



L'EVOLUCIÓ EN ELS TRIBUNALS

APLICACIONS FORENSES DE LES FILOGÈNIES MOLECULARS

FERNANDO GONZÁLEZ CANDELAS

En les dues últimes dècades s'ha generalitzat l'ús de proves genètiques en els tribunals, la qual cosa ha permès identificar criminals a partir de restes biològiques, determinar paternitats o identificar cadàvers. Menys conegudes són les proves pericials basades en l'ús de filogènies moleculars en què s'estudia l'ancestralitat comuna d'organismes, normalment virus o bacteris, per establir com s'associen a una font d'infecció. Des del cas del dentista de Florida, que va infectar amb el VIH alguns dels seus pacients, fins al més pròxim de l'anestesiista Juan Maeso, que va transmetre el VHC a vora 300 pacients, la teoria evolutiva té un paper essencial en aquestes proves. En aquest article s'expliquen les bases d'aquesta aplicació de la teoria evolutiva.

Paraules clau: avantpassat comú, virus, rellotge molecular, raó de versemblances, hipòtesis evolutives.

Les teories científiques no es discuteixen en els tribunals o, almenys, no des de fa uns quants segles. Els processos contra Galileu Galilei, Giordano Bruno o Miguel Servet, entre altres, es desenvolupen en tribunals eclesiàstics, no civils, i, moltes vegades, les condemnes es basaven en disputes religioses no lligades necessàriament a les heretgies derivades de noves teories científiques. Hi ha una notable excepció: la teoria de l'evolució biològica, formulada per Charles Darwin i Alfred R. Wallace a mitjan segle XIX, és qüestionada periòdicament en tribunals nord-americans de tots els nivells, on es posa en dubte la seua validesa com a teoria científica per a ser inclosa en els temaris d'ensenyament secundari. Però és d'un altre tipus de presència en tribunals de la que ens ocuparem ací. L'evolució fa la seua aparició en tribunals de justícia des de l'última dècada del segle passat. En un nombre creixent d'ocasions, especialistes en biologia evolutiva són cridats a declarar com a experts en demandes civils i, ocasionalment, penals. En totes hi ha un nexa comú: la transmissió d'un agent infeccios, normalment un virus com el de la immunodeficiència humana (VIH) o el de l'hepatitis C (VHC), des d'una

font comuna a un o més receptors que s'hi infecten. Atesa la gravetat d'aquestes infeccions, que poden acabar en la mort del pacient, els afectats solen buscar en els tribunals compensació pels danys físics, psicològics i econòmics causats. Sovint, la font està vinculada a un acte mèdic, una transfusió amb material contaminat o l'ús d'un producte o aparell no esterilitzat, però també trobem casos de males pràctiques, fins i tot d'actes criminals.

«EN UN NOMBRE CREIXENT D'OCASIONS, ESPECIALISTES EN BIOLOGIA EVOLUTIVA SÓN CRIDATS A DECLARAR COM A EXPERTS EN DEMANDES CIVILS I, OCASIONALMENT, PENALS. EN TOTES HI HA UN NEXE COMÚ: LA TRANSMISSIÓ D'UN AGENT INFECCIÓS»

■ EVOLUCIÓ A RITME ACCELERAT

Un dels postulats principals de la teoria de l'evolució és l'ancestralitat comuna de tots els éssers vius. Per bé que alguns detalls de les primeres etapes de la vida organitzada ja en forma de cèl·lules són encara controvertits, les proves a favor d'aquest origen comú de tots els organismes són

prou fermes perquè aquesta idea siga acceptada per la biologia actual com un dels seus pilars bàsics. A partir d'aquesta, i atès que un altre dels postulats bàsics estableix la continuïtat física entre el material hereditari d'avantpassats i descendents, entre pares (principalment les mares, quan hi ha diferenciació sexual)

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



i fills, seria en teoria possible traçar un gegantí arbre genealògic que vinculara tots els éssers vius que existeixen o han existit i han deixat descendència fins als nostres dies a partir de l'estudi del seu material hereditari. Amb objectius semblants, encara que un poc més modestos, hi ha establerts diversos projectes adreçats a desentranyar el que hom coneix com «arbre de la vida» (<<http://www.tolweb.org/tree/>>).

Els mètodes que s'hi fan servir es basen, fonamentalment, en l'anàlisi de la variació i evolució del material hereditari, principalment l'ADN (àcid desoxiribonucleic), que és la molècula de l'herència comuna a tots els organismes cel·lulars, si bé alguns virus, entre els quals patògens importants com el VIH o el de la grip, tenen una altra molècula per a transmetre el missatge genètic, l'ARN (àcid ribonucleic). Mitjançant l'ús de models cada vegada més complexos per a representar els processos de canvi evolutiu a nivell molecular i la

Un dels postulats principals de la teoria de l'evolució és l'ancestralitat comuna de tots els éssers vius. A partir d'aquest principi, i atès que un altre dels postulats bàsics estableix la continuïtat física entre el material hereditari d'avantpassats i descendents, seria en teoria possible traçar un gegantí arbre genealògic que vinculara tots els éssers vius que existeixen o han existit i han deixat descendència fins als nostres dies a partir de l'estudi del seu material hereditari. Amb objectius semblants s'han establert diversos projectes per desentranyar el que hom coneix com «arbre de la vida».

«LA FILOGENÈTICA MOLECULAR TRACTA DE RECONSTRUIR LES RELACIONS EVOLUTIVES I GENEALÒGIQUES ENTRE ORGANISMES A PARTIR DE LES SEQÜÈNCIES DE GENS O PROTEÏNES HOMÒLOGUES»

utilització de mètodes de computació més sofisticats, la filogenètica molecular aconsegueix establir amb creixent precisió i fiabilitat les relacions de parentiu entre tota mena d'organismes a partir de la comparació de les seqüències de nucleòtids que conformen el missatge hereditari.

A diferència d'altres aplicacions de la biologia en l'anàlisi forense, en les quals es busca establir la identitat entre les restes biològiques trobades en l'escena d'un crim i les dels possibles sospitosos o determinar el parentiu entre individus, la base de l'aplicació forense de l'anàlisi filogenètica de seqüències es basa en l'estudi de les diferències acumulades entre aquestes des que van divergir de l'avantpassat comú. Al llarg de l'evolució considerem que els distints llinatges que sorgeixen de la diferenciació a partir d'un avantpassat comú acumularan diferències a tots els nivells, des del molecular fins als conductuals, de forma independent, de manera que el que inicialment era una identitat quasi perfecta, amb el pas de les generacions dona lloc a un nombre creixent de diferències. En poques paraules, com major és el nombre de diferències acumulades més temps ha transcorregut des que els organismes comparats van divergir des del seu avantpassat comú. El nombre de diferències que hi podem observar depèn de dos factors bàsics, el temps transcorregut i la taxa de canvi evolutiu, que només poden separar-se en principi a partir d'estimacions independents de l'un o de l'altre. En funció del tipus d'organisme, de la naturalesa dels caràcters comparats i de la taxa d'evolució que s'hi associa podem trobar casos en què a penes hi ha diferències al cap de milions d'anys d'evolució independent i d'altres en què a penes uns dies o setmanes basten per a apreciar aquestes diferències.

Els organismes que presenten aquestes taxes tan ràpides de canvi evolutiu solen tenir el genoma basat en l'ARN i, com ja hem indicat, són patògens com el VIH, el VHC o el virus de la grip A. Les seues taxes d'evolució són fins a un milió de vegades més ràpides que les dels organismes que infecten, i el resultat de les seues peculiars maquinàries de còpia del material hereditari, que no posseeixen capacitat de correcció d'error, assoleix unes grandàries poblacionals molt elevades (en un pacient infectat es produeixen milers de milions de noves partícules virals cada dia) i d'uns temps de generació molt breus, de tot just uns minuts. Aquesta elevada taxa evolutiva té importants conseqüències clíniques,

com ara la dificultat per a trobar vacunes eficaces per al VIH o el VHC, el ràpid desenvolupament de mutacions de resistència als antivirals o la facilitat amb què s'adapten a nous hostes. L'altra cara de la moneda és que podem observar en temps real com evolucionen les seues poblacions, ja que acumulen suficients canvis en qüestió de setmanes o mesos per possibilitar l'aplicació dels mètodes de filogenètica molecular per a la reconstrucció de la seua història a curt termini.

■ FILOGÈNIES MOLECULARS

La filogenètica molecular tracta de reconstruir les relacions evolutives i genealògiques entre organismes a partir de les seqüències de gens o proteïnes homòlogues. Naix com a disciplina científica a mitjan anys seixanta, però pren major embranzida a començament d'aquest segle, amb l'acumulació de seqüències de gens i genomes dels més diversos organismes. El desenvolupament de nous algorismes i l'augment de la potència de càlcul dels ordinadors han permès aplicar mètodes cada vegada més sofisticats, com la màxima versemblança o la inferència bayesiana, a conjunts de dades cada vegada majors. El resultat és que disposem en l'actualitat de procediments per a construir i contrastar hipòtesis evolutives cada vegada més complexes.

Quan s'apliquen a casos d'infeccions de patògens amb evolució ràpida, les filogenies moleculars són una eina essencial per a desentranyar les possibles transferències i la seua direcció (qui infecta i qui és infectat), les fonts de brots, estimar els temps en què s'ha produït la infecció, etc., tot això aplicat a esdeveniments separats per unes poques setmanes o mesos. En la seua aplicació a casos judicials, una qüestió bàsica que cal resoldre és determinar si les mostres obtingudes a partir de diferents pacients comparteixen un avantpassat comú més pròxim a la possible font d'infecció que a altres individus infectats de la població general i que es prenen com a controls externs. El primer cas en què es va aplicar aquesta metodologia és una excel·lent il·lustració del problema i com es pot resoldre.

■ INFECCIONS I TRIBUNALS

A finals de la dècada dels vuitanta del passat segle, l'epidèmia de sida avançava sense control per molt di-

**«EL DIAGNÒSTIC D'INFECCIÓ
PER VIH A UNA DONA
QUE NO REALITZAVA
CAP PRÀCTICA DE RISC
CONEGUDA VA DONAR LLOC
A UNA INVESTIGACIÓ QUE
VA ASSENYALAR EL SEU
DENTISTA, PORTADOR DEL
VIH, COM A POSSIBLE FONT
DE LA INFECCIÓ»**

versos països i comunitats. No es disposava llavors de medicaments que pogueren aturar l'avanç de la malaltia i aquest diagnòstic representava quasi l'anunci d'una mort pròxima. Se sabia que la malaltia era ocasionada per un retrovirus i que aquest es transmetia de persona a persona mitjançant fluids corporals, especialment la sang, encara que podia haver-hi vectors intermedis, com ara agulles hipodèrmiques. El diagnòstic d'infecció per VIH a una dona que no realitzava cap pràctica de risc coneguda va donar lloc a una investigació que va assenyalar el seu dentista, portador del VIH, com a possible font de la infecció. Fins aquell moment no s'havia considerat la possibilitat que el VIH es poguera transmetre a través de l'instrumental odontològic, per la qual cosa no hi havia una normativa de seguretat sobre això. La dona va decidir demandar el professional per la via civil buscant una compensació als danys que li havia produït. El cas es va complicar quan es va descobrir que sis pacients més del mateix dentista també

«EN ALGUNA OCASIÓ LA DEMANDA S'HA VIST EN UN TRIBUNAL PENAL I NO CIVIL, COM EN EL CAS DE RICHARD SCHMIDT, ACUSAT D'INTENT D'HOMICIDI PER EMPRAR SANG INFECTADA AMB ELS VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA I DE L'HEPATITIS C»

estaven infectats pel VIH. La pregunta ara ja no era si la primera pacient havia estat infectada o no pel dentista, sinó quants, i quins, dels seus pacients ho havien estat, perquè alguns d'ells sí que van manifestar haver realitzat pràctiques de risc. Per respondre-la, un equip d'experts va seqüenciar un fragment del genoma del virus a partir mostres obtingudes tant del dentista com dels seus pacients i de 35 persones no relacionades amb ells i que també estaven infectades pel mateix virus.

El jutge encarregat de resoldre el cas no es trobava capacitat per a prendre una decisió sobre la validesa de l'evidència presentada, un estudi filogenètic que demostrava la vinculació de les mostres de cinc pacients, inclosa la primera denunciant, amb la del dentista però descartava la de dos més, l'origen de la qual es trobaria en una font no determinada. Per això va adoptar la resolució següent: acceptaria la validesa de la prova si la comunitat científica així ho ratificava, per a la qual cosa havia de comunicar-se segons el procediment habitual, com a article científic en una revista amb revisió



Miguel Lorenzo

per experts, que el sotmetrien a les oportunes proves abans d'admetre'l a publicació. L'article es va publicar en la revista *Science* el 22 de maig de 1992 (Ou *et al.*, 1992) i el dentista va ser condemnat a compensar les cinc víctimes pels danys causats.

A diferència d'altres proves genètiques habituals en els tribunals, en aquest cas no es buscava una identitat entre les dades genètiques de les presumptes víctimes i les de la font d'infecció sinó determinar-ne la coances-tralitat comuna enfront de la possibilitat que procediren d'altres fonts no identificades en la població gene-



Al febrer de 1998 es va descobrir a València un brot d'infeccions pel virus de l'hepatitis C que, al poc, es va atribuir a una actuació si més no negligent d'un anestesista, el doctor Juan Maeso. Es va condemnar el principal encausat a quasi 2.000 anys de presó per mala pràctica professional resultant en la infecció almenys de 275 pacients, cinc dels quals havien mort en el moment en què es va celebrar el judici.

ral, tot això a partir de l'anàlisi de les diferències trobades entre les seqüències genètiques corresponents. Des de llavors, han estat nombrosos els casos en què s'ha utilitzat l'evolució ràpida de virus com el de la sida per dirimir demandes per infeccions tant persona a persona com per actuacions mèdiques. En alguna ocasió la demanda s'ha vist en un tribunal penal i no civil, com en el cas de Richard Schmidt, un metge de l'estat de Luisiana (EUA) acusat d'intent d'homicidi per emprar sang infectada amb els virus de la immunodeficiència humana i de l'hepatitis C d'un dels seus pacients per transmetre'ls a la seua antiga amant, que havia decidit trencar la relació que mantenien (Metzker *et al.*, 2002). Encara que ambdós virus van ser transmesos a la receptora, l'acusació es basà en l'estudi del VIH. Els deu anys transcorreguts entre aquest cas i el del dentista de Florida van ser testimonis de nombrosos avenços tant en la metodologia d'estudi com en l'acceptació pels tribunals d'aquestes proves. No obstant això, en ambdós

«S'ESTIMA QUE AL VOLTANT DEL 2,5 % DE LA POBLACIÓ DEL NOSTRE PAÍS ESTÀ INFECTADA PEL VHC, ENCARA QUE MOLTS DELS INFECTATS DESCONEIXEN LA SEUA SITUACIÓ, PERQUÈ EL VIRUS POT ESTAR LATENT»

casos es van plantejar dubtes sobre la validació estadística dels resultats, especialment donada la transcendència de les conclusions reportades.

Una solució per a aquest problema és l'aplicació de mètodes estadístics més avançats que el remostratge pseudoaleatori (*bootstrapping*) utilitzat fins aquell moment. Concretament, la introducció d'estimacions d'arbres mitjançant màxima versemblança, la qual cosa permet el contrast d'hipòtesis alternatives amb una base estadística sòlida. De fet, dos dels autors de referència en les aplicacions forenses de la genètica proposen l'aplicació de la inferència bayesiana, basada en part en el càlcul de la versemblança d'una hipòtesi a partir de les dades empíriques disponibles, per informar sobre la probabilitat que determinada resta biològica provinga o no de l'acusat (Eveti i Weir, 1998). Per a això, l'investigador ha de calcular la probabilitat d'observar les dades que té a la seua disposició sota distints supòsits relatius a la manera com es podrien haver generat.

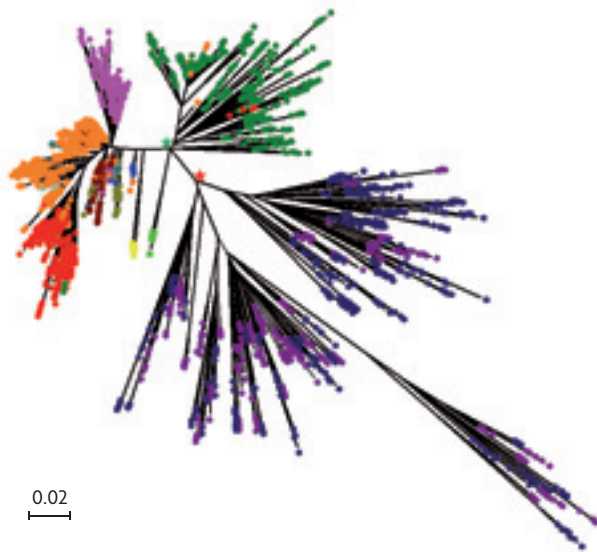


Figura 1. Arbre filogenètic obtingut per màxima versemblança a partir de 4.184 seqüències parcials (406 nucleòtids) del virus de l'hepatitis C aplicat en el brot d'aquest virus detectat en la ciutat de València el 1998. Les estrelles verda i roja indiquen els nodes on se situa l'avantpassat comú més pròxim dels virus obtinguts de pacients del brot (verda) i de la població general (roja). Les seqüències de color lila i blau fosc corresponen a mostres control i a pacients exclosos del brot, mentre que les seqüències restants corresponen a pacients del brot, pintades segons dates aproximades d'infecció.

■ EL «CAS MAESO»: APLICACIÓ DE LA FILOGENÈTICA MOLECULAR A UN BROT D'HEPATITIS C

En el nostre grup d'investigació vam tenir ocasió d'aplicar aquests desenvolupaments al que probablement és un dels casos més complexos d'aplicació de la teoria evolutiva en un informe pericial forense (González-Candelas *et al.*, 2013). Al febrer de 1998 es va descobrir a València un brot d'infeccions pel virus de l'hepatitis C que, al poc, es va atribuir a una actuació si més no negligent d'un anestesista, el doctor Juan Maeso. El denominat «cas Maeso» es va prolongar durant quasi deu anys en què a l'extensa instrucció judicial van seguir un juí en l'Audiència Provincial, que va durar un poc més d'un any, i el consegüent recurs al Tribunal Suprem. Com a resultat es va condemnar el principal encausat a quasi 2.000 anys de presó per mala pràctica professional resultant en la infecció almenys de 275 pacients, cinc dels quals havien mort en el moment en què es va celebrar el juí. En aquest cas el problema s'agreuja per la dimensió, fins ara no superada, del brot, produït per una mateixa font al llarg d'un període de temps que calia determi-

nar (van ser pràcticament deu anys) i durant el qual el virus havia continuat evolucionant en la pròpia font, de manera que la població que va infectar els primers afectats era prou diferent dels últims.

El punt de partida del nostre informe va ser el mateix que en casos anteriors: si la transmissió es produeix des d'una font comuna, els virus aïllats d'aquells pacients compartiran entre si i amb els virus aïllats de la font un avantpassat comú més pròxim que amb qualsevol altra població viral no vinculada a la font. Però en aquest cas no podíem simplement comprovar aquesta hipòtesi: era necessari establir qui dels quasi 400 pacients d'aquest anestesista a qui se'ls havia diagnosticat una infecció pel VHC del mateix tipus l'havien rebuda d'ell i quins l'havien rebuda d'altres fonts. S'estima que al voltant del 2,5% de la població del nostre país està infectada pel VHC, encara que molts dels infectats desconeixen la seua situació, perquè el virus pot estar latent sense produir malaltia aparent durant anys, encara que sí que es pot transmetre.

Com en treballs previs, vam procedir a seqüenciar virus obtinguts de pacients vinculats epidemiològicament al brot, per haver estat tractats pel doctor Maeso en algun dels hospitals on actuava habitualment, com també totes les mostres del mateix tipus viral que vam poder obtenir de persones infectades però no relacionades amb el brot. En total, vam obtenir 4.184 seqüències de poc més de 400 nucleòtids procedents de 366 pacients, inclosos 44 controls. L'arbre filogenètic derivat (figura 1) ens va permetre establir l'ancestralitat comuna, i en conseqüència la inclusió en el brot de les seqüències de 274 pacients, la qual cosa implicava, així mateix, l'exclusió

de 47 més. A més, calculant les estimacions de versemblança per a cada cas sota les dues hipòtesis possibles (que el pacient en qüestió pertanguera o no al brot), va ser possible assignar una estima de la probabilitat d'infecció comuna o no al brot de manera individualitzada. L'anàlisi es va completar amb una altra aplicació de la teoria de l'evolució a nivell molecular, basada en la quantificació del nombre de canvis produïts per unitat de temps des de la divergència d'un avantpassat comú. Aquest procés es produeix a un ritme aproximadament constant, la qual cosa va portar a postular l'existència d'un «rellotge molecular» (Zuckerkandl i Pauling, 1962) de l'evolució. Des de la seua formulació, el rellotge molecular s'ha utilitzat per datar tot tipus d'esdeveniments evolutius (<www.timetree.org> o <www.datelife.org>) i treballs recents permeten uti-

«ACTUALMENT ES POT DETERMINAR L'ORIGEN I LA CRONOLOGIA DE LES TRANSMISSIONS D'ORGANISMES INFECCIOSOS»

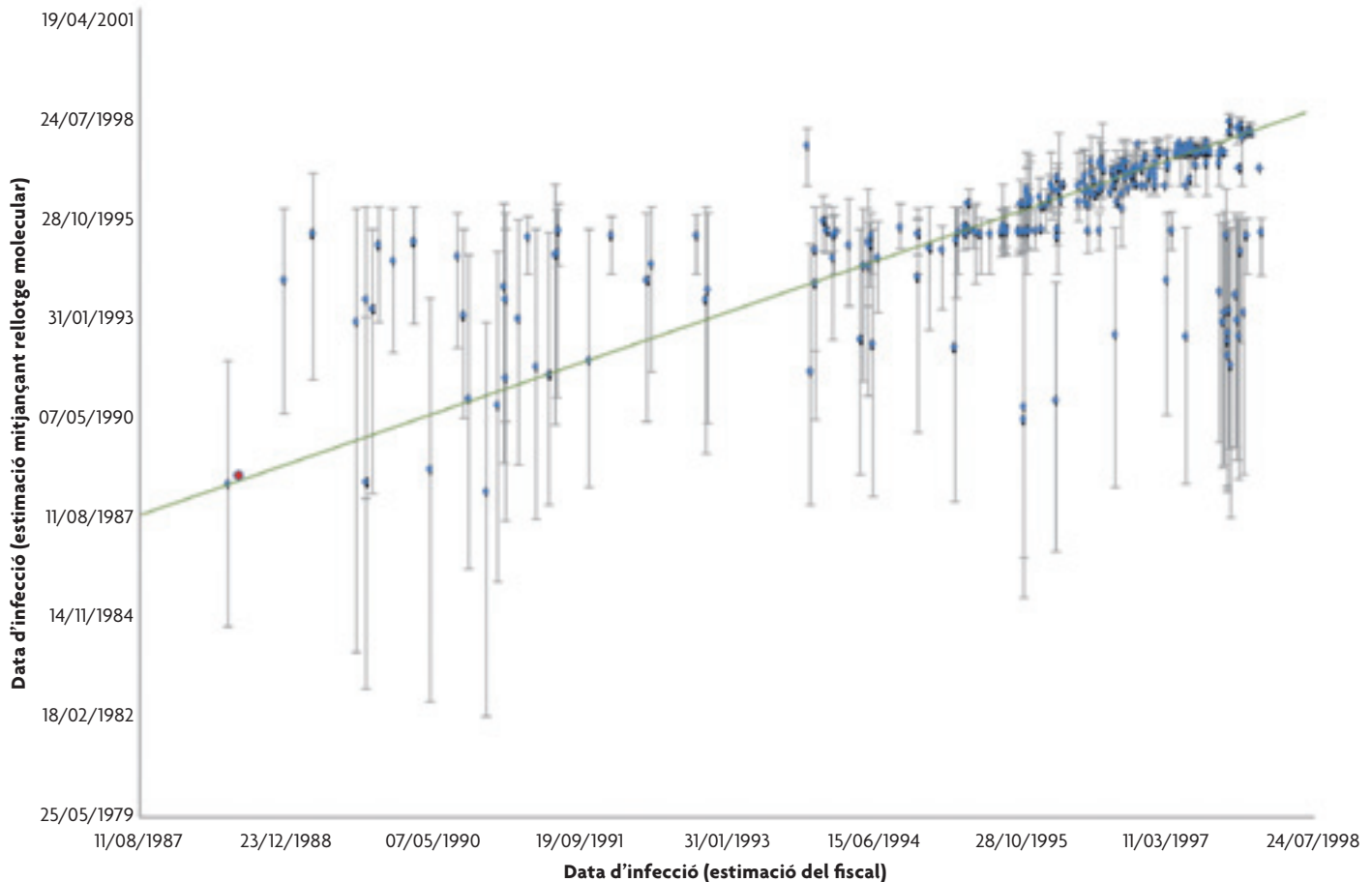


Figura 2. Relació entre les estimacions de dates d'infecció obtingudes a partir de l'anàlisi de seqüències del virus de l'hepatitis C en pacients del brot de València i les aportades pel fiscal del cas basant-se en la documentació analitzada. Les barres marquen els intervals de màxima densitat de probabilitat al 95% per a cada data estimada que es correspon amb la mitjana obtinguda en una anàlisi bayesiana independent per a cada pacient.

litzar-lo fins i tot sense una referència externa de calibrat (Drummond *et al.*, 2006). L'aplicació d'aquest procediment a les mostres derivades del brot (figura 2) va permetre comparar les dates estimades d'infecció a partir de les seqüències virals amb les proposades per l'acusació, amb un elevat grau de coincidència. En el juí, aquesta avaluació va servir per a determinar quines companyies asseguradores havien d'abonar les indemnitzacions assignades a cada pacient, perquè el doctor Maeso havia subscrit diverses assegurances al llarg de la seua vida professional. També ens va permetre establir que les infeccions havien començat ja el 1988, deu anys abans que es detectara el brot.

Avenços com els descrits en els mètodes de seqüenciació del material hereditari, així com en biologia computacional per a explotar la informació generada i en la teoria evolutiva per a interpretar les dades obtingudes, permeten determinar l'origen i la cronologia de les transmissions d'organismes infecciosos. Donades les responsabilitats que en l'àmbit civil, i fins i tot en el

penal, poden derivar-se d'aquestes infeccions, cal esperar que l'evolució guanye un protagonisme creixent en les seues judicials. ☺

BIBLIOGRAFIA

- DRUMMOND, A. J.; HO, S. Y. W.; PHILLIPS, M. J. i A. RAMBAUT, 2006. «Relaxed Phylogenetics and Dating with Confidence». *PLoS Biology*, 4: e88. DOI: <10.1371/journal.pbio.0040088>.
- EVETT, I. W. i B. S. WEIR, 1998. *Interpreting DNA Evidence*. Sinauer. Sunderland, EUA.
- GONZÁLEZ-CANDELAS, F.; BRACHO, M. A.; WRÓBEL, B. i 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. i L. B. PAULING, 1962. «Molecular Disease, Evolution, and Genetic Heterogeneity». In KASHA, M. i B. PULLMAN (eds.). *Horizons in Biochemistry*. Academic Press. Nova York.

Fernando González Candelas. Catedràtic de Genètica de la Universitat de València.