REVISTA MEDICINA LEGAL DE COSTA RICA Vol. 37 (2) Septiembre 2020

REVISTA MEDICINA LEGAL DE COSTA RICA

ISSN 2215-5287

Original Research

Investigación Original

Identificación molecular de Dípteros de importancia forense con el gen (COI Barcode), La Paz Bolivia

Molecular identification of Diptera of forensic importance with the gene (COI Barcode), La Paz Bolivia

Emma Torres Tola[1], Pamela Castillo Vega[2]& Andree Bernal Calderón[3]

[1] Bioquímica, M. Sc., Investigador, Universidad Policial "Mcal. Antonio José de Sucre" cingen@iitcup.org
[2] Médico cirujano, M. Sc. Medicina Legal, Docente Investigador, Universidad Pública de El Alto. medlegiscastillo@gmail.com,
[3] Oficial de Policía, M. Sc., Investigador, Universidad Policial "Mcal Antonio José de Sucre".

Correspondencia: Dra. Pamela Castillo Vega -- medlegiscastillo@gmail.com

Recibido: 29-06-2020 Aceptado: 01-08-2020

Resumen

Una de las dificultades encontradas es la correcta identificación de insectos asociados a la descomposición cadavérica, por la cual ha llevado a buscar y generar nuevas herramientas en biología molecular que facilitan la determinación de especímenes para la estimación del *Intervalo Post-Mortem* de una forma efectiva y certera a partir de estadios inmaduros; la colecta y taxonomía morfológica de Dípteros se realizaron en primera instancia y posteriormente se utilizó el sistema de Códigos de Barras (COI Barcode) para la identificación molecular de insectos problema por medio del gen mitocondrial COI en cualquier fase del ciclo biológico. Identificando tres especies de adultos con una probabilidad de correspondencia del 100%; los especímenes: *Sarconesia versicolor* de la Familia Calliphoridae y *Fannia sp.,* no fueron hallados en las bases de datos mundiales del GenBank y del Boldsystems, siendo necesario su actualización realizando patrones de sucesión cronológica de fauna cadavérica en diferentes zonas geográficas, cuya práctica se aplicaría en las investigaciones criminales.

Palabras clave

Código de barras, taxonomía molecular, COI y Dípteros

Abstract

One of the difficulties encountered is the correct identification of insects associated with cadaveric decomposition, which has led to the search and generation of new tools in molecular biology that facilitate the determination of specificities for the modification of the Post-Mortem Interval in an effective and accurate from immature stages; the collection and morphological taxonomy of Diptera were made in the first instance and then the Bar Code System (COI Barcode) was used for the molecular identification of

problem insects by means of the mitochondrial COI gene in any phase of the biological cycle. Identifying three species of adults with a probability of 100% correspondence; the specimens: *Sarconesia versicolor* of the *Calliphoridae* Family *and Fannia sp*., were not found in the world databases of the GenBank and the Boldsystems, being necessary to update them by chronological succession patterns of cadaveric fauna in different geographical areas, whose practice would be applied in criminal investigations.

Key words

Bar code, molecular taxonomy, IOC and dipterans

INTRODUCCIÓN.

Los insectos necrófagos y en especial los Dípteros, son de gran interés al ser los principales responsables de la reducción de materia orgánica en descomposición, incluidos los restos cadavéricos[1]. Tienen una asociación directa con la materia orgánica en putrefacción, el estudio de la entomofauna necrófaga es fundamental para la aplicación de la Entomología Forense[2]. Esta disciplina forense es la encargada de examinar la fauna entomológica, con el objetivo de extraer información, para precisar el tiempo, lugar y modo en el que ha tenido lugar un suceso[3].

En Bolivia, se han realizado escasas investigaciones sobre la sucesión de la entomofauna cadavérica, siendo el biomodelo más utilizado el cerdo doméstico (*Sus scrofa*)[4,5,6,7] Los estudios realizados tuvieron el propósito de conocer a los insectos presentes en cadáveres en sus diferentes etapas de descomposición, los de mayor importancia fueron los Dípteros de las familias Calliplioridae, Muscidae y Sarcophagidae, pero no se logró identificar las especies en diferentes etapas de su desarrollo, huevos, larvas, puparium y adultos[8] . Para relacionar las distintas fases de descomposición, así como estimar el tiempo de muerte (*Intervalo Post - Mortem*-IPM), conlleva a la cría de larvas en el laboratorio, recolectar pupas, lo que se traduce a un gasto de tiempo y recursos, debido a que es una labor compleja[8] y que además requiere del conocimiento taxonómico del especialista, confiando a menudo en el reconocimiento de pequeñas variaciones en las características fenotípicas[9] . No obstante las semejanzas morfológicas de las diferentes especies, especialmente en estadios inmaduros, dificulta su identificación y esto ocasiona a generar interés por el desarrollo de nuevas alternativas, que ayuden a resolver estos problemas taxonómicos de manera exacta y certera.

En este sentido, se ha desarrollado técnicas en biología molecular que facilitan la determinación de especies empleando el material genético de los mismos. El estudio del sistema de Códigos de Barras, en insectos, se desarrolla en el análisis del ADNmt que comprende alguna región de los genes que codifican el COI o COII[9]. La obtención de secuencias de ADNmt han sido a partir del Gen COI, este gen es propuesta como Barcode estándar para la mayoría de grupos de animales, es una región de 648 pares de base del gen mitocondrial Citocromo C Oxidasa Sub Unidad 1 (COI), cuya efectividad ha sido demostrada en varios trabajos de identificación de aves, peces, mariposas, moscas, entre otros[10,11]

El gen COI, es de amplio uso para identificar especies de insectos problema[8] en cualquier estadio inmaduro, así como con un simple fragmento de insecto que, en la mayoría de los casos no es tomado en cuenta debido a la dificultad de identificar claves dicotómicas certeras. La identificación taxonómica molecular genética de los insectos necrófagos, permite clasificar al insecto en cualquier estadio del ciclo de vida y a partir de

REVISTA MEDICINA LEGAL DE COSTA RICA

ISSN 2215-5287

cualquier fragmento o estructura o tejido del mismo en un periodo de tiempo. Además de poder clasificarlos a nivel de especies y subespecies.

El objetivo del presente estudio fue de realizar la identificación molecular rápida de la entomofauna cadavérica en diferentes biomodelos para su posterior aplicación en investigaciones criminales.

Es así que el presente estudio examina a la ciencia entomológica desde un punto de vista de la biología molecular moderna como un método complementario en datación de muerte y otros, tratando de contribuir a las instituciones jurídicas del Estado Boliviano, Ministerio Público y Policía Boliviana, a la resolución rápida de la investigación forense evitando de esta manera, la retardación de justicia de cualquier caso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomó muestras de huevos, larvas en diferentes estadios y adultos a partir de los biomodelos (*S. scrofa*, Cerdo domestico), muestras proporcionadas por la Dra. Castillo y el Tte. Bernal, con un intervalo postmordem no mayor a 24 hrs. (Fig. 1), a los cuales se realizó una disección del insecto adulto de cabezas con un peso estimado de 0,17g.

La extracción del material genético se realizó con el sistema Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) de acuerdo al protocolo de Miller[12]. Para la amplificación de Barcode se empleó la pareja de cebadores universales LCO1490 y HCO2198 descritos por Hebert[13] que permiten la amplificación de un fragmento de 709 pb. Para la reacción de PCR se realizó empleando el kit comercial GoTaq® Colorless Master Mix (Promega). Los productos amplificados fueron sometidos a una purificación alcohólica, realizándose posteriormente el PCR desbalanceado empleando el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Este producto fue secuenciado en un Analizador Genético ABI 3500 (Applied Biosystems) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa Sequencing Analysis v.6.0. (Applied Biosystems). Las secuencias se alinearon con el programa Mega 5.1. Las secuencias parciales y completas del gen citocromo oxidasa I (COI) y relacionadas a las especies fueron descargadas del GenBank[14] y del Boldsystems v.3.0.[15]

Cabe mencionar que los árboles filogenéticos fueron construidos a partir de la plataforma bioinformática del Blast Tree View, generados con los repositorios de los datos del Genbank.

Figura 1. Colecta de muestras entomológicas en estadios inmaduros. **Fuente**: Castillo, 2013

REVISTA MEDICINA LEGAL DE COSTA RICA

ISSN 2215-5287

RESULTADOS

El análisis de secuencias incluyó 600 pares de bases correspondientes a la región 3´del gen COI, de donde la identidad de las secuencias se verificó por comparación con la secuencia de referencia de *Ianius mosca*, cuya secuencia se encuentra depositada en GenBank con número de acceso MF130285.1. En total se obtuvieron diez secuencias. Se presenta la clasificación taxonómica molecular de 5 muestras de insectos adultos, observándose en la muestra CG-M3-ENT una probabilidad de correspondencia de especie (P.C.) del 100%, la muestra CG-M5-ENT presenta una P.C. de especie de 99,8% y la muestra CG-M6-ENT tiene una P.C. de especie de 94%. (Tabla 1)

Tabla 1. Resultados de los algoritmos de las bases de datos mundiales BoldSystems y GenBank, Estadio Adulto.
NDB: No Determinado en Bases de Datos Mundiales.

No.	Código CINGEN	Estadio	Nivel Taxonómico	Asignación de Taxón	Probabilidad de Correspondencia (%)
1	CG-M2-ENT	ADULTO	Filo	NDB	NDB
			Clase	NDB	NDB
			Orden	NDB	NDB
			Familia	NDB	NDB
			Género	NDB	NDB
			Especie	NDB	NDB
2	CG-M3-ENT	ADULTO	Filo	Arthropoda	100
			Clase	Insecta	100
			Orden	Diptera	100
			Familia	Calliphoridae	100
			Género	Sarconesia	100
			Especie	Sarconesia	100
3	CG-M4-ENT	ADULTO	Filo	NDB	NDB
			Clase	NDB	NDB
			Orden	NDB	NDB
			Familia	NDB	NDB
			Género	NDB	NDB
			Especie	NDB	NDB
4	CG-M5-ENT	ADULTO	Filo	Arthropoda	100
			Clase	Insecta	100
			Orden	Diptera	100
			Familia	Calliphoridae	100
			Género	Sarconesia	100
			Especie	Sarconesia	99,8
5	CG-M6-ENT	ADULTO	Filo	Arthropoda	100
			Clase	Insecta	100
			Orden	Diptera	100
			Familia	Fanniidae	100
			Género	Fannia	100
			Especie	Fannia sp	94

Fuente: (CINGEN, IITCUP).

REVISTA MEDICINA LEGAL DE COSTA RICA

ISSN 2215-5287

La muestra identificada como CG-M2-ENT (resaltado en amarillo) no fue encontrada en ninguna de las bases de datos del GenBank y del Boldsystems. Sin embargo se encuentra emparentado con secuencias de *Sarconesia chlorogaster* (Fig. 2). La muestra identificada como CG-M4-ENT (resaltado en amarillo) no fue encontrada en ninguna de las bases de datos del GenBank y del Boldsystems. Sin embargo se encuentra relacionado con secuencias de *Sarconesia versicolor* (Fig. 3).

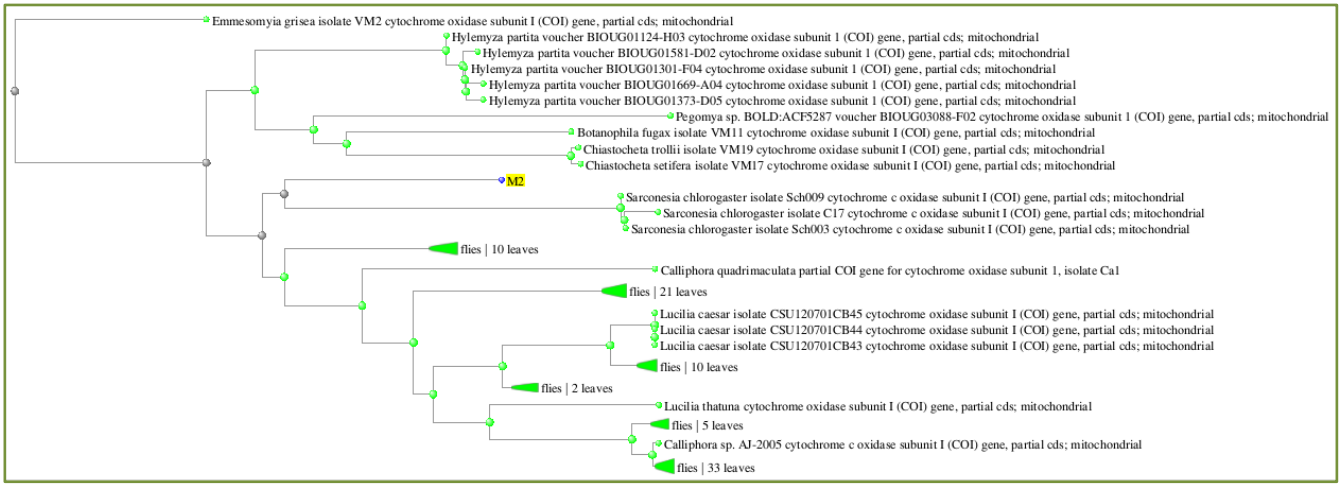

Figura 2. Árbol filogenético de la especie identificada, CG-M2-ENT (resaltado en amarillo), construido con programa Blast Tree View, método de Neighbor Joining (Saitou and Nei 1987) considerando 0.75 de Diferencia máxima de Secuencia y una distancia de Jukes-Cantor (1969). **Fuente**: (GENBANK)

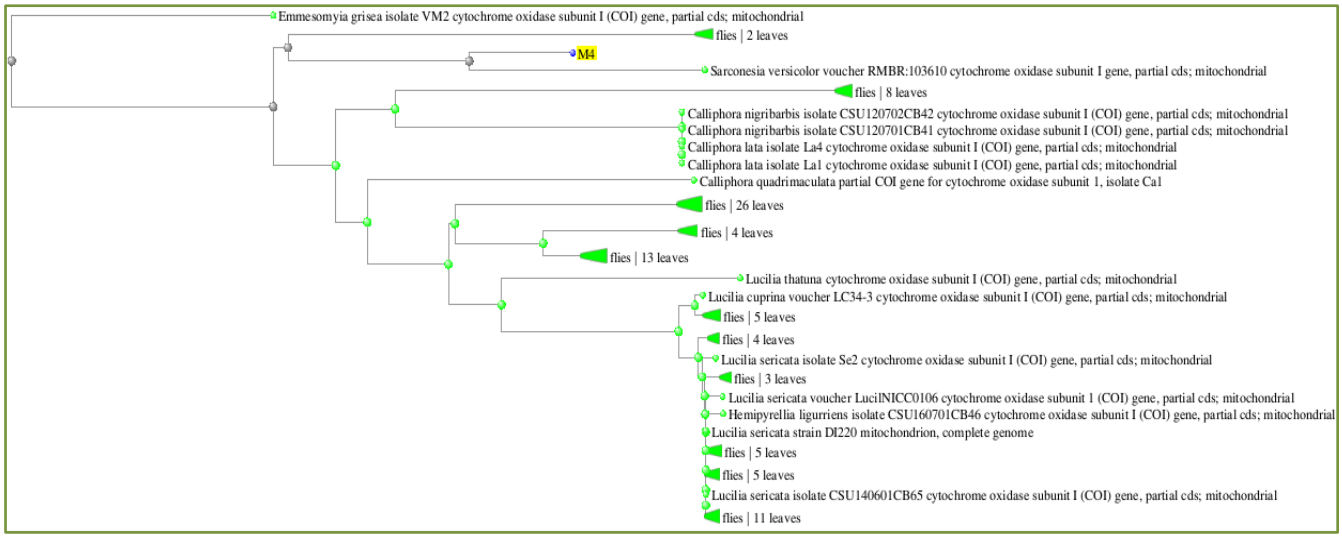

Figura 3. Árbol filogenético de la especie identificada, CG-M4-ENT (resaltado en amarillo), construido con programa Blast Tree View, método de Neighbor Joining (Saitou and Nei 1987) considerando 0.75 de Diferencia máxima de Secuencia y una distancia de Jukes-Cantor (1969).**Fuente**: (GENBANK).

Medicina Legal de Costa Rica

REVISTA MEDICINA LEGAL DE COSTA RICA

ISSN 2215-5287

Se presenta la clasificación taxonómica molecular de las 4 muestras de diferentes estadios inmaduros: huevos, larvas de primer, segundo y tercer estadio. Las muestras de CG-M17-ENT y CG-M19-ENT se observa la P.C. de la especie en un 100% y las muestras CG-M18-ENT y CG-M20-ENT presentan un P.C. de la especie del 99.8%. (Tabla 2)

Tabla 2. Resultados de los algoritmos de las bases de datos mundiales BoldSystems y GenBank, de las diferentes fases del ciclo biológico del insecto

	Código CINGEN	Estadio	Nivel Taxonómico	Asignación de Taxón	Probabilidad de Correspondencia (%)
1	CG-M17-ENT	PRIMER INSTAR	Filo	Arthropoda	100
			Clase	Insecta	100
			Orden	Diptera	100
			Familia	Calliphoridae	100
			Género	Sarconesia	100
			Especie	Sarconesia	100
2	CG-M18-ENT	SEGUNDO INSTAR	Filo	Arthropoda	100
			Clase	Insecta	100
			Orden	Diptera	100
			Familia	Calliphoridae	100
			Género	Sarconesia	100
			Especie	Sarconesia	99,8
3	CG-M19-ENT	TERCER INSTAR	Filo	Arthropoda	100
			Clase	Insecta	100
			Orden	Diptera	100
			Familia	Calliphoridae	100
			Género	Sarconesia	100
			Especie	Sarconesia	100
4	CG-M20-ENT	HUEVO	Filo	Arthropoda	100
			Clase	Insecta	100
			Orden	Diptera	100
			Familia	Calliphoridae	100
			Género	Sarconesia	100
			Especie	Sarconesia	99,8

Fuente: CINGEN, IITCUP

DISCUSIÓN

En vista de que es crucial la identificación de la fauna entomológica cadavérica para ayudar a establecer el IPM en el curso de la investigación de los hechos, la determinación precisa de las especies de las larvas halladas en los cadáveres, así como de las pupas que los rodean es de suma importancia y, pese a la escases de estudios que emplean secuencias de COI para identificar factores de importancia forense[16], los resultados obtenidos del análisis genético de la presente investigación muestra la caracterización taxonómica de cinco especímenes adultos obteniendo una probabilidad de correspondencia igual al 100% en dos muestras y de 99.8% en una muestra (Tabla 1), dos muestras no fueron encontradas en las bases de datos del GenBank y del Boldsystems. En la figura 1, la muestra M2 (resaltado en amarillo) se encuentra en la rama de especímenes *Sarconesia chlorogaster.* No obstante esta secuencia es diferente a los especímenes comparados llevándonos a sugerir una subespecie. En la figura 2, la muestra M4 (resaltado en amarillo),

REVISTA MEDICINA LEGAL DE COSTA RICA

ISSN 2215-5287

secuencia no hallada en las bases de datos internacionales, tiene semejanza a la secuencia de referencia *Sarconesia versicolor.*

Así mismo, se ha logrado realizar el análisis genético de diferentes fases del ciclo biológico del insecto (huevo, instar 1, instar 2 e instar 3), en vista de, que la información específica contenida en la molécula de ADN y en particular en el gen COI, se caracteriza por su inmutabilidad durante todos los cambios del insecto (tabla 2). Las secuencias de COI de cada especie fueron únicas y distinguibles entre sí, aunque mostraron alta homología. Este trabajo puso de manifiesto que la identificación de especies de dípteros inmaduros por análisis de secuencias del ADN resulta sencilla, economiza tiempo al eliminar la necesidad de esperar a la emergencia del adulto y elimina el requerimiento de un conocimiento altamente especializado de claves morfológicas. Además, proporciona información, no sólo del *Intervalo Post-Mortem*, sino también de las condiciones ambientales que rodean a los cuerpos[17].

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, podría concluirse que el uso del Citocromo Oxidasa Subunidad I (COI) como herramienta en la identificación taxonómica se mostró una región de fácil amplificación y secuenciación, que pueden ser utilizadas como complemento en la identificación de dípteros de interés forense, lo que daría un mayor soporte y consistencia a las investigaciones criminales. La metodología utilizada y propuesta por el sistema de identificación universal "ADN Barcode "fue eficiente en la identificación de la mayoría de las especies de la Familia Calliphoridae y Muscidae, objetos de estudio del presente trabajo, sobre todo en la identificación de los especímenes de diferentes fases del ciclo biológicos del insecto.

La presente investigación ha identificado secuencias genéticas del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I, COI (COI Barcode) no incluidos en las bases de datos mundiales de GenBank y Boldsystems, por lo tanto se considera un aporte científico al incorporar nuevos datos al sistema.

Sin embargo su aplicación no estaría completa si no se cuentan con los especímenes identificados en otras épocas del año, y en las distintas regiones geográficas del país para tener una base de datos completa, esta situación obliga a que se realicen más investigaciones tomando en cuenta todas las características mencionadas, para así tener una mejor aplicabilidad por el personal involucrado en investigación judicial: policía, médicos forenses, criminalistas, etc. Y lograr aplicar como pericia de manera eficiente en un marco estrictamente académico y científico.

REFERENCIAS

1. Peralta B, GilArriortua M, Saloña MI. Variabilidad espacial y temporal de Califóridos (Diptera) necrófagos de interés forense capturados en la Comunidad Autónoma del Principado de Asturias (CAPA). Estudio preliminar. Boletín de la Asociación española de Entomología. 2013; 37:301-314.
2. GilArriortua M., Saloña-Bordas M. I., & Pancorbo M. M. Uso de vestigios moleculares en entomología Forense. Ciencia Forense. 2015; 29–72.
3. Greenber B, Kunich JC (eds.). Entomology and the law: Flies as forensic Indicators. Cambridge University Press, Cambridge. 2002

ISSN 2215-5287

4. Sakuma Calatayud, E. Caracterización de entomofauna cadavérica y tiempo de desarrollo larvario en la localidad de Mecapaca La Paz. La Paz Bolivia: tesis de grado. 2005.
5. Chávez Abasto Dorian Sandy, R. A. Investigación de fauna cadavérica de importancia forense y determinación del intervalo posmortem a través del estudio de muestras entomológicas En Cochabamba Bolivia. Rev.Inv.E Info Salud. 2008; 3(7):1-15.
6. Castillo Vega, P. A. Caracterización de la entomofauna asociada a cadáveres de cerdo (*sus scrofa*) fallecidos por lesiones producidas por heridas por arma blanca, en el municipio de Pucarani de la provincia Los Andes del departamento de la Paz-Bolivia, mayo a julio del 2013. Tesis, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, La Paz- Bolivia. 2013
7. Acho. Identificación de la entomofauna cadavérica asociada a la presencia de artrópodos en contexto de valle, localidad de millares municipio de Betanzos departamento de Potosí gestión 2008. Revista de Tecnología y Ciencias de la Salud. Junio 2014 Vol.1 No.1 48-65.
8. Solano J., Castro M. Identificación molecular de califóridos (Diptera: Calliphoridae) de importancia forense en Colombia. Revista Colombiana de Entomología. Julio - diciembre 2013; 39 (2): 281-290.
9. Wells JD, Stevens JR. Molecular methods for forensic entomology, pp. 437-452. Byrd JH, Castner JL (eds.). Forensic entomology: The utility of arthropods in legal investigations. CRC Press, Boca Raton. 2010.
10. Meiklejohn KA, Wallman JF, Dowton M. DNA-based identification of forensically important Australian Sarcophagidae (Diptera). International Journal of Legal Medicine. 2009; 125:27-32.
11. Barcode of life. What Is DNA Barcoding? 2017 Obtenido de http://www.barcodeoflife.org/content/about/what-dna-barcoding.
12. Miller, S., Dykes, D., & Polesky, H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human cells. Nucleid Acid Research.1988; 16(3), 1215.
13. Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & De Waard, J. R. Biological Identifications through DNA Barcodes. Proceedings of the Royal Society B, 270(1512).2003; 313–321. doi:10.1098/rspb.2002.2218,
14. Benson, D., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D., Ostell, J., & Sayers, E. GenBank. Nucleid Acids Research, 41, D36 - D42. 2013; doi:10.1093/nar/gks1195.
15. Ratnasingham, S. and Hebert, P.D.N. BOLD: The Barcode of Life Data System (http://www.barcodinglife.org). Molecular Ecology Notes.2007; 7, 355-364.
16. Zhuang Q., Cai J., Zhang M., Feng H, Guo Y. and Lan L. Molecular indentification of forensically significant beetles (Coleoptera) in China Based on COI gene. Revista Colombiana de Entomol. 2011; gia 37: 95-102.
17. Pancorbo M. de, Ramos R., Saloña M., Sanchez P. Entomología molecular forense. Ciencia Forense.2006; 8:107-130.
18. Boehme P., Amendt J., Zehner R. The use of CoI barcodes for molecular identification of forensically important fly species in Germany. Parasitology Research. 2012; 110: 2325-2332.
19. Hofer, I.M.S., Hart, A.J., Matin-Vega, D. & Hall, M. J. R. Optimising crime scene temperature collection for forensic entomology casework. Forensic Sci Int. 2017 Jan;270:129-138. doi: 10.1016/j.forsciint.2016.11.019. Epub 2016 Nov 17.
20. Morlais I, Severson DW. Complete mitochondrial DNA sequence and amino acid analysis of the cytochrome c oxidase subunit I (COI) from Aedes aegypti. DNA sequence. 2002; 13 (2):123-127.

REVISTA MEDICINA LEGAL DE COSTA RICA

ISSN 2215-5287

21. Wells JD, Wall R, Stevens JR. Phylogenetic analysis of forensically important Luciliaflies based on cytochrome oxidase I sequence: A cautionary tale for forensic species determination. International Journal of Legal Medicine.2007; 121:229-233.

Attribution (BY-NC) - (BY) You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggest the licensor endorses you or your use. (NC) You may not use the material for commercial purposes.