



UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI



Facultat de
Química
Tarragona



**ESTUDIO GENÉTICO PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE RESTOS ÓSEOS
HUMANOS ENCONTRADOS EN FOSAS
COMUNES DE RIVAS Y FARASDUÉS (EJEA)
DE LA PROVINCIA DE ZARAGOZA**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER EN GENÉTICA,
FÍSICA Y QUÍMICA FORENSE**

DAVID ANDRÉS TAPIA MALDONADO

Centro de prácticas: Nasertic-Navarra de Servicios y Tecnologías

Tutor de prácticas: Mariola Elia López

Tutor de la URV: Josep María Serres

2021-2022

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 ADN.....	6
1.1.1 ADN Codificante.....	7
1.1.2 ADN no codificante.....	7
1.2 ADN no codificante de interés forense: STR.....	8
1.3 Cromosoma Y: su uso en genética forense	9
1.4 ADN Mitocondrial	10
1.5 SNP en el uso forense.....	11
1.6 Recuperación de ADN en distintos escenarios del ámbito forense.....	12
1.7 Prueba de LR valor estadístico.....	13
1.8 Memoria histórica.....	14
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1 Muestras Dubitadas: Registro de Laboratorio	17
3.2 Preparación de la muestra para huesos	17
3.3 Preparación de la muestra para dientes	18
3.4 Pulverización del hueso/diente.....	18
3.4.1 Freezer Mill.....	18
3.5 Extracción de ADN	19
3.6 Cuantificación de ADN.....	20
3.7 Amplificación de ADN.....	21
3.8 Análisis de fragmentos.....	22
3.9 ADN mitocondrial.....	22
3.9.1 Amplificación de ADN mitocondrial	22
3.9.2 Secuenciación de mtADN con Applied Biosystem 3500	23
3.10 Análisis Estadístico	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
4.1 Fosa Común de Rivas	24
4.1.1 Caso 1. Compatibilidad de resto biológico H22/00175 (Individuo 9) / H22/00177 (Cráneo Suelto) con muestra indubitada H22/00291.....	25

4.1.2	Caso 2. Compatibilidad de resto biológico H22/00168 (Individuo 2) con muestra indubitada H22/00288	26
4.2	Fosa Común de Farasdués	27
4.2.1	Caso 3. Compatibilidad de resto biológico (Individuo2) H22/00509 con muestras indubitadas H21/00531, H21/00532, H22/00283	29
4.2.2	Caso 4. Compatibilidad de resto biológico H22/00508 (Individuo 1) con muestras indubitadas H21/00533, H21/00632, H22/00282	30
5.	CONCLUSIONES	33
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
7.	ANEXOS	41

Abreviaturas

STR: Repeticiones Cortas en Tándem autosómicas

Y-STR: Repeticiones Cortas en Tándem del cromosoma Y

SNP: Polimorfismo de nucleótido único

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNmt: Ácido Desoxirribonucleico mitocondrial

rCRS: Secuencia de Referencia de Cambridge

Loci: Posición de un gen en un cromosoma

NGS: Secuenciación Masiva o de Nueva Generación

LR: Likelihood Ratio o Razón de Verosimilitud

IP: Índice de Paternidad

W: Probabilidad de Paternidad

RESUMEN

La genética forense desde los años 80 se ha consolidado como una práctica esencial dentro del sistema judicial para el esclarecimiento de hechos delictivos tanto del ámbito civil como del criminal. Los descubrimientos del genoma humano y del ADN mitocondrial enfocado en la práctica forense han motivado la capacitación de muchos laboratorios para el análisis de muestras dubitadas procedentes de un vestigio biológico (uñas, pelo, saliva, sangre, huesos o semen) para poder compararlo con muestras de referencia o indubitadas. En este trabajo se describe la identificación de 4 restos óseos de las fosas comunes de Rivas y Farasdués localizadas en Ejea de los caballeros, (Zaragoza) correspondiente a víctimas de la guerra civil española. Se describen los métodos analíticos utilizados para la identificación: Extracción de ADN, Cuantificación por q-PCR, Amplificación y Secuenciación. Tres de los restos óseos de los casos 1,2 y 3 presentan una probabilidad de paternidad W por encima de 99,999 %. El resto óseo del caso 4 presenta una probabilidad de paternidad del 96 % y un haplotipo mitocondrial coincidente con un familiar en segundo grado por vía materna. La limitación más importante que se encontró en este estudio fue el rastreo y la falta de disponibilidad de familiares para el análisis de parentesco con los restos biológicos.

Palabras Clave: ADN, STR, ADNmt, Óseo, Dubitado, Indubitado, LR, IP, W

ABSTRACT

Since the 1980s, forensic genetics has established itself as an essential practice within the judicial system for the clarification of criminal acts, both in the civil and criminal spheres. The discoveries of the human genome and mitochondrial DNA focused on forensic practice have motivated the training of many laboratories for the analysis of dubious samples from a biological vestige (nails, hair, saliva, blood, bones or semen) in order to compare it with samples of reference or indubitable. This paper describes the identification of 4 bone remains from the mass graves of Rivas and Farasdués located in Ejea de los Caballeros, (Zaragoza) corresponding to victims of the Spanish Civil War. The analytical methods used for identification are described: DNA extraction, Quantification by q-PCR, Amplification and Sequencing. Three of the bone remains of cases 1, 2 and 3 present a probability of paternity W above 99.999%. The bone remnant of case 4 has a 96% probability of paternity and a mitochondrial haplotype that coincides with a second-degree maternal relative. The most important limitation found in this study was the tracking and the lack of availability of relatives for the analysis of relationship with the biological remains.

Keywords: DNA, STR, mtDNA, Bone, Dubitable, Indubitable, LR, IP, W

1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia de la humanidad siempre ha sido un desafío encontrar un método fiable para la identificación e individualización de personas cuando ocurre algún suceso tanto en el ámbito civil como el criminal. A partir del siglo XX se han puesto en práctica algunos métodos que son efectivos a la hora de identificar a un individuo; como es el caso de las huellas dactilares (lofoscopia), grupo sanguíneo, antropología para el caso de cadáveres o análisis odontológicos. Con el descubrimiento del ADN y el nacimiento de la genética forense en el último siglo se ha abierto un amplio abanico de posibilidades y se ha convertido en un método indispensable en cualquier parte del planeta para poder resolver aquellos casos forenses en donde los métodos mencionados anteriormente no serían útiles. Existen una amplia variedad de vestigios biológicos que pueden ser analizados en el laboratorio (uñas, pelo, saliva, sangre, huesos o semen). Todas estas muestras posteriormente son enviadas a diferentes bases de datos para su tratamiento y comparación entre los distintos individuos que han podido estar implicados en algún tipo de delito o crimen. (Delgado & Neyra, 2019; Daeid et al., 2021).

1.1 ADN

El genoma humano es un término utilizado para describir la secuencia en forma de pares de bases que conforman el ADN. Esta estructura tan misteriosa se encuentra localizada en el núcleo de las células y contiene todas las instrucciones celulares necesarias para la síntesis de proteínas, que es responsable en última instancia de la fisiología y morfología de las células (Alonso, 2004).

El ADN se condensa en un cierto tipo de estructuras denominadas cromosomas a través de la interacción de histonas y otras proteínas. Los seres humanos poseen 23 pares de cromosomas, 22 de los cuales son autosomas y un par de cromosomas sexuales (XX para mujeres, XY para hombres). Se estima que el genoma humano contiene alrededor de 3300 millones de pares de bases, de los cuales aproximadamente el 2 % se considera ADN codificante, el 80 % es ADN funcional no codificante y el resto tiene una función u origen desconocido (Lichten & Massy, 2011; Dolezel et al., 2012).

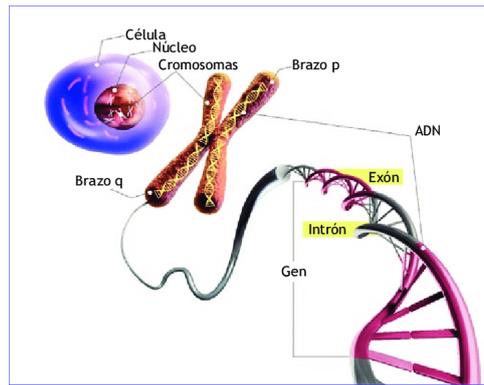


Figura 1. Estructura de un cromosoma (Juárez et al., 2017)

Millones de células de las que están compuestas nuestros órganos y tejidos internos (con la excepción de las células sexuales y algunas células como los glóbulos rojos, que han perdido su núcleo) contienen el mismo conjunto de información genética. Así, independientemente del órgano o tejido del que se extraiga el ADN de un determinado sujeto, la composición genética resultante será la misma. El principio básico universal de transmisión genética entre las distintas poblaciones humanas se basa en el análisis genómico comparativo realizado entre muestras dubitadas (generalmente, un rastro biológico encontrado en la escena del crimen o en el cuerpo de una víctima: sangre, semen, saliva, cabello, restos epidérmicos, tejido o huesos) y una muestra indubitada tomada de una persona sospechosa al dejar el material genético encontrado en la escena de crimen o muestra de referencia (Alonso, 2004; Ramón y Cajal & Hümmmer, 2018).

1.1.1 ADN Codificante

La cantidad total de ADN en una célula es de unos 3 mil millones de nucleótidos. Un pequeño fragmento de ADN que contiene información para la síntesis de proteínas o ARN se denomina gen (su tamaño puede variar entre 3.000 a 100.000 nucleótidos). Se estima que el número de genes humanos es de aproximadamente 30.000, y actualmente se desconoce la función de más del 50% de estos (Alonso, 2004; Ramón y Cajal & Hümmmer, 2018).

1.1.2 ADN no codificante

El resto del ADN, que representa la mayor parte del genoma nuclear humano, se compone en gran parte de secuencias de ADN repetitivas sin función aparente y a menudo, se lo denomina “ADN no codificante” en el sentido de que no codifica para la formación de

proteínas. (Ramón y Cajal & Hümmer, 2018). Estas repeticiones se las puede clasificar de la siguiente manera:

- Satélites: Son regiones grandes de repeticiones en tándem del ADN no codificante con un tamaño que van desde dos hasta más de diez mil nucleótidos.
- Minisatélites: Comprenden entre 7-100 pb repetidas generalmente de 5-50 veces en tándem. Los polimorfismos varían en longitud entre 500-10000 nucleótidos.
- Microsatélites: Constituye un 30 por ciento del ADN no codificante. Presentan unidades de repetición que oscilan entre 1 y 8 pares de bases, en un número comprendido entre las 3 y las 60 unidades.

1.2 ADN no codificante de interés forense: STR

En el interior del genoma humano se encuentran unas secuencias repetidas que generalmente no se localizan en una región codificante, denominadas STR por su acrónimo en inglés (short tandem repeat). Estas secuencias cortas de repetición en tándem están compuestas por motivos recurrentes de ADN de entre 2-6 pares de bases y funcionan en la población humana como una huella dactilar o como si fuera un código de barras. Son muy útiles en el diagnóstico molecular, estudios poblacionales y análisis de filiación o paternidad. (Tilanus, 2006; Somanathan & Mathur, 2017).

Los STR siguen un patrón de herencia mendeliana en la cual los descendientes heredan un alelo de cada padre. Por lo tanto, los resultados del análisis de fragmentos de STR en un electroferograma muestran un solo pico cuando existe homocigosis o dos picos que indican heterocigosis en un determinado locus (figura 2).

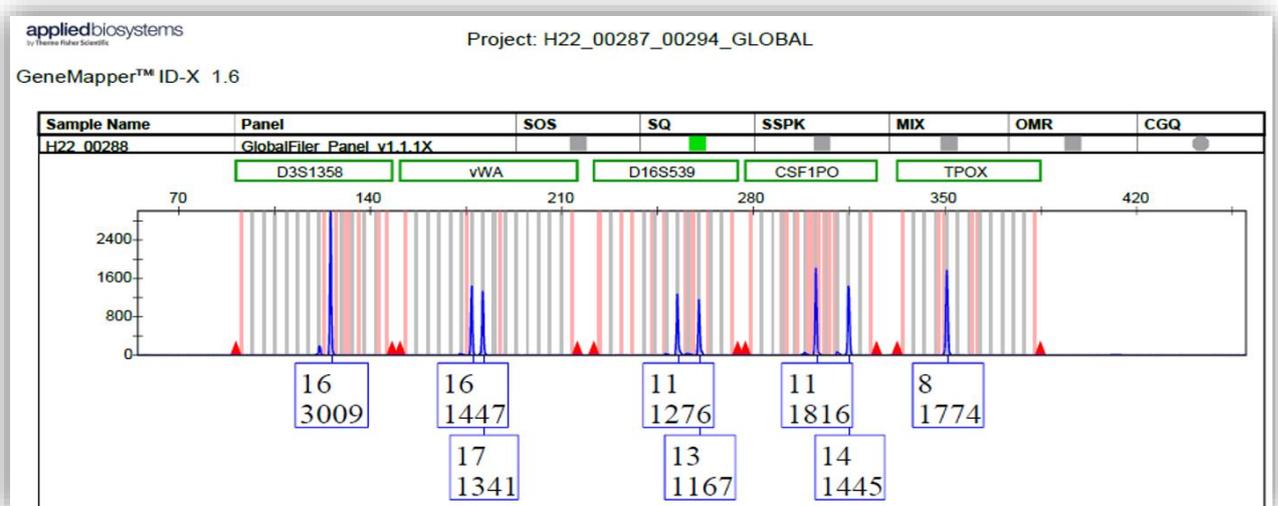


Figura 2. Electroferograma de STR's Autosómicos

Su tamaño corto, su alto grado de polimorfismo, la gran facilidad de amplificación o el desarrollo del sistema multiplex alcanzado en la actualidad han aumentado la utilidad de estos marcadores (Castella et al., 2013). Aunque los kits utilizados hoy en día han facilitado el análisis de muestras desafiantes (Mulero & Hennessy, 2012), solo un conjunto específico de marcadores STR se incluyen en ellos para el análisis de ADN en diversas poblaciones en todo el mundo (Butler, 2007).

Para obtener información válida y generar bases de datos fiables, se ha propuesto un conjunto básico de marcadores STR en aplicaciones forenses y casos de paternidad. Es importante obtener un número de marcadores apropiado para conseguir un alto índice de discriminación entre los individuos analizados. Actualmente, solo EE.UU. (CODIS y CODIS expandido), la Unión Europea (ESS) y el Reino Unido (DNA 17) han recomendado su set básico de loci STR (Stanciu et al. 2013; Grover et al. 2017; Novroski et al. 2019)

1.3 Cromosoma Y: su uso en genética forense

El cromosoma Y está formado por secuencias polimórficas altamente repetitivas ubicadas principalmente en la parte heterocromática del brazo largo del cromosoma. Gran parte del cromosoma no se recombinan durante la meiosis, y la no recombinación determina que todas las secuencias ubicadas en esta región se hereden en conjunto o bloque, formando un haplotipo, transmitido de padres a hijos a través de las generaciones (figura 4). Por lo tanto, estas variantes polimórficas contienen información sobre la historia del linaje del padre (Tilford et al., 2001).

A partir de 1992 tras la publicación de la primera STR polimórfica descubierta en la parte no recombinante del cromosoma Y, y su aplicación inmediata a casos forenses se desarrollaron más marcadores Y-STR para haplotipos forenses (Gopinath et al., 2016; Hall & Ballantyne, 2003; Vermeulen et al., 2009). Existe una gran variedad de autores que relacionan el uso de cromosoma Y con casos de agresiones sexuales. En estos casos, el perfil de STR autosómico del componente femenino es conocido por los investigadores y peritos forenses por el exceso de células epiteliales a partir de la muestra de referencia de la víctima. Sin embargo, debido a la amplificación preferencial del componente principal de ADN es a menudo difícil, y en muchos casos imposible seleccionar el perfil de STR autosómico del componente masculino de la mezcla. Aquí es donde entra en juego el perfil de los STR's del cromosoma Y, ya que solo el perpetrador masculino posee un

cromosoma Y (Kayser, 2007). Hasta la actualidad, aproximadamente 27 marcadores están incluidos en los kits comerciales de Y-STR (Yfiler Plus, Thermo Fisher Scientific) (Gopinath et al., 2016). Debido a la alta diversidad de haplotipos lograda, estas herramientas permiten la caracterización de un linaje paterno con alto, aunque no máximo, grado de certeza (Purps et al., 2014).

1.4 ADN Mitocondrial

Las mitocondrias se encuentran en todas las células humanas nucleadas y generan la mayor parte de la energía celular. Han sido útiles para la identificación humana debido a la alta tasa de mutación en determinadas regiones del DNA mitocondrial que ocurren tras el paso de los años entre las distintas generaciones de individuos. Cada célula humana nucleada contiene generalmente varios miles de copias de mitocondrias citoplasmáticas dependiendo de las necesidades energéticas del tejido. Además de la producción de energía, las mitocondrias participan en otros procesos, como la homeostasis del calcio, la biosíntesis de hormonas hemo y esteroides; la apoptosis y la regulación del ciclo celular (El-Hattab & Scaglia, 2016).

El mtDNA se presenta como un genoma supercompilado de doble cadena de 16.569 pares de bases (~16,6 kb) que contiene 37 genes, incluyendo 13 genes de subunidades complejas de codificación de proteínas ETC, 22 genes de ARN de transferencia (tRNA)

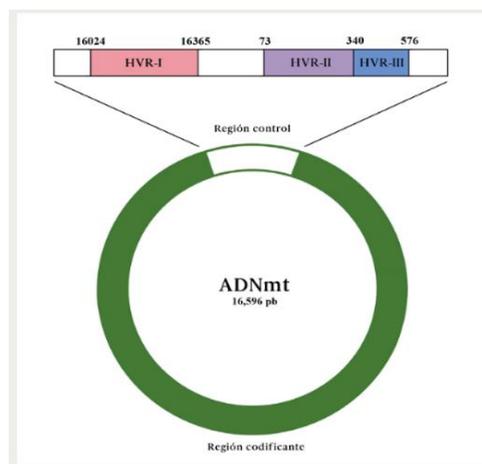


Figura 3. Region HV I,II y III. (Corona & Estrada, 2021)

y 2 genes de ARN ribosomal (rRNA). Las dos hebras de mtDNA se denominan hebras pesadas (H) y ligeras (L), con las primeras ricas en nucleótidos de guanina y las segundas ricas en citosinas. Contienen una región control o D-loop de ~ 1.1 kb que alberga los promotores de hebras H y L y el origen de la replicación de hebras H (OH). Estas regiones

son de especial interés en la práctica forense, ya que el análisis de las mismas permite un cierto poder de discriminación entre individuos que compartan una misma línea materna (figura 4). En la región control o D-loop se pueden encontrar la región hipervariable I, II y III que son aquellas regiones en donde suceden la mayoría de las mutaciones mitocondriales y que son muy utilizadas para la determinación de diferentes haplogrupos entre las distintas poblaciones del planeta (Lang et al., 1999) (Holt et al., 2007).

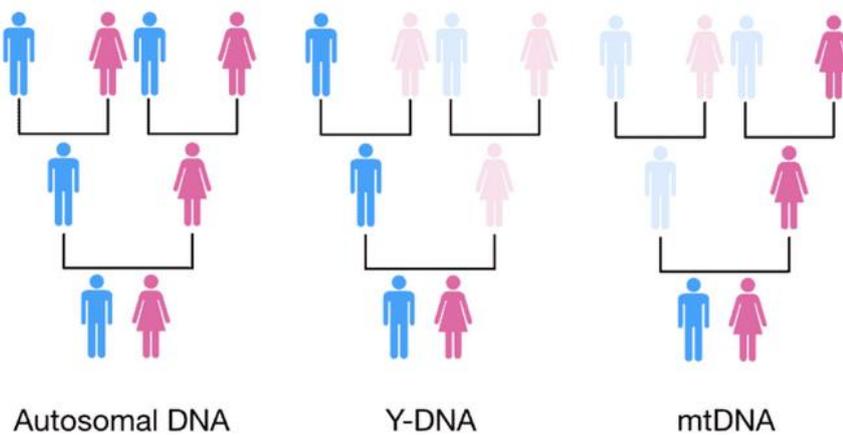


Figura 4. Herencia de ADN autosómico, Y-DNA y ADNmt (Shah, 2022)

1.5 SNP en el uso forense

Se denominan polimorfismo de un solo nucleótido o SNP a las distintas alteraciones de ADN como resultado de mutaciones en una sola base en la secuencia del genoma. En la actualidad, se estudian en profundidad para saber cómo este tipo de mutaciones afectan a distintas enfermedades o en la respuesta de medicamentos. Suelen ser útiles para resolver algunos problemas cuando los STR's no son de tanta utilidad. Tras el paso del tiempo se han ido considerando (Butler et al., 2007; Amorim & Pereira, 2005) como marcadores adicionales, proporcionando valores de verosimilitud (LR) más altos y fiables.

A pesar de que casi todos los SNP son bialélicos y, en consecuencia, menos polimórficos que los STR multialélicos, tienen varias ventajas conocidas sobre los STR: los SNP son marcadores genéticos más estables, con bajas tasas de mutación y, por lo tanto, menos cambios probables durante generaciones, lo cual es crucial como, por ejemplo, en casos de paternidad. Además, el procesamiento de estas muestras requiere de un análisis más

barato, más fácil y más rápido, así mismo exigen un consumo de ADN mucho menor debido al alto grado de multiplexación (Kayser & De Knijff, 2011).

En los últimos años, los SNP han ido ganando terreno en el campo forense enfocado sobre todo en la problemática de muestras de ADN con la presencia de más de un contribuyente. Así, por ejemplo, algunos autores como Voskoboinik et al., 2015 evalúan la utilidad práctica de los microarrays SNP comerciales disponibles para casos forenses complejos en los que se analizan perfiles de tipo mezcla. Se descubrió que un conjunto de 3000 SNP's seleccionados específicamente para este propósito puede identificar con precisión la presencia de un individuo en mezclas complejas de ADN. Según los autores, los individuos que aportan tan solo un 5 % a una mezcla compleja pueden identificarse de forma sólida incluso si la cantidad de ADN inicial es de tan solo 5 nanogramos. El trabajo presentado en este estudio representa una prueba de que el enfoque propuesto puede funcionar con muestras reales de tipo forense (Voskoboinik et al., 2015).

1.6 Recuperación de ADN en distintos escenarios del ámbito forense

El Principio de Intercambio de Locard teoriza que un intercambio entre dos objetos ocurre cuando estos entran en contacto entre sí. Se ha documentado que los individuos tienen la capacidad de transferir su ADN a los objetos simplemente con el tacto. Este hecho se conoce como desprendimiento; y el grado en el que ocurre varía entre individuos. Este fenómeno puede ser muy beneficioso para la comunidad científica forense, especialmente para intentar obtener un perfil de ADN a partir de ciertas evidencias como huellas dactilares, bombas caseras o cartuchos encontrados en una determinada escena de crimen (Van Oorschot & Jones, 1997).

A pesar del potencial del intercambio de material genético, el perito forense puede encontrar dificultades al tratar de recuperar el ADN, específicamente cuando existe una baja cantidad de ADN y/o daño del ADN debido a la degradación. Para el análisis de muestras degradadas, se suele optar generalmente por la amplificación de fragmentos más pequeños (Zhang & Wu, 2005). Para solucionar este aspecto, aparecen en el mercado los mini STR. Estos marcadores se amplifican mediante cebadores que se unen en una posición más cercana de las regiones diana, lo que da lugar a tamaños de amplicón más pequeños, de aproximadamente 50 a 280 pb (Opel et al., 2006).

1.7 Prueba de LR valor estadístico

Los profesionales forenses pueden evaluar los resultados de su análisis desde dos puntos de vista opuestos (desde el punto de vista del fiscal y desde el punto de vista de la defensa) mediante un cociente conocido como razón de verosimilitud o LR. Este es el método de valoración más aceptado en la actualidad, tal y como recomiendan varias de las sociedades forenses internacionales más importantes (Gill et al., 2006) (Crespillo et al., 2019).

Para calcular un LR, es necesario establecer al menos dos hipótesis sobre eventos que deben ser mutuamente excluyentes (si una es verdadera, la otra debe ser falsa), por ejemplo:

Ha (hipótesis de la acusación) = el perfil genético hallado en la escena del crimen pertenece al acusado.

Hd (hipótesis de la defensa) = el perfil genético hallado en la escena del crimen NO pertenece al acusado.

El LR mide cuánto más probable es que tengamos estos resultados genéticos si asumimos que el acusado es el donante de la muestra biológica; que si asumimos que otro individuo sea el que haya dejado su material biológico en la escena del crimen. La fórmula que define estas premisas es la siguiente:

$$LR = \frac{P(E|H_a)}{P(E|H_d)} =$$

probabilidad de obtener los resultados de la prueba genética suponiendo que el perfil pertenece al acusado
probabilidad de obtener los resultados de la prueba genética suponiendo que el perfil NO es del acusado

Figura 5. Fórmula de LR (Crespillo et al., 2019)

El valor que puede resultar tras realizar un cálculo de LR puede oscilar entre 0 hasta el infinito. Cuanto más aumenta este valor, mayor aceptación tiene la hipótesis del fiscal o de la acusación; con valores bajos entonces se apoyaría a la hipótesis de la defensa. Algo que suele confundirse con el valor del cálculo estadístico es que en ninguno de los casos el LR puede decirnos si una hipótesis planteada es verdadera o falsa, lo que nos indica es simplemente la probabilidad de una sobre otra.

1.8 Memoria histórica

A lo largo de la historia han ido apareciendo una serie de eventos catastróficos que han provocado víctimas múltiples, como puede ser el caso de terremotos, tsunamis, accidentes aéreos, accidentes por vía terrestre, etc. Algunos de ellos no obstante han sido provocados por intervención humana, como es el caso de los conflictos bélicos. Cuando existe un gran número de víctimas mortales, la identificación por métodos tradicionales dificulta la determinación de los restos encontrados, sin embargo, el uso de la genética ha podido solucionar y facilitar en la mayoría de los casos el reconocimiento de muchos individuos (Vallejo & Alonso, 2009).

La genética forense no se ha utilizado solamente para la identificación de personas, sino también para establecer una relación de parentesco entre individuos con sus respectivos cálculos estadísticos, que nos puede ayudar a precisar en mayor o menor medida el grado de parentesco entre una muestra biológica recogida post mortem, y una muestra perteneciente a una persona con algún lazo familiar ante mortem (Vallejo & Alonso, 2009).

En Europa existen varios estudios e investigaciones sobre exhumaciones de fosas comunes de conflictos armados ocurridos en la segunda guerra mundial – Rusia (Morild et al., 2015), en Eslovenia (Zupanič Pajnič et al., 2020) o en Italia (Pilli et al., 2018). Uno de los aspectos comunes de estos estudios consiste en la desaparición de personas. Por tanto, para poder identificar a las víctimas se realizan estudios de localización, intervención y exhumación de los restos humanos y posteriormente se analizan los restos de manera antropológica y genética.

Desde ya hace algunos años, diversas asociaciones españolas han reivindicado la importancia de identificar los restos óseos de personas desaparecidas en la guerra civil española. Estas exhumaciones se han realizado desde fosas comunes de diferentes localizaciones geográficas del país logrando hasta el momento intervenir cerca de 777 fosas comunes, recuperando un total de 9552 esqueletos de familiares desaparecidos (Etxebarria, 2020). En este trabajo se describe el análisis genético de los restos óseos encontrados en la fosa común 1 de Rivas y la fosa común 1 de Farasdués, de la localidad del municipio de Ejea de los Caballeros, en la provincia de Zaragoza. El trabajo de exhumación fue llevado a cabo por el arqueólogo Director: Francisco Javier Ruiz Ruiz; la antropóloga forense: Miriam Gracia Martínez; el restaurador: José Antonio Rodríguez Martín; la historiadora: Cristina Sánchez Martínez y los arqueólogos: Ana Rubio Zaurín y Ricardo Gayán Romero. La financiación de este proyecto ha sido promovida por Asociación Memoria Histórica Batallón Cinco Villas y Asociación Charata para la Recuperación de la Memoria Histórica de Uncastillo (García et al., 2021; Ruiz, 2008).



Figura 6. Fosa común de Rivas y Farasdués. (Ruiz, 2021; García et al., 2021)

2. OBJETIVOS

Tras adquirir los conocimientos teórico-prácticos en el máster, el objetivo principal de las prácticas realizadas en la empresa Nasertic consiste en aplicar estos conocimientos en el ámbito del ADN humano. Los objetivos derivados de las prácticas en la empresa son los siguientes:

- Extracción de ADN e identificación de restos óseos de las fosas comunes de Rivas y Farasdués localizadas en Ejea de los caballeros, (Zaragoza) correspondiente a un total de 12 individuos.
- Amplificación y secuenciación de STR's mediante el uso del kit comercial Global Filer / Yfiler Plus y posterior análisis con el software GeneMapper.
- Amplificación y secuenciación mediante electroforesis capilar de la región HV1, HV2 y HV3 del ADN mitocondrial de los restos óseos que no puedan identificarse de manera directa por filiación Padre-Hijo.
- Análisis de electroferogramas y mutaciones mitocondriales (haplotipos) para establecer una comparación entre los distintos familiares rastreados en las cercanías de Rivas y Farasdués.
- Establecer el parentesco entre las muestras dubitadas de los restos óseos y las muestras indubitadas de los familiares mediante análisis estadísticos con el uso de software Familias o GFF.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Muestras Dubitadas: Registro de Laboratorio

Cada una de las muestras llegan al laboratorio con una referencia. Se procede a registrar en la base de datos interna en la que se relaciona la referencia de la muestra con los códigos de registro del laboratorio.

Como se trata de hueso/diente seco, se almacena a temperatura ambiente.



Figura 7. Muestras dubitadas recibidas en el laboratorio desde H22/00167 - H22/00170



Figura 8. Muestras dubitadas recibidas en el laboratorio desde H22/00171 - H22/00172

3.2 Preparación de la muestra para huesos

Si presenta restos de tejido blando se intenta eliminar la mayor parte de la zona central del hueso en la campana extractora ayudado por un bisturí previamente esterilizado o también usando el taladro dremmel acoplado a una lija desechable.



Figura 9. Calcáneo (hueso) fijado en soporte metálico con cortes realizados a partir de muestra dubitada

Se preparan todos los materiales necesarios y se limpia exhaustivamente la zona en donde se va a proceder a cortar el hueso. Se coloca la muestra en el soporte, dejando visible y accesible la parte del hueso que se quiere cortar, a continuación, se limpia la superficie del hueso con la ayuda del taladro y lija. Una vez que está limpia y accesible la muestra, se realizan cortes horizontales y perpendiculares para recolectarlos en un tubo falcon de 25 ml previamente esterilizado. Se almacena en el congelador hasta el momento de procesarlo.

3.3 Preparación de la muestra para dientes

Se limpia el diente con lejía al 10% y se aclara con agua ultra pura. Se seca por completo el diente. Una vez limpio, se introduce en el tubo de freezer Mill a la espera de la pulverización. Se almacena en el congelador hasta su procesamiento.

3.4 Pulverización del hueso/diente

En la campana de flujo laminar se coloca un vaso de precipitados con lejía 10% donde se embeben unas pinzas, tijeras y una cucharilla. Se recoge el material del Freezer Mill (tubo, tapa, cilindro metálico) previamente esterilizado por autoclave. Se introduce el cilindro metálico en el tubo de freezer mill ayudado con las pinzas e inmediatamente el diente o en su caso trozos de hueso. Se comprueba que el cilindro no ha quedado inmovilizado por los fragmentos óseos, se coloca el tapón y se guarda el tubo con el diente/hueso en el congelador para la siguiente etapa.

3.4.1 Freezer Mill

Se vierte el nitrógeno líquido para pre-enfriar el Freezer Mill. Se abre el equipo y se coloca el tubo con los fragmentos óseos/dientes en su posición. Se rellena hasta la marca

con nitrógeno líquido y se lleva a cabo el programa preestablecido (programa 1_hueso) que consta de las siguientes etapas:

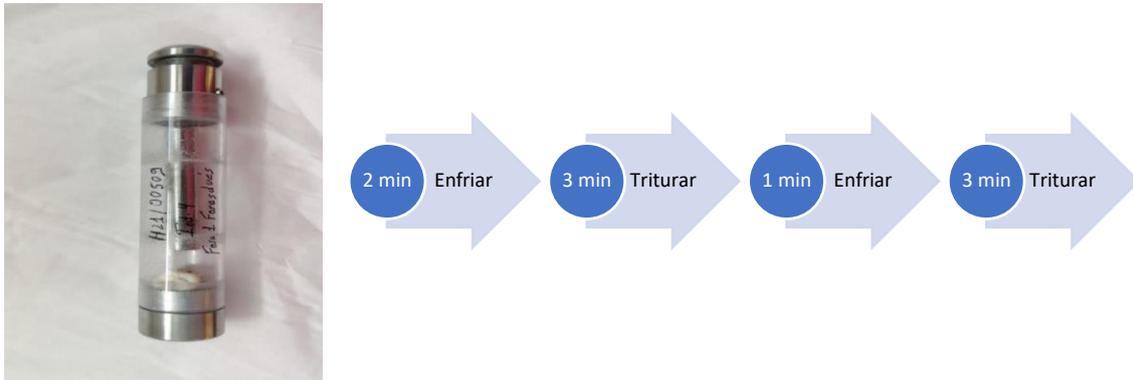


Figura 10. Tubo de Freezer Mill y cilindro metálico con diente de muestra dubitada

Una vez finalizado el programa se abre el Freezer Mill y se extrae el tubo con el hueso /diente pulverizado. En la campana extractora, se traspa el polvo del hueso/diente a los tubos PrepFiler 2-mL Microcentrifuge Tubes and caps, 3 réplicas en total. El resto de polvo se lo coloca en un eppendorf para almacenarlo por si se tiene que repetir algún procedimiento. Finalmente se almacenan a $<-18^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su digestión.

3.5 Extracción de ADN

Se realiza la extracción de ADN con el uso del equipo automatizado “Automate express”. Se utiliza el kit comercial PrepFiler BTA Express™ Forensic DNA Extraction, cuya base es la extracción mediante bolas magnéticas. A partir de los tubos de rosca preparados PrepFiler 2-mL Microcentrifuge Tubes and Caps (3 réplicas: A1, A2 y B) que contienen una cucharada de hueso pulverizado.

Se prepara la siguiente mezcla (Tabla 1 y 2) en un eppendorf de 2ml:

Si es hueso general (<7 años):

Tabla 1. Mezcla de reactivos para huesos con una antigüedad menor a 7 años

Reactivo	Volumen (uL)
PrepFiler™ BTA	220
Lysis Buffer	7
Proteinasa K	3
Ditiotreitol, DTT	

Si es hueso con posibilidad de ADN muy degradado (>7 años):

Tabla 2. Mezcla de reactivos para huesos con una antigüedad superior a 7 años.

Reactivo	Volumen (uL)
PrepFiler™ BTA	220
Lysis Buffer	14
Proteinasa K	6
Ditiotreitol, DTT	

Se añaden 230 o 240 uL del mix de buffer lisis con proteinasa K y DTT previamente preparado a cada uno de los tubos PrepFiler 2-mL Microcentrifuge Tubes and Caps (3 en total) + 1 blanco, y vortex durante 3 segundos. Se incuban los 4 tubos resultantes (3 de las muestras A1, A2, B, y 1 blanco) a 69°C en un termobloque con agitación a 1100 rpm durante 2 horas con la finalidad de romper las células óseas. Pasadas las 2 horas de agitación, se centrifugan los tubos 1 minuto a máxima velocidad.

A partir del sobrenadante de dos de los tubos PrepFiler (A1 y A2) se introduce en un complejo de columna y tubo colector (A). A partir de 1 tubo PrepFiler (B) se introduce el sobrenadante en un complejo de columna y tubo colector. Se repite el proceso con el blanco que se introduce también en un complejo de columna más tubo colector. Posteriormente se completa a un volumen final de 500 uL cada uno de los complejos preparados con el uso de PrepFiler™ Lysis Buffer. Se centrifuga 2 minutos a 10000 rpm para conseguir que el producto de filtrado pase al tubo colector.

Finalmente se introducen las muestras y el pack de reactivos necesarios siguiendo las indicaciones del fabricante para la extracción de ADN con el equipo automatizado “AutoMate Express”; el proceso tiene una duración total de 30 minutos. Se obtiene un volumen de 50 uL de ADN de hueso/diente. El ADN puede conservarse a 4+/-4 °C durante semanas o <-18°C durante años.

3.6 Cuantificación de ADN

La PCR en tiempo real se utiliza tanto para detectar como para cuantificar el ADN que se ha extraído en los pasos previos. Este método analiza el cambio de concentración de ADN ciclo a ciclo utilizando la señal de fluorescencia resultante de la amplificación de una

secuencia objetivo durante la PCR. Las etapas que se dan en el proceso de amplificación son las siguientes: Fase exponencial, fase lineal, y la fase meseta (Tamay et al., 2013).

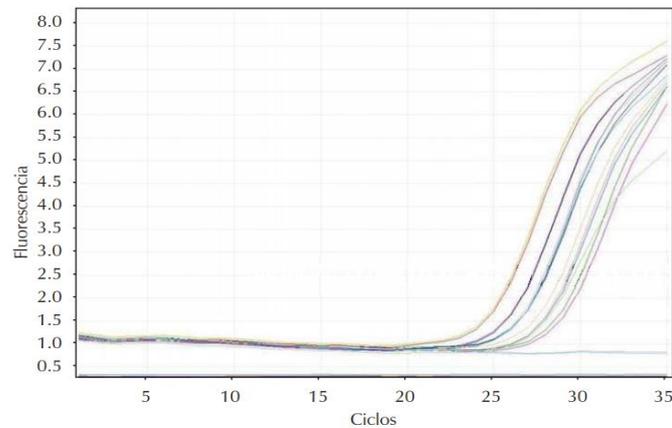


Figura 11. Curva de q-PCR según el número de ciclos vs fluorescencia (Tamay et al., 2013)

Los métodos actuales que utilizan la PCR para amplificar los STR autosómicos y otros loci requieren un rango óptimo de cantidades adecuadas de ADN para minimizar los problemas con la amplificación estocástica basada en valores bajos y la sobrecarga de pico basada en valores altos con la correspondiente saturación de la señal. Debido a que las muestras forenses pueden variar mucho en las cantidades relativas de ADN presentes, se necesitan métodos de cuantificación con un amplio rango dinámico (Lee et al., 2014).

Se realiza una cuantificación en tiempo real con el kit Quantifiler Trío (Applied Biosystems) en el equipo Real Time 7500 (Life technologies), pues permite amplificar un fragmento corto y largo autosómico para poder verificar la inhibición de la muestra; y además poder visualizar la presencia de cromosoma Y. Este kit comercial se dirige a un gen de la transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT) y a un control positivo interno sintético (IPC) que se utiliza para monitorear la inhibición de la muestra (Alonso et al., 2004). El procedimiento utiliza la sonda fluorogénica TaqMan con un rango de cuantificación entre 0.005 ng/uL hasta >50 ng/uL.

3.7 Amplificación de ADN

Una vez cuantificado se procede a realizar una PCR con el kit Globalfiler para STR's autosómicos y el kit comercial Yfiler para STR's del cromosoma Y.

STR-Autosómicos: Se utiliza el kit Globalfiler multiplex que está constituido por 21 marcadores STR's y 3 marcadores para la determinación del sexo (Amelogenina, DY391,

Yindel), distribuido en 5 colores y en distintos rangos. Son los siguientes: D31358, vWA, D16S539, CSF1PO, TPOX, D8S1179, D21S11, D18S51, D2S441, D19S433, TH01, FGA, D22S1045, D5S818, D13S317, D7S820, SE33, D10S1248, D1S1656, D12S3931 i D2S1338.

STR-Y: El kit Y-Filer Plus multiplex consta de 25 marcadores distribuidos en 5 colores y distintos rangos: DYS438, DYS627, DYS458, DYS437, DYS391, DYS392, DYS635 (Y GATA C4), DYS19, DYS390, DYS439, DYS456, DYS393, DYS449, DYS387S1 a/b, DYS576, DYS460, DYS533, DYS389 I/II, DYS570, DYS385 a/b, DYS481, YGATA H4, DYS518, DYS448

3.8 Análisis de fragmentos

El producto de PCR en cada uno de los kit's utilizados fueron analizados por el método de electroforesis capilar usando el secuenciador automático Applied Biosystems® 3500 siguiendo las instrucciones del fabricante. Para analizar los productos obtenidos se emplea el software GeneMapper ID-X Version 1.6, que permitirá visualizar por medio de electroferogramas los marcadores correspondientes a cada kit comercial. Se asigna cada alelo con la ayuda de un Allelic Ladder específico. Su tamaño viene dado en función del estándar interno GS600LIZ.

3.9 ADN mitocondrial

3.9.1 Amplificación de ADN mitocondrial

Se lleva a cabo el análisis de las posiciones polimórficas (SNP's) en las regiones HVI, HVII y HVIII de la región control del ADN mitocondrial. Se realiza una primera PCR con el kit comercial Taq Gold, que realiza la amplificación de con los siguientes primers:

- 15997L y 017H que incluye la región HVI
- 16555L y 649H que incluye las regiones HVII y HVIII.

Posteriormente se realiza una purificación de los fragmentos con el método de ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific) que consiste en el uso de dos enzimas, la exonucleasa I, que degrada fragmentos de nucleótidos con un tamaño menor a 100 pb y la fosfatasa alcalina que eliminará el exceso de nucleótidos.

3.9.2 Secuenciación de mtADN con Applied Biosystem 3500

Tras la obtención de los fragmentos de interés en la primera PCR, se procede a la secuenciación de distintos fragmentos que contendrán la secuencia de nucleótidos de las regiones hipervariables HVI, HVII Y HVIII. Se utiliza el método de Sanger a partir del kit comercial BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, se realiza la purificación con etanol/EDTA para eliminar los terminadores de nucleótidos residuales (ddNTP).

3.10 Análisis Estadístico

Se realiza el análisis estadístico de las muestras dubitadas con las muestras indubitadas usando el software Familias en su versión 3.3. Para el cálculo de índice de parentesco se utilizan las frecuencias alélicas de los STR'S autosómicos de la población española publicada por García O. et al., en el año 2012. Para los casos en los que se analizan mutaciones se utilizan las tasas de mutaciones de los marcadores STR's en la base de datos NIST Standard Reference Database SRD 130.

En el cálculo estadístico del IP se han realizado utilizando las siguientes suposiciones:

- El ADN es aportado por una sola persona.
- La población de referencia se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg (lo cual implica que no hay una sub-estructuración poblacional, que no hay alelos silentes y que los marcadores son independientes)
- La probabilidad de que el material genético de la muestra en cuestión pertenezca a otro individuo se calcula como la probabilidad de encontrar dicho perfil en un individuo escogido al azar en la población de referencia.

Una vez obtenida la secuencia de ADN mitocondrial, se utiliza el software SeqScape en la versión 4.0, que permite comparar las posiciones polimórficas (SNPs) respecto a la secuencia de referencia de Cambridge (rCRS). Para el análisis del haplotipo de ADN mitocondrial y sus correspondientes cálculos estadísticos se recurre a la base de datos EMPOP en la versión 4, release 13. El índice de parentesco (IP) se calcula utilizando la corrección de Balding y Nichols $p = (x + 1) / (n + 1)$, con la fórmula de $LR = 1 / (x + 1) / (n + 1)$. Se utiliza la frecuencia de los distintos haplotipos encontrados en la población europea.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Fosa Común de Rivas

Se obtienen perfiles completos de 10 individuos (tabla 3) de la fosa 1 de Rivas. Se amplifican STR's autosómicos con el kit globalfiler y Cromosoma Y con el kit Yfiler plus. Se rastrean los posibles familiares directos (hijos) y se reciben 6 muestras procedentes de los posibles familiares (tabla 4) de las personas desaparecidas enterradas en la fosa común. Se obtienen los perfiles genéticos por STR autosómicos de las 6 muestras indubitadas y se comparan con los restos óseos.

En total se encontraron **2 muestras compatibles** de relación Padre-Hijo/a con STR autosómicos

Tabla 3. Muestras Dubitadas fosa común de Rivas

Resto Óseo	Codificación Interna	Perfil Genético
Individuo 1 (Diente)	H22/00167	STR Autosómico y Cromosoma Y
Individuo 2 (Hueso)	H22/00168	STR Autosómico y Cromosoma Y
Individuo 3 (Diente)	H22/00169	STR Autosómico y Cromosoma Y
Individuo 4 (Diente)	H22/00170	STR Autosómico y Cromosoma Y
Individuo 5 (Diente)	H22/00171	STR Autosómico y Cromosoma Y
Individuo 6 (Diente)	H22/00172	STR Autosómico y Cromosoma Y
Individuo 7 (Diente)	H22/00173	STR Autosómico y Cromosoma Y
Individuo 8 (Diente)	H22/00174	STR Autosómico y Cromosoma Y
Individuo 9 (Diente)	H22/00175	STR Autosómico y Cromosoma Y
Individuo 10 (Hueso)	H22/00176	STR Autosómico y Cromosoma Y
Cráneo Suelto (Diente)	H22/00177 (igual a H22/00175)	STR Autosómico y Cromosoma Y

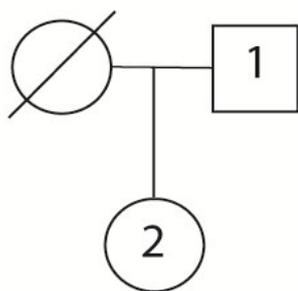
Tabla 4. Muestras Indubitadas de fosa común de Rivas

Familiar	Nombre del desaparecido	Codificación Interna	Perfil Genético
Hija 1	Felipe Vives Solana	H22/00287	STR Autosómico
Hija 2	Eusebio Fenolle Longas	H22/00288	STR Autosómico
Hija 3	Fernando Miguel Jiménez	H22/00289	STR Autosómico
Hija 4	Fermín Murillo Morlana	H22/00291	STR Autosómico
Hijo 5	Antonio Atrian Compaired	H22/00292	STR Autosómico y Cromosoma Y
Hijo 6	Antonio Beltrán Rebla	H22/00293	STR Autosómico y Cromosoma Y

4.1.1 Caso 1. Compatibilidad de resto biológico H22/00175 (Individuo 9) / H22/00177 (Cráneo Suelto) con muestra indubitada H22/00291

Se encuentra una coincidencia de los 19 marcadores genéticos STR's autosómicos (tabla 8) entre los restos biológicos H22/00175 y H22/00177. Observando los perfiles de STR autosómicos de las muestras óseas H22/00175 y H22/00177 no se puede excluir que pertenezcan al mismo individuo. La frecuencia del perfil genético de la muestra H22/00175 (diente) en la población española es de $2,91E-25$. Es decir, una persona de cada 3.436.724.609.724.270.000.000.000.

A continuación, se utiliza la información genética del H22/00175 (Individuo 9) para comprobar si existe alguna relación de filiación con los supuestos hijos (tabla 4). Se dispone solo de la información genética del presunto padre y de la hija. Por tanto, la muestra debe compartir el 50% de información procedente del genoma paterno. En este caso se puede observar que para todos los 21 marcadores autosómicos amplificados de esta muestra (tabla 8) al menos 1 de los alelos procedentes del genoma paterno se encuentra presente en el material genético de la muestra indubitada H22/00291, sugiriendo un resultado de **compatibilidad** entre una relación de filiación Padre-Hija. Para realizar el cálculo estadístico se consignan las siguientes hipótesis:



H1	El vestigio biológico H22/00175 presenta una relación de filiación (Padre-hija) con la donante de la muestra H22/00291
H2	El vestigio biológico H22/00175 NO presenta una relación de filiación (Padre-hija) con la donante de la muestra H22/00291 y por tanto el padre es otro hombre de la población española

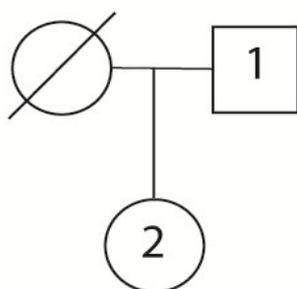
Figura 12. Árbol genealógico de resto biológico H22/00175 / H22/00177 (Diente) (1) con muestra indubitada H22/00291 (2)

El índice de paternidad (IP) que establece la probabilidad de que el donante del vestigio biológico (H22/00175), presente una relación de filiación (Padre-hija) con la donante de la muestra indubitada “Familiar 4”, hija de Fermín Murillo Morlana (H22/00291) en comparación con la hipótesis alternativa de que no estén relacionados filialmente, es de **9.338.224**. Es decir, en términos porcentuales, el valor de la probabilidad de que el

donante del resto óseo H22/00175 sea el padre biológico de la donante de la muestra H22/00291 es **99,9999892%** (con un valor a priori de 0,5).

4.1.2 Caso 2. Compatibilidad de resto biológico H22/00168 (Individuo 2) con muestra indubitada H22/00288

Se encuentra una **compatibilidad** de 20 marcadores genéticos STR's autosómicos entre el resto biológico H22/00168 (Individuo 2) con la muestra indubitada H22/00288 en una relación de filiación Padre-Hija. (tabla 9). Un marcador STR autosómico difiere entre ambos, por lo tanto, se encuentra una exclusión de primer orden en el marcador SE33. Como se puede observar en la tabla 9, el alelo que se encuentra en la muestra dubitada para el marcador SE33 es el 14.2, mientras que el alelo de la muestra indubitada es el 15.2. Teniendo en cuenta que se ha conseguido obtener un perfil completo del resto óseo y que dicho marcador se encuentra en heterocigosis, es muy probable pensar que en el momento de la meiosis e intercambio del material genético entre los progenitores ha ocurrido una mutación o específicamente una inserción en el marcador STR SE33. Por tanto, se consigna las siguientes hipótesis:



H1	El vestigio biológico H22/00168 presenta una relación de filiación (Padre-hija) con la donante de la muestra H22/00288
H2	El vestigio biológico H22/00168 NO presenta una relación de filiación (Padre-hija) con la donante de la muestra H22/00288 y por tanto el padre es otro hombre de la población española

Figura 13. Árbol genealógico de resto biológico H22/00168 (Hueso) (1) con muestra indubitada H22/00288 (2)

Tras consultar la tasa de mutación del marcador SE33 en la base de datos NIST Standard Reference Database SRD 130, se asigna un valor de 0,64 en “Mutation Rate” de dicho marcador. **El índice de paternidad (IP)** que establece la probabilidad de que el donante del vestigio biológico (H22/00168), presente una relación de filiación (Padre-hija) con la donante de la muestra indubitada “Familiar 2”, hija de Eusebio Fenolle Longas (H22/00288) en comparación con la hipótesis alternativa de que no estén relacionados filialmente, es de **11.412.536**. Es decir, en términos porcentuales, el valor de la

probabilidad de que el donante de la muestra H22/00168 sea el padre biológico de la donante de la muestra H22/00288 es **99,99999124 %** (con un valor a priori de 0,5).

4.2 Fosa Común de Farasdués

En la fosa común de Farasdués se obtienen 2 perfiles STR (tabla 5) a falta de identificar, ya que el resto de individuos (8 restos óseos) de la fosa común ya han sido identificados previamente por el personal técnico de Nasertic. Se amplifica STR's autosómicos con el kit globalfiler y se realiza amplificación de ADN mitocondrial de las regiones HVI, HVII y HVIII. Se obtienen perfiles consenso a través de diferentes réplicas y se encuentra un mismo haplotipo para las dos muestras, sugiriendo que estas dos individuos tienen un antepasado materno común. Al no existir familiares directos con una relación Padre-Madre-Hijo se recurre a familiares en segundo grado con respecto al presunto familiar desaparecido. Se reciben 6 muestras indubitadas (tabla 6) correspondientes a los nietos. Se amplificaron las muestras con el Kit Globalfiler para finalmente comparar los STR's con las muestras dubitadas.

En total se encontraron 2 **muestras compatibles** de relación Abuela-Nietos con STR autosómicos de la fosa común de **Farasdués**.

Tabla 5. Muestras dubitadas de fosa común de Farasdués

Familiar	Codificación Interna	Perfil Genético
Individuo 1 (Diente)	H22/00508	STR Autosómico y ADN mitocondrial
Individuo 2 (Diente)	H22/00509	STR Autosómico y ADN mitocondrial

Tabla 6. Muestras Indubitadas de fosa común de Farasdués

Familiar	Nombre del desaparecido	Codificación Interna	Perfil Genético
Nieta 1	Andresa Viartola García	H21/00531	STR Autosómico
Nieto 2	Andresa Viartola García	H21/00532	STR Autosómico
Nieta 3	Andresa Viartola García	H22/00283	STR Autosómico
Nieto 4	Felisa Palacios Burguete	H21/00533	STR Autosómico
Nieta 5	Felisa Palacios Burguete	H21/00632	STR Autosómico y Mitocondrial
Nieta 6	Felisa Palacios Burguete	H22/00282	STR Autosómico

Tabla 7. ADN Mitocondrial de muestras dubitadas e indubitadas de fosa común de Farasdués

Muestra	Región Editada	Haplotipo	Haplogrupos
Individuo 1 (diente) H22/00508	16024-574	A73G G185A G228A A263G C295T -315.1C C462T T489C A523DEL C524DEL C16069T T16126C A16300G	J1c5c1
Individuo 2 (diente) H22/00509	1-300 16024- 16569	A73G G185A G228A A263G C16069T T16126C A16300G	J1c5c1
Nieta 5_nieta de Felisa Palacios Burguete (H21/00632)	16024-574	A73G G185A G228A A263G C295T -315.1C C462T T489C A523DEL C524DEL C16069T T16126C A16300G	J1c5c1

4.2.1 Caso 3. Compatibilidad de resto biológico (Individuo2) H22/00509 con muestras indubitadas H21/00531, H21/00532, H22/00283

Para este caso de memoria histórica tras el rastreo de familiares realizado, no se encuentran familiares de linaje directo (hijos) vivos de los familiares desaparecidos, solamente se encuentran familiares de segundo grado (nietos). El resto H22/00508 y el resto H22/00509 presentan los mismos haplotipos (tabla 7) por lo que no permite la exclusión entre los restos óseos utilizando las premisas del ADN mitocondrial. Comparando los STR's autosómicos entre las muestras dubitadas H22/00508 y H22/00509 e indubitadas de los 6 familiares en segundo grado, tres de los nietos-hermanos H21/00531, H21/00532 y H22/00283 arrojan un resultado de **no exclusión** con el resto H22/00509 y de **exclusión** con el resto H22/00508, generando las siguientes hipótesis:

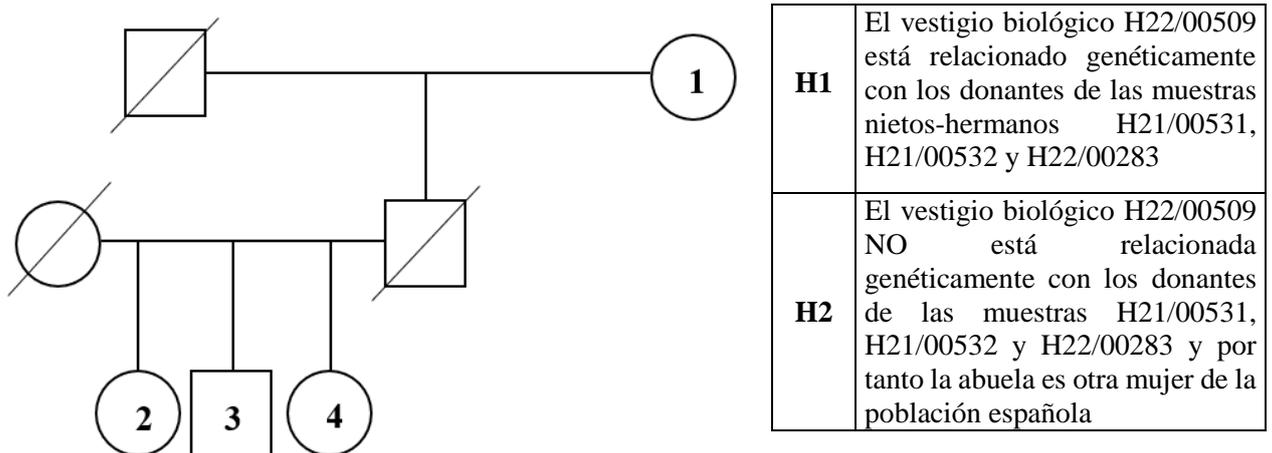


Figura 14. Árbol genealógico de resto biológico (diente) H22/00509 (1) con las muestras indubitadas H21/00531(2), H21/00532(3) y H22/00283 (4)

El índice de paternidad (IP) que establece la probabilidad de que la donante del vestigio biológico (H22/00509) (1), presenten una relación de filiación (Abuela-nietos) con los donantes de las muestras Nieto 1 (2), Nieto 2 (3) y Nieto 3 (4), nietos de Andresa Viartola García, asumiendo que provienen de los mismos parentales, en comparación con la hipótesis alternativa de que no estén relacionados genéticamente, es de **355.481**. Es decir, en términos porcentuales, el valor de la probabilidad de que la donante de la muestra H22/00509 sea la abuela biológica de los donantes de las muestras H21/00531, H21/00532 y H22/00283 es **99,999718%** (con un valor a priori de 0,5).

4.2.2 Caso 4. Compatibilidad de resto biológico H22/00508 (Individuo 1) con muestras indubitadas H21/00533, H21/00632, H22/00282

Siguiendo el mismo procedimiento anterior para el caso 3 y comparando las muestras indubitadas H21/00533, H21/00632 y H22/00282 con el resto biológico H22/00508 arrojan un resultado de **no exclusión**, generando las siguientes hipótesis:

H1	El vestigio biológico H22/00508 está relacionado genéticamente con los donantes de las muestras nietos H21/00533, H21/00632 y H22/00282.
H2	El vestigio biológico H22/00508 NO está relacionada genéticamente con los donantes de las muestras H21/00533, H21/00632 y H22/00282 y por tanto la abuela es otra mujer de la población española.

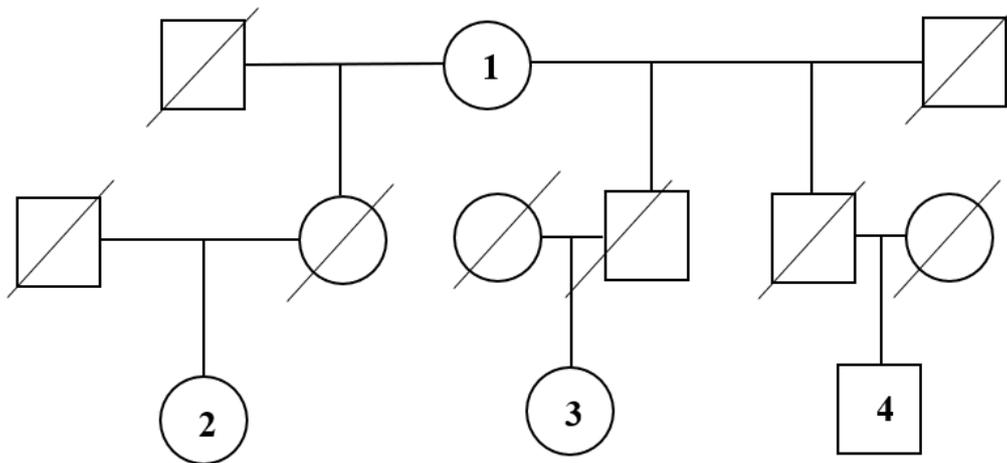


Figura 15. Árbol genealógico de resto biológico (diente) H22/00508 (1) con las muestras indubitadas H21/00632(2), H22/00282 (3) y H21/00533(4)

El índice de paternidad (IP) que establece la probabilidad de que la donante de la muestra dubitada (H22/00508) (1), presente una relación de filiación (Abuela-nietos) con los donantes de las muestras Nieto 6 (2), Nieto 5 (3) y Nieto 4 (4), nietos de Andresa Viartola García, asumiendo que cada nieto procede de parentales diferentes (son nietos-primos) en comparación con la hipótesis alternativa de que no estén relacionados genéticamente, es de **24,0677**. Es decir, en términos porcentuales, el valor de la probabilidad de que la donante del vestigio biológico H22/00508 sea la abuela biológica de los donantes de las muestras H21/00631, H22/00282 y H21/00533 es **96,010808 %** (con un valor a priori de 0,5).

El haplotipo del ADN mitocondrial que se obtiene a partir de la muestra del Individuo 1 (diente) (H22/00508) **COINCIDE** con el haplotipo de la donante de la muestra indubitada “Nieta 5” (tabla 7) (nieta, hija de hija de Felisa Palacios Burguete) (H21/00632). Este haplotipo aparece 14 veces en la base de datos EMPOP (14 coincidencias en 38.461 haplotipos de la población mundial; 4 coincidencias en 5913 haplotipos de Europa). Tras realizar este cálculo estadístico se obtiene un IP de 1.182,80. Este valor indica cuantas veces es más probable encontrar este haplotipo en la evidencia si están relacionados genéticamente por vía materna que si se trata de dos individuos al azar de la población europea.

El valor estadístico de la prueba IP para los 3 primeros casos es adecuado para poder afianzar la hipótesis de parentesco Padre-Hija en los casos 1 y 2 y Abuela-nietos en el caso número 3. En el caso 4 podemos observar un índice de parentesco de 24,0677 con un 96% de probabilidad de que sea la abuela biológica para los supuestos nietos. Según Crespillo et al., 2019 se comienza a considerar como mínimamente aceptable un valor de 99,9 % que equivale un IP=1000. Pero en este caso, si nos enfocamos en las evidencias no genéticas de la localización de los cadáveres, los relatos de los familiares, otros datos antropológicos y, por tanto, considerándolo como una fosa común con un núcleo cerrado, este valor es suficiente como para no excluir la relación de parentesco (abuela-nietos) de la muestra H22/00508 con los donantes de las muestras H21/00631, H22/00282 y H21/00533.

En la mayoría de las muestras dubitadas de Rivas se pudo obtener perfiles completos, sin embargo, en las muestras dubitadas de Farasdués no se consigue obtener perfiles completos, puesto que la integridad de las muestras se encontraba comprometidas porque han estado expuestas a condiciones ambientales extremas (acidez, humedad del suelo o los agentes degradantes de éste). Por tanto, en las muestras correspondientes a Farasdués se obtienen perfiles consenso obtenidos a través de diferentes réplicas de las muestras procesadas.

El uso de SNP's en los últimos años han ido tomando mayor importancia como puede visualizarse en la literatura. En la actualidad ya se encuentran disponibles paneles específicos de SNP's que pueden aumentar y complementar la probabilidad de los valores de índice de parentesco. Por ejemplo, García et al., en el año 2021 o Kling & Tillmar en 2019 describen en su investigación el uso de pruebas IP con paneles entre 600.000 y

900.000 SNP's para establecer parentescos entre familiares lejanos. Muchas veces, el problema de numerosos estudios para la identificación de restos humanos consiste en la falta de disponibilidad de familiares útiles para el cotejo entre muestra dubitada e indubitada, por ello estos paneles pueden solucionar estos inconvenientes para lograr una mayor tasa de identificación humana. En corea también se publicó recientemente un artículo realizado por Bae et al., 2021 en donde aseguran que con el uso de 160 SNP consiguen distinguir con precisión las pruebas de paternidad realizadas en el estudio. La combinación STR-SNP en el futuro puede ayudar a resolver los problemas actuales cuando no se disponen de familiares directos para la identificación de restos óseos.

5. CONCLUSIONES

Es innegable que la genética forense constituye en la actualidad uno de los mayores puntos de apoyo para los sistemas judiciales de todo el planeta. En los casos más mediáticos en los que los acusados e implicados de asesinatos pueden ser juzgados o ser absueltos de los cargos, la genética forense puede hacer justicia con las personas que no han cometido el crimen o en su defecto conseguir la condena de la persona culpable auxiliando de esta manera al juez para la toma de una decisión acertada. Como se ha visto a lo largo del recorrido literario se puede notar que aún hay muchos aspectos interesantes de la genética aún por explotar.

Con el uso de STR's autosómicos se ha conseguido identificar los restos óseos de los familiares desaparecidos con un alto índice de discriminación. Se puede comprobar con estos resultados que en la actualidad los laboratorios forenses disponen de una gran herramienta para la identificación humana, incluso si se analizan restos cadavéricos antiguos. El cromosoma Y no arrojó ningún resultado para la resolución de estos casos forenses, sin embargo, son de mucha utilidad cuando se dispone de familiares con linaje por vía paterna. Si más adelante se consigue localizar familiares de linaje paterno, se podrían identificar un mayor número de restos óseos.

En el caso de las relaciones de parentesco cuando se consigue identificar por marcadores STR autosómicos o ADN mitocondrial a un familiar desaparecido o que ha sido asesinado años atrás, vemos que no sólo basta con encontrar la compatibilidad entre los distintos marcadores genéticos, sino que hay un arduo trabajo estadístico detrás de un dictamen o informe pericial de identificación de restos biológicos. Muchas veces no se consiguen resolver las identificaciones en los supuestos más simples por el único hecho de no disponer de familiares directos, por esta razón muchas veces se recurre a familiares en segundo grado. Este factor limitante complica aún más los cálculos estadísticos y por tanto también la manera de poder explicar las fórmulas matemáticas empleadas en un informe pericial o juicio oral.

Este trabajo ha contribuido a la identificación de 4 restos óseos de las fosas comunes de Rivas y Farasdués, y esto se traduce en una sensación de liberación y tranquilidad para

sus familiares, recordemos que estas personas han sido víctimas de represalias durante la guerra civil y la dictadura franquista. El movimiento social para la recuperación de la memoria histórica ha impulsado estas iniciativas con gran éxito y gracias a ello, muchos laboratorios forenses de España reciben por parte de los ayuntamientos y gobiernos autonómicos los recursos económicos necesarios para la realización de proyectos de este calibre. Hasta el momento se ha logrado intervenir cerca de 777 fosas comunes, recuperando e identificando un total de 9552 esqueletos de familiares desaparecidos. Sin embargo, todavía queda un largo camino por recorrer.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso, A. A. (2004). Conceptos básicos de ADN forense. Nuevas técnicas de investigación del delito: Intervenciones Corporales y ADN, 1860-1871.
- Alonso, A., Martín, P., Albarrán, C., García, P., García, O., de Simón, L. F., ... & Fernández-Piqueras, J. (2004). Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. *Forensic science international*, 139(2-3), 141-149.
- Amorim, A., & Pereira, L. (2005). Pros and cons in the use of SNPs in forensic kinship investigation: a comparative analysis with STRs. *Forensic science international*, 150(1), 17-21.
- Bae, S., Won, S., & Kim, H. (2021). Selection and evaluation of bi-allelic autosomal SNP markers for paternity testing in Koreans. *International journal of legal medicine*, 135(4), 1369-1374.
- Butler JM. (2007). Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *Biotechniques*. 43(4):ii–Sv
- Butler, J. M., Coble, M. D., & Vallone, P. M. (2007). STRs vs. SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing. *Forensic science, medicine, and pathology*, 3(3), 200-205.
- Castella V, Gervaix J, Hall D. (2013). DIP-STR: highly sensitive markers for the analysis of unbalanced genomic mixtures. *Hum Mutat*. 34(4): 644–654.
- Coble, M. D., & Butler, J. M. (2005). Characterization of new miniSTR loci to aid analysis of degraded DNA. *Journal of Forensic Science*, 50(1), JFS2004216-11.
- Corona, S. & Estrada, M. (2021) El ADN mitocondrial: una alternativa útil para la identificación forense.
- Crespillo Márquez, M. C., Acón Ortego, I., Alonso Alonso, A., Amorim, A., Arenas, M., Carracedo, A., Fernández de Simón Loro, L., Fernández Oliva, C., Freire-Aradas, A.(2019). *Genética*

- forense: del laboratorio a los tribunales. Díaz de Santos.
- Daeid, N. N., Hackman, L., & Haddrill, P. R. (2021). Developments in forensic DNA analysis. *Emerging Topics in Life Sciences*, 5(3), 381-393.
- Delgado, E., & Neyra, C. D. (2019). Frecuencias alélicas de 21 marcadores STR autosómicos en una población mestiza peruana aplicado a la práctica forense. *Revista Española de Medicina Legal*, 45(3), 92-97.
- Doležel, J., Vrána, J., Safář, J., Bartoš, J., Kubaláková, M., & Simková, H. (2012). Chromosomes in the flow to simplify genome analysis. *Functional & Integrative Genomics*, 12(3), 397-416. <http://doi.org/10.1007/s10142-012-0293-0>
- El-Hattab, A. W., & Scaglia, F. (2016). Mitochondrial cytopathies. *Cell Calcium*, 60(3), 199-206.
- Etxebarria, F. (2020): Las exhumaciones de la Guerra Civil y la Dictadura Franquista 2000 – 2019. Estado actual y recomendaciones de futuro. *Memoria Democrática. Fosas y exhumaciones*. pp. 189
- García, Ó. (2021). Genealogía forense. Implicaciones sociales, éticas, legales y científicas. *Revista Española de Medicina Legal*, 47(3), 112-119.
- García M., Gayán, R., Rodríguez J.A., Rodríguez P., Rubio A., Ruiz J., Sánchez, C., Soriano, I. (2021). Informe sobre la segunda campaña de localización y exhumación de fosas comunes de la guerra civil española en el cementerio de farasdués (T.M. de Ejea de los Caballeros). N° EXP. 407/20/2021.
- García, O., Alonso, J., Cano, J. A., García, R., Luque, G. M., Martín, P., & Yurrebaso, I. (2012). Population genetic data and concordance study for the kits Identifiler, NGM, PowerPlex ESX 17 System and Investigator ESSplex in Spain. *Forensic Science International: Genetics*, 6(2), e78-e79.
- Gill, P., Brenner, C. H., Buckleton, J. S., Carracedo, A., Krawczak, M., Mayr, W. R., & Weir, B. S. (2006). DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on the interpretation of mixtures.

- Forensic science international, 160(2-3), 90-101.
- Gopinath S, Zhong C, Nguyen V, Ge J, Lagace RE, Short ML, Mulero JJ (2016) Developmental validation of the Yfiler((R)) Plus PCR amplification kit: an enhanced Y-STR multiplex for casework and database applications. *Forensic Sci Int Genet* 24:164–175
- Grover, R., Jiang, H., Turingan, R. S., French, J. L., Tan, E., & Selden, R. F. (2017). FlexPlex27—highly multiplexed rapid DNA identification for law enforcement, kinship, and military applications. *International Journal of Legal Medicine*, 131(6), 1489-1501.
- Hall A, Ballantyne J (2003) The development of an 18-locus Y-STR system for forensic casework. *Anal Bioanal Chem* 376:1234–1246
- Holt, I. J., He, J., Mao, C. C., Boyd-Kirkup, J. D., Martinsson, P., Sembongi, H., & Spelbrink, J. N. (2007). Mammalian mitochondrial nucleoids: organizing an independently minded genome. *Mitochondrion*, 7(5), 311-321
- Juárez, C. I., Lara-Aguilar, R. A., & Javier, F. (2017). Conceptos básicos de genética clínica para la práctica oncológica. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 16(1).
- Kayser, M. (2017). Forensic use of Y-chromosome DNA: a general overview. *Human genetics*, 136(5), 621-635.
- Kayser, M., & De Knijff, P. (2011). Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nature Reviews Genetics*, 12(3), 179-192.
- Kling, D., & Tillmar, A. (2019). Forensic genealogy—a comparison of methods to infer distant relationships based on dense SNP data. *Forensic Science International: Genetics*, 42, 113-124.
- Lang, B. F., Gray, M. W., & Burger, G. (1999). Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annual review of genetics*, 33(1), 351-397.

- Lee, S. B., McCord, B., & Buel, E. (2014). Advances in forensic DNA quantification: a review. *Electrophoresis*, 35(21-22), 3044-3052.
- Lichten, M., & de Massy, B. (2011). The impressionistic landscape of meiotic recombination. *Cell*, 147(2), 267–270. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.038>
- Morild, I., Hamre, S. S., Huel, R., & Parsons, T. J. (2015). Identification of missing norwegian world war II soldiers, in Karelia Russia. *Journal of forensic sciences*, 60(4), 1104-1110.
- Mulero JJ, Hennessy LK. (2012). Next-generation STR genotyping kits for forensic applications. *Forensic Sci Rev.* 24(1):1–13.
- Novroski, N. M., Wendt, F. R., Woerner, A. E., Bus, M. M., Coble, M., & Budowle, B. (2019). Expanding beyond the current core STR loci: An exploration of 73 STR markers with increased diversity for enhanced DNA mixture deconvolution. *Forensic Science International: Genetics*, 38, 121-129.
- Opel, K. L., Chung, D. T., Drábek, J., Tatarek, N. E., Jantz, L. M., & McCord, B. R. (2006). The application of miniplex primer sets in the analysis of degraded DNA from human skeletal remains. *Journal of forensic sciences*, 51(2), 351-356.
- Pilli, E., Boccone, S., Agostino, A., Virgili, A., D'Errico, G., Lari, M., & Caramelli, D. (2018). From unknown to known: identification of the remains at the mausoleum of fosse Ardeatine. *Science & Justice*, 58(6), 469-478.
- Purps, J., Siegert, S., Willuweit, S., Nagy, M., Alves, C., Salazar, R., & Turrina, S. (2014). A global analysis of Y-chromosomal haplotype diversity for 23 STR loci. *Forensic Science International: Genetics*, 12, 12-23.
- Ramon y Cajal, M. & Hümmer, S. (2018). Más allá de los genes. Cómo podemos entender el DNA no codificante. *An. RANM*, 2018, núm.135 (03),pág. 230-236.

- Ruiz, J. (2021) Localizada una nueva fosa común de víctimas civiles del franquismo en el cementerio de Farasdués, en la provincia de Zaragoza. Recuperado de https://www.eldiario.es/aragon/localizada-nueva-fosa-comun-victimas-civiles-franquismo-cementerio-farasdues-provincia-zaragoza_1_8266410.html
- Ruiz, J. (2021). Localizados los restos de diez personas en una fosa común en Rivas de víctimas de la represión fascista. Recuperado de <https://arainfo.org/fosa-comun-rivas-cinco-villas-victimas-represion-fascista/>
- Ruiz, F. J. (2008), Uncastillo, mujeres del 36: un retrato, una historia, una vida, Asociación Charata para la Recuperación de la Memoria Histórica de Uncastillo, Zaragoza.
- Shah, A. (21 de Julio de 2022). Cromosomas Y y ADN mitocondrial: una nueva frontera de ascendencia genética. *Nebula Genomics*. <http://nebula.org/blog/es/ascendencia-y-cromosoma-mitocondrial-adn/>
- Somanathan A, Mathur K. (2017). Application of STR markers in Forensics. *Int J Adv Res Sci Engin.* 6:61–79
- Stanciu, F., Vladu, S., Cuțăr, V., Cocioabă, D., Iancu, F., Cotolea, A., & Stoian, I. M. (2013). Genetic parameters and allele frequencies of five new European Standard Set STR loci (D10S1248, D22S1045, D2S441, D1S1656, D12S391) in the population of Romania. *Croatian Medical Journal*, 54(3), 232-237.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.
- Tilanus M. (2006). Short tandem repeat markers in diagnostics: what's in a repeat? *Leukemia*. 20(8):1353–1355
- Tilford, C. A., Kuroda-Kawaguchi, T., Skaletsky, H., Rozen, S., Brown, L. G., Rosenberg, M., & Page, D. C. (2001). A physical map of the

- human Y chromosome. *Nature*, 409(6822), 943-945.
- Vallejo, G., & Alonso, A. (2009). La identificación genética en grandes catástrofes: avances científicos y normativos en España. *Revista Española de Medicina Legal*, 35(1), 19-27.
- Van Oorschot, R. A., & Jones, M. K. (1997). DNA fingerprints from fingerprints. *Nature*, 387(6635), 767-767.
- Vermeulen M, Wollstein A, van der Gaag K, Lao O, Xue Y, Wang Q, Roewer L, Knoblauch H, Tyler-Smith C, de Knijff P, Kayser M (2009) Improving global and regional resolution of male lineage differentiation by simple single-copy Y-chromosomal short tandem repeat polymorphisms. *Forensic Sci Int Genet* 3:205–213
- Voskoboinik, L., Ayers, S. B., LeFebvre, A. K., & Darvasi, A. (2015). SNP-microarrays can accurately identify the presence of an individual in complex forensic DNA mixtures. *Forensic Science International: Genetics*, 16, 208-215.
- Zhang, L., & Wu, Q. (2005). Single gene retrieval from thermally degraded DNA. *Journal of biosciences*, 30(5), 599-604.
- Zupanic, I., Obal, M., Zupanc, T. (2020). Identifying victims of the largest Second World War family massacre in Slovenia. *Forensic Science International*, 306: 110056.

7. ANEXOS

Tabla 8. Genotipo de STR's autosómicos de restos óseos (H22/00175), (H22/00177) e hija 4 (H22/00291) caso 1.

Marcador	RIVAS_FOSA1 IND9_37 Y 38 (H22/00175)		RIVAS_FOSA1 SONDEO 12 CRÁNEO SUELTO (H22/00177)		Aurora Murillo Arnalé (H22/00291)	
	X	Y	X	Y	X	
AMEL	X	Y	X	Y	X	
D3S1358	15	18	15	18	17	18
vWA	15		15		15	17
D16S539	11	12	11	12	12	13
CSF1PO	11		11	12	11	
TPOX	11				9	11
D8S1179	11	13	11	13	11	14
D21S11	30	31.2	30	31.2	30	31.2
D18S51	15	20	15	20	13	15
D2S441	11.3		11.3		11	11.3
DYS391	10		10			
D19S433	14	16	14	16	13	16
TH01	7	9.3	7	9.3	7	8
FGA	21	24	21	24	23	24
D22S1045	15	16	15	16	16	
D5S818	11	12	11	12	11	12
D13S317	11	14	11	14	11	
D7S820	8	11	8	11	8	10
SE33	14	19	14	19	14	21
D10S1248	13	14	13	14	14	15
D1S1656	12	15.3	12	15.3	15	15.3
D12S391	19	23	19	23	20	23
D2S1338	17	24	17		17	23

Tabla 9. Genotipo de STR's autosómicos de resto óseo (H22/00168) e hija 2 (H22/00288) caso 2.

Marcador	RIVAS_FOSA1_IND 2 Calcáneo (H22/00168)		Mercedes Fenolle Longas (H22/00288)	
	X	Y	X	
AMEL	X	Y	X	
D3S1358	16	19	16	16
vWA	17		16	17
D16S539	11	14	11	13
CSF1PO	11	14	11	14
TPOX	8	9	8	8
D8S1179	12	13	12	13
D21S11	29	30	29	30
D18S51	14	16	15	16
D2S441	11	14	10	11
D19S433	12	15	12	13
TH01	6	9	9	9.3
FGA	24	26	24	26
D22S1045	16	18	16	16
D5S818	11	12	12	13
D13S317	11	13	8	13
D7S820	9	10	9	11
SE33	14.2	20	15.2	17
D10S1248	13		13	15
D1S1656	15	17.3	12	17.3
D12S391	18.3	21	18.3	21
D2S1338	16	17	16	24

Tabla 10. Genotipo de STR's autosómicos de resto óseo (H21/00509) y Nieta 1 (H21/00531), Nieto 2 (H21/00532) y Nieta 3 (H22/00283) caso 3.

Marcador	FARASDUÉS_FO SA1_IND 4 (H21/00509)		Nieta 1 (H21/00531)		Nieto 2 (H21/00532)		Nieta 3 (H22/00283)	
AMEL	X		X		X	Y	X	
D3S1358	14		14	17	14	14	15	17
vWA	15	17	15	16	15	17	15	17
D16S539	11		11	12	9	12	11	12
CSF1PO	10		10	11	10	11	10	11
TPOX	8		9	11	9	11	8	11
D8S1179	13	14	13	14	11	14	11	14
D21S11	29	33.2	29	31	29	31	29	31
D18S51			12	14	12	14	12	14
D2S441	11.3	13	11.3	12	11	11.3	11.3	12
D19S433	15	16	13	13	13	15	13	13
TH01	7	9.3	9	9.3	7	9	7	9
FGA	25	25	21	25	22	25	21	25
D22S1045	11	17	11	16	16	16	16	16
D5S818	13		12	13	11	13	11	13
D13S317	11	13	11	11	11	12	11	12
D7S820	9	12	11	12	11	12	11	12
SE33	19	32.2	16	23.2	20	23.2	16	32.2
D10S1248	13	14	14	17	13	14	13	14
D1S1656	11	12	15	18.3	11	16	16	18.3
D12S391	18.3	19.3	15	19	15	19.3	19.3	23
D2S1338	19		17	23	19	19	19	23

Tabla 11. Genotipo de STR's autosómicos de resto óseo (H21/00508) y Nieto 4 (H21/00533), Nieta 5 (H21/00632), Nieta 6 (H22/00282) caso 4.

Marcador	FARASDUÉS FOSA1_IND 3 (H21/00508)		Nieto 4 (H21/00533)		Nieta 5 (H21/00632)		Nieta 6 (H22/00282)	
	X		X		X	Y	X	
AMEL	X		X		X	Y	X	
D3S1358	16	17	16	16	16	17	16	16
vWA	14	19	14	17	16	19	14	17
D16S539	14		11	12	13	14	10	11
CSF1PO	10	12	11	13	12	12	12	12
TPOX			8	11	8	11	8	8
D8S1179	14	15	12	15	13	13	14	15
D21S11	30	31	30	30.2	29	31	31	31
D18S51	14	16	14	17	12	18	14	17
D2S441	10	11	10	10	11	11	11	11
D19S433	12	13	14	15.2	12	14	14	14
TH01	9	9.3	9	9.3	9.3	9.3	9	9.3
FGA	20	21	21	23	20	23	20	26
D22S1045	15	16	15	16	14	15	15	15
D5S818	11		11	13	9	12	11	12
D13S317	11		11	11	10	11	10	12
D7S820	10		7	11	12	12	9	10
SE33	23.2	25.2	13	20	20	28.2	16	17
D10S1248	12	16	13	16	16	16	14	17
D1S1656	15	18.3	12	16	12	17.3	14	15
D12S391	20	24	15	20	23	24	17.3	23
D2S1338	16		22	24	23	24	23	24