

LA EVOLUCIÓN EN LOS TRIBUNALES

APLICACIONES FORENSES DE LAS FILOGENIAS MOLECULARES

FERNANDO GONZÁLEZ CANDELAS

En las dos últimas décadas se ha generalizado el uso de pruebas genéticas en los tribunales, lo que ha permitido identificar criminales a partir de restos biológicos, determinar paternidades o identificar cadáveres. Menos conocidas son las periciales basadas en el uso de filogenias moleculares. En ellas se estudia la ancestralidad común de organismos, normalmente virus o bacterias, para establecer su asociación a una fuente de infección. Desde el caso del dentista de Florida, que infectó con el VIH a varios de sus pacientes, hasta el más próximo del anestesista Juan Maeso, que transmitió el VHC a cerca de 300 pacientes, la teoría evolutiva tiene un papel esencial en estas pruebas. En este artículo se explican las bases de esta aplicación de la teoría evolutiva.

Palabras clave: ancestro común, virus, reloj molecular, razón de verosimilitudes, hipótesis evolutivas.

Las teorías científicas no se discuten en los tribunales o, al menos, no desde hace varios siglos. Los procesos contra Galileo Galilei, Giordano Bruno o Miguel Servet, entre otros, se desarrollan en tribunales eclesiásticos, no civiles, y, en muchas ocasiones, las condenas se basaron en disputas religiosas no ligadas necesariamente a las herejías derivadas de nuevas teorías científicas. Hay una notable excepción: la teoría de la evolución biológica, formulada por Charles Darwin y Alfred R. Wallace a mitad del siglo XIX, es cuestionada periódicamente en tribunales estadounidenses de todos los niveles, donde se pone en duda su validez como teoría científica para ser incluida en los temarios de enseñanza secundaria. Pero es otro tipo de presencia en tribunales del que nos vamos a ocupar aquí.

La evolución hace su aparición en tribunales de justicia desde la última década del siglo pasado. En un número creciente de ocasiones, especialistas en biología evolutiva son llamados a declarar como expertos en demandas civiles y, ocasionalmente, penales. En todas ellas hay un nexo común: la transmisión de un agente infeccioso, normalmente un virus como el de la inmuno-

deficiencia humana (VIH) o el de la hepatitis C (VHC), desde una fuente común a uno o varios receptores que se infectan con él. Dada la gravedad de estas infecciones, que pueden acabar en la muerte del paciente, los afectados suelen buscar en los tribunales compensación por los daños físicos, psicológicos y económicos causados. Frecuentemente, la fuente está vinculada a un acto médico, una transfusión con material contaminado o el uso de un producto o aparato no esterilizado, pero también encontramos casos de malas prácticas, incluso de actos criminales.

«EN UN NÚMERO
CRECIENTE DE OCASIONES,
ESPECIALISTAS EN
BIOLOGÍA EVOLUTIVA SON
LLAMADOS A DECLARAR
COMO EXPERTOS EN
DEMANDAS CIVILES
Y, OCASIONALMENTE,
PENALES. EN TODAS ELLAS
HAY UN NEXO COMÚN:
LA TRANSMISIÓN DE UN
AGENTE INFECCIOSO»

■ EVOLUCIÓN A RITMO ACCELERADO

Uno de los postulados principales de la teoría de la evolución es la ancestralidad común de todos los seres vivos. Aunque algunos detalles de las primeras etapas de la vida organizada ya en forma de células son aún controvertidos, las pruebas a favor de este origen común de todos los organismos son lo suficientemente firmes como para que esta idea sea aceptada por la biología actual como uno de sus pilares básicos. A partir de ella, y dado que otro de los postulados básicos esta-

2007 Tree of Life Web Project. Image of Rose © 1999 Nick Kurzenko. Image of annelid worm © 2001 Greg W. Rouse



blece la continuidad física entre el material hereditario de ancestros y descendientes, entre padres (principalmente las madres, cuando hay diferenciación sexual) e hijos, sería en teoría posible trazar un gigantesco árbol genealógico que vinculase a todos los seres vivos que existen o han existido y han dejado descendencia hasta nuestros días a partir del estudio de su material hereditario. Con objetivos semejantes, aunque algo más modestos, hay establecidos varios proyectos para desentrañar lo que se conoce como «árbol de la vida» (<<http://www.tolweb.org/tree/>>).

Los métodos empleados para ello se basan, fundamentalmente, en el análisis de la variación y evolución del material hereditario, principalmente el ADN (ácido desoxirribonucleico), que es la molécula de la herencia común a todos los organismos celulares, si bien algunos virus, entre ellos patógenos importantes como el VIH o el de la gripe, tienen otra molécula para transmitir

Uno de los postulados principales de la teoría de la evolución es la ancestralidad común de todos los seres vivos. A partir de ella, y dado que otro de los postulados básicos establece la continuidad física entre el material hereditario de ancestros y descendientes, sería en teoría posible trazar un gigantesco árbol genealógico que vinculase a todos los seres vivos que existen o han existido y han dejado descendencia hasta nuestros días a partir del estudio de su material hereditario. Con objetivos semejantes hay establecidos varios proyectos para desentrañar lo que se conoce como «árbol de la vida».

«LA FILOGENÉTICA MOLECULAR TRATA DE RECONSTRUIR LAS RELACIONES EVOLUTIVAS Y GENEALÓGICAS ENTRE ORGANISMOS A PARTIR DE LAS SECUENCIAS DE GENES O PROTEÍNAS HOMÓLOGOS»

el mensaje genético, el ARN (ácido ribonucleico). Mediante el uso de modelos cada vez más complejos para representar los procesos de cambio evolutivo a nivel molecular y la utilización de métodos de computación más sofisticados, la filogenética molecular consigue establecer con creciente precisión y fiabilidad las relaciones de parentesco entre todo tipo de organismos a partir de la comparación de las secuencias de nucleótidos que conforman el mensaje hereditario.

A diferencia de otras aplicaciones de la biología en el análisis forense, en las que se busca establecer la identidad entre los restos biológicos encontrados en la escena de un crimen y los de los posibles sospechosos o determinar el parentesco entre individuos, la base de la aplicación forense del análisis filogenético de secuencias radica en el estudio de las diferencias acumuladas entre estas desde su divergencia del ancestro común. A lo largo de la evolución consideramos que los distintos linajes que surgen de la diferenciación a partir de un ancestro común van a acumular diferencias a todos los niveles, desde el molecular hasta los conductuales, de forma independiente, de manera que lo que inicialmente era una identidad casi perfecta, con el paso de las generaciones da lugar a un número creciente de diferencias. A grandes rasgos, cuanto mayor es el número de diferencias acumuladas más tiempo ha transcurrido desde que los organismos comparados divergieron desde su ancestro común. El número de diferencias que podemos observar depende de dos factores básicos, el tiempo transcurrido y la tasa de cambio evolutivo, que solo pueden separarse en principio a partir de estimas independientes de uno u otro. En función del tipo de organismo, de la naturaleza de los caracteres comparada y de la tasa de evolución asociada a ellos podemos encontrar casos en que apenas hay diferencias al cabo de millones de años de evolución independiente y otros en los que apenas unos días o semanas bastan para apreciar estas diferencias.

Los organismos que presentan estas tasas tan rápidas de cambio evolutivo suelen tener el genoma basado en el ARN y, como ya hemos indicado, son patógenos como el VIH, el VHC o el virus de la gripe A. Sus tasas de evolución son hasta un millón de veces más rápidas que las de los organismos a los que infectan, siendo el resultado de sus peculiares maquinarias de copia del material hereditario, que no poseen capacidad de corrección de error, de unos tamaños poblacionales muy grandes (en un pa-

ciente infectado se producen miles de millones de nuevas partículas virales cada día) y de unos tiempos de generación muy breves, de apenas unos minutos. Esta elevada tasa evolutiva tiene importantes consecuencias clínicas, tales como la dificultad para encontrar vacunas eficaces para el VIH o el VHC, el rápido desarrollo de mutaciones de resistencia a los antivirales o la facilidad con la que se adaptan a nuevos huéspedes. La otra cara de la moneda es que podemos observar en tiempo real cómo evolucionan sus poblaciones, pues acumulan suficientes cambios en cuestión de semanas o meses como para posibilitar la aplicación de los métodos de filogenética molecular para la reconstrucción de su historia a corto plazo.

■ FILOGENIAS MOLECULARES

La filogenética molecular trata de reconstruir las relaciones evolutivas y genealógicas entre organismos a partir de las secuencias de genes o proteínas homólogas. Nace como disciplina científica a mediados de los años sesenta, pero el gran despegue se produce a principios de este siglo, con la acumulación de secuencias de genes y genomas de los más diversos organismos. El desarrollo de nuevos algoritmos y el aumento de la potencia de cálculo de los ordenadores han permitido aplicar métodos cada vez más sofisticados, como la máxima verosimilitud o la inferencia Bayesiana, a conjuntos de datos cada vez mayores. El resultado es que disponemos en la actualidad de procedimientos para construir y contrastar hipótesis

evolutivas cada vez más complejas.

Cuando se aplican a casos de infecciones de patógenos con evolución rápida, las filogenias moleculares son una herramienta esencial para desentrañar las posibles transferencias y su dirección (quién infecta y quién es infectado), las fuentes de brotes, estimar los tiempos en que se ha producido la infección, etc., todo ello aplicado a acontecimientos separados por unas pocas semanas o meses. En su aplicación a casos judiciales, una cuestión básica a resolver es determinar si las muestras obtenidas a partir de distintos pacientes comparten un ancestro común más próximo con la posible fuente de infección que con otros individuos infectados de la población general y que se toman como controles externos. El primer caso en que se aplicó esta metodología es una excelente ilustración del problema y cómo se puede resolver.

«EL DIAGNÓSTICO DE
INFECCIÓN POR VIH A
UNA MUJER QUE NO
REALIZABA NINGUNA
PRÁCTICA DE RIESGO
CONOCIDA DIO LUGAR A
UNA INVESTIGACIÓN QUE
SEÑALÓ A SU DENTISTA,
PORTADOR DEL VIH, COMO
POSIBLE FUENTE DE LA
INFECCIÓN»

■ INFECCIONES Y TRIBUNALES

A finales de la década de los ochenta del pasado siglo, la epidemia de sida avanzaba sin control por muy diversos países y comunidades. No se disponía entonces de medicamentos que pudiesen detener el avance de la enfermedad y su diagnóstico representaba poco menos que el anuncio de una muerte próxima. Se sabía que la enfermedad estaba ocasionada por un retrovirus y que este se transmitía de persona a persona mediante fluidos corporales, especialmente la sangre, aunque podía haber vectores intermedios, como agujas hipodérmicas. El diagnóstico de infección por VIH a una mujer que no realizaba ninguna práctica de riesgo conocida dio lugar a una investigación que señaló a su dentista, portador del VIH, como posible fuente de la infección. Hasta ese momento no se había considerado la posibilidad de que el VIH pudiese transmitirse a través del instrumental odontológico, por lo que no había una normativa de seguridad al respecto. La mujer decidió demandar al pro-

«EN ALGUNA OCASIÓN LA DEMANDA SE HA VISTO EN UN TRIBUNAL PENAL Y NO CIVIL, COMO EN EL CASO DE RICHARD SCHMIDT, ACUSADO DE INTENTO DE HOMICIDIO POR EMPLEAR SANGRE INFECTADA CON LOS VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA Y DE LA HEPATITIS C»

fesional por la vía civil buscando una compensación a los daños que le había producido. El caso se complicó cuando se descubrió que seis pacientes más del mismo dentista también estaban infectados por el VIH. La pregunta ahora ya no era si la primera paciente había sido infectada o no por el dentista, sino cuántos, y cuáles, de sus pacientes lo habían sido, pues algunos de ellos sí que manifestaron haber realizado prácticas de riesgo. Para responderla, un equipo de expertos secuenció un fragmento del genoma del virus de muestras obtenidas tanto del dentista como de sus pacientes y de 35 personas no relacionadas con ellos y que también estaban infectadas por el mismo virus.

El juez encargado de resolver el caso no se encontraba capacitado para tomar una decisión sobre la validez de la evidencia presentada, un estudio filogenético que demostraba la vinculación de las muestras de cinco pacientes, incluida la primera denunciante, con la del dentista pero descartaba la de otros dos, cuyo origen se encontraría en una fuente no determinada. Por ello adoptó la siguiente resolución: aceptaría la validez de la prueba



Miguel Lorenzo

si la comunidad científica así lo ratificaba, para lo cual debía comunicarse en la forma habitual, como artículo científico a una revista con revisión por pares, que lo someterían a las oportunas pruebas antes de admitirlo a publicación. El artículo se publicó en la revista *Science* el 22 de mayo de 1992 (Ou *et al.*, 1992) y el dentista fue condenado a compensar a las cinco víctimas por los daños causados.

A diferencia de otras pruebas genéticas habituales en los tribunales, en este caso no se buscaba una identidad entre los datos genéticos de las presuntas víctimas y los



En febrero de 1998 se descubrió en Valencia un brote de infecciones por el virus de la hepatitis C que, al poco, se atribuyó a una actuación cuanto menos negligente de un anestesista, el doctor Juan Maeso. Se condenó al principal encausado a casi 2.000 años de prisión por mala práctica profesional resultante en la infección de al menos 275 pacientes, de los que cinco habían fallecido en el momento en que se celebró el juicio.

de la fuente de infección sino determinar su coancestralidad común frente a la posibilidad de que procediesen de otras fuentes no identificadas en la población general, todo ello a partir del análisis de las diferencias encontradas entre las secuencias genéticas correspondientes. Desde entonces, han sido numerosos los casos en que se ha utilizado la evolución rápida de virus como el del sida para dirimir demandas por infecciones tanto persona a persona como por actuaciones médicas. En alguna ocasión la demanda se ha visto en un tribunal penal y no civil, como en el caso de Richard Schmidt, un médico del estado de Luisiana (EEUU) acusado de intento de homicidio por emplear sangre infectada con los virus de la inmunodeficiencia humana y de la hepatitis C de uno de sus pacientes para transmitirlos a su antigua amante, que había decidido romper la relación que mantenían (Metzker *et al.*, 2002). Aunque ambos virus fueron transmitidos a la receptora, la acusación se basó en el estudio del VIH. Los diez años transcurridos entre este caso y el del dentista de Florida fueron testigos de nume-

«SE ESTIMA QUE ALREDEDOR DEL 2,5% DE LA POBLACIÓN DE NUESTRO PAÍS ESTÁ INFECTADA POR EL VHC, AUNQUE MUCHOS DE LOS INFECTADOS DESCONOCEN SU SITUACIÓN, PUES EL VIRUS PUEDE ESTAR EN MODO LATENTE»

rosos avances tanto en la metodología de estudio como en la aceptación por los tribunales de estas pruebas. Sin embargo, en ambos casos se plantearon dudas sobre la validación estadística de los resultados, especialmente dada la trascendencia de las conclusiones reportadas.

Una solución para este problema es el empleo de métodos estadísticos más avanzados que el remuestreo pseudoaleatorio (*bootstrapping*) empleado hasta ese momento. Concretamente, la introducción de estimas de árboles mediante máxima verosimilitud, lo que permite el contraste de hipótesis alternativas con una base estadística sólida. De hecho, dos de los autores de referencia en las aplicaciones forenses de la genética proponen la aplicación de la inferencia bayesiana, basada en parte en el cálculo de la verosimilitud de una hipótesis a partir de los datos empíricos disponibles, para informar sobre la probabilidad de que determinado resto biológico provenga o no del acusado (Evetts y Weir, 1998). Para ello, el investigador debe calcular la probabilidad de observar los datos que tiene a su disposición bajo distintos supuestos relativos a cómo se podrían haber generado.

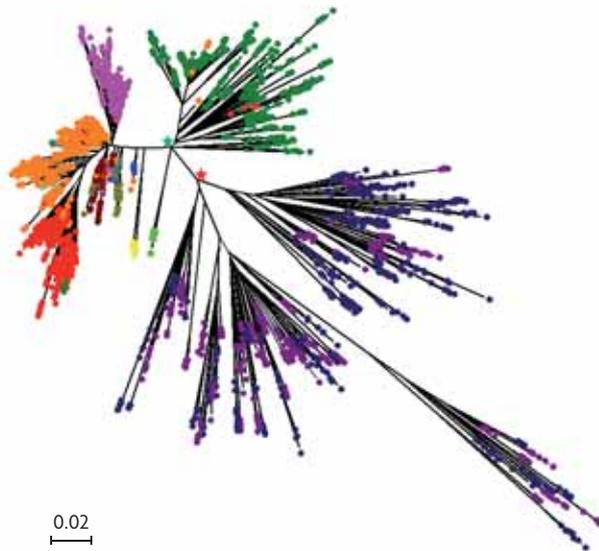


Figura 1. Árbol filogenético obtenido por máxima verosimilitud a partir de 4.184 secuencias parciales (406 nucleótidos) del virus de la hepatitis C empleado en el brote de este virus detectado en la ciudad de Valencia en 1998. Las estrellas verde y roja indican los nodos donde se sitúa el ancestro común más próximo de los virus obtenidos de pacientes del brote (verde) y de la población general (roja). Las secuencias de color lila y azul oscuro corresponden a muestras control y a pacientes excluidos del brote, mientras que las restantes secuencias corresponden a pacientes del brote, coloreadas según fechas aproximadas de infección.

■ EL «CASO MAESO»: APLICACIÓN DE LA FILOGENÉTICA MOLECULAR A UN BROTE DE HEPATITIS C

En nuestro grupo de investigación tuvimos ocasión de aplicar estos desarrollos en el que probablemente es uno de los casos más complejos de aplicación de la teoría evolutiva en una pericia forense (González-Candelas *et al.*, 2013). En febrero de 1998 se descubrió en Valencia un brote de infecciones por el virus de la hepatitis C que, al poco, se atribuyó a una actuación cuanto menos negligente de un anestesista, el doctor Juan Maeso. El denominado «caso Maeso» se prolongó durante casi diez años en los que a la extensa instrucción judicial siguieron un juicio en la Audiencia Provincial, que duró algo más de un año, y el consiguiente recurso al Tribunal Supremo. Como resultado se condenó al principal encausado a casi 2.000 años de prisión por mala práctica profesional resultante en la infección de al menos 275 pacientes, de los que cinco habían fallecido en el momento en que se celebró el juicio. En este caso el problema se agravaba por la dimensión, hasta ahora no superada, del brote, producido por una misma fuente a

«ACTUALMENTE SE PUEDE DETERMINAR EL ORIGEN Y LA CRONOLOGÍA DE LAS TRANSMISIONES DE ORGANISMOS INFECCIOSOS»

lo largo de un periodo de tiempo que había que determinar (resultaron ser prácticamente diez años) y durante el cual el virus había seguido evolucionando en la propia fuente, de manera que la población que infectó a los primeros afectados era bastante diferente de los últimos.

El punto de partida de nuestro informe fue el mismo que en casos anteriores: si la transmisión se produce desde una fuente común, los virus aislados de esos pacientes compartirán entre sí y con los virus aislados de la misma un ancestro común más próximo que con cualquier otra población viral no vinculada a la fuente. Pero en este caso no podíamos simplemente comprobar esta hipótesis: era necesario establecer quiénes de los casi 400 pacientes de este anestesista a los que se les había diagnosticado una infección por el VHC del mismo tipo lo habían recibido de él y quiénes lo habían recibido de otras fuentes. Se estima que alrededor del 2,5% de la población de nuestro país está infectada por el VHC, aunque muchos de los infectados desconocen su situación, pues el virus puede estar en modo latente sin producir enfermedad aparente durante años, aunque sí puede transmitirse.

Como en trabajos previos, procedimos a secuenciar virus obtenidos de pacientes vinculados epidemiológicamente al brote, por haber sido tratados por el doctor Maeso en alguno de los hospitales donde actuaba habitualmente, así como cuantas muestras del mismo tipo viral que pudimos obtener de personas infectadas pero no relacionadas con el brote. En total, obtuvimos 4.184 secuencias de poco más de 400 nucleótidos procedentes de 366 pacientes, incluidos 44 controles. El árbol filogenético derivado (figura 1) nos permitió establecer la ancestralidad común y en consecuencia la inclusión en el brote, de las secuencias de 274 pacientes, lo que implicaba, asimismo, la exclusión de otros 47. Además, calculando las estimas de verosimilitud para cada caso bajo las dos hipótesis posibles (que el paciente en cuestión perteneciera o no al brote), fue posible asignar una estima de la probabilidad de infección común o no al brote de forma individualizada.

El análisis se completó con otra aplicación de la teoría de la evolución a nivel molecular, basada en la cuantificación del número de cambios producidos por unidad de tiempo desde la divergencia de un ancestro común. Este proceso se produce a un ritmo aproximadamente constante, lo que llevó a postular la existencia de un «reloj molecular» (Zuckerkandl y Pauling, 1962) de la evolución. Desde su formulación, el reloj molecular se ha utilizado para datar todo tipo de acontecimientos evolutivos (<www.timetree.org> o

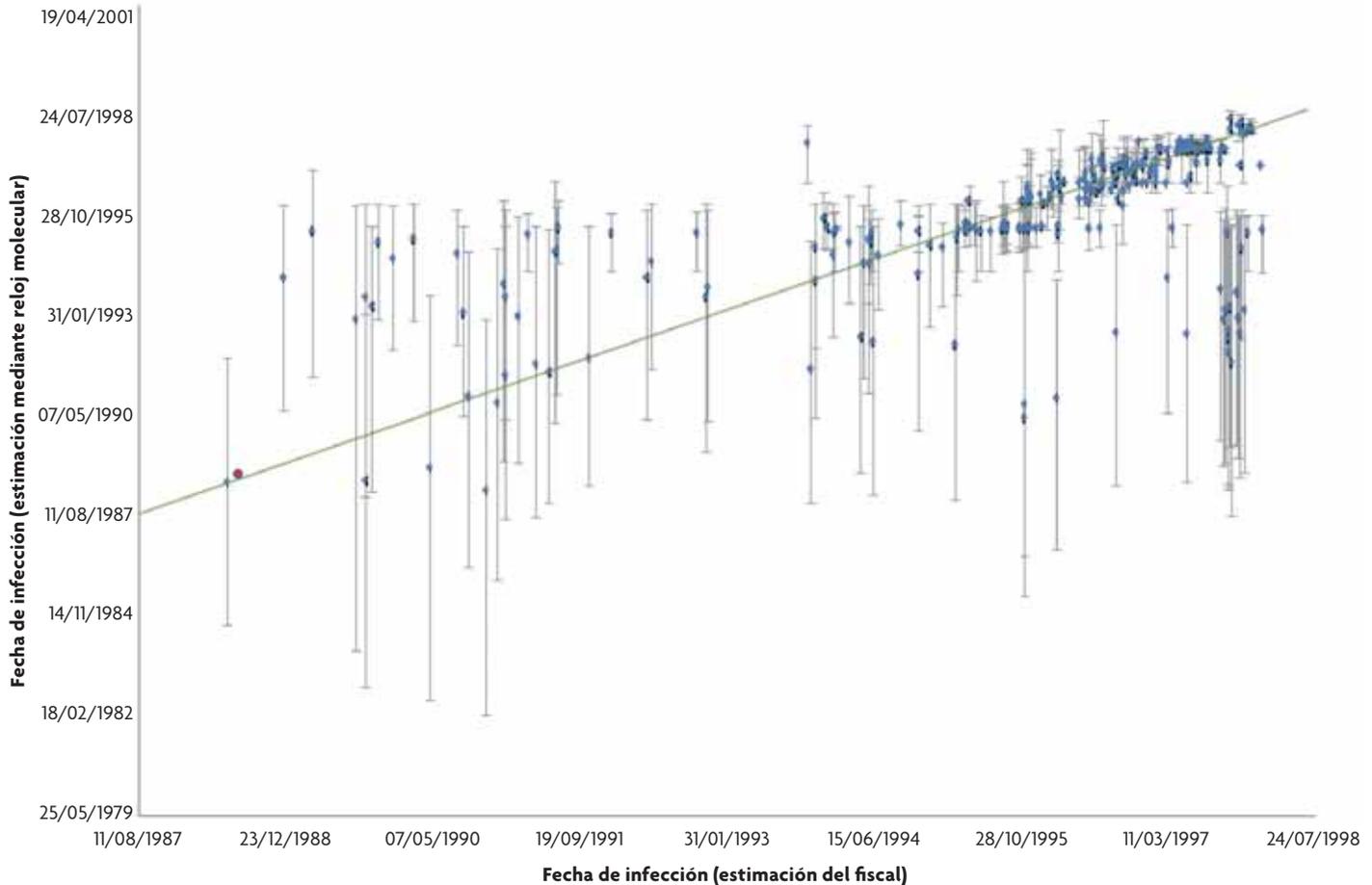


Figura 2. Relación entre las estimas de fechas de infección obtenidas a partir del análisis de secuencias del virus de la hepatitis C en pacientes del brote de Valencia y las aportadas por el fiscal del caso en base a la documentación analizada. Las barras marcan los intervalos de máxima densidad de probabilidad al 95% para cada fecha estimada que se corresponde con la mediana obtenida en un análisis bayesiano independiente para cada paciente. (Fuente: GONZÁLEZ CANDELAS *et al.*, 2013).

<www.datelife.org>) y trabajos recientes permiten utilizarlo incluso sin una referencia externa de calibrado (Drummond *et al.*, 2006). Su utilización con las muestras derivadas del brote (figura 2) permitió comparar las fechas estimadas de infección a partir de las secuencias virales con las propuestas por la acusación, con un elevado grado de coincidencia. En el juicio, esta evaluación sirvió para determinar qué compañías aseguradoras debían abonar las indemnizaciones asignadas a cada paciente, pues el doctor Maeso había suscrito diversos seguros a lo largo de su vida profesional. También nos permitió establecer que las infecciones habían comenzado ya en 1988, diez años antes de que se detectara el brote.

Avances como los descritos en los métodos de secuenciación del material hereditario así como en biología computacional para explotar la información generada y en la teoría evolutiva para interpretar los datos obtenidos permiten determinar el origen y la cronología de las transmisiones de organismos infecciosos. Dadas las responsabilidades que en el ámbito civil, e incluso

en el penal, pueden derivarse de estas infecciones, cabe esperar que la evolución gane un protagonismo creciente en las sedes judiciales. 

BIBLIOGRAFÍA

- DRUMMOND, A. J.; HO, S. Y. W.; PHILLIPS, M. J. y A. RAMBAUT, 2006. «Relaxed Phylogenetics and Dating with Confidence». *PLoS Biology*, 4: e88. DOI: <10.1371/journal.pbio.0040088>.
- EVETT, I. W. y B. S. WEIR, 1998. *Interpreting DNA Evidence*. Sinauer, Sunderland, EE UU.
- GONZÁLEZ-CANDELAS, F.; BRACHO, M. A.; WRÓBEL, B. y A. MOYA, 2013. «Molecular Evolution in Court: Analysis of a Large Hepatitis C Virus Outbreak from an Evolving Source». *BMC Biology*, 11: 76. DOI: <10.1186/1741-7007-11-76>.
- METZKER, M. L. *et al.*, 2002. «Molecular Evidence of HIV-1 Transmission in a Criminal Case». *PNAS*, 99: 14.292-14.297. DOI: <10.1073/pnas.222522599>.
- OU, C. Y. *et al.*, 1992. «Molecular Epidemiology of HIV Transmission in a Dental Practice». *Science*, 256: 1.165-1.171. DOI: <10.1126/science.256.5060.1165>.
- ZUCKERKANDL, E. y L. B. PAULING, 1962. «Molecular Disease, Evolution, and Genetic Heterogeneity». In KASHA, M. y B. PULLMAN (eds.). *Horizons in Biochemistry*. Academic Press. Nueva York.

Fernando González Candelas. Catedrático de Genética de la Universitat de València.