

Uso de evidencia genética en la investigación del tráfico ilegal de reptiles en Colombia. Reporte de caso.

Use of genetic evidence in the investigation of illegal reptile trafficking in Colombia. Case Report.



Yurby Lailiny Robles González ^{1*}: <https://orcid.org/0000-0002-7903-8153>
Diego Alejandro Ussa Pérez ¹: <https://orcid.org/0000-0001-8989-452X>
Carlos Miguel del Valle Useche ¹: <https://orcid.org/0000-0003-1973-0444>



¹Policía Nacional de Colombia; Dirección de Investigación Criminal e INTERPOL; Laboratorio de Identificación Genética Forense de Especies Silvestres; Bogotá, Colombia.

*Correspondencia a: yurby.robles@correo.policia.gov.co

RESUMEN

Justificación: En Colombia, el comercio de especies de fauna silvestre sin la documentación necesaria es prohibido por ley, por lo que, en el contexto de una investigación penal sobre venta de reptiles a través de internet, como parte de una diligencia de allanamiento y registro, se realizó el procesamiento del lugar de los hechos. **Objetivo:** realizar la asignación taxonómica más probable utilizando análisis genético en muestras biológicas recolectadas del lugar de los hechos para establecer la presencia de reptiles, dada la ausencia de animales en el momento del allanamiento. **Métodos:** se recolectaron seis muestras biológicas que incluyeron un trozo de muda de piel, hisopados de superficies y materia fecal, para su posterior procesamiento siguiendo los protocolos de análisis establecidos. Se realizó extracción de ADN empleando sílice y se amplificó un marcador mitocondrial 12S-120pb; los fragmentos resultantes fueron secuenciados y las secuencias fueron comparadas con la información disponible en la base de datos Genbank mediante el algoritmo BLASTn. **Resultados y discusión:** a partir de los datos obtenidos de la comparación realizada, 100% de cobertura y 100% de identidad y tras analizar las características de cada grupo taxonómico y la información genética disponible se realizó la asignación taxonómica. En la muestra de muda de piel se

PALABRAS CLAVE

Taxonomía molecular, ADN mitocondrial, Genética Forense, Tráfico, Animales silvestres.

KEYWORDS

Molecular Taxonomy, Mitochondrial DNA, Forensic Genetics, Trafficking, Wild animals.

CITAR COMO

Robles González Y, Ussa Pérez D, Del Valle Useche C. Uso de evidencia genética en la investigación del tráfico ilegal de reptiles en Colombia. Reporte de caso. Rev. cienc. forenses Honduras. 2022;8(2):29-35.
doi:10.5377/rcfh.v8i2.15970

HISTORIA DEL ARTÍCULO

Recepción: 07-02- 2023

Aprobación: 10-02- 2023

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERÉS, RELACIONES Y ACTIVIDADES FINANCIERAS O COMERCIALES

Ninguna

encontró dificultad para la amplificación y secuenciación de todo el fragmento, lo que limitó el empleo de marcadores de mayor tamaño, sin embargo, a partir de la información obtenida se logró la identificación de la especie *Boa constrictor* (boa común); en el caso de la materia fecal y los hisopados se determinó la presencia de muestras provenientes de grupos taxonómicos comúnmente empleados para alimentación de algunas especies de reptiles, como *Mus musculus* (ratón común) y el género *Rattus* (especies de ratas). **Conclusión:** El marcador mitocondrial 12S-120pb empleado en este caso resultó exitoso para la obtención de secuencias a partir de muestras forenses, sin embargo, la utilización de cualquier marcador para la asignación taxonómica depende en gran medida de la información disponible y las características propias de cada grupo taxonómico.

ABSTRACT

Introduction: In Colombia, the wildlife species trade without the necessary documentation is banned by law, so in the context of a criminal investigation into the sale of reptiles over the Internet, as part of a search procedure, the scene was processed. **Objective:** To make the most probable taxonomic assignment using genetic analysis in biological samples collected from the scene to establish the presence of reptiles, given the absence of animals at the time of the search. **Methods:** Six biological samples, including a skin shedding, surface swabbing and fecal samples were collected for their subsequent processing in the laboratory following the established analysis protocols. DNA extraction was performed using a silica-based DNA isolation method and a 12S-120bp mitochondrial marker was amplified; the resulting fragments were sequenced and the sequences were compared with the information available in the Genbank database using the BLASTn algorithm. **Results and discussion:** Based on the data obtained from the comparison, 100% coverage and 100% identity, and after analyzing the characteristics of each taxonomic group and the available genetic information, the taxonomic assignment was made. In the skin shedding sample, difficulties were found for the amplification and sequencing of the entire fragment, which limited the use of larger markers, however, from the information obtained, the species identification for *Boa constrictor* (common boa) was achieved; In the case of feces samples and swabbing, the presence of DNA from

taxonomic groups commonly used for feeding some reptile species such as *Mus musculus* (common house mouse) and the genus *Rattus* (rat species) was determined. **Conclusion:** The 12S-120bp mitochondrial marker used in this case was successful for obtaining sequences from forensic samples; however, the use of any marker for taxonomic assignment depends largely on the information available and the characteristics of each taxonomic group.

INTRODUCCIÓN

Los crímenes contra la vida silvestre, se han convertido en un negocio global muy lucrativo y ampliamente distribuido, con un valor de comercio ilegal estimado entre 7 y 23 billones de dólares por año¹, favoreciendo la pérdida de biodiversidad, el empeoramiento de la crisis climática y la diseminación de enfermedades zoonóticas. En lo que respecta al tráfico y la comercialización ilegal, el panorama es cada vez más complejo, considerando el aumento de la demanda, la captura múltiple y el uso de la misma especie en diferentes mercados². El empleo de metodologías basadas en el análisis de ADN, particularmente marcadores de ADN mitocondrial, abrió la posibilidad para la identificación de productos o subproductos de origen biológico en los diferentes contextos de crímenes contra la vida silvestre³, sin embargo, debido a la gran cantidad de organismos, la limitada información en bases de datos y las distintas aplicaciones de esta metodología, su uso abarca diferentes tópicos que deben ser evaluados para cada marcador a emplear, cumpliendo a cabalidad con criterios de estandarización y validación que garanticen la admisibilidad de las pruebas en el contexto judicial⁴.

En Colombia el comercio de especies de fauna silvestre es prohibido por ley⁵, el caso que presentamos, corresponde a una investigación penal llevada a cabo por la Policía Nacional de Colombia en la Dirección de Protección y Servicios Especiales, sobre la venta de reptiles

a través de internet; como parte de una diligencia de allanamiento y registro ⁶, para la cual se solicitó el apoyo de peritos del Laboratorio de Identificación Genética Forense de Especies Silvestres de la Dirección de Investigación Criminal e INTERPOL para la toma de muestras biológicas durante el procesamiento del lugar de los hechos, el posterior análisis genético y la respectiva asignación a categoría taxonómica. Se recolectaron seis muestras biológicas que incluyeron dos hisopados de la superficie de un terrario, tres muestras de materia fecal y un trozo de muda de piel, para su posterior procesamiento, con el propósito de asignarlas a una categoría taxonómica.

MÉTODOS

Toma de muestras

La toma de muestras se llevó a cabo durante el procesamiento del lugar de los hechos (**Figura 1**), por personal experto en la recolección de evidencia traza de origen biológico del Laboratorio de Identificación Genética Forense de Especies Silvestres, siguiendo los protocolos establecidos ⁷.

Extracción

El ADN de las muestras recolectadas fue aislado empleando un método de extracción casero usando sílice, adaptado de lo descrito por Hoyos y Cols. ⁸, los buffers de unión y elución registrados en la metodología de referencia fueron reemplazados por los buffers QG y EB de la casa comercial QIAGEN®, respectivamente. El volumen de elución final fue de 25µL.

Amplificación

Se amplificó un fragmento del 12S mitocondrial 12S-120pb a partir de 2µl de cada uno de los extractos de ADN obtenidos, en volumen total de 25µL, incluyendo master mix 1X One Taq HS® (BioLabs), BSA 0,2 mg/mL, 0,1 µM de los cebadores (Iden_12SL1† 5'CAGGAAACAGCTATGACCGGATTAGATACCCAC TATGC-3' e Iden_12SH1† 5'TGTAAAACGACGGCCAGTATCGATTATAGAACAGG CTCC-3') (9) y 0,5 µM de los cebadores M13REV 5'CAGGAAACAGCTATGACC-3' y M13- 21 5'TGTAAAACGACGGCCAGT-3' ⁹, con un protocolo

de ciclaje que incluye una fase de denaturación de 2 minutos a 94°C, 5 ciclos de 30s a 95°C, 30s a 50°C y 20s a 72°C, seguidos de 35 ciclos de 30s a 95°C, 30s a 56°C y 20s a 72°C, seguido de una extensión de 5min a 72°C ¹⁰.

Los productos de amplificación fueron verificados en geles de agarosa al 2%.

Secuenciación

De cada producto amplificado 2µL fueron secuenciados en un equipo analizador genético ABI 3500® a volumen final de 10µL, con 2µL de BigDye Terminator Sequencing Buffer (5x)®, 1µL de BigDye

Terminator ready reaction mix® y los cebadores M13 registrados previamente a concentración de 1,0 µM, con protocolo de ciclaje de 1 minuto a 96°C, 15 ciclos de 10s a 96°C, 5s a 50°C y 75s a 60°C, 15 ciclos de 10s a 96°C, 5s a 50°C y 1min 45s a 60°C, seguidos de 5 ciclos de 10s a 96°C, 5s a 50°C y 2min 45s a 60°C ¹⁰.

Edición de secuencias y comparación con bases de datos

Las secuencias obtenidas fueron analizadas empleando los programas CodonCode Aligner ¹¹ y Bioedit versión 7.2.5 ¹², y posteriormente comparadas con la

“
Los crímenes contra la vida silvestre, se han convertido en un negocio global muy lucrativo y ampliamente distribuido. El análisis de ADN, particularmente el mitocondrial, abre la posibilidad para la identificación de productos o subproductos de origen biológico en los diferentes contextos de crímenes contra la vida silvestre.
”



Figura 1: fotografía recolección de muestra 01, fragmento de muda de piel.

información disponible en la base de datos Genbank¹³ mediante el algoritmo BLASTn¹⁴.

La identificación de especie se basa en que la variación entre los organismos de una especie sea menor a la variación entre los organismos de especies diferentes, lo que se conoce como “barco de gap”¹⁵, sin embargo, cuando se presenta sobrelapamiento la asignación taxonómica se debería reportar a categoría supra específica como género o familia¹⁶,¹⁷, y para la emisión de los resultados se podrá hacer uso los reportes arrojados tras la comparación con la base de datos de referencia, la disponibilidad de secuencias intra e inter grupo, la presencia de polimorfismos diagnósticos, las características taxonómicas asociadas y la distribución geográfica de las especies involucradas⁹.

RESULTADOS

De las seis muestras analizadas tres generaron resultados inconcluyentes debido a la calidad deficiente de la secuencia obtenida, las demás muestras presentaron amplificación exitosa y secuencias aptas para análisis, como se muestra en la **Figura 2**, entre las cuales se pudo identificar una especie de reptil propia de la biodiversidad colombiana. En el **Cuadro 1** se registra la asignación

Cuadro 1. Asignación a categoría taxonómica por muestra

Muestra	Asignación taxonómica
Muestra 01: fragmento de muda de piel	Especie: <i>Boa constrictor</i>
Muestra 03: materia fecal	Especie: <i>Mus musculus</i>
Muestra 05: hisopado de superficie	Género: <i>Rattus</i>

Fuente: Autores

taxonómica para cada muestra.

Para la muestra 01: fragmento de piel, se obtuvo 100% de cobertura y 100% de identidad, con una secuencia registrada como proveniente de un organismo de la especie *Boa constrictor*, los porcentajes de identidad con cobertura del 100%, con secuencias de individuos de la familia *Boidae* y otros grupos taxonómicos, son inferiores a 90.30%, por lo tanto, la asignación taxonómica más probable es como perteneciente a la especie *Boa constrictor*.

Para la muestra 03: materia fecal, se obtuvo 100% de cobertura y 100% de identidad, con secuencias registradas como provenientes de organismos de la especie *Mus (Mus) musculus* (ratón casero común, única especie del género ampliamente distribuida a nivel global). Los porcentajes de identidad con cobertura del 100%, con secuencias de otras especies del mismo sub género (*Mus*) y otros grupos taxonómicos son inferiores a 99,07%, por lo tanto, la asignación taxonómica más probable para la muestra es como perteneciente a la especie *Mus musculus*.

Para la muestra 05: hisopado de superficie, se obtuvo 100% de cobertura y 100% de identidad, con secuencias registradas como provenientes de organismos de la especie *Rattus norvegicus* (rata de alcantarilla o rata noruega común) los porcentajes de identidad con cobertura del 100%, con secuencias de otras especies del mismo género y otros grupos taxonómicos son inferiores a 98,09%, sin embargo, no todas las especies del género están representadas en la base de datos y más de una especie se encuentra ampliamente distribuida a nivel global, por lo tanto, la asignación taxonómica más probable es como perteneciente al género *Rattus*.

DISCUSIÓN

La asignación taxonómica de evidencia producto de crímenes contra la vida silvestre, a través de técnicas de biología molecular depende de varios factores:

1. De la intervención de personal experto en el procesamiento del lugar de los hechos, lo cual es fundamental. Las muestras biológicas deben ser adecuadamente recolectadas, embaladas y conservadas, esto con el propósito de preservar el

material genético presente, evitando contaminación con fuentes exógenas o productos que ocasionen inhibición¹⁸, de tal manera que sean apropiadas para los análisis moleculares.

2. En el caso de evidencia traza o subproductos, donde la cantidad de ADN recolectado puede ser escaso o estar altamente degradado, el uso de marcadores moleculares cortos es necesario¹⁹.

3. La disponibilidad de secuencias en las bases de datos de ADN es indispensable para lograr la correcta asignación²⁰; mientras más grande sea un grupo taxonómico la posibilidad de contar con información de todas o la mayoría de las especies es menor, y con ello, también disminuye la resolución en la asignación del espécimen.

4. Cuando se usa ADN mitocondrial para la identificación taxonómica, es importante tener en cuenta que los procesos biológicos como la heteroplasma, la poliploidía, la introgresión, la hibridación, las copias nucleares de los genes mitocondriales (NUMT) y la clasificación incompleta del linaje pueden causar problemas de interpretación y por ende en la generación de informes⁴.

En ninguna de las muestras procesadas en el presente caso, se evidenció contaminación, lo que indica una correcta recolección de evidencia; el marcador empleado con un tamaño de aproximadamente 120 pb, permitió obtener resultados en tres de las seis muestras procesadas, lo cual demuestra:

- 1.-Su rendimiento en muestras degradadas o escasas.
- 2.-La eficiencia del marcador para ser empleado como tamizaje en muestras de origen desconocido.
- 3.-La efectividad en la asignación probable a un grupo taxonómico.

Considerando que se trata de pruebas forenses, la simple coincidencia NO debe ser empleada para realizar el reporte, es recomendable revisar la veracidad de la información respecto a la coincidencia (información publicada, coincidencia intra especie, etc.); características de grupo

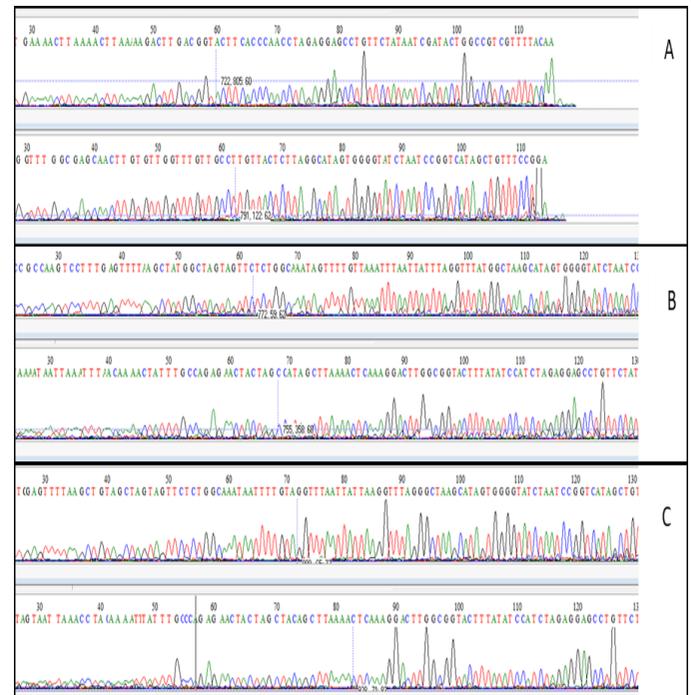


Figura 2: Secuencias obtenidas en programa Bioedit versión 7.2.5. electroferogramas complementarios 5'-3' y 3'-5' de las muestras. **A.-** muestra muda de piel. **B.-** materia fecal. **C.-** hisopado de terrario.

taxonómico tales como el número de especies que lo componen y disponibilidad de secuencias de estas, entre otros; en caso de no contar con la información suficiente o de ser contradictoria, es pertinente realizar la asignación a la categoría taxonómica jerárquica previa, de la que se tenga certeza (género, familia).

Los resultados brindaron la evidencia necesaria para demostrar la presencia de reptiles en el lugar inspeccionado y con ello la posibilidad de establecer una conducta punible, así mismo, permitieron dar a conocer la capacidad del laboratorio tanto en la toma de muestras como en el análisis molecular de muestras forenses.

En Latinoamérica son muy pocos los laboratorios forenses dedicados a la identificación de especies diferentes a la humana, a pesar de que en esta se encuentran varios de los países con la mayor biodiversidad del mundo, por lo que resulta necesario aunar esfuerzos que permitan la

consolidación de información y la estandarización en los procesos contribuyendo a la investigación efectiva de los delitos contra la vida silvestre.

El caso reportado muestra la capacidad que tiene el ADN como herramienta forense para la identificación de especies silvestres de interés, facilitando la protección de la biodiversidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- United Nations Environment Programme. The rise of environmental crime: a growing threat to natural resources peace, development and security. [Internet]. Nairobi: UNEP; 2016. [citado 12 mayo 2022]. Disponible: <https://wedocs.unep.org/handle/20.500.11822/7662;jsessionid=3B92AC8047733F1979B4C3CFDDC88BB4>
- 2.-United Nations Office on Drugs and Crime. World Wildlife Crime Report 2020: Trafficking in Protected Species. [Internet]. New York: UNODC;2020. [citado 12 mayo 2022]. Disponible en: https://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/wildlife/2020/World_Wildlife_Report_2020_9July.pdf
- 3.-Linacre A, Tobe SS. An overview to the investigative approach to species testing in wildlife forensic science. *Investig Genet* 2 [Internet]. 2011 [citado 12 mayo 2022];2. Disponible: <https://doi.org/10.1186/2041-2223-2-2>. Disponible: <https://investigativegenetics.biomedcentral.com/articles/10.1186/2041-2223-2-2#citeas>
- 4.- Meiklejohn KA, Burnham-Curtis MK, Straughan DJ, Giles J, Moore MK. Current methods, future directions and considerations of DNA-based taxonomic identification in wildlife forensics. *Forensic Sci Int Anim Environ* [Internet]. 2021 [citado el 21 de marzo de 2023];1(100030):100030. Doi <https://doi.org/10.1016/j.fsiae.2021.100030>. Disponible: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666937421000299>
- 5.-Colombia. Congreso Nacional. Ley 2111 de 2021; De los delitos contra los recursos naturales y el medio ambiente. Diario Oficial No.51.750. [Internet]). 29 de Julio de 2021 [citado 12 mayo 2022]. Disponible en: http://www.secretariasenado.gov.co/senado/basic/oc/ley_2111_2021.html
- 6.-Colombia. Congreso Nacional. Código de Procedimiento Penal [CPP]. Ley 906 de 2004. Artículo 219. 31 de agosto de 2004 [Internet]. Colombia: Congreso; 2004. [citado 23 mayo 2022]. Disponible en: http://www.secretariasenado.gov.co/senado/basic/oc/ley_09060_204a.html
- 7.- Policía Nacional de Colombia. Dirección de Investigación Criminal e INTERPOL. Documento Interno N° 2DC-GU-0053 manual de toma de muestras biológicas de especies silvestres con fines de identificación. Colombia: Laboratorio de Identificación Genética Forense de Especies Silvestres; 2019.
8. Hoyos M, Tusso S, Bedoya TR, Manrique Gaviria AS, Bloor P. A simple and cost-effective method for obtaining DNA from a wide range of animal wildlife samples. *Conserv Genet Resou* [Internet]. 2017[citado 23 marzo 2022];9(4):513–21. Doi <https://doi.org/10.1007/s12686-017-0735-z>. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/316215222_A_simple_and_costeffective_method_for_obtaining_DNA_from_a_wide_range_of_animal_wildlife_samples
9. Messing J. New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol* [Internet]. 1983[citado 23 marzo 2022];101:20–78 Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0076687983010058>
10. Policía Nacional de Colombia Dirección de Investigación Criminal e INTERPOL. Documento Interno N°2DC-GU-0073 Métodos para el análisis de muestras biológicas en el laboratorio de identificación genética forense de especies silvestres. Colombia: Laboratorio de Identificación Genética Forense de Especies Silvestres; 2019.
11. Codon Code Corporation. (2015). Codon Code Aligner (versión 6.0.2). Disponible en: <https://www.codoncode.com/aligner/>.

12. Hall TA. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT.[Internet]. 1999. Nucleic Acids Symposium Series, 41, 95-98. [citado 12 abril 2022]. Disponible en: <https://bioedit.software.informer.com/Descargar-gratis/>.
13. Sayers EW, Bolton EE, Brister JR, Canese K, Chan J, Comeau DC, et al. Database resources of the national center for biotechnology information. Nucleic Acids Res [Internet]. 2022[citado 12 abril 2022];50(D1):D20–6. doi: 10.1093/nar/gkab1112.. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8728269/>
14. Madden T. The BLAST Sequence Analysis Tool. In: McEntyre J, Ostell J, editors. The NCBI Handbook [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2002. [citado 12 abril 2022]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21097/>
15. Meyer CP, Paulay G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. PLoS Biol [Internet]. 2005[citado 12 abril 2022];3(12):e422 3: e422. doi:10.1371/journal.pbio.0030422. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1287506/>
16. Chapple DG, Ritchie PA. A retrospective approach to testing the DNA barcoding method. PLoS One [Internet]. 2013[citado 12 abril 2022];8(11):e77882. Doi: 10.1371/journal.pone.0077882. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/258639108_A_Retrospective_Approach_to_Testing_the_DNA_Bar_coding_Method.
17. Meier R, Zhang G, Farhan A, The Use of Mean Instead of Smallest Interspecific Distances Exaggerates the Size of the “Barcoding Gap” and Leads to Misidentification, Systematic Biology [Internet]. 2008 [citado 12 abril 2022];57(5):809–813. Doi <https://doi.org/10.1080/10635150802406343>. Disponible: <https://academic.oup.com/sysbio/article/57/5/809/1619912>
18. van Oorschot RAH, Meakin GE, Kokshoorn B, Goray M, Szkuta B. DNA transfer in forensic science: Recent progress towards meeting challenges. Genes (Basel) [Internet]. 2021[citado 12 abril 2022];12(11):1766. doi: 10.3390/genes12111766. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8618004/>
19. Darren Y, Amrita S, Rudolf M. Mini-barcodes are equally useful for species identification and more suitable for large-scale species discovery in Metazoa than full-length barcodes. bioRxiv 594952 [Pre print] 2019. [citado 14 marzo 2022]. doi: <https://doi.org/10.1101/594952>. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/594952v4.full>.
20. Conde-Sousa E, Pinto N, Amorim A. Reference DNA databases for forensic species identification: Auditing algorithms. Forensic Sci Int Genet Suppl Ser. [Internet].2019[citado 12 abril 2022];7(1):564–6. doi: 10.1016/j.fsigss.2019.10.091. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1875176819301490>.