



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**“Obtención de ADN humano a partir del
contenido gástrico de larvas de dípteros
alimentadas y colectadas en cadáveres
humanos”**

TESIS

Que para obtener el título de:

BIÓLOGA

Presenta:

GARCÍA MOZQUEDA ERIKA

Director de Tesis: Dr. Mauro López Armenta

Laboratorio de Genética del Instituto de Ciencias Forenses del Distrito Federal
Tribunal Superior de Justicia del Distrito Federal.

Los Reyes Iztacala, Edo. De México, Junio, 2013





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DIRECTOR

Dr. Mauro López Armenta

ASESORES

Biol. María Eugenia Ambriz Franco Romero

M. en C. María del Pilar Villedas Callejas

Biol. Alberto Morales Moreno

M. en C. María Eugenia I. Heres y Pulido

La presente Investigación fue realizada en las instalaciones del Departamento de Genética, del Instituto de Ciencias Forenses (INCIFO) del Distrito Federal, dependiente del Tribunal Superior de Justicia del Distrito Federal (TSJDF). Gracias por el apoyo al brindarme las facilidades para la obtención y análisis de las muestras utilizadas en el presente trabajo.

Asimismo, gracias a mi Director y asesores por otorgarme su valioso tiempo, asesoría, apoyo y consejos. Gracias por darme las bases de mi crecimiento profesional. Porque cada corrección ha enriquecido este trabajo, porque gracias a Ustedes aprendí a amar lo que hago, al realizarlo con el mayor esfuerzo y dedicación.

DEDICATORIA

*A mis padres **OSO** y **GATO NEGRO** siempre serán mi mejor motivo para salir adelante.
Por su sacrificio y amor que siempre han tenido por mí.
Sin ellos, ni esto ni yo existiríamos.*

*A mis hermanos **HILDA** y **RAÚL** porque a pesar de todo siempre serán lo más importante en mi vida.*

*A **DEMETRIO** porque durante estos cuatro años no hubo un día que no esperara fiel a mi llegada. Simplemente lo amo.*

Agradecimientos

A **Mauro López Armenta** Mi Querido Director en este proyecto del cual no solo gané conocimiento y aprendizaje. Sino lo más importante, gané un amigo que me llena de admiración y respeto no sólo en lo académico, sino en lo personal, al ver la sencillez y dedicación que impone en todo lo que hace. Gracias por apoyarme en todo momento, por tus enormes consejos, por darte el tiempo de escucharme y compartir siempre una sonrisa conmigo. Ahora si "Don't stop me now, My Doctor".

A **María Eugenia Ambriz Franco "Maru"** por su enorme apoyo en este proyecto, porque sin su dedicación y consejos no hubiera superado los obstáculos para llegar a esta meta. Gracias por creer en mí y en mis sueños. Por tu apoyo incondicional día a día.

A **Rayo del Carmen Orea "Rayo"** y **Mariana Ruiz "Marianita"** por darme la oportunidad de estar en ese hermoso laboratorio que tanto amé. Porque de la misma manera, confiaron en mí y me brindaron el mejor apoyo que pude haber tenido al luchar contra viento y marea para que este trabajo concluyera. Por animarme a seguir adelante a pesar de los obstáculos tan grandes en este camino.

A mis queridas amigas **Yadira** y **Anahí "Mis peques"** con las cuales comparto hermosos momentos, por su compañía, sonrisas y tristezas compartidas. Por su buena vibra en todo momento y por esas pláticas tan amenas que hacen que el trabajo sea de lo más divertido. Las adoro.

A **Burro (Jon)** por alentarme día a día. Por tu amor y comprensión a pesar de todo. Gracias por los momentos vividos y tu apoyo en esta etapa importante en mi vida.

A mis amigos de generación: **Amaury, Emily, Rutsi, Andy, Rambo** y **Los Fuchis (Bibi, Manolo, Lalo y Chucho)** al hacer mi estancia ahí más amena. Por los momentos inolvidables a su lado. Por todas las aventuras y cariño brindado. Porque siempre fue diversión a su lado.

A **Clara, Nely** y **Lili** por ser las mejores amigas que puedo tener. Por entenderme y comprenderme durante todo este tiempo conocido. Por todo el amor y apoyo incondicional que me tienen.

Sería imposible agradecer a toda esa gente linda que ha estado a mi lado en las buenas y malas. Por lo tanto si alguno de ustedes se me pasó una enorme disculpa. A final de cuentas saben que son parte de mi vida loca. Gracias infinitas a cada uno de Ustedes, que han hecho de mí una mejor persona.

*Todos los sepultureros saben
que la tierra posee conocimiento.*

*Con ella juegan los niños,
pero ella también cansada de los hombres
juega con sus restos.*

*En su interior alberga
umbrales hacia el paraíso,
en el estómago de los gusanos
reside el primer peldaño al cielo.*

OMAR HEBERTT

| Índice | Pág. |
|---|------|
| 1. Introducción..... | 11 |
| 2. Antecedentes..... | 12 |
| 2.1 Historia de la entomología forense..... | 13 |
| 2.2 Fenómenos cadavéricos..... | 14 |
| 2.3 Importancia de los insectos de interés forense..... | 16 |
| 2.4 Aplicaciones entomológicas en las ciencias forenses | |
| 2.4.1 Intervalo postmortem..... | 17 |
| 2.4.2 Entomotoxicología..... | 18 |
| 2.4.3 Identificación humana a través de insectos..... | 19 |
| 2.5 Principales especies de interés forense..... | 20 |
| 2.5.1 Familia <i>Calliphoridae</i> | 20 |
| 2.5.1.2 <i>Phaenicia sericata</i> | 21 |
| 2.5.1.3 <i>Calliphora vicina</i> | 22 |
| 2.5.2 Familia <i>Sarcophagidae</i> | 23 |
| 2.6 Identificación forense..... | 24 |
| 2.6.1 Identificación mediante ADN..... | 25 |
| 2.6.2 El ADN como elemento de identificación..... | 26 |
| 2.7 Polimorfismos de ADN..... | 27 |
| 2.8 Métodos de identificación basados en el análisis del ADN..... | 28 |
| 2.8.1 Análisis de STRs autosomales..... | 28 |
| 2.8.1.2 <i>Identifiler</i> | 32 |
| 2.8.1.3 <i>Minifiler</i> | 32 |
| 2.8.1.4 <i>Powerplex 21 System</i> | 33 |

| | |
|---|----|
| 2.8.1.5 <i>Powerplex Y23 System</i> | 33 |
| 2.9 Extracción de ADN | 34 |
| 2.10 Cuantificación de ADN..... | 35 |
| 2.11 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)..... | 37 |
| 2.12 Electroforesis capilar..... | 38 |
| 3. Justificación de estudio y objetivos..... | 40 |
| 4. Material y métodos..... | 42 |
| 4.1 Colecta y preservación de muestras..... | 42 |
| 4.2 Extracción de ADN de larvas..... | 43 |
| 4.3 Extracción de ADN de hueso para muestra de referencia | 44 |
| 4.3.1 Extracción de ADN de restos óseos mediante el método fenol/cloroformo ... | 45 |
| 4.4 Cuantificación de ADN en tiempo real..... | 46 |
| 4.5 PCR Múltiplex..... | 47 |
| 4.6 Electroforesis Capilar..... | 51 |
| 5. Resultados y análisis..... | 52 |
| 6. Discusión..... | 67 |
| 7. Conclusión..... | 69 |
| Apéndice..... | 71 |
| Referencias..... | 77 |
| Anexos..... | 80 |

Índice de figuras y tablas

Fig. 1 Fotografía de uno de los cadáveres estudiados ejemplificando el estado de putrefacción en que se encontraban los cuerpos.

Fig. 2. Fotografía de díptero de la familia *Calliphoridae* género *Phaenicia*

Fig. 3 Fotografía de díptero de la familia *Calliphoridae* género *Calliphora*

Fig. 4 Estructuras observadas para la identificación de la especie de la familia *Calliphoridae Calliphora vicina*

Fig. 5 Estructuras observadas para la identificación de la especie de la familia *Calliphoridae Phaenicia sericata*

Fig.6 Caso ejemplificando una toma de muestra inadecuada, sin obtención de perfil genético para su identificación.

Fig.7 Fotografía ejemplificando el estado de putrefacción de uno de los cadáveres (768) utilizado con el sistema *MiniFiler*, obteniéndose buenos resultados.

Fig.8 Electroferograma ejemplificando marcadores amplificados en un rango menor a 400pb, mediante el análisis de larvas en segundo estadio

Fig.9 Electroferograma ejemplificando marcadores amplificados en un rango menor a 400pb, mediante el análisis de larvas en tercer estadio

Tabla 1. ADN humano recuperado por conjunto de contenido gástrico de larvas en segundo estadio cada uno mediante PCR en tiempo real

Tabla 2- ADN humano recuperado por conjunto de contenido gástrico de larvas en tercer estadio cada uno mediante PCR en tiempo real.

Tabla 3 Nanogramos de ADN recuperado con respecto al peso promedio de cada larva, todas en segundo estadio, mediante PCR en tiempo real. El número de larvas empleadas por cadaver varió dependiendo del tamaño de las larvas.

Tabla 4. Loci amplificados a partir del sistema *Power Plex 21 System*. En donde en todos los casos se obtuvieron todos los marcadores que incluye el sistema.

Tabla 5. Marcadores obtenidos a partir del sistema *Power plex y23*. Compuesto por 23 loci en donde se muestra que en el caso 4739 se obtuvo un total de 19 marcadores los cuales correspondieron con los de la muestra de referencia (Rf), en comparación con el caso 1556 en donde sólo se obtuvieron cinco de veintitrés marcadores

Tabla 6. Marcadores obtenidos a partir del sistema de identificación humana *Minifiler*. En estos casos se trabajó con larvas en segundo estadio (E2), las cuales arrojaron resultados satisfactorios.

ABREVIATURAS

ADN.- Ácido desoxirribonucleico

CODIS.- (Sistema de Índices Combinado de ADN) de los Estados Unidos

ng.-nanogramos (10^{-9} g)

pb.- Pares de bases

PCR.- Reacción en Cadena de la Polimerasa

RFLPs.- (polimorfismos de longitud por fragmentos de restricción)

SNPs.- Polimorfismo de un solo nucleótido (por sus siglas en inglés *Single Nucleotide Polymorphism*, pronunciado *snip*)

STR .- Por sus siglas en inglés *Short Tandem Repeats* Corresponden a la repetición en tándem de secuencias de entre 2 y 5 nucleótidos.

VNTR.- Número variable de repeticiones en tándem por sus siglas en inglés (*Variable Number of Tandem Repeats*)

XAAD. Solución para la preservación de larvas compuesta de 4 partes de xilol, 6 partes de alcohol isopropílico, 5 partes de ácido acético glacial y 4 partes de dioxano.

Resumen

La principal aplicación de las pruebas entomológicas era anteriormente la determinación de data de muerte o intervalo *post mortem*. Actualmente, se reconoce que los insectos pueden aportar más información en el campo médico legal como por ejemplo, si el cadáver de un individuo fue trasladado del lugar donde ocurrió la muerte a otro sitio distinto a éste y con ello se puede determinar las especies específicas que habitan en diferentes ecosistemas y que son características del lugar de los hechos en un crimen, abuso por efecto laceraciones, así como ser fuente para el análisis de ADN humano. En este trabajo se presenta la obtención de perfiles genéticos útiles para la identificación humana a partir del contenido gástrico de larvas de dípteros en segundo y tercer estadio, preservadas de manera distinta, con resultados prometedores en casos de cadáveres putrefactos; con la recuperación de hasta 5.10 ng de ADN humano por larva, y en algunos casos la caracterización del conjunto completo de marcadores para los sistemas *Identifiler*, *PowerPlex 21 System*, *PowerPlex 23 System* y *MiniFiler*, en todos los casos con caracterización de amelogenina, marcador que determina el sexo.

Palabras clave: dípteros, contenido gástrico, perfil genético e identificación.

1. Introducción

La entomología forense consiste en el estudio de insectos y otros artrópodos presentes en eventos relacionados con cuestiones legales, pudiendo ser dividida en tres áreas principales: urbana, plagas de alimentos almacenados, y médico legal (Byrd & Castner, 2010). La primera de éstas se refiere a disputas relativas con el ambiente urbano en que se desarrollan los insectos, incluyendo actos de negligencia relacionados con la infesta de éstos. La segunda se relaciona con la presencia de artrópodos en alimentos u otros productos, y la entomología médico legal, la cual se dedica al estudio de insectos necrófagos o necrófilos que infestan los restos humanos generando información para la resolución de casos criminales. La función principal del entomólogo médico legal es lograr la identificación precisa de los insectos o de los otros artrópodos asociados al cadáver, ya que de esta precisión derivará la veracidad de las inferencias que puedan hacerse en torno a esto último (Viloria Petit, 2007)

Anteriormente, la principal aplicación de las pruebas entomológicas era la determinación de data de la muerte o intervalo *post mortem* (IPM). Sin embargo, el estudio de la entomofauna cadavérica ha ampliado notablemente su campo de acción; actualmente, se reconoce que los insectos y otros artrópodos pueden aportar más información en el campo médico legal como el traslado de un cadáver tras la muerte, características del lugar de los hechos en un crimen, abuso, además de constituir alternativas para los análisis toxicológicos, así como fuente para el análisis de ADN humano (Lord *et al.*, 1998).

2. Antecedentes

En 2011, Li X y colaboradores demuestran que es posible la asociación de larvas de hábitos necrófagos con restos humanos; al obtener exitosamente de una cosecha de larvas alimentadas de tejido de cadáver, una ampliación del material genético correspondiente al cadáver asociado con su alimentación.

Tiempo atrás, en 2004, Zehner y colaboradores analizan por primera vez microsátélites de ADN humano en larvas necrófagas alimentadas en trece cadáveres humanos con más de cuatro meses de intervalo *post mortem*, amplificando regiones autosomales de ADN para repetidos cortos en tándem o STR (*Short Tandem Repeats*) y ADN mitocondrial (ADNmt) de regiones hipervariables. Donde se obtuvieron siete perfiles completos de STRs a partir de los trece cadáveres empleados.

Campobasso y colaboradores, en 2003, criaron larvas de dípteros de la especie *Calliphora vicina* en hígado humano para el análisis forense de ADN recuperado del intestino de la larva para identificar el cadáver del cual se había alimentado anteriormente. Obteniendo con éxito haplotipos de ADNmt en siete de nueve muestras analizadas.

Estudios previos reportados por Linville y colaboradores, en 2001, refieren el análisis del contenido gástrico de larvas para la identificación genética de un cadáver humano, las cuales fueron preservadas, diseccionadas y analizadas en manera distinta. Obteniendo resultados exitosos cuando las muestras de larvas fueron preservadas en etanol a menos 70°C, cuantificadas y amplificadas las regiones del ADN mitocondrial.

En 2001, Wells y su equipo habían demostrado que por medio del ADNmt es posible obtener una secuencia de perfil genético humano a través del contenido obtenido del intestino de larvas que se habían alimentado de tejido de cadáveres humanos, lo cual aportó datos para la identificación del cadáver del cual se alimentaron.

2.1 Historia de la entomología forense

El primer documento sobre un caso resuelto por la entomología forense se remonta al siglo XIII y se encuentra en un manual chino de medicina legal, el cual refiere a un homicidio en el que apareció un labrador degollado por una hoz. Se describe que el día después de la muerte, el investigador pidió a todos los labradores que pusieran su herramienta de trabajo (hoz) en el piso. Trazas invisibles de sangre atrajeron moscas a una única hoz. Confrontado con la evidencia el dueño de la hoz confesó su crimen (Benecke, 2001).

Durante mucho tiempo se creyó que los insectos eran creados por generación espontánea y no fue hasta el Renacimiento que Francisco Redi (1626-1697), demostró que las larvas procedían de insectos, que depositaban sus huevos en el cadáver, asimismo concluyó que los huevos eran depositados por distintas especies de insectos que se transformaban en larvas, después en pupas y de ahí era donde emergían los insectos adultos (Magaña, 2001).

Fue a mediados del siglo XIX cuando los insectos fueron utilizados científicamente como herramienta en el área forense debido a Bergeret, que en el año 1850 hizo la primera determinación del tiempo de muerte en un cadáver, basándose en el desarrollo de las larvas y pupas que contenía. Siendo éste uno de los primeros casos en que la evidencia entomológica fue admitida en un tribunal de justicia (Goff, 1993.) Posteriormente, Pierre Mégnin (1894) expandió los métodos de sus predecesores, proponiendo que un cuerpo expuesto al aire sufre una serie de cambios, y caracterizó la sucesión regular de artrópodos que aparecen en cada estado de descomposición plasmando su trabajo en una publicación titulada: "La faune des cadáveres : application de l'entomologie à la médecine légale" la cual da inicio a la aplicación de la entomología forense en la resolución de pericias en el ámbito médico legal, ya que en esta obra Mégnin refiere como estimar el IPM a través de la sucesión de artrópodos encontrados en un cadáver en descomposición (Keh, 1985).

Tiempo después surge la entomología forense moderna representada por trabajos como los de Leclercq en el año 1978, quien publica "Entomología y Medicina Legal: Datación de la Muerte" y, en 1986, Smith divulga el "Manual de Entomología Forense". (Yussef, 2007).

Uno de los trabajos más destacados es el aportado por Jason Byrd y James Castner, titulado "Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations", publicado en el año 2001. También Mark Benecke ha contribuido con una gran cantidad de aportes a la entomología forense, entre los cuales se destaca el libro "Insects and Corpses", editado en el 2002. En mismo año Greenberg y Munich publican "Entomology and the Law: Flies as Forensic Indicators", donde se describen las moscas de importancia forense.

A partir de este momento la trayectoria de la entomología forense ha venido en ascenso. Donde muchos autores han dedicado su tiempo y conocimientos a estos estudios, dando lugar a innumerables casos de investigación policiaca en los que han contribuido los entomólogos.

2.2 Fenómenos cadavéricos

El cuerpo humano sufre tras la muerte una serie de transformaciones que nos pueden ayudar a estudiar y comprender las circunstancias en las que tuvo lugar ésta. Existen dos tipos de signos: a) los debidos al establecimiento de los fenómenos cadavéricos y b) los debidos al cese de las funciones vitales, los cuales hacen referencia a la parada funcional irreversible de cualquiera de los tres sistemas vitales, la cual es equivalente a la muerte del individuo: Cese de la función respiratoria: como signo aislado carece de validez pues pueden darse casos de muerte aparente donde no haya movimientos respiratorios aparentes; cese de la función circulatoria (paralización cardíaca y de la circulación periférica); y el cese de las funciones nerviosas del Sistema Nervioso Central con diagnóstico de muerte cerebral (Fernández Almeida, 2008).

Los fenómenos cadavéricos son signos que por su naturaleza, implican una serie de cambios bioquímicos y estructurales en los tejidos (Fernández Almeida, 2008).

Pueden ser divididos en tempranos o tardíos, éstos se designan de acuerdo a los cambios físicos y químicos que suceden en el cuerpo a partir del momento en que se extinguen los procesos químicos vitales, sufriendo pasivamente la acción de las influencias ambientales. Dentro de los fenómenos cadavéricos tempranos tenemos enfriamiento, deshidratación, pérdida de peso, apergamiento cutáneo, desecación de mucosas, fenómenos oculares, livideces, rigidez, espasmo, coagulación y fluidez sanguínea. En cuanto a los fenómenos tardíos estos pueden ser divididos en destructores: autólisis, putrefacción y antropofagia y los fenómenos tardíos conservadores como es el caso de la momificación, la adipocira y la corificación (Méndez, 2010).

La putrefacción es un proceso destructivo que ocurre con mayor frecuencia; consiste en un tipo de descomposición fermentativa, de origen bacteriano, en la cual ocurre la desintegración de moléculas a través de reacciones de reducción y oxidación. Los microorganismos responsables de la putrefacción producen enzimas que actúan selectivamente sobre los compuestos orgánicos, originando modificaciones profundas, que conducen a la destrucción del cadáver. Los microorganismos existentes en el sistema digestivo desempeñan las principales acciones responsables para este proceso, que tiene inicio con la actividad de las bacterias aerobias que absorben el oxígeno. Esta acción permite, posteriormente el desarrollo de microorganismos aerobios facultativos o anaerobios, siendo estos últimos los que desempeñarán la máxima acción de desintegración (Gisbert, 2004).

La evolución de los fenómenos putrefactos puede ser subdividida en cuatro periodos: coloración cromática, producción de gases (estado enfisematoso), licuefacción y reducción esquelética. El estudio de estas modificaciones de putrefacción, conjugado con las influencias ambientales (humedad, temperatura etc.) y los factores individuales (edad, estatura, complejión, causa de muerte etc.) puede constituir marcadores

orientativos sobre el intervalo *post mortem* (Gisbert, 2004), pero cabe destacar que las modificaciones de putrefacción varían de cadáver a cadáver, de ambiente a ambiente y asimismo en distintas regiones corporales del mismo. Ya que muchas veces este proceso se ve modificado por la antropofagia cadavérica causada generalmente por artrópodos principalmente insectos (Fig.1) y uno que otro mamífero y/o ave.



Fig.1 Fotografía de uno de los cadáveres estudiados ejemplificando el estado de putrefacción en que se encontraban los cuerpos.

2.3. Importancia de los insectos de interés forense

El uso de insectos en el área forense ha adquirido cada vez mayor reconocimiento, debido a que son los primeros organismos en llegar a un cuerpo en descomposición, lo cual ha servido como herramienta en investigaciones donde los restos humanos han sido colonizados por ellos.

Anteriormente, la principal aplicación de los insectos era estimar el lapso de tiempo transcurrido a partir del fallecimiento de una persona hasta al momento en que era encontrado.

Sin embargo con el paso del tiempo la entomología médico legal ha sido aplicada en las siguientes circunstancias:

- Establece el sitio donde se llevó a cabo el fallecimiento, esto debido a la distribución geográfica del insecto y/o artrópodo específico.
- Identifica áreas de trauma y/o laceraciones sufridas en tejidos blandos, ya que estos serán los primeros sitios colonizados por los insectos, principalmente dípteros; los cuales ovopositarán al momento de localizar el cadáver lesionado.
- Determina la presencia o ausencia de drogas y fármacos consumidos anteriormente por la persona acaecida
- Analiza con técnicas moleculares para la identificación de insectos necrófagos encontrados en los cuerpos.
- Identifica a las personas a partir de insectos encontrados y alimentados en el cadáver a cuestión.

Es importante reconocer que en casi todos los estudios, incluso con temperaturas, hábitats, ubicaciones geográficas y diferentes estaciones del año, la secuencia de los grupos de insectos colonizadores de cadáveres son consistentes (Hall, 1995).

2.4 Aplicaciones entomológicas en las ciencias forenses

2.4.1 Intervalo *post mortem*

El intervalo *post mortem* (IPM) se refiere al tiempo transcurrido desde la muerte, hasta el tiempo transcurrido en que se encuentra al cadáver (Byrd & Castner, 2010); proporcionando una importante pieza de información en investigaciones de homicidios y muertes prematuras.

Puede ser determinado a partir de los cambios físicos y químicos ocurridos en el cadáver, así como también por el desarrollo embrionario de los insectos presentes en el cadáver.

Para una determinación precisa del IPM, larvas, pupas, y adultos de insectos encontrados en los cuerpos tienen que ser identificados (Malgorn, 1999), ya que dependiendo de la especie y el estado de desarrollo del ejemplar colectado obtendremos el tiempo de ovoposición y por lo tanto el tiempo de muerte.

También deben evaluarse todos los elementos ambientales posibles (temperatura, humedad relativa, pluviosidad, irradiación solar y nubosidad) y la fauna cadavérica, en especial de dípteros y coleópteros. Así como también el tipo de vegetación (follaje, cobertura y desniveles del terreno), vestimenta, ubicación del cadáver (lugares cerrados, abiertos, e inhumaciones) ya que estos datos influirán directamente en el tiempo de desarrollo de las larvas presentes (Yussef, 2010) las cuales darán como resultado el tiempo de muerte.

2.4.2 Entomotoxicología

Además de su uso en la estimación de intervalos *post mortem*, los insectos pueden servir como muestras fiables y alternas para análisis toxicológicos; cuando en casos específicos existe ausencia de tejidos y fluidos normalmente utilizados para tales fines.

La entomotoxicología tiene como objetivo rastrear todo tipo de drogas y venenos, para determinar la posible causa de muerte y mediante qué forma la presencia de estas sustancias altera el ciclo de los insectos colonizadores en el cadáver a investigar.

Se ha demostrado que la presencia de drogas y/o toxinas en los tejidos en descomposición puede afectar la velocidad y los patrones de desarrollo (Gosselin, 2010), ya que estos tejidos son utilizados como alimentos de insectos necrófagos, los cuales al ingerirlos almacenan estas sustancias en su tejido adiposo así como en la quitina exterior que lo cubre (Hall, 1995), lo que podría alterar las estimaciones del intervalo *post mortem*.

Además, que en recientes estudios se comprueba que el estudio con larvas proporcionan ciertas ventajas técnicas con respecto a muestras de tejido ya que al ser tratadas durante la extracción, tienden a disolverse lo cual hace que la muestra sea más manejable durante su procesamiento. Asimismo, en los resultados cromatográficos es posible apreciar una disminución de agentes contaminantes propios de la muestra (Gosselin, 2010)

2.4.3 Identificación humana a través de insectos

Actualmente las técnicas de identificación forense han avanzado a enormes pasos debido a los diferentes tipos de muestras e indicios biológicos que puedan arrojar información suficiente, para la identificación del cadáver encontrado, así como para el esclarecimiento del crimen y las circunstancias de los hechos (Martínez Jarreta, 1999).

Aunque la identificación humana mediante ADN tiene gran éxito, ésta puede verse comprometida dadas las condiciones y estado en que una muestra biológica es recuperada. Cuando un cadáver se encuentra en avanzado estado de putrefacción la recuperación de una muestra útil puede ser una tarea difícil debido al daño generado en el ADN; la sangre y tejido blando que se recupera de forma habitual suelen estar tan degradados que no es posible la obtención del perfil genético en cuestión, en tales circunstancias la recuperación de muestras estará confinada a materiales óseos, sin embargo, la obtención de ADN a partir de hueso por métodos tradicionales implica un procedimiento largo que se puede prolongar por semanas e incluso meses.

Con los avances en biología molecular y en las técnicas de identificación genética, la identificación de humanos a partir de insectos, a través de métodos de ADN, se está convirtiendo cada vez más común.

Se ha demostrado que es posible la asociación de larvas específicas a restos cadavéricos (Li, 2011) las cuales han servido como apoyo para la identificación del cadáver del cual se alimentaron (Campobasso, 2003) y así mostrar la sociedad

existente entre las larvas y un cadáver en particular (Wells, 2001); ya que la larva al tener hábitos necrófagos almacenará el material humano ingerido del cadáver en el intestino, el cual servirá de referencia para la identificación de la persona acaecida a partir de un análisis genético.

2.5 Principales especies de insectos de interés forense

Los insectos son el grupo de animales más exitosos y abundantes del mundo (Grimaldi, 2005). Durante todas las fases de descomposición tienen una participación de forma activa y sin lugar a dudas contribuyen de manera más eficaz a este proceso por lo cual reciben el nombre de fauna sarcosaprófaga; debido a sus hábitos y preferencias biológicas (Amaldos *et al.*, 2006)

Muchas especies de moscas (Díptera) y escarabajos (Coleóptera) forman parte de esta fauna al ser atraída por los cadáveres, donde se alimentan, viven y crían (Yussef, 2010). Además, cabe destacar que son los primeros organismos en localizar y colonizar de manera secuencial un cadáver (Byrd & Castner, 2010). El orden Díptera comprende cerca de 86,000 especies conocidas (Byrd & Castner, 2010), siendo uno de los órdenes más grandes de insectos, ya que las especies que forman parte de este orden pueden ser encontradas en todos los hábitats (Gennard, 2007).

2.5.1 Familia *Calliphoridae*

Esta familia de insectos contiene moscas comúnmente conocidas como moscas azules y verdes metalizadas. Se trata de un grupo que contiene más de 1,000 especies, los cuales se pueden encontrar en todo el mundo. Que junto con la *Sarcophagidae* y *Muscidae*, son las especies más importantes que proporcionan información relativa a la estimación exacta del período de actividad de los insectos, y por lo tanto representa una porción del intervalo *post mortem*. Las moscas *Calliphoridae* son atraídas por tejidos

humanos y animales en descomposición, carroña, excrementos, algo de material vegetativo y algunas especies explotan heridas abiertas y son utilizadas como hábitat dentro de los seres humanos y animales (miasis) (Byrd & Castner, 2010; Gennard, 2007).

Esta familia incluye las moscas verde botella familiares (género *Phaenicia*) y moscas azules botella (género *Calliphora*), así como las moscas del gusano barrenador (género *Cochliomyia*) (Gaudry *et al*, 2007). Además de su importancia forense, esta familia es extremadamente valiosa en el reciclaje de nutrientes y la ecología de la comunidad con base a su eliminación y degradación de los cadáveres de vertebrados del medio ambiente (Byrd & Castner, 2010).

2.5.1.2 *Phaenicia sericata*

Phaenicia sericata (Méigen) es una especie muy común de la familia *Calliphoridae* la cual puede considerarse cosmopolita, de vivo color verde cobrizo, con palpos amarillentos y una tenue línea longitudinal en el dorso del abdomen alcanzando una longitud de 6 a 9 mm en la etapa adulta (Fig.2) (Byrd & Castner, 2010).

Las larvas de esta especie se desarrollan eficazmente en restos de comida pero es más común localizarlas en tejidos descompuestos y/o carroña. Esta especie es una de las primeras en arribar en restos tanto animales como humanos. Generalmente estos dípteros depositan sus huevos unas horas después del fallecimiento (Byrd & Castner, 2010; Gennard, 2007).

Suele localizarse en cadáveres expuestos de diciembre a marzo; raramente de marzo a mayo, en miasis traumáticas y/o cutáneas (Gaudry *et al.*, 2007).



Fig.2 Fotografía de díptero adulto de la familia *Calliphoridae* género *Phaenicia*

2.5.1.3 *Calliphora vicina* (Rodineau-Desvoidy)

Comúnmente conocida como mosca azul. Esta especie tiene una distribución cosmopolita. *C. vicina* es una mosca grande que durante su etapa adulta alcanza un rango de entre 10 a 14 mm, de cabeza negra con la parte inferior de la boca amarillorrojiza y tórax con coloración negra azul-verdoso oscuro (Fig.3) (Byrd & Castner, 2010).

Los adultos son atraídos en algunos tipos de materia descompuesta y frecuentemente en fruta podrida, carne descompuesta y heces.

Generalmente es una de las especies dominantes en el arribo y colonización de cadáveres humanos. Siendo de las primeras especies en arribar a cadáveres localizados en zonas urbanas, así como también favorece a cadáveres expuestos a la sombra (Gaudry *et al*, 2007).

Además es causante de miasis en humanos y animales (Gennard, 2007).



Fig.3 Fotografía de díptero adulto de la familia *Calliphoridae* género *Calliphora*

2.5.2 Familia *Sarcophagidae*

Conocidas como moscas de la carne esta familia comprende cerca de 2000 especies la mayoría de las especies se encuentran en las regiones templadas y/o tropicales. Los adultos son localizados de manera abundante en interiores de hábitats o en condiciones adversas que imposibilitan la llegada de otros insectos, por esta razón se encuentran entre los primeros insectos en localizar restos cadavéricos después de los *Calliphoridaes*. Se alimentan de tejidos humanos y animales en descomposición tanto en fases tempranas y tardías, así como de vegetación descompuesta (Byrd & Castner, 2010). Las larvas o gusanos se alimentan comúnmente de algún tipo de material de origen animal. Además de carroña, se alimentan de excrementos o carnes al descubierto provocando miasis, asimismo pueden participar en las transmisiones mecánicas de enfermedades (Gaudry *et al.*, 2007).

Los adultos alcanzan una longitud que varía de 2-14mm, comúnmente tienen rayas grises a negras de manera longitudinal en el tórax, algunas de ellas presentan una

coloración similar a un tablero de ajedrez. Estas moscas jamás poseen una coloración metálica, tienen aristas plumosas en su totalidad y otras solo en su base (dependiendo de la especie). Cuerpos cubiertos de pequeñas cerdas y los ojos se encuentran separados en ambos sexos, en algunas especies tienden a tener una coloración rojiza y a simple vista es posible apreciar su genitalia (Byrd & Castner, 2010).

2.6 Identificación forense

La identificación forense es el conjunto de técnicas destinadas a reconocer a una persona viva, muerta, o a sus restos dentro un marco de carácter legal. Esto a partir de los caracteres que hacen a un individuo distinto de otro, centrándose en cualquier componente de la persona desde lo más trascendente hasta lo puramente biológico. Donde al final del proceso del análisis se hace una comparación del resultado obtenido en el estudio con otros cuyo origen es conocido, en caso en que sean iguales servirán para confirmar que se trata de la persona a identificar y en caso de que no coincidan permitirá descartar que se trate del mismo individuo (Martínez Jarreta, 1999).

Los métodos de identificación son variados y dependerán de las condiciones en que se encuentre un individuo luego de su muerte (Butler, 2010). La identificación puede realizarse a partir de los elementos con que se asocia una persona, siendo sus objetos personales elementos de gran importancia, por lo que prendas e identificaciones en forma de credenciales o cartillas juegan un rol importante. Sin embargo, en muchos casos los objetos personales suelen dejar una dosis de duda, ante tal hecho se prefieren rasgos o características biométricas presentes aún en el individuo, de esta forma son las huellas dactilares, tatuajes, formas de los dientes, talla y forma de los huesos, color de la piel y cabello así como otros rasgos morfológicos, elementos clave en la identificación humana (Martínez Jarreta, 1999). A pesar de lo anterior, es frecuente que sólo se localicen fragmentos de una persona, ante ello, el trabajo de médicos y antropólogos puede ser limitado por lo que se deberá contar con otros

elementos de auxilio, siendo los estudios de ADN el método más recurrente y exacto entre cualquier otro (Charlotte, 2004).

2.6.1. Identificación mediante ADN.

El principio que rige la identificación está determinado por marcas biológicas que pasan de padres a hijos, la mayoría no observables y que se encuentran presentes no sólo en los genes, sino en todo el genoma. Dicha herencia o información genética presente en el ADN de cualquier persona y que es concedida por ambos progenitores se encuentra presente en todas las células, salvo aquellas carentes de núcleo y es la misma desde el momento de la concepción de una persona hasta el día en que muere. La identificación mediante ADN se basa en ello, ubica sitios particulares del ADN de una persona y la compara con el ADN de padres e hijos, e incluso con el de tíos, primos, abuelos y otros familiares vinculados o emparentados biológicamente (Primarosa y Zannoni, 2005). La capacidad para poder comparar el ADN de una persona con la de un familiar estará determinada entonces con cierta región de interés y el tipo de herencia que se tiene, por lo que el ADN autosomal, o que se encuentra en el núcleo, servirá para comparar familiares de línea directa tales como padres e hijos, mientras que el ADN del cromosoma Y podrá ubicarse en familiares emparentados con línea paterna, en tanto que el ADNmt con aquellos vinculados por línea materna, en virtud de que tanto el ADN del cromosoma Y como ADNmt, no recombinan al ser heredados (Butler, 2010).

Los sitios particulares del ADN que son empleados en la identificación son genes que codifican para un carácter hereditario y reciben el nombre de alelos cuando el fenotipo es diverso para ese carácter según el alelo presente; aunque también son llamados marcadores de ADN, en virtud de que funcionan como marcas y que por tanto pueden ser comparadas entre una persona y otra, no será de extrañar que dichas marcas serán las que determinen los métodos de identificación basada en ADN (Primarosa y Zannoni, 2005).

La utilización del ADN para realizar análisis en el ámbito de la administración de la justicia ha adquirido una importancia de gran magnitud en casos del ámbito familiar (demandas de paternidad) y penales, en concreto en aquellos hechos delictivos que dejan vestigios biológicos del autor sobre la víctima, el lugar o los instrumentos del delito, así como de la víctima sobre el autor o sus pertenencias (delitos violentos como homicidio y ataque sexual de las personas), pero también es un instrumento particularmente útil para la identificación de cadáveres. (Martínez Jarreta, 1999).

2.6.2 El ADN como elemento de identificación

El ácido desoxirribonucleico (ADN) de cualquier organismo vivo está constituido por dos cadenas de nucleótidos que forman una doble hélice, cada nucleótido está formado a su vez por una base nitrogenada (Adenina, Guanina, Citosina y Timina), una pentosa (azúcar de cinco carbonos) y un grupo fosfato (Charlotte, 2004); la doble cadena de ADN está formada por un fenómeno de complementariedad que le confiere sus nucleótidos en donde, de acuerdo con la regla Watson-Crick, la adenina se unirá con una timina, mientras que la citosina con la guanina, en el primero de los casos a través de dos enlaces mientras que en el último de los casos con triple enlace, en ambos casos los enlaces son del tipo puente de hidrógeno (Primarosa y Zannoni, 2005; Butler, 2005).

La asociación de grupos de tres pares de bases en el ARN mensajero (ARNm) que se sintetiza a partir del ADN, dan lugar a la formación de codones que permiten la síntesis de aminoácidos a través de la traducción, los cuales a su vez darán lugar a la formación de proteínas y otras moléculas biológicas de importancia (Carracedo, 2009).

El ADN es por tanto una molécula capaz de almacenar la información requerida para la síntesis de productos génicos que determinan un organismo en cuestión. La información para los productos génicos a ser generados recibe el nombre de genes, que desde un punto de vista molecular general serán aquellas regiones de ADN susceptibles para la síntesis de proteínas y/o productos génicos funcionales (Butler,

2010). En consecuencia existirán en el ADN regiones codificantes y no codificantes, las primeras menos abundantes con respecto a las segundas, pero en ambos casos regiones informativas (Primarosa y Zannoni, 2005).

2.7 Polimorfismos de ADN

Todos los individuos de la especie humana son idénticos entre sí en un 99,98% de su ADN y sólo en el 0,02% restante (~600 000 nucleótidos) residen las diferencias entre unos y otros, que nos hacen un ser único (salvo en el caso de gemelos univitelinos que son genéticamente idénticos) (Butler, 2010). Dentro de esta pequeña proporción de ADN distintivo existen regiones hipervariables o polimórficas que son las que nos permiten usar la información genética con fines de identificación (Farfán, 2004). El estudio de marcadores polimórficos se ha convertido en una herramienta imprescindible en el análisis genético de vestigios biológicos de interés forense (Martínez Jarreta, 1999).

Existen dos tipos de polimorfismos, uno ellos llamado *de secuencia*, en el que los alelos de un mismo locus se diferencian en la base (A, C, G o T) presente en una o más posiciones concretas, en el otro de los casos llamado *de longitud*, en el que los alelos de un locus se diferencian entre ellos por el número total de bases que lo componen (Primarosa *et al.*, 2005).

El análisis de los polimorfismos de secuencia puede detectarse de forma variada y con múltiples métodos, en todos los casos lo que se pretende es reconocer la mutación o mutaciones previstas, su abanico comprende el análisis de RFLPs (polimorfismos de longitud por fragmentos de restricción) hasta los modernos métodos de secuenciación de segunda generación pasando por PCR en tiempo real en sus diferentes modalidades hasta secuenciación directa mediante electroforesis capilar (Butler, 2005).

En lo que refiere a los polimorfismos de longitud, estos pueden ser detectados a través métodos estándar como es la electroforesis en geles, tanto acrilamida como agarosa pero también a través de novedosos métodos como espectrometría de masas y sus

variantes, aunque es la electroforesis capilar el método empleado por excelencia (Martínez Jarreta, 1999).

2.8 Métodos de identificación basados en el análisis del ADN

El estudio de casos forenses humanos se hace actualmente empleando STRs autosomales y aunque no es el único método, sí es el de mayor uso. El uso extendido de los STRs se debe a la alta variabilidad o polimorfismos que en ellos se puede encontrar, y porque son marcadores altamente conservados en las regiones de ADN que los flanquean, además de que su análisis puede realizarse en conjunto desde su amplificación hasta su detección, la cual suele realizarse en forma semiautomatizada (Butler, 2010). Es por ello que se han desarrollado sistemas comercialmente en formato múltiplex (en donde la reacción de PCR se lleva a cabo en un sólo tubo, en el cual se amplifican múltiples loci); otros recursos de variación genética que encuentran aplicaciones más especializadas son los marcadores para SNPs autosomales, marcadores para el cromosoma Y, cromosoma X y ADNmt (Kobilinsky *et al.*, 2007).

2.8.1 Análisis de STRs autosomales

No será difícil advertir que los polimorfismos más utilizados en los laboratorios de genética forense sean los STRs, entre otras características además de las ya antes referidas se tiene que los STRs son de las regiones de ADN repetitivo más abundantes a lo largo de todo el genoma (Kobilinsky *et al.*, 2007). Los STRs se caracterizan por estar compuestos de secuencias de entre 2 a 7 pb que se repiten de forma consecutiva, motivo por el cual se les califica como “en tándem”, siendo precisamente la variación en el número de veces que se repite la unidad de secuencia la base de su polimorfismo genético (Butler, 2005) . Debido a su abundancia en el genoma humano, a su naturaleza polimórfica y a su posibilidad de ser estudiados fácilmente mediante técnicas de muy alta sensibilidad, como la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés) incluso a partir de muestras antiguas que contienen un ADN altamente degradado y la posibilidad de realizar una tipificación genética de alta resolución que

permita una asignación inequívoca de los alelos, son razones fundamentales que han convertido a estos marcadores genéticos en los más utilizados en la genética forense. Gracias a los STRs es posible realizar la comparación del perfil genético obtenido de una evidencia (manchas de sangre, saliva, pelos, huesos etc.) con el perfil genético obtenido a partir de una muestra biológica perfectamente reconocida llamada “muestra de referencia” procedente de una persona en particular o de los familiares con los que se presume una relación biológica (Martínez Jarreta, 1999).

El primer sistema múltiplex ampliamente utilizado (conocido como “quadruplex”) consistió simplemente en cuatro STRs. Sin embargo, y pese a que tenía una alta probabilidad de coincidencia de aproximadamente 1 en 10,000, los primeros casos criminales que implicaban perfiles STRs autosomales fueron reportados conjuntamente con perfiles de VNTRs *unilocus* (Kobilinsky *et al.*, 2007). La adición subsecuente de dos STRs complejos altamente variables disminuyó la probabilidad de coincidencia de aproximadamente 1 en 50 millones. Estos sistemas múltiplex de segunda generación (SGM) también incluían un análisis de PCR sobre los genes del amelogenina homólogos en los cromosomas X e Y, de tal modo que podían revelar el sexo del donante de la muestra. Llegó a estar claro que los STRs eran más sensibles que otros métodos y sin ambigüedad en la asignación de los alelos, siendo el método conveniente para el desarrollo de bases de datos. En 2000, los cuatro loci adicionales fueron agregados al sistema múltiplex, que fue retitulado como SGM Plus, de tal modo que se pudo reducir la probabilidad de coincidencia a menos de 10⁻¹³. Actualmente existen diversos sistemas, no obstante tienen muchos loci en común. El CODIS (Sistema de Índices Combinado de ADN) de los Estados Unidos contiene 13 STRs más la prueba de sexo que ofrece el análisis de amelogenina, con una probabilidad de coincidencia más baja que el sistema empleado por el Reino Unido. Generalmente, se utilizan dos sistemas múltiplex por separado en los Estados Unidos para mejorar su eficacia, en respuesta a ello, los nuevos sistemas múltiplex son capaces de amplificar 16 loci en una sola reacción (en la que se incluye a la amelogenina). En Alemania, se utilizan ocho loci, incluyendo el locus *ACTBP2*. Las colaboraciones internacionales han

recomendado el uso de los principales loci para facilitar el intercambio de datos a nivel internacional, por ejemplo, un sistema de siete para el uso común en Europa.

Las probabilidades de coincidencia obtenidas con los STR múltiplex son tan bajas que sus recíprocos exceden muchas veces más a toda la población humana. Sin embargo, los reportes de la evidencia del ADN en una corte o juzgado tienen un acercamiento conservador, cuando las probabilidades de coincidencia son bajas, por lo que se utilizan comúnmente los métodos basados en probabilidad para tomar en cuenta los factores que se aplican a un caso en particular

Los sistemas múltiplex se analizan empleando equipos de secuenciación automatizada. Éstos son generalmente los sistemas multicanales de electroforesis capilar que se utilizan para detectar los productos de PCR, que fueron marcados con fluorescencia y se combinan con el manejo de sistemas de información automatizada de los laboratorios, incluyendo códigos de barra para las muestras, con objeto de reducir los posibles errores del operador. Esta automatización reduce los costos y aumenta el rendimiento en el procesamiento de las muestras. La interpretación (que define los alelos en un perfil) es más difícil de automatizar. Sin embargo, ha habido progreso para convertir la interpretación subjetiva de los expertos en reglas (heurísticas) programables para el desarrollo de software de computadora (conocidos como "sistemas expertos"), previstos generalmente para complementar, más que para sustituir, el ojo experto humano. Éstos consideran el tamaño del fragmento (medido exactamente con respecto a marcadores de estándares internos y a una escala alélica usada para identificar los alelos), representada por la altura del electroferograma y área máxima y valoración del balance de heterocigotos, incluyendo un chequeo automatizado para interpretar artefactos tales como los *stutters* los cuales son generados en PCR (Kobilinsky *et al.*, 2007). La calidad del ADN de las muestras de referencia (tomadas de individuos para crear bases de datos) es predeciblemente buena y hace de los sistemas automatizados para la tipificación e interpretación un procedimiento relativamente directo. En el Servicio de Ciencias Forense Británico, si dos sistemas expertos que trabajan con

diversos principios coinciden en un perfil, éste se acepta, por lo que son sujetos a pruebas regulares con controles ciegos. Para las muestras empleadas en el estudio de casos, la valoración preliminar es vital a fin de poder determinar el mejor método de procesamiento, sin embargo, la automatización es más difícil puesto que la calidad y la cantidad del ADN son variables y las mezclas de ADN se encuentran a menudo complicando la interpretación. Algunas anomalías en los perfiles también pueden tener lugar por razones biológicas (por ejemplo, las mutaciones) y si se utilizan métodos que son bastante sensibles para detectar una sola molécula de ADN (bajo número de copias), la contaminación basada en el laboratorio de uno o múltiples alelos es muy posible, de modo que son necesarias las estrategias para su interpretación.

El análisis forense del ADN basado en STRs ha alcanzado la aceptación mundial del público y de los profesionales, como un medio confiable en la identificación individual, teniendo un impacto importante en los sistemas de impartición de justicia. El aumento en la sensibilidad de los métodos del ADN ha permitido la reapertura y solución de casos inesperados (cold cases) como se les llama en los Estados Unidos (Kobilinsky *et al.*, 2007), que es un equivalente en México con los casos que se le ha dado “carpetazo” como se les refiere de manera coloquial. El uso de los STRs ha llevado a la exoneración de presos condenados por la justicia (algunos de los cuales aguardaban una ejecución con pena de muerte). La mayoría de estos casos han estado en los Estados Unidos (muchos de estos casos llevados por el Proyecto Inocencia), donde la prueba “postconvicto” atrae el financiamiento federal, no debe de extrañar que casos como éstos se den en otras partes del mundo.

Entre los sistemas comerciales de STRs, o kits de identificación como también se les conoce, destacan tres casas o corporativos comerciales dedicados a su suministro, *QIAgen*, *Promega* y *Applied Biosystems*, los dos últimos con gran impacto en México al proveer equipo, reactivos y suministros para laboratorios gubernamentales y privados, siendo lo anterior consecuencia de cumplir con normas internacionales en su

manufactura, en que se incluye la acreditación de sus instalaciones así como estudios de genética de poblaciones para algunos tipos de sistemas de identificación.

A continuación se enlistan algunos sistemas de identificación humana, los cuales han sido empleados en la presente investigación, entre ellos siendo *Powerplex 21 System*, *Powerplex Y23 System*, marcadores STRs de última generación con consecuentes beneficios en la identificación humana.

2.8.1.2 Identifiler

Es un sistema múltiplex que amplifica quince loci STRs y una región del gen de la amelogenina el cual determina el sexo. Identifiler cuenta con trece de los loci requeridos para el Sistema de Índices Combinados de ADN (CODIS). Los loci que amplifican en el sistema *AmpF!STR® Identifiler™* PCR de *Applied Biosystems* son: *D8S1179*, *D3S1358*, *vWA*, *D21S11*, *D16S539*, *D18S51*, *D5S818*, *D13S317*, *D7S820*, *TH01*, *TPOX*, *CSF1PO*, *FGA*, *D2S1338*, *D19S433* y *amelogenina*.

2.8.1.3 Minifiler

El kit de identificación humana *Ampf!str® Minifiler* de *Applied Biosystems* obtiene resultados de ADN a partir de muestras comprometidas que anteriormente han dado poca o ninguna información genética, las cuales se caracterizan por ser muestras con ADN degradado y/o de poca cantidad, por lo que en casos críticos pueden ser una alternativa excelente para el análisis de muestras difíciles, brindando la oportunidad de obtener resultados interpretables. Cabe destacar que este es el primer kit mini STR disponible comercialmente en el mundo. El sistema *AmpF!STR® Minifiler™* de *Applied Biosystems* amplifica ocho loci STRs autosómicos los cuales son: *D13S317*, *D7S820*, *D2S1338*, *D21S11*, *D16S539*, *D18S51*, *CSF1PO* y *FGA* y *amelogenina*. Los loci abarcan un rango de entre 70 a 283 nucleótidos.

2.8.1.4 Powerplex 21 System

PowerPlex® 21 System permite la amplificación en múltiplex y detección por fluorescencia de cuatro colores de veinte loci STRs además de amelogenina. Las mejoras del sistema PowerPlex 21, estriban en contar con cuatro marcadores adicionales a los tradicionales con que cuenta Identifiler y poseer una química que permite la amplificación de ADN aún en presencia de agentes contaminantes tales como inhibidores de PCR, por lo que representa uno de los sistemas de mayor sensibilidad, al amplificar muestras y el sustrato en que se encuentran. Los marcadores adicionales hacen de este sistema uno de los más confiables en pruebas de identificación aun cuando se cuente con fenómenos de mutación en alguno de sus marcadores. PowerPlex® 21 System comprende los siguientes marcadores: *D1S1656, D2S1338, D3S1358, D5S818, D6S1043, D7S820, D8S1179, D12S391, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, CSF1PO, FGA, Penta D, Penta E, TH01, TPOX, vWA y amelogenina.*

2.8.1.5 Powerplex Y23 System

Durante los últimos quince años, la tipificación multiplex de STRs por medio de PCR se ha convertido en una poderosa herramienta para el análisis de casos forenses, especialmente en casos de agresión sexual, donde por lo general la evidencia consiste en mezclas que contienen grandes cantidades de ADN femenino en la presencia de cantidades menores de ADN masculino.

Los marcadores STRs del cromosoma Y (*Y-STRs*) tienen cualidades distintas de marcadores autosómicos y son útiles para la identificación humana. Los marcadores *Y-STRs* se encuentran en la región no recombinante del cromosoma Y (*NRY*) teniendo la capacidad de producir un perfil haploide cuando son amplificados a partir de una muestra de ADN masculino. Powerplex Y23 System presenta como distintivo el contar con un elevado número de marcadores que le confieren un alto poder de discriminación. Esta característica es de gran ayuda para diferenciar muestras

mezcladas hombre/mujer mediante la discriminación del material genético femenino, generalmente procedentes de delitos sexuales. Powerplex Y23 System® permite la amplificación y detección de 23 loci: *DYS576, DYS389I, DYS448, DYS389II, DYS19, DYS391, DYS481, DYS549, DYS533, DYS438, DYS437, DYS570, DYS635, DYS390, DYS439, DYS392, DYS643, DYS393, DYS458, DYS385a / b, DYS456* e *Y-GATA-H4*.

2.9 Extracción de ADN

Para estudiar la molécula de ADN con fines identificativos es necesario, previamente aislar dicha molécula en su forma nativa, libre de proteínas y otros componentes celulares. La extracción de ADN es un paso fundamental en el análisis genético de muestras forenses, pues el éxito del estudio puede verse afectado en gran medida si no se realiza un buen aislamiento de los ácidos nucleicos (Carracedo, 2005).

Con frecuencia las muestras forenses analizadas implican una dificultad durante su análisis, debido a la degradación que sufren por el medio en que se encuentran, así como por el mismo proceso autodestructivo ocurrido en el cadáver, y por las trazas de otros compuestos contaminantes los cuales pueden inhibir la PCR (Goodwin *et al.*, 2007) Es por ello que, la eficiencia y la sensibilidad del procedimiento de extracción es fundamental para la obtención de resultados favorables en una muestra forense (Carracedo, 2005).

El método de fenol cloroformo es una extracción forense bien establecida. De hecho es el método a elección para muestras sospechosas de contener sustancias inhibitoras en la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) (Carracedo, 2005). Sin embargo, existe una amplia batería de métodos de extracción a emplear según el tipo de muestra que se trata, la mayoría de ellos correspondientes a sistemas comerciales lo cuales tienen por objetivo facilitar la extracción eliminando la mayor cantidad de agentes contaminantes de manera fácil y pronta (Goodwin *et al.*, 2007).

La extracción de ácidos nucleicos sobre muestras biológicas recientes o en condiciones óptimas (como por ejemplo la sangre líquida) puede seguir diferentes protocolos

(Sambrook *et al.*, 1989), la mayoría con resultados óptimos, salvo en aquellos casos en que la muestra se encuentra altamente degradada. La mayoría de los métodos se fundamentan en tres etapas:

a) **Digestión o lisis celular.** En esta etapa se adiciona a la muestra una solución amortiguadora compuesta por un detergente iónico como el duodecil sulfato de sodio (SDS), una enzima proteolítica como proteinasa K, la cual se inactiva fácilmente por calor lo que evita que interfiera en la reacción de amplificación de PCR (Higuchi, 1989) y una sal, generalmente Tris-HCl. El primero de los componentes tiene por objeto disgregar las membranas lipídicas de la célula y desnaturalizar proteínas, en tanto que la enzima proteolítica servirá para desnaturalizar la mayor cantidad de proteína presente en el extracto celular al tiempo que la sal conferirá el pH óptimo para la adecuada acción de la enzima.

b) **Purificación.** Los métodos de purificación son variados y tienen por objetivo remover la mayor cantidad de remanentes celulares que permitan dejar ADN libre, en el caso en que se emplea un método de extracción fenólica se busca que el ADN sea separado de sus contaminantes a través de diferencia de polaridad que estos casos se consigue mediante el uso de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:24:1). Dicha dilución en su fase fenólica, retiene las proteínas, mientras que en su fase acuosa retiene ácidos nucleicos. Con cada lavado, se eliminan los remanentes de membranas y retiran proteínas provenientes de la célula y la proteinasa K, con lo que se eleva la pureza del ADN. La purificación fenólica no es la única, existen métodos que unen el ADN a resinas, siendo la sílica u óxido de sílice la más recurrida y que forma parte de los principales métodos comerciales de extracción en modalidad de columnas.

c) **Precipitación y/o recuperación de ADN.** El uso de etanol en presencia de sales (por ejemplo Acetato Sódico) y bajas temperaturas suele ser el método por excelencia para la recuperación de ADN, además que el uso de alcohol 70 % favorece su limpieza. Con este método se logran retirar sales, proteínas y otros componentes celulares separándolos de los ácidos nucleicos mediante centrifugación. El ADN así obtenido es de doble hebra y es ideal para todo tipo de análisis molecular. Sin embargo, la recuperación de ADN dependerá el método de extracción empleado, en el caso del uso

de la sílica, su aislamiento puede conseguirse con una solución amortiguadora como TE (Tris-EDTA) a pH 8 u otra solución con igual pH (Goodwin *et al.*, 2007).

2.10 Cuantificación de ADN.

Después de la recuperación del ADN, prosigue un paso llamado cuantificación, que consiste en determinar de forma aproximada la cantidad de ADN recuperado. La cuantificación se realiza de diferentes formas, generalmente se lleva a cabo por espectrofotometría, electroforesis en geles de agarosa, entre otras técnicas cuantitativas, pero debido a que el ADN extraído puede resultar en extremo variable en cuanto a su cantidad y calidad, se ha optado por métodos más sensibles. PCR en tiempo real es en la actualidad el método más sensible y preciso con que se cuenta, permite cuantificaciones tanto relativas como absolutas, es decir, puede cuantificar ADN con base en su cantidad relativa sin discriminar el organismo u organismo del que procede, pero también de regiones y tamaños específicos para una especie en particular, lo cual hace que la cuantificación bajo estas condiciones sea llamada absoluta. El principio con que se rige esta técnica se basa en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) bajo presencia de un molécula reportera o reveladora, que consiste de un fluorocromo capaz de emitir fluorescencia a una determinada longitud de onda, y que puede ser integrada como agente intercalante en la doble cadena del ADN o como parte de los mismos oligonucleótidos que permiten la amplificación, en ambos casos lo que se busca es una lectura fluorescente que es directamente proporcional a la cantidad de ADN amplificado, ello mediante equipos de termociclado con alta sensibilidad de lectura a los fluorocromos empleados durante cada ciclo, motivo por el cual dicha técnica es llamada de cuantificación en tiempo real (Primarosa y Zannoni, 2005; Butler, 2005). Actualmente, la cuantificación en tiempo real es desarrollada de manera ordinaria en muchos laboratorios de ADN forense mediante sistemas comerciales los cuales reducen errores humanos, consumo de tiempo-hombre y la obtención de resultados confiables.

2.11 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La Reacción en la Cadena de la Polimerasa (PCR) es un proceso enzimático en el que una región específica de ADN se replica una y otra vez para producir muchas copias de una secuencia particular (Butler, 2005) mediante una reacción enzimática cíclica (Martínez Jarreta, 1999).

La introducción de la PCR en la Genética Forense ha hecho posible el análisis de una gran variedad de muestras cuyo estudio resultaba imposible mediante las técnicas convencionales (Butler, 2005).

Los componentes básicos en una mezcla de reacción de PCR son: el ADN bicatenario o molde extraído a partir de la muestra objeto de análisis, un par de oligonucleótidos o cebadores (pequeños fragmentos de ADN de cadena simple de secuencia complementaria a las regiones que flanquean al segmento de ADN de interés) que mediante su unión específica al ADN molde permiten iniciar la reacción, la polimerasa (enzima que cataliza la reacción), nucleótidos (que servirán de sustrato con los que sintetizar las nuevas cadenas de ADN), además de una solución amortiguadora y las sales necesarios para el óptimo funcionamiento de la enzima (Farfán, 2004).

Un proceso estándar de PCR implica la repetición de un número determinado de ciclos, cada uno de los cuales consta de tres pasos:

- a) Desnaturalización: mediante elevación de la temperatura a 94-95 °C las dos cadenas de la doble hélice de ADN molde se separan, quedando en forma de cadena simple.
- b) Hibridación: al disminuir la temperatura a 50-60 °C, los cebadores se unen al ADN molde justo en el lugar de sus secuencias complementarias (su pequeño tamaño favorece esta unión frente a la posibilidad de renaturalización o unión de la cadena complementaria de ADN molde).
- c) Extensión: el calentamiento a 72 °C (temperatura óptima de funcionamiento de la polimerasa), permite la extensión de la cadena de ADN a partir de los cebadores mediante la adición sucesiva de nucleótidos tomando como referencia la secuencia del ADN molde (Farfán, 2004).

Estos tres pasos se repiten cíclicamente entre 25 y 35 veces, incluso más, de forma que el proceso total de la reacción dura aproximadamente de 2 a 4 horas según el número de ciclos y tiempo de cada paso. En cada ciclo se produce un incremento exponencial en el número de copias, de forma que el resultado de la reacción de PCR es la obtención de millones de copias del segmento de ADN que nos interesa (Butler, 2005).

2.12 Electroforesis capilar

La electroforesis se define como el movimiento de partículas o moléculas cargadas en un medio líquido, generalmente acuoso, producido por la influencia de un campo eléctrico (Kobilinsky *et al.*, 2007).

La electroforesis capilar se ha desarrollado rápidamente como técnica analítica aplicada a un amplio rango de áreas por su alta eficacia en la separación, sus posibilidades de automatización y su compatibilidad con pequeñas cantidades de muestra (Charlotte, 2004). Esta técnica se basa en los fundamentos de la cromatografía y se desarrolla en un finísimo capilar que está lleno de un polímero a través del cual se moverán los fragmentos de ADN al aplicarle una diferencia de potencial. La gran ventaja del uso de capilares radica en que permiten una efectiva disipación del calor y por ello se pueden aplicar elevados voltajes en la electroforesis (200-500 V/cm) que se traducen en un tiempo de separación de los fragmentos de ADN mucho más corto y en un elevado poder de resolución. Debido a la extrema delgadez del capilar es imposible rellenarlo de polímero manualmente, pues se necesita una presión que sólo los sistemas automatizados pueden conseguir (Kobilinsky *et al.*, 2007). Por ello la electroforesis capilar es un proceso que se desarrolla de manera totalmente automatizada. La detección de los fragmentos se puede realizar de múltiples formas, entre ellas con un láser, por lo que en este caso es necesario que el producto amplificado esté marcado de forma fluorescente, requisito que se cubre con los modernos sistemas de identificación múltiple, lo cual se traduce en el análisis paralelo de un gran número de

marcadores moleculares, para el caso de STRs, desde 5 hasta 25 marcadores, los cuales pueden agrupar diferentes fluorocromos, por lo que la fluorescencia emitida y su tamaño les permite ser caracterizados hasta la mínima diferencia, que se precisa en una base (Butler, 2010).

3. Justificación de estudio y objetivos

Cuando se presenta un cadáver o restos cadavéricos cuya identidad se sospecha pero no se pueda establecer con total seguridad por métodos tradicionales, se puede recurrir a un estudio genético como complemento o como única vía posible de identificación. Constantemente la toma de muestra en casos donde los cadáveres presentan un avanzado estado de putrefacción o esqueletizados se realizan después de un periodo largo tras la muerte, lo cual produce un grave daño al ADN, esto debido a los procesos destructores en el cadáver.

Sin embargo en la actualidad se ha demostrado que es posible la asociación de larvas específicas a restos de cadáveres las cuales han servido como apoyo para la identificación del cadáver del cual se alimentaron, presentando un intervalo *post mortem* hasta de cuatro meses.

Es por eso que conocer el estado de digestión así como la naturaleza alimenticia de estos organismos puede aportar datos en una investigación, asimismo puede ser una alternativa en casos en que dada la descomposición del cadáver no es posible la obtención de ADN de tejidos blandos dejando como única alternativa la extracción de ADN de hueso, el cual es un procedimiento largo y laborioso.

Por lo tanto este estudio es justificado como alternativa para la identificación de cadáveres putrefactos, teniendo como objetivos los siguientes:

Objetivo General

Obtener el material genético humano (ADN) a partir del contenido gástrico de larvas de dípteros colectadas y alimentadas en cadáveres humanos.

Objetivos Particulares

Determinación taxonómica de los organismos colectados

Comparar el material genético obtenido del contenido gástrico de las larvas de dípteros con el de la muestra de referencia del cadáver humano.

Comparar contenido gástrico de larvas de díptero en segundo y tercer estadio para verificar en cuál de éstos existe una mayor recuperación de material genético.

Comparar técnicas de preservación para verificar cuál nos permite una mayor recuperación de ADN humano.

4. Material y métodos

4.1 Colecta y preservación de muestras

Las larvas fueron obtenidas de cadáveres no identificados ingresados al anfiteatro del Instituto de Ciencias Forenses perteneciente al Tribunal Superior de Justicia del Distrito Federal, México, de cada uno de ellos se colectaron larvas en segundo y tercer estadio, las cuales fueron divididas en dos grupos: el primero para la preservación e identificación del ejemplar el cual fue determinado taxonómicamente tomando en cuenta su morfología externa y de ser necesaria la morfología interna; las especies observadas y empleadas fueron *Phaenicia sericata* y *Calliphora vicina*, para este fin se hizo uso de claves taxonómicas, donde el único equipo necesario para la identificación fue un microscopio Stereo Discovery V12 marca Carl Zeiss. La preservación de las larvas para este proceso se llevó a cabo mediante solución XAAD (4:6:5:4 Xilol-alcohol isopropílico-ácido acético glacial-dioxano) la cual mantiene en mejores condiciones las muestras colectadas ya que al ser un líquido fijador de tejidos internos es de gran utilidad para conservar intactas las partes para el estudio e identificación de las mismas (Borror *et al.*, 1989; Llorente *et al.*, 1985).

El segundo grupo tuvo por objeto la extirpación de estómago e intestino de las larvas para la obtención de ADN, este grupo fue sometido a dos técnicas distintas de preservación.

El primer método utilizado consistió en matar las larvas con agua hirviendo durante un minuto, subsiguientemente fueron almacenadas en frascos con etanol al 70% y guardadas en refrigeración a 4°C para su posterior análisis.

La segunda técnica consistió en una serie de lavados (3-4) con agua corriente para posteriormente congelarlas a -22°C.

Con objeto de establecer la certeza de los perfiles obtenidos a partir del contenido gástrico larval, se procedió a la extracción de ADN de los cadáveres de donde dichas larvas fueron colectadas. A efecto de reducir la posibilidad de colecta de larvas

alimentadas de dos o más cuerpos se procedió a la colecta de larvas de órganos torácicos así como de encéfalo.

4.2. Extracción de ADN de larvas

Técnica de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico estandarizada para el presente trabajo

A cada 250 mg de estómagos e intestino de larvas se adicionó, 1 mL de buffer de digestión (Tris-HCl 10 mM pH 8.0; EDTA 0.1 M pH 8.0; SDS 5%), más 50 μ L de proteinasa K (10 mg/mL) y 10 μ L de ditionitrietol (DTT) (1.0M). La muestra entonces fue puesta en digestión por toda la noche (12 horas son suficientes, no más de 24 horas) a 56 °C en termobloque o baño seco.

Al término de la incubación la muestra se centrifugó a velocidad máxima (13,500 a 15,000 rpm) a temperatura ambiente por 3 min y se recuperó el sobrenadante.

El sobrenadante se dividió en alícuotas de 500 μ L y se adicionaron 500 μ L de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló en Vortex por 1 min con agitación máxima y se centrifugó a velocidad máxima (13,500 a 15,000 rpm). Se recuperó la fase acuosa y el fenol y las trazas fueron eliminadas.

Nota. Se evita arrastrar cualquier traza de fenol, lo cual se consigue dejando una pequeña cantidad de fase acuosa, de haber arrastrado alguna cantidad de fenol, centrifugue y recupere la fase deseada, dejando nuevamente una pequeña fracción de la fase acuosa.

La fase recuperada fue dividida en alícuotas de 400 μ l en tubos para micro centrífuga de 1.7 mL y se adicionó 1 mL de isopropanol al 100%, se mezcló suavemente en Vortex y se centrifugó a 15000 rpm por 30 minutos a 0°C.

Al término de la centrifugación se eliminó el isopropanol por decantación y el botón fue secado a 55 °C.

Al tubo se adicionan 100 (cuando se trató de 30 larvas) y/o 30 (una sola larva) μL de agua estéril libre de nucleasas y se incuba por 5 minutos a 55 °C.

Para la eliminación completa de agentes contaminantes se realiza una segunda purificación por medio del sistema de columnas Qiaquick tal como se indica en los protocolos del proveedor. El ADN de las larvas se eluye en 30 μL de solución amortiguadora TE.

4.3 Extracción de ADN de hueso como muestra de referencia

Cuando se desea realizar una extracción de ADN de restos óseos con fines forenses es importante se tengan ciertas consideraciones:

1. Las prácticas forenses suelen exigir el análisis de marcadores de tipo STR, los cuales se encuentran presentes en ADN nuclear, se sugiere entonces se emplee una mayor cantidad de restos óseos. Es preferible tener un exceso de ADN que cantidades límite mínimas para estadios posteriores.
2. Los restos óseos modernos suelen presentar altas cantidades colágeno, que pocas veces está presente en restos óseos antiguos, se recomienda por ello un incremento de proteinasa K así como el uso de coadyuvantes de extracción tales como agentes reductores, el uso de ditionitroto (DTT) puede ser una opción viable.
3. Mientras que la incubación en restos antiguos se realiza a temperatura ambiente o a 37 °C, los restos óseos contemporáneos pueden ser incubados con bajo riesgo de daño en el ADN en un rango de temperatura de 50 a 56 °C, temperatura para actividad óptima de la proteinasa K.
4. Deben valorarse cuidadosamente los procesos de descalcificación. El uso de EDTA como agente descalcificante si bien permite el secuestro de iones calcio también provoca la liberación de cantidades significativas de ADN debido a la afinidad que éste presente con la hidroxiapatita, por lo que entonces ADN-hidroxiapatita liberada. El

empleo de EDTA como descalcificante puede ser de gran utilidad si la muestra es de origen relativamente reciente, ya que la cantidad de ADN que puede perderse durante los lavados suele ser despreciable respecto a la cantidad de ADN que queda en el material descalcificado. Cuando el material óseo lleva algunos años quizá sea necesario considerar no descalcificar o incluso usar el EDTA como solución de extracción, el ADN liberado se encontrará en la solución de EDTA y entonces podrá ser purificado recuperando el ADN que haya sido liberado.

5. Uno de los pasos cruciales en la extracción de ADN de restos óseos es el molido de la muestra. El molido de muestras implica un aumento de superficie reactante, confiriendo mejores y más rápidas extracciones. Es importante valorar el método de molido, los restos óseos suelen ser fácilmente molidos con tan sólo mortero y pistilo, mientras que muestras óseas modernas pueden requerir de moledores específicos para este fin. Tenga cuidado de no descalcificar material molido, la pérdida de ADN puede ser importante, así que muele después de la descalcificación.

6. En las prácticas forenses la extracción de una muestra o indicio suele estar condicionada por la cantidad de material con que se cuenta, procure contar con material óseo de práctica en cantidad suficiente que le permita evaluar métodos y reactivos bajo consideración de que cada muestra suele ser única, y por tanto, con resultados variables entre una muestra y otra.

4.3.1 Extracción de ADN de restos óseos mediante el método fenol/cloroformo.

La extracción del ADN de referencia, procedente de cadáveres se realizó a partir de costilla; previa descontaminación del fragmento de hueso mediante solución de lavado compuesto por hipoclorito de sodio y detergente, la muestra ya limpia fue cortada en fragmentos pequeños que se pesaron a fin de obtener de 1 a 5 g de hueso que se colocó en un tubo Falcon de 50 mL,. posteriormente la muestra fue descalcificada con

EDTA 0.5 M pH 8.0 (cuando la muestra no fue cubierta por completo, se adicionó cantidad suficiente para que esto ocurriera) a temperatura ambiente hasta por mes y medio con al menos cinco cambios de EDTA.

La liberación del ADN del hueso se logró mediante solución de lisis, proteinasa K y ditiotrietol de acuerdo a la composición y concentración antes señalada para dichos reactivos, del mismo modo que en la extracción de ADN en larvas, el ADN de los cadáveres fue purificada con fenol cloroformo alcohol isoamílico 25:24:1. El ADN de las muestras óseas se eluyó en 100 μ L de solución amortiguadora TE.

4.4 Cuantificación de ADN en tiempo real.

Para lograr lo anterior se utilizó el sistema comercial *Quantifiler® Human*. El sistema *Quantifiler® Human* consta de sondas *taqman* específicas de humano, las cuales amplifican dos segmentos, uno de ellos de 140 pb ubicado en el cromosoma 14 así como una cadena de ADN sintético que sirve de control estándar interno para evaluación de la química empleada y agentes inhibidores de la muestras. *Quantifiler® Human* fue amplificado de acuerdo a las especificaciones del proveedor empleando un equipo 7500 Real Time PCR System y software 7500 System SDS Software v.1.2.3. Para lo anterior se generó una cueva de ADN estándar en concentraciones de 50 a 0.0023 ng. Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

1 ciclo:

50 °C por 2 min

1 ciclo:

95 °C por 10 min

40 ciclos:

95 °C por 15 segundos

60 °C por 1 minuto

4.5 PCR Múltiplex.

Identifiler

La amplificación mediante el sistema *Identifiler* se realizó de acuerdo a las indicaciones del proveedor, con base en ello las mezclas se prepararon de la siguiente manera

| Reactivos | Volumen por reacción |
|---------------------------------|--------------------------------------|
| AmpFISTR PCR reactionMix | 10.5 µL |
| AmpFISTR Gold DNA Polymerase | 0.5 µL |
| AmpFISTR Identifiler Primer set | 5.5 µL |
| ADN | 1 ng en un volumen no mayor a 8.5 µL |
| Agua estéril libre de nucleasas | Hasta completar un volumen de 25 µL |

Los parámetros de termociclado para un equipo *GenAmp PCR System 9700* de *Applied Biosystems* son los siguientes:

1 ciclo:

95 °C por 11 min

28 a 32 ciclos:

94 °C por 1 min

59 °C por 1 min

72 °C por 1 min

1 ciclo:

60 °C por 60 min

1 ciclo:

4°C por tiempo indefinido

MiniFiler

La amplificación mediante el sistema *MiniFiler* se realizó de acuerdo a las indicaciones del proveedor, con base en ello las mezclas se prepararon de la siguiente manera

| Reactivos | Volumen por reacción |
|---------------------------------|---|
| AmpFISTR miniFiler MasterMix | 10.0 µL |
| AmpFISTR MiniFiler Primer set | 5.0 µL |
| ADN | 0.1 a 0.5 ng en un volumen no mayor a 10.0 µL |
| Agua estéril libre de nucleasas | Hasta completar un volumen de 25 µL |

Los parámetros de termociclado para un equipo GenAmp PCR System 9700de Applied Biosystems son los siguientes:

1 ciclo:

95 °C por 11

28 a 32 ciclos:

94 °C por 20 seg

59 °C por 2 min

72 °C por 1 min

1 ciclo:

60 °C por 45 min

1 ciclo:

4°C por tiempo indefinido

Powerplex 21 System

La amplificación mediante el sistema *Powerplex 21 System* se realizó de acuerdo a las indicaciones del proveedor, con base en ello las mezclas se prepararon de la siguiente manera:

| Reactivos | Volumen por reacción |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| PowerPlex 21 5X Master Mix | 5.0 µL |
| PowerPlex 21 5X Primer Par Mix | 5.0 µL |
| ADN | 1 ng en un volumen no mayor a 15.0 µL |
| Agua estéril libre de nucleasas | Hasta completar un volumen de 25.0 µL |

Los parámetros de termociclado para un equipo GenAmp PCR System 9700 de *Applied Biosystems* son los siguientes:

1 ciclo:

96 °C por 1 min

30 a 34 ciclos:

94 °C por 10 seg

59 °C por 1 min

72 °C por 30 seg

1 ciclo:

60 °C por 20 min

1 ciclo:

4°C por tiempo indefinido

Powerplex Y23 System

La amplificación mediante el sistema *Powerplex Y23 System* se realizó de acuerdo a las indicaciones del proveedor, con base en ello las mezclas se prepararon de la siguiente manera

| Reactivos | Volumen por reacción |
|---|---------------------------------------|
| <i>PowerPlex Y23 5X Master Mix</i> | 5.0 µL |
| <i>PowerPlex Y23 10X Primer Par Mix</i> | 2.5 µL |
| ADN | 1 ng en un volumen no mayor a 17.5 µL |
| Agua estéril libre de nucleasas | Hasta completar un volumen de 25.0 µL |

Los parámetros de termociclado para un equipo *GenAmp PCR System 9700* de *Applied Biosystems* son los siguientes:

1 ciclo:

96 °C por 2 min

30 a 34 ciclos:

94 °C por 10 segundos

61 °C por 1 min

72 °C por 30 seg

1 ciclo:

60 °C por 20 min

1 ciclo:

4°C por tiempo indefinido

4.5 Electroforesis Capilar

Para detectar los alelos de los diferentes loci del sistema *Identifiler*, *MiniFiler*, *Powerplex 21 System* y *Powerplex Y23 System* se realizó un escaneo génico de los productos de PCR de las muestras en estudio con el equipo *Genetic Analyzer 3130*. Los marcadores genéticos de la casa comercial *Applied Biosystem* fueron analizados empleando como *Size Standar GS500 LIZ Dye*, mientras que para la casa comercial *Promega* se empleó *Size Standare CC5 ILS 500*, en ambos casos las corridas electroforéticas se realizaron con uso de formamida Hi-Di™ de *Applied Biosystems*. Finalmente los resultados se analizaron mediante el software *GeneMapper ID-X* de la compañía *Applied Biosystems*.

5. Resultados y análisis.

Las especies observadas y empleadas fueron *Phaenicia sericata* y *Calliphora vicina*. De cada una de ellas se tomaron en cuenta las estructuras externas e internas que permitieron su identificación precisa. Cabe mencionar que de los 18 cuerpos estudiados todos presentaban ambas especies. Y sólo en un caso (cadáver 542) se contó también con la presencia de la especie *Chrysomya albiceps* perteneciente también a la familia *Calliphoridae*.

Para la clasificación a nivel familia se observó forma, coloración (blanco o blanco amarillento), longitud de 3 a 10 mm según el estadio en que se encontraban y número de segmentos que la conformaban de los cuales, 3 corresponden a la región torácica y 8 al abdomen (Fig. 5a), además de la cabeza.

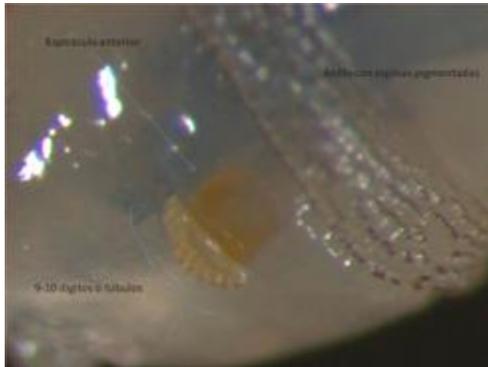
Posteriormente fue observada la región anterior donde se localizaron las papilas sensoriales, las mandíbulas o cornuas paralelas distinguibles en la abertura oral. Además de los espiráculos anteriores situados en el primer segmento torácico, así mismo se contaron las prolongaciones tubulares que salen de sus bordes libres, conocidas como túbulos y/o dígitos por su forma parecida a dedos.

En el segmento caudal, se observaron los espiráculos posteriores situados a nivel del cuerpo, cada uno con tres aberturas rodeadas por un peritrema, el cual varía en forma y tamaño, según la especie. Así también fue revisada la presencia de papilas (proyección diminuta, suave y en forma de pezón) y tubérculos (estructura sólida en forma de grano).

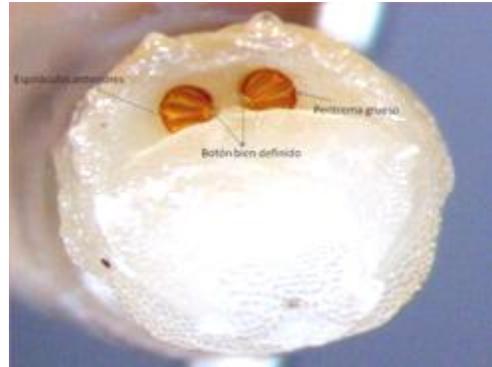
Con el fin de cumplir con el objetivo de la identificación a nivel especie fue determinante la revisión detallada de cada una de las estructuras específicas útiles para este fin.

Para el caso de la identificación de *C. vicina* (Robineau-Desvoidy) se observó que los segmentos 2-9 presentaban anillo completo con espinas levemente pigmentadas y de una sola punta en todo el cuerpo, el segmento 10 exhibía espinas sólo en la región basal y 11-12 anillo completo nuevamente. Los espiráculos anteriores presentaron de 9-

10 túbulo o dígitos (Fig.4a), y en la observación de los espiráculos posteriores se distinguió peritrema grueso, completo y botón bien definido (Fig. 4b), áreas fusiformes ausentes y esclerito oral pigmentado, con la base significativamente más ancha. Región caudal con tubérculos dorsales internos pequeños y ampliamente separados (Fig. 4c).



4a)



4b)

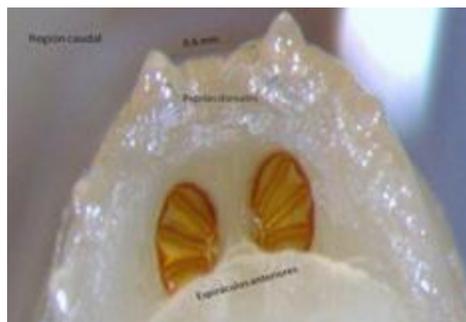


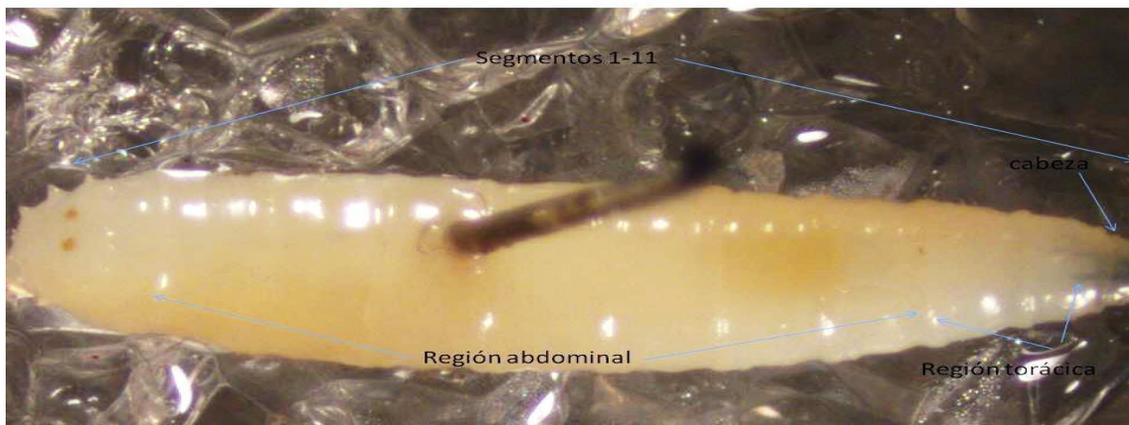
Fig.4 Estructuras observadas para la identificación de la especie de la familia *Calliphoridae* *C. Vicina*.4a) región caudal 4b) espiráculos posteriores 4c) espiráculo anterior y anillo completo con presencia de espinas.

Las características distintivas de la especie *P. sericata* (Méigen) fueron observadas en los segmentos 2-8 los cuales contaban con anillo de espinas completo, 9 con anillo de espinas hasta 3/4 del segmento, 10 con espinas sólo en la porción basal, 11 y 12 contaban con anillo completo se observaron que las espinas eran una sola punta y ligeramente pigmentadas (Fig. 5a).

Espiráculos anteriores con presencia de 7-12 túbulo (Fig.5b) dependiendo el estado de desarrollo ya que en el tercero se contó con 12 túbulo por cada espiráculo.

En relación a los espiráculos posteriores se distinguió peritrema completo y botón bien definido para tercer estadio (Fig. 5c).

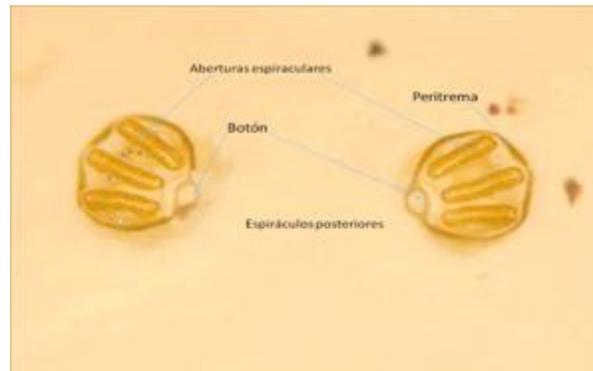
Ausencia de área fusiforme y esclerito oral (Fig. 5d). Asimismo, la distancia entre las papilas dorsales (interna, media y lateral) fue aproximadamente igual (0.2 mm aproximadamente entre cada una de ellas) (Fig. 5e).



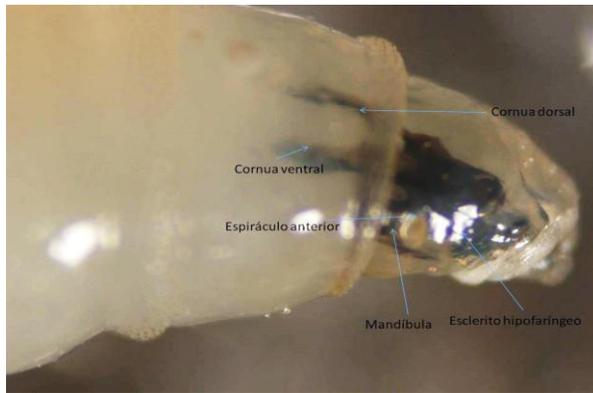
5a)



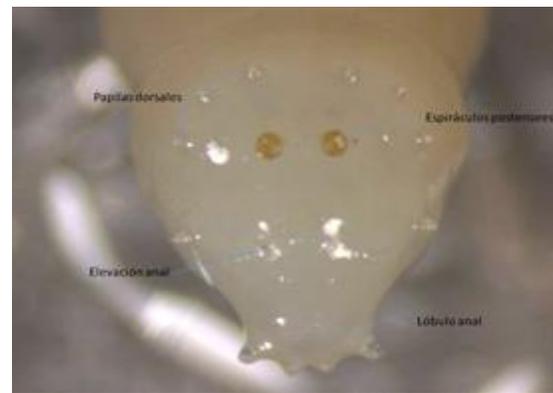
5b)



5c)



5d)



5e)

Fig.5. Estructuras observadas para la identificación de la especie de la familia *Calliphoridae* *P. sericata*. 5a) vista dorsal de los segmentos de *Phaenicia sericata* 5b) espiráculo anterior 5c) espiráculos posteriores 5d) esqueleto cefalofaríngeo, 5e) región caudal

El objetivo de trabajar con un diferente número de larvas tuvo como propósito el determinar cual era la cantidad mínima necesaria para la obtención de un perfil genético del ADN recuperado en el proceso de extracción a partir del contenido gástrico de larvas. Durante la estandarización se analizaron 30 larvas por estadio para cada cadáver en cinco casos de estudio, posteriormente el número de larvas se redujo a 15, 10, 5 y 1.

La recuperación exitosa de ADN humano de contenido gástrico larval fue confirmada mediante cuantificación específica de ADN humano por PCR en tiempo real mediante el sistema de cuantificación *Quantifiler Human* (Fig.6). Cabe mencionar que en el caso de utilización de una sola larva no se obtuvo lectura de ADN durante la cuantificación en tiempo real y en el caso de 5 larvas analizadas se recuperó la cantidad mínima para la realización de un análisis genético que es 1 ng/μL.

La media de valores obtenidos en cuantificación fue de 2.13 ng de ADN humano por larvas en el segundo estadio (Tabla1) y de 5.10 ng en tercer estadio (Tabla 2). Se observó que la cantidad de ADN humano recuperado no se asocia al estadio larval, sino a la cantidad de material orgánico ingerido (Tabla 3).

| Datos de larvas en segundo estadio | | | | | |
|---|-------------------------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------------------|---|
| Numero cadáver. | Peso contenido gástrico (mg) | ADN recuperado (ng) | # de Larvas usadas | Peso promedio por larva (mg) | ADN promedio recuperado por larva (ng) |
| 3458 | 550 | 1.2 | 30 | 18.33 | 0.04 |
| 3460 | 390 | 1.4 | 30 | 13 | 0.04 |
| 3470 | 470 | 1.92 | 30 | 15.66 | 0.06 |
| 3471 | 390 | 3.91 | 30 | 13 | 0.13 |
| 3545 | 470 | 1.76 | 30 | 15.66 | 0.05 |
| 4157 | 110 | 2.17 | 10 | 11 | 0.21 |
| 1556 | 80 | 6 | 15 | 5.33 | 0.4 |
| 4117 | 150 | 1.5 | 15 | 10 | 0.1 |
| 4118 | 100 | 0.06 | 15 | 6.66 | 0.004 |
| 4739 | 180 | 3.11 | 15 | 12 | 0.2 |
| 768 | 170 | 6 | 15 | 11.33 | 0.4 |
| 422 | 200 | 0 | 15 | 13.33 | 0 |
| 640 | 280 | 0.9 | 15 | 18.66 | 0.06 |
| 542 | 190 | 0 | 15 | 14.61 | 0 |

Tabla 1. ADN humano recuperado por conjunto de contenido gástrico de larvas en segundo estadio cada uno mediante PCR en tiempo real.

+

| Datos de larvas el tercer estadio | | | | | |
|--|------------------------------------|----------------------------|---------------------------|------------------------------------|---|
| Numero cadáver. | Peso contenido gástrico(mg) | ADN recuperado (ng) | # de larvas usadas | Peso promedio por larva(mg) | ADN promedio recuperado por larva (ng) |
| 3458 | 1160 | 3.5 | 30 | 38.66 | 0.11 |
| 3460 | 1410 | 7 | 30 | 47 | 0.23 |
| 3470 | 1370 | 3.5 | 30 | 45.66 | 0.11 |
| 3471 | 510 | 0.3 | 30 | 17 | 0.01 |
| 4155 | 190 | 5.56 | 5 | 38 | 1.11 |
| 4158 | 230 | 11.88 | 5 | 46 | 2.37 |
| 70 | 190 | 0.11 | 5 | 38 | 0.02 |
| 711 | 190 | 9 | 5 | 38 | 1.8 |

Tabla 2. ADN humano recuperado por conjunto de contenido gástrico de larvas en tercer estadio cada uno mediante PCR en tiempo real.

| Numero cadáver | Numero de larvas | Peso de contenido gástrico por peso de larva(mg) | Cantidad de ADN recuperado por larva (ng) |
|----------------|------------------|--|---|
| 4739 | 15 | 12 | 0.2 |
| 4158 | 5 | 46 | 2.37 |
| 4157 | 10 | 11 | 0.21 |
| 4155 | 5 | 38 | 1.11 |
| 4118 | 15 | 6.66 | 0.004 |
| 4117 | 15 | 10 | 0.1 |
| 3545 | 30 | 15.66 | 0.05 |
| 3471 | 30 | 13 | 0.13 |
| 3470 | 30 | 15.66 | 0.06 |
| 3460 | 30 | 13 | 0.04 |
| 1556 | 15 | 5.33 | 0.4 |
| 768 | 15 | 11.33 | 0.4 |
| 711 | 5 | 38 | 1.8 |
| 640 | 15 | 18.66 | 0 |
| 542 | 15 | 14.61 | 0 |
| 422 | 15 | 13.33 | 0 |
| 70 | 5 | 38 | 0.02 |

Tabla 3 Nanogramos de ADN recuperado con respecto al peso promedio de cada larva todas en segundo estadio mediante PCR en tiempo real. El número de larvas empleadas por cadáver varió dependiendo del tamaño de las larvas.

De los 18 cuerpos utilizados se obtuvo un perfil completo en 14 de los casos, lo cual implica resultados exitosos en 77.7% de los casos analizados, cabe señalar que los cuatros restantes se debió a una toma de muestra inadecuada o reducida (Fig. 9). Se infiere que la toma de larvas en regiones externas del cadáver no proporciona la cantidad necesaria para la elaboración de un perfil, en otros casos se observaron fenómenos de contaminación cruzada, es decir, la presencia de más de un perfil genético, a este respecto se presumen que las larvas se habían alimentado de más de un cuerpo, según reportes en que se sabe, se ubicaron más de un cuerpo en el mismo sitio, es así que durante la colecta no es posible garantizar que las larvas recuperadas se hubieran alimentado de un mismo cadáver.



Fig.6 Caso ejemplificando una toma de muestra inadecuada, la cual no proporcionó un perfil para su identificación.

Asimismo, se observó que el consumo de materia orgánica y de desarrollo está estrechamente ligado con la temperatura que a su vez puede o no, favorecer una mejor recuperación de ADN, esto se infiere a que la toma de muestras fue realizada en distintas épocas del año; otoño e invierno; por lo que fue posible observar que cuando la colecta se realizó a una temperatura ambiente de 25°C las larvas llegaban a tercer estadio en un promedio de 7-8 días, por lo cual se apreció consumían alimento más rápidamente y al momento de la extirpación de estómago e intestinos de las larvas, éstos se encontraban llenos, en comparación con las larvas colectadas en los meses de diciembre y enero, donde las larvas tardaron de 11-13 días para alcanzar el tercer estadio. Se pudo ver que el saco gástrico e intestinos no contenían la misma cantidad recuperada durante el otoño y el peso de los mismos se encontraban de manera distante con los analizados en los meses de agosto y octubre. Por lo que se

recomendaría un análisis más profundo en cómo influye la temperatura en estos organismos.

El uso de cuatro sistemas de identificación tuvo por objeto determinar cuál de ellos favorecía la obtención del máximo número de marcadores, dado el hecho de contar con ADN altamente degradado y con presencia de inhibidores de PCR. De los resultados obtenidos se observó la amplificación y caracterización del conjunto completo de marcadores para el sistema *Identifiler*, así como la obtención de 19 de los 20 marcadores para el sistema *Powerplex 21 System*, sin contar en cada caso la amplificación del gen *amelogenina*, el cual es un marcador que determina el sexo (Tabla 4).

Cabe señalar que en ambos sistemas de identificación se contó con los 13 marcadores que comprende el sistema de índices combinados de ADN (CODIS, por sus siglas *Combined DNA Index System*), por lo que se podría hacer la identificación plena de un individuo con base en normas internacionales.

El ADN recuperado del segundo estadio permitió la obtención de fragmentos cercanos a 400 pb (Fig. 7) y en tercer estadio de más de 400 pb (Fig. 8), lo anterior siempre y cuando se contara con la cantidad de muestra necesaria.

Este hecho no implica que la colecta de larvas deba realizarse únicamente de un tercer estadio, menos aún se tenga que esperar a que las larvas lo alcancen, ya que en ambos casos es posible la obtención de perfiles genéticos útiles para la identificación.

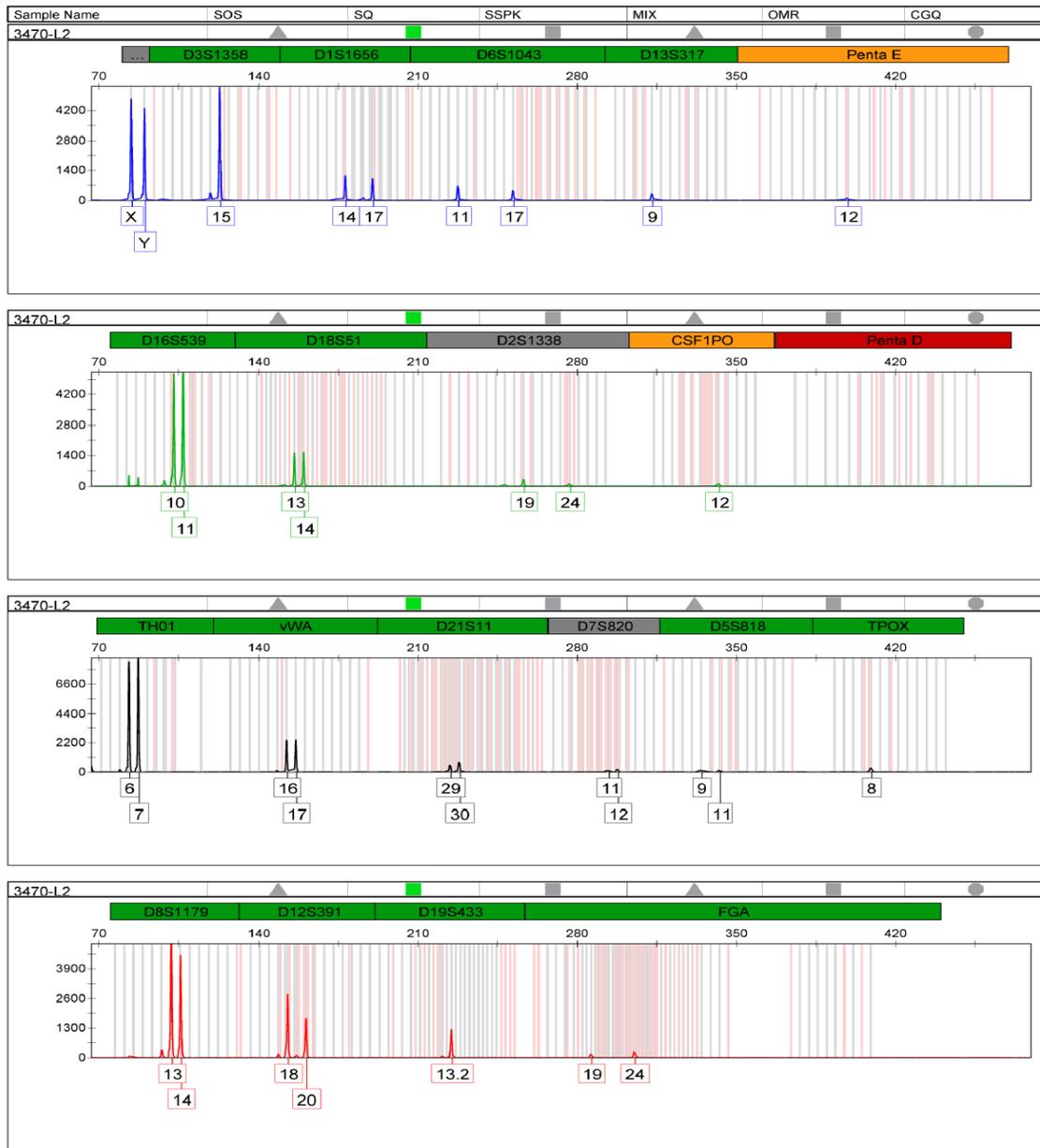


Fig.7 Electroferograma obtenido mediante el sistema de identificación genética PowerPlex 21 System ejemplificando marcadores amplificados en un rango menor a 400 pb. Análisis de ADN humano recuperado de contenido gástrico de larvas en segundo estadio

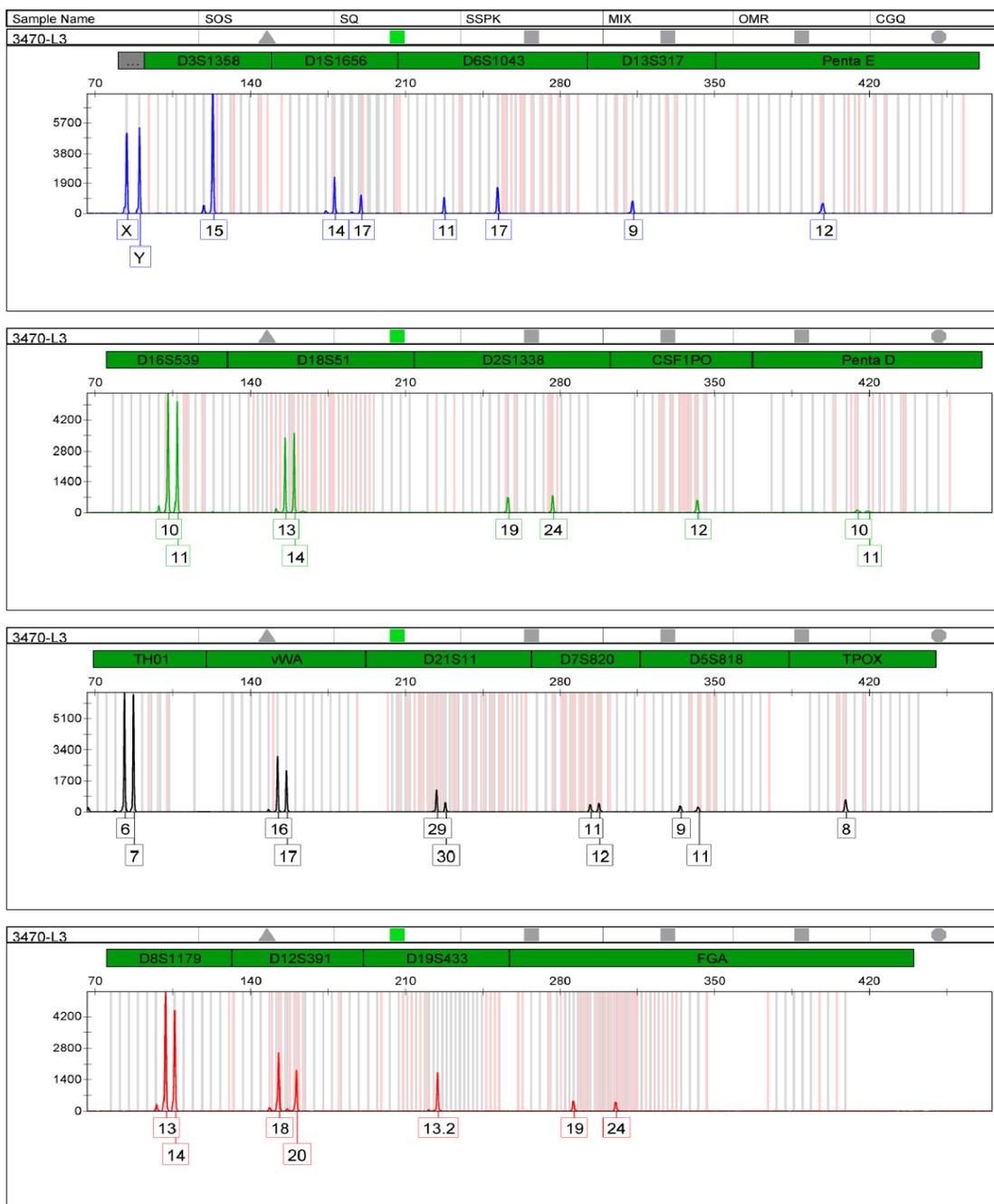


Fig.7 Electroferograma obtenido mediante el sistema de identificación genética PowerPlex21 System ejemplificando marcadores amplificados en un rango menor a 400 pb. Análisis de ADN humano recuperado de contenido gástrico de larvas en segundo estadio

Las tablas de resultados de marcadores genéticos que se presentan tienen por objeto describir los diferentes loci obtenidos y que son caracterizados por el número de unidades repetidas, tetranucleótidos la mayoría de ellos salvo el caso de los marcadores tipo penta, compuestos por repetidos pentanucleótidos. La veracidad de los perfiles obtenidos de larvas fue corroborada al comparar los perfiles genéticos de los cuerpos de los cuales se alimentaron dichas larvas por lo que el reporte de tablas tiene a brindar dicha información.

| <i>PowerPlex21 System</i> | 3458 Rf | 3458 E3 | 3460 Rf | 3460 E3 | 3470 Rf | 3470 E3 | 3471 Rf | 3471 E3 | 3545 Rf | 3545 E2 | 4155 Rf | 4155 E3 |
|---------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <i>amelogenina</i> | X y | X, Y | X y | X, Y | X,Y | X,Y | X,X | X,X | X,Y | X,Y | X,Y | X,Y |
| <i>D3S1358</i> | 15,15 | 15,15 | 15,15 | 15,15 | 15,15 | 15,15 | 15,16 | 15,16 | 15,15 | 15,15 | 15,16 | 15,16 |
| <i>D1S1656</i> | 15,17.3 | 15,17.3 | 1316.3 | 13,16.3 | 14,17 | 14,17 | 15,19.3 | 15,19.3 | 15,17 | 15,17 | 15,17 | 15,17 |
| <i>D6S1043</i> | 12,14 | 12,14 | 12,23 | 12,23 | 11,17 | 11,17 | 14,15 | 14,15 | 13,14 | 13,14 | 13,13 | 13,13 |
| <i>D13S317</i> | 9,12 | 9,12 | 10,12 | 10,12 | 9,9 | 9 | 10,12 | 10,12 | 9,11 | 9,11 | 9,11 | 9,11 |
| <i>PENTA E</i> | 14,16 | 14,16 | 10,12 | 10,12 | 12,12 | 12,12 | 12,17 | 12,17 | 16,19 | ----- | 16,2 | ---- |
| <i>D16S539</i> | 10,12 | 10,12 | 10,11 | 10,11, | 10,11 | 10,11 | 9,11 | 9,11 | 11,12 | 11,12 | 11,11 | 11,11 |
| <i>D18S51</i> | 13,16 | 13,16 | 14,17 | 14,17 | 13,14 | 13,14 | 12,14 | 12,14 | 14,14 | 14,14 | 15,18 | 15,18 |
| <i>D2S1338</i> | 19,23 | 19,23 | 19,23 | 19,23 | 19,24 | 19,24 | 25,25 | 19,25 | 19,23 | 19,23 | 18,23 | 18,23 |
| <i>CSF1PO</i> | 10,12 | 10,12 | 11,12 | 11,12 | 12,12 | 12,12 | 11,12 | 11,12 | 10,12 | 10,12 | 11,12 | 12 |
| <i>PENTA D</i> | 11,12 | 11 | 9,12 | 9,12 | 10,11 | 10,11 | 9,17 | 9,17 | 10,10 | 10,10 | 10,10 | 10,10 |
| <i>TH01</i> | 6,7 | 6,7 | 6,9 | 6,9 | 6,7 | 6,7 | 9.3,9.3 | 9.3,9.3 | 6,6 | 6,6 | 6,9 | 6,9 |
| <i>vWA</i> | 15,17 | 15,17 | 16,16 | 16,16 | 16,17 | 16,17 | 14,15 | 14,15 | 16,17 | 16,17 | 16,16 | 16,16 |
| <i>D21S11</i> | 32,33.2 | 32,33.2 | 30.2 | 30.2 | 29,30 | 29,30 | 27,30 | 27,30 | 32.2,33.2 | 32.2,33.2 | 33.2,33.2 | 33.2,33.2 |
| <i>D7S820</i> | 11,12 | 11,12 | 10,13 | 10,13 | 11,12 | 11,12 | 12,12 | 12,12 | 11,12 | 11,12 | 9,10 | 9,10 |
| <i>D5S818</i> | 12,12 | 12,12 | 11,11 | 11,11 | 9,11 | 9,11 | 11,11 | 11,11 | 11 | 11,12 | 11,11 | 11,11 |
| <i>TPOX</i> | 12,12 | 12,12 | 8,11 | 8,11 | 8 | 8 | 8,11 | 8,11 | 8,11 | 8,11 | 8,12 | 8,12 |
| <i>D8S1179</i> | 12,15 | 12,15 | 13,17 | 13,17 | 13,14 | 13,14 | 11,13 | 11,13 | 12,13 | 12,13 | 13,13 | 13,13 |
| <i>D12S391</i> | 19,20 | 19,20 | 18,20 | 18,20 | 18,20 | 18,20 | 21,23 | 21,23 | 20,20 | 20,20 | 16,18 | 16,18 |
| <i>D19S433</i> | 12,13.2 | 12,13.2 | 13,13 | 13,13 | 13.2,13.2 | 13.2 | 13,15.2 | 13,15.2 | 13,14 | 13,14 | 13,13 | 13,13 |
| <i>FGA</i> | 22,25 | 22,25 | 19,20 | 19,20 | 19,24 | 19,24 | 22,25 | 22,25 | 23.2,25 | 23.2,25 | 23,26 | 23,26 |

Tabla 4. Loci amplificados a partir del sistema *PowerPlex 21 System* en donde en todos los casos se obtuvieron los marcadores que incluye el sistema.

| | | | | | | | | | | |
|---------------------------|------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|
| <i>PowerPlex21 System</i> | 4157 Rf | 4157 E2 | 4158 Rf | 4158 E3 | 070 Rf | 070 E3 | 711 Rf | 711 E3 | 1556 Rf | 1556 E2 |
| <i>amelogenina</i> | X,Y | X,Y | X,Y | X,Y | X,Y | X,Y | X,Y | X,Y | X,Y | X,Y |
| <i>D3S1358</i> | 15,15 | 15,15 | 15,15 | 15,15 | 15,18 | 15 | 14,15 | 14,15 | 14,15 | 14,15 |
| <i>D1S1656</i> | 16,16.3 | 16,18.3 | 14,17.3 | 14,17.3 | 16,17.3 | 16,17.3 | 12,17.3 | 12,17.3 | 15,16 | 15,16 |
| <i>D6S1043</i> | 14,17 | 14,17 | 15,18 | 15,18 | 14,18 | 14,18 | 12,13 | 12,13 | 13,18 | 13,18 |
| <i>D13S317</i> | 9,12 | 9,12 | 9,10 | 9,10 | 11,12 | 11,12 | 10,12 | 10,12 | 9,12 | 9,12 |
| <i>PENTA E</i> | 15,19 | ----- | 8,12 | ----- | 11,18 | 11,18 | 5,14 | 5,14 | 8,12 | 8,12 |
| <i>D16S539</i> | 9,12 | 9,12 | 11,12 | 11,12 | 11,12 | 11,12 | 10,12 | 10,12 | 9,12 | 9,12 |
| <i>D18S51</i> | 13,18 | 13,18 | 13,17 | 13,17 | 14,16 | 14,16 | 16,17 | 16,17 | 16,17 | 16,17 |
| <i>D2S1338</i> | 19,24 | 19,24 | 17,23 | 17,23 | 18,24 | 18,24 | 17,23 | 17,23 | 23,23 | 23,23 |
| <i>CSF1PO</i> | 11,12 | 11,12 | 11,12 | 12 | 12,12 | 12,12 | 7,10 | 7,10 | 12,12 | 12,12 |
| <i>PENTA D</i> | 9,12 | ----- | 9,10 | ----- | 10,12 | 10,12 | 8,9 | 8,9 | 11,13 | ----- |
| <i>TH01</i> | 7,9.3 | 7,9.3 | 7,7 | 4,7 | 7,9 | 7,9 | 7,7 | 7,7 | 6,7 | 6,7 |
| <i>vWA</i> | 16,17 | 16,17 | 17,20 | 17,20 | 17,18 | 17,18 | 16,16 | 16,16 | 16,16 | 16,16 |
| <i>D21S11</i> | 30,30 | 30,30 | 30,32.2 | 30,32.2 | 28,32.2 | 18,32.2 | 28,30 | 28,30 | 29,31 | 29,31 |
| <i>D7S820</i> | 11,11 | 11,11 | 9,10 | 9,10 | 10,13 | 10,13 | 9,12 | 9,12 | 10,10 | 10,10 |
| <i>D5S818</i> | 11,12 | 11,12 | 11,11 | 11,11 | 11,12 | 11,12 | 9,12 | 9,12 | 7,11 | 7,11 |
| <i>TPOX</i> | 8,11 | 8,11 | 8,12 | 8,12 | 11,11 | 11,11 | 11,12 | 11,12 | 8,11 | 8,11 |
| <i>D8S1179</i> | 13,13 | 13,13 | 11,12 | 11,12 | 12,14 | 12,14 | 12,15 | 12,15 | 14,16 | 14,16 |
| <i>D12S391</i> | 19,20 | 19,20 | 19,20 | 19,20 | 19,25 | 19,25 | 19,20 | 19,20 | 20,21 | 20,21 |
| <i>D19S433</i> | 14,14 | 14,14 | 14.2,15.2 | 14.2,15.2 | 13,13.2 | 13,13.2 | 13,14 | 13,14 | 13,16 | 13,16 |
| <i>FGA</i> | 24,24 | 24,24 | 21,23 | 21,23 | 21,23 | 21,23 | 25,25 | 25,25 | 19,25 | 19,25 |

RF: Referencia (muestra ósea obtenida del cadáver), E2: segundo estadio larval, E3: tercer estadio larval

En cuanto al sistema y23 éste fue empleando en dos de los casos a tratar (1556 y 4739) en donde el primero de los casos se obtuvo sólo seis de los 23 marcadores comprendidos en el sistema, mientras que en el caso 4739 fueron 19 los marcadores obtenidos (Tabla 5).

Tabla 5. Marcadores obtenidos a partir del sistema *PowerPlex y23*. Compuesto por 23 loci en donde se muestra que en el caso 4739 se obtuvo un total de 19 marcadores los cuales correspondieron con los de la muestra de referencia, en comparación con el caso 1556 en donde sólo se obtuvieron cinco de veintitrés.

| <i>PowerPlex Y23</i> | 1556 RF | 1556 E2 | 4739 RF | 4739 E2 |
|----------------------|---------|---------|---------|---------|
| <i>DYS576</i> | 17 | ----- | 18 | 18 |
| <i>DYS3891</i> | 14 | 14 | 12 | 12 |
| <i>DYS448</i> | 20 | ----- | 20 | 20 |
| <i>DYS389II</i> | 31 | ----- | 30 | ----- |
| <i>DYS19</i> | 12 | ----- | 12 | 12 |
| <i>DYS391</i> | 10 | ----- | 10 | 10 |
| <i>DYS481</i> | 25 | 25 | 25 | 25 |
| <i>DYS549</i> | 13 | ----- | 11 | 11 |
| <i>DYS533</i> | 11 | ----- | 10 | 10 |
| <i>DYS438</i> | 11 | 11 | 10 | ----- |
| <i>DYS437</i> | 14 | ----- | 14 | ----- |
| <i>DYS570</i> | 17 | ----- | 21 | 21 |
| <i>DYS635</i> | 22 | 22 | 21 | 21 |
| <i>DYS390</i> | 23 | ----- | 23 | 23 |
| <i>DYS439</i> | 14 | ----- | 12 | 12 |
| <i>DYS392</i> | 14 | ----- | 11 | 11 |
| <i>DYS643</i> | 10 | ----- | 12 | ----- |
| <i>DYS393</i> | 13 | 13 | 13 | 13 |
| <i>DYS458</i> | 16 | 16 | 17 | 17 |
| <i>DYS385a/b</i> | 16 | ----- | 17,18 | 17,18 |
| <i>DYS456</i> | 16 | ----- | 15 | 15 |
| <i>Y-GATA-H4</i> | 11 | ----- | 9 | 9 |

RF: Referencia (muestra ósea obtenida del cadáver), E2: segundo estadio larval.

El sistema *MiniFiler* permitió obtener perfiles donde el ADN estaba altamente degradado, esto debido a que los cuerpos contaban con un mayor intervalo *postmortem*, que implica mayor daño al ADN. Sin embargo el sistema utilizado arrojó excelentes resultados al obtener un perfil completo, el cual permitiría la identificación plena del cadáver (Tabla 6).

Tabla 6. Marcadores obtenidos a partir del sistema comercial *MiniFiler*. En estos casos se trabajó con larvas en segundo estadio (E2), las cuales arrojaron resultados satisfactorios

| <i>M i n i f i l e r</i> | 768 Rf | 768 E2 | 4117 Rf | 4117 E2 | 4739 Rf | 4739 E2 |
|--------------------------|-----------|------------|---------|---------|-----------|---------|
| <i>amelogenina</i> | X,X | X,X | X,Y | X,Y | X,Y | X,Y |
| <i>D13S317</i> | 11,12 | 11,12 | 8,10 | 9,12 | 8,11 | 8,11 |
| <i>D7S820</i> | 8,8 | 8,8 | 11,13 | 10,10 | 11,11 | 10,11 |
| <i>D2S1338</i> | 17,20 | 17,20 | 19,23 | 23,23 | 19,24 | 19,23 |
| <i>D21S11</i> | 31.2,32.2 | 31.2, 32.2 | 29,30 | 29,31 | 31.2,32.2 | 29,33.2 |
| <i>D16S539</i> | 9,11 | 9,11 | 12,13 | 9,12 | 11,11 | 11,11 |
| <i>D18S51</i> | 14,16 | 14,16 | 17,17 | 16,17 | 16,25 | 16,25 |
| <i>CSF1PO</i> | 10,12 | 10,12 | 9,12 | 12,12 | 10,12 | 10,12 |
| <i>FGA</i> | 22,25 | 22,25 | 20,21 | 19,25 | 24,25 | 24,25 |

RF: Referencia (muestra ósea obtenida del cadáver), E2: segundo estadio larval



FIG.9 Fotografía ejemplificando el estado de putrefacción de uno de los cadáveres (768-) utilizado con el sistema *MiniFiler*.

6.- Discusión

Entre la fauna cadavérica del Centro de México la presencia de *C. vicina* y *P. sericata* tiene lugar preponderante, siendo ésta última la especie de mayor frecuencia en los cadáveres acaecidos en esta región; pocos estudios sobre esta especie son reportados, menos aún los vinculados con la tipificación de ADN humano por lo que los hallazgos en este rubro son fundamentales dados los altos índices de violencia que son registrados en el país.

En el presente trabajo se comprueba la recuperación de ADN humano en muestras obtenidas a partir del contenido gástrico de larvas de dípteros *C. vicina* y *P. sericata*

para la obtención de perfiles genéticos humanos, los cuales pueden servir como recurso para la identificación de personas muertas, aisladas de otros cadáveres y que se encuentran en calidad de desconocidos.

De los dos estadíos analizados, el segundo y el tercero, se encuentra que la recuperación de ADN y obtención de perfiles genéticos exitosos tiene relación con el contenido gástrico de la larva y no con el estadío larval, dato importante pues en muchos casos el estado de putrefacción no guarda relación directa con el estadío de las larvas en vista de que la fauna cadavérica puede colonizar un cadáver, en diferentes momentos. Lo anterior implica que la recuperación de larvas deba realizarse sin que por ello se deba tener un estadio larval específico.

Debe considerarse que el tamaño del estómago puede variar dependiendo de las especies que se están tratando, por ejemplo, el estómago de *P. sericata* tiende a secarse a partir del primer día de colecta en comparación con otras especies las cuales van consumiendo el contenido poco a poco (Campobasso., *et al.*, 2005), lo cual influye de manera directa en la recuperación de ADN.

Cabe destacar que las técnicas de preservación influyen directamente en la recuperación de ADN ya que, en las que fueron tratadas con agua hirviendo y almacenadas en etanol al 70% a 4°C presentaron un mayor rendimiento en comparación con las muestras que fueron congeladas a -22°C.

De los cuatro sistemas utilizados *Power-Plex 21 System* es el que proporcionó mejores resultados en comparación con los otros sistemas, se atribuye que dichos resultados sean favorecidos debido a que su química trabaja aún en presencia de agentes inhibidores de PCR, los cuales se piensan no son eliminados en su totalidad, lo que hace que éste sea un sistema altamente sensible, con beneficio adicional de contar con mayor número de marcadores genéticos en comparación con los otros sistemas utilizados, sin embargo, existirán casos extraordinarios en que el uso de otros

marcadores será fundamental, como es el caso de muestras altamente degradadas en que *MiniFiler* demuestra mejores beneficios con reserva de que dicha observación se hizo en sólo uno de los casos.

El uso de diferentes sistemas de identificación genética adquiere sentido en vista de lo variado que un caso puede resultar, por lo que la evaluación de un solo sistema limitaría las respuestas esperadas.

Se observa que la obtención de perfiles genéticos puede realizarse aún cuando se cuenta con escasa cantidad de ADN, incluso por debajo de las recomendaciones establecidas para muestras de referencia esto es posible al compensar la falta de ADN con un incremento en el número de ciclos de PCR, por lo que las limitaciones no estarán confinadas sólo en la cantidad de ADN recuperado, sino también en la pureza y calidad de los reactivos empleados, por lo que un sistema de podría ser forzado en algún punto de su procedimiento de análisis, como es el caso de PCR.

7. Conclusiones

Desde un punto de vista taxonómico las especies más comunes observadas en los cadáveres estudiados fueron *Phaenicia sericata* y *Calliphora vicina*.

El contenido gástrico de las larvas es una excelente fuente de ADN, que permitiría la identificación de un individuo cuando no es posible utilizar otros métodos de caracterización.

Una segunda purificación mediante el empleo de columnas de sílica posterior al fenol cloroformo generó ADN con menos inhibidores, lo cual permite una mayor probabilidad de obtener un perfil genético completo.

La obtención del perfil genético no está ligado al estadio en que se encuentran las larvas, si no a la cantidad de material biológico propio del cadáver y que es ingerido por éstas antes de la colecta.

La técnica de preservación que brindó resultados óptimos fueron las hervidas y almacenadas en alcohol al 70% a 4°C permitiendo la conservación de éstas como fuentes de ADN, dicha técnica puede ser de utilidad en aquellas Instituciones de Procuraduría de Justicia Estatales en las que no cuenten con un laboratorio de genética con la finalidad que puedan enviarse en estas condiciones para su estudio a laboratorios oficiales o privados.

La técnica de preservación óptima mediante hervor y preservadas en alcohol al 70% a 4°C puede servir también para la realización de estudios entomotoxicología ya que no altera la lectura de los metabolitos de interés que suelen ser estudiados para estos fines, salvo que se busque trazas de isopropanol en los restos de las larvas, lo cual implicaría casos extraordinarios y poco probables.

La obtención de un perfil genético a partir del contenido gástrico de larvas facilita y reduce el tiempo de identificación de un cadáver de 1 a 1.5 días en comparación con las muestras óseas las cuales pueden tardar semanas o meses, por lo que la presente investigación puede generar nuevas y mejores pautas en la preservación de larvas que se alimentan de cadáveres y un método más eficiente y práctico para el análisis ADN recuperado del contenido gástrico de dichas larvas con fines de identificación humana.

Apéndice

Medidas de bioseguridad

Algunos reactivos utilizados en los procedimientos y/o prácticas relacionadas al análisis de ADN tienen la característica de ser tóxicos, irritantes, corrosivos, cancerígenos, mutagénicos y neurotóxicos, por lo tanto el investigador siempre deberá usar guantes, mascarillas, lentes protectores y mandil para evitar un contacto directo o accidental con ellos.

El proceso de ebullición durante la conservación de larvas en baño maría a 100°C deberá realizarse con extremo cuidado para evitar quemaduras. En este sentido, se recomienda utilizar envases de vidrio resistentes a altas temperaturas (por ejemplo: Pyrex) y gradillas flotantes de polipropileno para colocar los viales

Manejo de muestras y reactivos en biología molecular

El investigador deberá usar guantes de látex mientras se encuentre trabajando con ADN. Este paso ayudará a evitar la degradación del ADN por acción de las nucleasas presentes en la superficie de las manos. Asimismo, el uso de guantes evitará que quien trabaja se exponga ante algún posible riesgo de intoxicación por contacto accidental con cualquier material potencialmente dañino.

El material biológico debe ser conservado a bajas temperaturas. El ADN extraído debe ser repartido en alícuotas y en volúmenes pequeños para evitar etapas de congelamiento descongelamiento continuo que ocasionarían un eventual deterioro del ADN. Las alícuotas en uso tanto de ADN genómico como de productos amplificados pueden ser almacenadas a 4°C, mientras que las alícuotas restantes que no sean usadas por periodos largos serán almacenadas a -20°C. Las muestras óseas y/o momificadas sin procesar serán almacenadas a -70°C.

Debido a la importancia que tiene la medición de volúmenes en los procedimientos de electroforesis, se sugiere que los insumos destinados para tal fin,

como las micropipetas, puntas de 10, 20, 200 y 1000 μ L, viales de 0,5 y 1,5, tubos de 15, 50 y 250 mL y los equipos de laboratorio, cuenten con un certificado que acredite la calidad del producto.

Se recomienda que las puntas que se insertan en las micropipetas y que tienen contacto directo con ADN cuenten preferentemente con filtro, sean nuevas y estériles, a fin de evitar una posible contaminación cruzada. Es importante señalar que es posible trabajar con puntas previamente usadas, siempre y cuando estén libres de restos orgánicos y hayan sido previamente esterilizadas en autoclave (121°C a 1,5 psi), sin embargo, su uso sólo estará confinado a prácticas que involucran productos amplificados, nunca ADN genómico extraído.

Los reactivos a usarse durante los procesos de extracción y purificación de ADN deben tener grado "biología molecular" para asegurar el éxito del procedimiento. El uso combinado de reactivos de diferente grado de pureza puede llevar a un fracaso del experimento o determinación.

Productos químicos de uso.

Acetato de sodio, 3M pH 4.5

Disolver 408 g de acetato de sodio 3H₂O en agua destilada. Ajustar el pH a 4.5 con ácido acético 3 M. Aforar con agua destilada a 1 L.

Amortiguador de lisis

Tris-HCl 10 mM pH 8.1; EDTA 0.1 M pH 8; SDS al 0.5%. Proteinasa K en concentración de 10mg/mL. La proteinasa K es lábil y debe usarse fresca para cada uso

Amortiguador TE

Tris-HCl 10 mM; EDTA 0.1mM, pH 8.0 (1L). Mezclar 10 mL de Tris-HCl, pH 8, 0.2 mL de EDTA 0.5 M y 990 mL de agua destilada o desionizada. Fraccionar en frascos de 100 mL y esterilice con autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

Ditiotreitol (DTT) 1M

Disolver 15.45 g de DTT en 100 mL de agua. Almacenar a -20°C .

La solución debe ser esterilizada por filtración. NO ESTERILIZAR. Fraccionar (se recomiendan fracciones de 1 mL) y almacenar a -20°C .

EDTA (Ácido etilendiamino tetraacético) 0.5M, pH 8.0 (1L)

Lentamente adicionar 186.1 g de EDTA $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 800 mL de agua destilada o desionizada. Agitar vigorosamente sobre un agitador magnético. Ajuste el pH a 8.0 adicionando NaOH en lentejas (aproximadamente 20 g). NOTA: El EDTA no se disolverá si no se ajusta el pH. Afore a 1 L con agua destilada y desionizada. Esterilizar con autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

Fenol-cloroformo-Alcohol isoamílico 25:24:1

PRECAUCIÓN: El fenol puede causar severas quemaduras. Deben usarse lentes y guantes para trabajar con el fenol-cloroformo. Si las soluciones de fenol se ponen en contacto con la piel o los ojos, lave inmediatamente con grandes cantidades de agua. No lave con etanol.

NaOH 10M, 10 N (1L)

PRECAUCIÓN: el hidróxido de sodio es cáustico. Esta reacción genera calor.

Lentamente disolver 400 g de lentejas de NaOH en 800 mL de agua destilada o desionizada. Enfriar a temperatura ambiente. Ajustar el volumen a 1 L. Almacenar a temperatura ambiente.

Proteinasa K 10 mg/mL (10 mL)

Disolver 100 mg de proteinasa K en 10 mL de agua destilada o desionizada. Fraccione la solución (0.5 mL recomendado) y almacenar a -20°C .

Dodecil sulfato de sodio SDS 20 % (1 L)

Lentamente disolver 200 g de SDS grado electroforesis (ultrapuro) en 800 mL de agua destilada o desionizada. Para facilitar la disolución, la solución debe ser calentada. Ajustar el volumen a 1 L y almacenar a temperatura ambiente.

PRECAUCIÓN: Utilizar mascarilla protectora cuando pese el SDS.

Tris-HCl, pH 8.0 (1L)

Disolver 121.1 g de Tris base en 800 mL de agua destilada o desionizada. Ajuste el pH a 8.0 a temperatura ambiente agregando HCl concentrado (aproximadamente. 45 mL)

NOTA: Muchos tipos de electrodos no miden exactamente el pH del amortiguador Tris; hay que asegurarse de obtener los electrodos adecuados para el ajuste del pH del amortiguador Tris, ajustar el volumen final a 1 L con agua destilada o desionizada. Esterilizar con autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

XAAD.

Preparación: 4 partes de xilol, 6 partes de alcohol isopropílico, 5 partes de ácido acético glacial y 4 partes de dioxano.

Mantener a temperatura ambiente en frasco ámbar.

Etanol. 70%

Añadir 700 mL de etanol al 100% en un matraz graduado de 1000 mL asegurándose de que la medición sea exacta. Agregar 300 mL de agua al matraz graduado para obtener un volumen total de 1000 mL

Reactivos y suministros utilizados en el Laboratorio.

Químicos

Acetato de sodio, Sigma, No de Lot. 31H-014616

Ácido acético glacial, J.T.Baker, No de Lot. C02C57

Alcohol isoamílico, Productos Químicos Monterrey, No de Lot. 015337

E.D.T.A. dihidratado, Sigma, No. de Lot. 33H1160

Etanol absoluto, Merck, No. de Lot. 30126

Fenol cloroformo alcohol isoamílico de 1 fase AMRESCO, No. de Lot. 1942C155

Hidróxido de sodio, Mercker, No. de Lot. 4031406498

Proteinasa K, BMG Labtech, No. de Lot. 73421535-55

Tris base, J.T Baker, No. de Lot. 132424223

Dioxano

Xilol.

DTT

SDS AMRESCO de 1kg Cat.0227

Formamida Hi Di Formamide, No. de Lot.0908871

Sistemas comerciales de extracción y sistemas comerciales de identificación

QIAquick, QALgen No. de Lot. 28706

Identifiler No. de Lot. 1005020

Minifiler

PowerPlex21 System No. de Lot. 0000014495

PowerPlex Y23 System No. de Lot. 0000038674

Equipos:

Termociclador GeneAmp PCR System modelo 9700.

Genetic Analyzer 3130 Hitachi de Applied Biosystems.

Software GeneMapper ID-X, de la compañía Applied Biosystems.

Centrifuga refrigerada Hermle Labnet modelo z216mk

Campanas de bioseguridad UVP® UV3 HEPA PCR Cabinet

Termo shaker de Labnet International VORTEMP 56
Vortex Mixer de labnet international modelo VX-200
Termobloque o baño seco de labnet international modelo Accublock D-1100
Parrilla de calentamiento IKA® c-MAG HS4
Real Time PCR System modelo 7500 de Applied Biosystems
Microscopio Stereo Discovery.V12 marca Carl Zeiss
Refrigerador Sanyo Biomedical Laboratory Freezer modelo MDF-U5312
Refrigerador Sanyo Medicoool modelo MPR-514

Suministros

(Que pueden ser abastecidos por cualquier laboratorio de productos científicos)

Bolsas y envolturas para las muestras

Contenedores para RPBI

Cubre bocas

Gradillas para tubos de microcentrífugas

Guantes desechables de latex

Marcadores de tinta indeleble

Matraces de 10 mL a 1 l

Matraces de 50 mL a 2 L

Matraces de filtración de 2 L

Navajas de bisturí

Papel aluminio

Parafilm

Pinzas entomológicas

Pipetas pasteur

Probetas graduadas

Puntas para micropipetas con filtro

Tijeras

Toallas absorbentes

Tubos para microcentrífuga

Referencias

- Amendt J., Krettek R. & Zehner R. (2004). Forensic entomology. *Naturwissenschaften* 91. 51-65.
- Arnaldos, M. I., C. Prado e Castro, J. J. Presa, E. López-Gallego & M. D. García. 2006. Importancia de los estudios regionales de fauna sarcosaprófaga. Aplicación a la práctica forense. *Ciencia Forense*, 8: 63-82.
- Beneke, M. 2001. A brief history of forensic entomology. *Forensic Science International* 120:2-14.
- Borror, D. J., C. A. Triplehorn & N. F. Johnson 1989. *An introduction to the study of insects*. Saunders College Publishing, Philadelphia.
- Byrd, J.H. and Castner, J.L. 2010. *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations*. 2° edition. CRC Press, Boca Raton. FL.
- Butler, J. M. 2005. *Forensic DNA Typing: Biology and Technology Behind STR Markers*. Academic Press.
- Butler, J.M. 2010. *Fundamentals of forensic DNA typing*. Academic Press, Elsevier. 519pp.
- Campobasso, C. P., Llinville, J Wells and F. Introna. 2005. *Forensic Genetic Analysis of insect Gut Contents*. *American Journal of Forensic Medicine And Phatology* 26:161-165.
- Charlotte Omoto C.K. and P.F. Lurquin. 2004.-, *Genes and DNA: A Beginner's Guide to Genetics and Its Applications*. Columbia University Press, USA., 239.
- Farfán M.J. 2004. *Introducción a la tecnología del ADN aplicada en el laboratorio forense*. Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Departamento de Sevilla. Universidad Autónoma de Madrid. [En línea] 2004 [Consult: 2013] Disponible en: http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/gpepe/g_forense/introduccion_a_la_tecnologia_del_adn_aplicada_en_el_laboratorio_forense
- Fernández Almeida. R. *Autopsia* [En línea]. Biblioteca Universia Recursos de aprendizaje 2009. [Consult. 25 de marzo de 2013]. Disponible en WWW:<<http://hdl.handle.net/2024/464>
- Gaudry E., Dourel L., Chauvet B., Vincent B. and Pasquerault T. 2007. L'entomologie légale: Lorsque insecte rime avec indice. *Revue Francophone des Laboratoires* 392:23-32.

Gennard D.E. 2007. *Forensic Entomology: an Introduction*. Ltd John Wiley & Sons, 224 pp.
Gisbert Calabuig, J. A. and Villanueva Cañadas. 2004. *Medicina legal y toxicología*. 6ª edición. Elsevier- Masson, 1416 pp.

Grimaldi, D and M.S. Engel. 2005. *Evolution of insects*. Cambridge University Press. 772 pp.

Goff, M.L. 1993. Estimation of postmortem interval using arthropod development and successional patterns. *Forensic Sci. Rev.*5: 81-94.

Goodwin W., Linacre A. and Hadi S. 2007. *An introduction to forensic genetics.*, edit. Wiley, 170.

Hall, R.D. and N. H. Haskell. 1995. *Entomology-applications in medico legal investigations, in forensic sciences*, ed. C. Wecht, New York: Matthew Bender.

Introna F., Campobasso C.P. and Lee Goff M. 2001. Entomotoxicology. *Forensic Science International* 120: 42-47.

Kobilinsky L., Levine, L., Margolis-Nunno H. 2007. *Forensic DNA analysis*. Chelsea House Publishers. 121 pp..

Li, X, Cai, J.F. and Guo, Y.D. 2011. Mitochondrial DNA and STR analyses for human DNA from maggots crop contents: a forensic entomology case from central – Southern China. Department of Forensic Science. *Tropical Biomedicine* 28(2): 333-338.

Lord W.D. and JF. Burguer. 1984. Artropods associated with herring gull (*Larus argentatus*) and great black backed gull (*Larus marinus*) carrion on islands in the gulf of maine. *Environmental Entomology* 13: 1261-1268.

Llorente J., A. Garcés, T. Pulido and I. Luna (Trads.) 1985. *Manual de Recolección y Preparación de Animales*. Facultad de Ciencias, UNAM, México, D. F.

Magaña, C. 2001. La entomología forense y su aplicación a la medicina legal. Data de la muerte. *Aracnet 7-biol. S.E.A.* 28:49-57.

Malgorn, Y. and Coquoz, R. 1999. DNA typing for identification of some species of Calliphoridae: an interest in forensic entomology. *Forensic Science International*, 102: 111–119.

Martín Martín.P. 2004. La identificación genética de restos cadavéricos. Estudios jurídicos. Médicos forenses. Ministerio de Justicia: Centro de Estudios Jurídicos de la Administración de Justicia, España, 3994-4014.

Martínez Jarreta M.B., 1999. *La prueba del ADN en medicina forense*. Ed. Masson S.A., Barcelona.

Primarosa Chieri, Zannoni E.A. 2005. Prueba del ADN. 2° edición, primera reimpresión. Editorial Astrea de Alfredo y Ricardo de Palma. Buenos Aires, Argentina. 237 pp.

Ramos-Mendes Cainé.L.S. *Entomologia forense: identificação genética de espécies em Portugal*. Universidade de Coimbra. [En línea] 2010 [Consult. 25 de marzo de 2013]. Tesis doctoral. Disponible en: [www: http://hdl.handle.net/10316/14540](http://hdl.handle.net/10316/14540)

Viloria Petit.A. 2007. La importancia de la entomología en la investigación criminal. [En línea] 2007[Consult. 25 de marzo de 2013]. Disponible en: [WWW:<http://criminalistic.org/DescargablesPDF/La_Importancia_de_la_Entomolo_Invest_Criminal.pdf>](http://criminalistic.org/DescargablesPDF/La_Importancia_de_la_Entomolo_Invest_Criminal.pdf)

Wells, J.D., Introna, F.Jr., Di Vella, G.,Campobasso, C.P., Hayes, J. and Sperling, F.A. 2001. Human and insect mitochondrial DNA analysis from maggots. *Journal of Forensic Sciences* 46: 685-687.

Zehner, R., Amendt, J. and Krettek, R. 2004.STR Typing of Human DNA from Fly Larvae Fed on Decomposing Bodies. *Journal of Forensic Sciences* 49: 337-340.

Anexos

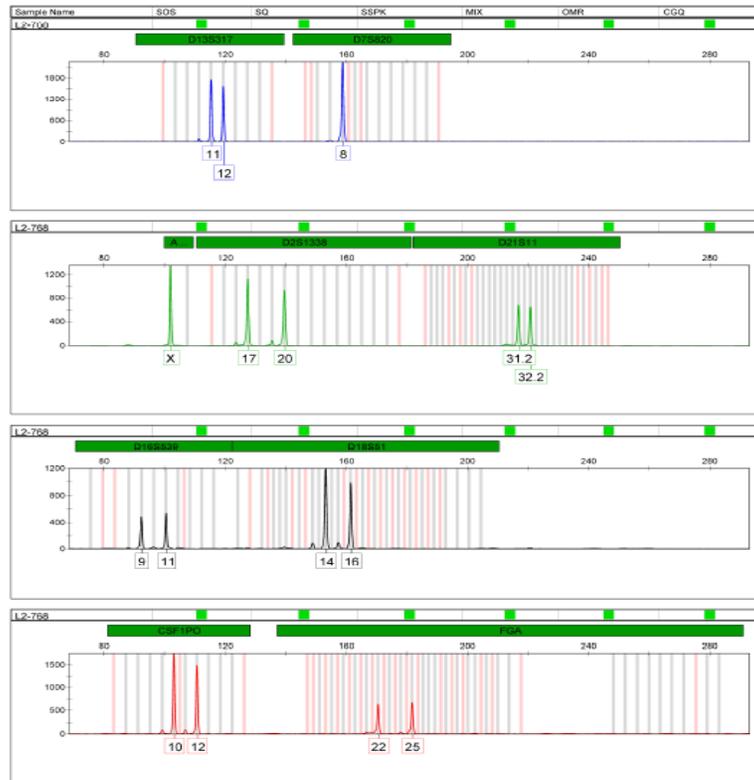
Muestras de algunos electroferogramas obtenidos con los distintos sistemas de amplificación utilizados en el presente estudio.

MiniFiler

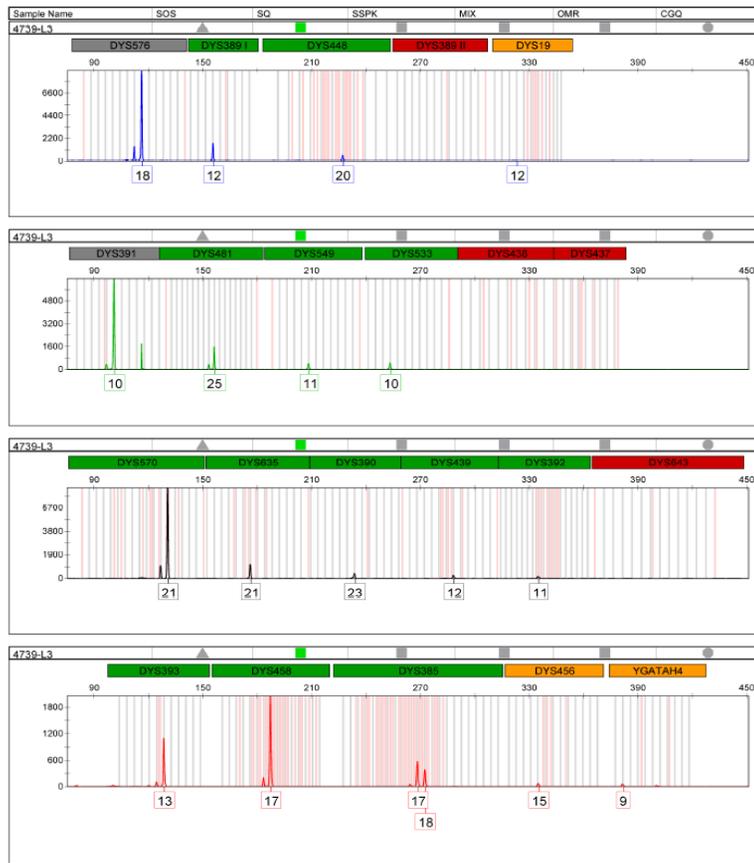
Powerplex y23

Power-plex 21

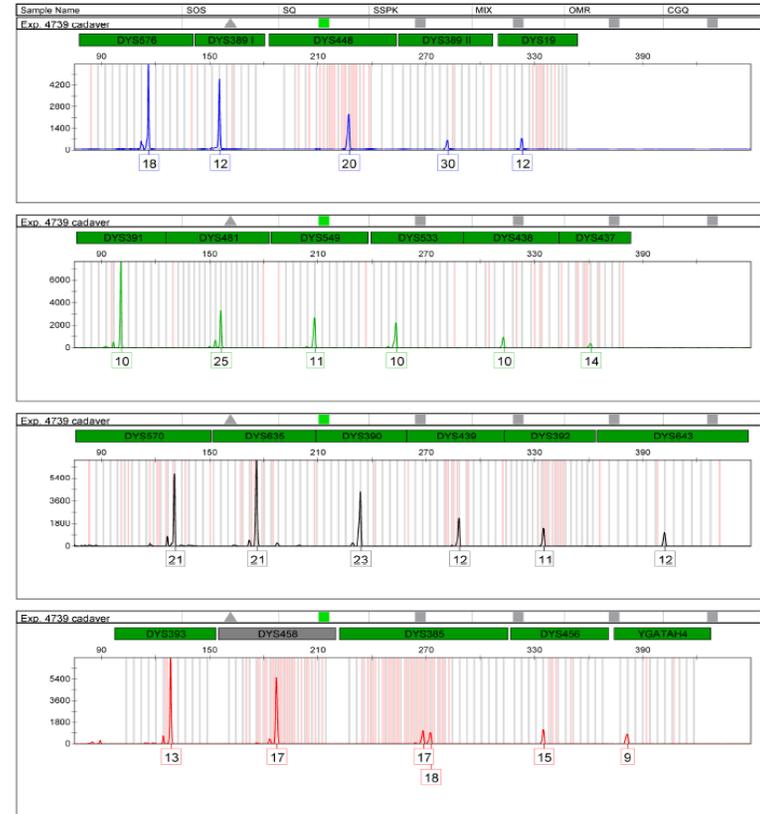
Identifiler



Electroferograma obtenido con el sistema Minifiler® a partir del contenido gástrico de larvas en segundo estadio

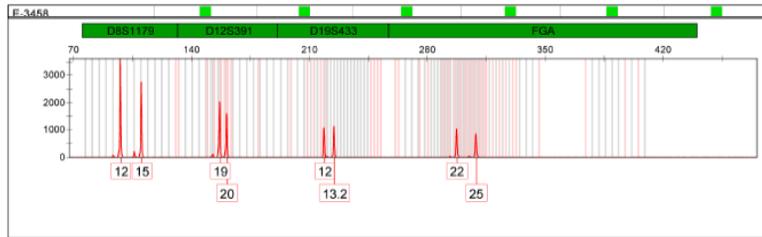
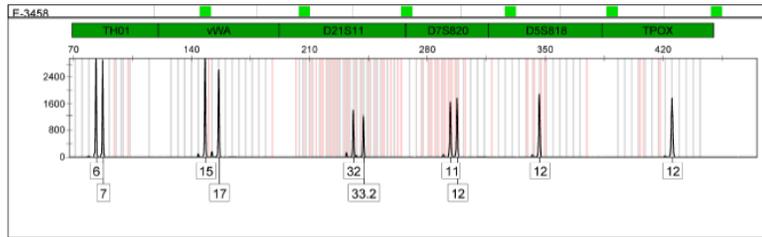
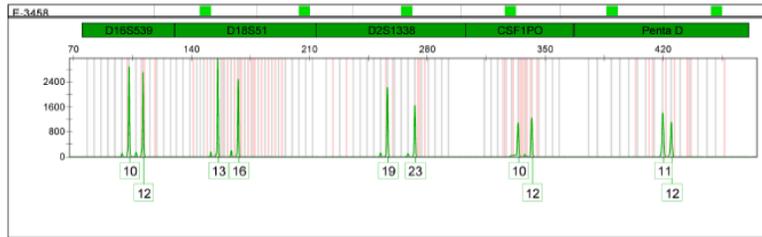
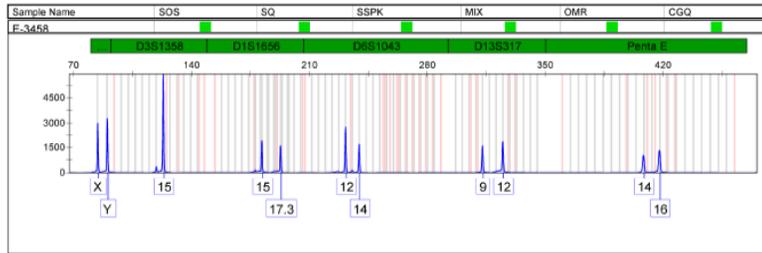


a)

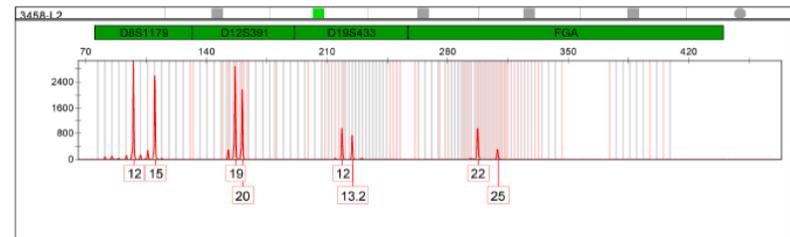
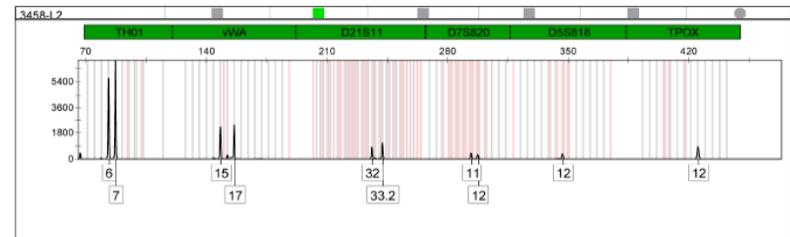
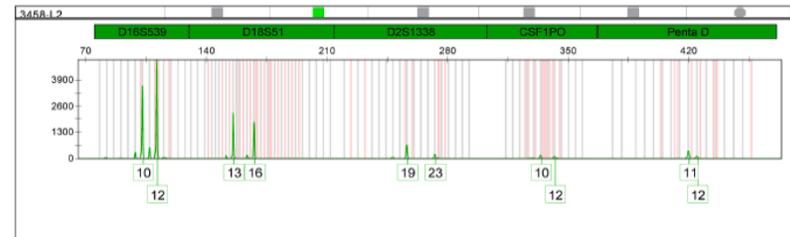
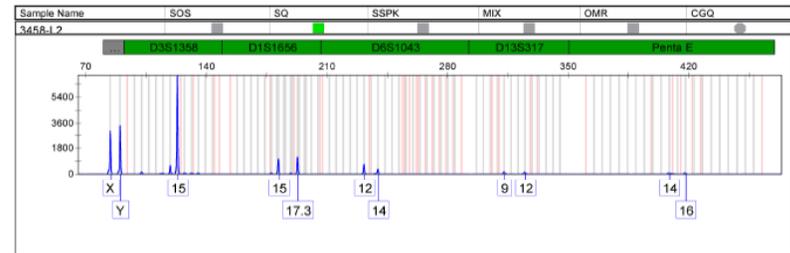


b)

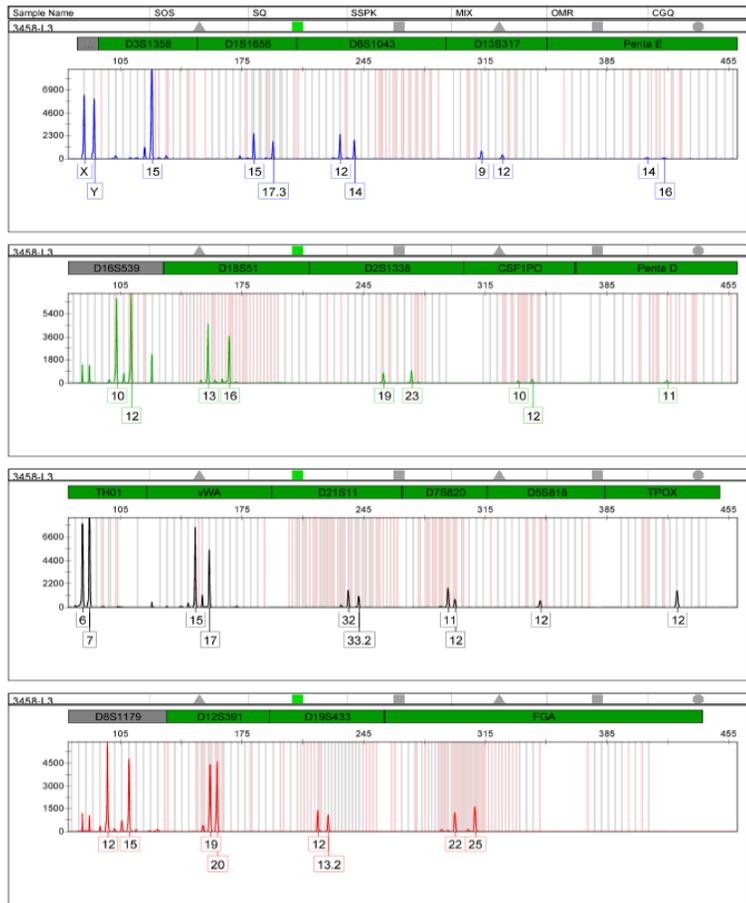
Loci amplificados mediante el kit PowerPlex Y23 a) muestra de referencia b) análisis de larvas en tercer estadio



a)

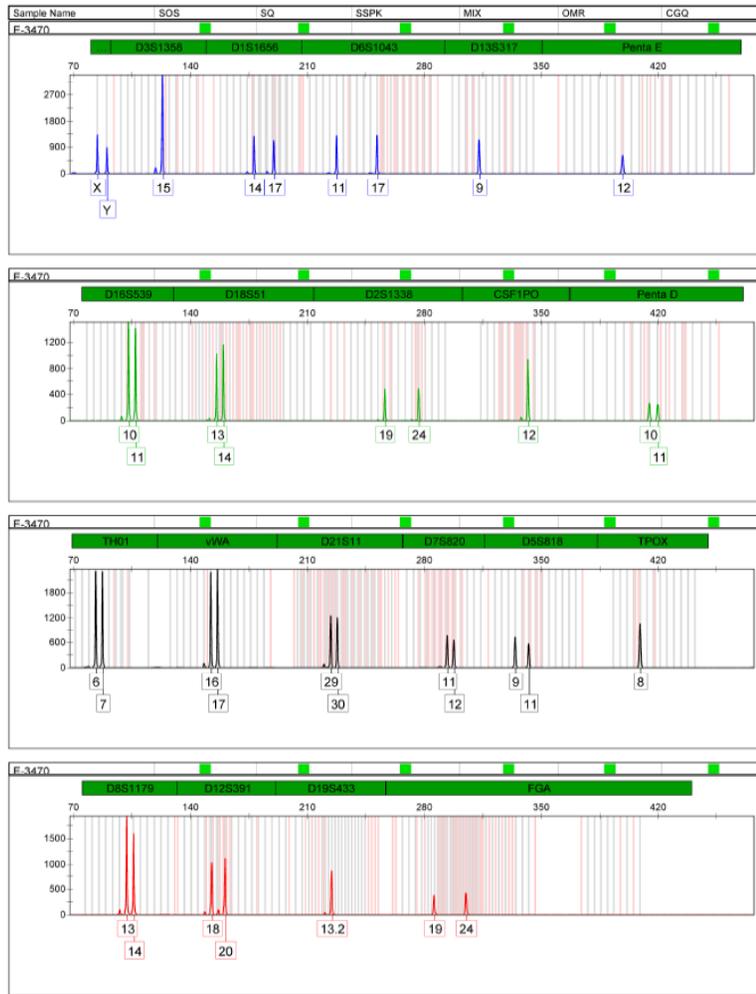


b)

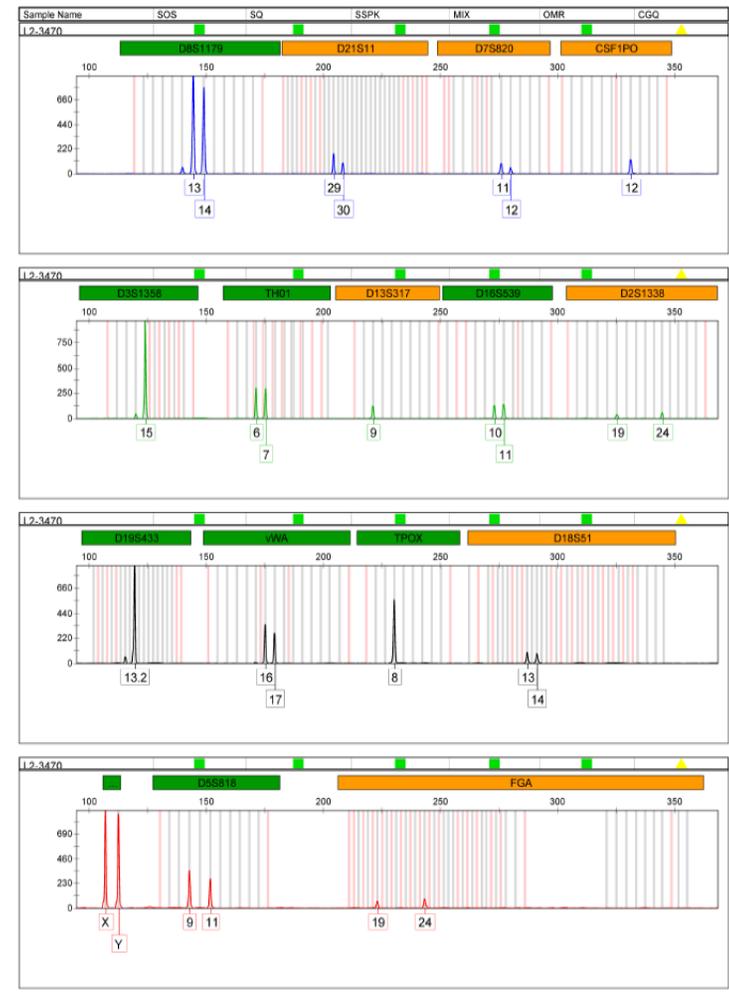


c)

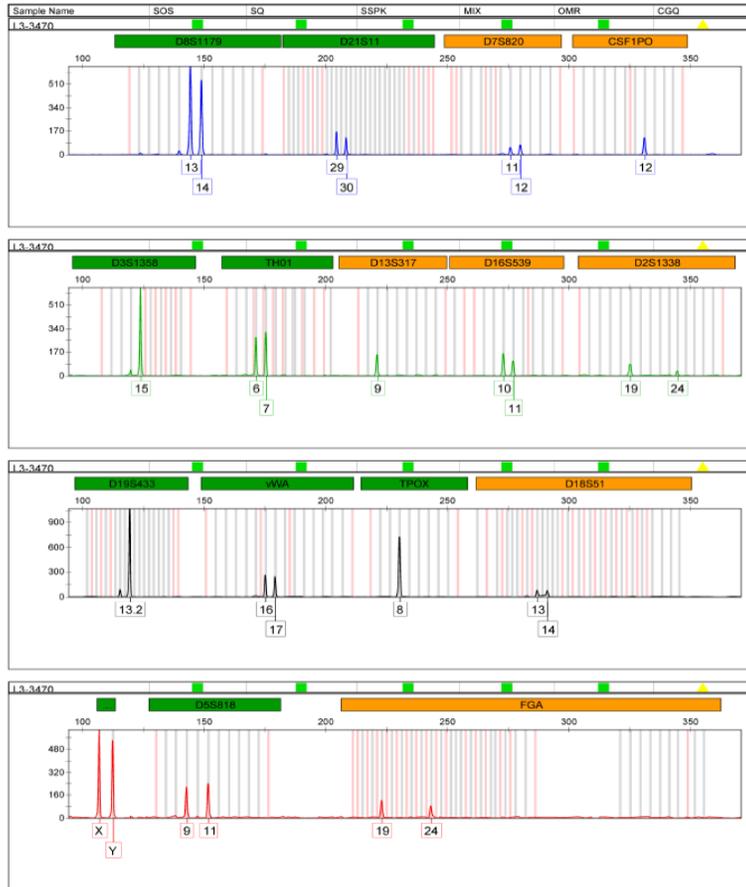
Electroferogramas obtenidos con el sistema Power Plex 21 System. a) referencia, b) segundo estadio, c) tercer estadio.



a)



b)



c)

Electroferogramas obtenidos a partir de la amplificación con el sistema Identifiler, a) muestra de referencia, b) segundo estadio, c) tercer estadio