come la resistenza della fonte alla degradazione, o danni dovuti alla sua struttura naturale.

Fra gli **approcci attuali** si considerano:

1. SANGUE E SALIVA: prelevati su carta FTA o su tampone. Però è una fonte poco attendibile perché al momento del decesso il sangue coagula e la saliva non viene più prodotta e pertanto rende difficile il recupero del DNA.
2. PELLE E MUSCOLI: si considerano attendibili i tessuti duri in profondità, al contrario di quelli molli, che si degradano molto più rapidamente.
3. OSSA E DENTI: fonti di DNA molto affidabili soprattutto in condizioni ambientali avverse proprio perché hanno un alto tasso di successo nel recupero del DNA rispetto a sangue, saliva e tessuto muscolare. Tuttavia, è preferibile analizzare il dna mitocondriale a causa della maggiore resistenza alla degradazione, piuttosto che il DNA nucleare, che ha una scarsa qualità e

quantità. Questo perché gli elementi scheletrici variano nel modo di conservare il DNA. Da ciò si deduce che, a differenza delle ossa spugnose, l'osso corticale denso conserva al meglio il DNA perché protetto da una struttura compatta. È stato, quindi, determinato che ossa come femore, tibia, bacino, metatarso siano più adatti per la raccolta dei campioni. I denti offrono un riscontro migliore perché, grazie alla loro composizione, proteggono in maniera migliore il DNA dalle condizioni ambientali e fisiche che comporterebbero una degradazione post mortem (PM). La quantità di DNA nucleare e mitocondriale è maggiore nella polpa e nel cemento, e denti con la superficie delle radice più grande (esempio: molari) sono i più attendibili. Si devono comunque considerare alcuni fattori (tipo di dente, la salute dei denti e l'età dell'individuo) come effetto delle proporzioni relative di DNA presenti nel dente.

4. **CAPELLI:** associati alla comparazione con campione AM piuttosto che come buona fonte di DNA PM. Hanno un valore limitato soprattutto in resti decomposti e, inoltre, è difficile recuperare abbastanza DNA nucleare per un profilo di DNA a causa della struttura stessa del capello, che presenta per lo più proteine cheratinizzate. Si ha un maggior riscontro se si effettua un test su campioni che presentano una radice con cellule epiteliale aderenti.
5. **UNGHIE:** sono una preziosa fonte di DNA perché resistono maggiormente alla decomposizione preservando al meglio il DNA ed inoltre si riesce ad isolare con successo le STR anche dopo essere state soggette a condizioni ambientali estreme. Si ritiene, infatti, che il DNA delle unghie venga protetto da un microambiente positivo che si genera dopo la sepoltura e che non esistono differenze nel contenuto di DNA delle unghie attraverso il sesso, tra le dita di una stessa persona o fra età diverse di individui. Il **vantaggio** delle unghie come fonte di DNA è quello di poter isolare il DNA con successo anche dopo giorni, mesi e anni utilizzando, appunto, le STRs come fonte. Un **limite**, invece, risulta essere la presenza di DNA esogeno, che però viene superato campionando le unghie dei piedi. L'identificazione basata sul DNA estratto dalle unghie viene svolta con il sistema PowerPlex 16.
6. **TESSUTO CONNETTIVO:** sono una fonte alternativa di DNA per resti in via di decomposizione. Ad esempio il tendine di Achille è un tessuto stabile che può essere usato come fonte di DNA. Insieme ai suoi collaboratori, Trindade-Filho ha dimostrato come dalla cartilagine ialina si possano isolare con successo STRs utili ad un profilo di DNA, rispetto al muscolo scheletrico.

Negli **approcci emergenti**, invece, si considerano:

1. **TESSUTI COMPRESI GLI ORGANI INTERNI:** Van Den Berge e collaboratori sono riusciti a dimostrare come anche i tessuti di organi (cuore, cervello, polmone, fegato...) siano fonti attendibili per il profilo del DNA, questo perché DNA e RNA rimangono stabili in alcuni tessuti d'organo PM. Il campione viene prima trasferito su carta FTA, la quale una volta asciutta, è pronta per eseguire il profiling del DNA.
2. **OSSATURA:** grazie a Mundoff e Davoren si è scoperto come le piccole ossa spongiose (falangi di mani e piedi e caviglie) producono più DNA e loci STRs rispetto alle ossa corticali all'aumentare degli intervalli di PM. Pertanto oltre ad essere una fonte molto attendibile sono anche molto più facili da campionare (rimangono intatte). Fonte attendibile per cadaveri molto putrefatti sono gli ossicini uditivi.

## Preparazione del campione:

Una volta prelevato il campione, si procede con la preparazione del campione.

Fra gli **approcci attuali** si esegue la procedura che consiste:

1. **SOLUZIONI CONSERVANTI:** utili per mantenere l'integrità dei campioni, soprattutto in situazioni come disastri di massa dove la campionatura è ad ampio spettro. Queste soluzioni agiscono inibendo le nucleasi e rallentando la crescita microbica. I conservanti raccomandati dalle linee guida DVI sono: etanolo, NaCl, EDTA e DMSO.
2. **PREPARAZIONE DEL CAMPIONE:** il rischio di contaminazione dei resti di DNA da fonti estranee solitamente proviene da quelli che hanno raccolto il campione, ma spesso vengono incluse anche altre fonti, come per esempio la manipolazione del campione, gli strumenti contaminati, l'attrezzatura... Tali rischi devono, pertanto, essere ridotti al minimo e per farlo bisogna adottare delle procedure che comprendono: uso di dispositivi di protezione individuale, aree di campionamento pulite, strumenti puliti e stoccaggio dei campioni raccolti. Ossa e denti sono le fonti più affidabili per estrarre DNA non contaminato. Prima di procedere con l'estrazione del DNA, bisogna ripulire il campione da eventuali contaminazioni che possono invalidare i risultati. L'uso di acqua con detergenti SDS è rilegato essenzialmente alla decontaminazione delle unghie, mentre per gli elementi scheletrici solitamente il lavaggio del campione comprende: candeggina diluita, lavaggio acido e irradiazione UV. Anche candeggina al 10%, acqua sterile ed etanolo al 70% sono utili per la pulizia delle ossa. L'uso dell'ipoclorito, invece, è ancora molto discusso a causa della sua propensione a distruggere il DNA attraverso il danno ossidativo.
3. **ESTRAZIONE DEL DNA:** affinché si possano ottenere delle PCR ottimali, è importante ridurre al minimo gli effetti inibitori contenuti nei campioni di tessuto ed essere rapidi nell'estrazione del DNA. È importante adottare metodi efficienti per l'estrazione di DNA che comportino anche la rimozione di potenziali inibitori della PCR. I kit consigliati per tali fini sono:
  - **QIAGEN:** a base di silice, estrazione del DNA e rimozione di inibizioni. Usato solitamente in campioni come ossa, tessuti, tamponi boccali e sangue.
  - **TFS:** basato su microsferre magnetiche, è capace di estrarre il DNA da campioni di sangue, saliva e seme

In campioni come ossa e denti, prima di procedere con l'estrazione di DNA, si segue un protocollo di demineralizzazione basato sull'EDTA. Questo protocollo, associato alla digestione di proteinasi, comporta una resa significativa del DNA e un'ottima tipizzazione dello stesso. Conclusa la fase di demineralizzazione, i campioni possono essere estratti utilizzando un metodo di estrazione del DNA adeguato al tipo di campione.

4. **QUANTIFICAZIONE DEL DNA:** dopo aver compiuto l'estrazione del DNA, gli estratti vengono quantificati per determinare la quantità e la qualità del DNA del campione. Un approccio comune è l'uso della reazione a catena della polimerasi in tempo reale (RT-PCR).

Con lo sviluppo delle nuove tecnologie, sono emersi **approcci emergenti** come:

1. **TEST RAPIDO DEL DNA:** compie un'analisi specialistica del DNA e comprende RapidHITTM 200, ParaDNA e DNAscan. Quello più accreditato è RapidHITTM

200, che genera profili STR in circa 90 minuti ed incorpora estrazione, amplificazione e separazione in elettroforesi capillare, ma non è in grado di quantificare il DNA aggiunto in PCR.

2. **DIRECT- TO- PCR:** la sua preparazione consiste nell'aggiungere direttamente i campioni alla provetta PCR ed è stato dimostrato il suo successo in campioni come capelli, unghie, sangue e follicoli piliferi. Con questo tipo di approccio, è stato riscontrato un aumento dei picchi dell'elettroferogramma come conseguenza ad una maggiore tempistica del DNA, rispetto agli approcci tradizionali. Infatti sono necessarie solo 17 cellule per ottenere un profilo STR completo, al contrario delle 250 cellule richieste per la metodologia tradizionale. Il successo del direct- to- PCR dipende sia dal tipo di campione che dalla presenza di inibitori della PCR.
3. **SOLUZIONI ESTRAENTI E CONSERVANTI IL DNA:** tramite le soluzioni conservanti, è possibile ricavare il DNA di un tessuto diluito in una soluzione conservante proprio dalla soluzione stessa. Infatti Sorensen e collaboratori hanno dimostrato che se si preleva un'aliquota del conservante, all'interno del quale vi è il campione, e si aggiunge direttamente alla PCR, si ottiene il profilo del DNA del campione. La procedura include: DMSO-EDTA soluzione salinizzata (DESS), tampone TENT e alcuni conservanti (DNAgard e DNA Genotek).

## Marcatore genetici:

L'uso di marcatori genetici garantisce la riuscita del profilo di DNA.

Negli **approcci attuali** vengono considerati importanti:

1. **STRs AUTOSOMICI:** sono i marcatori maggiormente utilizzati perché hanno un alto potere discriminante. Infatti l'analisi delle STR ha dimostrato di essere uno strumento potente in eventi di mortalità di massa soprattutto se si utilizzano i moderni multisplit STR come PowerPlex 21 e GlobalFiler.
2. **STRs in Chr. Y e Chr. X:** le Y-STR sono particolarmente utili quando si devono stabilire legami di parentela, appunto perché i profili Y-STR rimangono gli stessi tra patrilineage. È utile e necessario integrare l'analisi delle X-STR soprattutto per ottenere una discriminazione quando si utilizzano i fratelli come campioni.
3. **DNA MITOCONDRIALE REGIONI IPERVARIABILI I E II:** il DNA mitocondriale è una valida alternativa, oltre ad essere di grande vantaggio nei test forensi, quando il DNA nucleare non è disponibile. Infatti il mtDNA ha un elevato numero di copie per cellula rendendo così il sequenziamento delle regioni ipervariabili I e II particolarmente utile per casi di persone scomparse o resti non identificati. Inoltre il DNA mitocondriale è più resistente al degrado ed essendo ereditato maternamente viene sfruttato in disastri chiusi dove si pensa che le vittime non siano correlate.

Con lo sviluppo di nuove tecnologie, si è voluto guardare oltre l'uso delle STR per l'identificazione del DNA, questo perché alcuni marcatori sono meno soggetti alla degradazione aiutando così il biologo forense nella genotipizzazione del DNA.

Gli **approcci emergenti** consentono l'utilizzo di marcatori di DNA altamente informativi, soprattutto per le caratteristiche esternamente visibili e la genealogia biogeografia, come:

1. **SNPs:** polimorfismi a singolo nucleotide sono variazioni di sequenza a base singola tra individui in un punto specifico del genoma. Forniscono una

discriminazione molto elevata e vengono classificati in base alla loro applicazione: SNPs di identità informativa (IISNPs), SNPs Lignudine per produrre genealogie (LISNPs), SNPs di tipo fenotipico (PISNPs) per caratteristiche esternamente visibili e antenati SNPs (AISNPs) per genealogia biogeografia. Per gli PISNPs sono stati sviluppati saggi per la previsione di caratteri esterni visibili come colore degli occhi, dei capelli e della pelle, mentre, gli AISNPs hanno mostrato divergenze di frequenza allelica tra le principali popolazioni globali.

2. MICROAPLOTIPI: esistono come conseguenza delle origini delle varianti in siti diversi, di ricombinanti vari e dell'imprevedibilità della deriva genica. I microaplotipi sono costituiti da regioni che comprendono due o più SNP entro un limite di 200 bp e vengono utilizzati per l'assegnazione degli antenati, l'identificazione individuale, l'analisi di parentela, determinazione delle relazioni familiari e l'identificazione e deconvoluzione di miscele. È proprio grazie a quest'ultima caratteristica identificativa che i microaplotipi offrono un vantaggio in più rispetto alle SNP.
3. MARCATORI InDels: le InDels sono i secondi marcatori più abbondanti del genoma umano e sono un'alternativa utile alla STR. Sono infatti un tipo di variazione della lunghezza del DNA breve e biallelica e condividono molte delle caratteristiche degli SNP rendendoli così ideali all'analisi del DNA degradato.
4. Res, LINEs e SINEs: gli elementi ritrasformanti (RE), costituiti da lunghi elementi nucleari intervallati (LINE) e da brevi elementi nucleari intervallati (SINE), vengono utilizzati per l'identificazione dell'identità umana. L'uso delle RE per gli studi di popolazione agevolati era condizionato dalle differenze di dimensioni associate all'inserimento di alleli null (INNUL). Però, grazie allo sviluppo di nuove tecnologie, si è designato un nuovo primer che ha facilitato il test dei marker INNUL: l'InnoTyper 21, biallelico con due possibili stati allelici (inserimento e null). Questo nuovo kit per gli INNUL offrono, così, una sensibilità e un potere discriminante che li rendono utili alle identificazioni umane di campioni estremamente degradati.

## Criteri analitici:

Dopo aver analizzato le fonti del DNA, i vari tipi di approcci per l'estrazione del DNA e i marcatori necessari, andremo ad analizzare come si arriva ad ottenere un profilo del DNA.

L' ELETTROFORESI CAPILLARE(CE) è una tecnica, fra gli **approcci attuali**, ad essere usata per ottenere il profilo del DNA e viene sfruttata sia per l'analisi della lunghezza dei frammenti che per le applicazioni di sequenziamento (SND del mtRNA e SNaPshot). Il metodo SNaPshot viene usato per l'analisi dell'estensione a base singola dove incorpora tutte le classi SNP ed è un'alternativa economica ed efficiente in termini di tempo al metodo di sequenziamento massivo parallelo (MPS) per le esigenze di genotipizzazione.

L'analisi del DNA mitocondriale si concentra nelle regioni I e II perché vi è un'alta concentrazione di varianti in tali regioni anche se, è stato dimostrato che più del 70% delle variazioni totali del mtDNA (mtGenome) si trova al di fuori di tali regioni, ciò permette di avere un'identificazione migliore. Il sequenziamento di Sanger oltre la zona di controllo è laborioso, costoso e dispendioso in termini di tempo.

Lo sviluppo ha apportato novità anche nel campo del sequenziamento andando ad elaborare una tecnologia di sequenziamento post-Sanger. Infatti, tra gli **approcci emergenti**, possiamo valutare come nuovo metodo il SEQUENZIAMENTO DI PROSSIMA GENERAZIONE (NGS) o MPS. Questo metodo permette, a un prezzo relativamente conveniente, di produrre milioni di reazioni di sequenziamento in parallelo e la sua capacità di digitare contemporaneamente grandi batterie di marcatori è sempre più sfruttata in ambito forense.

L'MPS offre molti vantaggi come: identificare SNP all'interno di regioni STR, gli SNP per la genotipizzazione dei microplotipi, le InDels vengono definiti meglio anche per identificare SNP prossimali. Inoltre offre una soluzione pratica per l'elaborazione del mtGenome, fornendo un alto livello di discriminazione della discendenza materna. Anche per campioni degradati è disponibile un approccio mediante questa tecnica per il sequenziamento simultaneo di mtGenome.

## STRUTTURE TAPHONOMICHE:

Lo scopo dello sviluppo in campo scientifico non è solo quello di facilitare e migliorare le tecniche e le tempistiche in laboratorio, ma anche la selezione, la raccolta e la conservazione dei campioni. È emersa, così, una ricerca sull'intelligenza del DNA che aiuta nell'identificazioni delle vittime e dei parenti delle vittime. Infatti sono state istituite delle strutture taphonomiche che assicurano che i campioni più rilevanti siano usati per l'identificazione. Prima dell'istituzione di queste strutture, lo studio veniva condotto su carcasse di suino perché molto analoghi all'uomo. Fu nel 1980 che in Tennessee venne aperta la prima struttura Taphonomica, chiamata "La Fattoria del Corpo", con lo scopo di utilizzare cadaveri umani per studiare e capire in maniera accurata gli sviluppi del corpo in condizioni ambientali estreme. Attualmente esistono 6 strutture operanti in America, ma lo scopo della ricerca è l'apertura di più strutture in tutto il mondo così da avere la possibilità di sperimentare ambienti di prova con il clima appropriato, le differenze regionali e stagionali in una serie di scenari DVI.

## CONCLUSIONI:

Gli attuali sviluppi tecnologici ci dirigono verso un nuovo modo di identificare i campioni attraverso il dna, di conseguenza anche gli standard e le principali linee guida DVI dovrebbero essere aggiornate.

Si pensa, infatti, che in futuro le procedure per il DVI basate sul DNA saranno caratterizzate dal recupero anche di frammenti minimi che verranno direttamente amplificati e genotipizzati per essere confrontati con campioni AM.