



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**LA ENTOMOTOXICOLOGÍA Y SU UTILIDAD EN EL
QUEHACER FORENSE**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO**

PRESENTA

RICARDO MARÍN SÁNCHEZ

TUTORA

DRA. MARÍA ELENA BRAVO GÓMEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

AÑO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: José Fausto Rivero Cruz**

VOCAL: **Profesor: Luis Gerardo Martínez Jardines**

SECRETARIO: **Profesor: María Elena Bravo Gómez**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Carolina Flores Ávila**

2º SUPLENTE: **Profesor: Sandra María Centeno Llanos**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: EDIFICIO DE LA LICENCIATURA EN CIENCIA FORENSE, FACULTAD DE MEDICINA, CIUDAD UNIVERSITARIA.

ASESORA DEL TEMA:

María Elena Bravo Gómez

SUSTENTANTE:

Ricardo Marín Sánchez

“Les mouches bourdonnaient sur ce ventre putride,
D'où sortaient de noirs bataillons
De larves, qui coulaient comme un épais liquide
Le long de ces vivants haillons”

Charles Baudelaire

Une Charogne – Les Fleurs du Mal

Contenido

INTRODUCCIÓN.....	1
LA ENTOMOTOXICOLOGÍA.....	4
ENTOMOFAUNA CADAVERICA DE INTERÉS FORENSE.....	9
ORDEN <i>DIPTERA</i>	13
ORDEN <i>COLEOPTERA</i>	18
APLICACIONES DE LA ENTOMOTOXICOLOGÍA.....	23
DETECCIÓN INDIRECTA DE XENOBIÓTICOS EN CADÁVERES.....	24
DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LOS XENOBIÓTICOS EN EL DESARROLLO DE ESPECIMENES ENTOMOLÓGICOS CON INTERÉS FORENSE.....	28
OTRAS APLICACIONES.....	32
DETECCIÓN DE RESIDUOS DE ARMAS DE FUEGO EN UN CADÁVER.....	32
ECOLOGÍA.....	33
ARQUEOLOGÍA.....	33
MUESTREO Y ANÁLISIS.....	36
MUESTREO Y ALMACENAMIENTO.....	37
PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA EL TRANSPORTE, CONSERVACIÓN Y ANÁLISIS.....	39
ANÁLISIS TOXICOLÓGICO.....	40
EXTRACCIÓN.....	43
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA Y GASEOSA.....	44
ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO.....	48
ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJO.....	50
INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	54
INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS POSITIVOS USANDO INSECTOS COMO MATRIZ TOXICOLÓGICA.....	55
INTERPRETACIÓN DEL IMPACTO EN EL DESARROLLO DE UN INSECTO SARCOSAPRÓFAGO, DEBIDO A LA EXPOSICIÓN A UN XENOBIÓTICO, Y SUS IMPLICACIONES EN LA DETERMINACIÓN DEL INTERVALO <i>POSTMORTEM</i>	59
INTERPRETACIÓN EN OTROS CONTEXTOS.....	64
LA ENTOMOLOGÍA FORENSE Y LA ENTOMOTOXICOLOGÍA EN MÉXICO.....	66
LA APLICACIÓN DE LA ENTOMOLOGÍA FORENSE EN MÉXICO.....	67

LA INVESTIGACIÓN SOBRE ENTOMOLOGÍA FORENSE Y ENTOMOTOXICOLOGÍA EN MÉXICO	69
CONCLUSIONES.....	71
BIBLIOGRAFÍA.....	73

Índice de tablas

<i>Tabla 1 Sucesión de la fauna de los cadáveres. Tabla basada en datos de Megnin P. (1894) y Smith K. (1986). Elaboración propia.</i>	12
<i>Tabla 2 Ejemplos de sustancias reportadas en estudios entomotoxicológicos, y las técnicas utilizadas en su análisis.</i>	42
<i>Tabla 3 Etapas del análisis inmunohistoquímico</i>	50
<i>Tabla 4 Diferencia de concentraciones de Diazepam en dípteros de la misma especie y diferente etapa de desarrollo</i>	55
<i>Tabla 5 Ejemplos en los cuales un resultado positivo a algún xenobiótico fue interpretado en el contexto de una investigación forense</i>	58
<i>Tabla 6 Algunos xenobióticos con efecto marcado en el desarrollo de los insectos sarcosaprófagos</i>	62

Índice de figuras

<i>Figura 1 Imágenes del libro La Faune des Cadavres (La Fauna de los Cadáveres, 1894), de Pierre Mégnin.</i>	6
<i>Figura 2 Ilustración extraída del tratado de entomología forense, “La Faune des Cadavres” de Mégnin P. (1894).</i>	8
<i>Figura 3 Calliphora vicina.</i>	15
<i>Figura 4 Lucilia sericata.</i>	16
<i>Figura 5 Chrysomya megacephala adulta.</i>	17
<i>Figura 6 Sarcophaga carnaria adulta.</i>	18
<i>Figura 7 Ejemplos de coleópteros hallados en cadáveres.</i>	22
<i>Figura 8 Detección de morfina mediante una técnica inmunohistoquímica, en una sección de tejido de una larva de C. vicina en tercera fase.</i>	27
<i>Figura 9 Duración de las etapas de C. megacephala a temperatura constante (28°C), con tres dosificaciones diferentes de ketamina en su alimento.</i>	31
<i>Figura 10 Especímenes de Chrysomya putoria. A) Control, B) Especímenes expuestos a diazepam.</i>	32
<i>Figura 11 Estructura química de la quitina.</i>	34

Figura 12 Pupa de <i>Chrysomya albiceps</i> , hallada dentro del abdomen de la momia de Namenkhet Amun.	35
Figura 13 Recuperación de THC y THCA en extracción líquido – líquido, variando los solventes de la fase orgánica. (n-Hex: n-Hexano; n-Hep: n-Heptano; TMBE: Tetrametilbutil éter; EA: Acetato de Etilo; DE: Dietiléter).	44
Figura 14 Sistema Básico de HPLC.	47
Figura 15 Ejemplos de movimientos moleculares detectados por los instrumentos de análisis de espectroscopía infrarroja. Arriba se muestra un movimiento de elongación asimétrico de un metilo. Abajo se observa la representación de una flexión en los enlaces C – H.	51
Figura 16 Comparación de los espectros de infrarrojo cercano de siete sustancias con diferentes grupos funcionales.	52
Figura 17 Etapas de muestreo y análisis toxicológico en insectos.	53
Figura 18 Cadáver en estado de esqueletización hallado a la intemperie cubierto de nieve. Las larvas muertas que se encontraron en el cadáver dieron un resultado positivo a la benzoilecgonina. (Nolte y cols., 1992).	59
Figura 19 Diagrama isomorfo e isomegalo.	63
Figura 20 Desarrollo general de una larva de una mosca necrófaga. Se aprecian las estructuras bucales (izquierda), el tamaño de animal (centro) y los espiráculos en la parte posterior (derecha). Tomado de Goff (2009). p. 27.	64
Figura 21 Cantidad de mercurio contenido en los tejidos de dos especies de moscas, asociado a ciertas zonas de Finlandia y Yugoslavia. Tomado de Nourteva y cols. (1980).	65

LA ENTOMOTOXICOLOGÍA Y SU UTILIDAD EN EL QUEHACER

FORENSE

INTRODUCCIÓN

Desde la década de 1980, se comenzó a tomar en cuenta la posibilidad de detectar sustancias tóxicas en los tejidos de insectos necrófagos durante las investigaciones forenses, de esta manera aparece la entomotoxicología. Un ejemplo, entre los casos precursores de esta disciplina, es el descrito por Beyer y cols. en 1980: Se halló un cadáver en avanzado estado de descomposición, en proceso de esqueletización. No había disponibilidad de muestras de orina, sangre o tejidos que fueran viables para realizar un análisis toxicológico. Sin embargo, en el sitio se hallaban aún especímenes de *Cochliomyia macellaria*, una variedad de mosca necrófaga. Los análisis fueron positivos para fenobarbital, lo cual sirvió como apoyo para la hipótesis de un suicidio, al relacionar este hecho con otras evidencias.

Desde finales del siglo XX y hasta ahora, se han realizado una gran cantidad de estudios con el objetivo de desarrollar esta nueva disciplina forense. Se ha experimentado con diversas especies de insectos necrófagos, que han sido expuestos a alimento contaminado con sustancias tóxicas; se han evaluado numerosos métodos de detección de xenobióticos; se han implementado técnicas

con el objetivo de estandarizar los métodos de análisis, entre otras cosas. Ciertas cuestiones han obtenido respuestas satisfactorias, tales como el efecto que algunos xenobióticos pueden tener en el crecimiento de los insectos necrófagos; pero otras cuestiones, tales como la relación entre la concentración de una sustancia en el tejido del insecto con la concentración en los tejidos del cadáver, aún no se han resuelto.

El presente trabajo tiene como objetivo explorar las bases, la actualidad y las posibilidades de la entomotoxicología. Esta nueva disciplina se mostró, desde sus inicios, como una herramienta de notable potencial para dilucidar las causas de decesos relacionados con agentes tóxicos. Así mismo, ha demostrado ser una fuente de información muy importante para obtener una determinación fiable del intervalo de tiempo transcurrido desde la muerte del individuo hasta su hallazgo, cuando dicha determinación se realiza con base en el desarrollo de la entomofauna cadavérica.

Primero será necesario explorar los fundamentos de la entomotoxicología: se hará un recorrido desde sus orígenes, se presentarán sus bases científicas y se comentarán sus fortalezas y debilidades. Posteriormente, enlistarán y describirán las especies de insectos con mayor relevancia en el quehacer forense, se describirán sus principales características taxonómicas, fisiológicas, distribución geográfica y comportamiento. Más adelante, se dará una revisión a los métodos seguidos para el análisis toxicológico, desde el muestreo *in situ*, hasta la aplicación de los métodos analíticos y la obtención de resultados. Después se presentarán las interpretaciones y aplicaciones de los resultados obtenidos en los

análisis toxicológicos, en casos reales y en situaciones de laboratorio, haciendo énfasis en el actual estado del arte. Finalmente, se abordará la situación actual de la entomología forense y de la entomotoxicología en México.

A través de las siguientes páginas, se intentará ilustrar la relevancia de la entomotoxicología como una herramienta para las investigaciones forenses, ofreciendo un panorama actual y general, que también sirva como un esbozo del potencial y del futuro de esta disciplina.

LA ENTOMOTOXICOLOGÍA

La entomotoxicología, es una rama de la entomología forense, que tiene como objetivo la detección de xenobióticos en los tejidos de insectos necrófagos. Sus resultados, pueden aplicarse para determinar la presencia de sustancias tóxicas en los tejidos de un cadáver, auxiliando en el esclarecimiento de las causas del deceso; también hallan utilidad al cuantificar el efecto que estas sustancias pudiesen tener en el desarrollo de especímenes entomológicos, utilizados en la determinación del intervalo postmortem (IPM). Según Gennard, Estos insectos pueden usarse, basándose en sus etapas de desarrollo y sucesiones, para la investigación forense, cuando han pasado más de 72 h del deceso, y la temperatura del cadáver, entre otros indicios estudiados por la medicina forense, ya no ofrecen suficiente información para correlacionar con el intervalo postmortem (2007, p.3).

Pensando en el primer punto, podría surgir la siguiente pregunta: ¿En qué momento sería ventajoso, o incluso necesario, utilizar insectos necrófagos para realizar un análisis toxicológico? Pues si bien, en muchos casos es posible acceder a matrices toxicológicas convencionales, tales como sangre, orina u órganos internos, la putrefacción avanzada de un cadáver puede conducir a la inviabilidad de estas, o incluso a su ausencia, por lo que la utilización de matrices toxicológicas alternativas se convierte en un recurso para el investigador forense (Skopp y cols. 2010). Entonces aparecen en escena los insectos sarcosaprófagos, que al haber acompañado al cadáver desde las primeras horas, o incluso minutos,

y habiéndose alimentado de este, podrían contener en su interior alguna respuesta que abra un camino en la investigación forense, conduciendo a nuevas líneas de investigación.

Con respecto al segundo punto, la influencia de los xenobióticos en el desarrollo de los insectos necrófagos, la importancia es notable, debido a que algunos de estos artrópodos, principalmente los dípteros, se utilizan frecuentemente para determinar el tiempo que ha transcurrido desde la muerte de un individuo hasta el momento del hallazgo del cuerpo. Estas determinaciones se realizan con base en el desarrollo de los especímenes entomológicos recolectados, comparándolos con una base de datos. Esta práctica forense se ha utilizado desde el siglo pasado, teniendo una gran aceptación en el ámbito legal, debido a que pueden obtenerse datos fundamentados cuantitativamente sobre el momento del deceso.

El desarrollo y las sucesiones de insectos sarcosaprófagos en los cadáveres se han estudiado ampliamente desde finales del siglo diecinueve. Los primeros casos documentados, en los que se utilizó formalmente la entomología forense para las investigaciones, fueron en Francia. El primero de ellos tuvo lugar en 1850, y su objeto de estudio fue el cadáver de un niño, encontrado en estado de momificación (Benecke, 2001). El médico francés Louis Bergeret D'Arbois, contemporáneo y amigo de Louis Pasteur, tuvo la idea de utilizar a los insectos para datar la fecha aproximada del deceso, y así dar luz a esta cuestión para la cual la medicina forense no hallaba respuesta. Para esto, Bergeret utilizó información de otro importante personaje: el científico francés de origen español Mathieu Orfila (también llamado "padre de la toxicología", por sus importantes

aportaciones al desarrollo de esta disciplina en sus primeras etapas), que años antes, en 1831, había descrito a la fauna cadavérica a partir de diversas exhumaciones que realizó y documentó en su *Tratado de las Exhumaciones Jurídicas*.

Posteriormente, Pierre Mégnin, médico francés, publica su libro *La Fauna de las Tumbas* (1887), seguido de su obra más importante *La Fauna de los Cadáveres* (1894). En esta última, amplía enormemente el conocimiento del comportamiento de los insectos necrófagos, describiendo las sucesiones de estos animales, así como sus características.

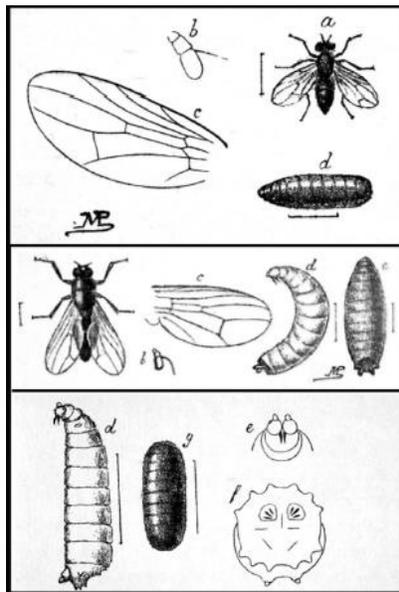


Figura 1 Imágenes del libro *La Faune des Cadavres* (La Fauna de los Cadáveres, 1894), de Pierre Mégnin.

Pero fue a partir de la aparición de la entomotoxicología, que tomó en cuenta el aceleramiento o la inhibición en el desarrollo de los insectos necrófagos debido a la incorporación de xenobióticos a su metabolismo. Estas modificaciones en ocasiones representan errores de horas, e incluso días, en el estimado del intervalo postmortem (Lopes de Carvalho y cols. 2012), lo que puede conducir a importantes equivocaciones, con implicaciones legales. De esta forma, los insectos pueden convertirse en un aliado para el investigador forense, cuyos resultados son, a su vez, un apoyo fundamental en la aplicación de la justicia.

La utilidad de la entomotoxicología, se ha demostrado en diversas ocasiones. Sin embargo, esta disciplina presenta puntos débiles, tales como la actual imposibilidad de establecer una clara relación entre la concentración del xenobiótico en los tejidos del insecto con la concentración en los tejidos del cadáver (Gosselin y cols. 2011a), algo que sería de enorme utilidad para poder aseverar que la presencia de una sustancia fue la causa de la muerte, o si su concentración correspondía a un consumo posiblemente inofensivo. Esta cuestión podría ser eventualmente resuelta, con el avance en el conocimiento del metabolismo de los xenobióticos en los especímenes entomológicos. Sin embargo, estas limitaciones, más que restar importancia a esta nueva disciplina, representan áreas de oportunidad para la investigación.

La mayoría de las sustancias involucradas en las muertes relacionadas con xenobióticos, son detectables a través de las larvas de insectos necrófagos: opiáceos tales como morfina y codeína, cocaína y su metabolito benzoilecgonina,

anfetaminas, fenotiacinas y benzodiacepinas, esteroides, barbitúricos y distintos salicilatos como el paracetamol.

Algunas drogas se han detectado en puparios, e incluso en excrementos de escarabajo. Ciertos estudios han demostrado que es posible detectar drogas en los tejidos de las larvas, cuando en los tejidos del cadáver ya no son detectables (Gosselin y cols. 2011a). Sin embargo, el no detectar ninguna droga en las larvas no implica su ausencia en los tejidos, como indican algunos estudios.

En los estudios entomotoxicológicos, la detección analítica de xenobióticos no representa la mayor dificultad. El mayor obstáculo es la interpretación de los datos obtenidos, debido a la carencia de métodos estandarizados para el manejo de los especímenes durante su recolección, almacenamiento y descontaminación; así como la carencia de suficientes bases de datos, que relacionen las concentraciones del xenobiótico en el sustrato en el cual se desarrolla el insecto, y en los tejidos del mismo.

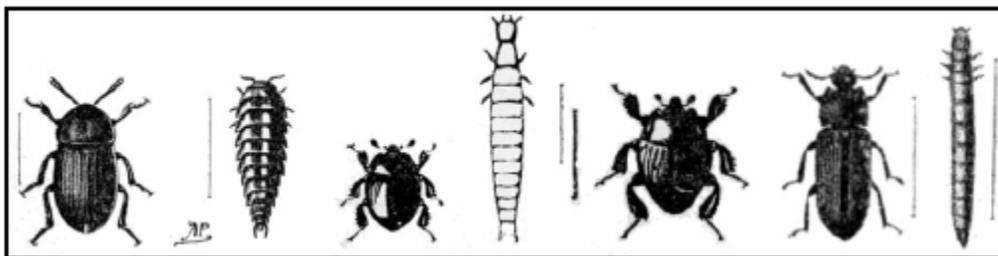


Figura 2 Ilustración extraída del tratado de entomología forense, “La Faune des Cadavres” de Mégnin P. (1894).

ENTOMOFAUNA CADAVÉRICA DE INTERÉS FORENSE

A partir de los primeros instantes del deceso, se lleva a cabo una serie de reacciones químicas que modifican las condiciones del medio. Se lleva a cabo la autólisis, y la producción de sustancias volátiles por parte de las bacterias anaerobias. Estas sustancias causan el *Odor Mortis* (Arpad, 2012), lo cual atrae a los insectos sarcosaprogos.

La fauna que habita en la carroña consiste principalmente de insectos, los cuales siguen una secuencia de aparición, hecho que fue descrito por primera vez por Pierre Mégnin en 1894. Mediante el reconocimiento de las especies en esta secuencia, de su etapa de desarrollo, de las condiciones ambientales y la exposición a xenobióticos, se puede hacer un estimado del tiempo que ha transcurrido desde la muerte. También es posible averiguar si el cadáver fue movido de su localización original, y en algunos casos es posible detectar la presencia de sustancias tóxicas (Gosselin y cols. 2011a).

Los insectos son los organismos animales más abundantes en el planeta. La *clase* Insecta, que se encuentra inscrita en el *phylum* Artropoda, a su vez se subdivide en una gran cantidad de grupos llamados *órdenes*. Cada orden se divide en *familias*, y cada familia se divide en *géneros*, y los géneros dan lugar a una o más especies. Cuatro órdenes de insectos, en específico, son especialmente diversos en cuanto a especies identificadas se refiere: Coleoptera (300,000), Lepidoptera (200,000), Hymenoptera (130,000) y Diptera (110,000) (Guillot, 2005). Las especies de insectos con más relevancia en la investigación forense pertenecen a

los órdenes *Diptera* y *Coleoptera*. Los primeros insectos en llegar al cadáver pertenecen al orden Diptera, y entre ellos suelen ser los especímenes de la familia Calliphoridae los primeros en llegar a colonizar.

No todos los insectos hallados en el cadáver se alimentan de carroña. Pueden distinguirse cuatro categorías de entomofauna relacionada con el cadáver (Kenneth, 1986):

- **Especies necrófagas:** Se alimentan de los tejidos en descomposición, y constituyen la categoría más importante en el establecimiento del intervalo postmortem. Diptera: Calliphoridae, Sarcophagidae. Coleoptera: Silphidae, Dermestidae.
- **Predadores y parásitos de las especies necrófagas:** La segunda categoría con mayor interés forense. Coleoptera: Staphylinidae. Diptera: Chrysomya, Ophyra (que se convierten en depredadores de otras especies, cuando llegan a una etapa larvaria avanzada).
- **Especies Omnívoras:** Avispas, hormigas y algunos escarabajos. Pueden llegar a alimentarse del cadáver y de los demás insectos.
- **Especies adventicias:** Son aquellas que llegan al cadáver casualmente, y lo usan como extensión de su ambiente. Collembola, arañas.

Según la descripción de numerosos entomólogos, desde la época de Pierre Megnin, hasta ahora, la sucesión de la fauna de los cadáveres puede dividirse en ocho grupos:

Fauna		Estado del cadáver	Imagen
Grupo	Ejemplos		
1	Calliphoridae: <i>Calliphora vicina</i> <i>Lucilia sericata</i> Muscidae: <i>Musca domestica</i>	Fresco	
2	Sarcophagidae: <i>Sarcophaga</i> spp.	Desarrollo del olor	
3	Dermeestidae: <i>Dermeestes</i> <i>Lardarius</i>	Enranciamiento de grasas	
4	Piophilidae: <i>Piophila casei</i> Fannidae: <i>Fannia canicularis</i>	Fermentación butírica	
5	Muscidae: <i>Ophyra capensis</i> Silphidae: <i>Nicrophorus vespilloides</i>	Fermentación amoniacal	

Fauna		Estado del cadáver	Imagen
Grupo	Ejemplos		
6	Acari	Restos secos	
7	Dermeestidae: <i>Attagenus pello</i>		
8	Ptinidae: <i>Ptinus brunneus</i> Tenebrionidae: <i>Tenebrio obscurus</i>		

Tabla 1 Sucesión de la fauna de los cadáveres. Tabla basada en datos de Megnin P. (1894) y Smith K. (1986). Elaboración propia.

ORDEN DIPTERA

Otro nombre común de este *taxo* es “moscas verdaderas”. Los adultos de esta especie, tienen solo un par de alas, y además otro par modificado -llamados halterones-, que funcionan como órganos de equilibrio. Los moscardones o moscas azules (blowflies), los tábanos (horsefly) y los mosquitos, pertenecen a este grupo.

Un gran número de especies pertenecientes a este *taxo* se desarrollan en materia orgánica en descomposición, como la carroña; mientras que otros son parásitos obligados de vertebrados o de otras especies de invertebrados.

Familia Calliphoridae

A esta familia pertenecen las moscas azules (*Calliphora*) y las verdes (*Lucilia*). Estos géneros son los que tienen más relevancia para la entomología forense. También se encuentra en esta familia el género *Chrysomya*.

Genero Calliphora

Aquí se encuentran clasificadas las moscas azules o moscardones, las cuales miden entre 6 y 14 mm de longitud, tienen un color azul metálico y un aspecto erizado. Este género está bien representado en las regiones holoárticas y en Australia. Aunque dos especies de este *taxo* se encuentran ampliamente distribuidas en la región afrotropical: *C. croceipalpis* y *C. vicina*). Los adultos de

este grupo pueden comenzar la ovoposición de 4 a 5 días, con una temperatura ambiental de 24°C, después de emerger, finalizando su fase como pupa.

Una hembra puede poner hasta 300 huevos en pequeños grupos o en una sola puesta, sus huevos miden aproximadamente 1.7 mm. Una vez que eclosionan, las larvas buscan penetrar en el cadáver, ya sea por orificios naturales o heridas. En cuanto las larvas llegan a la tercera fase, se alejan del cuerpo, buscando un refugio para continuar con la etapa de pupa; estos refugios pueden ser rocas, troncos, hojas o bajo el suelo, en el caso de estar a la intemperie; en el caso de hallarse dentro de una habitación, los refugios pueden ser muebles, almohadas o cualquier objeto que las pueda cubrir. Estas larvas pueden moverse hasta diez metros de distancia del cadáver, y llegar a otras habitaciones, por lo que es importante que el perito tome en cuenta esta conducta al momento de recolectar los especímenes.

Las especies más estudiadas en casos forenses son ***Calliphora vicina*** y ***Calliphora vomitoria*** L. También son de importancia las especies ***Calliphora alpina***, ***Calliphora stygia***, ***Calliphora uralensis***, ***Calliphora subalpina***, ***Calliphora loewi***, ***Cynomya mortuorum*** L., ***Cynomyopsis cadaverina***.

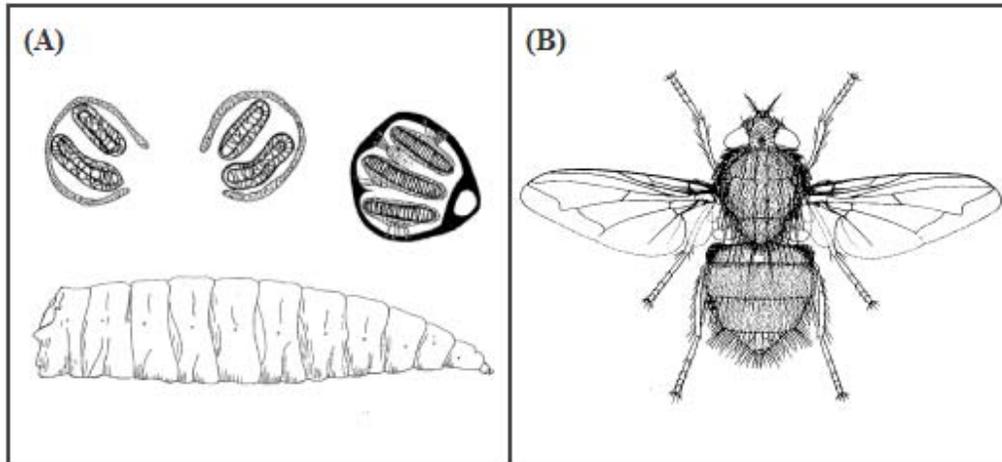


Figura 3 *Calliphora vicina*.

(A) Espiráculos posteriores de la segunda y tercera fase larvaria, vista lateral de una larva en tercera fase. (B) Especimen adulto de *Calliphora vicina*. Tomado de Smith K. (1986).

Genero *Lucilia*

En este grupo se encuentran las moscas de color verde, cuyo color característico se modifica con la edad del espécimen, siendo verde azulado, con reflejos violetas, al momento de emerger de la fase pupa, llegando a un verde esmeralda en la fase adulta que con el tiempo se va oscureciendo.

Los adultos de este género, son algo más pequeños que los pertenecientes al taxo *Calliphora* (4.5-10 mm), aunque tienen comportamientos y una biología similar.

Las especies de este grupo no son fáciles de identificar, especialmente las hembras, y probablemente deban enviarse con un experto para su identificación.

Algunas de las especies con particular interés forense son ***Lucilia sericata***, ***Lucilia illustris*** y ***Lucilia caesar*** L.

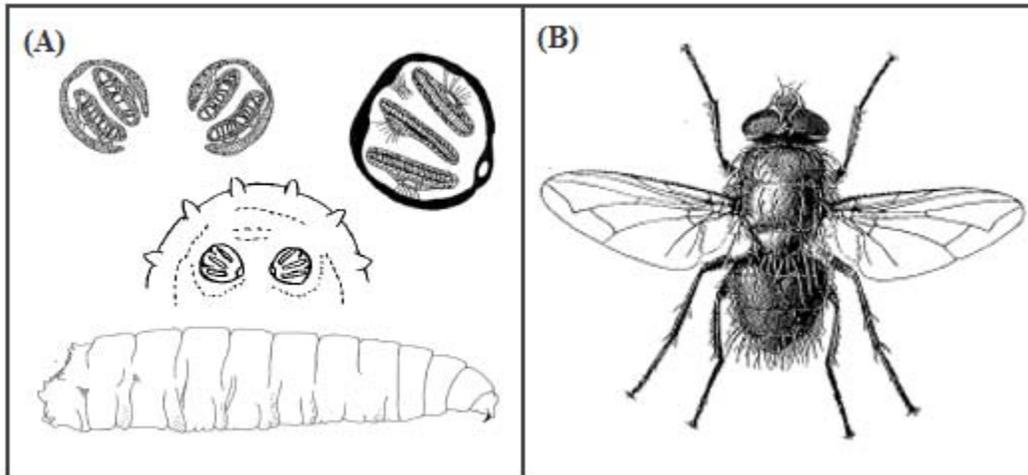


Figura 4 *Lucilia sericata*.

(A) Espiráculos posteriores de la segunda y tercera fase larvaria, vista posterior y lateral de una larva en tercera fase. (B) Espécimen adulto de *Lucilia sericata*. Tomado de Smith K. (1986).

Genero *Chrysomya*

Es un grupo esparcido en zonas tropicales y subtropicales del *viejo mundo*, en donde remplazan a las especies pertenecientes a *Calliphora* y *Lucilia*, que se hallan en zonas templadas.

Los adultos miden entre 5 y 12 mm y tienen una coloración verde oscuro o azul, algunas veces metálico. Algunas especies de importancia forense son ***Chrysomya albiceps*, *Chrysomya rufifacies*, *Chrysomya megacephala*.**



Figura 5 *Chrysomya megacephala* adulta.

Tomado de Smith K. (1986).

Familia Sarcophagidae

La familia Sarcophagidae, es un grupo muy extendido en todo el mundo. Las especies de este taxo, son comúnmente llamadas moscas de la carne (flesh-flies). Los adultos miden entre 4 y 16 mm de largo, y tienen en su tórax coloraciones plateadas y grisáceas, que forman patrones rayados, sus ojos tienen un color rojizo. Al igual que las moscas del género *Lucilia*, tienen preferencia por la carroña expuesta al sol. A menudo, estas moscas llegan después que las de la familia Calliphoridae. Otra característica importante de estos insectos, es que la hembra es vivípara, deposita larvas y no huevos en la carroña, a diferencia de las moscas *Calliphoras*, que son generalmente ovíparas.

Las especies de esta familia son muy similares entre sí, y por tanto puede ser difícil identificarlas. Algunas especies de particular interés forense, y de las cuales

se han hecho más estudios son: *Sarcophaga haemorrhoidalis*, *Sarcophaga misera*, *Sarcophaga crassipalpis*, *Sarcophaga argyrostoma* y *Sarcophaga carnaria*.

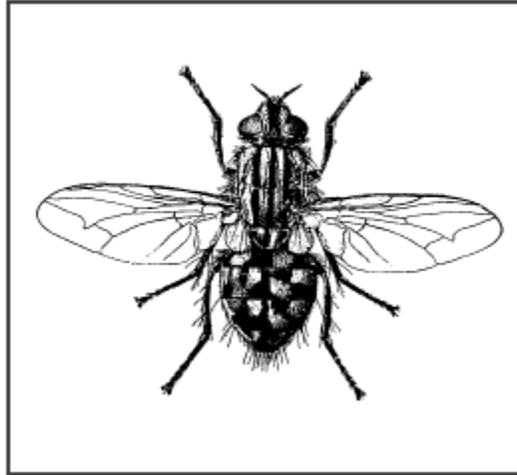


Figura 6 *Sarcophaga carnaria* adulta.

Tomado de Smith K. (1986).

ORDEN COLEOPTERA

Estos insectos, conocidos como escarabajos, poseen un par de alas modificadas, llamadas élitros, que protegen a las alas membranosas posteriores, que en la mayoría de los casos están habilitadas para volar, aunque en algunas especies se encuentran atrofiadas o incluso ausentes (Gillot, 2007). Los adultos están formados por tres partes: cabeza, tórax y abdomen. Las larvas poseen una cabeza con forma distintiva con piezas bucales cortantes. Este orden es el más diverso,

con más de 300,000 especies descritas. Una de las características estructurales con más contribución al éxito de este orden, ha sido el desarrollo de los élitros (las alas esclerotizadas), que protegen sus alas cuando no están en uso, permitiendo que estos insectos ocupen espacios muy cerrados. Además, otra característica importante, es el posicionamiento de los espiráculos respiratorios, bajo los élitros. Esto permite una menor pérdida de agua, y por tanto una mejor adaptabilidad a ambientes áridos. (Guillot, 2007).

La mayoría de los escarabajos hallados en el cadáver, serán probablemente depredadores de otros insectos, y solo algunos serán necrófagos.

Especímenes pertenecientes a las familias Staphylinidae, Scarabaeidae e Histeridae fueron los más abundantes en un estudio realizado en el sur de México. En dicho estudio se encontraron 130 especies pertenecientes a 21 familias (Caballero y León, 2014).

En un estudio realizado en Brasil, las familias más abundantes fueron: Dermestidae, Scarabaeidae, Cleridae y Trogidae (Mayer y Vasconcelos, 2013).

Familia Silphidae

Estos escarabajos tienen un cuerpo aplanado con bordes afilados, sus cabezas son pequeñas en comparación con el tamaño del tórax. Los especímenes de esta familia poseen antenas que se engrosan conforme los segmentos se acercan al

final de las mismas, y la distancia entre los puntos de inserción en la cabeza es amplia. Un ejemplo de importancia es el *Nicrophorus humator*.

Familia Staphylinidae

Se trata de escarabajos de gran actividad, los cuales son fáciles de reconocer, debido a que cuando se observan desde arriba, al menos la mitad de sus segmentos abdominales se quedan sin cubrir por sus pequeños élitros. Estas especies de escarabajos pueden volar con facilidad, ya que cuentan con unas fuertes alas membranosas debajo de sus pequeños élitros.

Algunos especímenes tienen la característica de elevar los últimos segmentos abdominales sobre su cuerpo, recordando a la forma de un escorpión. Estas especies son depredadoras de las larvas de las moscas. Algunos ejemplos de interés forense son *Philonthus longicornis* y *Creophilus maxillosus L.*

Familia Histeridae

Estos escarabajos son de tamaño pequeño, de color negro brillante, con un fuerte exoesqueleto y poseen patas con una parte aplanada. Los élitros dejan ver, si se observa por encima, los últimos dos segmentos abdominales.

Se trata de insectos depredadores, las larvas y los adultos pueden hallarse en el cadáver alimentándose de los insectos necrófagos.

Familia Trogidae

Estos insectos de tamaño mediano, son de color café opaco, su parte dorsal tiene un aspecto rugoso y sus élitros pueden tener vello. Sus patas no son muy anchas, y no están adaptadas para escarbar. Las larvas poseen garras características, de forma alargada y afilada. Estos escarabajos pueden hallarse en la etapa seca del cadáver.

Familia Dermestidae

Los escarabajos de este grupo pueden tener tamaños que van desde 1.5 mm a 1 cm, y son de forma ovalada y alargada. Sus antenas tienen de 5 a 11 segmentos, finalizando en dos o tres segmentos con forma de mazo. Poseen ojos simples (ocelos). Los ejemplares de esta familia tienen la capacidad de retraer sus miembros en la parte baja de su cuerpo, de manera que nada sobresalga.

Las larvas pueden variar de color café al negro, y están cubiertas de vellosidades de distintas longitudes en su superficie dorsal, a menudo tienen mechones de vello en los costados. Un par de ejemplos representativos de esta familia, son las especies ***Dermestes maculatus*** (conocidos como osos lanudos, debido a la cantidad de vellos que poseen), y ***Dermestes lardarius L.***

Familia Cleridae

Son escarabajos de colores brillantes, o al menos en alguna parte de su cuerpo. Son de forma alargada y cilíndrica, y parece tuvieran cuello, debido a que la primera parte de su tórax es más angosta que los élitros. Los adultos pueden ser de apariencia vellosa. Estas especies son depredadoras de las larvas de las moscas. Un ejemplo representativo es la especie ***Necrobia rufipes***.

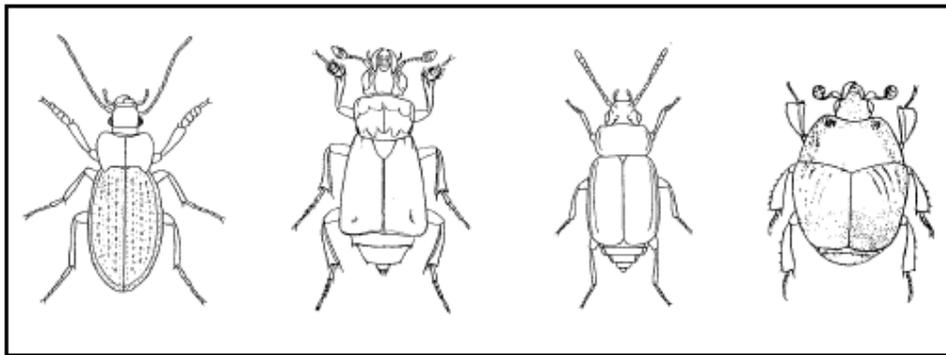


Figura 7 Ejemplos de coleópteros hallados en cadáveres.

De izquierda a derecha: *Carabus* (Carabidae), *Nicrophorus* (Silphidae), *Anthobium* (Staphylinidae), *Saprinus* (Histeridae). Tomado de Smith K. (1986).

Identificación taxonómica de las especies

Según identificación de los insectos puede hacerse de distintas maneras: (1) Enviando el espécimen a un experto, (2) Comparando el espécimen con otros pertenecientes a alguna colección, (3) Comparando al insecto con imágenes o descripciones, (4) Utilizando una clave dicotómica (Gillot C. 2007). A esto se le puede sumar la opción de comparar el código genético del espécimen, con un banco de datos (Rodríguez, 2014)

APLICACIONES DE LA ENTOMOTOXICOLOGÍA

En un principio, el estudio toxicológico en tejidos de insectos se dirigió a la detección de metales pesados en el ambiente, así como a la evaluación del efecto de pesticidas en la fauna entomológica. Y fue durante los años setenta, cuando la investigación entomotoxicológica tomó relevancia en las investigaciones forenses (Gosselin, 2009).

Dentro del área forense, podemos destacar dos aplicaciones: La determinación del efecto de cierto xenobiótico en el desarrollo de las especies de insectos usados para determinar el intervalo postmortem, y la detección indirecta de xenobióticos en un cadáver. Además, se ha estudiado la acumulación de plomo, bario y antimonio en larvas de dípteros, lo cual ofrece una herramienta más para determinar la utilización de armas de fuego, y puede ser de utilidad en casos en los que el cadáver se halle en un estado avanzado de descomposición (LaGoo y cols., 2010).

Por otra parte, la entomotoxicología puede ser de utilidad en otro tipo de investigaciones, por ejemplo, ayudando a dilucidar crímenes en contra de la fauna silvestre (Fico, 2013) o incluso podría ser de ayuda en investigaciones arqueológicas (Gosselin, 2009), ya que los restos de los insectos pueden llegar a conservarse cientos de años (Didier, 2008) y con ellos las sustancias bioacumuladas.

DETECCIÓN INDIRECTA DE XENOBIÓTICOS EN CADÁVERES

El fenobarbital, fue la primera droga identificada en larvas de mosca encontradas en un cadáver, en esa ocasión el cuerpo se encontraba en etapa de esqueletización (Beyer y cols., 1980). Desde ese momento hasta la fecha, se han podido detectar decenas de drogas y sustancias tóxicas en los tejidos de insectos asociados a los cadáveres, y en algunos casos se han desarrollado y validado métodos para alguna sustancia en específico. La lista de sustancias abarca opiáceos, antidepresivos, barbitúricos, benzodiazepinas y metales pesados, entre otras (Gosselin y cols., 2010). Y las técnicas más comúnmente utilizadas para las determinaciones son la cromatografía de gases y cromatografía de líquidos, acopladas a espectrometría de masas.

En un estudio realizado por Aguiar França y cols. (2015) en Brasil, el país latinoamericano con más publicaciones sobre el tema que nos ocupa, recientemente se evaluó la implementación de una metodología para la detección simultánea de xenobióticos en tejidos de insectos necrófagos, alimentados con carne de cerdo con una cantidad conocida de cada sustancia. En dicho estudio se analizaron seis drogas de prescripción (amitriptilina, carbamazepina, bromazepam, clonazepam, diazepam, flunitrazepam), además de cocaína y benzoilecgonina, y Aldicarb (un insecticida) junto con sus metabolitos, utilizando cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas. Una vez desarrollado el método, fue utilizado en larvas recolectadas de cadáveres en el Instituto Médico Legal de

Brasil, con lo que fue posible detectar cocaína y benzoilecgonina, carbamazepina, diazepam y amitriptilina en algunas de las muestras.

Otro estudio, realizado en Bélgica, tuvo por objetivo desarrollar y validar un método de detección y cuantificación de metadona y su metabolito principal, 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina, en las diferentes etapas de desarrollo de la *Lucilia sericata*. Se utilizó extracción líquido-líquido, y para la determinación se usó cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS-MS). El límite de cuantificación de la droga se fijó en 10 pg/mg en la larva. Posteriormente, el método se aplicó en especímenes en su tercera etapa larvaria, obtenidos de un medio artificial compuesto por corazón de res adicionado con 4 µg/g de metadona, así mismo, se analizaron larvas provenientes de un cadáver de un caso de sobredosis, con resultados positivo en la detección del xenobiótico (Gosselin y cols., 2010).

Karampela y cols., (2015) abordan el desarrollo un método de cromatografía líquida, para la determinación de Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) y 11-carboxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THCA), en un tipo de dípteros califóridos (*Lucilia sericata*), partiendo de la hipótesis de que el THC y el THCA, son bioacumulados en el cuerpo del insecto al alimentarse del cadáver. Además, los autores se encargaron de describir el efecto de distintas técnicas de extracción. En este estudio se utilizó un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas con ionización por electrospray, y la técnica de extracción fue líquido-líquido en condiciones ácidas.

Es importante destacar que este método fue aplicado en una investigación forense. En dicha ocasión, se halló el cuerpo de una mujer ahorcada, en las primeras etapas de descomposición. En el cuerpo se hallaron larvas de *Lucilia sericata* en segunda fase, las cuales fueron analizadas con cromatografía de líquidos, dando un resultado positivo para THC, en una concentración de 43 pg/mg. A la vez, se analizó una muestra de orina de la occisa, la cual dio positivo a canabinoides; además de una muestra de hígado, de la cual se obtuvieron resultados positivos para THC y THCA, con concentraciones de 2.1 y 3.4 ng/g respectivamente.

Las carcasas de las pupas (puparios), que son abandonadas por el insecto adulto, también pueden analizarse para detectar trazas de determinado xenobiótico. Se analizaron carcasas de pupas pertenecientes a ejemplares de *Lucilia sericata*, en busca de metadona. Para la determinación, se utilizó UPLC-MS/MS (ultra performace liquid chromatography-mass spectrometry). Se colocaron cinco grupos de larvas con alimento artificial, cada uno de los cuales contenía cuatro cantidades distintas de metadona, así como un blanco sin la droga. Los resultados fueron positivos para las dos concentraciones más altas (0.8 mg/g, y 4 mg/g), lo que demuestra la acumulación de metadona en la cutícula del insecto. Una sustancia sólo puede detectarse en un insecto si la absorción del xenobiótico es mayor a su eliminación. Estas determinaciones confirman que mientras cierta cantidad de metadona se elimina por los órganos larvarios (por los túbulos de Malpighian o por los nefrocitos), una parte se bioacumula en el pupario (Gosselin y cols., 2011). Según estos resultados, un resultado negativo a metadona, no necesariamente

implica la ausencia de esta en el cadáver. Además, es importante tomar en cuenta que la concentración hallada en los puparios fue 60 veces menor a la que existía en las larvas en tercera fase.

Un tipo de análisis entomotoxicológico alternativo es el inmunohistoquímico. Un ejemplo de ello es el trabajo publicado por Souza y cols. (2013) en Brasil, en el cual se propone una estandarización de procedimientos histológicos, para la detección de sustancias tóxicas por inmunohistoquímica en larvas de dípteros con interés forense (*C. albiceps*, *C. megacephala* y *S. ruficornis*). En este estudio, se prueban distintos tipos de sustancias fijadoras, así como intervalos de tiempo de fijación.

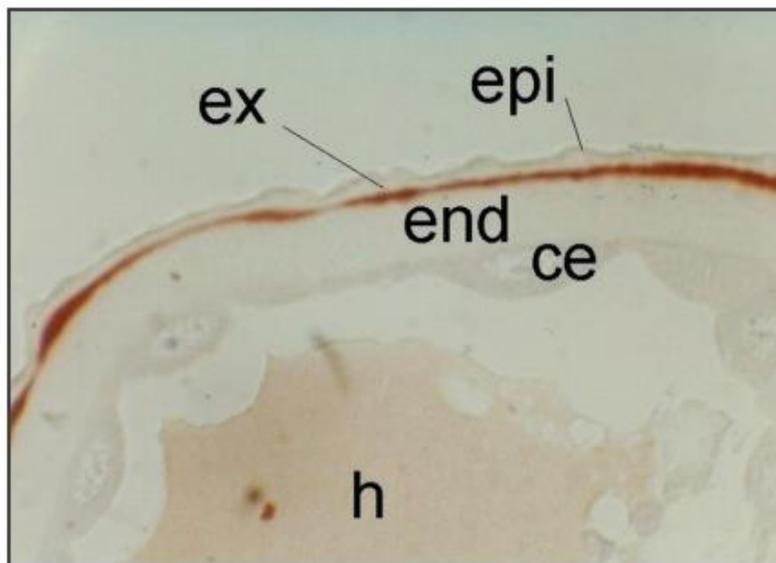


Figura 8 Detección de morfina mediante una técnica inmunohistoquímica, en una sección de tejido de una larva de *C. vicina* en tercera fase.

(La reactividad de la morfina se observa en marrón, entre la endo y la exocutícula). Ex: exocutícula, epi: epicutícula, end: endocutícula, h: hemolinfa. Tomado de Souza C. (2013).

Otra alternativa a los métodos de detección tradicionalmente utilizados en la investigación entomotoxicológica, es el uso de la espectroscopía de infrarojo cercano (NIRS: Near-infrared spectroscopy). Esta opción presenta las ventajas de no requerir extracción, necesitar un manejo mínimo de la muestra y la no destrucción de la misma. Mediante este método, es posible detectar la huella metabólica (lípidos, proteínas, procesos celulares) de especímenes vivos, de una manera rápida. En un estudio realizado en larvas, pupas y adultos de *Chrysomia megacephala*, se evaluó esta alternativa para la detección de flunitrazepam, con resultados positivos, demostrando su viabilidad y su practicidad (Oliveira y cols., 2014).

En la mayoría de los casos, fue posible detectar el xenobiótico tanto en los tejidos de los insectos, como en los del cadáver, sin embargo, no siempre se pudo detectar la sustancia estudiada en los insectos, aunque esta si se hallaba en presente en cadáver.

DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LOS XENOBIÓTICOS EN EL DESARROLLO DE ESPECIMENES ENTOMOLÓGICOS CON INTERÉS FORENSE

La aplicación más frecuente de la entomotoxicología es la cuantificación de los efectos de alguna sustancia sobre los insectos usados para determinar el intervalo

postmortem. Los efectos más importantes de los xenobióticos en estos especímenes son el aceleramiento o la inhibición del desarrollo.

Existen bases de datos con información concerniente al desarrollo de diversas especies de insectos necrófagos, en donde se toma en cuenta el efecto de la temperatura en el tiempo que abarca su ciclo de vida. Después de la identificación de las especies halladas en un cadáver, se utiliza la información de las bases de datos para poder identificar la etapa de desarrollo en que se encuentran los especímenes, con esto puede obtenerse un estimado muy preciso del momento del deceso, con un margen de error de pocas horas. Sin embargo, en los casos en que las larvas son expuestas a xenobióticos, el ciclo puede verse acelerado o inhibido, y el ignorar este hecho puede llevar a estimaciones incorrectas, con variaciones que pueden llegar a ser incluso de días (C. Mullany y cols., 2014).

Hasta la fecha, decenas de sustancias se han evaluado en especímenes entomológicos. Los efectos son de magnitud diversa en el aceleramiento o inhibición del ciclo de vida, así como en la supervivencia de los especímenes a través de sus distintas etapas. Estos estudios son de gran importancia, ya que en la actualidad se ha incrementado el uso de drogas ilegales con fines recreativos, y es necesario contar con métodos validados para su detección, además de bases de datos para cuantificar el efecto sobre el artrópodo.

La metanfetamina es una de las drogas frecuentemente utilizadas en la actualidad. Se ha estudiado la presencia de metanfetamina en especímenes de *Calliphora vomitoria*, dando como resultado un incremento en el ciclo de vida (una diferencia

de 12 h, en el lapso desde la ovoposición hasta la eclosión de los adultos), también se observó un incremento considerable en el tamaño de las larvas, y al mismo tiempo hubo un incremento en la mortalidad de los insectos en su etapa de pupa (sobrevivieron menos del 50%). Este estudio se realizó alimentando a las larvas con una comida artificial que contenía cantidades conocidas de metanfetamina. La determinación se realizó utilizando cromatografía de gases y espectrometría de masas (Magni y cols., 2014).

La cocaína, también ha probado ser un estimulante en el desarrollo de las larvas de dípteros. Un estudio realizado en especímenes de *Chrysomya albiceps* y *Chrysomya putoria*, alimentados con conejos a los cuales se les inyectó cocaína, arrojó como resultado un aceleramiento de más de 40 horas en el lapso de la etapa larvaria, a la vez que disminuyó la mortalidad de los especímenes en la etapa de pupa, en comparación con el grupo control (Lopes de Carvalho y cols., 2012).

Los casos anteriores son ejemplos de xenobióticos que promueven el desarrollo de los especímenes necrófagos. Un efecto contrario es el producido por la ketamina, la cual se estudió en especímenes de *Chrysomya megacephala*. En este estudio, se comparó el desarrollo de la *C. megacephala*, bajo los efectos de tres concentraciones diferentes de ketamina en su alimento (Zhou Lu y cols., 2014).

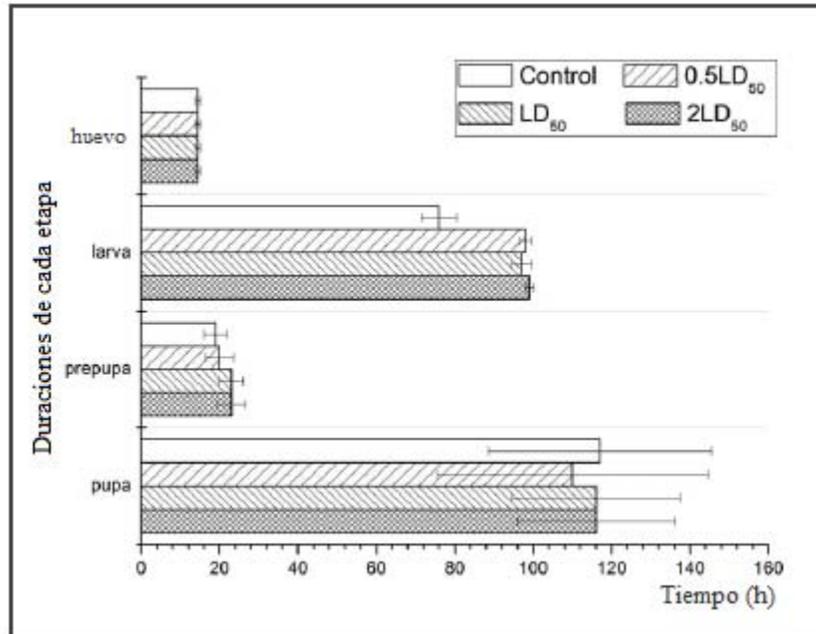


Figura 9 Duración de las etapas de *C. megacephala* a temperatura constante (28°C), con tres dosificaciones diferentes de ketamina en su alimento.

Se observa un incremento significativo en la etapa larvaria. Tomado de Zhou Lu y cols. (2014).

En los casos de infestación de larvas de dípteros en un ser viviente, es decir, en casos de miasis, la determinación del desarrollo de estas larvas puede ser de utilidad para datar el periodo de negligencia criminal, en el cual bebés, personas incapacitadas u hospitalizadas, así como animales han sido objeto de descuido. En estos casos la entomotoxicología puede auxiliar al investigador forense, ya que en muchos de estos casos el afectado puede encontrarse medicado.

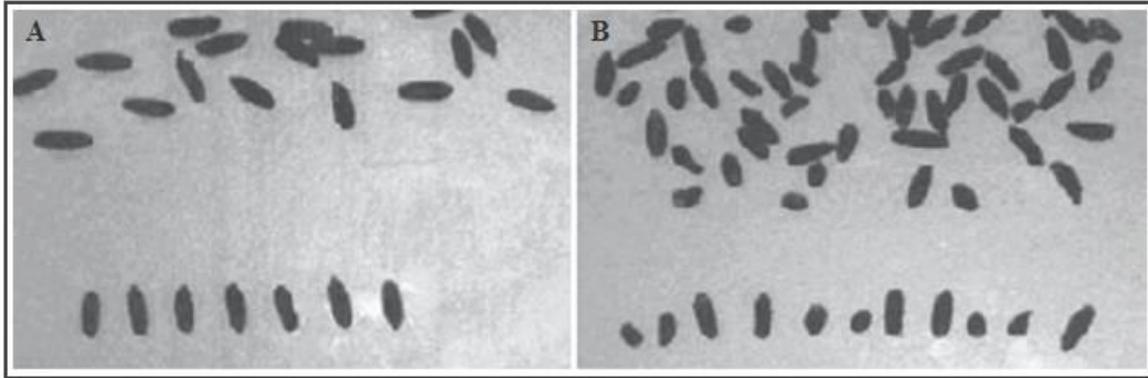


Figura 10 Especímenes de *Chrysomya putoria*. A) Control, B) Especímenes expuestos a diazepam.

Tomado de Lopes de Carvalho (2009).

OTRAS APLICACIONES

DETECCIÓN DE RESIDUOS DE ARMAS DE FUEGO EN UN CADÁVER

Al dispararse un arma de fuego, se dispersan partículas de plomo, bario y antimonio, por lo que presencia de estos residuos en un cadáver, es una evidencia clara de una herida causada por arma de este tipo. Las evidencias físicas de esta clase de lesiones son, en muchos casos, claramente identificables, sin embargo, cuando un cuerpo se halla en un estado avanzado de descomposición, las heridas pueden verse severamente modificadas por la putrefacción y la actividad de las larvas.

Se ha comprobado experimentalmente, que es posible hallar residuos de plomo, bario y antimonio, en larvas que se alimentan de los tejidos circundantes a la zona

de impacto de un proyectil de un arma de fuego. De hecho, estos elementos pueden hallarse en los tejidos del insecto hasta su etapa de pupa, y existen evidencias de que el bario es bioacumulado en sus tejidos, ya que la concentración se incrementa conforme la larva se sigue alimentando (LaGoo y cols., 2010).

ECOLÓGÍA

Mediante el análisis toxicológico de los insectos, es posible determinar la presencia de metales pesados en el ambiente, así como pesticidas y otras sustancias tóxicas, como sugiere un estudio realizado en la desaparecida Yugoslavia, en el cual se detectó mercurio en especímenes de *Lucilia caesar* y *Lucilia illustris* (Nuorteva P., Nuorteva S. y Suckcharoen, 1980)

La entomotoxicología, también puede aplicarse en cadáveres de animales, con el fin de determinar las causas de su muerte cuando se sospecha de un envenenamiento. De esta manera puede contribuir al cuidado y conservación de la fauna silvestre (Anderson, 1999; Fico y cols., 2013).

ARQUEOLOGÍA

La *arqueoentomología*, es el estudio de restos de insectos hallados en sitios arqueológicos. Bajo ciertas condiciones ambientales, la cutícula de los insectos

puede conservarse por cientos, e incluso miles de años. Los especímenes que suelen conservarse mejor, son los del orden *Coleoptera*, debido a la dureza y resistencia de su exoesqueleto (Didier, 2008).

Speight (1984) demostró que los escleritos, placas de quitina y proteínas que constituyen el exoesqueleto de los artrópodos, son químicamente estables y particularmente resistentes a la descomposición. Se muestra la estructura de la quitina, principal componente del exoesqueleto de los insectos, en la siguiente figura.

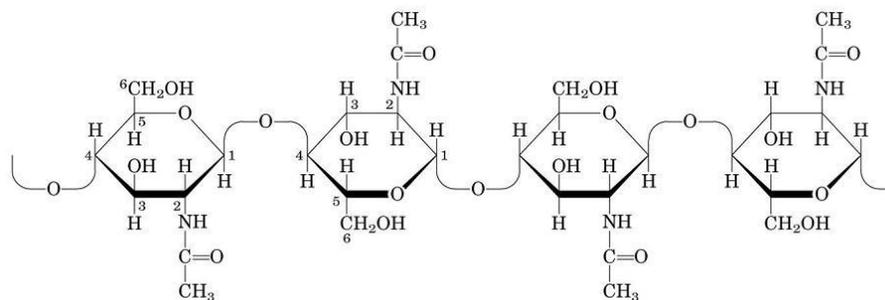


Figura 11 Estructura química de la quitina.

Sin embargo también es posible hallar restos de otros grupos de insectos, tales como los dípteros, que pueden encontrarse en sus distintas etapas de desarrollo. Puede mencionarse, como ejemplo, el estudio realizado a una momia egipcia (Namenkhet Amun) de aproximadamente 2500 años de antigüedad, dentro de la cual se hallaron restos de especímenes necrófagos, tanto dípteros -*Chrysomya albiceps* (Calliphoridae)- como coleópteros -*Necrobia rufipes* (Cleridae), *Nathrenus verbasci* (Dermestidae)-, de los cuales se encontraron especímenes en etapa larvaria y adulta, además de pupas (Huchet, 2010).

Se ha comprobado que ciertas sustancias, tales como metales pesados y cocaína pueden acumularse en la matriz proteínica de las carcasas de la pupa (Introna y cols., 2004). De manera que existe la posibilidad de detectar xenobióticos en especímenes hallados en sitios arqueológicos, los cuales pueden ligarse a los cadáveres, y aportar información de interés histórico (Gosselin, 2009).

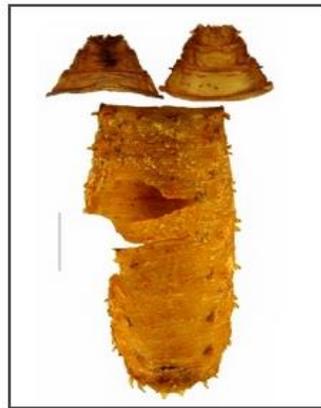


Figura 12 Pupa de *Chrysomya albiceps*, hallada dentro del abdomen de la momia de Namenkhet Amun.

Tomado de (Huchet, 2010).

MUESTREO Y ANÁLISIS

Un punto muy importante, señalado por los especialistas en el tema, es la falta de estandarización en los protocolos de la entomotoxicología. Existen variaciones importantes en las metodologías, que incluyen consideraciones diferentes al recolectar los especímenes o al preparar la muestra para el análisis.

El proceso de la investigación entomotoxicológica, inicia con el muestreo de los insectos. Este primer paso, que en principio parecería obvio, debe realizarse tomando en cuenta algunas consideraciones de importancia. Como señalan algunos investigadores (Amendt y cols. 2006, Carvahlo y cols. 2010, Gosselin y cols. 2011), un muestreo descuidado puede devenir en una gran variabilidad en los resultados.

Posteriormente, para la elección del procedimiento analítico adecuado, deben considerarse las características de la sustancia a analizar, ya sea esta orgánica (drogas o pesticidas) o inorgánica (metales) (Gagliano y Aventaggio, 2001).

En cuanto al origen de las muestras entomológicas, podemos dividir los estudios existentes en dos grupos:

1) los que se estudian muestras provenientes de cadáveres humanos, es decir, casos en los que se realizó una investigación forense;

2) los que emplean muestras provenientes de estudios realizados en laboratorio.

A su vez, el segundo grupo puede sub-dividirse en dos:

2.1) los estudios en los que un xenobiótico es administrado a un animal vivo, que posteriormente es sacrificado, y de cuyo cadáver se alimenta la entomofauna;

2.2) estudios en los que se prepara el medio en el laboratorio, utilizando tejidos animales a los cuales se les adiciona el xenobiótico, homogenizándolo, para la alimentación de los insectos.

Todos los métodos implementados deben ser validados. Según la Farmacopea de Estados Unidos, “la validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas”. Con la validación se demuestra que el procedimiento es apto para cumplir con su propósito y con esto se comprueba su confiabilidad.

Las características analíticas que deben ser evaluadas son la linealidad, la especificidad, el límite de detección, el límite de cuantificación, la precisión y la exactitud.

MUESTREO Y ALMACENAMIENTO

Gosselin (2011a) señala que “es importante recolectar insectos de diferentes sitios, y no únicamente de las zonas en donde hay una intensa actividad de las larvas, así como recolectar un número suficiente de especímenes entomológicos de todos los tamaños y formas”.

Algunos autores (Tracqui y cols. 2004, Bourel y cols. 2001, Sadler y cols. 1995) han evidenciado la importancia de recolectar larvas de diferentes sitios del cadáver, esto debido a la gran variabilidad en la concentración de los xenobióticos en las distintas partes del cuerpo. Esta variación se explica por la distribución, antemortem y postmortem, de las sustancias en función de sus propiedades fisicoquímicas.

Además, es importante recordar que en cadáveres en avanzado estado de descomposición, pueden sucederse varias poblaciones distintas de una misma especie, por lo cual existirían diferencias en las concentraciones del xenobiotico en los insectos, en razón de la estabilidad y de la redistribución postmortem en el cadáver.

Es de resaltar, la importancia de llevar a cabo la identificación de las especies de insectos necrófagos, así como su estado de desarrollo antes de la utilización de técnicas analíticas.

Algunos autores, recolectan a los insectos de forma aleatoria, y agrupan a las larvas o a las pupas y puparios, de diferentes zonas del cadáver, en una sola muestra (Kharbouche y cols., 2008, Definis-Gojanovic y cols., 2007, Introna y cols., 1990, Kintz y cols., 1990) Lo que en opinión de M. Gosselin, “no toma en cuenta la realidad biológica de los insectos”. Esta forma de muestrear provoca una importante variabilidad en los resultados analíticos.

La concentración de xenobióticos en una matriz biológica postmortem no necesariamente refleja la concentración en el momento de la muerte, y no es

homogénea en todo el cuerpo. La concentración de un xenobiótico puede variar en función del tejido, del sitio y el intervalo postmortem. La variación de concentración se conoce como “redistribución postmortem” (Drummer O. H., 2008) y es provocada por fenómenos como la acidificación de los tejidos, coagulación, cambios en la circulación sanguínea en donde ahora factores como la posición del cuerpo o el rigor mortis cobran importancia para la acumulación de sangre en algunas zonas, la putrefacción y la descomposición de los componentes celulares; todo esto se refleja en cambios fisicoquímicos que se manifiestan en la difusión del xenobiótico y su acumulación en algunas zonas del cadáver.

PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA EL TRANSPORTE, CONSERVACIÓN Y ANÁLISIS

Previo al análisis químico, las muestras deben tratarse siguiendo un protocolo específico. La ausencia de un protocolo al provocar la muerte del insecto, descontaminar y almacenar a los insectos, puede tener influencia en los resultados y en la interpretación de los mismos, al afectar a la estabilidad de la sustancia por determinar o contaminar las muestras.

Previo a la extracción y análisis se recomienda provocar la muerte de los insectos utilizando bajas temperaturas, algunos autores indican que la temperatura debe ser cercana a los -20°C (Campobasso y cols., 2004; Tracqui y cols., 2004; Gosselin y cols., 2011), para después almacenarlos en alcohol etílico (70%)

(Carvalho 2010). Aunque también se ha reportado el sacrificio usando agua a 80°C (Karampela y cols. 2015).

Es recomendado, almacenar las larvas a -20°C sin ningún medio líquido, con el fin de asegurar la estabilidad de los xenobióticos y disminuir el riesgo de extraerlos en el alcohol (Gosselin, 2014). Las pupas vacías deben almacenarse en condiciones secas y en refrigeración (2 - 6°C).

ANÁLISIS TOXICOLÓGICO

A la fecha en la práctica de la entomotoxicología se han aplicado diversas técnicas analíticas, algunas de ellas se muestran en la Tabla 2. Son de destacar, por su frecuencia de empleo y efectividad, la cromatografía de gases y la cromatografía líquida, acopladas a algún sistema de detección, aunque también se ha aplicado con éxito el inmunoensayo y la espectroscopía de infrarrojo cercano.

En la práctica forense, los análisis toxicológicos suelen comenzar con una prueba presuntiva o de orientación, sensible a cierta familia de drogas o de medicamentos, que indique la presencia de algún xenobiótico. Estas son las llamadas pruebas *screening*. Un resultado positivo en estas pruebas, debe confirmarse con un análisis específico, el cual comúnmente se realiza con cromatografía.

Sustancia	Técnica de extracción	Técnica analítica	Comentarios	Referencia
Aldicarb, cocaína y drogas de prescripción	Líquido - Líquido	Cromatografía líquida (HPLC) / Espectrometría de masas en tándem	Los límites de detección del método se reportan desde 1 ng/g (para carbamacepina) hasta 40 ng/g (para aldicarb) en las larvas. Otros valores: 2 ng/g para cocaína, 3 ng/g para clonacepam. Recobro cercano al 100%.	Aguiar França y cols. (2015)
Metanfetamina	Líquido- Líquido	Cromatografía gaseosa (GC) / Espectrometría de masas (MS)	El límite de detección se determinó en 0.10 ng/mg. El límite de cuantificación fue de 0.33 ng/mg. El porcentaje de recobro de la extracción fue del 88.91%. Y el coeficiente de varianza fue de 5.82%.	Magni P. y cols. (2014)

Sustancia	Técnica de extracción	Técnica analítica	Comentarios	Referencia
Flunitrazepam	Sin extracción	Espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS)	El límite de detección de la droga en las larvas se reporta en 32 pg/g.	Oliveira y cols. (2014)
Cocaína (Benzoilecgonina)	Sin extracción	Análisis inmunohistoquímico	Se obtuvieron resultados cualitativos, comparando el tejido de una larva desarrollada en un medio sin la droga y otra expuesta a la droga.	Souza y cols. (2013)
Metadona	Líquido - Líquido	Cromatografía líquida (UPLC) / Espectrometría de masas en tándem (MS-MS)	El límite de detección se fijó en 2 pg/mg. Mientras que el límite de cuantificación fue de 10 pg/mg. El recobro fue >86%.	Gosselín y cols. (2011)
Opiáceos	Fase sólida	Cromatografía gaseosa (GC) / Espectrometría de masas (MS)	Concentración en equivalentes de morfina (promedio de 14 casos). Hígado (cadáver): 32.3 $\mu\text{g}/\text{ml}_{\text{muestrahomogenizada}}$, Larva: 0.67 $\mu\text{g}/\text{ml}_{\text{mh}}$, Prepupa: 0.27 $\mu\text{g}/\text{ml}_{\text{mh}}$. No reporta límites de detección o cuantificación.	Campobasso y cols. (2004)

Tabla 2 Ejemplos de sustancias reportadas en estudios entomotoxicológicos, y las técnicas utilizadas en su análisis.

EXTRACCIÓN

Las muestras deben lavarse previo al paso de la extracción, debido a que la superficie del insecto puede encontrarse contaminada, lo cual afectaría sensiblemente los resultados, pudiéndose presentar un falso positivo o una concentración mayor a la real. Se ha sugerido el lavado con agua desionizada (Bushby y cols., 2012), y agua destilada cercana al punto de ebullición (Mullany y cols., 2014). También se ha reportado el uso de diclorometano (Magni y cols. 2014).

Se debe considerar la optimización de la extracción, aumentando el porcentaje de recuperación del analito y reduciendo la interferencia provocada por la matriz. Para ello se prueban distintos métodos de extracción aplicables al caso en particular. Pudiéndose utilizar la extracción líquido – líquido, variando los solventes, sus combinaciones y sus cantidades; o la extracción en fase sólida, variando los cartuchos utilizados; entre otras técnicas.

Un ejemplo es el trabajo realizado por Karampela y cols. (2015), en el cual se variaron los solventes y sus cantidades para la extracción óptima de THC y THCA, de una muestra homogenizada de larvas de *L. sericata*, a la cual se le había añadido las sustancias en cantidades definidas. Estas combinaciones se hicieron con base en la polaridad de las sustancias (en este caso las dos son muy poco polares) y en coeficiente de reparto que tienen con los solventes, así como las mezclas de ellos. Los resultados de estas pruebas de extracción se muestran en la figura 13.

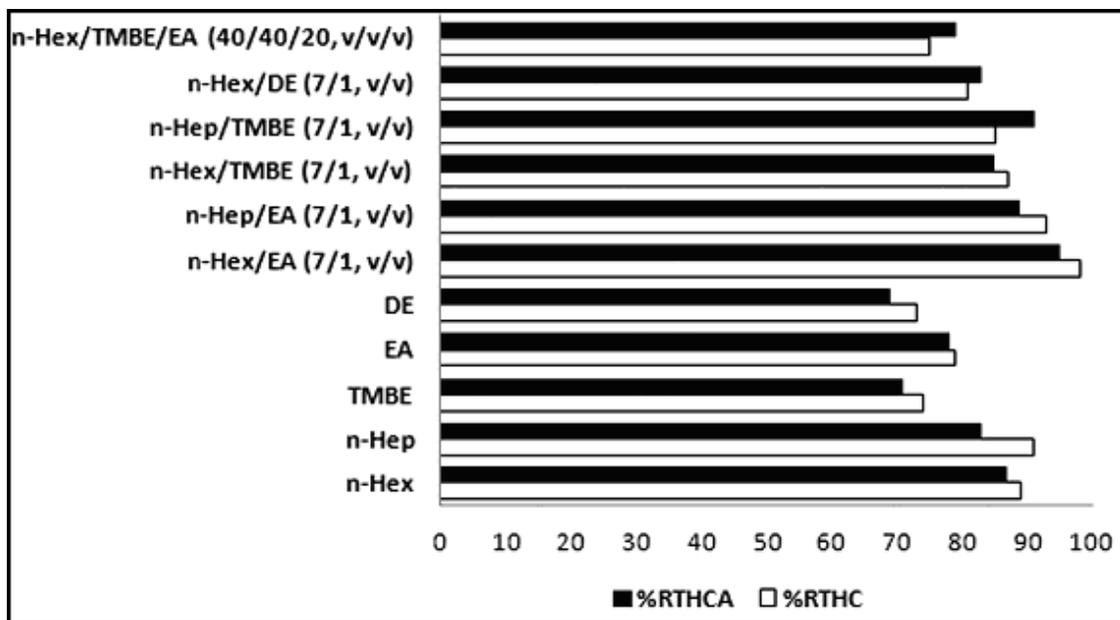


Figura 13 Recuperación de THC y THCA en extracción líquido – líquido, variando los solventes de la fase orgánica. (n-Hex: n-Hexano; n-Hep: n-Heptano; TMBE: Tetrametilbutil éter; EA: Acetato de Etilo; DE: Dietiléter).

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA Y GASEOSA

Dentro de las llamadas pruebas confirmatorias, se encuentran las técnicas cromatográficas. La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés), define a la cromatografía como “un método físico de separación, en el cual los componentes que serán separados están distribuidos entre dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras que la otra es móvil”. La fase móvil puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico, siendo el estado de agregación de esta fase el criterio principal para nombrar a cada subtipo de método cromatográfico.

Previo al análisis cromatográfico, debe realizarse una extracción, con el fin de aislar al xenobiótico de la matriz, y concentrarlo.

Las técnicas de cromatografía líquida utilizadas en los análisis toxicológicos son la HPLC (High Performance Liquid Chromatography) y la UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography). Básicamente, el proceso se ilustra en la figura 14 y, se resume de la siguiente manera:

- a) Se utiliza un solvente, o una mezcla fija o variable de solventes, como fase móvil, es decir, como líquido de arrastre para llevar al analito, la sustancia de interés analítico, y a la mezcla que lo contiene a través del sistema. Para impulsar al líquido se utiliza una bomba, la cual puede ser programada en un determinado caudal, dependiendo del método y de la capacidad del sistema.
- b) Se cuenta con una válvula de inyección, la cual permite introducir la muestra a analizar usando una jeringa especial para este fin.
- c) Una vez introducida la muestra, la fase móvil la arrastra a través de la columna, la cual separa los componentes de la muestra dependiendo de su interacción con la fase fija. La fase fija, es el material que contiene la columna en su interior, y esta variará, al igual que el tamaño de la columna, dependiendo la sustancias a analizar, y las necesidades de análisis. Las condiciones de temperatura en la columna también pueden ser controladas dependiendo de los efectos de la misma, deseados para el método. Para ello se manipula la temperatura del horno.

d) Los componentes de la muestra, ya separados, llegan a diferentes tiempos hasta el detector, el cual produce una señal generada por estas, y así es procesada hasta llegar a la interfaz del software, que el analista puede utilizar. Existen varios tipos de detectores utilizados en la cromatografía, entre ellos se encuentran:

- i. **Espectrometría de masas:** La muestra es ionizada, pudiéndose realizar este paso de diferentes maneras (electrospray, bombardeo con átomos rápidos, etc.) y posteriormente analizada por la relación masa/carga (m/z) de los iones.
- ii. **Resonancia magnética nuclear:** La espectroscopía de RMN ofrece información importante sobre la estructura y estereoquímica de las sustancias. No es destructiva, por lo que se puede recuperar la muestra. A diferencia de la espectrometría de masas (con la ionización), este detector no necesita un paso previo.
- iii. **Espectroscopía de infrarrojo:** Ofrece información sobre los grupos funcionales y requiere poco mantenimiento, sin embargo los solventes comúnmente utilizados en cromatografía de líquidos pueden intervenir causando ruido en la información espectral, disminuyendo la sensibilidad.
- iv. **Ultravioleta – Vis:** Mide la absorbancia de las sustancias para cuantificarlas, utilizando la radiación electromagnética en el rango de la luz visible y UV.

e) La información provista llega al software en forma de cromatogramas, los cuales contienen información del analito, tales como tiempos de retención y absorbancia. Estos ayudan a conocer la identidad de la sustancia y sus concentraciones.

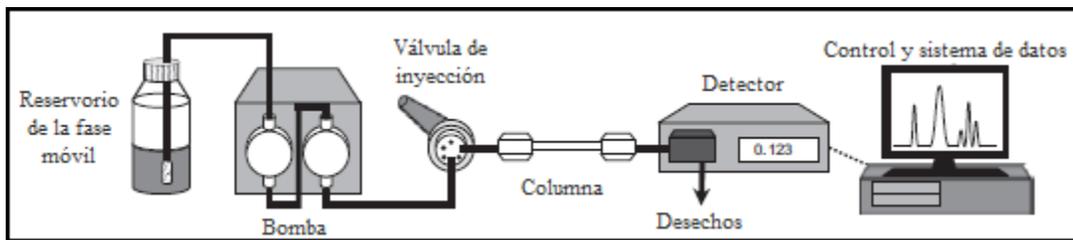


Figura 14 Sistema Básico de HPLC.

Imagen tomada de Shackman J. (2013) p. 285.

La cromatografía gases es, en muchos aspectos, similar a la de líquidos. Ambas usan una fase móvil, solo que en el caso de la gaseosa, dicha fase es un gas o una mezcla de gases: comúnmente helio, argón, hidrógeno o nitrógeno, todos ellos de una pureza muy elevada. Ambas cuentan con puertos de inyección, difiriendo la gaseosa de la líquida, en que el puerto deberá encontrarse a una temperatura que vaporice la muestra para su ingreso a la columna, por lo que el inyector deberá encontrarse a una temperatura mayor al punto de ebullición de la muestra. La columna puede estar empacada con moléculas de líquido fijadas a un sólido inerte, siendo esto lo más común, o con un sólido. Finalmente, la muestra llega separada en sus componentes hasta el detector, algunos ejemplos son los siguientes:

- i. **Ionización de llama:** Es el más utilizado desde su introducción en 1958 (Andersson Jan, 2014. p.205). Pertenece al tipo de detectores que convierten a las especies químicas en iones previo a su detección. La parte central de este detector es una flama H₂/aire.
- ii. **Conductividad térmica:** Se basa en la diferencia de pérdida de calor de un cable calentado eléctricamente, cuando por él pasa el gas de acarreo solo y cuando pasa con el analito.
- iii. **Captura de electrones:** Es un detector de ionización, usado principalmente para analizar compuestos halogenados. Tiene una sensibilidad alta.

La señal del detector es interpretada por un software, que plasma mediante cromatogramas la información requerida por el analista.

ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

La inmunohistoquímica fusiona en sí conocimientos de anatomía, inmunología y bioquímica, para cumplir su cometido: usar anticuerpos marcados apropiadamente para detectar ciertos antígenos en muestras de tejidos, y mediante el uso de un microscopio apreciar visualmente las áreas donde se encuentran. Permitiendo visualizar la distribución y la localización de diversas sustancias dentro de las células. En otras palabras, este tipo de análisis permite detectar, *in situ*, componentes celulares y extracelulares por medio de anticuerpos específicos

Esta técnica, es una alternativa prometedora para la detección de xenobióticos en insectos, ya que posee la ventaja de ofrecer información acerca de la localización de los xenobióticos en sitios específicos del animal, lo cual sería de gran utilidad para comprender la farmacodinámica y la farmacocinética en dichos organismos (Souza y cols., 2013).

Actualmente, la inmunohistoquímica se usa diagnóstico clínico, investigación y desarrollo de fármacos. Por ejemplo, utilizando marcadores específicos para tumores, la inmunohistoquímica se puede usar para determinar si el cáncer es benigno o maligno, determinar la etapa de desarrollo de la enfermedad, e identificar el tipo de célula de origen de la metástasis para hallar el sitio del tumor primario.

Los pasos del análisis inmunohistoquímico, descritos por Taylor C.R. (2013, p. 12), se pueden resumir en la tabla 3 de la siguiente forma:

Etapa	Paso
<i>Preanalítica</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Obtención del tejido • Procesado del tejido (fijado con formaldehído y embebido en parafina) • Seccionamiento (obtención de cortes ultrafinos, 4 µm, a partir del tejido embebido en parafina)
<i>Analítica</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tinción (es la parte analítica del proceso. Abarca la recuperación del antígeno, aplicación del anticuerpo primario y sistema de visualización, finalizando con la contratinción). a) La

	<p>recuperación del antígeno se lleva a cabo para recobrar a aquellos que hayan sido alterados por la fijación. b) Se bloquean las enzimas endógenas. c) Se aplica un anticuerpo primario para enlazarse con el antígeno objetivo. d) Un anticuerpo secundario lleva una enzima (marca) que se enlaza al anticuerpo primario. e) Se aplica un cromógeno para visualizar las marcas. f) Se aplica la contratinción para visualizar la estructura celular.</p>
<i>Postanalítica</i>	<p>Se realiza la interpretación de los resultados usando controles positivos y negativos de tejido, utilizando un microscopio.</p>

Tabla 3 *Etapas del análisis inmunohistoquímico*

ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJO

Se trata de una técnica basada en la detección de longitudes de onda del infrarrojo, emitidas por ciertos arreglos moleculares al ser afectados por un haz de luz. Un espectro molecular es el resultado de los movimientos periódicos de los átomos que forman parte de determinadas moléculas. Las vibraciones y flexiones de las moléculas presentan actividad espectroscópica que puede ser medida usando diferentes técnicas espectroscópicas, tales como el infrarrojo cercano, medio, lejano y la espectroscopía Raman.

La energía infrarroja es la energía electromagnética de las vibraciones moleculares (Workman J. y Weyer L., 2008). La banda de energía infrarroja se define de la siguiente forma:

- Infrarrojo cercano: $12,821 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ (780 – 2500 nm).
- Infrarrojo medio: $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ (2500 – 25000 nm).
- Infrarrojo lejano: $400 - 10 \text{ cm}^{-1}$ (25000 – 1000000 nm).

Existe una variedad de movimientos en las moléculas que absorben energía infrarroja a una única longitud de onda o frecuencia, dependiendo del tipo de enlace. Entre estos se encuentran los movimientos de estiramiento o flexión. Como se muestra en la figura 15.

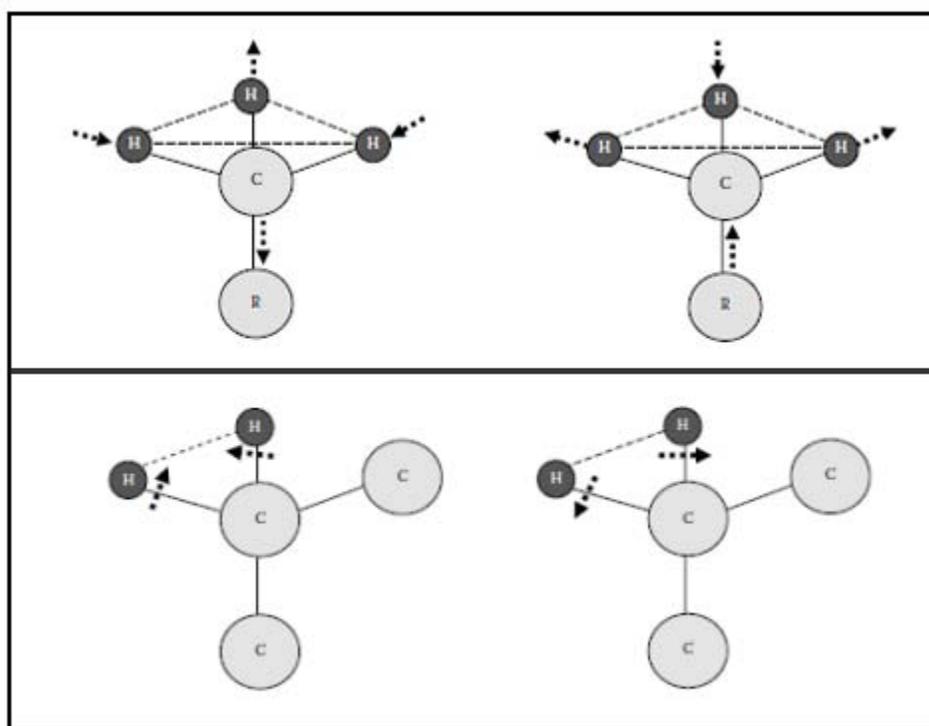


Figura 15 Ejemplos de movimientos moleculares detectados por los instrumentos de análisis de espectroscopía infrarroja. Arriba se muestra un movimiento de elongación asimétrica de un metilo. Abajo se observa la representación de una flexión en los enlaces C – H.

Imagen tomada de Workman J. y Weyer L. (2008) p. 6.

La amplitud de la absorción a alguna longitud de onda o número de onda en particular, está determinada por su absorptividad y el número de moléculas encontradas en la trayectoria del haz de luz del instrumento de medición. La figura 16 muestra una comparación de los espectros de infrarrojo cercano de siete sustancias con diferentes grupos funcionales.

Esta técnica no es destructiva, no requiere realizar extracción y posee la ventaja de requerir una mínima preparación de la muestra, consumiendo una menor cantidad de tiempo en el análisis. La absorción infrarroja es afectada por la composición bioquímica interna y externa del organismo. Esta técnica también ya ha sido utilizada para la identificación de especies y de etapas de desarrollo de insectos necrófagos, basándose en las diferencias de la composición de los tejidos de los mismos (Rodríguez-Fernandez y cols., 2011) (Mayagaya y cols., 2009).

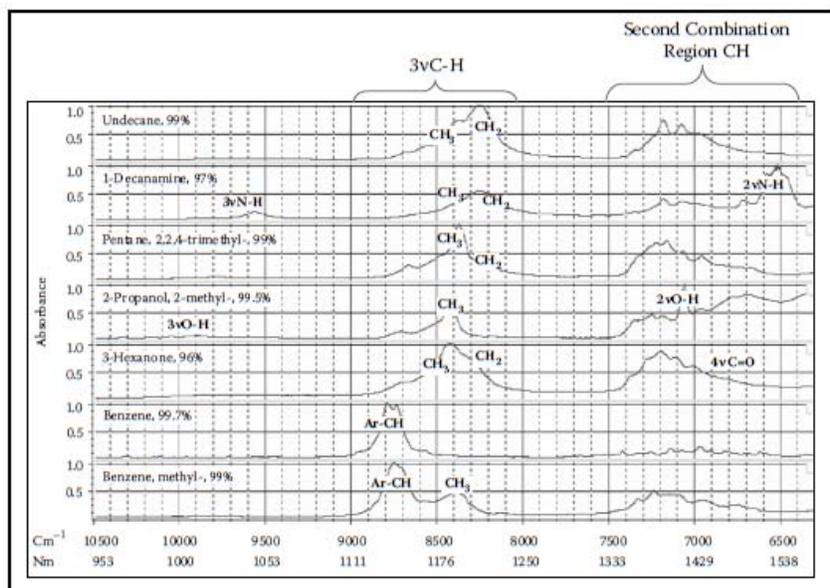


Figura 16 Comparación de los espectros de infrarrojo cercano de siete sustancias con diferentes grupos funcionales.

Tomado de Workman J. y Weyer L., 2008. p. 157.



Figura 17 Etapas de muestreo y análisis toxicológico en insectos.

1) Recolección de especímenes de diferentes partes del cadáver. Las muestras de cada zona se almacenan por separado. 2) Descontaminación del insecto. Se utiliza agua, metanol o solución salina. 3) Extracción. 4) Análisis de la muestra.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Interpretar un análisis toxicológico puede resultar una tarea simple o relativamente compleja, dependiendo de varios factores como el tipo de matriz con la cual se realizó el análisis, la cual posee una gran importancia en este sentido. En el caso de un análisis con orina, la presencia de drogas o medicamentos indica una exposición a las sustancias, pero obtener una evaluación concreta de la toxicidad es casi imposible. Por otra parte, una muestra de sangre ofrece una buena correlación entre la concentración del xenobiótico, y los efectos tóxicos de este. En otras palabras, se puede establecer una relación entre la dosis y el efecto (Di Fazio y Gosselin, 2011). Como se ha mencionado a lo largo de este trabajo, el principal problema de la utilización de insectos como matrices toxicológicas en análisis postmortem, es la actual imposibilidad de establecer correlaciones fiables para determinar el efecto tóxico de alguna sustancia exógena. No obstante sí existen estudios que sugieren que es posible establecerla (Campobasso y cols., 2004), aunque sea solo en condiciones controladas.

Pese a los múltiples inconvenientes en el aspecto de la interpretación, los resultados de un análisis entomotoxicológico pueden ser de gran interés y utilidad, como ya se ha demostrado en algunas investigaciones forenses.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS POSITIVOS USANDO INSECTOS COMO MATRIZ TOXICOLÓGICA

Según lo expuesto en capítulos anteriores, un resultado toxicológico negativo usando este tipo de matrices, no significa que el individuo fallecido no estuvo expuesto a determinadas sustancias, ya que la naturaleza biológica de los insectos conlleva una gran cantidad de factores que afectan las concentraciones del xenobiótico. Estas variaciones se deben a la biotransformación y eliminación progresiva del xenobiótico también por parte del organismo del insecto; y a las diferencias de concentración de las sustancias a las que están expuestos los insectos de determinadas zonas del cadáver como resultado de la redistribución postmortem, entre otras cosas. Por lo que el insecto podría haberse expuesto a un xenobiótico, y aun así no presentar rastros medibles de la sustancia. La tabla 4 muestra las diferencias de concentración entre insectos en diferentes etapas de desarrollo expuestos a Diazepam. Se observa que la concentración disminuye, indicando que la droga es eliminada del cuerpo del insecto, bioacumulándose de forma mínima, pero detectable.

Sustancia	Técnica de extracción	Técnica analítica	Comentarios	Referencia
Diazepam	Líquido - Líquido	Cromatografía gaseosa (GC) / Espectroscopía de masas (MS)	Las concentraciones fueron las siguientes: Hígado (conejo): 9.53 µg/mg Larva: 0.342 µg/mg Pupa: 0.233 µg/mg Adulto: 0.051 µg/mg No reportan límites de detección	Carvalho y cols. (2001)

Tabla 4 Diferencia de concentraciones de Diazepam en dípteros de la misma especie y diferente etapa de desarrollo

Un resultado positivo es un indicio claro de que el occiso estuvo expuesto en vida al xenobiótico, esto puede complementarse estableciendo una relación meramente cualitativa entre la concentración detectada en el insecto y el cadáver, en el caso de ser esta excepcionalmente alta, como proponen algunos autores; de esta manera, como mencionan Gosselin y cols. (2011), el hallazgo de una concentración muy elevada del xenobiótico en el insecto se podría relacionar con una concentración por encima de la dosis letal en el individuo muerto. Sin embargo, prácticamente la totalidad de los estudios realizados llevan a la conclusión de que una relación cuantitativa entre concentraciones es imposible de establecer, limitándose a ser un indicio de una exposición al xenobiótico, más no a una cantidad del mismo.

El resultado positivo usando este tipo de matriz, es un dato que se incluye en el dictamen. Por lo cual puede ser un factor decisivo para la resolución de un caso. En la tabla 5 se mencionan algunos casos en los que el resultado positivo de un estudio entomotoxicológico sirvió de ayuda en la investigación forense.

Matriz	Xenobiótico	Resultado	Comentarios	Referencia
Larvas de califóridos	Fenobarbital	Positivo a fenobarbital en larvas halladas en un cadáver esquelitizado	Se trata del primer caso registrado en el que la entomotoxicología auxilió en una investigación forense	Beyer y cols., 1980.
Larvas de C. megacephala y C. rufifacies	Malatión	Se detectó malatión en las larvas en una concentración de aproximadamente 2050 µg/g de larva.	Se sospechaba de una muerte por envenenamiento con malatión en un cadáver hallado en avanzado estado de descomposición	Gunatilake y cols. 1989.
Ejemplares muertos de C.vicina	Benzoilecgonina	Se detectó benzoilecgonina en larvas halladas en un cuerpo congelado a la intemperie en estado de esquelitización	El xenobiótico se detectó en larvas y tejido muscular. Se concluyó que la muerte se debió a una sobredosis.	Nolte y cols., 1992.

Matriz	Xenobiótico	Resultado	Comentarios	Referencia
Larvas de moscas sarcosaprófagas, no identificadas	Secobarbital	Se detectó secobarbital en las larvas, apoyando la hipótesis de un suicidio.	En este caso el cadáver se hallaba en un estado de descomposición muy avanzado, y solo se contaba con las larvas y una porción de músculo de la pantorrilla, el cual no presentó indicios de xenobióticos.	Levine, Golle y Smialek, 2000.
Larvas de moscas sarcosaprófagas, no especificadas	Benzoilecgonina Carbamazepin Diazepam Amitriptilina	Se obtuvieron resultados positivos para una o más de estas sustancias, en cada caso, en larvas provenientes de 10 cadáveres	Se realizó el estudio en cadáveres de una morgue en Brasil. Estos no habían sido sometidos a ninguna prueba toxicológica.	De Aguiar França y cols., 2015.

Tabla 5 Ejemplos en los cuales un resultado positivo a algún xenobiótico fue interpretado en el contexto de una investigación forense



Figura 18 Cadáver en estado de esqueletización hallado a la intemperie cubierto de nieve. Las larvas muertas que se encontraron en el cadáver dieron un resultado positivo a la benzoilecgonina. (Nolte y cols., 1992).

INTERPRETACIÓN DEL IMPACTO EN EL DESARROLLO DE UN INSECTO SARCOSAPRÓFAGO, DEBIDO A LA EXPOSICIÓN A UN XENOBIÓTICO, Y SUS IMPLICACIONES EN LA DETERMINACIÓN DEL INTERVALO *POSTMORTEM*

Las determinaciones del tanatocronodiagnóstico o intervalo *postmortem*, después de un periodo de aproximadamente 72 horas después de la muerte, a menudo se realizan con base en el estudio de la fauna cadavérica. El motivo de la

predilección por esta herramienta, es la falta de datos objetivos que el mismo cadáver puede proveer después de este periodo: la temperatura (*algor mortis*), la rigidez (*rigor mortis*) y el *livor mortis*, ya no son factores que sean de utilidad. Debido a que el cuerpo ha llegado a un equilibrio térmico con el ambiente, es imposible realizar una correlación con el cambio de temperatura. La rigidez ha desaparecido, por lo que este factor, cuya duración puede situarse temporalmente con respecto al fallecimiento, ya no puede utilizarse. Y llega un momento en el que el *livor mortis* no produce modificaciones visibles en la piel (Goff, 2009).

En condiciones normales, los insectos sarcosaprófagos colonizan el cadáver rápidamente. Incluso en cuestión de minutos después de la muerte, las moscas de la familia *Calliphoridae*, tales como la *Calliphora vicina*, depositan sus huevos en el cuerpo sin vida, prefiriendo los orificios naturales, tales como la boca y las fosas nasales. Es por este motivo que estas moscas se utilizan para determinar el intervalo postmortem. Su ciclo de vida está bien estudiado, y se considera la gran importancia de la temperatura ambiental en su desarrollo.

El tamaño y la etapa de desarrollo de las moscas, se compara con bases de datos para determinada especie. La temperatura se incluye en el análisis por medio de una curva, similar a la mostrada más adelante, en donde se plasma el desarrollo del espécimen, en función de la temperatura y del tiempo (Villet, Cameron y Midgley, 2009).

Sin embargo, como se expuso en el capítulo anterior, el desarrollo del insecto también está en función de la exposición a algunos xenobióticos, tales como la

cocaína que acelera su desarrollo, o el tetrahidrocanabinol que lo retrasa (Karampela y cols. 2015).

Los resultados obtenidos en los estudios entomotoxicológicos, deben apoyarse para interpretación adecuada en estas curvas, ya que en los casos en los que se detecte la presencia de sustancias en los insectos, muy probablemente existirán desviaciones en los resultados y podría ser un factor que cambie los resultados de una investigación. Basta remitirse a la cantidad de casos reales que han sido resueltos con la entomología forense, desde el siglo XIX hasta la fecha.

Siendo frecuente la presencia de este tipo de sustancias en los cadáveres estudiados por los especialistas forenses, ya sea por la relación entre las drogas y los entornos violentos, por los fallecimientos no resueltos cuya causa fue una intoxicación, por al influjo de alguna sustancia en el comportamiento de un individuo, o por las consecuencias letales de dosis elevadas, es de suma importancia conocer e interpretar su efecto en la fauna cadavérica.

Sustancia	Influencia en el desarrollo del insecto	Especie estudiada	Comentarios
Metanfetamina (y su metabolito: p-hidroximentanfetamina)	Acelera el crecimiento	Calliphora stygia	Se concluye que el uso de esta especie no es adecuado para determinar el IPM, cuando hay metanfetamina de por medio, ya que puede variar el resultado hasta por 78 h. (C. Mullany y cols., 2014)

Metadona	Inhibe el crecimiento	Lucilia sericata	El crecimiento es inhibido ligeramente , y solo a altas concentraciones. La larva elimina casi todo el metabolito, y solo se detectan trazas en el pupario. Afecta la viabilidad de las pupas. (M. Gosselin y cols., 2011)
Cocaína	Acelera el crecimiento	Chrysomya albiceps y Chrysomya putoria	La diferencia en el tiempo total de desarrollo de ambas especies no expuestas a la cocaína, con las que si lo estuvieron, fue de aproximadamente 60 horas . La mortalidad de las pupas disminuyó con la cocaína. (L. Lopes de Carvalho y cols., 2012)
Ketamina	Inhibe el crecimiento	Chrysomya megacephala	Se realizó un estudio con variaciones en la concentración de ketamina y la temperatura. Se observó una desviación de 24 h . No hay relación lineal concentración-crecimiento. (Zhou Lu y cols., 2014)

Tabla 6 Algunos xenobióticos con efecto marcado en el desarrollo de los insectos sarcosaprófagos

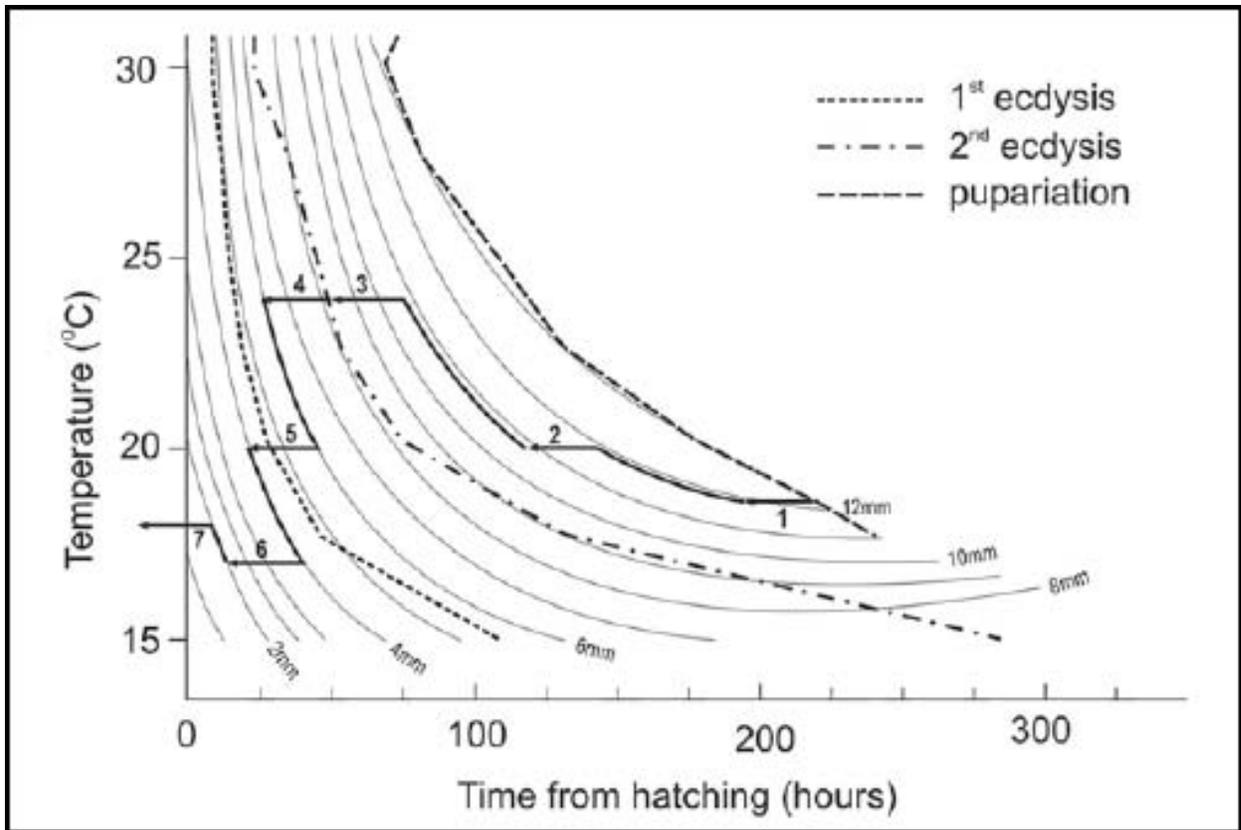


Figura 19 Diagrama isomorfo e isomegalo.

La **figura 19** muestra el tamaño y la fase de desarrollo de una larva, desde la eclosión, en función del tiempo y la temperatura. En este caso se parte de una larva recolectada de 12.2 mm justo antes de la etapa de pupa (línea discontinua). Se avanza hacia atrás tomando en cuenta la temperatura de cada periodo (en este caso las flechas horizontales representan 24 h, pero se puede ajustar si se poseen datos de lapsos más cortos). El IPM determinado de esta forma es de 6.4 días aproximadamente. Tomado de Villet, Cameron y Midgley (2009), pp. 127.

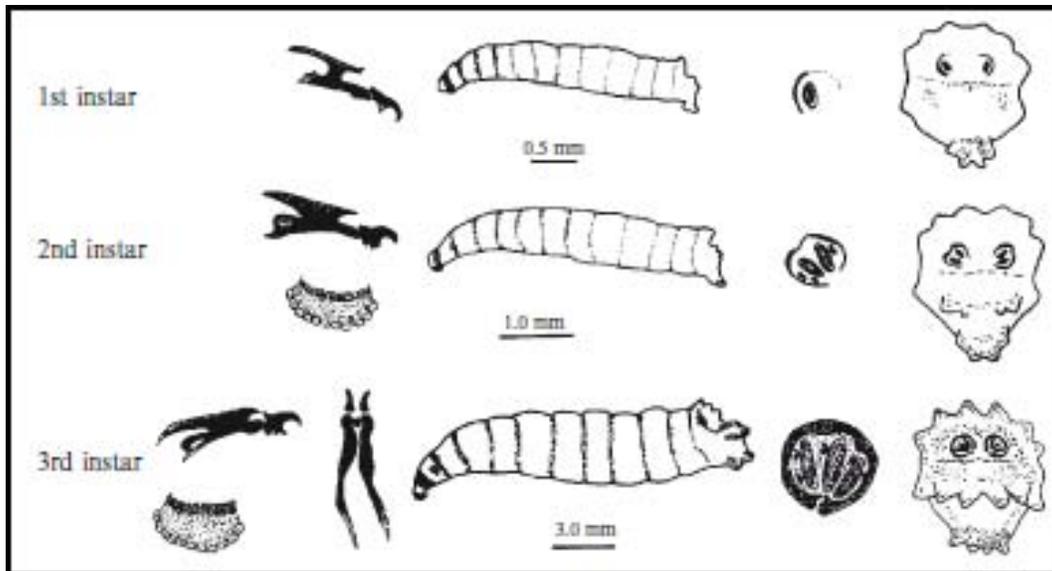


Figura 20 Desarrollo general de una larva de una mosca necrófaga. Se aprecian las estructuras bucales (izquierda), el tamaño de animal (centro) y los espiráculos en la parte posterior (derecha). Tomado de Goff (2009). p. 27.

INTERPRETACIÓN EN OTROS CONTEXTOS

La detección de la presencia de un xenobiótico en un insecto, no necesariamente sarcosaprófago, puede ser de interés en otras áreas alejadas, en mayor o menor medida, con las investigaciones forenses. Un ejemplo es el área ambiental, en donde la detección de un xenobiótico en los insectos pertenecientes a cierto ecosistema, puede ser un indicador de contaminación ambiental. Esto puede aplicarse para insecticidas o metales pesados, entre otras cosas. Tal es el caso de un estudio realizado por Nuorteva y cols. (1980) en donde se comprueba la elevada concentración de mercurio en Idrija, una zona de la extinta Yugoslavia (Idrija actualmente pertenece a Eslovenia), utilizando especímenes de *L. caesar* y

L. illustris, recolectados del medio. Con los resultados se determina el efecto en el ambiente de una destiladora de mercurio local. También se evidencia el alcance de estos efectos, siendo las concentraciones, en los tejidos de los insectos, cuatro veces menores a una distancia de 0.8 Km.

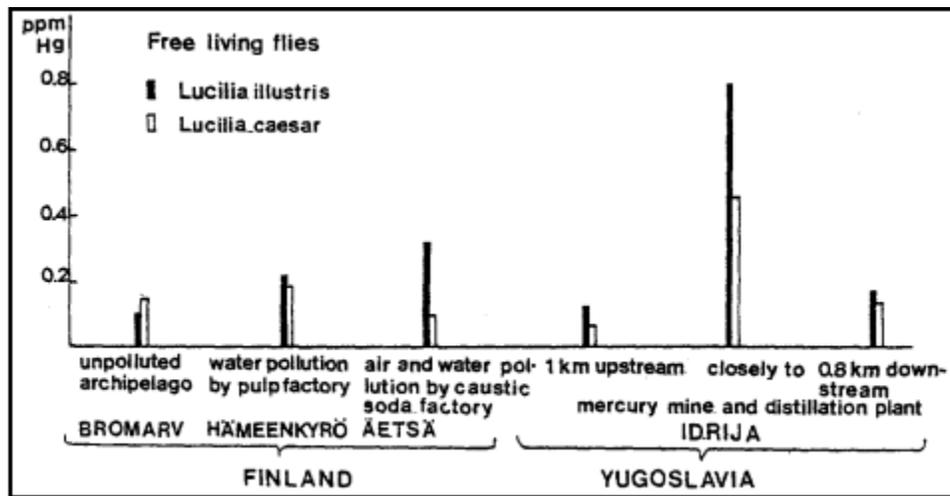


Figura 21 Cantidad de mercurio contenido en los tejidos de dos especies de moscas, asociado a ciertas zonas de Finlandia y Yugoslavia. Tomado de Nourteva y cols. (1980).

LA ENTOMOLOGÍA FORENSE Y LA ENTOMOTOXICOLOGÍA EN MÉXICO

En México, la entomología forense aun no llega a desarrollarse al nivel de países como Francia o Estados Unidos, e incluso su presencia es menor que en algunas naciones vecinas de Latinoamérica. Una prueba de ello es la escasa cantidad de publicaciones al respecto, y si bien, esta disciplina se practica en instituciones tales como la Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal y el Instituto de Ciencias Forenses, su implementación es relativamente reciente. Entre las causas de esta problemática se encuentra la escasa colaboración entre las instituciones de procuración de justicia con las universidades, así como la insuficiente difusión. No obstante, algunas universidades tales como la Universidad de Guadalajara, la Universidad Autónoma de Chapingo, la Universidad Autónoma de Nuevo León, la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y la Universidad Nacional Autónoma de México, han hecho esfuerzos al respecto trabajando en el desarrollo de nuevos proyectos (Molina, 2009). Por lo tanto se puede afirmar que la entomotoxicología, enmarcada en este contexto, se encuentra en condiciones similares de desarrollo.

LA APLICACIÓN DE LA ENTOMOLOGÍA FORENSE EN MÉXICO

Entre las instituciones que utilizan la entomología forense para la resolución de casos reales, se encuentra la Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal (PGJDF) y el Instituto de Ciencias Forenses (INCIFO).

La PGJDF cuenta con un laboratorio de entomología forense, que se encuentra subordinado a la Subdirección de Identificación, y el cual tuvo su origen en el año 2004. Este representó el paso a la profesionalización de la entomología forense en dicha institución. Previo a su aparición, los especímenes entomológicos no eran tomados en cuenta como un indicio de importancia, y la estimación del intervalo postmortem, se realizaba utilizando otras técnicas forenses.

Actualmente, la PGJDF tiene la posibilidad de recurrir a los expertos en el área de entomología forense, los cuales proveen de importantes herramientas para elucidar hechos criminales. El análisis toxicológico está incluido en el protocolo seguido por los peritos con los insectos recolectados. El proceso comienza con un muestreo, en el cual las larvas, las pupas y las exuvias son colocadas en viales plásticos o de vidrio. En el caso de las larvas, estas pueden mantenerse vivas, o almacenadas en una solución de etanol al 70%. Posteriormente, se toma una muestra representativa de 7 a 20 larvas que son maceradas en metanol, o en metanol/cloroformo, con el fin de realizar la extracción. Es importante destacar que no se discrimina el sitio de muestreo de los especímenes entomológicos, como aconsejan algunos autores (Gosselin, y cols. 2011). La solución orgánica es sometida a un análisis inmunológico, el *screening* (el mismo realizado con las muestras de orina) con el fin de detectar xenobióticos. Un resultado positivo

conduce a la realización de un análisis adicional, utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. En este caso los resultados se utilizan para apoyar las determinaciones de drogas de abuso y otros xenobióticos en los cadáveres, lo cual puede utilizarse para hallar la causa de muerte, o para identificar algún cuerpo.

Un hecho importante, señalado por una fuente de la PGJDF, es que al hallarse un cadáver en un estado de descomposición muy avanzado, los analistas del área de toxicología de la PGJDF, utilizan directamente a los insectos para realizar los análisis, dejando en segundo plano la determinación a partir de los tejidos del cadáver. Lo anterior se debe a que existen antecedentes de análisis realizados con tejidos putrefactos que presentaron dificultades al interpretar los resultados, debido a la interferencia de sustancias generadas por la descomposición, sumado a la inestabilidad de algunos xenobióticos en las condiciones propiciadas por la putrefacción.

El INCIFO (Instituto de Ciencias Forenses), anteriormente llamado Servicio Médico Forense (SEMEFO), dependencia del Tribunal Superior de Justicia del Distrito Federal, realiza en promedio 4,780 necropsias al año, para determinar las causas de muerte, esto se traduce en un aproximado de 13 cadáveres al día. Actualmente, en el INCIFO trabajan 110 peritos de diversas especialidades como entomología, química, genética y medicina.

En el sitio de internet del INCIFO, se declara que “El SEMEFO se ha dado a la tarea de realizar investigación científica seria y profesional, un ejemplo de esto es

que ha realizado experimentación con cadáveres para tener datos reales del desarrollo de los insectos y su actividad dentro del mismo cuerpo dando como resultado una base de datos real y confiable en materia de entomología forense. Tomando en cuenta los datos climatológicos y toxicológicos, datos de gran relevancia para la interpretación del desarrollo del insecto” Así mismo, declara que en materia de entomotoxicología “ en el INCIFO se montan constantemente proyectos de investigación” y cita como ejemplo un proyecto que lleva por nombre *Determinación de clorhidrato de cocaína, diacepam, cannabis y/o sus metabolitos en larvas de dípteros alimentadas en cadáveres de ratas Wistar (Rattus norvegicus) previamente tratadas con las drogas*. De este trabajo no se pudo obtener más información.

LA INVESTIGACIÓN SOBRE ENTOMOLOGÍA FORENSE Y ENTOMOTOXICOLOGÍA EN MÉXICO

Las publicaciones respecto a la distribución y las sucesiones de la entomofauna cadavérica de ciertas regiones del territorio nacional, o sobre el efecto de la temperatura en el desarrollo de las especies necrófagas, tales como los trabajos de Molina y cols. y Nava y cols. aportan información de gran valor para la investigación forense. En el primer caso se expone la diversidad de la entomofauna cadavérica en la Ciudad de México, y en el segundo, el efecto de la temperatura en el desarrollo de la mosca *Sarcophaga haemorroidalis*.

En otro ejemplo destacable se estudia la dispersión espacial de las larvas en etapa de postalimentación (Vergara y cols., 2012). Este estudio, realizado en el estado de Coahuila, tiene la peculiaridad de que se realizó utilizando, por primera vez en México, un cadáver humano.

Sin embargo pocas veces se ha atendido a la aplicación de la toxicología en la entomofauna cadavérica. Ejemplo de estas investigaciones aisladas, es un estudio en el que se estudia el posible impacto del paratión metílico, un insecticida, en la sucesión de la fauna cadavérica, utilizando para ello cerdos a los cuales se les aplicó antemortem la sustancia. Se encontraron algunas diferencias en el tiempo de estadía de ciertas especies de moscas y escarabajos en el cadáver, no así en la sucesión (Martínez R., y cols. 2008).

La producción de tesis también ha contribuido a la divulgación y el desarrollo de la materia. En una de ellas, enfocada a la entomotoxicología, se aborda la detección de metabolitos de clorhidrato de cocaína en dípteros alimentados de ratas tratadas antemortem (Cerdeira G. 2010), utilizando cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas. Otro ejemplo es una tesis de doctorado en la cual se evalúa el efecto de la cocaína, el carbofurano y el paratión en larvas de mosca (Solís, 2014).

Así mismo, existen trabajos de gran calidad que estudian la diversidad biológica de especímenes entomológicos de interés forense, así como las sucesiones en las etapas de descomposición. Ejemplo de ello es un estudio sobre la sucesión de

entomofauna cadavérica utilizando como biomodelo al cerdo blanco (Flores, 2009).

Aunque las evidencias del trabajo mexicano sobre el tema que nos ocupa se dé a cuentagotas, el hecho de que exista comprueba la inquietud, muchas veces individual, de desarrollar una disciplina que ha sido de gran utilidad, ayudando a resolver casos que van desde negligencia hasta homicidios. El que la entomología forense, y por ende la entomotoxicología, se encuentren escasamente desarrolladas en nuestro país, no debe ser si no un aliciente para la generación de nuevas investigaciones aplicadas al contexto mexicano. Sin duda, la entomología forense y la entomotoxicología podrían ser de ayuda en la resolución de muchos casos, dado el lamentable crecimiento de la delincuencia en nuestro país.

CONCLUSIONES

Es un hecho que la entomotoxicología puede aportar información valiosa. Puede ofrecer indicios de presencia de drogas en cadáveres muy descompuestos o en cuerpos en los que los tejidos han desaparecido casi en su totalidad, como en los casos mencionados en este trabajo, los cuales son evidencias del potencial que tiene esta nueva disciplina. También puede ofrecer información acerca de los efectos de los xenobióticos en el desarrollo de un insecto. Incluso puede ser de relevancia en otras áreas, es el caso de la protección ambiental.

Es necesario profundizar en la investigación de la fisiología de los insectos, y en el proceso de biotransformación, acumulación y eliminación de xenobióticos de interés en sus cuerpos. De esta manera, y con ayuda de nuevas tecnologías y técnicas de análisis químico con mayores posibilidades, será posible alcanzar los objetivos pendientes de esta disciplina, para que no solo sea “una simple curiosidad de laboratorio” como se ha llegado a afirmar (Tracqui, A. y cols., 2004).

En México, la entomología forense comienza a tomar más importancia. En los últimos años han aparecido laboratorios especializados (hago mención especial del laboratorio de entomología forense de la PGJDF de la Ciudad de México) y en nuestro país existen expertos capaces de sacar adelante importantes proyectos de investigación. Aunque, según opiniones provenientes de estos científicos, aún hace falta mucho apoyo por parte de las instituciones gubernamentales y de las universidades para poder concretar tales proyectos.

Es importante mencionar que en el presente año, 2016, se comenzaron a realizar trabajos de titulación a nivel licenciatura en el tema que nos ocupa, apoyados por los profesores-investigadores adscritos a la licenciatura de Ciencia Forense, de la Facultad de Medicina de la UNAM, dándose más difusión a la disciplina, así como oportunidades de desarrollo. El presente trabajo ha sido de utilidad para estos proyectos, aportando información básica y actualizada, ayudando a abarcar el tema de manera general y aportando referencias para casos particulares.

BIBLIOGRAFÍA

Anderson Jan. (2014). *Detectors*. En Dettmer-Wilde, K. y Engewald W. (Eds.), *Practical Gas Chromatography. A Comprehensive Reference*. (PP.) US. Ed. Springer.

Anderson G. Wildlife Forensic Entomology: Determinating Time of Death in Two Illegally Killed Black Bear Cubs. (1999) *Journal of Forensic Sciences*. 44(4), pp. 856-859.

Benecke, Mark. (2001) A brief history of forensic entomology. *Forensic Science International* 120, 2-4.

Beyer J., Enos W. y Stajic M. (1980) Drug Identification Through Analysis of Maggots. *Journal of Forensic Sciences*. Vol. 25, No. 2. Abril de 1980. pp. 411 – 412.

Bushby S., Thomas N. Priemel. Petra. Coulter C., Rades T., Kieser J. (2012) Determination of methylphenidate in Callipjorid larvae by liquid-liquid extraction and liquid chromatography mass spectrometry – Forensic entomotoxicology using an in vivo rat brain model. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 70 (2012) 456– 461.

Campobasso C., Gherardi, M., Caligara, M., Sironi, L., Introna, F. (2004) Drug analysis in blowfly larvae and in human tissues: a comparative study, *Int. J. Legal Med*. 118, 210–214.

Carvalho L., Linhares, A., Trigo, J. (2001) Determination of drug levels and the effect of diazepam on the growth of necrophagous flies of forensic importance in southeastern Brazil, *Forensic Sci. Int.* 120, 140–144.

Cerda G. y Ana G. (2010) Determinación de metabolitos de clorhidrato de cocaína en muestras de entomofauna obtenidas en ratas previamente tratadas. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias quimicobiológicas. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional.

De Aguiar França J., Brandao M., Fabriz F. y Dutra E. (2015) Simultaneous determination of prescription drugs, cocaine, aldicarb and metabolites in larvae from decomposed corpses by LC–MS–MS after solid–liquid extraction with low temperature partitioning. *Forensic Toxicol.* 33:93–103.

Definis-Gojanovic, M., Sutlovic, D., Britvic, D., Boze, K. (2007) Drug analysis in necrophagous flies and human tissues, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 58 (2007) 313–316.

Di Fazio, V. y Gosselin, M. (2011) Toxicologie forensique. En: Boel, P., De Cloet, V., De Kinder, J., Mahieu, J. y Van Varenbergh, D. Manuel: L'Enquête forensique. Politeia. Bélgica. pp 241 – 245.

Didier, Bruno. (2008) Les insects au service de l'Histoire. *Insectes* 33 No.150. 2008 (3)

Drummer O. H. (2008) Postmortem Toxicological Redistribution. En: Ratty G.N. *Essentials of Autopsy Practice*. Springer, London.

Fico, Rosario. y cols. (2013) Manuale delle attività investigative per i reati contro la fauna. Ente Parco Nazionale della Majella. Sulmona, Italia.

Flores P. Leonardo R. (2009) Sucesión de entomofauna cadavérica utilizando como biomodelo cerdo blanco, *Sus scrofa* L. Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Estado de México.

Gennard D. (2007) Forensic Entomology. An Introduction. Wiley. UK.

Goff M. (2009) Early Postmortem Changes and Stages of Decomposition. En: Amendt J., Campobasso C. y Grassberg M. (Editores). Current Concepts in Forensic Entomology. Springer. pp. 1 – 5.

Gosselin, Mathias (2009). L'entomotoxicologie légale. Insectes 33 No. 155.

Gosselin M., Ramírez-Fernández M., Wille S., Samyn N., De Boeck G., Bourel B., (2010) Quantification of Methadone and its Metabolite 2-Ethylidene-1,5-dimethyl-3,3 diphenylpyrrolidine in Third Instar Larvae of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) Using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. Journal of Analytical Toxicology, Vol. 34.

Matthias Gosselin, Sarah M.R. Wille, Maria del Mar Ramírez Fernandez, V. Di Fazio, Nele Samyn, Gert De Boeck, Benoit Bourel (2011). Entomotoxicology, experimental set-up and interpretation for forensic toxicologists. Forensic Science International 208, 1–9.

Gosselin M., Di Fazio V., Wille S., Ramírez Fernandez M., Samyn N., Bourel B. Rasmont P. (2011b) Methadone determination in puparia and its effect on the

development of *Lucilia sericata* (Diptera, Calliphoridae). *Forensic Science International*, 209(1-3), pp. 154–159.

Gosselin, M. y Bourel, B. (2014) Apports de l'entomotoxicologie a l'expertise judiciaire : etat de l'art et perspectives. En Charabidze D. y Gosselin M. *Insectes, Cadavres & Scènes de crimes*. Ed. De Boek. Bélgica.

Gunatilake K. y Goff M. (1989) Detection of Organophosphate Poisoning in a Putrefying Body by Analyzing Arthropod Larvae. *Journal of Forensic Sciences*. Vol. 34, No. 3, Mayo de 1989. pp. 714 – 716.

Huchet, Jean-Bernard. (2010) Archaentomological study of the insects remains found within the mummy of Namenkhet Amun (San Lazzaro Armenial Monastery, Venice/Italy). *Advances in Egiptology* 1(2010): 59-80

Karampela S., Pistos C., Moraitis K., Athanaselis S. (2015) Development and validation of a LC/MS method for the determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in the larvae of the blowfly *Lucilia sericata*: Forensic applications. *Science and Justice*.

Kolte K., Pinder R. and Lord W. (1992) Insect larvae used to detect cocaine poisoning in a decomposed body. *Journal of Forensic Sciences*. Vol. 37, No. 4, Julio de 1992. pp. 1179 – 1185.

LaGoo L., Schaeffer L., Szymanski D., Waddell S. R. (2010) Detection of Gunshot Residue in Blowfly Larvae and Decomposing Porcine Tissue Using Inductively

Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS). *J Forensic Sci*, May 2010, Vol. 55, No. 3.

Levine B., Golle M., Smialek J. (2000) An Unusual Death Involving Maggots. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*. Vol. 21(1), pp. 59 – 61.

Lopes de Carvalho. (2009). *Toxicology and Forensic Entomology*. En: Amendt J., Campobasso C. y Grassberg M. (Editores). *Current Concepts in Forensic Entomology*. Springer. p. 174.

Lopes de Carvalho L., Linhares A. X., Badan-Palhares F. A. (2012) The effect of cocaine on the development rate of immatures and adults of *Chrysomya albiceps* and *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) and its importance to postmortem interval estimate. *Forensic Science International* 220, 27–32.

Magni, P., Tommaso P., Pazzi M., Vincenti M., Dadour I. R. (2014) Development of a GC–MS method for methamphetamine detection in *Calliphora vomitoria* L. (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International* 241 (2014) 96–101

Martínez R. Haydee, Jaramillo J.F., Escoto R.J., Rodríguez V. M., Posadas R.F., Medina R.I. (2009) Estudio comparativo preliminar de la sucesión de insectos necrófagos en *Sus scrofa* intoxicado con paratión metílico, en tres periodos estacionales. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, vol. 40. núm. 3, pp. 5-10. Distrito Federal, México.

Mayagaya V., K.Michel,M.Q. Benedict, G.F. Killeen, R.A. Wirtz,H.M. Ferguson, y cols. (2009) Non-destructive determination of age and species of *Anopheles*

gambiae s.l. using near-infrared spectroscopy, Am. J. Trop. Med. Hyg. 81. 622–630.

Mégnin, P. (1894). La Faune des Cadavres. Encyclopédie Scientifique des Aide-Memoire. Gauthier-Villars et Fils, Paris.

Molina C. Humberto. (2009) Conformación del laboratorio de entomología forense en la Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal (PGJDF). Reporte de trabajo profesional. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

Molina C. Humberto y cols. (2013) Distribución de dípteros asociados con las fases de degradación cadavérica de humanos en el Distrito Federal, México. Vol. 12 Tomo 2. México. pp. 1749-1754.

Mullany C., Keller P., Ari S. N. Wallman. J (2014) Effects of methamphetamine and its primary human metabolite, p-hydroxymethamphetamine, on the development of the Australian blowfly *Calliphora stygia*. Forensic Science International 241. 102–111.

Nava Hernandez, Manuel y cols. (2013) Efecto de la temperatura sobre el desarrollo de *Sarcophaga haemorrhoidalis* (Fallen) (Diptera: Sarcophagidae). Entomología Mexicana. Vol. 12 Tomo 1. México. pp. 901-906.

Nuorteva P., Nuorteva S. y Suckcharoen S. (1980) Bioaccumulation of Mercury in Blowflies Collected near the Mercury Mine of Idrija, Yugoslavia. Bull. Environm. Contam. Toxicol. 24, pp. 515 – 521.

Oliveira J., Baia T., Gama R., Kássio M.G. (2014) Development of a novel non-destructive method based on spectral fingerprint for determination of abused drug in insects: An alternative entomotoxicology approach. *Microchemical Journal* 115 (2014) 39–46.

Rodríguez-Fernandez J., C.J.B. Carvalho, C. Pasquini, K.M.G. Lima, M.O. Moura, G.G.C. Arízaga (2011) Barcoding without DNA? Species identification using near infrared spectroscopy, *Zootaxa* 2933, 1–9.

Shackman J. (2013) General Instrumentation. En Fanali Salvatore, Haddad Paul (Eds.), *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*. US. Elsevier.

Smith, K. (1986). *A Manual of Forensic Entomology*. Cornell University Press. London, England.

Solís Esquivel, Elton. (2014) Estudio entomotoxicológico de paratión, carbofurano y cocaína en larvas de mosca carroñera de interés médico forense en el estado de Nuevo León. Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Souza C., Lima. C.G., Alves-Jr M., Arrais-Silva W., Giorgio S., Linhares A. X., Thyssen P. (2013) Standardization of Histological Procedures for the Detection of Toxic Substances by Immunohistochemistry in Dipteran Larvae of Forensic Importance. *J Forensic Sci*, Vol. 58, No. 4.

Speight, M. (1974) Potential contributions to archaeology from animal remains, with special reference to insects. En B. G. Scott (ed.) *Perspectives in Irish Archaeology*, 24-34. Association of Young Irish Archaeologists, Dublin Seminar.

Taylor C. R. (2013) Introduction to Immunohistochemistry. En Taylor C. y Rudbeck L. (Eds.) Immunohistochemical Staining Methods. 6ta edición. Dako. 2013.

Tracqui, A., Keyser-Tracqui, C., Kintz, P., Ludes, B. (2004). Entomotoxicology for the forensic toxicologist : much ado about nothing ?, International Journal of Legal Medicine, 118, 194-196.

Vergara Pineda, Santiago y cols. (2012) Dispersión de larvas de *Lucilia sericata* y *Calliphora coloradensis* (Diptera: Calliphoridae) en etapa de postalimentación. Revista Colombiana de Entomología. 38 (1): 97-99.

Workman, Jerry y Weyer, Lois. Practical Guide to Interpretive Near- Infrared Spectroscopy. CRC Press. Boca Raton, Fl. 2008.

Zhou Lu., Xiandun Zhai, Haimei Zhou, Pu Li, Jinqi Ma, Ling Guan y Yaonan Mo (2014) Effects of Ketamine on the Development of forensically important Blowfly *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae) and its Forensic Relevance. J Forensic Sci, Vol. 59, No.