Métodos de recolección y procesado. Metodología de estudios experimentales

Asignatura: **Entomología Forense**

Máster Universitario en Ciencias Forenses

Universidad de Murcia

Material docente elaborado por M.I. Arnaldos, M.D. García y J.J. Presa

Curso 2010-11

ENTOMOLOGÍA FORENSE. Tema: Métodos de recolección y procesado. Metodología de estudios experimentales

CONTENIDOS:

- Principales líneas de investigación en Entomología Médico-legal
- Metodología de los estudios de sucesión sarcosaprófaga
  - Modelo animal
  - Diseño experimental
  - Métodos de preparación y conservación de los ejemplares
- Metodología de los estudios de ciclos vitales de dípteros de interés forense
  - Obtención de ejemplares
  - Mantenimiento de colonias de laboratorio
  - Experimentación
- Métodos moleculares en Entomología médico-legal

OBJETIVOS:

- Conocimiento de las líneas de investigación básicas en Entomología Médico-legal
- Iniciación a los métodos y técnicas d estudio de la fauna cadavérica
- Desarrollo de los métodos de estudio necesarios para el mantenimiento, en condiciones controladas, de colonias estables de insectos
- Discriminación entre las metodología apropiadas para la realización de estudios sucesionales en cadáveres expuestos, enterrados y sumergidos
- Iniciación en las técnicas de biología molecular útiles para la obtención de conclusiones en el ámbito forense

COMPETENCIAS:

- Reconocer las diferentes metodologías empleadas en los estudios de Entomología Forense
- Diseñar estudios experimentales en el ámbito de la Entomología forense.
- Evaluar la viabilidad de realización de estudios en Entomología médico-legal.

SESIÓN PRÁCTICA:

Práctica nº2: Prospección entomológica. Aplicación de métodos experimentales

BARRIENTOS J.A. (ed.) 2004 Curso práctico de Entomología. CIBIO. Universidad de Alicante. Asociación española de Entomología. Servei de Publicacions. Universitat autonoma de Barcelona.

BYRD J.H. & CASTNER J.L. (eds.) 2010. Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations. CRC Press.

CATTS E.P. & HASKELL N.H. 1990. Entomology and Death : A Procedural Guide. Joyce´s Print Shop

SMITH K.G.V. 1986. A Manual of Forensic Entomology. The Trustees of the British Museum (Natural History).

GRASSBERGER M. & REITER C. 2001. Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the isomegalen- and isomorphen- diagram. *Forensic Science International* 120:32-36

REITER C. & WOLLWNEK G. 1983. On the determination of maggots of forensically important blowflies. *Z-rechmed* 90:309-316

WELLS J. & WILLIAMS D.W. 2007 Validation of a DNA-based method for identifying Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae) used in a death investigation. *International Journal of Legal Medecine* 121:1-8.

ZEHNER R., AMENDT J., SCHÜTT S., SAUER J., KRETTEK R. & POVOLNY D. 2004. Genetic identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). *International Journal of Legal Medecine* 118:245-247

http://fcf.unse.edu.ar/pdf/Guia-captura-y-conserv-insectos.pdf
http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/71707.htm
http://edis.ifas.ufl.edu/IG091
http://www.univie.ac.at/forensic-entomology/information.htm

ENTOMOLOGÍA FORENSE Tema: Métodos de recolección y procesado. Metodología de estudios experimentales.

PRINCIPALES LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN EN ENTOMOLOGÍA MEDICO-LEGAL

Las líneas de investigación actuales están encaminadas, en principio, a dilucidar el conocimiento de la fauna artropodiana y secuenciación en las diferentes regiones del planeta, estos trabajos suelen ser realizados en una época determinada del año considerada por el autor como más propicia, pero se hecha en falta por su escasez los trabajos en los que se estudien las 4 estaciones anuales. Estos estudios permiten un conocimiento de la dinámica estacional y de la abundancia individual de las distintas especies en los cadáveres y da una perspectiva global sobre la composición de las especies que forman la comunidad sarcosaprófaga.

A pesar del interés faunístico de estos estudios, no debemos olvidar que la mayoría de los estudios de la comunidad sarcosaprófaga comienzan a realizarse al descubrirse su utilidad práctica forense, especialmente a la hora de determinar los intervalos postmortem. Los insectos son especialmente útiles para la estima del intervalo postmortem en fases tempranas de la descomposición y, según algunos autores, el método más fiable a partir de las 72 horas del fallecimiento. En las fases tempranas de la descomposición el grupo predominante son las larvas de díptero, en este sentido se ha desarrollado toda una línea de investigación que estudia el desarrollo de los ciclos vitales de los dípteros de interés forense a diferentes condiciones de temperatura y humedad relativa.

Por otro lado, existe la posibilidad de detectar opiáceos, toxinas u otras drogas analizando las larvas existentes en el cadáver y ha aumentado el interés en el uso potencial los insectos para detectar ciertas sustancias en tejidos en descomposición. De hecho un factor muy importante a considerar a la hora establecer la data a partir del estado de desarrollo de las larvas de díptero, es la existencia de tóxicos o drogas en los tejidos del cadáver. Estas sustancias pueden alterar el crecimiento normal de las larvas con lo que, de no considerarlos, los resultados se verían alterados. Este conocimiento ha generado otra línea de investigación en Entomología médico-legal denominada Entomotoxicología.

Finalmente, en los últimos años esta aumentando el interés en las técnicas de tipificación de ADN en relación con la Entomología médico-legal. En este sentido se pretende tanto

aumentar la capacidad de identificar determinadas especies de insectos como, a partir de los contenidos estomacales de los insectos carroñeros, asociar insectos con una persona viva o un cadáver, incluso cuando el contacto no ha sido observado.

La lógica indica que los primeros estudios que hay que afrontar son los de tipo faunístico que nos permiten conocer las especies implicadas en la sucesión y las de mayor importancia a efectos forenses. Una vez identificadas las especies de interés pueden comenzarse los estudios de desarrollo de sus ciclos vitales y de tipificación de ADN.

METODOLOGÍA EN LOS ESTUDIOS DE SUCESIÓN SARCOSAPRÓFAGA

Para la realización de este tipo de estudios los factores principales a considerar son el tipo de cebo o modelo animal a utilizar y el modo de recolección y conservación de los ejemplares.

Modelo animal

En relación con el tipo de modelo animal, el ideal es el cadáver humano. Ante la imposibilidad de su utilización, en nuestro entorno, por motivos tanto éticos como morales como legales (en otros continentes si se puede experimentar con cadáveres humanos bajo ciertas circunstancias en las denominadas granjas de cuerpos), se hace necesario la utilización de animales para la realización de estos estudios.

La elección del tipo de cebo y su posible extrapolación a cadáveres humanos ha sido tratado en numerosos trabajos. Existe una gran discrepancia, entre los distintos autores, sobre la validez de un tipo de cebo u otro, y en sustitución del cebo humano se ha utilizado gran diversidad de cebos animales: aves, ratones, cerdos, impalas, elefantes, perros, gatos, reptiles, etc., en todos estos trabajos se justifica de una manera u otra (su parecido en tamaño y forma al cadáver humano o simplemente su oportunidad y facilidad de manejo) la elección del cebo.

Algunos autores opinan que los experimentos llevados a cabo con carroña animal no son necesariamente aplicables a cadáveres humanos, en ese sentido indican que los resultados de los estudios realizados con animales herbívoros u omnívoros se acercan más a la situación real que nos podemos encontrar con cadáveres humanos, que los resultados de los estudios utilizando como cebo animales carnívoros.

El estudio con modelos animales no es un sustituto de las observaciones en cuerpos humanos, en éstas, cuando sea posible, se deben tomar muestras de la fauna existente,

tanto adultos como larvas, incluso aunque se conozca el intervalo postmortem por otros métodos (patológicos o de evidencias circunstanciales). Este conocimiento entomológico puede ser utilizado en otros casos en que el intervalo postmortem no sea conocido de manera exacta, y nos permite acumular gran cantidad de información realmente concluyente. Así, para el conocimiento de la fauna sarcosaprófaga, existen dos vías de investigación principales: el estudio de los ejemplares recogidos directamente en casos forenses y en exhumación de cadáveres y, el estudio de los ejemplares recolectados utilizando modelos animales.

Para la elección del tipo de modelo animal, además de todos los condicionantes anteriores, hay que tener en cuenta las necesidades propias de un trabajo experimental y para ello el modelo animal utilizado debe cumplir los siguientes requisitos:

- Posibilidad de obtención de ejemplares de tamaño uniforme que hagan factible las posibles las repeticiones del experimento, y de un tamaño relativamente grande en los cuales las fases de la descomposición se observarían con mayor claridad.
- Facilidad de manejo y accesibilidad, considerando que en este tipo de estudios se realiza un examen frecuente los restos, este es un factor no desdeñable
- Coste, dada las necesarias repeticiones del experimento, esta circunstancia puede ser en algunos casos, un factor limitante en el diseño de la experimentación.

El cerdo doméstico, esta considerado como el animal más parecido al hombre en cuanto a su similitud en el patrón de descomposición, esto hace que junto a su facilidad de obtención, su relativo bajo coste (al menos en nuestras latitudes) y a que su utilización no despierta controversia en el gran público (como puede ocurrir con perros, gatos...), hacen que sea el animal mas utilizado en este tipo de experimentos.

Sin embargo hemos de añadir una objeción a la utilización de este cebo, su tipo de piel y panículo adiposo. El cerdo de manera general presenta un tipo de piel mucho más gruesa que la humana, dado que uno de los lugares de puesta preferente de los dípteros en cadáveres humanos son los lugares donde la piel es más fina, el grosor de la piel del cebo es un dato ha tener en cuenta a la hora de hora de extrapolar los datos a cadáveres humanos.

Se ha comprobado que el tamaño de cebo no tiene efecto sobre el patrón de la descomposición y en la composición de la fauna artropodiana aunque sí existen

diferencias en el nivel de la descomposición de los restos en cebos de diferente tamaño. Estas diferencias son más pronunciadas en las fases de descomposición y descomposición tardía, en cambio, los estados tempranos y finales de la descomposición son bastante similares. El tamaño del cadáver está en relación directa con las poblaciones de dípteros y sus masas de larvas. Durante la fase de descomposición éstas son las responsables de la rápida sustitución de la biomasa. En condiciones naturales el cadáver de mayor tamaño tendrá un número de larvas de mosca mayor que un cadáver más pequeño, dando como resultado una mayor rapidez en el consumo de biomasa. Pero, a pesar de ello, se ha comprobado que los patrones de la sucesión de los artrópodos y sus niveles de desarrollo son suficientemente independientes del tamaño y peso de los restos utilizados.

Para estandarizar los resultados se recomienda la utilización de cebos de talla entre 20-30 kilos.

Otros factores a considerar son el modo de sacrificio del cebo, su modo de conservación hasta el momento de ser utilizado y su estado, intacto o con heridas a la hora de realizar el experimento. Pero, de la misma manera que existen numerosos tipos y estados de modelos animales, el modo de aparición y estado de los cadáveres en los casos forenses es prácticamente infinito y los datos aportados por cualquier tipo de cebo es, en principio, válido y muy interesante.

Diseño experimental

Los estudios de campo de sucesión sarcosaprófaga con utilización de modelos animales están orientados en tres supuestos principales:

1. Estudio de cuerpos expuestos al aire libre
2. Estudios de cuerpo enterrados
3. Estudios de cuerpos inmersos en agua

Cada uno de estos supuestos implica unos modos específicos de recolección de los ejemplares y manejo de los modelos animales.

En el caso de **cadáveres expuestos** al aire libre uno de los primeros factores a considerar es la posible acción de los vertebrados carroñeros sobre el cebo. Para evitarlo conviene proteger el cebo mediante una malla metálica con un diámetro de luz suficiente para permitir el acceso de los insectos pero aislarlo de la acción de los vertebrados carroñeros.

En relación con la comunidad sarcosaprófaga de cadáveres expuestos los tipos principales de artrópodos que van a aparecer son voladores y reptadores. Para su captura se emplea habitualmente la manga entomológica o cazamariposas, pinceles, pinzas y trampas adhesivas.

En cuanto a la manga entomológica sus principales cualidades deben ser la ligereza y la resistencia de su armazón: la primera nos permite su fácil y rápido manejo y la segunda nos da la seguridad necesaria para batir con la fuerza que se precise en cada caso. La malla deber ser ligera y, sin llegar a ser rígida ni opaca, lo suficientemente resistente como para no deteriorarse al golpear la vegetación. Para evitar dicho deterioro conviene que la parte que rodea el aro vaya reforzada por un tejido más resistente, ya que es la zona que soporta mayor roce. El diámetro del aro no debe ser inferior a los 30 cm. de abertura, aunque tanto éste como la longitud del mango deben adecuarse a las necesidades particulares de cada grupo, siendo útiles al respecto las mangas de longitud regulable.

Todos estos métodos de recolección han mostrado ser muy efectivos a la hora de descubrir las especies implicadas en las distintas fases de la descomposición y de averiguar su secuenciación temporal. La desventaja de estos métodos se centra que se depende de la pericia y habilidad del recolector (que no tiene por qué ser un experto) y cuando se necesita cuantificar estadísticamente los resultados.

Para paliar estos posibles problemas se utilizan como dispositivos de captura trampas de cebo. Este tipo de trampas permite capturar simultáneamente diferentes grupos de artrópodos que comparte un mismo tipo de dieta. Se utilizan para estudios faunísticos, de distribución espacial y temporal, preferencias de cebo, hábitats, etc. Se han diseñado varios modelos desde los más sencillos a los más sofisticados. La trampa de cebo más sencilla consiste en un simple recipiente hundido a ras del suelo y en cuyo interior se coloca el cebo. Estas trampas deben protegerse de la lluvia y de otros animales no deseados que pudieran caer en ellas por lo que se pueden cubrir con una piedra grande sostenida por otras de menor tamaño, o bien con ramas hojas o cualquier otra estructura que las cubra sin que se impida el paso a los artrópodos edáficos o marchadores. Tanto el cebo utilizado como su estado dependen de los requerimientos tróficos del grupo de artrópodos que se pretenda capturar y de su biología.

Las trampas de cebo para insectos voladores, están diseñadas en función del tipo de estudio que se va a realizar, el hábitat en donde se hacen las capturas y el grupo de insectos que se pretende capturar. Un modelo básico al que se le pueden hacer modificaciones adecuadas a cada caso particular consiste en suspender la trampa con

el cebo en un árbol o cualquier otro soporte que asegure un máximo aislamiento de la fauna del suelo. Deben colocarse preferentemente en lugares protegidos del sol para reducir la condensación y evitar los efectos nocivos de las radiaciones solares sobre el cebo y los ejemplares capturados. A este tipo pertenecen las trampas orientadas por el viento, conocidas como WOT por sus iniciales en inglés (Wind Orientated Trap). Esta trampa consta de dos cámaras aisladas una donde se coloca el cebo y otra donde se recogen los ejemplares que, atraídos por el cebo, entran a través de embudo. La pieza clave de esta trampa es la veleta que orienta el orificio de entrada en la misma dirección, pero en sentido contrario al del viento dominante, por lo que facilita la entrada de insectos que, atraídos por el olor del cebo, vuelan en contra del viento.

Pero el salto cualitativo en los modos de recolección de la fauna sarcosaprófaga se efectuó al aparecer una serie de trampas que permitían hacer un censo tanto de los artrópodos que se introducían en ella para acceder a los restos en descomposición como de los criados en los restos. Esta trampas denominadas trampas de Schoenly por el nombre de su autor, están diseñadas para recolectar todos los insectos, tanto los que acceden al cebo, como los que emergen de él, con una interferencia mínima en el proceso natural de descomposición del cadáver y su sucesión faunística. La trampa permite hacer un censo total de todos los insectos que acceden a ella y se desarrollan en el cadáver. Los artrópodos, son capturados continua y automáticamente con una mínima perturbación del estado y situación del cadáver. Esta captura sistematizada e igualitaria para todos los muestreos y durante todos los días de los que constan los mismos, nos permite hacer cualquier tipo de análisis estadístico.

Las trampas de Schoenly están pensadas para recoger todo tipo de entomofauna adulta. Sin embargo, las larvas de díptero y de algunas especies de coleópteros necesitan enterrarse en el suelo para completar su desarrollo y, es por ello que, aparecen recolectadas en mayor o menor cantidad con esta trampa. Por no ser este método de muestreo el adecuado para la recolección y cuantificación sistemática de ejemplares inmaduros, sus resultados, en este caso, solamente deben ser tenidos en cuenta para aportar datos suplementarios a la biología de algunas especies, pero no para hacer ningún tipo de análisis estadístico.

Existen distintas variantes de este modelo de trampa, a continuación vamos a describir un modelo generalizado de forma rectangular. Esta variante del Modelo de Schoenly tiene dimensiones 120 x 90 x 60 cm.; consta de 16 orificios de entrada, cuatro por lado, situados a dos alturas distintas (12 y 42 cm.) y distribuidos equidistantes en los 4 lados de la trampa.

Ocho de los 16 orificios de entrada conducen directamente a 4 canales de ingreso formados, internamente, por tela plástica de luz de malla 2 cm. y, externamente, por tela metálica con luz de malla de 1 mm., que finalizan en unos recipientes con líquido conservante situados bajo la superficie del suelo. Los restantes ocho orificios de entrada permiten el acceso directo de los animales al cadáver. Una vez dentro, los ejemplares no recolectados y, en su caso, los emergentes del cadáver pueden salir a través del orificio de salida situado en el techo de la trampa, o de los ocho situados, como los de entrada, a dos alturas (12 y 42 cm.), en los vértices truncados de la jaula, al final de todos los orificios de salida, se encuentran unos recipientes con líquido conservante. Esta trampa captura, teóricamente, la mitad de los ejemplares que entran a la trampa y todos los que salen de ella.

Otro dato a tener en cuenta, sea cual sea la trampa utilizada, es el medio de conservación que se utilice en los botes de captura. Para contrarrestar el posible efecto repugnatorio de los tradicionales métodos de conservación aromáticos, se recomienda la utilización de la denominada solución de Morril como contenido de los botes de captura. Esta solución es la más adecuada dada su neutralidad, por minimizar las pérdidas de evaporación y por haber dado buenos resultados en la conservación de la mayoría de los taxones.

La solución de Morril consta de:

- 600 ml de agua, preferentemente destilada
- 400 ml del etilenglicol (anticongelante)
- 5 ml de formaldehído
- 1-2 ml de detergente

Para el estudio de la fauna de **cadáveres enterrados** se han de considerar dos supuestos diferentes, el estudio de la fauna obtenida a partir de enterramientos tradicionales y en exhumación de cuerpos y el estudio de la fauna sarcosaprófaga y su sucesión en modelos animales.

En ambos casos los modos de recolección de los ejemplares incluyen los métodos tradicionales de captura no habiéndose diseñado ningún dispositivo especial de captura para este tipo de supuestos.

Para la recolección de la fauna edáfica se deben tomar muestras de suelo y hojarasca de las que con posterioridad se extraerá su fauna. El medio edáfico es húmedo y oscuro,

y el método más utilizado para la obtención de fauna es el embudo de Berlesse que actúa haciendo huir a los organismos vivos de la luz y del calor. En su forma más simple es un embudo que lleva en su parte superior una rejilla con una luz de malla adecuado al tamaño de los ejemplares que se pretenden estudiar. Sobre la rejilla se coloca la muestra (suelo, musgo, hojarasca, materia orgánica...) de la que se va a extrae la fauna. Sobre ella se hace incidir directamente un foco de luz (no demasiado potente) durante algunas horas e incluso días. A medida que la muestra se vaya secando, la fauna desciende buscando zonas más oscuras y húmedas, atravesando el tamiz y cayendo en la parte inferior del embudo, que desemboca directamente en un frasco con el líquido conservante, alcohol de 70º o formol al 4%, donde caerán los ejemplares.

Otro método de extracción de fauna edáfica es el denominado método de extracción húmeda y flotación. Un número considerable de pequeños artrópodos, así como sus exuvias, huevos, larvas, pupas o crisálidas, pueden separarse de la muestra de suelo por flotación en un líquido con solución salina al 25% (ej. 250 gr. de sulfato de magnesio en un litro de agua), cuyo peso específico es ligeramente superior al del agua. El suelo se remueve en dicha solución y los artrópodos que flotan en la superficie se van retirando con la ayuda de un pincel o colador. No obstante este método es menos útil cuando en las muestras de suelo hay gran cantidad de material orgánica vegetal, ya que esta también flota. En este caso los artrópodos pueden ser separados de la materia vegetal mediante el método de extracción húmeda, utilizado preferentemente en la obtención de larvas y pequeños coleópteros que se desarrollan en fluidos residuales de materia orgánica en descomposición o bien en los detritus orgánicos de los depósitos de aguas estancadas. La extracción por humedecimiento y flotación diferencial, permite la separación de la materia vegetal de la animal mediante la inmersión de las muestras en dos líquidos inmiscibles. Usualmente se utiliza agua y un líquido orgánico como el benceno, de modo que los residuos vegetales permanecen en la capa de agua, mientras que los artrópodos, cuya cutícula de cera esta humedecida por dicho lípido orgánico, flotan en el mismo por encima de la capa de agua.

En el caso de **cadáveres sumergidos** en medio acuático se emplean los métodos clásicos de recolección entre los que hay que distinguir los específicos de ambientes dulceacuícolas, los de ambientes marinos y los de fauna intermareal.

Para la captura de los artrópodos en medio dulceacuícola se precisa una manga o red de características similares a la descrita para grupos voladores, con la salvedad de que para este medio se necesita un bastidor más fuerte, siendo también adecuada una

embocadura triangular y de menor tamaño para ofrecer menos resistencia en el desplazamiento en el agua.

En el medio marino además de la manga o red descrita para ambientes dulceacuícolas, además se emplean redes de arrastre de tamiz de seda o nailon de diferentes diámetros de malla.

La orilla del mar representa el lugar donde se presenta la fauna más accesible del medio marino, de hecho los métodos de recolección de fauna intermareal son relativamente simples y dependen del tipo de fauna. Muchos representantes móviles se esconden en oquedades durante los periodos intermareales diurnos, siendo allí por tanto donde pueden ser capturados a mano con pinzas o con simples redes de mano

Métodos de preparación y conservación de los ejemplares

Sea cual sea el origen del matrial entomológico los métodos de conservación pueden agruparse de forma simplificada, en dos grandes apartados: en seco o en medio líquido que actúe como conservante. Esta última foma es cada vez más utilizada ya que, entre otras ventajas, presenta las del ahorro de espacio en las colecciones y de tiempo de preparación y mantenimiento.

Conservación en medio líquido: Por regla general se conservan en medio líquido todos los quelicerados, crustáceos, miriápodos y los insectos de tegumento blando. Excepto en los casos en los que se indique expresamente ese líquido es etanol de 70% al que se le pueden añadir unas gotas de glicerina para evitar el excesivo endurecimiento: los ejemplares pueden guardarse juntos siempre y cuando tengan una misma procedencia. Se utilizarán tubos adecuados al tamaño del grupo y tras etiquetarlos se cierran con tapones o simplemente algodón y se guardan juntos los de un mismo grupo en un frasco de boca ancha, lleno hasta cubrir la muestra con alcohol de 70% y cerrado lo más herméticamente posible para evitar su evaporación.

Conservación en seco: Los grupos que se conservan en seco son casi exclusivamente insectos. El primer paso es proceder a matar el ejemplar medinate la utilización de acetato de etilo. Para este fin bastará utilizar un tapón impregnado en acetato de etilo o bien se intriduce en el interior del tubo, preferentemente de cristal para evitar que sea atacado por el acetato, una tira ligeramente humedecida en dicho producto. Los ejemplares a los que se les va a extraer su ADN, deben matarse por congelación, ya que el uso de cualquiera de los productos letales mencionados, impedirá la realización de dichos análisis.

Los insectos adultos se montan en alfileres entomológicos y nunca se deben emplear alfileres de costura, ya que con el tiempo llegan a oxidarse, estropéndose los ejemplares. Los alfileres entomológicos suelen tener la misma longitud variando el grosor para lo cual se numeran del 000 que es el más fino al 7 que es el más grueso

METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE DESARROLLO DE CICLOS VITALES DE DÍPTEROS DE INTERÉS FORENSE

Dos de los factores más importantes que influyen en el nivel de desarrollo de los insectos son la temperatura y la humedad relativa. En el caso de los insectos sarcosaprófagos, existen datos puntuales sobre el desarrollo de determinadas especies de interés y en determinadas fases de su desarrollo.

Existe una línea de investigación sobre el estudio de los ciclos vitales de los dípteros sarcosaprófagos centrada en su utilidad práctica forense. Resultan especialmente interesantes las representaciones gráficas de los datos obtenidos denominada isomegadiagramas e isomorfodiagramas. Utilizándolas es posible determinar la edad de las larvas a partir de su longitud y por medio de una rápida y fácil lectura de una gráfica.

La metodología para el estudio de ciclos vitales de dípteros de interés forense implica tanto la obtención de ejemplares de las especies requeridas como el mantenimiento y desarrollo de dichas especies en el laboratorio.

Obtención de los ejemplares

Para la recolección de los ejemplares para el establecimiento de las colonias de las especies a estudiar se utilizan trampas orientables con el viento (trampas WOT) cebadas con vísceras de pescado o carne. Para asegurar la captura de los ejemplares, además de las trampas WOT, se pueden poner cebos en el interior de un recipiente plástico que debe disponer de una abertura suficiente como para permitir el libre acceso de las hembras grávidas de díptero para la ovoposición.

Mediante la utilización de estos dos métodos de recolección de ejemplares se asegura la captura de ejemplares de las especies a estudiar, ya sea hembras grávidas, como en el caso de la trampa WOT o, huevos y larvas de primer estado, en el caso de los cebos de libre acceso.

Se debe procurar capturar cada una de las especies a estudiar en la estación del año preferente según su fenología.

Mantenimiento de colonias de laboratorio

Para el mantenimiento de las colonias en el laboratorio se ha adoptado un protocolo de consenso entre los métodos utilizados para el mantenimiento de los dípteros en situaciones estrictamente forenses y, los utilizados para los estudios en condiciones de laboratorio de desarrollo de los dípteros.

Una vez los ejemplares en el laboratorio, los adultos recogidos mediante la trampa WOT deben ser inicialmente seleccionados mediante identificación visual de los ejemplares vivos. Debido a la dificultad de, en ejemplares vivos y en movimiento, poder observar con claridad los caracteres taxonómicos definitorios de cada una de las especies seleccionadas, la primera identificación debe ser confirmada con otra posterior de los ejemplares ya criados en el laboratorio.

Los ejemplares adultos seleccionados se dispondrán en jaulas de mantenimiento de adultos en cuyo interior se dispondrá tanto sustrato alimenticio como de puesta. Los huevos y larvas obtenidos mediante la disposición de cebos, se han trasladar directamente a jaulas para el desarrollo y mantenimiento de larvas de dípteros. En este último caso, hay que tener especial cuidado en la manipulación de los huevos y larvas debido a que la posibilidad de la existencia de parasitosis es mucho mas elevada que en los ejemplares adultos. En prevención de cualquier tipo de contaminación de las colonias, las pupas obtenidas deben ser aisladas individualmente, para una vez producida la emergencia del adulto proceder a su identificación a nivel específico y, en caso de parasitación, descartarlos.

Los ejemplares adultos, obtenidos por cualquiera de los métodos, se mantendrán en las jaulas de mantenimiento de dípteros adultos. Un modelo muy utilizado de estas jaulas tiene unas dimensiones de 22 x 22 x 25 cm. y presenta una abertura de 10 cm. de diámetro conectado con un tubo cilíndrico (manga) que permite al acceso al interior de la jaula. Mediante el uso de la abertura se podrá disponer el interior de la jaula el sustrato de puesta y el alimenticio, así como se podrá extraer de su interior las puestas una vez se produzcan. Las jaulas deben estar confeccionadas en un tipo de tela que permita la aireación, la entrada de luz al interior de la jaula así como la visión del interior. Normalmente se utiliza tela de tul de color blanco, este tejido permite una perfecta aireación de los ejemplares en el interior de la jaula y no interfiere, tamiza o difumina la luz existente en el exterior.

Como sustrato alimenticio de los adultos se utiliza habitualmente agua y azúcar, que debe permanecer a libre acceso de los insectos a lo largo de su ciclo biológico y ser repuesto de forma periódica. El agua se dispondrá, en unos bebederos diseñados al efecto que impidan el ahogamiento de los ejemplares. Un modelo muy sencillo y efectivo consiste en una placa Petri con un papel de filtro en su interior y en la misma se coloca un recipiente conteniendo agua dispuesto en posición invertida. De esta forma el agua se difunde, por capilaridad, de forma continua por toda la superficie de la placa Petri, previniéndose el ahogamiento de los adultos debido al exceso de agua.

Las hembras de díptero, para el desarrollo y maduración de su sistema reproductor, necesitan un sustrato proteico del que alimentarse. Para ello, una vez transcurridos unos días de la enmergencia del pupario se les proporciona un sustrato proteico que puede ser hígado, carne o vísceras de pescado. Esta dilación en la disposición del sustrato proteico se realizará para asegurar la sincronización en la maduración de todos los ejemplares de la colonia.

Para la ovoposición se introducirá en el interioro de las jaulas de adultos el sustrato de puesta que debe estar adaptado a los requerimientos de cada una de las especies a estudiar.

Una vez obtenidas las puestas, éstas se trasladan a un recipiente de mayor capacidad conteniendo sustrato de cría (generalmente es el mismo que el sustrato de puesta) en donde los huevos completarán su desarrollo larvario hasta alcanzar el tercer estado larvario. Todo este proceso se efectuará en el interior de las jaulas de desarrollo de larvas. Éstas consisten en un recipiente que presenta una abertura su parte superior para permitir el acceso al interior de la jaula. La abertura debe estar forrada de un material que permita la circulación del aire en el interior de la jaula.

Las larvas de tercer estado una vez completado su desarrollo migrarán del sustrato de cria para su pupación. Para ello en el fondo de la jaula de cría debe haber el denominado sustrato de pupación. Este sustrato es un medio inerte en el que las larvas puedan enterrarse o esconderse para pupar, puede ser desde vermiculita, arena, tiras de papel, etc.

Una vez obtenidos los puparios, éstos se aislan del sustrato de pupación y se revisan para seleccionar, únicamente, aquellos presenten un tamaño y morfología adecuada a su especie. Los puparios se dispondrán en el interior de una jaula de adultos a la espera de la emergencia de los adultos.

Durante todo el periodo de estudio, las colonias de mantenimiento se mantendrán en unas condiciones ambientales, temperatura, humedad relativa, iluminación y fotoperíodo, fijas y estables. Para todo ello, se debe utilizar un incubador en el cual permanecerán los dípteros en todo momento con excepción de las revisiones periódicas por parte de los investigadores.

Es recomendable que los ejemplares a utilizar en la experimentación pertenecerán como mínimo a la tercera generación de dípteros criado en condiciones de laboratorio a partir de su recogida en el medio salvaje.

Experimentación

Una vez estabilizadas las colonias y obtenida una población contínua de la especie que queremos estudiar se puede comenzar la experimentación y el estudio de los ciclos vitales bajo diferentes condiciones ambientales o sustratos alimenticios alterados o no. En cada intervalo de tiempo estipulado, se recoge una cantidad de ejemplares suficientemente significativa y se van registrando todas las variables. Todos los datos recogidos, posteriormente, se elaboran estadísticamente.

MÉTODOS MOLECULARES EN ENTOMOLOGÍA MEDICO-LEGAL

En un momento en que muchos aspectos de la ciencia forense están dominados por los recientes avances en el campo de la biología molecular, no es de extrañar que la tecnología de ADN se convierta en una herramienta del entomólogo forense. En la actualidad, los esfuerzos para el desarrollo de estas técnicas están en su mayor parte en fase de investigación. Sin embargo, tienen la posibilidad de desarrollarse muy rápidamente en el uso generalizado por los que analizan la evidencia de insectos en las investigaciones forenses.

La Biología molecular es un campo muy técnico y de foma general esta línea de investigación se está desarrollando como herramienta para la identificación de ciertos insectos que por los métodos tradicionales presentan especial dificultad. Para solucionar este problema se ha comenzado a utilizar la información específica contenida en la molécula de ADN que se caracteriza por su inmutabilidad durante todas las fases del ciclo de vida de los insectos, su presencia en cualquiera de sus tejidos (huevo, larva, pupa e imago) y elevada estabilidad, lo que facilita la identificación taxonómica en cualquier etapa del insecto. Consecuentemente, las técnicas basadas en el análisis del ADN en general, y del ADN mitocondrial en particular, presentan numerosas ventajas

sobre la identificación morfológica cuando los especimenes están dañados o carecen de las características necesarias para la clasificación morfológica. Además, estas técnicas permiten identificar la especie en cualquiera de las fases su ciclo de vida.
Los métodos de secuenciación del ADN proporcionan una gran cantidad de información referente a la variabilidad intra- e interespecífica. Los marcadores más utilizados al respecto han sido las subunidades I y II de citocromo oxidasa (COI y COII). Estos marcadores han sido aplicados en estudios principalmente sistemáticos, evolutivos y de genética de poblaciones.

La mayor parte de los estudios que implican estos marcadores se han realizado desde una perspectiva de clasificación sistemática, y sólo en algunos casos se ha mencionado la utilidad de este procedimiento en relación con la Entomología forense

El análisis molecular puede no solo proporcionar información taxonómica de la entomofauna, sino que también puede ser de interés en casos de sospecha de contaminación larvaria, ya que el ADN recuperado del intestino de las larvas puede ser usado para identificar lo que éstas habían comido; así, es posible confirmar o descartar que las larvas procedan del cuerpo. Si consideramos que los insectos pueden ser una fuente de ADN del organismo vivo o muerto del cual se han alimentado, esta circunstancia hace que a partir de los contenidos estomacales de las larvas de díptero se pueda localizar un cuerpo o ayudar a su identificación o se pueda identificar al autor de un abuso sexual por la existencia en la victima de una ladilla conteniendo sangre del autor del abuso.

Quizás el paso más importante para el investigador forense es la fijación y conservación del material lo más rápida y adecuada posible para su utilización en estudios de ADN. El mejor modo de obtener un buen ADN es partir de muestras conservadas y fijadas en etanol de 95% o congeladas o ambas cosas. Debe evitarse el uso de formaldehido que hace imposible el estudio del ADN.