

LA IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE VÍCTIMAS DE LA GUERRA CIVIL ESPAÑOLA: LA EXPERIENCIA DEL INSTITUTO NACIONAL DE TOXICOLOGÍA Y CIENCIAS FORENSES.

ALONSO A¹, MARTÍN P¹, ALBARRÁN C¹, GARCÍA P¹, AGUIRRE A¹, FERNÁNDEZ C¹.

RESUMEN

Se presentan datos globales de los estudios llevados a cabo por el Servicio de Biología del Departamento de Madrid del Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses en la identificación genética de restos óseos de 40 víctimas de la Guerra Civil Española procedentes de diferentes fosas comunes atendiendo a 9 solicitudes de investigación de distintos Juzgados de Instrucción en el periodo 2002-2010. Se describen los procedimientos analíticos y las normas de calidad a las que deben estar sometidos este tipo de estudios de ADN y se identifican las limitaciones más importantes así como los avances científicos más relevantes para lograr un mayor número de identificaciones genéticas en este tipo de investigaciones.

PALABRAS CLAVE: Guerra Civil Española, STRs Autosómicos, STRs del cromosoma Y, ADN Mitocondrial, Bases de datos de ADN, Identificación de Personas Desparecidas.

ABSTRACT

Global data are presented from studies conducted by the Madrid Biology Service of the National Institute of Toxicology and Forensic Science in the genetic identification of skeletal remains from 40 victims of the Spanish Civil War from different mass graves in response to 9 investigation requests of different trial courts during the period 2002-2010. Here they are described the analytical procedures and quality standards to which this kind of DNA research should be adhered and it is identified the major constraints and the most relevant scientific advances to achieve a greater number of genetic identification in this type of research.

KEY WORDS: Spanish Civil War, Autosomal STR, Y-Chromosome STR, Mitochondrial DNA, DNA Data Bases, Missing Person Identification

CONTACTO: Antonio Alonso. Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Servicio de Biología. José Echegaray 4 28232 - LAS ROZAS – MADRID. Spain.
E-mail: a.alonso@mju.es

1. INTRODUCCIÓN.

La gran mayoría de las investigaciones de las fosas de la guerra civil han sido llevadas a cabo por iniciativa de las asociaciones para la Memoria Histórica con la colaboración en algunos casos de los gobiernos de las Comunidades Autónomas o los Ayuntamientos. Con anterioridad al año 2000 se llevan a cabo exhumaciones por iniciativa de los familiares de las que no existe registro documentado. Por otro lado, la guía metodológica de actuación en exhumaciones [1], así como la primera base de datos con información integral de las fosas comunes exhumadas de la guerra civil [2, 3] son de muy reciente publicación.

Durante el periodo 2002-2010 el Servicio de Biología del Departamento de Madrid del Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses (INTCF) ha sido requerido en nueve investigaciones judiciales en las que se han solicitado estudios de identificación genética de restos óseos de víctimas de la guerra civil Española.

En este estudio se presentan los datos globales de esta investigación y se describen los procedimientos analíticos y las normas de calidad a las que deben estar sometidos este tipo de investigaciones de ADN y se identifican las limitaciones más importantes así como los avances científicos más relevantes para lograr

1 Servicio de Biología. Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses, Las Rozas. Madrid.

un mayor número de identificaciones genéticas en este tipo de investigaciones.

2. METODOLOGÍA.

La recogida y selección de las muestras biológicas, tanto las de los restos óseos de los desaparecidos como las de los familiares de referencia más adecuados, se realizó de acuerdo a las normas de remisión de muestras del GHEP [4] y las normas de remisión de muestras del INTCF, recientemente actualizadas [5].

La selección de los restos óseos se realizó tras el análisis antropológico de los mismos. En todos los casos se solicitaron piezas dentales y un hueso largo, procediéndose en un principio al análisis de las piezas dentales como muestra de elección y utilizándose una porción de tejido óseo compacto de la diáfisis de un hueso largo (fémur) en los casos en los que no se dispuso de piezas dentales (5 cadáveres) o como muestra complementaria.

Tras la adecuación y descontaminación de las muestras, se procedió en cada caso a la pulverización de las mismas en viales estériles mediante crío fractura y se realizó el proceso de extracción y purificación de ADN en cabina de seguridad biológica en un laboratorio del área de Pre-PCR utilizando los estándares científicos para minimizar y monitorizar la contaminación [6].

Todos los extractos de ADN se sometieron a la cuantificación de ADN genómico nuclear mediante técnicas de PCR a tiempo real [7, 8].

En todos los casos se procedió al análisis de marcadores STRs Autosómicos mediante el uso de diversos kits comerciales de amplificación y detección de STRs validados en el ámbito forense (*ProfilerPlus*, *Cofiler*, *Identifiler*, *PowerPlex16*) así como el uso de sistemas para el análisis de MiniSTRs (*NC01*, *NC02*, *Minifiler*) en las muestras que presentaban una alta degradación. Se procedió también en los casos más recientes a la aplicación de los nuevos Kits comerciales de PCR-multiplex (NGM, ESX y

ESI) que incluyen los 12 marcadores STR del nuevo Estándar Europeo [9].

En los casos en los que se disponía de un familiar de referencia por vía materna se procedió al análisis de secuenciación de las regiones HV1 (16024-16365) y HV2 (73-340) del ADN mitocondrial de todos los cadáveres de la misma fosa.

En los casos en los que se disponía de un familiar de referencia por vía paterna se procedió al análisis de marcadores STR del cromosoma Y (sistemas *PowerPlex Y* e *Yfiler*) en todos los cadáveres varones de la misma fosa.

En todos los casos se utilizó la nomenclatura y las guías de interpretación recomendadas por la ISFG (*International Society for Forensic Genetics*) [10, 11]

El análisis bioestadístico de las compatibilidades genéticas observadas se realizó utilizando las frecuencias alélicas de marcadores STR autosómicos del INTCF, la base de datos poblacional EMPOP de mtDNA [12] y la base de datos YHRD de haplotipos STR del Cromosoma Y [13].

3. RESULTADOS.

A) LA CALIDAD DE LOS PERFILES DE ADN DE LOS RESTOS ÓSEOS Y AVANCES CIENTÍFICOS.

Una de las limitaciones del estudio genético de restos óseos inhumados en tierra con una antigüedad superior a los 60 años es el previsible alto grado de degradación del ADN cuya severidad dependerá de la propia antigüedad y sobre todo de las condiciones ambientales del enterramiento (temperatura, pH, humedad, radiación UV,...) y podrá conducir a una fragmentación que dificulte o incluso imposibilite el análisis de fragmentos cortos (STR) de ADN mediante PCR.

Sin embargo, los avances producidos tanto en los métodos de extracción y purificación de

ADN (que permiten mayor eficiencia en la obtención de ADN libre de inhibidores) así como el desarrollo de sistemas de PCR de alto rendimiento en muestras degradadas (Mini-STRs y Mini-SNPs) en combinación con una química tolerante a los inhibidores de PCR, han permitido obtener un alto grado de éxito en este tipo de investigaciones. Nuestra experiencia en este sentido ha sido muy positiva habiendo obtenido perfiles STR reproducibles (parciales y complementados con el estudio de Mini-STRs o completos) en 39 de los 40 cadáveres

analizados (97,5% de éxito).

La mayoría de los extractos de ADN obtenidos de los cadáveres fueron analizados en diversas reacciones STR-multiplex de PCR con distinta carga de ADN genómico. Además, en una gran proporción de casos hubo que analizar distintas muestras de un mismo cadáver para asegurar la reproducibilidad de los resultados y obtener un perfil STR fiable (76 extractos de ADN analizados en 40 víctimas, **Tabla 1**).

NÚMERO DE CADAVERES	NÚMERO DE FOSAS	EXTRACTOS DE ADN DE LOS RESTOS ÓSEOS	MUESTRAS DE REFERENCIA	ANÁLISIS DE ADN REALIZADOS
40	9 De 1 (2 casos), 2 (2 casos), 4, 5, 7 (2 casos) y 11 individuos	76 • 58 Extractos de ADN de Piezas dentales. • 18 Extractos de ADN Huesos largos	33 (correspondientes a 29 Grupos familiares distintos) • 15 hijos • 3 hermanas • 4 hermanas • 5 sobrinos paternos • 1 sobrina materna • 1 sobrina paterna • 4 nietos	Marcadores STR Autosómicos: • Estándar CODIS (13 STRs) (Profiler + Cofiler kits) • Estándar CODIS + D2S1138 + D19S433 (15 STRs) (Identifiler Kit) • Nuevo Estándar Europeo de 12 STRs + SE33 + D16S539 + D2S1138 + D19S433 • (16 STRs) (ESX17, ESI17 y NGM kits) Marcadores Mini-STR Autosómicos • NC01 y NC02 NIST Multiplexes y Minifiler kit Marcadores STR del Cromosoma Y • 17 Y-STR (PowerPlex Y e Yfiler kits) Marcadores ADN Mitocondrial • Regiones HV1 y HV2

Tabla 1. Muestras y Análisis realizados

Este dato es indicativo de la dificultad del análisis genético de algunos de los restos investigados en los que la degradación del ADN disminuye drásticamente el número de copias de ADN genómico amplificables por PCR y puede generar en dicho proceso para algunos STRs (los de mayor tamaño) ciertos artefactos que es necesario tener presentes en la interpretación de los resultados, tales como la "perdida alélica" (*"Allele Dropout"*) que puede dar lugar a falsos homocigotos.

En la **Figura 1** se presenta un perfil genético completo obtenido mediante el análisis de 15 STRs y el marcador de sexo Amelogenina (AMG) (Kit Identifiler) a partir de una pieza dental en el que pueden observarse algunos desbalances alélicos o pérdidas alélicas parciales en algunos marcadores con un tamaño superior a los 200 nucleótidos.

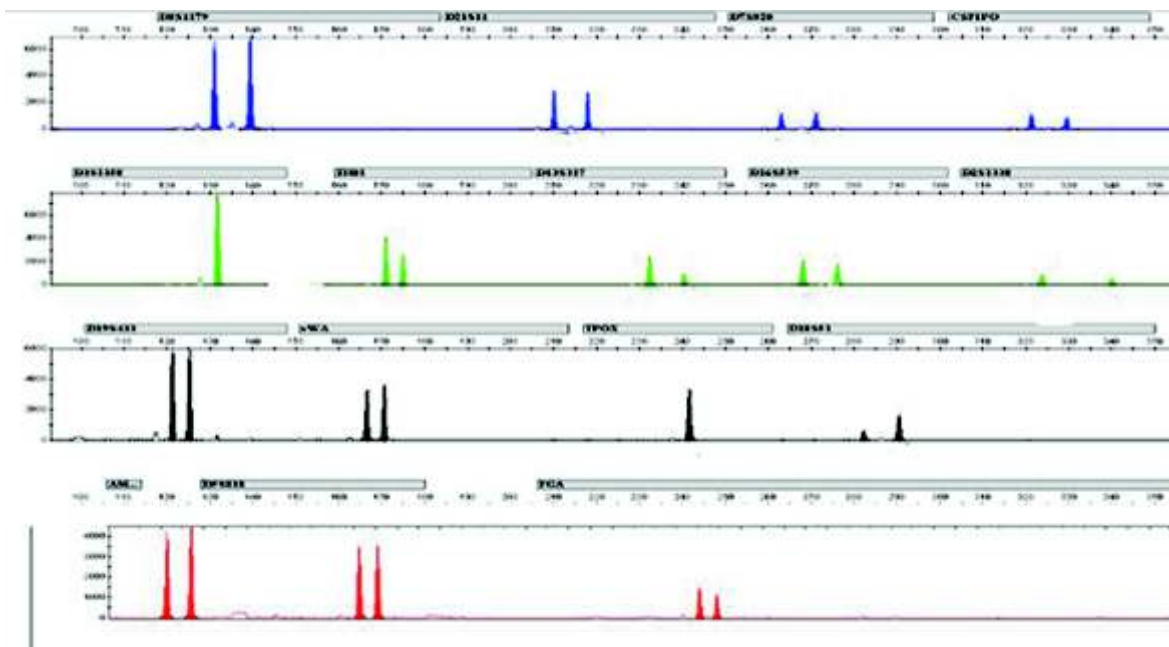


Figura 1. Perfil de STRs Autosómicos (kit Identifiler) de un desaparecido de la guerra civil Española obtenido a partir de una pieza dental. (Se ha eliminado la nomenclatura de los alelos por razones de confidencialidad).

B) DISPONIBILIDAD DE MUESTRAS DE FAMILIARES Y MEMORIA HISTÓRICA.

En nuestra experiencia la falta de disponibilidad de familiares (o de familiares adecuados para el análisis genético) ha sido una de las principales limitaciones en este tipo de investigaciones. Como puede verse en la Tabla 1 no en todos los casos se obtuvieron muestras de familiares (29 grupos familiares distintos para identificar 40 cadáveres) o estos no permitían realizar un diagnóstico de exclusión (5 grupos familiares) lo que impidió la posible identificación de 16 de las 40 víctimas en estudio. Esta falta de disponibilidad ha sido el mayor inconveniente para el éxito de estas investigaciones de identificación genética siendo el responsable de la inviabilidad de la identificación del 40% de las víctimas.

Otro de los retos afrontados en este tipo de investigaciones fue el error en la localización de algunas fosas, basada en el testimonio oral que testigos de la época han tenido que recordar más de medio siglo después de los hechos.

En concreto, en una de las fosas analizadas (fosa de 7 cadáveres) se excluyeron a todas las víctimas que se presumían contenía la fosa investigada mediante el análisis comparativo con distintas muestras de referencia (hijos y hermanos), permaneciendo los cadáveres todavía sin identificar. En otra de las fosas investigadas (Fosa de 11 cadáveres) tras un primer análisis genético en el que se descartó la supuesta identidad de las víctimas, se recibieron nuevas muestras de otros grupos familiares que llevaron a la comunicación de 4 compatibilidades genéticas.

C) RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN GENÉTICA.

En la **Tabla 2** se recoge el número de cadáveres que ofrecieron compatibilidad genética con las distintas muestras de referencia (11 cadáveres; 27% del total de cadáveres investigados), así como el índice de verosimilitud dependiendo del tipo de marcador genético y tipo de herencia investigados.

TIPO DE RELACION INVESTIGADA	NUMERO DE CADÁVERES CON RESULTADO DE COMPATIBILIDAD GENÉTICA	MARCADORES GENÉTICOS en los que se basa la compatibilidad	RANGOS DEL INDICE DE VEROSIMILITUD (LR: Likelihood Ratio)
Cadáver / Hijo o Hija	7	STRs Autosómicos	1.098.858.6185 – 16.096
Cadáver / Hermano Varón	2	STRs Autosómicos	22.603.937/ 1.644.886
		STRs Cromosoma Y	899/2.000
		MtDNA (HV1/HV2)	238/15
Cadáver / Hermana	1	STR Autosómicos	97
		mtDNA	125
Cadáver / Sobrino paterno	1	STRs Cromosoma Y	27.740

Tabla 2. Resultados de identificación genética.

Como puede observarse en la **Tabla 2** el análisis genético de descendientes directos de las víctimas (hijos e hijas), basado fundamentalmente en el análisis de STRs autosómicos aportó en 7 casos valores de LR siempre por encima de 10.000, lo que indica que los resultados de compatibilidad genética observados entre cadáver e hijo o hija son al menos 10.000 más probables si consideramos la relación de parentesco investigada como cierta frente a la hipótesis de que se traten de individuos no relacionados genéticamente.

En el caso de disponer de un supuesto hermano varón de alguno de los cadáveres varones se realizó un análisis combinado de STRs autosómicos (que tiene la limitación de no permitir excluir la relación investigada de hermandad), STRs de cromosoma Y y ADN mitocondrial.

En el caso de disponer solamente de una supuesta hermana el análisis se basó exclusivamente en el estudio de STRs autosómicos y ADN mitocondrial.

En un caso se comunicó una compatibilidad basada en el haplotipo de STRs del cromosoma Y entre un supuesto sobrino paterno y un cadáver varón con un valor de LR de 27.740 (**Tabla 2**).

D) BASES DE DATOS DE ADN Y BÚSQUEDA DE DESAPARECIDOS.

Aunque los casos presentados (con un bajo número de víctimas en cada fosa) no han necesitado de un análisis genético comparativo entre un gran número de perfiles de ADN, el avance producido en los últimos años en el desarrollo de sistemas informáticos para búsquedas sistemáticas de perfiles de ADN estructurados en bases de datos, posibilita en la actualidad la comparación tanto de perfiles STRs autosómicos, como de STRs de Cromosoma Y y ADN mitocondrial con especial interés en la identificación genética de fosas con un alto número de víctimas o para el análisis genético sistemático de distintas fosas de una misma región.

En la actualidad el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses es una de las instituciones españolas acreditadas de acuerdo a la norma UNE / ISO 17.025 en el ámbito de la genética forense y forma parte de la Red CODIS [14], disponiendo de un servidor local (Software CODIS 7.0 para investigación criminal e identificación de desaparecidos) en el Ministerio de Justicia conectado con el nodo nacional de la base de datos sobre identificadores obtenidos a partir del ADN [15] al que contribuye tanto en el ámbito de la

identificación de desaparecidos como en la investigación criminal de acuerdo a las solicitudes de las autoridades judiciales.

4. CONCLUSIONES.

Si bien en un principio cabría pensar que la mayor dificultad para la identificación genética de las víctimas de la guerra civil española podría ser la propia antigüedad y el estado de deterioro de los restos cadavéricos y de su ADN, este trabajo demuestra que en la actualidad los laboratorios de genética forense disponen de un conjunto de herramientas genéticas basadas en la PCR que permiten obtener, en una alta proporción de los restos óseos investigados, perfiles de ADN nuclear (97,5%) y ADN mitocondrial (100%) reproducibles y fiables.

Las mayores dificultades observadas tienen que ver con la falta de disponibilidad de familiares de referencia adecuados (sólo 24 grupos familiares) para el análisis comparativo con los perfiles genéticos obtenidos de los restos (40 cadáveres) y con los posibles errores en los procesos de localización de las fosas (2 casos) llevados a cabo en base a testimonios orales realizados varios años después de los hechos.

El uso de aplicaciones informáticas, recientemente desarrolladas, que posibilitan la gestión de un gran número de muestras y perfiles de ADN y que ofrecen distintos algoritmos de comparación tanto de perfiles STRs autosómicos, como de STRs de Cromosoma Y y ADN mitocondrial, se convierte en un procedimiento indispensable en la identificación genética de fosas con un alto número de víctimas o en el análisis genético sistemático de distintas fosas de una misma región.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- [1] Orden PRE/2568/2011, de 26 de septiembre, por la que se publica el Acuerdo del Consejo de Ministros de 23 de septiembre de 2011, por el que se ordena la publicación en el Boletín Oficial del Estado del Protocolo de actuación en exhumaciones de víctimas de la guerra civil y la dictadura. (BOE 27/09/2011)
- [2] Mapa de Fosas. Ministerio de Justicia http://mapadefosas.mjusticia.es/exovi_externo/CargaInformacion.htm;jsessionid=axqG5HwnAQK3arS53eXZPQ*.vi03_inst4
- [3] Exhumaciones llevadas a cabo en España desde el año 2000. Ministerio de la Presidencia. http://politicasdelamemoria.org/images/stories/documentos/listado_exhumacionesn.pdf
- [4] Recomendaciones para la recogida y envío de muestras con fines de identificación genética. Grupo Español Portugués de la Sociedad Internacional Genética Forense (GEP-ISFG). Madeira 02 de Junio de 2002 <http://www.gep-isfg.org/documentos/Recogida%20de%20evidencias.pdf>
- [5] Orden JUS/1291/2010, de 13 de mayo, por la que se aprueban las normas para la preparación y remisión de muestras objeto de análisis por el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. <http://www.boe.es/boe/dias/2010/05/19/pdfs/BOE-A-2010-8030.pdf>
- [6] ALONSO A, ANDELINOVIC S, MARTÍN P, SUTLOVIC D, ERCEG I, HUFFINE E, DE SIMÓN LF, ALBARRÁN C, DEFINIS-GOJANOVIC M, FERNÁNDEZ-RODRIGUEZ A, GARCÍA P, DRMIC I, REZIC B, KURET S, SANCHO M, Primorac D. DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples. *Croat Med J*;42(3):260-6. 2001 Jun.
- [7] ALONSO, A., MARTIN, P., ALBARRÁN. C., GARCÍA, P., GARCÍA, O., DE SIMÓN, L.F., GARCÍA-HIRSCHFELD, J., SANCHO, M., DE LA RÚA, C. & FERNÁNDEZ-PIQUERAS, J. Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. *Forensic Sci Int*. 139, 141-149. (2004).
- [8] BARBISIN M, FANG R, O'SHEA CE, CALANDRO LM, FURTADO MR, SHEWALE JG. Developmental validation of the Quantifiler Duo DNA Quantification kit for simultaneous quantification of total human and human male DNA and detection of PCR inhibitors in biological samples. *J Forensic Sci*; 54(2):305-19. 2009 Mar.