



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

biomics
Research Group
Grupo Consolidado

INFORME PROVISIONAL DE LOS ANÁLISIS GENÉTICOS DE LOS INDIVIDUOS
INHUMADOS EN LA FOSA DE PARASIMÓN (LENA, ASTURIAS)

20 de noviembre de 2018

Grupo BIOMICs / BIOMICs Research Group UPV/EHU
Centro de Investigación "Lascaray" Ikerunea
Universidad del País Vasco UPV/EHU
Avda. Miguel de Unamuno, 3
01006 Vitoria-Gasteiz
Spain

Contacto: marian.mdepancorbo@ehu.eus
mbaetab@gmail.com
Tel +34 945 01 4528
Fax +34 945 01 4458

En este informe se detallan los procedimientos realizados hasta la fecha dentro del proyecto "Identificación de víctimas inhumadas en la fosa de Parasimón (Lena, Asturias)", iniciado el 24 de julio de 2018, en el Grupo Consolidado BIOMICs de la Universidad del País Vasco UPV/EHU, sito en el Centro de Investigación Lascaray Ikergeunea, Av. Miguel de Unamuno nº 3, 01006 Vitoria-Gasteiz, Álava.

Se ha realizado el estudio genético de 12 restos post-mortem procedentes de la fosa de Parasimón:

1. Individuo 1: dientes 25 y 28 y fragmento de tibia izquierda (código interno: BADN1521GC-BIO)
2. Individuo 2: dientes 26 y 38 y fragmento de fémur derecho (código interno: BADN1522GC-BIO)
3. Individuo 3: dientes 35, 36 y 37 y fragmento de tibia izquierda (código interno: BADN1523GC-BIO)
4. Individuo 4: dientes 45 y 48 y fragmento de tibia derecha (código interno: BADN1524GC-BIO)
5. Individuo 5: dientes 47 y 48 y fragmento de tibia izquierda (código interno: BADN1525GC-BIO)
6. Individuo 6: dientes 17 y 26 y fragmento de tibia derecha (código interno: BADN1526GC-BIO)
7. Individuo 7: dientes 15 y 26 y fragmento de fémur derecho (código interno: BADN1527GC-BIO)
8. Individuo 8: dientes 37 y 38 y fragmento de tibia derecha (código interno: BADN1528GC-BIO)
9. Individuo 9: dientes 18 y 28 y fragmento de tibia derecha (código interno: BADN1529GC-BIO)
10. Individuo 10: dientes 25 y 27 y fragmento de tibia derecha (código interno: BADN1530GC-BIO)
11. Individuo 11: dientes 25 y 27 y fragmento de tibia izquierda (código interno: BADN1531GC-BIO)
12. Individuo 12: dientes 17 y 48 y fragmento de tibia derecha (código interno: BADN1532GC-BIO)

Y de muestras de familiares de saliva de **3** individuos supuestamente emparentados biológicamente. Estas personas se mencionan a continuación:

| Referencia interna | Donante indubitado | Familiar desaparecido | Relación de parentesco |
|--------------------|----------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| BADN1533GC-BIO | D. Gerardo Cienfuegos Fernández | D. Luis Cienfuegos Suárez | Nieto paterno, hijo de hijo |
| BADN1534GC-BIO | Dña. María Adoración Peláez Lobo | D. Francisco Peláez Lobo | Hija |
| BADN1535GC-BIO | Dña. Isabel Delgado Antuña | D. Manuel Delgado Delgado | Hija |

Con la finalidad de identificar los restos post-mortem anteriormente referidos mediante diagnóstico de parentesco biológico con respecto a las citadas personas.

I. METODOLOGÍA EMPLEADA

Los restos post-mortem y las muestras de saliva de las personas supuestamente emparentadas fueron enviados por el Dr. Francisco Etxebarria y D^a. Lourdes Herrasti de la Sociedad de Ciencias Aranzadi, al Grupo Consolidado BIOMICs de la Universidad del País Vasco UPV/EHU, sito en el Centro de Investigación Lascaray Ikerguna, Av. Miguel de Unamuno nº 3, 01006 Vitoria-Gasteiz, Álava. Las muestras fueron recibidas el 24 de julio de 2018 y el 10 de octubre de 2018.

A partir de los restos post-mortem recibidos se analizaron dientes y/o fragmentos de fémur o tibia. El ADN de los restos post-mortem fue extraído mediante el extractor automático Automate Express usando el kit PrepFiler Forensic DNA Extraction Kit (Applied Biosystems) siguiendo el procedimiento PNT067. El ADN extraído fue cuantificado mediante Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems) siguiendo el procedimiento del grupo BIOMICs PNT048. El ADN extraído fue cuantificado mediante Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems) siguiendo el procedimiento del grupo BIOMICs PNT048.

El ADN de las muestras de saliva fue extraído mediante el protocolo de Puregene DNA Purification System (Gentra Systems) mediante el procedimiento del grupo BIOMICs PNT050 y cuantificado mediante espectrofotometría con un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) mediante el procedimiento del grupo BIOMICs PNT005.

Una parte alícuota del ADN extraído fue utilizada para amplificar los marcadores microsatélites (STRs) autosómicos y el locus amelogenina mediante los procedimientos

del grupo BIOMICs PNT012 y PNT016. Los productos de la amplificación se analizaron con un analizador automático de ADN ABI Prism 3130 (Applied Biosystems). Otra parte alícuota del ADN extraído fue utilizada para amplificar los marcadores microsatélites del cromosoma Y (Y-STRs) mediante el procedimiento del grupo PNT021.

Los productos de la amplificación se analizaron con un analizador automático de ADN ABI Prism 3130 (Applied Biosystems). La asignación alélica de los marcadores microsatélites de las muestras degradadas se realiza tomando un umbral mínimo de 30 RFUs (Relative Fluorescence Units) en el caso de alelos en heterocigosis y 40 RFUs para alelos en homocigosis.

En caso de ser necesario, el detalle de los protocolos utilizados puede ser solicitado al Grupo BIOMICs.

Los análisis genéticos fueron realizados siguiendo las directrices de la *International Society of Forensic Genetics* (ISFG) y del GHEP-ISFG (Grupo de Habla Española y Portuguesa de la ISFG).

Todos los procesos fueron supervisados por la Dra. Miriam Baeta.



II. RESULTADOS ANALÍTICOS

Los resultados de cuantificación y la pureza del extracto de ADN de los restos post-mortem y de las muestras de familiares se recogen en las tablas 1 y 2, respectivamente.

Tabla 1. Resultados de cuantificación y pureza del extracto de ADN de los restos post-mortem. En caso de que se haya repetido la extracción de una muestra se indican también los valores de cuantificación y pureza correspondientes a estas extracciones adicionales.

| Muestra | Extracción | ng/ μ l | Ct IPC* |
|----------------|---------------|---------------|---------|
| BADN1521GC-BIO | 1ª Extracción | 0,097 | 27,95 |
| BADN1522GC-BIO | 1ª Extracción | Indeterminado | 27,39 |
| | 2ª Extracción | 0,004 | 28,9 |
| BADN1523GC-BIO | 1ª Extracción | Indeterminado | 27,35 |
| | 2ª Extracción | 0,026 | 28,7 |
| BADN1524GC-BIO | 1ª Extracción | 0,158 | 27,58 |
| | 2ª Extracción | Indeterminado | 28,90 |
| BADN1525GC-BIO | 1ª Extracción | Indeterminado | 27,98 |
| | 2ª Extracción | Indeterminado | 29,30 |
| BADN1526GC-BIO | 1ª Extracción | 0,005 | 30,30 |
| BADN1527GC-BIO | 1ª Extracción | 0,006 | 28,17 |
| | 2ª Extracción | Indeterminado | 30,50 |
| BADN1528GC-BIO | 1ª Extracción | Indeterminado | 29,77 |
| | 2ª Extracción | Indeterminado | 29,00 |
| BADN1529GC-BIO | 1ª Extracción | 0,056 | 27,54 |
| BADN1530GC-BIO | 1ª Extracción | Indeterminado | 27,05 |
| | 2ª Extracción | 0,004 | 29,10 |
| BADN1531GC-BIO | 1ª Extracción | 0,0128 | 27,49 |
| | 2ª Extracción | 0,008 | 28,50 |
| BADN1532GC-BIO | 1ª Extracción | Indeterminado | 27,93 |
| | 2ª Extracción | 0,004 | 29,40 |

*Ct IPC (Internal PCR Control): control interno de PCR que determina el grado de inhibición de cada muestra analizada. Valores de Ct IPC entre 20 y 30 indican que la reacción PCR de cuantificación no se encuentra inhibida.

Tabla 2. Resultados de cuantificación y pureza del extracto de ADN de las muestras de familiares.

| Muestra | ng/ μ l | A260 | A280 | 260/280 | 260/230 |
|----------------|-------------|------|------|---------|---------|
| BADN1533GC-BIO | 41,94 | 0,84 | 0,69 | 1,22 | 0,15 |
| BADN1534GC-BIO | 45,31 | 0,92 | 0,70 | 1,30 | 0,21 |
| BADN1535GC-BIO | 99,24 | 1,99 | 1,00 | 1,99 | 0,24 |

En los restos post-mortem BADN1522GC-BIO, BADN1525GC-BIO, BADN1528GC-BIO, BADN1530GC-BIO y BADN1532GC-BIO no se ha detectado la cantidad de ADN nuclear mínima para proceder a los análisis genéticos de marcadores nucleares.

Ila. Marcadores nucleares autosómicos

Se estudiaron marcadores microsatélites autosómicos para investigar el parentesco biológico paterno-filial entre los restos post-mortem y los familiares. Los resultados se muestran en las tablas 3 y 4.

Tabla 3. Perfil genético de STRs autosómicos de los restos post-mortem.

| Marcador | Restos post-mortem | | | | | | | | | | | | | |
|----------|--------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|-------|-------------------|-------|
| | BADN1521 GC-BIO | | BADN1523 GC-BIO | | BADN1524 GC-BIO | | BADN1526 GC-BIO | | BADN1527 GC-BIO | | BADN1529 GC-BIO | | BADN531 GC-BIO | |
| | Alelo | Alelo | Alelo | Alelo |
| AMEL | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| D10S1248 | X | Y | - | Y | X | Y | - | - | - | Y | X | Y | X | Y |
| VWA | 14 | 16 | - | - | - | - | - | - | 16 | - | 16 | 19 | 16 | 17 |
| D16S539 | 11 | 12 | - | - | - | - | - | - | - | - | 11 | 13 | 11 | - |
| D2S1338 | 18 | 27 | - | - | - | - | - | 22 | - | - | 17 | - | 19 | - |
| D8S1179 | 10 | 15 | 10 | 11 | 12 | - | - | 11 | - | - | 12 | 15 | 13 | - |
| D21S11 | 29 | 32.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | 29 | 30 | - | - |
| D18S51 | 15 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 16 | - | - | - |
| D22S1045 | 16 | - | 12 | 14 | 17 | - | - | 15 | - | - | 15 | 16 | 15 | 16 |
| D19S433 | 13 | 14 | 13 | - | 14 | - | - | 13 | 14 | 14 | 13 | 14 | - | - |
| TH01 | 6 | 9.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | 8 | 9 | 6 | - |
| FGA | 20 | 26 | 20 | - | - | - | - | 19 | - | - | 24 | 25 | - | - |
| D2S441 | 10 | 14 | 11.3 | 14 | 11 | 14 | - | - | - | - | 11 | - | 10 | 11 |
| D3S1358 | 14 | 18 | 18 | - | 18 | - | - | 15 | 19 | 19 | 15 | 17 | 15 | - |
| D1S1656 | 12 | 13 | - | - | - | - | - | 13 | - | - | 14 | 15 | 15 | - |
| D12S391 | 17 | 21 | - | - | - | - | - | - | - | - | 16 | 21 | 21 | - |
| SE33 | 18 | 23.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | 20 | 21 | 24.2 | - |



Tabla 4. Perfil genético de STRs autosómicos de las muestras de familiares.

| Marcador | Muestras de familiares | | | | | |
|-----------------|------------------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| | BADN1533GC-BIO | | BADN1534GC-BIO | | BADN1535GC-BIO | |
| | Alelo 1 | Alelo 2 | Alelo 1 | Alelo 2 | Alelo 1 | Alelo 2 |
| AMEL | X | Y | X | | X | |
| D10S1248 | 13 | | 13 | | 14 | 15 |
| vWA | 14 | 18 | 16 | 17 | 16 | |
| D16S539 | 13 | | 11 | 13 | 10 | 12 |
| D2S1338 | 24 | | 17 | | 17 | 19 |
| D8S1179 | 13 | | 13 | 14 | 14 | |
| D21S11 | 29 | 30 | 29 | 32.2 | 28 | 29 |
| D18S51 | 14 | | 16 | | 13 | |
| D22S1045 | 16 | | 16 | 17 | 17 | |
| D19S433 | 12 | 15.2 | 14 | 15 | 13 | 14 |
| TH01 | 7 | 9.3 | 6 | | 6 | 7 |
| FGA | 21 | 24 | 20 | 24 | 21 | 23 |
| D2S441 | 14 | | 11 | 15 | 11 | 14 |
| D3S1358 | 16 | 17 | 14 | | 15 | 16 |
| D1S1656 | 14 | 16 | 12 | 17.3 | 11 | 15 |
| D12S391 | 20 | 21 | 22 | | 18 | 21 |
| SE33 | 30.2 | 31.2 | 22 | 30.2 | 14 | 17 |

En el caso de los restos post-mortem BADN1521GC-BIO y BADN1529GC-BIO se han obtenido perfiles genéticos informativos (≥ 12 STRs). Se observa exclusión de paternidad entre estos restos post-mortem respecto a los familiares BADN1534GC-BIO y BADN1535GC-BIO.

En el caso de los restos post-mortem BADN1523GC-BIO, BADN1524GC-BIO, BADN1526GC-BIO, BADN1527GC-BIO y BADN1531GC-BIO se han obtenido perfiles genéticos parciales o no informativos (< 12 STRs), que no han permitido el estudio del parentesco biológico.

IIb. Marcadores nucleares del cromosoma Y

Se estudiaron marcadores microsatélites del cromosoma Y para determinar la existencia de parentesco biológico por vía paterna de los restos post-mortem y la muestra del familiar BADN1533GC-BIO. Se excluyeron aquellos restos post-mortem que no dieron resultados para el análisis de STRs autosómicos.

Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Perfil genético de cromosoma Y de los restos post-mortem y la muestra del familiar.

| Marcador | Restos post-mortem | | | | | Muestra de familiar |
|-----------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------|
| | BADN1521 GC-BIO | BADN1524 GC-BIO | BADN1527 GC-BIO | BADN1529 GC-BIO | BADN1531 GC-BIO | BADN1533 GC-BIO |
| DYS576 | 17 | 17 | - | 16 | - | 17 |
| DYS389I | 14 | - | 14 | 12 | - | 12 |
| DYS448 | 20 | 21 | - | 20 | 19 | 21 |
| DYS389II | 30 | - | - | 29 | - | 29 |
| DYS19 | 13 | - | - | - | - | 15 |
| DYS391 | 9 | 10 | - | 10 | - | 10 |
| DYS481 | 27 | 21 | - | 21 | - | 21 |
| DYS549 | 11 | - | - | 12 | - | 13 |
| DYS533 | 11 | - | 12 | 9 | - | 9 |
| DYS438 | 10 | - | - | - | - | 10 |
| DYS437 | 14 | - | - | 16 | - | 16 |
| DYS570 | 22 | - | - | 16 | - | 19 |
| DYS635 | 21 | - | - | 21 | - | 21 |
| DYS390 | 24 | - | 23 | 22 | - | 23 |
| DYS439 | 10 | - | - | 13 | - | 12 |
| DYS392 | 11 | - | 11 | 11 | - | 11 |
| DYS643 | 12 | - | - | 12 | - | 11 |
| DYS393 | 13 | - | 13 | 13 | 13 | 14 |
| DYS458 | 17 | - | - | 17 | 17 | 16 |
| DYS385 | 13,14 | - | 12 | 12 | - | 14,16 |
| DYS456 | 15 | - | - | - | - | 16 |
| GATA_H4 | 11 | - | - | 11 | - | 12 |

En el caso de los restos post-mortem BADN1521GC-BIO y BADN1529GC-BIO, cuyos haplotipos del cromosoma Y han sido informativos, no se observa coincidencia respecto al haplotipo de la muestra del familiar BADN1533GC-BIO para los marcadores analizados que han dado resultado.

En el caso de los restos post-mortem BADN1524GC-BIO, BADN1527GC-BIO y BADN1531GC-BIO se han obtenido haplotipos genéticos parciales o no informativos que limitan el estudio de la relación de parentesco biológico por vía patrilínea.

III. CONCLUSIONES

Individuo 1 (BADN1521GC-BIO) e individuo 9 (BADN1529GC-BIO)

1. El análisis de STRs autosómicos y del cromosoma Y de los restos post-mortem del **Individuo 1** (BADN1521GC-BIO) e **Individuo 9** (BADN1529GC-BIO) han proporcionado perfiles genéticos informativos (≥ 12 STRs).
2. A la vista de los resultados del análisis de los STRs autosómicos es posible concluir que los restos post-mortem del **Individuo 1** (BADN1521GC-BIO) e **Individuo 9** (BADN1529GC-BIO) NO presentan relación de paternidad biológica con **Dña. María Adoración Peláez Lobo** (BADN1534GC-BIO) y **Dña. Isabel Delgado Antuña** (BADN1535GC-BIO).
3. A la vista de los resultados del análisis del cromosoma Y es posible concluir que los restos post-mortem del **Individuo 1** (BADN1521GC-BIO) e **Individuo 9** (BADN1529GC-BIO) NO presentan relación de parentesco biológico por vía patrilínea con **D. Gerardo Cienfuegos Fernández** (BADN1533GC-BIO).

Individuo 2 (BADN1522GC-BIO), Individuo 5 (BADN1525GC-BIO), Individuo 8 (BADN1528GC-BIO), Individuo 10 (BADN1530GC-BIO) e Individuo 12 (BADN1532GC-BIO)

1. La ausencia o escasez de ADN nuclear en los restos post-mortem del **Individuo 2** (BADN1522GC-BIO), **Individuo 5** (BADN1525GC-BIO), **Individuo 8** (BADN1528GC-BIO), **Individuo 10** (BADN1530GC-BIO) e **Individuo 12** (BADN1532GC-BIO) no ha permitido el estudio de marcadores nucleares en estos restos. Por lo tanto, no ha sido posible estudiar la existencia de una relación de parentesco biológico con las muestras de los familiares.

Individuo 3 (BADN1523GC-BIO), Individuo 4 (BADN1524GC-BIO), Individuo 6 (BADN1526GC-BIO), Individuo 7 (BADN1527GC-BIO) e individuo 11 (BADN1531GC-BIO)

1. El análisis de los STRs autosómicos y del cromosoma Y de los restos post-mortem del **Individuo 3 (BADN1523GC-BIO), Individuo 4 (BADN1524GC-BIO), Individuo 6 (BADN1526GC-BIO), Individuo 7 (BADN1527GC-BIO) e Individuo 11 (BADN1531GC-BIO)** no ha permitido la obtención de perfiles informativos para poder estudiar la relación de paternidad biológica respecto a **Dña. María Adoración Peláez Lobo (BADN1534GC-BIO)** y **Dña. Isabel Delgado Antuña (BADN1535GC-BIO)**, ni la relación de parentesco biológico por vía patrilínea con **D. Gerardo Cienfuegos Fernández (BADN1533GC-BIO)**.

IV. ESTADO ACTUAL DE LOS ANÁLISIS

En la actualidad, se está repitiendo la extracción de ADN de los restos post-mortem que no han dado perfiles genéticos informativos para intentar obtener mejores resultados.

Asimismo, debido a la ausencia o escasez de ADN nuclear de los restos post-mortem sería conveniente estudiar el ADN mitocondrial de estas muestras. El ADN mitocondrial presenta una serie de características que lo hacen más resistente a la degradación y, por lo tanto, más susceptible de poder ser estudiado en muestras difíciles. Este tipo de marcador únicamente permite establecer relaciones de parentesco biológico por vía matrilineal. Es por ello, que es necesario obtener muestras de ADN de familiares por línea materna para poder realizar las comparaciones con los restos post-mortem, tales como:

- Hermanos o hermanas del desaparecido.
- Sobrino/as materno/as (hijos o hijas de hermanas del desaparecido).
- Sobrino-nieto/as (hijos o hijas de hijas de hermanas del desaparecido).



V. COSTE DE LOS ANÁLISIS

El coste de los análisis realizados hasta la fecha es de **6.007,65 €** (IVA incluido): 5.553,90€ (IVA incluido) correspondientes al análisis de los restos post-mortem y 453,75 € (IVA incluido) correspondientes al análisis de los familiares.

| COSTE DE LOS ANÁLISIS GENÉTICOS DE LOS RESTOS POST-MORTEM | | | | | | |
|---|----------------|------------|------------------|----------|-----------------------|-----------------------|
| Muestra dubitada | Código interno | Extracción | STRs autosómicos | Y-STRs | COSTE TOTAL (SIN IVA) | COSTE TOTAL (con IVA) |
| Individuo 1 | BADN1521GC-BIO | 250,00 € | 120,00 € | 150,00 € | 520,00 € | 629,20 € |
| Individuo 2 | BADN1522GC-BIO | 250,00 € | | | 250,00 € | 302,50 € |
| Individuo 3 | BADN1523GC-BIO | 250,00 € | 120,00 € | | 370,00 € | 447,70 € |
| Individuo 4 | BADN1524GC-BIO | 250,00 € | 120,00 € | 150,00 € | 520,00 € | 629,20 € |
| Individuo 5 | BADN1525GC-BIO | 250,00 € | | | 250,00 € | 302,50 € |
| Individuo 6 | BADN1526GC-BIO | 250,00 € | 120,00 € | | 370,00 € | 447,70 € |
| Individuo 7 | BADN1527GC-BIO | 250,00 € | 120,00 € | 150,00 € | 520,00 € | 629,20 € |
| Individuo 8 | BADN1528GC-BIO | 250,00 € | | | 250,00 € | 302,50 € |
| Individuo 9 | BADN1529GC-BIO | 250,00 € | 120,00 € | 150,00 € | 520,00 € | 629,20 € |
| Individuo 10 | BADN1530GC-BIO | 250,00 € | | | 250,00 € | 302,50 € |
| Individuo 11 | BADN1531GC-BIO | 250,00 € | 120,00 € | 150,00 € | 520,00 € | 629,20 € |
| Individuo 12 | BADN1532GC-BIO | 250,00 € | | | 250,00 € | 302,50 € |
| TOTAL: | | | | | 4.590,00 € | 5.553,90 € |

| COSTE DE LOS ANÁLISIS GENÉTICOS DE LAS MUESTRAS DE FAMILIARES | | | | | |
|---|------------|------------------|--------|-----------------------|-----------------------|
| Código interno | Extracción | STRs autosómicos | Y-STRs | COSTE TOTAL (SIN IVA) | COSTE TOTAL (con IVA) |
| BADN1533GC-BIO | | 125,00 € | | 125,00 € | 151,25 € |
| BADN1534GC-BIO | | 125,00 € | | 125,00 € | 151,25 € |
| BADN1535GC-BIO | | 125,00 € | | 125,00 € | 151,25 € |
| TOTAL: | | | | 375,00 € | 453,75 € |

Y para que así conste, firmo el presente informe en Vitoria-Gasteiz, a 22 de noviembre de 2018.

Fdo.: Dra. M. Martínez de Pancorbo

Catedrática de Biología Celular
Directora del Grupo Consolidado BIOMICS
Universidad del País Vasco UPV/EHU