

DOCUMENTO INFORMATIVO RELACIONADO CON EL INFORME DE ENSAYO MD-02/23-Celanova (ampliación) (v.1)

UNIDAD: Genética Forense

SECCIÓN: Identificación

Se realiza este documento informativo a partir de los resultados del Informe MD-02/23-Celanova (ampliación), previamente emitido, eliminando datos genéticos y personales de carácter confidencial de la muestra de referencia (sobrina por vía materna del desaparecido objeto de búsqueda). Además, se elimina la marca ENAC y las referencias a los ensayos amparados por la acreditación ENAC por contener resultados parciales de Informe MD-02/23-Celanova (ampliación).

Nombre del peticionario: Convenio Xunta de Galicia – Universidade de Santiago de Compostela (USC) Memoria Democrática

Solicitud: Identificación de restos cadavéricos recogidos en fosa en el Cementerio San Breixo de Celanova (Ourense).

1.- INFORMACIÓN GENERAL

El presente informe se emite como ampliación al informe MD-02/23-Celanova, al obtenerse nuevas muestras de referencia con las que realizar las comparaciones con los restos óseos no identificados, por lo tanto, recoge únicamente la información referida a los nuevos análisis realizados.

Por el médico forense Dr. Fernando Serrulla Rech del IMELGA, subdirección de Ourense, ha sido enviada a este Instituto de Ciencias Forenses una muestra dubitada

codificada como “M6” que, según la documentación adjunta, se trata de dos peñascos del Individuo 8 recogidos en la Fosa de Celanova.

Posteriormente, por el mismo médico forense, ha sido entregada en este Instituto de Ciencias Forenses una muestra biológica rotulada como “Indubitada. 10-11-23. Fosa Celanova.”. Según la documentación recibida, la donante de dicha muestra es sobrina por vía materna (hija de una hermana) del desaparecido de la Guerra civil Baldomero Vigil-Escalera Vallejo. Se nos indica que, como muestra dubitada, se empieza con el análisis de la muestra codificada en origen como M6 (individuo 8), y en segundo lugar con la muestra M2 (individuo 2).

Fecha de recepción de las muestras: 2 de febrero de 2023 y 20 de noviembre de 2023.

2.- IDENTIFICACIÓN ÚNICA DE LAS MUESTRAS RECIBIDAS

Las muestras remitidas y el código interno que se les ha asignado, según el procedimiento PG/XF/05, se indica en la siguiente tabla:

ETIQUETA ORIGINAL	CÓDIGO INTERNO
Celanova. Individuo 8	MD-02/23-Celanova M6
Indubitada. 10-11-23. Fosa Celanova	MD-referencia-24

3.- DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS RECIBIDAS Y SU ESTADO

El 2 de febrero de 2023 se recibe un sobre con membrete del IMELGA de Verín, rotulado como “Celanova” que contiene sobres de menor tamaño, uno de ellos con la muestra que se describe a continuación y se codifica internamente como:

- **MD-02/23-Celanova-M6:** Sobre blanco con membrete del IMELGA Ourense rotulado como “M6”, con una bolsa de plástico en su interior rotulada como “Celanova. Individuo 8”, que contiene dos peñascos (según la documentación adjunta). Se analiza un peñasco que se codifica internamente como MD-02/23-Celanova M6a.

Se adjunta, además, documentación en la que se indica que, de acuerdo con el estudio histórico de esta fosa, se recuperaron 7 individuos en una zanja enfrente del panteón de Isauro del cementerio de San Breixo de Celanova.

El 20 de noviembre de 2023 se recibe un sobre con membrete del IMELGA de Verín, conteniendo la muestra que se describen a continuación y se codifican internamente como:

- **MD-referencia-24:** dos cajas portahisopos rotuladas como “Indubitada. 10-11-23. Fosa Celanova”, conteniendo dos hisopos cada una.

4.- MUESTRAS ANALIZADAS

Muestra MD-02/23-Celanova M6a: peñasco del individuo 8.

Muestra MD-referencia-24: indubitada.

5.- PROCEDIMIENTOS DE ENSAYO

5.1. Extracción de ADN:

5.1.1. Se ha realizado una extracción de ADN mediante el kit *PrepFiler® Express BTA Forensic DNA Extraction Kit* de Applied Biosystems (AB), a partir de la muestra MD-02/23-Celanova M6a, ensayo descrito en el procedimiento PE/XF/02.

5.1.2. Se ha realizado una extracción de ADN mediante el kit *PrepFiler® Express Forensic DNA Extraction Kit* (AB), a partir de la muestra MD-referencia-24, ensayo descrito en el procedimiento PE/XF/02.

5.2. Cuantificación de ADN: se ha realizado la cuantificación de ADN humano mediante el kit *Quantifiler® TRIO* (AB), ensayo descrito en el procedimiento PE/XF/03.

5.3. Análisis de polimorfismos de ADN:

5.3.1. Se analizaron 21 *Short Tandem Repeats* (STRs) autosómicos, además de la amelogenina como marcador de sexo, un indel de cromosoma Y y un STR de cromosoma Y, mediante PCR multiplex, utilizando el kit *GlobalFiler™ Amplification Kit* (AB), ensayo descrito en el procedimiento PE/XF/04. Los sistemas

analizados fueron: D3S1358, VWA, D16S539, CSF1PO, TPOX, D8S1179, D21S11, D18S51, D2S441, D19S433, TH01, FGA, D22S1045, D5S818, D13S317, D7S820, SE33, D10S1248, D1S1656, D12S391, D2S1338, Y InDel, DYS391 y amelogenina. Para la electroforesis capilar se utilizó un secuenciador automático *3500 Genetic Analyzer* (AB) y el programa de análisis y lectura de datos *GeneMapper™ ID-X Software v1.4* (AB).

5.3.2. Se analizaron 12 *Short Tandem Repeats* (STRs) autosómicos, además de la amelogenina como marcador de sexo, mediante PCR multiplex, utilizando el kit *Investigator HDplex Kit PCR Assay* de Qiagen. Los sistemas analizados fueron: D7S1517, D3S1744, D12S391, D2S1360, D6S474, D4S2366, D8S1132, D5S2500, D18S51, D21S2055, D10S2325, SE33 y amelogenina. Para la electroforesis capilar se utilizó un secuenciador automático *3500 Genetic Analyzer* (AB) y el programa de análisis y lectura de datos *GeneMapper™ ID-X Software v1.4* (AB).

5.3.3. Se analizaron 100 microhaplotipos (MHs) autosómicos, utilizando para ello el protocolo desarrollado por de la Puente et al., 2020 [1]. Los sistemas analizados fueron: 1pA, 1pB, 1pC, 1pD, 1qA, 1qB, 1qC, 1qD, 2pA, 2pB, 2pC, 2qA, 2qB, 2qC, 2qD, 2qE, 3pA, 3pB, 3qA, 3qB, 3qC, 4pA, 4pB, 4qA, 4qB, 4qC, 4qD, 5pA, 5pB, 5qA, 5qB, 5qC, 6pA, 6pB, 6qA, 6qB, 6qC, 6qD, 7pA, 7pB, 7pC, 7qA, 7qB, 7qC, 8pA, 8pB, 8qA, 8qB, 8qC, 9pA, 9pB, 9qA, 9qB, 9qC, 10pB, 10qA, 10qB, 11pA, 11pB, 11qA, 11qB, 11qC, 12pA, 12pB, 12qB, 12qC, 13qA, 13qB, 13qC, 13qD, 14qA, 14qB, 14qC, 14qD, 15qA, 15qB, 15qC, 15qD, 16pA, 16pB, 16qA, 16qB, 17pA, 17qA, 17qB, 18pA, 18qA, 18qB, 18qC, 19pA, 19pB, 19qA, 20pA, 20pB, 20qA, 20qB, 21qA, 21qB, 22qA y 22qB. Para el análisis se utilizó la plataforma de secuenciación masiva mediante semiconductores Ion S5 de Thermo Fisher Scientific.

1. de la Puente M, et al. *Building a custom large-scale panel of novel microhaplotypes for forensic identification using MiSeq and Ion S5 massively parallel sequencing systems. Forensic Sci Int Genet* (2020) 6(5): p. e149-50.

5.4. Evaluación estadística de los resultados de marcadores autosómicos con el software

Familias 3: Se ha empleado el *software* Familias 3 (v. 3.2.8) para el cálculo del índice de parentesco (IP) y de la probabilidad *a posteriori* dadas dos hipótesis, descrito en el procedimiento PE/XF/06. Para el cálculo estadístico se han utilizado una probabilidad *a priori* establecida según la fórmula $1/(N+1)$, siendo $N=5$, teniendo en cuenta el número de desaparecidos o víctimas a identificar en la fosa del Cementerio San Breixo de Celanova (Ourense), y frecuencias alélicas recogidas en publicaciones científicas internacionales [1-5]. En el presente informe se comunican únicamente aquellas comparaciones que resultan en una probabilidad *a posteriori* suficiente para asumir una identificación genética [6-7].

1. Fernandez-Formoso L., et al. Allele frequencies of 20 STRs from Northwest Spain (Galicia). *Forensic Sci Int Genet* (2012) 6(5): p. e149-50.
2. Pestoni C, et al. Genetic data on three complex STRs (ACTBP2, D21S11 and HUMFIBRA/FGA) in the Galician population (NW Spain). *Int J Legal Med* (1999) 112: 337-339.
3. Phillips C, et al. Global population variability in Qiagen Investigator HDplex STRs. *Forensic Sci Int Genet* (2014) 8: 36-43.
4. Phillips C, et al. Analysis of global variability in 15 established and 5 new European Standard Set (ESS) STRs using the CEPH human genome diversity panel. *Forensic Sci Int Genet* (2011) 5: 155-169.
5. de la Puente M, et al. Building a custom large-scale panel of novel microhaplotypes for forensic identification using MiSeq and Ion S5 massively parallel sequencing systems. *Forensic Sci Int Genet* (2020) 6(5): p. e149-50.
6. Parsons TJ, et al. Large scale DNA identification: The ICMP experience. *Forensic Sci Int Genet* (2019) 38: 236-244.
7. Prinz M, et al. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DVI). *Forensic Sci Int Genet* (2007) 1(1): 3-12.

No existen desviaciones de los métodos de ensayo realizados.

Fecha de inicio de los ensayos: 21 de febrero de 2024.

Fecha de finalización de los ensayos: 22 de mayo de 2024.

6.- RESULTADOS

6.1. Resultados del análisis de STRs autosómicos y marcadores de sexo:

En este documento informativo, por motivos de confidencialidad de los datos, no se emiten los perfiles genéticos de la muestra de referencia (sobrina por vía materna del desaparecido objeto de búsqueda).

6.1.1. Resultados de *GlobalFiler™*

Muestras Sistema	MD-02/23- Celanova M6a
	peñasco del individuo 8
D3S1358	15-16
VWA	17
D16S539	11
CSF1PO	10-12
TPOX	5-12
Y indel*	2
Amelogenina*	XY
D8S1179	12-14
D21S11	29-33.2
D18S51	14
DYS391*	10
D2S441	11.3-14
D19S433	11-15
TH01	9.3
FGA	24
D22S1045	16
D5S818	11
D13S317	11-12
D7S820	8-10
SE33	17-23.2
D10S1248	14-15
D1S1656	14-16.3
D12S391	16-17.3
D2S1338	20-25

*Marcadores de sexo

Dadas las características de la muestra MD-02/23-Celanova M6a, no se pueden descartar eventos de *drop-in* y *drop-out*.

Documento informativo relacionado con el informe MD-02/23-Celanova (ampliación) (v.1)

6.1.2. Resultados de *Investigator HDplex*

Muestras Sistema	MD-02/23- Celanova M6a
	peñasco del individuo 8
Amelogenina*	XY
D7S1517	23
D3S1744	14-18
D12S391	16-17.3
D2S1360	20-24
D6S474	15
D4S2366	9-13
D8S1132	17-18
D5S2500	12-14
D18S51	14
D21S2055	n.c.
D10S2325	8-9
SE33	17-23.2

*Marcadores de sexo
n.c.= no concluyente

Dadas las características de la muestra MD-02/23-Celanova M6a, no se pueden descartar eventos de *drop-in* y *drop-out*.

6.2. Resultados del análisis de microhaplotipos autosómicos:

Muestras Sistema	MD-02/23-Celanova M6a
	peñasco del individuo 8
1pA	GCGG
1pB	AAC-AGA
1pC	TAG-TGG
1pD	CCC-CTC
1qA	GA
1qB	CGAC-TCGT
1qC	TAA
1qD	CAA
2pA	TAAT-TAGA
2pB	ACA
2pC	GCGG-GCGT
2qA	CCAC-TTAC
2qB	n.c.
2qC	n.c.
2qD	GGG
2qE	n.c.
3pA	CTAC-CTGC
3pB	AACCG-AGCCA
3qA	CACC
3qB	ACA-GCA
3qC	n.c.
4pA	CTCA-GTAA
4pB	CAC-CGC
4qA	CCT-CTT
4qB	CAA
4qC	GGGG-TAGG
4qD	GGCC-GGTC
5pA	n.c.
5pB	CA-CC
5qA	TCGT-TCTA
5qB	CCAT-TTAC
5qC	CGC-TGT
6pA	CCT
6pB	n.c.

Muestras Sistema	MD-02/23-Celanova M6a
	peñasco del individuo 8
6qA	CCT-GCC
6qB	GCAG-GTGG
6qC	ATC-CTC
6qD	TCCT-TTTC
7pA	AATA-AGTC
7pB	n.c.
7pC	CCCGT-CTCGT
7qA	CAC
7qB	CAG-CCA
7qC	AGTGC-TACGC
8pA	AGTA-AGTG
8pB	CATCA-CTCTG
8qA	AGT-CAC
8qB	GCT-GTC
8qC	CCGA-CCGC
9pA	GTCAC-GTCGC
9pB	TCGT
9qA	GGG-TGC
9qB	CATT-TGCT
9qC	n.c.
10pB	n.c.
10qA	CGG
10qB	AGA-GTA
11pA	n.c.
11pB	TGCG
11qA	CC
11qB	ATGT-GTGC
11qC	AAC-AGC
12pA	n.c.
12pB	TGA-TGT
12qB	GAAT-GCAC
12qC	n.c.
13qA	ATAA-ATGG
13qB	ATCA-ATCG
13qC	TGGC

Muestras Sistema	MD-02/23-Celanova M6a
	peñasco del individuo 8
13qD	n.c.
14qA	GCG-TCG
14qB	ATC
14qC	CAG-TGG
14qD	GTG
15qA	ATCA-GTAA
15qB	TGG
15qC	GCT
15qD	CCGG-CTGA
16pA	CGTA-CGTG
16pB	AC
16qA	GGT-GTT
16qB	AAT-GGA
17pA	TCC-TTC
17qA	ACCT-GCCC
17qB	AGT-GGC
18pA	TCATA-TCGTG
18qA	n.c.
18qB	TAC
18qC	TAGG-TGAT
19pA	CGA
19pB	AACTG
19qA	n.c.
20pA	CACC-TGCC
20pB	AGG-TCA
20qA	GAA-GGC
20qB	CAAC
21qA	n.c.
21qB	TAC-TGC
22qA	ACTG-TCGG
22qB	AGCAT-AGTGT

n.c.= no concluyente

Dadas las características de la muestra MD-02/23-Celanova M6a, no se pueden descartar eventos de *drop-in* y *drop-out*.

7.- VALORACIÓN ESTADÍSTICA

7.1. Marcadores STRs autosómicos:

La evaluación estadística se ha realizado teniendo en cuenta los perfiles genéticos de STRs autosómicos obtenidos para la muestra MD-02/23-Celanova M6a y para la muestra de referencia MD-referencia-24.

Dada la información del caso, se ha calculado la Razón de Verosimilitud (R.V.), que calcula la probabilidad de la evidencia genética comparando diferentes hipótesis alternativas, y una probabilidad *a posteriori* de las hipótesis planteadas.

$$\text{Razón de Verosimilitud (R.V.)} = \Pr(E/H1)/\Pr(E/H2)$$

Donde:

E = perfil genético de la evidencia

H1: Hipótesis de que los restos cadavéricos analizados (MD-02/23-Celanova M6a) pertenezcan a un tío biológico de la donante de la muestra MD-referencia-24.

H2: Hipótesis de que los restos cadavéricos analizados (MD-02/23-Celanova M6a) pertenezcan a una persona al azar de la población, no relacionada biológicamente con la donante de la muestra MD-referencia-24.

Dada la relación de parentesco a resolver (la donante de la muestra de referencia MD-referencia-24: indubitada es sobrina por vía materna, hija de una hermana, del desaparecido de la Guerra civil Baldomero Vigil-Escalera Vallejo), los resultados obtenidos para STRs autosómicos no superan el umbral necesario para establecer una identificación genética, por lo que se han analizado otros marcadores genéticos autosómicos.

7.2. Marcadores microhaplotipos autosómicos:

Documento informativo relacionado con el informe MD-02/23-Celanova (ampliación) (v.1)

La evaluación estadística se ha realizado teniendo en cuenta los perfiles genéticos de microhaplotipos autosómicos obtenidos para la muestra MD-02/23-Celanova M6a y para la muestra MD-referencia-24.

Dada la información del caso, se ha calculado la Razón de Verosimilitud (R.V.), que calcula la probabilidad de la evidencia genética comparando diferentes hipótesis alternativas, y una probabilidad *a posteriori* de las hipótesis planteadas.

$$\text{Razón de Verosimilitud (R.V.)} = \Pr(E/H1)/\Pr(E/H2)$$

Donde:

E = perfil genético de la evidencia

H1: Hipótesis de que los restos cadavéricos analizados (MD-02/23-Celanova M6a) pertenezcan a un tío biológico de la donante de la muestra MD-referencia-24.

H2: Hipótesis de que los restos cadavéricos analizados (MD-02/23-Celanova M6a) pertenezcan a una persona al azar de la población, no relacionada biológicamente con la donante de la muestra MD-referencia-24.

Se ha observado compatibilidad genética para la relación de parentesco “tío-sobrina” entre las muestras MD-02/23-Celanova M6a y MD-referencia-24, obteniendo:

- Razón de Verosimilitud (R.V.) = 432394,78 a favor de H1
- Probabilidad de Parentesco (W) = 99,9998 % para la H1

8.- CONCLUSIONES

Primera: Tras el análisis de STRs autosómicos para la muestra MD-02/23-Celanova M6a: peñasco del individuo 8, y teniendo en cuenta la relación de parentesco descrita entre el desaparecido y su familiar, no se ha obtenido una razón de verosimilitud que supere el umbral necesario para establecer una identificación genética concluyente, por lo que se han analizado otros marcadores genéticos autosómicos.

Segunda: Tras el análisis de microhaplotipos autosómicos para la muestra MD-02/23-Celanova M6a: peñasco del individuo 8, se ha obtenido una razón de verosimilitud que establece la probabilidad de la evidencia dada la hipótesis (H1) de que los restos cadavéricos analizados (MD-02/23-Celanova M6a) pertenezcan a un tío biológico de la donante de la muestra MD-referencia-24: indubitada, en contra de la hipótesis alternativa (H2) de que los restos cadavéricos analizados (MD-02/23-Celanova M6a) pertenezcan a una persona al azar de la población, no relacionada biológicamente con la donante de la muestra MD-referencia-24: indubitada es de 432394,78 (a favor de la hipótesis H1). En términos porcentuales, el valor de la probabilidad para la hipótesis H1 es de 99,9998 %.

Nota- Las muestras de ADN quedan custodiadas en esta Unidad. Para cualquier solicitud de información adicional, pueden ponerse en contacto con la Unidad de Genética Forense del Instituto de Ciencias Forenses Luis Concheiro.

En Santiago de Compostela, a 4 de julio de 2024.


Prof. Dra. María Victoria Lareu Huidobro


Dra. Ana Mosquera Miguel

Este informe sólo afecta a las muestras sometidas a ensayo, y no puede ser reproducido parcialmente sin la autorización escrita del Instituto de Ciencias Forenses Luis Concheiro.

El laboratorio queda eximido de cualquier responsabilidad ajena a los análisis realizados, por ejemplo, cuando la información o la muestra sean proporcionadas por el cliente y puedan afectar a la validez de los resultados. afectar a la validez de los resultados.