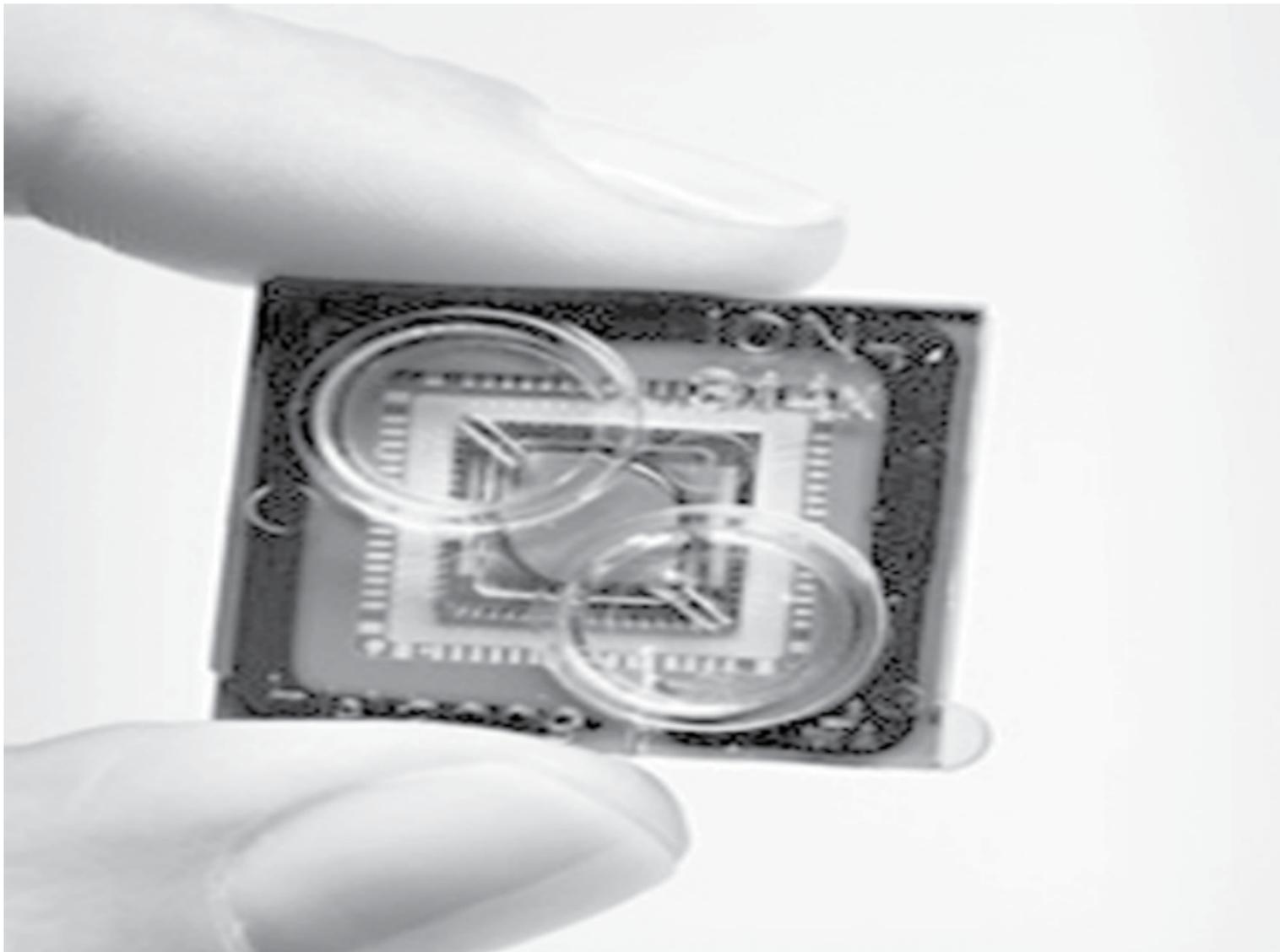


# Identificación de restos humanos mediante técnicas de secuenciación



1. Chip con millones de "nanopozos", perteneciente a la tecnología "Ion Torrent" (MR)

**Alejandro Sánchez Flores**  
Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática  
Instituto de Biotecnología, UNAM

**Presentación por Enrique Galindo,**  
Instituto de Biotecnología, UNAM  
Academia de Ciencias de Morelos

## Presentación

El Doctor Alejandro Sánchez Flores estudió la carrera de Investigación Biomédica Básica y el doctorado en Ciencias Bioquímicas en la UNAM. Realizó una estancia postdoctoral en el Wellcome Trust Sanger Institute en Hinxton, Cambridge, UK. Actualmente labora como Investigador Asociado de Tiempo Completo en el Instituto de Biotecnología de la UNAM y es el jefe de la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática. Perteneció al Sistema Nacional de Investigadores. Su interés de investigación se centra en la Genómica y la Bioinformática.

## Identificación de restos humanos mediante técnicas de secuenciación masiva de ADN, ¿qué son y qué pueden aportar?

Recientemente, se han publicado notas periodísticas referentes a la identificación de los restos de hueso hallados en Co-

cula, Guerrero para determinar si pertenecen a los normalistas desaparecidos originarios de Ayotzinapa. Para lograr este objetivo, expertos en Medicina Forense tanto de Argentina como de Austria han participado en el proceso de identificación. Tanto en declaraciones recientes, como en los informes entregados a la Procuraduría General de la República (PGR), se ha anunciado que sólo una de las 17 muestras pudo ser identificada y que pertenecía a Alexander Mora Venancio. Sin embargo, no se ha podido obtener información alguna de las 16 muestras restantes, dado que al parecer, los métodos rutinarios no se han podido emplear para realizar un análisis que arroje resultados contundentes.

Dados los problemas presentados por las 16 muestras restantes y sobre todo por la importancia que implica realizar la identificación de dichas muestras lo antes posible, los expertos austriacos han sugerido la utilización de tecnologías de "Secuenciación Masivamente Paralela". Si bien este término se utiliza para referirse a un grupo de tecnologías en particular para caracterizar ADN de cualquier tipo, el funcionamiento y potencial de estas tecnologías no es del conocimiento público e

inclusive sólo una pequeña parte de la comunidad científica conoce y aprovecha estas tecnologías. Por lo tanto, es importante explicar en qué consisten las mencionadas tecnologías de "Secuenciación Masivamente Paralelas" y si realmente son una solución para poder identificar el resto de las muestras óseas.

## Muestras y técnicas de identificación convencionales

Según los reportes entregados a la PGR por los expertos de la Universidad de Innsbruck, Austria, se enviaron 17 muestras que consistían en una colección de huesos que fueron encontrados en Cocula, Guerrero con la sospecha de que pertenecieran a varios de los normalistas desaparecidos. La técnica que se utilizaría para la identificación de los restos se basa en la caracterización del ADN recuperado de los restos óseos. El 22 de Diciembre del año pasado se publicó en este espacio la nota "El ADN, los forenses y Ayotzinapa" elaborada por el Dr. Miguel Ángel Cevallos (ver: <http://bit.ly/1BS4Kwx>), en la que se describen ampliamente las características del ADN, las técnicas forenses de identificación de individuos y el trabajo que respalda tanto al Equipo Argentino

de Antropología Forense (EAAF), como el grupo de la Universidad Médica de Innsbruck. En resumen, las pruebas forenses de identificación convencionales, se enfocan a buscar solo ciertos elementos llamados STR por sus siglas en inglés "Short Tandem Repeats" que se puede traducir de manera simplista como "secuencias cortas repetidas".

Estas secuencias se utilizan como marcadores moleculares para identificación de individuos debido a que el número de repeticiones que se presenta en cada marcador es único para los individuos de una familia. Estos marcadores genéticos son heredados de los padres y se pueden compartir entre hermanos. Por lo tanto, sólo tienen sentido cuando se comparan contra los marcadores obtenidos de los familiares que son utilizados como referencia. Adicionalmente a las 17 muestras de hueso, la PGR envió los perfiles genéticos correspondientes a 43 familias de los normalistas desaparecidos, los cuales fueron obtenidos de manera independiente tanto por el personal de la PGR como por los miembros del EAAF. Estos perfiles genéticos tienen la finalidad de ser usados como referencia para poder interpretar los resultados de la prueba con los

marcadores STR, buscados en las muestras de los restos también enviados. Tanto la decisión sobre las técnicas, como los antecedentes de éxito en identificación de muestras de este tipo (huesos calcinados) por parte del grupo de la Universidad de Innsbruck, generaron altas expectativas para la resolución del caso de los normalistas desaparecidos de Ayotzinapa. Sin embargo, sólo una de las 17 muestras arrojó resultados convincentes utilizando los métodos convencionales de STR y resultó ser de uno de los 43 normalistas, Alexander Mora Venancio.



2. Imagen de una laminilla o "flow cell" para Secuenciación Masiva de la tecnología "Illumina" (MR)

## Esperanza en las nuevas tecnologías

Según la conclusión de los especialistas de la Universidad Médica de Innsbruck, el ADN extraído de las 16 muestras restantes no era adecuado para las pruebas de marcadores STR que se pretendían realizar tanto de ADN proveniente del núcleo celular como del ADN mitocondrial. En casos de identificación de restos como los encontrados en Cocula, el uso de marcadores STR de ADN mitocondrial es conveniente debido a que hay mayor probabilidad de obtener mejores resultados en restos como huesos calcinados.



# Secuenciación masiva de ADN, ¿qué son y qué pueden aportar?

Sin embargo, algo que no se reporta y que es de suma importancia es la cantidad y la calidad del ADN extraída de las muestras óseas enviadas. Para el caso de la muestra identificada como de Alexander Mora Venancio ni siquiera hubo necesidad de realizar la prueba de SRT de ADN mitocondrial. Al parecer, el ADN extraído de dicha muestra, cumplió las características necesarias para realizar la identificación con los marcadores STR provenientes de ADN del núcleo celular, siendo el resultado validado tanto usando los perfiles genéticos provenientes del padre como de dos

En una declaración reportada en varias notas periodísticas, los especialistas de Innsbruck mencionaron el uso de tecnología de "Secuenciación Masivamente Paralela" para obtener algún resultado a partir de las 16 muestras restantes. Sin embargo, ellos mismos mencionan que son experimentales y que no pueden estimar un porcentaje de éxito en caso de utilizarlas.

Pero, ¿qué son y cómo funcionan estas tecnologías? El término "Secuenciación Masivamente Paralela" fue mencionado en las declaraciones y propagado

## La Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática de la UNAM (USMB-UNAM)

En la USMB-UNAM, se cuentan con tecnologías de Secuenciación Masiva de ADN desde el año 2009 y aunque se han utilizado en un gran número de proyectos científicos e industriales, no se ha incursionado en el área forense. Sin embargo, las técnicas y conceptos de esta área no son desconocidos para nosotros. Estas tecnologías y nuestra experiencia de casi 6 años nos han permitido brindar un servicio de calidad mundial y contribuir al desarrollo científico y tecnológi-

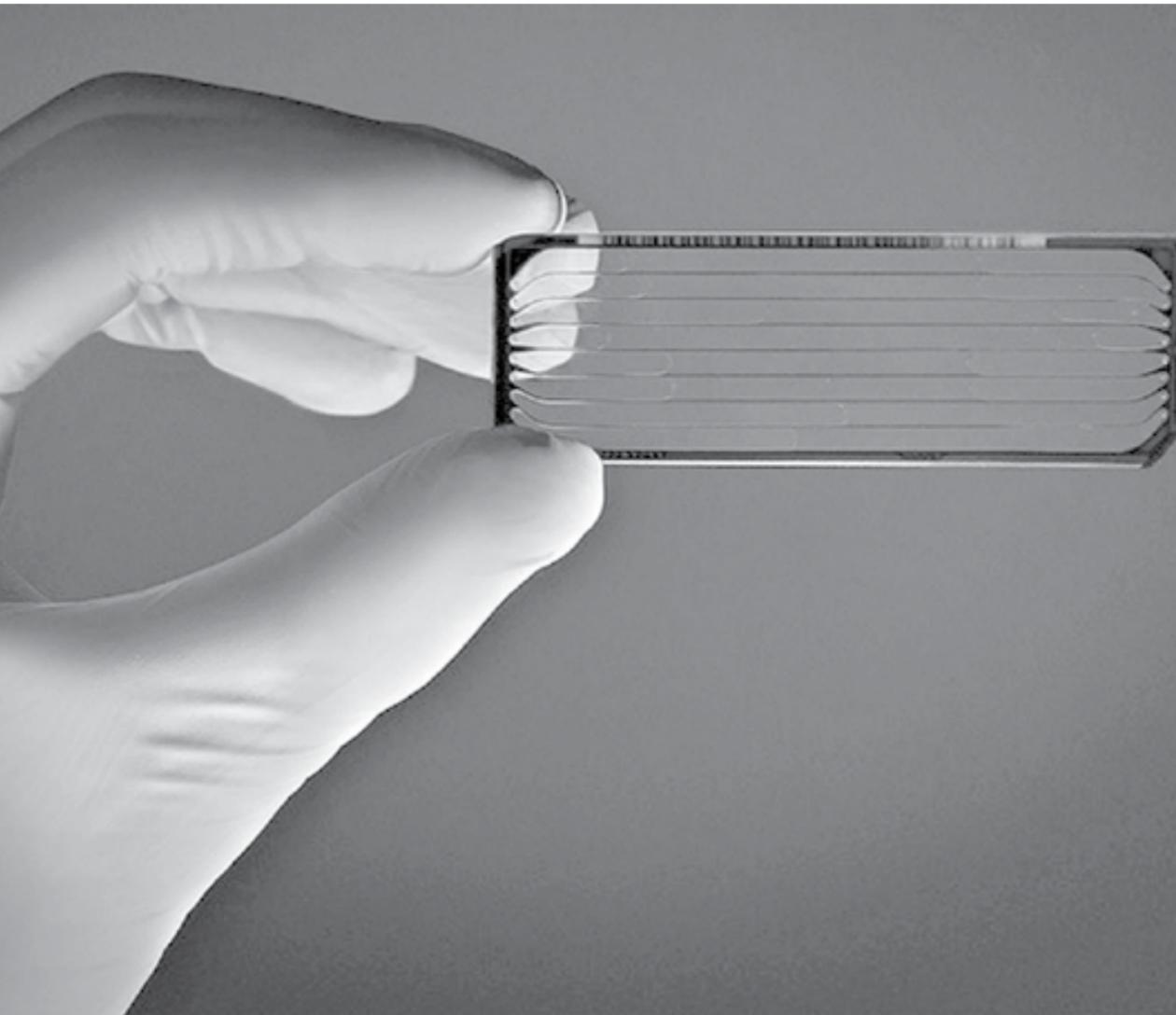
tamaño (figura 2). Incluso, las más modernas tecnologías utilizan una sola molécula de ADN (figura 3) y determinar así su secuencia. Las razones probables por las cuales los expertos forenses han sugerido el uso de estas tecnologías pueden ser las siguientes:

Es muy probable que los expertos austriacos hayan obtenido una cantidad muy pequeña de ADN. Sin embargo, las tecnologías de Secuenciación Masiva requieren sólo 1 nanogramo de ADN para funcionar, mientras que las técnicas convencionales en el área forense, requieren al menos 20 veces más.

Es muy probable que el ADN obtenido esté muy fragmentado. Esto sería un problema para los métodos convencionales dado que si el ADN se encuentra fragmentos más pequeños que el tamaño de los marcadores STR, no es posible utilizar dicha técnica forense. Sin embargo, para algunas tecnologías de Secuenciación Masiva, es un requisito fragmentar las moléculas de ADN en tamaños muy pequeños, por lo que sería una buena alternativa para el ADN

obtenido de los restos óseos calcinados.

Los expertos austriacos no mencionan cuál de las varias tecnologías disponibles de Secuenciación Masiva son las que ellos utilizarían. Sin embargo, es posible que la tecnología que tienen en mente estos especialistas sea la tecnología de la compañía "Illumina" (figura 2), la cual cumple con los supuestos mencionados anteriormente. No obstante, la información referente a la cantidad y calidad del ADN extraído de las muestras es algo que no conocemos. Esta información es de gran importancia para tomar la mejor decisión. Cabe mencionar que los datos que se generan de la Secuenciación Masiva requieren de experiencia en Bioinformática para su análisis. La USMB-UNAM cuenta con equipos de secuenciación masiva de última generación y con la capacidad de análisis bioinformático, aunque no cuenta con acreditación en el área forense. Considero que es importante informar al público sobre la utilidad y el potencial de las técnicas de secuenciación masiva disponibles en nuestro país.



hermanos.

Si bien este resultado es contundente y dio certidumbre a la familia Mora Venancio, en los reportes entregados a la PGR, no se menciona la razón por la cual el ADN extraído de las otras muestras no fue favorable para ninguna de las pruebas mencionadas hasta ahora. Por un lado, el reporte menciona que la muestra que fue identificada con éxito no difiere de gran manera a las 16 restantes en cuanto a tamaño; sin embargo no se mencionan datos como el peso y qué tan dañadas por el fuego estaban. Pero sobre todo, el dato más importante es la cantidad y calidad del ADN extraído de dichas muestras.

en las notas periodísticas. Si bien el término es correcto y proviene de una patente y comercialización elaborada por la empresa Lynx Therapeutics en el año 2000, ya no es utilizado en la actualidad o por lo menos no por la comunidad científica. Un término más adecuado es el de "Secuenciación de alto rendimiento de ADN" y en el argot científico son más conocidas con el término en inglés de "Next-Generation Sequencing" (NGS). A continuación se explicará las posibles razones por las cuales las tecnologías de NGS podrían ser una opción para rescatar algo de las 16 muestras que aún no han podido ser analizadas.

co en el país. Si bien el término de Secuenciación Masiva engloba a un conjunto de tecnologías que pueden realizar el proceso de secuenciación de moléculas de ADN con una gran sensibilidad, en tiempos más cortos y con costos menores, su principal característica es que se obtienen grandes rendimientos. El funcionamiento depende de cada tecnología y existen diferencias entre ellas. Estas tecnologías son un claro ejemplo de nanotecnología aplicada, ya que en todos los casos se analizan de manera paralela millones de moléculas de ADN ya sea en pozos nanométricos (figura 1) o bien adhiriéndolas a superficies de laminillas de vidrio de unos cuantos centímetros de



3. Esquema de una molécula de ADN cuya secuencia es determinada por un poro de proteína de la tecnología "Oxford Nanopore" (MR)