

EXTRACCIÓN DE ADN HUMANO OBTENIDO DEL TRACTO DIGESTIVO DE LARVAS DE *Dermestes maculatus* (De Geer, 1774) (COLEOPTERA: DERMESTIDAE) ALIMENTADAS DE TEJIDO CADAVERÍCO

Marisol Ortega-Rosales^{1,2,3}✉, Arturo Gabriel Cortés-Cruz¹, María Lourdes Vega-Navarrete² y Luis Javier Víctor-Rosas³

¹Laboratorio de Entomología Forense, Instituto de Ciencias Forenses, Niños Héroes 130, Col. Doctores, Del. Cuauhtémoc, C. P. 06720, México, D. F.

²Centro de Estudios e Investigaciones Genéticas ANIGEN, Municipio Libre 366, Col. Santa Cruz Atoyac, Del. Benito Juárez, C. P. 03310, México, D. F.

³Laboratorio de Entomología, Departamento de Zoología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala, Col. Santo Tomás, Del. Miguel Hidalgo, C. P. 11340, México, D. F.

✉ Autor de correspondencia: ortro28@outlook.com

RESUMEN. Se muestrearon coleópteros (dermestidos necrófagos) mediante necrotrampas NTP-80 modificadas probando tres diferentes tipos de tejido cadavérico (tejido muscular, piel y tejido adiposo) y monitoreándolas de mayo a noviembre del 2013. Se colectaron larvas y adultos de *Dermestes maculatus*, las larvas se pesaron y midieron para separarlas por estadios y se extrajo el ADN humano de su tracto digestivo para obtener un perfil genético del cadáver. Se obtuvo un total de 218 adultos y 356 larvas de *D. maculatus*. En la trampa con igual proporción de tejido muscular y adiposo (50 % de cada uno), se registró un mayor número de larvas y se obtuvo mayor cantidad de ADN humano (0.012 ng) mientras que en la trampa con predominio de tejido muscular (80 %), el registro de larvas fue menor y no se obtuvo una cantidad suficiente de ADN humano. Se obtuvo el perfil genético humano completo de un cadáver desconocido masculino incluso de una sola larva en el cuarto estadio de desarrollo.

Palabras clave: Entomología forense, necrotrampa, perfil genético.

Extraction of human DNA obtained from the digestive tract of *Dermestes maculatus* (De Geer, 1774) larvae (Coleoptera: Dermestidae) fed with cadaveric tissue

ABSTRACT. Samples of necrophagous dermestid beetles were obtained through modified NTP-80 necrotraps, testing three different kinds of cadaveric tissue (muscle, skin and fat, in varying proportions). Traps were monitored weekly from May to November, 2013. Larvae and adults of *Dermestes maculatus* were collected, larvae were weighed and measured to separate them by instar, and human DNA was extracted from their midgut to obtain a genetic profile of the corpse from which tissue samples were taken. A total of 218 adults and 356 larvae of *D. maculatus* was obtained. In the trap with equal proportion of muscle and adipose tissue (50% each), more larvae were recovered and more human DNA was obtained from their midgut (0.012 ng), while in the trap with predominance of muscle tissue (80%), larvae were fewer and not enough human DNA was obtained. A complete human genetic profile of an unknown male corpse was obtained from even a single larva in the fourth instar of development.

Keywords: Forensic Entomology, necrotrap, genetic profile.

INTRODUCCIÓN

La tecnología del ADN ha permitido aislar, amplificar y analizar cantidades mínimas de ADN humano, con la finalidad de identificar personas, a través de materiales biológicos que se encuentran en el lugar de los hechos o provenientes de la víctima (Butler, 2010). Las larvas de dípteros y coleópteros pueden servir como herramienta para la obtención de ADN humano, que al utilizar el cadáver como fuente de alimento almacenan el ADN humano en su saco gástrico. Zehner *et al.* (2004) reportaron que obtuvieron perfiles genéticos de STR (*Short Tandem Repeats*) del

tracto digestivo de larvas de dípteros, permitiendo asociar las larvas del cadáver del cual fueron colectadas. DiZinno *et al.* (2002) aislaron satisfactoriamente ADNmt humano del tracto digestivo de larvas de coleópteros necrófagos pertenecientes a la familia Nitidulidae, que se encontraban en restos óseos, para la obtención de un perfil genético. La especie de coleóptero más frecuentemente registrada en entomología forense es *Dermestes maculatus* (De Geer, 1774), como lo mencionaron Charabidze *et al.* (2013), quienes en su revisión de 81 casos forenses en Francia encontraron el registro de larvas, pupas y adultos de estos derméstidos en 50 % de cadáveres en el periodo colicuativo de la descomposición cadavérica y 35 % en el de reducción esquelética, de manera que estos insectos se encuentran en la mayoría de los estados de descomposición, inclusive en la etapa de esqueletización, en la cual usualmente es muy difícil obtener material genético. El fenómeno de preservación por deshidratación (momificación y corificación) favorece el arribo de estos coleópteros, que son principalmente atraídos al cadáver por quimiotaxis proveniente del tejido seco o deshidratado (Von Hoermann *et al.*, 2011). Sin embargo, hay pocos estudios sobre su utilidad para la obtención de ADN humano. Es por eso que el presente trabajo tuvo por objetivo extraer ADN humano del tracto digestivo de larvas de *D. maculatus*.

MATERIALES Y MÉTODO

Muestras. Se tomaron muestras de tejido cadavérico de tres cadáveres diferentes con un intervalo postmortem no mayor a 24 h. En todos los casos, la muestra se tomó de la región pectoral (piel, tejido adiposo y músculo) y se deshidrató de acuerdo a los protocolos establecidos por Cortés-Cruz (*in prep.*), y en cada caso la naturaleza de la muestra varió de acuerdo a la proporción relativa de músculo y grasa en cada cadáver. De cada una de las tres muestras se seleccionaron 300 g y se colocaron como atrayente en respectivas necrotrampas NTP-80 modificadas (Morón y Terrón, 1984; Fig. 1). Paralelo a esta toma de muestra se realizó otra, la cual fue nuestro tejido de referencia o control, que consistió en tomar tejido muscular de cada cadáver que posteriormente se impregnó de sal. En la primera necrotrampa (etiquetada como NTP-1) se colocó la muestra que presentaba una proporción más equilibrada entre tejido muscular (50 %) y adiposo (50 %), en la siguiente necrotrampa (NTP-2) se colocó una muestra con predominio de tejido adiposo (80 %), y en la última necrotrampa (NTP-3) se colocó una muestra con mayor cantidad de tejido muscular (80 %).

Las necrotrampas se colocaron a una distancia de aproximadamente dos metros entre sí, en las instalaciones del Instituto de Ciencias Forenses (INCIFO), en la Ciudad de México (en las coordenadas 19° 25' 22.1' N, 99° 08' 57.6' O), del mes de mayo al mes de noviembre del 2013, a 2137 msnm. Las necrotrampas se revisaron diariamente durante el mes de mayo, después cada tercer día (durante junio) y posteriormente cada semana, anotando fecha, hora del muestreo y factores climáticos (temperatura y humedad).



Figura 1. Necrotrampas NTP-80 modificadas armadas y conteniendo el atrayente. (Tejido cadavérico deshidratado).

Material biológico. Se colectaron manualmente los coleópteros de la familia Dermestidae encontrados en cada necrotampa, tanto adultos como larvas, y se identificaron a especie con ayuda de claves taxonómicas especializadas (Rees, 1947; Háva, 2004). Las larvas identificadas como *D. maculatus* se midieron con el microscopio estereoscópico *Stereo Discovery. VI2[®]*, con objetivo de 0.63 X, mediante el software *AxioVision* y se pesaron con la balanza electro analítica *Scientech SA 120 (Labnet[®])* con el fin de separarlas por estadíos. Se analizó si existían diferencias significativas en peso entre estadíos y necrotampas a través de una prueba estadística (análisis de varianza de dos vías) con ayuda del programa PAST versión 3.02 (Hammer *et al.*, 2001).

Extracción y purificación de ADN. Se colectaron diez larvas por trampa de *D. maculatus* y fueron congeladas para posteriormente hacer la disección del saco gástrico. Con el apoyo del microscopio estereoscópico, se llevó a cabo la disección de las larvas obtenidas de cada NTP-80. Ésta se realizó de manera ventral, con ayuda de agujas hipodérmicas y pinzas tipo relojero estéril. Posteriormente se extrajo el ADN humano del tejido control y del tracto digestivo de *D. maculatus* por duplicado mediante el kit *DNA IQ[™] Casework Pro Kit for Maxwell[®] 16* (Promega). Los productos resultantes se purificaron mediante el *Maxwell[®] 16 LEV Instrument* y el kit mencionado anteriormente, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Para cuantificar el ADN tanto de la muestra control como del tracto digestivo de las larvas de *D. maculatus*, se preparó la curva y un volumen de reacción (60 µl) de cada muestra mediante el kit PCR-RT *Plexor[®] System* y el robot Biomek 3000 de acuerdo al protocolo establecido por Vega (com. pers.). Finalmente, las muestras preparadas se cuantificaron en el equipo para PCR en Tiempo Real *Stratagene Mx 3005P* (Promega). Se analizó si existían diferencias significativas en la cantidad de ADN obtenido entre estadíos y necrotampas a través de un análisis de varianza de dos vías con ayuda del programa PAST versión 3.02 (Hammer *et al.*, 2001).

PCR. Se amplificaron dos tipos de marcadores genéticos: STR y Y-STR. Para los STR, se utilizó el kit *Power Plex[®] Fusion System* con un volumen total de reacción de 25 µl. Cada reacción consistió en 5 µl de *Power Plex[®] Fusion Master Mix*, 5 µl del iniciador *Pair Mix* y 15 µl de la muestra. Para los marcadores Y-STR se utilizó el kit *PowerPlex[®] Y23 System* con un volumen final de 25 µl. Cada reacción consistió en 5 µl de *Power Plex[®] Y23 Master Mix*, 2.5 µl del iniciador *Pair Mix* y 17.5 µl de la muestra. En ambos kits se utilizó un control positivo (ADN muestra) y uno negativo (*Master Mix*, iniciador y agua para amplificación). Para la amplificación mediante PCR las condiciones fueron: (1) *Power Plex[®] Fusion System*: 96 °C por 1 min, 94 °C por 10 segundos, 59 °C por un min, 72 °C por 30 segundos para 30 ciclos, con una extensión final de 60 °C por 10 min. (2) *Power Plex[®] Y23*: 96 °C por dos minutos, 94 °C por 10 segundos, 61 °C por un min, 72 °C por 30 segundos para 30 ciclos, con una extensión final de 60 °C por 20 min. Una vez amplificadas las muestras se analizaron mediante electroforesis capilar en el secuenciador *3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) utilizando los mismos iniciadores. La información obtenida por el equipo de electroforesis capilar fue analizada mediante el programa GENEMAPPER Versión 3.2 con la finalidad de visualizar las secuencias genéticas correspondientes a cada muestra. El perfil genético de la muestra obtenida del tracto digestivo de la larva de *D. maculatus* se comparó con el del tejido control, es decir, del respectivo cadáver masculino, para corroborar si existía correspondencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se registró la presencia de derméstidos adultos en las necrotampas a partir del mes de junio y hasta el mes de noviembre del 2013. Tanto adultos como larvas colectados se identificaron como *D. maculatus*. En la NTP-2 arribaron derméstidos adultos en los primeros días de junio del 2013 pero no lograron sobrevivir, probablemente debido a que esta necrotampa contenía la muestra de tejido con la mayor proporción de grasa y se ha reportado que las hembras de este grupo prefieren

ovipositar sobre músculo o restos secos más que en grasa o médula ósea (Woodcock, 2013); por lo tanto, en dicha trampa no hubo registro subsecuente de derméstidos durante el resto de los muestreos. Mientras tanto, en la NTP-1 y NTP-3 se colectaron aproximadamente 218 adultos y 356 larvas entre el tercer y quinto estadio. En la NTP-3, los derméstidos adultos arribaron en mayor cantidad, aunque en la NTP-1 se desarrolló una mayor cantidad de larvas y de mayor peso. Asimismo, el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías demostró diferencias significativas en el peso promedio de las larvas entre estadios y trampas ($F_{\text{trampa}} = 10.61$, $p = 0.004$; $F_{\text{estadio}} = 54.21$, $p = 4.86E-18$; $F_{\text{trampa} \times \text{estadio}} = 6.659$, $p = 0.001$; Fig. 2).

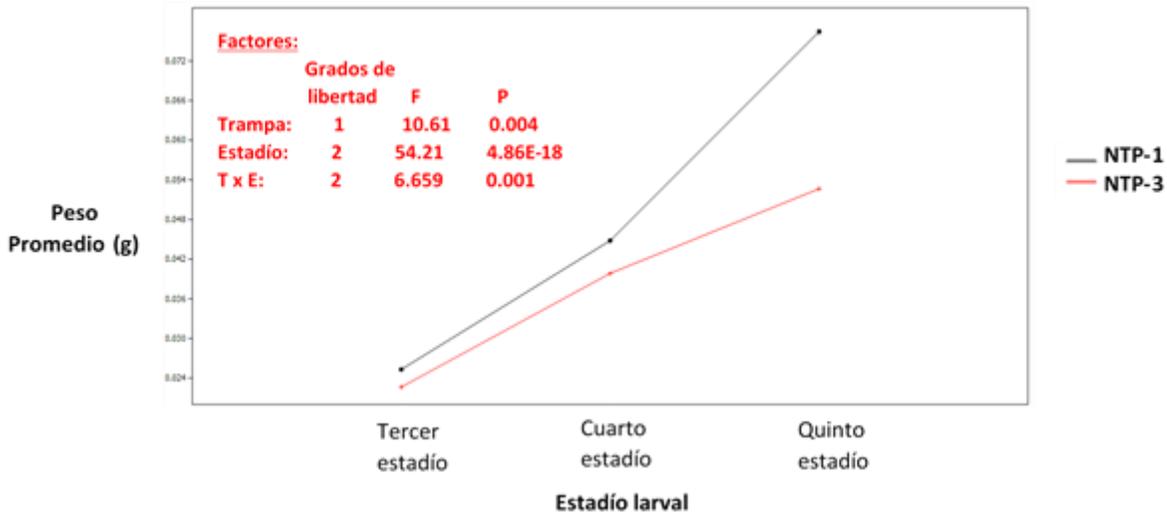


Figura 2. Diferencias en peso promedio de las larvas de *Dermestes maculatus* entre estadios larvales (considerando por separado a las necrotrampas NTP-1 y NTP-3).

De manera análoga, al realizar la cuantificación del ADN humano extraído del tubo digestivo de las larvas se detectaron diferencias significativas tanto entre necrotrampas como entre estadios ($F_{\text{trampa}}=4.647$, $p=0.044$; $F_{\text{estadio}}=7.625$, $p=0.003$; $F_{\text{trampa} \times \text{estadio}}=4.091$, $p=0.034$; Fig. 3), obteniéndose mayores cantidades de ADN humano a partir de larvas en el cuarto estadio, inclusive de un solo individuo, y más aún cuando dichas larvas provenían de la NTP-1.

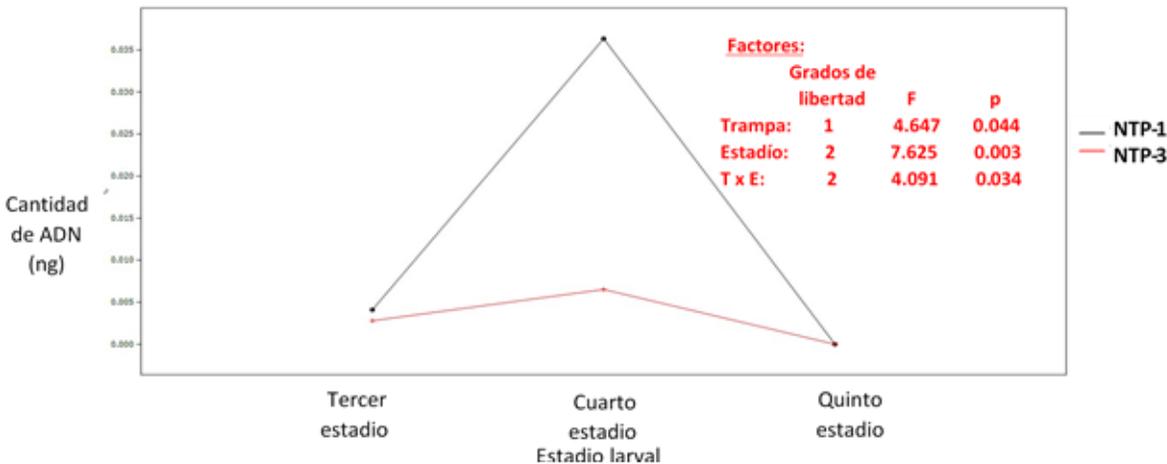


Figura 3. Diferencias en cantidad de ADN humano extraído del tubo digestivo de las larvas de *Dermestes maculatus* entre estadios larvales (considerando por separado a las necrotrampas NTP-1 y NTP-3).

Aunque la NTP-3 contenía mayor cantidad de músculo, las larvas de *D. maculatus* se desarrollaron mejor en la NTP-1, que contenía una proporción más equilibrada de músculo y tejido adiposo (50 % de cada uno), y sólo tejido adiposo no permitió el desarrollo de derméstidos. Se ha documentado que el consumo de ácidos grasos libres reduce el crecimiento de las larvas de *D. maculatus*, pero también que estas larvas requieren un recurso de 22-dehidrocolesterol para un crecimiento exitoso y no es necesaria la exigencia de otros esteroides (Woodcock *et al.*, 2013). Otro punto relevante es que los miocitos o células del músculo al ser plurinucleados poseen más información genética que la célula grasa o adipocito, la cual sólo posee un núcleo en su periferia (Teijón *et al.*, 2006). En el quinto estadio larvario no se logró obtener suficiente cantidad de ADN humano para la determinación de un perfil, lo que sugiere que una mayor talla y peso larvarios no necesariamente se correlacionan con mayor éxito en la extracción del ADN humano de su tubo digestivo.

Se pudo amplificar ADN humano del tracto digestivo a partir de una sola larva de *D. maculatus* en el cuarto estadio, así como la obtención de un perfil genético humano masculino completo con ambos kits (Fig. 4), encontrando concordancia alélica en todos los marcadores genéticos analizados (Cuadro 1).

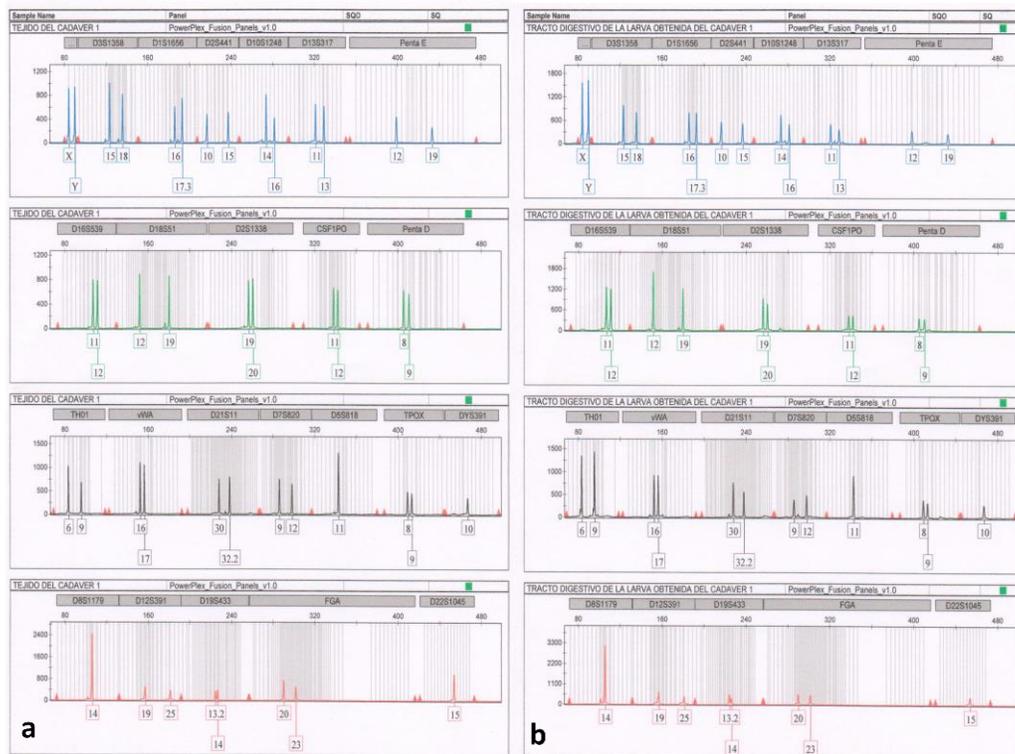


Figura 4. Electroferogramas que muestran el perfil genético del cadáver 1 fresco masculino desconocido comparado con el obtenido de las larvas de *D. maculatus* a partir del kit *PowerPlex® Fusion System*: a) Tejido control; b) Tracto digestivo de la larva de *Dermestes maculatus*.

Estos resultados sugieren que el tejido ingerido por las larvas de *D. maculatus* es útil para la obtención de un perfil genético. Asimismo, el método y tiempo de conservación en congelación no fue un factor que afectara la extracción y cuantificación del ADN humano, ya que independientemente del tiempo de conservación se obtuvieron resultados similares en todas las extracciones. Linville *et al.* (2004) obtuvieron mayor cantidad de ADN humano tanto nuclear como

mitocondrial al congelar las larvas de dípteros en comparación con otros métodos comunes de preservación (etanol, solución de Kahle y/o formaldehído), mientras que DiZinno *et al.* (2002) lograron obtener una cantidad suficiente de ADN humano de larvas de coleópteros al congelarlas con la cual posteriormente obtuvieron un perfil genético.

Cuadro 1. Comparación de los perfiles genéticos obtenidos de la muestra del tejido control (Cadáver 1) y de la larva de *Dermestes maculatus* mediante el kit PowerPlex® Fusion System.

Locus	Tejido control (Cadáver)	Larva
Amelogenina	XY	XY
D3S1358	15,18	15,18
D1S1656	16,17.3	16,17.3
D2S441	10,15	10,15
D10S1248	14,16	14,16
D13S317	11,13	11,13
Penta E	12,19	12,19
D16S539	11,12	11,12
D18S51	12,19	12,19
D2S1338	19,20	19,20
CSF1PO	11,12	11,12
Penta D	8,9	8,9
TH01	6,9	6,9
vWA	16,17	16,17
D21S11	30,32.2	30,32.2
D7S820	9,12	9,12
D5S818	11,11	11,11
TPOX	8,9	8,9
DYS391	10,10	10,10
D8S1179	14,14	14,14
D12S391	19,25	19,25
D19S433	13.2,14	13.2,14
FGA	20,23	20,23
D22S1045	15,15	15,15

CONCLUSIÓN

Se pudo amplificar ADN humano del tracto digestivo de las larvas de *D. maculatus* (Coleoptera: Dermestidae) en cantidad y calidad suficiente para obtener un perfil genético masculino tanto autosómico como de cromosoma Y. Esto pudo lograrse inclusive a partir de una sola larva, siempre y cuando correspondiera al cuarto estadio y hubiera proveniendo de la trampa con igual proporción de tejido muscular y adiposo. El efecto del peso en la obtención de ADN humano no fue tan claro, siendo las variables más relevantes para el éxito en la obtención de un perfil el estadio al que pertenece la larva y el tipo de tejido del cual se alimentó.

Literatura citada

- Butler, J. M. 2010. *Fundamentals of forensic DNA typing*. Academic Press, Burlington, Massachusetts. 519 p.
- Charabidze, D., Colard, T., Vincent, B., Pasquerault, T. and V. Hedouin. 2013. Involvement of larder beetles (Coleoptera: Dermestidae) on human cadavers: a review of 81 forensic cases. *International Journal of Legal Medicine*, 128: 1021–1030.
- DiZinno, J. A., Lord, W. D., Collins-Morton, M. B., Wilson, M. R. and M. L. Goff. 2002. Mitochondrial DNA sequencing of beetle larvae (Nitidulidae: *Omosita*) recovered from human bone. *Journal of Forensic Sciences*, 47: 1337–1339.

- Hammer, Ø., Harper, D. A. T. and P. D. Ryan. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4: 1–9.
- Háva, J. 2004. World keys to the genera and subgenera of Dermestidae (Coleoptera), with descriptions, nomenclature and distributional records. *Acta Musei Nationalis Pragae, Series B, Natural History*, 60: 149–164.
- Linville, J. G., Hayes, J. and J. D. Wells. 2004. Mitochondrial DNA and STR analyses of maggot crop contents: Effect of specimen preservation technique. *Journal of Forensic Sciences*, 49: 341–344.
- Morón, M. A. y R. Terrón. 1984. Distribución altitudinal y estacional de los insectos necrófilos en la Sierra Norte de Hidalgo, México. *Acta Zoológica Mexicana, (n. s.)*, 3: 1–47.
- Rees, B. E. 1947. Taxonomy of the larvae of some North American species of the genus *Dermestes* (Coleoptera: Dermestidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 49: 1–20.
- Teijón, J. M., Garrido, A., Blanco, D., Villaverde, C., Mendoza, C. y J. Ramírez. 2006. Fundamentos de bioquímica metabólica. Segunda edición. Editorial Tébar, Madrid. 386 p.
- Von Hoermann, C., Ruther, J., Reibe, S., Madea, B. and M. Ayasse. 2011. The importance of carcass volatiles as attractants for the hide beetle *Dermestes maculatus* (De Geer). *Forensic Science International*, 212: 173–179.
- Woodcock, L., Gennard, D. and P. Eady. 2013. Egg laying preferences and larval performance in *Dermestes maculatus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 148: 188–195.
- Zehner, R., Amendt, J. and R. Krettek. 2004. STR typing of human DNA from fly larvae fed on decomposing bodies. *Journal of Forensic Sciences*, 49: 337–340.