

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA  
UNIDAD DE POSGRADO  
ESPECIALIDAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS FORENSES  
INSTITUTO SELADIS**



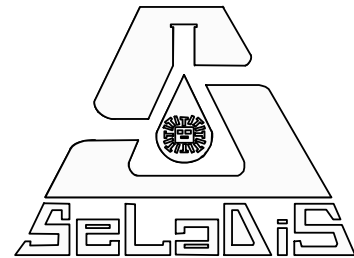
**TRABAJO DIRIGIDO**

# **DETECCIÓN DEL MARCADOR FORENSE DYS393 EN HECES**

TUTOR: PhD. María Teresa Álvarez

AUTOR: Lic. Ruddy Luna Barrón

Julio 2007



**TRABAJO DIRIGIDO  
NIVEL ESPECIALIDAD  
BIOQUÍMICA FORENSE**

Investigación y aplicación técnica realizada con el apoyo de la  
Policía Nacional de Bolivia y el Instituto SELADIS en La Paz,  
Bolivia durante en la gestión 2005-2006.

**TUTOR:** PhD. María Teresa Álvarez (UMSA)  
**ASESOR CIENTÍFICO:** MSc. Lisbeth Borjes F. (Universidad del  
Zulia, Venezuela)  
**AUTOR:** Lic. Ruddy Luna Barrón (FELC-C)

Julio 2007

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Instituto SELADIS por el apoyo técnico y científico brindado a través de la PhD. Susana Revollo Z. su Directora.

A mi familia por el apoyo permanente y gratificante durante mi vida.

De forma especial al Tcnl. Gualberto Condori Tapia, por el soporte y apoyo personal brindado para el desarrollo de este tema de investigación.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>5</b>
<b>PALABRAS CLAVE.....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA .....</b>	<b>6</b>
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>10</b>
<i>MUESTRAS DE PRUEBA.....</i>	<i>10</i>
<i>PURIFICACIÓN DE ADN MEDIANTE EL SISTEMA COMERCIAL “MoBio FECAL DNA ISOLATION KIT” .....</i>	<i>10</i>
<i>PURIFICACIÓN DE ADN DE SANGRE (Control).....</i>	<i>11</i>
<i>CONDICIONES DE PCR PARA DYS393 .....</i>	<i>11</i>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>13</b>
<i>PURIFICACIÓN DE ADN .....</i>	<i>13</i>
<i>AMPLIFICACIÓN DE DYS393 .....</i>	<i>13</i>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>20</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>21</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>22</b>

# **DETECCIÓN DEL MARCADOR FORENSE DYS393 EN HECES**

Ruddy Luna Barrón

## **RESUMEN**

Los restos fecales son un indicio biológico raro y difícil al tratar de obtener ADN suficientemente puro e íntegro para la determinación de perfiles genéticos de identidad humana. En esta investigación, cuatro sub muestras de 400 a 500 mg de heces humanas recientes y conservadas a  $-20^{\circ}$  C durante seis, trece y 20 días, fueron estudiadas mediante PCR para la detección del microsatélite (STR) de uso forense, y presente únicamente en el cromosoma Y, DYS393.

El ADN total de las submuestras fue obtenido empleando un procedimiento de extracción (por lisis alcalina) y purificación de ácidos nucleicos (por filtrado selectivo) diseñado por la compañía MoBio para estudios microbiológicos. Modificaciones en los tiempos de lisis y centrifugación permitieron obtener ADN en cantidad y calidad suficientes para lograr la amplificación de un producto de 130 pb correspondiente a DYS393.

Pese a las mínimas proporción de genoma humano presente en los restos fecales, y a la gran cantidad de bacterias, cuya actividad destruye los fragmentos de ADN humano, el sistema de extracción y purificación de ADN evaluado ha demostrado ser eficiente y se recomienda su aplicación en el estudio de muestras complejas de características semejantes.

## **PALABRAS CLAVE**

ADN, heces, DYS393.

# DETECCIÓN DEL MARCADOR FORENSE DYS393 EN HECES

## INTRODUCCIÓN

El presente trabajo corresponde a la prosecución de una investigación de tres partes, cuyo objetivo general es elaborar un método para la caracterización genética en casos de investigación criminal, a partir de muestras de heces o restos fecales bajo condiciones de colecta y manipulación según los procedimientos del Departamento de la Policía Técnica Científica de la Policía Nacional de Bolivia.

La primera de las tres partes corresponde a la evaluación de un método de extracción y purificación de ADN total a partir de heces fecales humanas en distintos estados de descomposición, y su posterior aplicación en la amplificación de un fragmento genómico de 1500 pares de bases mediante PCR para evaluar la *pureza*, método diseñado por la compañía “MoBio Inc.” para obtener ADN microbiano de heces (Fuentes, com.pers.). La segunda y presente parte, corresponde a la detección del marcador microsatélite de identidad genética humana DYS393 de 130 pb, propio del cromosoma Y, en muestras de heces para evaluar la *sensibilidad* del método. Y la tercera pretende evaluar la *aplicabilidad* del método en un caso real utilizando restos fecales obtenidos con técnicas de colecta, manipulación y almacenamiento estándar de la Policía Nacional de Bolivia (Condori, com.pers.).

## FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

La importancia y necesidad de emplear métodos de la biología molecular y de la genética de poblaciones en casos de investigación policial como herramientas accesorias ha sido demostrada hace ya más de una década (Weir, 1992; Robinson, 1993), y los progresos

actuales son evidencia del alcance, potencia y efectividad del perfil de identidad genética para tales usos y aplicaciones (Lee y Tirnady, 2003).

Son diversos los indicios biológicos que pueden hallarse en una determinada escena criminal. No obstante, el hallazgo de restos fecales sujetos a investigación policial es infrecuente y, hasta hace poco como indicio o elemento de prueba, carecía de relevancia en comparación a otros elementos presentes con mayor potencial informativo como las huellas dactilares, restos biológicos típicos, prendas de vestir, armas y otros.

Sin embargo, en circunstancias especiales, estos restos podrían ser el único indicio presente capaz de contener información para relacionar a un sospechoso con una determinada escena criminal, como lo fue el caso del atraco a la casa de cambios “Sudamer” en la ciudad de La Paz el año 2005. Durante la fase de colección de indicios, fueron encontrados desechos de esta peculiar naturaleza entre los elementos a ser usados para la identificación de los implicados. No obstante su colecta y remisión a los laboratorios de análisis respectivos, las pruebas preliminares realizadas a solicitud de la policía no fueron exitosas debido a la complejidad y naturaleza química del material biológico (com.pers., TCnl. Gualberto Condori Tapia – Jefe Nacional Policía Técnica Científica).

Existen tres razones principales por las que obtener ADN a partir de heces es un proceso complejo: a) la cantidad de material genético humano es escasa, b) existe una gran cantidad de material genético microbiano contaminante, y c) las heces poseen una variedad de compuestos químicos inhibidores de la actividad enzimática como las bilirrubinas, polisacáridos complejos, compuestos húmicos y sales biliares. (Deuter et al., 1995; Monteiro et al., 1997).

La actividad inhibitoria de los contaminantes inherentes al material fecal ha sido previamente documentada (Surace, 1999), esta inhibición obstaculiza principalmente la actividad de la enzima “*Taq* Polimerasa” durante el proceso de amplificación específica de los marcadores moleculares de identidad genética (PCR), por lo que la búsqueda de medios

que permitan su remoción o mengua es una necesidad ineludible si se pretende emplear el material genético en procedimientos de genotipificación (Wilson, 1997).

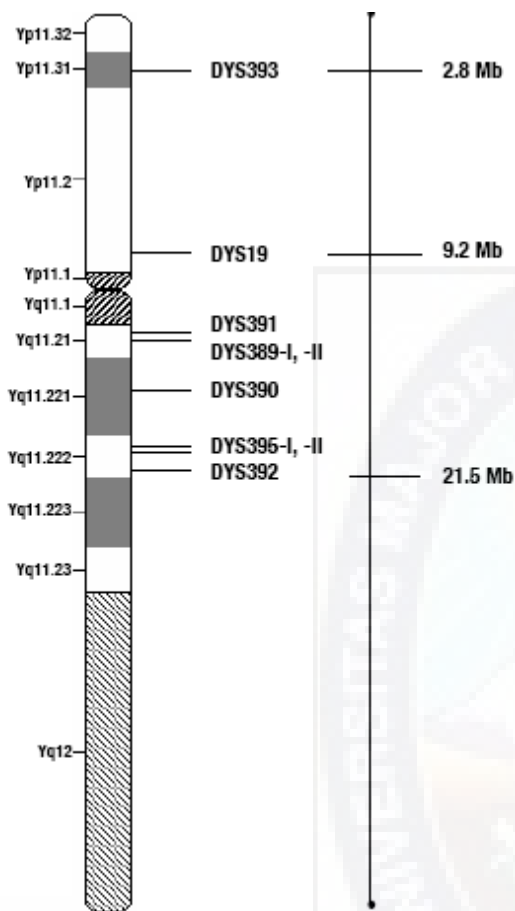
Pero la contaminación no es el único ni el principal factor contraproducente en la obtención de ADN. Otro problema lo conforma la integridad del material genético que se ve destructivamente afectada por los procesos degradativos inherentes a la naturaleza metabólica de los microorganismos presentes en los restos fecales. Por tal motivo es necesario, por un lado, recuperar el ADN antes de que la integridad estructural del mismo se vea irreparablemente afectada y lo haga incompatible para la subsiguiente detección de microsátélites, y por otro, elegir marcadores mini-STR (de tamaño menor a 200 pb) ya que, por su reducido tamaño, es menos probable que su integridad sea irreversiblemente dañada en el mismo tiempo de descomposición (Wang et al., 2004; Dixon et al., 2005).

Por lo tanto, es de extrema importancia elegir un método eficaz para recuperar ADN útil del organismo donante de los restos fecales (Vigilant, 2002; Wehausen et al., 2004), donde el gran número de procariotes presentes de la micrflora intestinal (Kreader, 1995) y las nimias cantidades de genoma humano del epitelio arrastrado pueden llevar incluso a falsos resultados positivos.

Durante los procesos de obtención del ADN en el laboratorio, el factor preponderante resulta ser la etapa de purificación que es intermedia entre la extracción y la recuperación. Otros sistemas comerciales de extracción y purificación han sido exitosamente probados (Vandenberg y Oorschot, 2002), y puesto que un reto semejante lo comprende la obtención de ADN a partir de sedimentos y suelos al tratar con genoma microbiano, se decidió probar el sistema de purificación de ADN de la compañía MoBio (especializada en suelos y sedimentos) para obtener ADN suficientemente puro, pero a partir de heces.

Los resultados de estas pruebas han sido documentados en el trabajo preliminar a este (Fuentes, 2007), donde se ha descrito el efecto degradativo de la comunidad microbológica intestinal sobre la integridad del ADN y el efecto inhibitor de los desechos húmicos fecales durante el PCR.

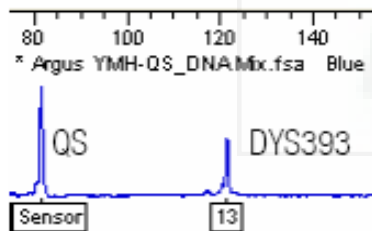




**Figura 1:** Esquema de localización del marcador DYS393 en el cromosoma Y.

En la presente investigación se evaluó la presencia de genoma humano en cantidad e integridad suficientes, en el ADN total obtenido de los restos fecales con el método previamente evaluado, efectuando ensayos de amplificación por PCR del microsatélite marcador molecular universal de uso forense DYS393.

El marcador DYS393 se caracteriza por estar presente únicamente en la posición 2,8 Mb del brazo corto “p” del cromosoma Y humano (Yp11.31; Figura 1), limitando la probable población de estudio a varones. Típicamente se compone de repeticiones en tándem de la secuencia AGAT, en un número variable de 9 a 17 copias, por lo que el tamaño de los productos esperados de la amplificación oscila entre los 108 y 141 pares de bases (Figura 2; <http://www.cstl.nist.gov>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).



**Figura 2:** Peso molecular promedio del microsatélite DYS393 próximo a los 120 pb obtenido mediante electroforesis de lectura láser.

La amplificación multiplex de este marcador, junto a DYS390, DYS385I/II, DYS392, es de uso universal para la genotipificación de perfiles de identidad humana (Hammer y Narveson, 2000; Rejala et al., 2003). Y para obtener un haplotipo mínimo viable es requerida la caracterización adicional de los marcadores

DYS19, DYS389I/II y DYS391 (nueve en total; Leat et al., 2004). Su extensa aplicación en el campo forense y la disponibilidad del mismo permitieron elegirlo para el presente trabajo.

## **METODOLOGÍA**

### **MUESTRAS DE PRUEBA**

Se colectaron y conservaron a  $-0^{\circ}\text{C}$  fragmentos (submuestras) de restos fecales de un donante varón, realizando una extracción de ADN en el tiempo cero (T1), una subsiguiente seis días después (T8), una tercera 13 días después (T9) y una cuarta a los 20 días (T10). (La nomenclatura corresponde a la asignada en el trabajo preliminar).

El control positivo (C+) corresponde a material genético obtenido de una muestra de 100 ul de sangre del mismo donante, y el control negativo (C-) a 100 ul de sangre de un donante femenino.

### **PURIFICACIÓN DE ADN MEDIANTE EL SISTEMA COMERCIAL “MoBio FECAL DNA ISOLATION KIT”**

400 a 500 mg de heces son agregados a un tubo MoBio de miniesferas de sílica y se adicionan 700 ul de solvente Tris 10 mM más 250 ul de la solución removedora de contaminantes IRS del kit de composición desconocida, y se somete a vórtex por 10 minutos. Se centrifugan los tubos a 10000G por 1 minuto y luego se colecta el sobrenadante en un tubo nuevo, adicionando 250 ul de la solución de lisis alcalina de composición no revelada por el fabricante, dejando reposar a  $4^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos luego de mezclarlos por inversión. Se colectan 600 ul de la mezcla en un tubo filtro spin, centrifugando por 1 minuto a 10000G y desechando el precipitado. El remanente es sometido al mismo procedimiento. Se desecha el filtrado y se agregan 600 ul de una solución de etanol al 90% centrifugando a 10000G 1 minuto, el filtrado de etanol es desechado y se centrifuga una vez

más por 1 minuto a 10000G para precipitar el etanol residual. El filtro spin es cuidadosamente retirado y colocado en un tubo nuevo, agregando 50 ul de una solución Tris 10 mM sobre el mismo, recuperando el ADN del filtro por centrifugación de 1 minuto a 10000 G.

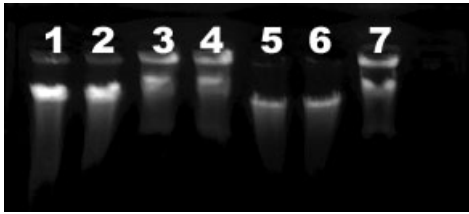
## **PURIFICACIÓN DE ADN DE SANGRE (Control)**

50 ul de sangre fresca son colocados en un tubo eppendorf y se agregan 800 ul de la misma solución de lisis alcalina del método anterior, dejando reposar durante 20 minutos a 4 ° C luego de mezclar por inversión. Se colectan 600 ul de la mezcla en un tubo filtro spin, centrifugando por 1 minuto a 10000G y desechando el precipitado. El remanente es sometido al mismo procedimiento. Se desecha el filtrado y se agregan 600 ul de una solución de etanol 90%, centrifugando a 10000G 1 minuto. El filtrado de etanol es desechado y se centrifuga una vez más por 1 minuto a 10000G para precipitar el etanol residual. El filtro spin es colocado en un tubo nuevo y se agregan 50 ul de una solución Tris 10 mM sobre el filtro, recuperando el ADN por centrifugación de 1 minuto a 10000 G.

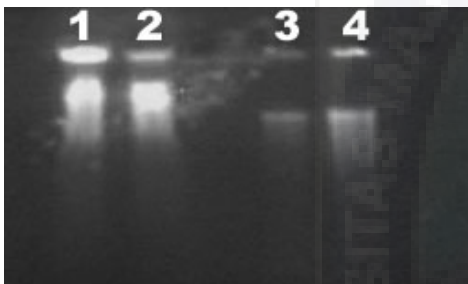
## **CONDICIONES DE PCR PARA DYS393**

<b>DYS393 (Vf = 20 ul)</b>	
<b>Comp</b>	<b>[ ] final</b>
H <sub>2</sub> O	---
Buffer Taq	1 X
dNTP's	0,2 mM
Primer 1	0,2 uM
Primer 2	0,2 uM
Taq Pol	0,035 U/ul

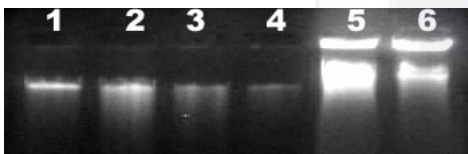
Se utilizaron reactivos de la compañía BioLabs de Inglaterra, cuyo solvente general (Buffer) contiene 2 mM de MgSO<sub>4</sub> y 10 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en Tris-HCl, para un volumen final de 20 ul y con una dilución de ADN de factor 100 en todos los casos. Las concentraciones de los componentes se detallan en el recuadro derecho. El programa de ciclos estandarizado para un termociclador Perkin Elmer 9600 fue: 95 °C por 1 minuto; 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos; 72 °C por 5 minutos.



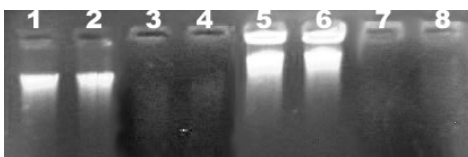
**Figura 3:** Electroforesis de los productos de la extracción de ADN de heces por duplicado en el tiempo cero (T1, Carriles 5 y 6). Los carriles 1 al 4 y 7 muestran los pasos intermedios de purificación.



**Figura 4:** Electroforesis de los productos de la extracción de ADN por duplicado de heces congeladas seis días (T8, Carriles 3 y 4). Carriles 1 y 2 pasos intermedios.



**Figura 5:** Electroforesis de los productos de la extracción de ADN por duplicado de heces congeladas trece días (T9, Carriles 3 y 4). Carriles 1, 2, 5 y 6 pasos intermedios.



**Figura 6:** Electroforesis de los productos de la extracción de ADN por duplicado de heces congeladas veinte días (T10, Carriles 1 y 2). Carriles 3 al 8 pasos intermedios.

# **RESULTADOS**

## **PURIFICACIÓN DE ADN**

La obtención de ADN a partir de los 400 a 500 mg de las cuatro muestras de heces procesadas mostró productos en cantidad directamente visible a través de electroforesis en agarosa (Figuras 3 a la 6).

Pruebas posteriores a la conclusión del presente trabajo dejaron ver, mediante espectrofotometría UV, que la concentración aproximada del material genético obtenido alcanzaba los 20 a 40 ng/ul.

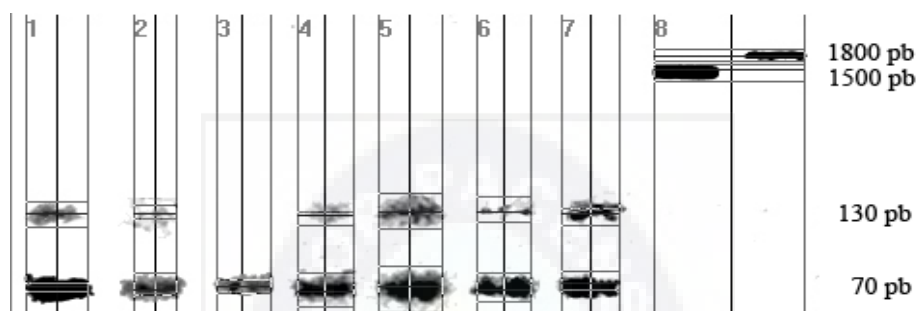
Es apreciable cierta proporción no cuantificable directamente de degradación en todos los extractos finales. La diferencia de intensidad en el brillo de las bandas que contienen los pasos intermedios, intensidad que es un indicador de la cantidad de ácidos nucleicos presentes, en todos los casos deja ver que un porcentaje del material genético se pierde durante la purificación ya que los productos intermedios fueron obtenidos de la lisis directa de cada muestra (correspondientes a los carriles 1 y 2 de las figuras 3 y 4, y a los carriles 5 y 6 de las figuras 5 y 6).

Es visible también una diferencia de intensidad entre los purificados finales de las muestras conservadas a distintos tiempos. Curiosamente las bandas más brillantes corresponden a las muestras conservadas mayor tiempo (20 días), lo cual es un indicador del efecto de las diferencias existentes en el método técnico operativo, el cual fue finalmente estandarizado para las últimas submuestras y es el método descrito en este documento.

## **AMPLIFICACIÓN DE DYS393**

Durante la estandarización del protocolo de amplificación mediante PCR se realizaron múltiples variantes para optimizar la concentración de MgCl<sub>2</sub>, la temperatura de

hibridación y la temperatura y tiempo extensión. El protocolo presentado en este documento corresponde al protocolo que mostró los mejores resultados.



**Figura 6:** Fotografía digital de los productos de la amplificación de DYS393 (PM = 130 pb) con heces en tiempo cero de colecta (T1, carriles 1 y 6), a los seis días (T8, carril 2), a los trece días (T9, carril 3) y a los veinte días (T10, carril 4). Carril 7 control positivo. Carril 8 controles de peso molecular. Para una correcta interpretación todas las fotografías digitales fueron analizadas con el software de distribución libre LabImage 7,1.

La figura 6 presenta la fotografía digital de la electroforesis de los productos de la amplificación del microsatélite DYS393 (130 pb aprox.) con las submuestras T1, T8, T9 y T10 que corresponden respectivamente a la colecta de 400 a 500 mg de heces en tiempo cero, a los seis, a los trece y a los veinte de días luego de su almacenamiento a 0 °C.

La baja intensidad luminosa de las bandas de 130 pb, correspondientes a DYS393, en contraste a la brillantez de la banda de productos diméricos de 70 pb, es evidencia de que, pese a los 30 ciclos de amplificación, la cantidad de producto es poca pero suficiente para ser visualizada incluso mediante electroforesis de agarosa estándar al 2% y bromuro de etidio como tinción, lo cual es prometedor ya que normalmente los microsatélites son revelados en geles de poliacrilamida y nitrato de plata como colorante, cuya definición y sensibilidad es varias veces mayor la de la agarosa.

El carril 3, que corresponde a la submuestra de trece días, no presenta un producto a la altura esperada (carril 3). Al considerar que la submuestra T10, procedente de la misma muestra principal, presenta un producto amplificado a la altura esperada (carril 4), se procedió a la repetición del PCR para verificar si la falla fue a nivel de preparación de reactivos y manipulación, y así poder descartar contaminación o degradación del ADN. Los productos de este segundo PCR de verificación dieron positivo (resultados no mostrados), siendo esto coherente con la hipótesis de falla por evaporación accidental ocurrida con el microtubo del primer PCR correspondiente a la submuestra T10.

## DISCUSIÓN

En la búsqueda de información que contenga datos y experiencias para la obtención de ADN total a partir de muestras fecales, se dio cuenta de una cantidad respetable de trabajos dedicados a heces principalmente animales, y la mayor parte de los mismos correspondía al estudio de comunidades microbianas, parasíticas y patogénicas de este atípico indicio biológico. Un interesante resumen, especialmente referido a potenciales aplicaciones forenses, puede hallarse en el trabajo de Fuchs y Poda (2005).

Al considerar la gran cantidad de ADN microbiano presente en las heces, el efecto de los contaminantes e inhibidores de PCR es mucho menos problemático cuando se trata de estudiar la microflora. Una interesante aplicación de esta propiedad fue la detección del microorganismo aerobio del género *Bacteroides*, típico de los intestinos humanos. El diseño de cebadores y sondas para la detección del 16S DNA ribosomal de *Bacteroides sp.*, por PCR e hibridación, ha permitido hace más de una década a Kuijper y colaboradores (1989) inferir la presencia de heces de origen humano a través de la detección de la bacteria en trazas, y este principio fue utilizado para obtener datos de polución generada por humanos (Kreader, 1995).

Estas experiencias se realizaron con material genético sometido a condiciones ambientales de degradación y descomposición natural, y es evidente que ni estos factores ni la presencia

de contaminantes orgánicos en las heces, fueron limitante para obtener los productos de PCR. Más aún, al obtener datos de la dieta y costumbres alimenticias de restos humanos momificados a través de la caracterización genética, el grupo de investigadores (Rollo et al., 2002) pudo concluir sobre la diversidad animal y vegetal presente en el colon, derivada de los últimos alimentos ingeridos y digeridos, y es importante recordar que indudablemente el ADN de estos alimentos está presente en menor proporción que el microbiano.

Los restos humanos del trabajo de Rollo et al. fueron momificados hace 5000 años y pese al tiempo los resultados fueron concluyentes. Un año antes se realizó un estudio semejante con restos fecales de 2000 años de antigüedad (Poinar et al., 2001). Se amplificaron fragmentos de 1800 pb del genoma ribosomal a partir de los coprolitos, los que demostraron ser de origen humano, además de secuencias de mamíferos y plantas correspondientes a la dieta del donante. Una vez más, el tiempo y la actividad microbiana degradativa no tuvieron un efecto total de descomposición sobre el ADN humano, animal y vegetal presentes.

A criterio y recomendación de Poinar et al., trabajos como estos han demostrado que estudiar el genoma de restos momificados es mucho más efectivo y menos complejo que, por ejemplo, con restos óseos recientes. A través de esto es posible concluir que en muestras recientes conservadas, como las empleadas en la presente investigación, la contaminación es un problema más serio que la degradación.

La purificación de ADN en muestras complejas, como restos fecales, sedimentos humificados y sustratos autrofizados, es un reto que ha sido contestado mediante diversas técnicas (Tsai y Olson, 1992), con énfasis en la década de los 80 debido a los requerimientos de pureza del PCR. Pero estos procedimientos se enfocaban más a la taxonomía molecular y la filogenia, y no se realizaban esfuerzos por optimizarlos para la genotipificación.



Taberlet et al. (1996) propuso una técnica para la obtención de minisatélites tipo VNTR (de mucho mayor tamaño que los microsatélites STR) ha ser empleada en la tipificación mediante perfiles genéticos de identidad a partir de ADN en mínimas cantidades. El uso de los VNTR fue extendido en la década de los 90 para la identificación humana, pero la localización telomérica de los mismos en cada cromosoma, y su gran tamaño (mayor a los 1000 pb), hicieron su uso limitado, y en muchos casos restrictivo, ya que las muestras biológicas debían estar adecuadamente conservadas para velar por la integridad de la cadena de ADN.

El descubrimiento de los espacios intergénicos no codificantes (intrones) de reducido tamaño (100 a 500 pb) y amplia distribución, fueron la solución para obtener perfiles de identidad genética a partir de muestras con cierto grado de descomposición, además de incrementar la precisión y la rapidez de las pruebas. La técnica, puesta en práctica por Palumbi y Baker en 1994, fue publicada con el nombre inicial de EPIC (Exon Primed Intron Crossing) – PCR. Inmediatamente, la hipervariabilidad de los patrones repetitivos de la estructura secundaria en las cadenas de estos intrones fue empleada para la obtención de perfiles de identidad humana, pruebas en las que estas cadenas intrónicas fueron mejor conocidas como STR (Single Tandem Repeats).

A diferencia de los VNTR, al disponer de regiones informativas tan pequeñas como los STR dentro del genoma, disminuyen las limitaciones para obtener perfiles de identidad humana mediante genotipificación. Y, procesos antes imposibles como el PCR con muestras formolizadas, pueden ser resueltos con nuevas técnicas de recuperación de genomas íntegros como la RCA-RCA (Restriction and Circularization-Aided Rolling Circle Amplification; Wang et al., 2004).

Todos los STR empleados para le genotipificación forense comparten la característica de la hipervariabilidad, que permite observar diferencias de generación en generación, aun entre familiares cercanos, lo cual convierte a estos STR en ideales herramientas para elaborar bases de datos con perfiles de identidad humana (Pritchard et al., 1999; Leat et al., 2004; Gusmao et al., 2005).

Ya se ha mencionado el uso de heces fecales para investigar niveles de contaminación producida por humanos. Por un lado, el trabajo de Kreader (1995) ha demostrado que es posible rastrear actividad humana estudiando las bacterias asociadas al cuerpo. Norris y Bock (2000) llegaron más lejos, y con gran éxito, a través del estudio de la fenología de restos de heces, comparando la estructura microscópica y composición de restos celulares vegetales y animales, aportaron a la resolución de dos casos de homicidio.

El reporte final de la investigación de Norris y Bock permitió dar con los responsables del homicidio por trazas de heces de la víctima encontradas en prendas de vestir. Cinco años más tarde Jonson (2005) publicó la aplicación de un sistema comercial (QIAGEN) de purificación de ADN de heces (basado en columnas de filtración selectiva) para su uso en PCR, y no obstante Roy (2003) dos años antes empleó con éxito tres métodos distintos para obtener los mismos resultados pero amplificando marcadores específicos de identidad genética humana del tipo STR somáticos y sexuales, incluido el DYS393.

En síntesis, si bien la obtención de ADN suficientemente puro a partir de heces fecales es un reto, múltiples experimentos con sistemas de purificación por inhibición de contaminantes (CTAB) y por filtrado selectivo (QIAGEN, MOBIO) han dado resultados positivos. Lo mencionado hasta este punto demuestra que, ni la contaminación ni la degradación son problemas de orden técnico insuperable al trabajar con heces humanas. Con el presente trabajo se quiso probar tal supuesto, optimizando en nuestro medio y condiciones un método rápido, accesible y confiable para la amplificación de STRs a partir de heces fecales con potencial aplicación en el campo forense.

El sistema de extracción y purificación de ADN evaluado fue fabricado por la compañía MoBio, dedicada específicamente a productos relativos a la obtención y manipulación de ácidos nucleicos para múltiples propósitos y objetivos, incluso con experimentos microbianos en el espacio exterior.

El kit (Fecal DNA Isolation Kit) fue originalmente diseñado para la purificación de ADN microbiano que, como se dijo, está presente en grandes cantidades, así que técnicamente se

centra más en la purificación para extinguir contaminantes y remover inhibidores, que en la integridad del producto final. No se han encontrado referencias que utilicen este sistema para obtener específicamente ADN humano, ni tampoco que detallen su aplicación y uso forense. Experiencias preliminares de los autores de este trabajo, con sustratos humificados y genética microbiana, dieron el incentivo para evaluar este kit en busca de genoma humano.

El procedimiento general de la aplicación del kit comprende una fase inicial de disgregación y lisis, una siguiente de purificación por filtrado selectivo, y una final de resuspensión. La disgregación es mecánica y en suspensión mediante vibración en vórtex. El mecanismo de lisis observado corresponde al principio alcalino de disgregación de membranas y paredes celulares, libre de detergentes y enzimas líticas, lo cual hace la purificación mucho más sencilla. Durante este procedimiento, los ácidos nucleicos liberados son retenidos por un filtro poroso de diámetro selectivo (aprox. 0,2  $\mu\text{m}$ ) de tal manera que solo moléculas de gran tamaño ( $>10$  kDa) son retenidas para poder precipitar, con etanol, proteínas y otras moléculas no polares. La precipitación y resuspensión con Tris 10 mM arrastra el ADN retenido al extender los poros del filtro en una fase polar.

Los productos finales son sometidos a diluciones sucesivas hasta 100 veces el volumen inicial para utilizarlas en las pruebas de PCR. Habiendo obtenido ADN suficientemente puro según los resultados de la experiencia previa con el DNA ribosomal bacteriano (Fuentes, 2006), se procedió a la amplificación de DYS393 en un PCR inicial de 25 ciclos, donde los amplificados no pudieron ser detectados en gel de agarosa. Los resultados con 30 ciclos permitieron apreciar una banda tenue del producto esperado de 130 pb, y a través del análisis digital de las fotografías, se confirmó su peso molecular.

Es importante aclarar que, para una posible genotipificación a partir de productos de tan bajo peso molecular, se tienen que emplear geles de poliacrilamida, especialmente si se pretenden obtener resultados para un perfil de identidad humana. El uso de geles de agarosa permite únicamente verificar la presencia o ausencia de amplificados y aproximar, de manera poco precisa, el peso molecular. La baja intensidad de las bandas de DYS393,

incluida la correspondiente al control positivo de sangre (Figura 6, carril 7) es un claro indicio de que la matriz de agarosa no tiene las condiciones estructurales necesarias para mostrar un fragmento de 130 pb con definición, pues de ser así la banda del carril 7 debería ser mucho más brillante y definida. Más aún, esto es un interesante indicativo de que la pureza e integridad, y no así cantidad, del ADN en ambos casos (heces y sangre) es semejante, al menos para las condiciones de PCR empleadas.

En cuanto a la obtención de ADN, la experiencia ha demostrado que el protocolo recomendado por el fabricante (Figura 3, carriles 5 y 6) puede ser levemente modificado para incrementar su eficiencia (Figura 6, carriles 1 y 2): La cantidad de heces no debe superar los 500 mg en estado húmedo; la disgregación por vórtex debe ser total, de tal forma que puede extenderse a 15 minutos y, en ciertos casos, puede ser necesario disgregar cúmulos semisólidos o compactados con ayuda de una varilla estéril de plástico. El tiempo de lisis a 4 °C se ha incrementado de 10 a 20 minutos y todas las etapas de centrifugación se han duplicado en tiempo. Finalmente, es posible recuperar más ADN retenido en el filtro en una segunda resuspensión y precipitación.

## **CONCLUSIONES**

Considerando que ha logrado obtener el producto amplificado del marcador STR DYS393 de uso forense, es posible concluir que el método evaluado para la extracción de ADN (MoBio Fecal DNA Isolation Kit) basado en lisis alcalina y purificación por filtración selectiva, y el protocolo de PCR estándar ajustado a los requerimientos de hibridación de los cebadores específicos, son apropiados para realizar estudios de identidad humana.

Tanto la degradación aparente del ADN humano en heces conservadas en congelación hasta 20 días, como la contaminación por inhibidores, sustancias orgánicas y actividad nucleasa de origen microbiano, son problemas técnicos superables al emplear el método descrito si se pretende obtener perfiles de identidad genética con marcadores STR como el DYS393 de típica aplicación en ciencias forenses.

El kit está valuado actualmente en 130 \$us americanos para procesar 50 muestras, y 500 \$us para 250 muestras. Sin embargo, es mucho más económico y recomendable adquirir los componentes por separado, específicamente los tubos “spin” con las miniesfereas de sílica, la solución de lisis y los filtros selectivos, ya que el etanol y el Tris 10 mM pueden ser preparados en el laboratorio.

## **RECOMENDACIONES**

Es extremadamente recomendable el uso de geles de poliacrilamida para la determinación de perfiles de identidad humana. Así mismo, se recomienda la aplicación multiplex de cebadores de requerimientos térmicos semejantes con productos de tamaño distinto para economizar en reactivos y generar perfiles más completos.

Así mismo, se sugiere evaluar el procedimiento en heces degradadas por condiciones ambientales, restos deshidratados y en trazas fecales, y aplicar procesos cuantitativos (real time PCR) para estimar la concentración presente de ADN humano, además de la amplificación de genes más grandes (como los ribosomales) para estimar la integridad.

Considerando la rareza de las heces como indicio biológico, es aconsejable adquirir los reactivos en bajas cantidades. Aun así, los componentes independientes del sistema comercial pueden ser utilizados por separado. Un interesante ejemplo fue la obtención de ADN de sangre como control positivo, ya que se utilizó la misma solución de lisis y los mismos filtros selectivos “spin”. Un proceso más detenido de estandarización podría demostrar que el mecanismo es extremadamente versátil y de múltiples aplicaciones en el campo de las ciencias y la salud.

## BIBLIOGRAFÍA

Deuter R, Pietsch S, Hertel S, Muller O.1995. **A method for preparation of fecal DNA suitable for PCR.** Nucleic Acids Research. 23(18):3800–3801.

Dixon L.A., Dobbins A.E., Pulker H.K., Butler J.M., Vallone P.M., Coble M.D, Parson W., Berger B., Brubwieser P., Mogensen H.S., Morling N., Nielsen K., Sanchez J.J., Petkovski E., Carracedo A, Sanchez-Diz P., Ramos-Luis E., Briòn E., Irwin J.A., Just R.S., Loreille O., Parsons T.J., Syndercombe-Court D., Schmitter H., Stardmann-Bellinghausen L.A. Dixon, A.E. Dobbins, H.K. Pulker, J.M. Butler, P.M. Vallone, M.D. Coble, W. Parson, B. Berger, P. Grubwieser, H.S. Mogensen, N. Morling, K. Nielsen, J.J. Sanchez, E. Petkovski, A. Carracedo, P. Sanchez-Diz, E. Ramos-Luis, M. Brion, J.A. Irwin, R.S. Just, O. Loreille, T.J. Parsons, D. Syndercombe-Court, H. Schmitter, B. Stradmann-Bellinghausen, K. Bender y P. Gill. 2005. **Analysis of artificially degraded DNA using STRs and SNPs- results of a collaborative European EDNAP exercise.** Forensic Science International. (Submitted).

Fuchs J. y Podda M.. 2005. **Encyclopedia Of Medical Genomics and Proteomics.** Ed. Marcel Dekker. pp.500-504.

Fuentes S.. 2007. **Purificación de ADN para PCR a partir de heces fecales.** Trabajo Dirigido de Postgrado. Facultad de de Bioquímica, UMSA. La Paz, Bolivia.

Gusmao, P. Sánchez-Diz, F. Calafell, P. Martín, C.A. Alonso, F. Álvarez-Fernández, C. Alves, L. Borjas-Fajardo, W.R. Bozzo, M.L. Bravo, J.J. Builes, J. Capilla, M. Carvalho, C. Castillo, C.I. Catanesi, D. Corach, A.M. Di Lonardo, R. Espinheira, E. Fagundes de Carvalho, M.J. Farfaín, H.P. Figueiredo, I. Gomes, M.M. Lojo, M. Marino, M.F. Pinheiro, M.L. Pontes, V. Prieto, E. Ramos-Luis, J.A. Riancho, A.C. Souza Goés, O.A. Santapa, D.R. Sumita, G. Vallejo, L. Vidal Rioja, M.C. Vide, C.I. Vieira da Silva, M.R. Whittle, W.

Zabala, M.T. Zarrabeitia, A. Alonso, A. Cariacedo y A. Amorim. 2005. **Mutation Rates at Y Chromosome Specific Microsatellites.** Human Mutation. 26(6): 520-528.

Hammer M. y Narveson S.. 2000. **Development of the human Y Chromosome as a forensic tool, final progress report.** U.S. Department of Justice. Doc # 181956.

JohnsonD, MartinL, RobertsK. 2005. **STR-typing of human DNA from human fecal matter using the QIAGEN QIAamp® stool mini kit.** Journal of Forensic Sciences. Volume 50, Issue 4.

Kreader C. A.. 1995. **Design and Evaluation of *Bacteroides* DNA Probes for the Specific Detection of Human Fecal Pollution.** Applied and Environmental Microbiology, 61(4):1171-1179.

Kuiperj E. D. J., Steigerwalt A. G., Schoenmakers B. S. C. I. M., Peeters M. F., Zanen H. C. y Brenner D. J.. 1989. **Phenotypic Characterization and DNA Relatedness in Human Fecal Isolates of *Aeromonas* spp.** Journal of Clinical Microbiology. 27(1):132-138.

Leat N, Ehrenreich L, Benjeddou M y Davison S.. 2004. **Developments in the use of Y-chromosome markers in forensic genetics.** African Journal of Biotechnology. 3(12):637-642.

Lee H.C. y Tirnady F.. 2003. **Blood evidence: how DNA is revolutionizing the way we solve crimes.** Book review. The Journal of Clinical Investigation. 112(9):1268.

Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, 1997. **Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces.** Journal of Clinical Microbiology. 1997:995–998.

Norris DO y Bock JH. 2000. **Use of fecal material to associate a suspect with a crime scene: report of two cases.** Journal of Forensic Sciences. 45(1).



Palumbi S. y Baker C.. 1994. **Contrasting Population Structure from Nuclear Intron Sequences and mtDNA of Humpback Whales.** Molecular Biology and Evolution. 11(3):426-435.

Poinar H. N., Melanie Kuch, Kristin D. Sobolik, Ian Barnes, Artur B. Stankiewicz, Tomasz Kuder, W. Geofferey Spaulding, Vaughn M. Bryant, Alan Cooper y Svante Paabo. 2001. **A molecular analysis of dietary diversity for three archaic Native Americans.** PNAS. 98(8):4317–4322.

Pritchard J.K., Mark T. Seielstad, Anna Perez-Lezaun, and Marcus W. Feldman. 1999. **Population Growth of Human Y Chromosomes: A Study of Y Chromosome Microsatellites.** Molecular Biology and Evolution. 16(12):1791–1798.

Rebala K, Kapinska E y Szczerkowska Z.. 2003. **Anaylisis of polymorphism of three human Y-chromosome STR loci: DYS390, DYS392 y DYS393 in the population of northern Poland.** Journal of Applied Genetics. 44(2): 219-223.

Robinson A.. 1993. **DNA typing has become an important police tool.** Canadian Medical Association Journal. 149(4):464-466.

Rollo F., Massimo Ubaldi, Luca Ermini, and Isolina Marota. 2002. **Otzi's last meals: DNA analysis of the intestinal content of the Neolithic glacier mummy from the Alps.** PNAS. 99(20)12594-12599.

Roy R.. 2003. **Analysis of human fecal material for autosomal and Y chromosome STRs.** Journal of Forensic Sciences. 48(5).

Surace D.. 1999. **Retrieval of nuclear DNA from human feces: Implications and techniques in forensic science [hons. thesis].** La Trobe University.



Taberlet P., Sally Griffin, Benoît Goossens, Sophie Questiau, Valérie Manceau, Nathalie Escaravage, Lisette P. Waits and Jean Bouvet. 1996. **Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR.** *Nucleic Acids Research*. 24(16):3189–3194.

Tsai Y. y Olson B. H.. 1992. **Rapid Method for Separation of Bacterial DNA from Humic Substances in Sediments for Polymerase Chain Reaction.** *Applied and Environmental Microbiology*. 58(7):2292-2295.

Vandenberg N. y van Oorschot R.A.H.. 2002. **Extraction of Human Nuclear DNA from Feces Samples Using the QIAamp DNA Stool Mini Kit.** *Journal of Forensic Sciences*. 47(5):1-3.

Vigilant L.. 2002. **Technical challenges in the microsatellite genotyping of a wild chimpanzee population using feces.** *Evolutionary Anthropology, Suppl.* 1:162-166.

Wang G., Maher E., Brennan C., Chin L., Leo C., Kaur M., Zhu P., Rook M., Wolfe J.L. y Makrigiorgos G.M.. 2004. **DNA amplification method tolerant to sample degradation.** *Genome Research*. 14:2357-2366.

Wehausen J.D., Ramey II R.R. y Epps C.W.. 2004. **Experiments in DNA extraction and PCR amplification from bighorn sheep feces: the importance of DNA extraction method.** *Journal of Heredity*. 95(6):503-509.

Weir B.S.. 1992. **Population genetics in the forensic DNA debate.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89:11654-11659.

Wilson I.G.. 1997. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(10):3741-3751.