ESTUDIOS DE ADN, SITUACIONES DE DIFÍCIL RESOLUCIÓN. DISCRIMINACIÓN ENTRE HERMANOS Y MEDIOS HERMANOS

Armando M. Rennella, Graciela F. Eleta y Rosario Alicia Sotelo Lago

INTRODUCCIÓN

A partir de los últimos años de la década de 1980 la medicina legal inició el empleo de las técnicas moleculares para la identificación, este hecho implicó un salto importante y abrupto que cambió cualitativamente el aporte de la prueba biológica y significó un tránsito hacia una certeza equiparable a las de las huellas dactilares, pudiéndose mencionar como hitos en esta trayectoria la caracterización del sistema mayor de histocompatibilidad primero y la tipificación de polimorfismos del ADN después.

La introducción del sistema mayor de histocompatibilidad (HLA) en la práctica médico forense como recurso para el análisis de vínculos biológicos en personas vivas, significó una ruptura con los grados de certidumbre biológica que en materia de marcadores genéticos se conocían hasta el momento.

Añadiendo aún más certidumbre biológica y con la posibilidad de su empleo en cualquier tipo de rastro biológico, la tecnología de ADN permitió lograr un recurso identificatorio cuya potencial especificidad individual redimensionó otra vez el aporte de las pruebas biológicas destinadas a identificación[1]. Hoy se sabe que el 90% del genoma humano está conformado por secuencias no codificantes, con capacidad de definir la identidad biológica de una persona con una altísima confiabilidad[2]. Esta cualidad convierte a las tecnologías basadas en la tipificación de polimorfismos del ADN en paradigmas de identificación médico-legal.

Por todo esto, el uso del ADN en los estudios de vínculos de parentesco, ha permitido incrementar de manera considerable los niveles de certeza alcanzados en dichos análisis. Esto es así, especialmente cuando el tipo de parentesco estudiado es el de filiación y se dispone de material biológico de todos los involucrados, es decir, del trío conformado por el titular, el progenitor reconocido -que usualmente es la madre- y el progenitor alegado -usualmente el padre-. Bajo estas circunstancias y de no mediar errores de procedimiento, es posible afirmar que los estudios de ADN son conclusivos para casi la totalidad de los casos; ya sea permitiendo descartar la existencia del parentesco alegado, ya sea no excluyéndolo con una probabilidad superior al 99.99 %.

Justamente este enorme poder de discriminación que ofrece el uso del ADN, ha permitido explorar e identificar la existencia de vínculos más lejanos, como son los de se-

gundo grado (relación entre hermanos) y los de tercer grado (entre tíos y sobrinos, abuelos y nietos o medios hermanos). Sin embargo, para este último tipo de escenarios, existen ciertas limitaciones.

Por un lado, a medida que el vínculo se vuelve más remoto, el grado de certeza disminuye y por ello no siempre es posible arribar a dictámenes conclusivos. De hecho, si bien existen métodos para el análisis de vínculos más allá del tercer grado de relación, hay autores que, a los fines prácticos, consideran a personas relacionadas por un vínculo más distante que el de tercer grado como no emparentadas[3].

Por otra parte, en los estudios de parentesco paterno-filial, conocido como vínculo de primer grado, es posible determinar de manera absoluta la exclusión del vínculo. En efecto, según las leyes de la herencia padres e hijos deben compartir material genético en la totalidad de los marcadores analizados, cuando no se constatan dichas coincidencias el vínculo alegado es sin dudas inexistente. Esta posibilidad no se presenta cuando el parentesco analizado es de segundo o tercer grado, ya que en tales vínculos no es obligatorio que el titular y el familiar alegado compartan material genético en todos los marcadores estudiados y por lo tanto el método pierde su capacidad de excluir[4]. En estos casos es posible, aunque poco probable, que dos individuos verdaderamente relacionados entre sí no compartan alelos en la mayoría de los marcadores analizados, es por ello que nunca es posible garantizar de manera absoluta la exclusión del vínculo.

Dadas estas circunstancias, la responsabilidad de asignar el parentesco a nivel genético recae fundamentalmente sobre los indicadores estadísticos, específicamente el índice y la probabilidad de parentesco y, en menor grado, el número de sistemas con material genético compartido, la frecuencia poblacional de dicho material y la probabilidad de que los familiares involucrados compartan material genético por azar. Por otra parte, como hemos dicho, los atributos del método referidos a su sensibilidad y especificidad decrecen cuando se trata de investigar el parentesco entre familiares del segundo grado y son aún menores con familiares del tercer grado, siendo habitual la obtención de índices y probabilidades de parentesco de muy bajo valor. A pesar de que en casos de existencia de vínculo biológico, la probabilidad de compartir material genético se incrementa por la sumatoria de la probabilidad generada por la acción del vínculo y por la acción del azar, ello no impide la existencia de familiares que por ley de herencia biológica comparten escaso material genético transmitido por esta vía, y de personas no relacionadas que presenten por acción del azar similitud de alelos en varios marcadores, con capacidad de generar indicadores de parentesco con valores no despreciables.

Por lo tanto, todo estudio de ADN requiere que una vez obtenidos los perfiles genéticos de los involucrados, se proceda por medio de cálculos estadísticos a establecer el índice de parentesco correspondiente al tipo de relación alegada. En los estudios de filiación con ambos progenitores presentes, existen criterios preestablecidos, ampliamente aceptados, que permiten sostener si un determina-

do valor del índice es lo suficientemente elevado como para no descartar el vínculo estudiado con un grado de certeza aceptable. No existen, sin embargo, criterios ya pautados que contemplen toda la diversidad de situaciones que pueden presentarse al analizar parentescos más alejados. Más aún, por lo general, los estudios de ADN están orientados a confrontar entre dos hipótesis alternativas, que son la existencia de un vínculo determinado entre dos personas o la ausencia de dicho parentesco. Una situación diferente, pero que suele presentarse, es la de discriminar si dos personas son hermanos o medios hermanos entre sí. En este caso no se evalúa la existencia o ausencia del vínculo alegado sino que se debe valorar entre dos tipos de parentescos alternativos.

En aquellos casos en los que se cuenta con muestras de material biológico de los progenitores alegados y reconocidos, el problema se circunscribe a la realización de sendos estudios de filiación. Resulta evidente que si se demuestra que dos personas son hijos del mismo padre y de la misma madre, queda comprobado el vínculo de hermandad entre ellos. Por el contrario, si se concluye que tienen un solo progenitor en común, entonces serán medios hermanos. Tal abordaje del problema planteado no es viable cuando no se cuenta con material biológico de los posibles padres.

El objetivo del presente trabajo es justamente explorar criterios de valoración que permitan discriminar entre vínculos de hermandad y de media hermandad cuando no se dispone de material biológico de los progenitores tanto reconocidos como alegados.

METODOLOGÍA

Fue posible contar con perfiles genéticos correspondientes a 15 pares de hermanos y 16 pares de personas cuyo vínculo era de tercer grado. Este último grupo estaba compuesto tanto por medios hermanos como por abuelos-nietos y tíos-sobrinos. Sin embargo todos serán considerados como medios hermanos, en virtud de que por las leyes de la herencia estos tipos de parentesco son equivalentes entre sí respecto de la cantidad de material genético compartido. Por otra parte, con el fin de mejorar los niveles de certeza se incrementó por simulación el número de hermanos y de medios hermanos. A partir de 392 perfiles genéticos de individuos no emparentados entre sí, fue posible conformar por azar 196 pares independientes de individuos que se usaron como progenitores para generar por simulación 196 pares de hermanos. Asimismo, a partir de los genotipos de los mismos 392 individuos no emparentados se conformaron 130 tríos de perfiles con el objeto de generar a partir de ellos, también por simulación, 130 pares de medios hermanos.

En todo los casos, para la obtención de los perfiles genéticos fueron utilizados los siguientes 15 marcadores autosómicos: D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, PENTA E, VWA, D8S1179, TPOX, FGA, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO y PENTA D. Posteriormente para cada uno de los pares de individuos descriptos, se determinaron los índices de hermandad y media hermandad propuestos por Wenk[5].

Finalmente se calculó la sensibilidad y la especificidad de distintos criterios de discriminación entre hermanos y medios hermanos. Se

define como sensibilidad de un test a la probabilidad de que dicho test arroje un resultado positivo cuando las dos personas bajo análisis están realmente emparentadas. Por otra parte, la especificidad de un test es la probabilidad de que el test resulte negativo cuando los involucrados no están relacionados[6].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Wenk[5] exploró y propuso como criterio para discriminar entre hermanos y medios hermanos el uso del cociente entre el índice de hermandad y el de media hermandad (I.H./I.M.H.). En el citado estudio, que estaba basado en el uso de marcadores VNTR -un tipo de fragmentos de ADN-, el cociente adquiría valores mayores que uno cuando el vínculo era efectivamente de hermandad y menores que uno si el vínculo era de media hermandad.

Los marcadores VNTR han caído tanto en la Argentina como en el ámbito internacional prácticamente en desuso. Es por eso que resulta conveniente revisar y mejorar los criterios de discriminación en función de los marcadores genéticos que son de rutina en la actualidad, los denominados STR que también son fragmentos de ADN pero de menor tamaño que los VNTR.

Nuestros resultados, basados en estos últimos marcadores, reflejan ciertas coincidencias con los obtenidos por Wenk. En 30 de los 36 pares de hermanos y medios hermanos analizados, el parentesco sería correctamente asignado si se siguiera el criterio de dicho autor, esto le otorgaría al método, utilizando marcadores STR, una sensibilidad del 83 %. En efecto para 16 de los 20 pares de hermanos el cociente I.H./I.M.H. adquiere valores mayores a uno y en 13 de los 16 pares de medios hermanos dicho cociente resulta menor que uno. Si se considera sólo la correcta asignación del vínculo de hermandad, la sensibilidad sería del 80 % y la especificidad del 76 %.

En la figura 1 se presenta el modo en que varía el cociente propuesto por Wenk (I.H./I.M.H.) en función del índice de hermandad. La tendencia general es de un incremento gradual de dicho cociente a medida que aumenta el índice de hermandad. Al mismo tiempo, como era de esperar, el índice de hermandad y el cociente alcanzan los valores máximos cuando se comparan personas que realmente son hermanos y presentan valores mínimos cuando el tipo de vínculo es de medios hermanos.

Al comparar las distribuciones de los valores del cociente entre los grupos de hermanos y medios hermanos, es posible observar una zona de superposición. Esta zona se presenta cuando los índices de hermandad adquieren valores entre 16 y 450 y el cociente I.H./I.M.H se aproxima a la unidad (Figura 1).

Una característica observable para dicha región de solapamiento es el bajo nivel de precisión que presenta el criterio propuesto por Wenk para distinguir entre hermanos y medios hermanos. De hecho, de cinco pares de medios hermanos ubicados en dicha zona, tres presentan valores del cociente mayores a uno, al tiempo que de cinco pares de hermanos dos están por debajo de dicha cifra.

Resulta conveniente considerar esta zona de superposición, como

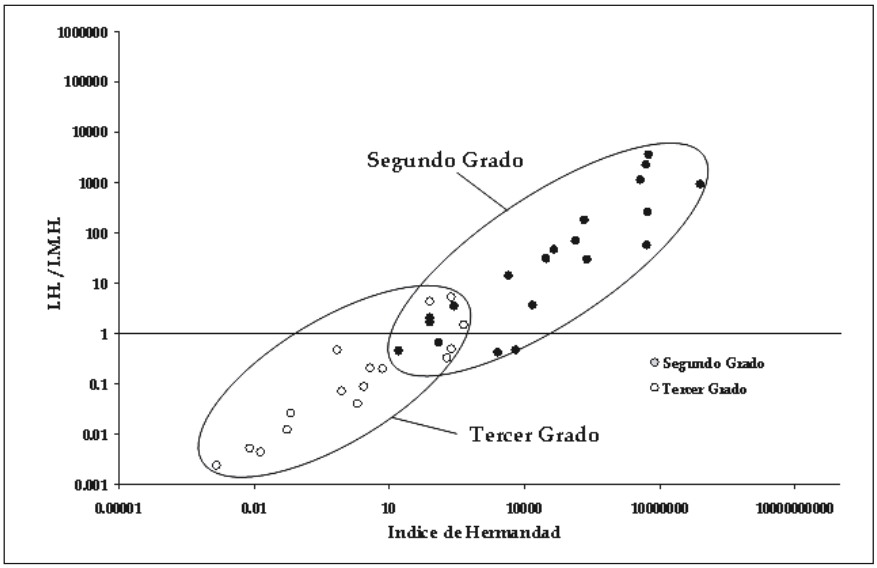

Figura 1. *Variación del cociente de los índices de hermandad y media hermandad en función del valor del índice de hermandad para parentescos de segundo y tercer grado. La línea horizontal marca el límite propuesto por Wenk para discriminar entre hermanos y medios hermanos, ver texto. I.H.: Índice de Hermandad, I.M.H.: Índice de media hermandad.*

una región de incertidumbre dentro de la cual no es posible discriminar entre sendos tipos de parentesco[7]. Por lo tanto, podría proponerse para diferenciar entre hermanos y medios hermanos el siguiente criterio: *obtención de un índice de hermandad superior a 450, para establecer un vínculo de hermandad e inferior a 16 para asignar el vínculo de media hermandad.* Con este nuevo criterio, en términos promedios, el 28 % de los estudios realizados arrojaría resultados no conclusivos pero en el 72 % restante se asignaría el tipo de parentesco con una sensibilidad del 100 %, lo que quiere decir que el margen de error sería prácticamente nulo.

Por lo tanto, utilizando sólo el índice de hermandad y sin recurrir al cociente propuesto por Wenk se logra generar un criterio adecuado para la discriminación entre hermanos y medios hermanos. Sin embargo, los perfiles genéticos a partir de los cuales se realizaron las comparaciones del presente trabajo, fueron obtenidos a partir de los estudios de ADN llevados adelante en el marco de los expedientes y causas judiciales que tramitan ante el *Cuerpo Médico Forense*. Es por ello que el número de parentescos de hermandad y de media hermandad que pudieron ser incorporados fue restringido. Esta situación representa una limitación en el análisis presentado, dado que es de esperar que un incremento en el número de casos estudiados conlleve un aumento en el rango de dispersión de los datos, con lo que podría intensificarse el solapamiento descripto previamente. Es por ello que se decidió confeccionar por simulación perfiles genéticos correspondientes a hermanos (196 perfiles) y medios hermanos (130 perfiles).

En la Figura 2 se presentan los resultados obtenidos a partir de los perfiles generados por simulación.

Tal como era de esperar, con el aumento del número de casos el grado de superposición entre hermanos y medios hermanos incrementa notablemente. De todos modos, el patrón general descripto previamente se mantiene, esto es, tanto el índice de hermandad como el cociente I.H./I.M.H. en términos promedio resultan más elevados para hermanos que para medios hermanos.

El criterio de discriminación propuesto por Wenk tendría, para los casos simulados, una sensibilidad del 80 %, que es levemente inferior a la encontrada para los casos reales. En efecto 175 de los 196 pares de hermanos simulados presentan valores del cociente I.H./I.M.H. mayores a uno y en 106 de los 130 pares de medios hermanos simulados el cociente alcanza valores menores que uno.

Por otra parte, si se mantiene la premisa de declarar el área de máxima superposición como una zona de incertidumbre donde no es posible alcanzar resultados conclusivos, el rango de valores del índice de hermandad para dicha región aumenta en virtud del mencionado incremento en el solapamiento de los datos. De este modo, el criterio de discriminación antes propuesto cambiaría por el siguiente: *obtención de un índice de hermandad superior a 15000 para determinar un vínculo de hermandad y de un índice de hermandad inferior a 10.5 para un parentesco de media hermandad.*

Siguiendo estas pautas se obtendría un 40 % de resultados no conclusivos, valor que resulta ser muy superior al encontrado cuando se analizaron los casos reales. Para disminuir este porcentaje resulta necesario recurrir al cociente propuesto por Wenk y establecer un doble criterio de discriminación. De este modo se requeriría la o*btención de un índice de hermandad superior a 15000 o un valor para el cociente I.H./I.M.H. mayor a 6.6 para establecer un vínculo de hermandad*. Mientras que para determinar una relación de *media hermandad la consigna sería un índice de hermanad inferior a 10.5 o un valor del cociente I.H./I.M.H. inferior a 0.4* (Figura 2).

De este modo los resultados no conclusivos disminuyen al 23 % de los casos simulados, que es incluso inferior al obtenido para los casos reales. En efecto 46 de los 196 pares de hermanos simulados y 28 de los 130 pares de medios hermanos simulados se encontrarían en la zona de incertidumbre (Tabla 1 y Figura 2). Asimismo, para el 77 % restante la sensibilidad resultante sería de un aceptable 95 %, en virtud de que sólo 9 hermanos simulados y 3 medios hermanos simulados de los 252 restantes, serían incorrectamente discriminados (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de resultados para los perfiles de hermanos y medios hermanos obtenidos por simulación.

	Correctos	*No conclusivos*	*Incorrectos*	*Total*
Hermanos	141	46	9	196
Medios Hermanos	99	28	3	130
Total	240	74	12	326

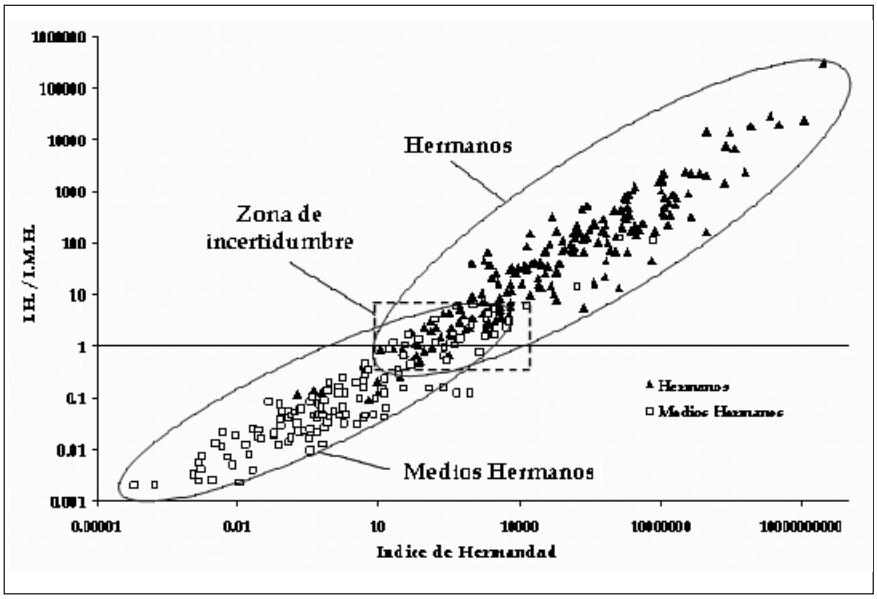

Figura 2. *Variación del cociente de los índices de hermandad y media hermandad en función del valor del índice de hermandad para 196 pares de hermanos y 130 pares de medios hermanos obtenidos por simulación. La línea horizontal marca el límite propuesto por Wenk para discriminar entre hermanos y medios hermanos, ver texto. I.H.: Indice de Hermandad. I.M.H.: Indice de media hermandad.*

Como se ha descripto, para nuestros datos existe una zona de incertidumbre cuando los valores del índice de hermandad se encuentran entre 10.5 y 15000 o el cociente de I.H./I.M.H. se encuentra entre 0.4 y 6.6. En tales situaciones, se dijo que el estudio debería ser considerado no conclusivo, sin embargo, existen procedimientos complementarios que podrían aportar información de valor. Estos procedimientos, que deben ser considerados e instrumentados según las condiciones de cada caso, son: estudios de marcadores del cromosoma Y, estudios de ADN mitocondrial o aumento del número de marcadores autosómicos analizados.

Los polimorfismos del cromosoma sexual Y se transmiten en bloque y sin modificaciones de una generación a otra de varones, conformando patrones genéticos que sólo pueden ser modificados por fenómenos mutacionales. Los descendientes de sexo masculino pertenecientes a una misma línea paterna presentan el mismo patrón Y, característica que hace a estos marcadores aplicables a investigaciones de parentesco, donde los involucrados (titulares y familiares alegados) son de sexo masculino, y en las cuales los marcadores Y adquieren un rol protagónico, con capacidad discriminatoria muy frecuentemente superior a su contraparte autosómica. Se recomienda un haplotipo de no menos de 9 marcadores para su empleo forense, si bien un mayor número de marcadores empleados intensificaría el poder identificatorio del método[8, 9]. Por lo tanto, aunque restringido para personas de sexo masculino, los marcadores del cromosoma Y podrían ser importantes en el esclarecimiento del 23 % de estudios no conclusivos, esperados en los estudios de ADN autosómico usando los marcadores STR, cuando se requiere discriminar entre hermanos y medios her-

manos. En efecto, si el vínculo cuestionado es el paterno y no está en duda la relación por vía materna, entonces la coincidencia de la información genética en el cromosoma Y permitiría establecer que ambos individuos comparten la misma patrilínea. Por el contrario, de existir divergencias en la información genética en dicho cromosoma entonces se podría asegurar que esa patrilínea no es compartida y por lo tanto son medios hermanos.

Análogamente, pero no restringido por el sexo, es posible el estudio de parentescos por vía materna mediante el análisis del ADN mitocondrial. El estudio de las regiones hipervariables I y II complementa la técnica del ADN nuclear en instancias donde el análisis de parentesco debe efectuarse con familiares maternos, ya que el patrón mitocondrial se hereda en bloque de madres a hijos, tanto varones como mujeres, presentando los descendientes de una misma línea materna igual patrón mitocondrial, cuyas variaciones sólo pueden generarse a través de mutaciones [10, 11]. Por ello, aunque no sea la situación que se presenta con mayor frecuencia, el estudio de ADN mitocondrial permitiría determinar la existencia de vínculos por vía materna, si estos estuvieran cuestionados o en duda.

Por último, una alternativa válida para mejorar los niveles de certeza cuando un estudio resulta no conclusivo, consiste en el aumento de la cantidad de marcadores genéticos autonómicos analizados. Si bien el número de 15 marcadores utilizados en el presente estudio es de por sí elevado y suele bastar para alcanzar resultados conclusivos en la mayoría de las situaciones en que habitualmente debe intervenir el Cuerpo Médico Forense, un número aún mayor permitiría incrementar los niveles de certeza en situaciones excepcionales como las abordadas en el presente trabajo, disminuyendo por consiguiente el porcentaje de estudios con resultados no conclusivos.

CONCLUSIONES

El criterio propuesto por Wenk, al ser aplicado a perfiles obtenidos a partir de marcadores STR pierde especificidad y por lo tanto resulta necesario definir nuevas pautas para discriminar entre hermanos y medios hermanos.

Del estudio de la distribución de los índices de parentesco de los 36 casos reales y los 326 casos simulados, se reconoce la existencia de una zona de superposición entre hermanos y medios hermanos dentro de la cual no sería posible obtener resultados que sean claramente orientadores para la asignación de un tipo de parentesco determinado.

Se propone un criterio de discriminación que contempla la existencia de dicha zona y que considera tanto los valores del índice de hermandad como los del cociente I.H./I.M.H.

El criterio sugerido establece como requisito para orientar hacia un parentesco de hermandad la obtención de un índice de hermandad superior a 15000 o un valor para el cociente I.H./I.M.H. mayor a 6.6. Mientras que para establecer un vínculo de media hermandad la consigna sería la obtención de un índice de hermandad inferior a 10.5 o un valor del cociente I.H./I.M.H. inferior a 0.4

Siguiendo estas premisas se obtendría un 23 % de resultados no conclusivos, valor que podría disminuir mediante el uso de procedimientos alternativos y complementarios de enorme valor informativo como son los marcadores del cromosoma Y, los estudios de ADN mitocondrial o el incremento del número de marcadores autonómicos utilizados.

BIBLIOGRAFÍA

1. R. Chakraborty , S. Kidd. The utility of DNA typing in forensic work. Science 1991, 254: 1735-1739.

2. Research News, Mining treasures from "Junk DNA". Science. Vol. 263. February 4. 1994.

3. J.Lee, H-S. Lee, M. Park, J-J. Hwang. Paternity probability when a relative of the father is an alleged father. Science and Justice 1999, 39: 223-230.

4. R. Wenk, M. Traver, F. Chiafari. Determination of sibship in any two persons. Transfusion 1996, 36: 259-262.

5. R. Wenk, F. Chiafari. Distinguishing full siblings from half-siblings in limited pedigrees. Transfusion 2000, 40: 44-47.

6. R. Gaytmenn, D. Hildebrand, D. Sweet, I.A. Pretty. Determination of the sensitivity and specificity of sibship calculations using AmpF/STR Profiler Plus. Int. J. Legal Med. 2002, 116: 161-164.

7. R.W. Allen, J. Fu, T.M. Reid & Michael Baird. Considerations for the interpretation of STR results in cases of questioned half-sibship. Transfusion 47: 515-519.

8. D. Corach, L. Filgueira Risso, M. Marino, G. Penacino, A. Sala. Routine Y-STR typing in forensic casework. Forensic Science International 2001, 118: 131-135.

9. B. Rolf, W. Keil, B. Brinkman, L. Roewer, R. Fimmers. Paternity testing using Y-STR haplotypes: assigning a probability for paternity in cases o mutation. Int J Legal Med 2001, 115: 12-15.

10. S. Lutz, J. Weisser, J. Heizmann, S. Pollak. MtDNA as a tool for identification of human remains. Int J Legal Med 1996, 109: 205-209.

11. M. Wilson, J. Dizinno, D. Polanskey, J. Replogle, B. Budowle. Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. Int J Legal Med 1995, 108: 68-74.