

Universidad de Costa Rica

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología



**Desarrollo de la mosca de importancia forense *Lucilia eximia* (Diptera:
Calliphoridae) a diferentes temperaturas constantes**

**Práctica Dirigida de Graduación presentada para optar por el grado de Licenciatura
en Biología con énfasis en Zoología**

Lilliana Valenciano Mejías

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

2019

Miembros del tribunal

Ph.D. Paul E. Hanson Snortum

Director de tesis

Lic. Roberto Morales Montero

Lector

Lic. John Vargas Fonseca

Lector

M.Sc. Daniel Briceño Lobo

Director Escuela de Biología

Miembro del tribunal

Dr. Javier Trejos Zelaya

Decano Facultad de Ciencias

Presidente del Tribunal

Bach. Lilliana Valenciano Mejías

Postulante

A mi mamá

Agradecimientos

A mi mamá, por todo su sacrificio y apoyo incondicional, por permanecer a mi lado a pesar de la distancia y tener siempre la fortaleza de salir adelante a pesar de los obstáculos...no hay palabras en este mundo para agradecerte, te amo.

A Esteban por estar siempre a mi lado, por su cariño incondicional y por darme el aliento necesario en los momentos más difíciles.

A mi director de tesis Paul Hanson por su guía, paciencia y comprensión durante la elaboración de este trabajo y por compartir sus conocimientos durante toda mi formación universitaria.

En mi comité de tesis, le agradezco profundamente a Roberto por su paciencia, sus ideas y gran ayuda durante todo el proceso, sin las cuales este estudio no hubiera sido posible. A John por su apoyo, sus observaciones e ideas para mejorar el proyecto cada día.

Le agradezco a mis compañeros de la Sección de Biología Forense por todo su apoyo e interés a lo largo de este proceso.

Índice general

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes	4
3. Justificación.....	9
4. Objetivos.....	10
5. Metodología	11
6. Resultados.....	15
7. Discusión.....	24
8. Conclusiones	27
9. Recomendaciones	28
10. Bibliografía.....	29
11. Anexos	34

Índice de cuadros

Cuadro 1. Duración media del desarrollo de los estadios inmaduros de <i>L. eximia</i> a temperaturas constantes de 20, 25 y 30 °C.....	21
Cuadro 2. Ecuaciones de simulación, valores F, valores P y coeficiente de determinación (R^2) de la relación entre la longitud corporal de las larvas de <i>L. eximia</i> (mm) y el tiempo después de la eclosión (h) a tres temperaturas constantes.....	23

Índice de figuras

Figura 1. Desarrollo de <i>L. eximia</i> a una temperatura constante de 20 °C, se muestra la variable longitud a lo largo del tiempo (horas y días de desarrollo).....	16
Figura 2. Curva de crecimiento de <i>L. eximia</i> a una temperatura de 20 °C, se muestra la variable longitud a lo largo del tiempo (promedio de la longitud y desviación estándar). El modelo ajustado para esta variable correspondió a parámetros lineales que se definen como: $\hat{L} = 3.012 + 0.1339 t$, donde \hat{L} : longitud, t: tiempo de desarrollo. Coeficiente de determinación $R^2=0.96$	16
Figura 3. Desarrollo de <i>L. eximia</i> a una temperatura constante de 25 °C, se muestra la variable longitud a lo largo del tiempo (horas y días de desarrollo).....	18
Figura 4. Curva de crecimiento de <i>L. eximia</i> a una temperatura de 25 °C, se muestra la variable longitud a lo largo del tiempo (promedio de longitud y desviación estándar). El modelo ajustado para esta variable correspondió a parámetros lineales que se definen como: $\hat{L} = 5.907 + 0.1083 t$, donde \hat{L} : longitud, t: tiempo de desarrollo. Coeficiente de determinación $R^2=0.71$	18
Figura 5. Desarrollo de <i>L. eximia</i> a una temperatura constante de 30 °C, se muestra la variable longitud a lo largo del tiempo (horas y días de desarrollo).....	20
Figura 6. Curva de crecimiento de <i>L. eximia</i> a una temperatura de 30 °C, se muestra la longitud a lo largo del tiempo (promedio de la longitud y desviación estándar). El modelo ajustado para esta variable correspondió a parámetros lineales que se definen como: $\hat{L} = 2.592 + 0.2330 t$, donde \hat{L} : longitud, t: tiempo de desarrollo. Coeficiente de determinación $R^2=0.82$	20
Figura 7. Porcentaje del tiempo total de desarrollo larval que fue utilizado en el desarrollo de las larvas en la fase de crecimiento y en el desarrollo de las larvas en fase post alimentación, para cada uno de los tratamientos estudiados.....	2

Índice de anexos

Anexo 1. Trampa de suelo utilizada para atraer y atrapar adultos.....	34
Anexo 2. Cajas utilizadas para la cría de larvas, pupas y adultos.....	35
Anexo 3. Cámara de ambiente controlado (Panasonic MLR-352H) utilizada para el desarrollo de larvas a temperaturas constantes.....	36
Anexo 4. Procedimiento para la cría de dípteros de interés forense y construcción de curvas de crecimiento longitudinal (procedimiento elaborado para su uso en la Sección de Biología del Departamento de Ciencias Forenses, Organismo de Investigación Judicial.....	37

Resumen

La entomología forense es una herramienta de importancia ya que aporta indicios en casos de muertes dudosas, utilizando los artrópodos necrófagos que colonizan y se alimentan de tejido necrótico humano. El tiempo de desarrollo o la edad de un insecto que fue encontrado en un cuerpo puede ser utilizada para estimar el tiempo de muerte o intervalo *post mortem*, mediante curvas de crecimiento que relacionan el incremento del tamaño corporal con el tiempo de desarrollo. Sin embargo, esta determinación varía entre especies y algunas variables como la temperatura pueden afectar el desarrollo. Entre los insectos involucrados en la descomposición de un cuerpo los dípteros son el grupo más constante, diverso y conspicuo presente, en especial las larvas de las moscas de la familia Calliphoridae que son reconocidas como las principales y más precisas indicadores forenses del momento de la muerte. El objetivo de la investigación fue estudiar el desarrollo de las formas inmaduras de la mosca de importancia forense *Lucilia eximia* (Calliphoridae) a diferentes temperaturas constantes, con el fin de construir curvas de crecimiento longitudinal que puedan ser utilizadas como un indicador del intervalo *post mortem* en la Sección de Biología del Departamento de Ciencias Forenses del Organismo de Investigación Judicial. Además, crear un procedimiento de operación normado específico para la sección que pueda ser utilizado para la cría de dípteros de interés forense y para la creación de curvas de crecimiento longitudinal. Se realizó la cría de larvas de *L. eximia* a temperaturas constantes de 20, 25 y 30 °C. Los resultados obtenidos muestran que el tiempo de desarrollo de las larvas disminuye a medida que aumentaba la temperatura; la duración total del desarrollo de las larvas a 20, 25 y 30 °C, desde la eclosión de los huevos hasta la pupación fue de 180 ± 4 , 114 ± 7 y 109 ± 7 horas, respectivamente. Las curvas de crecimiento para cada una de las temperaturas estudiadas muestran el cambio de la longitud del cuerpo de las larvas a lo largo del tiempo y mediante las ecuaciones de regresión lineal de cada una de las curvas es posible obtener el tiempo de desarrollo. Estos resultados proporcionan una base importante para la estimación del intervalo *post mortem* basado en el desarrollo de la mosca de interés forense *L. eximia*.

Palabras clave: Calliphoridae, *Lucilia eximia*, intervalo *post mortem*, entomología forense.

1. Introducción

La entomología forense se define como la aplicación del estudio de los insectos y otros artrópodos como prueba científica o evidencia en investigaciones criminales, las cuales pueden llegar a ser presentadas en tribunales de justicia (Catts & Goff 1992). La aplicación más frecuente de la entomología forense se encuentra relacionada con investigaciones sobre muertes dudosas, por ejemplo, es aprovechada como herramienta en casos de homicidio. Utilizando los artrópodos necrófagos que colonizan el tejido necrótico humano, puede determinarse el tiempo de muerte, características de la escena de los hechos o hasta evidenciar el movimiento de un cuerpo de un lugar a otro (Catts & Goff 1992; Camacho 2005, Boatright & Tomberlin 2010).

Una de las aplicaciones más importantes de la entomología forense es la estimación del tiempo de muerte o intervalo *post mortem* (PMI, por sus siglas en inglés), ambos términos son empleados para definir el tiempo que ha transcurrido desde el momento en que ocurrió la muerte hasta que es hallado el cuerpo (García-Espinoza *et al* 2012). El PMI depende de muchos factores y puede ser difícil de determinar, por esta razón cualquier cambio físico o biológico en función del tiempo desde que ocurrió la muerte provee una clave potencial para establecerlo (Wells & Lamotte 2009). Las secuelas químicas y físicas de la muerte son usualmente los indicadores más fiables del PMI, sin embargo, conforme se incrementa el tiempo desde la defunción los métodos anteriores son menos útiles y para obtener resultados más precisos a menudo se utiliza información ecológica y entomológica (Wells & Lamotte 2009). La entomología forense se considera el método más preciso para estimar el tiempo transcurrido desde la muerte cuando han transcurrido más de 72 horas desde que ocurrió el deceso (Sharma *et al.* 2015).

Existen varias razones por las cuales se utilizan insectos en investigaciones relacionadas a muertes. En primer lugar, los insectos son generalmente los primeros en encontrar un cuerpo en descomposición y a menudo las moscas ovipositan en la carroña en las primeras horas posteriores a la muerte; esta acción inicia un reloj biológico en el que la edad de la progenie de la mosca se encuentra directamente relacionada con el cuerpo (Catts & Goff 1992; Wells & Lamotte 1995; Joseph *et al.* 2011). En segundo lugar, la fauna de artrópodos en y alrededor de un cadáver cambia en una secuencia sucesional bastante predecible a medida que progresa la descomposición. El cadáver, el cual representa un

recurso temporal, es explotado por una amplia variedad de organismos, donde los artrópodos suelen ser uno de los constituyentes principales; siendo los insectos, sobre todo las moscas, el grupo más constante, diverso y conspicuo presente (Smith 1986; Catts & Goff 1992; Joseph *et al.* 2011).

Los dípteros necrófagos desempeñan un papel clave en el ciclo de nutrientes en ecosistemas terrestres, ya que aceleran la degradación de tejidos animales, lo que facilita la acción de microorganismos descomponedores (Vasconcelos *et al.* 2015). Especies de al menos 23 familias de dípteros explotan la carroña como alimento; entre las principales familias que se asocian al proceso de descomposición se encuentran: Calliphoridae, Sarcophagidae, Muscidae, Fanniidae y Phoridae (Goff 2009; Wells & Lamotte 2009; Vasconcelos *et al.* 2015). Las moscas representan un grupo de gran interés para las investigaciones forenses debido a sus hábitos necrófagos, a su gran capacidad y eficiencia biológica para adaptarse a diversos ecosistemas, además de presentar una amplia distribución geográfica y capacidad reproductiva (García-Espinoza *et al.* 2012). Además, por su uso como evidencia entomológica la importancia ecológica de los dípteros necrófagos se ha fortalecido en las últimas décadas (Vasconcelos *et al.* 2015).

Los dípteros asociados con carroña pueden ser relacionados con el PMI y una determinación precisa de este último es posible gracias a la estimación de la edad de las etapas larvales de las moscas que colonizaron el cuerpo; un parámetro utilizado para ésta estimación son las curvas de crecimiento, las cuales relacionan el incremento del tamaño corporal (longitud o, menos común, peso) con el tiempo de desarrollo (Amendt *et al.* 2004; Wells & Lamotte 2009; Baqué *et al.* 2015). De esta manera, la mejor estimación de la edad de una larva es el valor correspondiente a su tamaño en la curva, esto es, una línea horizontal desde el valor de la longitud o peso de la larva, que interseca la curva de crecimiento directamente sobre el tiempo de desarrollo (Wells & Lamotte 2009).

La tasa de desarrollo de las larvas depende de las temperaturas ambientales circundantes; ya que la misma tiene un efecto significativo en las tasas metabólicas y de crecimiento de los individuos (Goff 2009; Higley & Haskell 2009; Joseph *et al.* 2011). Las tasas de crecimiento son afectadas por las fluctuaciones diarias en la temperatura ambiente, por episodios prolongados de bajas temperaturas o por la producción de calor metabólico por

agregaciones de larvas (Clark *et al.* 2006). Generalmente, dentro un cierto rango de temperaturas el desarrollo se acelera conforme aumenta la misma (Wells & Lamotte 2009).

Es fundamental contar con datos precisos y confiables sobre el desarrollo de los estadios inmaduros de las moscas y sobre cómo este se ve afectado por la temperatura; pues la precisión en la estimación del PMI es tan buena como los datos disponibles (Chua 2013). Slone *et al.* (2005) demostraron que el parámetro más sensible en la estimación del PMI es la tasa de crecimiento de las larvas, seguida de cerca por la temperatura. Datos de referencia sobre el crecimiento de los distintos estadios inmaduros de las moscas, generados bajo condiciones de laboratorio controladas, son utilizados para construir curvas de crecimiento que permitan estimar la edad de las larvas a temperaturas determinadas y así brindar una determinación confiable del tiempo desde la muerte (Boatright & Tomberlin 2010; Baqué *et al.* 2015; Sharma *et al.* 2015).

2. Antecedentes

Los insectos crecen atravesando una serie de etapas, la apariencia física y la duración de cada etapa varía según el insecto, la especie y las condiciones ambientales en las que se encuentra (Castner 2009). Las moscas presentan un desarrollo holometábolo, conocido también como metamorfosis completa, su ciclo de vida comienza como un huevo, que es colocado en grandes cantidades sobre materia en descomposición (normalmente la fuente de alimento para las larvas). Posteriormente los huevos eclosionan en larvas que empiezan a alimentarse, las larvas incrementan en tamaño y pasan por tres estadios, en el último estadio alcanzan su madurez y migran de la fuente de alimento para pupar en el suelo. Las larvas maduras se encojen y endurecen su piel formando las pupas, de las que emerge el adulto (Evans 1984). Usualmente, las pupas de moscas necrófagas pueden ser encontradas en las prendas de vestir del occiso, en el suelo alrededor del cuerpo o en el caso de encontrarse bajo techo en muebles o alfombras (Castner 2009).

Las moscas de la familia Calliphoridae, junto con la familia Sarcophagidae, representan las especies más importantes para proveer información precisa sobre el intervalo *post mortem* (Byrd & Castner 2009). Esta familia presenta alrededor de 1500 especies en todo el mundo, en el Neotrópico se encuentran aproximadamente unas 126 especies, distribuidas en cuatro subfamilias: Calliphorinae, Luciliinae, Chrysomyinae y Melanomyinae (Solano *et al.* 2013). En Costa Rica se han registrado 30 especies de califóridos, no obstante se estima que esta cifra podría alcanzar un total de 40 especies (Zumbado 2006). Esta familia exhibe una diversidad de hábitos entre los diferentes géneros que la componen, sin embargo, las especies más estudiadas han sido aquellas que forman parte significativa de la fauna de descomponedores y sobre todo aquellas cuya aparición en cuerpos cadavéricos juegan un papel fundamental en la entomología forense como disciplina (Norris 1965; Anderson 2000; Solano *et al.* 2013).

La familia Calliphoridae presenta moscas que son reconocidas como las primeras colonizadoras de cadáveres humanos, debido a esto, a su tamaño, número y ubicuidad son las principales y más precisas indicadores forenses del momento de la muerte (Grassberger & Reiter 2002; Goff 2009; Wells & Lamotte 2009; García-Espinoza *et al.* 2012). En el continente Americano, *Lucilia* spp. junto con *Cynomyopsis* spp. son típicamente las primeras

especies en colonizar un cuerpo, atraídas por el olor producido por el cadáver durante las primeras etapas de descomposición (Campobasso *et al.* 2001; Clark *et al.* 2006).

Los dípteros del género *Lucilia* son cosmopolitas y son conocidos comúnmente como moscas verdes, normalmente ovipositan en una amplia variedad de materia en descomposición (Vargas & Wood 2010). Existen dos especies pertenecientes a este género con gran importancia forense por su comportamiento y que con frecuencia son utilizadas para la estimación del PMI en Norte América, se trata de *L. illustris* y *L. sericata* (Clark *et al.* 2006; Bird & Castner 2009). Estas especies cuentan con amplias investigaciones y datos de referencia sobre su ciclo de vida, lo que proporciona una base importante para la estimación del tiempo de muerte basado en su desarrollo; sin embargo, estas especies no se encuentran con frecuencia en cuerpos humanos en Costa Rica.

Por ejemplo, Wang *et al.* (2016) estudiaron la duración del ciclo de vida y los cambios en la longitud de *L. illustris* a nueve temperaturas constantes. Según los resultados obtenidos esta especie completó su ciclo de vida en temperaturas que variaron desde los 15 a los 32.5 °C y su desarrollo varió de 955.5 horas en la mínima temperatura a 234.8 horas en la máxima. Niederegger *et al.* (2010) estudiaron el desarrollo de *L. illustris* a temperaturas fluctuantes y a varias temperaturas constantes. Para investigar el desarrollo a temperaturas fluctuantes oscilaron la misma entre 5 a 29 °C, con esta metodología *L. illustris* mostró un crecimiento lento en los primeros días, las larvas alcanzaron su longitud máxima en el día 7 y las primeras pupas se encontraron el día 11, el desarrollo completo se dio en un total de 245 horas. Los autores realizaron experimentos de desarrollo a temperatura constante a 5, 13 y 29 °C, en la primera temperatura los huevos no eclosionaron, en la segunda temperatura el desarrollo fue lento y no se completó y a 29 °C las primeras pupas se encontraron el día 6 y el desarrollo tuvo una duración total de 120 horas.

Asimismo, Niederegger *et al.* (2010) estudiaron el desarrollo *L. sericata* a temperaturas fluctuantes y a varias temperaturas constantes. Lograron observar que los huevos de esta especie no eclosionan a las temperaturas fluctuantes utilizadas (5 a 29°C). En el ensayo realizado a 13 °C no se completó el desarrollo y no se pudo observar la pupación. A una temperatura de 29 °C se encontraron pupas el día 5 y los adultos emergieron el día 11, completando el desarrollo en 120 horas. Grassberger & Reiter (2001) estimaron el desarrollo de *L. sericata* bajo 9 regímenes diferentes de temperatura: 17, 19, 20, 21, 22, 25, 28, 30 y 34

°C, obteniendo como resultados para cada temperatura una duración total del desarrollo de: 842, 564, 451, 379, 339, 297, 275, 268 y 259 horas, respectivamente. Adicionalmente, observaron que a una temperatura de 15 °C el desarrollo es incompleto y no se observa pupación. Por otra parte, según Anderson & Kaufman (2011) a aproximadamente 21 °C los huevos de *L. sericata* tardan 21 horas en eclosionar y alrededor de 27 °C tardan 18 horas. El desarrollo larvario requiere aproximadamente cuatro días a 20°C y tres días a 27°C. El desarrollo de la pupa toma aproximadamente 10 días a 21 °C y 7 días a 27 °C, después de lo cual emerge la mosca adulta.

Para el caso de Costa Rica ocho especies de califóridos se encuentran con frecuencia en cuerpos humanos: *L. eximia*, *L. purpurescens*, *Cochliomyia macellaria*, *Hemilucilia segmentaria*, *H. semidiaphana*, *Chrysomya megacephala*, *C. rufifacies* y *Calliphora irazuana* (Vargas & Wood 2010). Destacando *L. eximia* como una de las especies más frecuentes en cuerpos. En el Neotrópico *L. eximia* se encuentra en Argentina, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, México, Panamá, Perú, Puerto Rico, Guyana y Venezuela (Carvalho & Mello-Patiu 2008). Es una especie neártica y neotropical comúnmente encontrada en áreas urbanas, que se alimenta primariamente de carroña, pero también de frutas y desechos urbanos (Hall 1948), en Costa Rica se encuentra frecuentemente en zonas bajas (Vargas 1999).

La única referencia encontrada sobre la duración del ciclo de vida de *L. eximia* es dada por Vargas (1999) y solamente se indica que el mismo tiene una duración aproximada de 22 a 23 días, a una temperatura de 25 °C, con aproximadamente 13 horas de huevo, 7 días de larva y 15 días de pupa. Por lo que, se carece de una comprensión detallada del desarrollo de esta especie y no se encuentran registros precisos de la duración de su ciclo de vida o de las variaciones del mismo. Por otra parte, Elizondo-Delgado *et al.* (2019) estudiaron en el país la determinación del intervalo *post mortem* utilizando la especie *L. eximia*, pero basados en un modelo de acumulación térmica.

Los modelos de acumulación térmica se fundamentan en que los insectos requieren una cantidad constante de acumulación de calor para alcanzar determinadas etapas de su desarrollo, esta información se ha utilizado para estimar el IPM mediante el cálculo de la acumulación de grados-día o grados-hora necesarios para alcanzar un punto específico del desarrollo (Arnott & Turner 2008). Para cada especie de insecto la temperatura bajo la cual

no ocurre ningún desarrollo medible se denomina umbral de desarrollo y la cantidad de calor requerida para que se complete algún aspecto de su desarrollo es considerada una constante térmica; se ha demostrado que el umbral de desarrollo y la constante térmica pueden ser útiles indicadores de la distribución, abundancia y desarrollo de un insecto (Campbell *et al.* 1974). Los valores de grados-día interpretan la acumulación de calor (Murray 2008), un grado día se da cuando la temperatura promedio de un día es mayor que el umbral de desarrollo y las acumulaciones diarias de grados día pueden ser sumadas en un periodo de tiempo y ser utilizadas para predecir el desarrollo del insecto (Townsend *et al.* 2010).

En su estudio Elizondo-Delgado *et al.* (2019) criaron larvas *L. eximia* a una temperatura controlada de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, con una humedad relativa del 100% y un fotoperiodo de 12 horas. Registraron el tiempo que tardaron los huevos en eclosionar y el tiempo que le tomó a las larvas experimentar un cambio de fase hasta el estadio adulto, con estos datos calcularon la inversión de grados-hora requeridos para cada cambio de fase (para el cálculo utilizaron una temperatura umbral de 8°C) y generaron una ecuación de regresión lineal para el cálculo del PMI. Además, colocaron dos cádaveres de cerdo expuestos al ambiente y partir de estos colectaron larvas de *L. eximia* a las 78, 144 y 192 horas posteriores a la colocación de los cuerpos, por último desarrollaron las larvas en condiciones controladas y calcularon el IPM con la ecuación obtenida anteriormente. Según sus resultados el modelo de acumulación térmica brindó información precisa sobre el IPM solamente con las muestras de 144 horas.

Dada la complejidad del desarrollo de un insecto y los factores que pueden influir en el mismo, los estudios basados en modelos de acumulación térmica no proveen estimaciones precisas del tiempo transcurrido después de la muerte, excepto en aquellos casos o situaciones donde se cuente con datos muy detallados de la temperatura a la que se encontraban las larvas durante todo su desarrollo (Higley & Haskell 2009). Asimismo, este método requiere que las larvas encontradas en un cuerpo sean enviadas vivas al laboratorio para determinar los grados-hora o grados-día requeridos para un cambio de fase y determinar el tiempo de desarrollo que presentaban los individuos, controlando además la temperatura a la que se encontraban los mismos desde su recolección en el campo y hasta su llegada al laboratorio. Por lo que la utilización de esta metodología no es aún factible en el país y las delegaciones policiales no cuentan con los recursos necesarios para el transporte y manejo adecuado de muestras entomológicas vivas.

La investigación de la entomología forense en Costa Rica se ha desarrollado en la Sección de Biología del Departamento de Ciencias Forenses del Organismo de Investigación Judicial desde 1998. En la sección se han realizado curvas de crecimiento longitudinal para algunas especies de importancia forense, sin embargo, no se cuenta con datos de referencia para todas las especies encontradas en cuerpos humanos en el país, incluida *L. eximia*. Además, que no se contaba con las condiciones de laboratorio ideales para controlar la temperatura a cual se da el desarrollo, no obstante, el laboratorio invirtió recientemente en la compra de equipo que posibilita el estudio de las larvas en base a variables ambientales controladas, para así asegurar que los resultados emitidos en la sección sobre la determinación del PMI son válidos y confiables.

3. Justificación

El estudio de la fauna encontrada en un cadáver constituye la aplicación más importante de la entomología forense. La edad de un insecto encontrado en un cuerpo, especialmente de las etapas inmaduras, proporcionan evidencia para la estimación del tiempo de muerte, variando según la especie de insecto involucrado y sobre todo de las condiciones climáticas registradas en la escena de la muerte (Wall *et al.* 1992). El conocimiento de los factores que inhiben o favorecen la colonización y el crecimiento de las diversas especies de dípteros es un requerimiento necesario para la estimación correcta del tiempo de muerte (Goff *et al.* 1988). La duración del desarrollo varía según la especie, principalmente sobre bases genéticas, pero a pesar de esto la temperatura es la variable más importante para determinar la tasa de desarrollo (Campobasso *et al.* 2001). El estudio de los ciclos de vida de las diferentes especies y las variaciones del mismo, aportan datos valiosos para incrementar la exactitud de las estimaciones del PMI, para el esclarecimiento de los casos forenses y la agilización del tiempo requerido para los análisis en las pericias médico-legales (Amat *et al.* 2008).

Existen muchos estudios sobre la duración del ciclo de vida y el desarrollo de las etapas inmaduras de los principales dípteros considerados de importancia forense y utilizados en investigaciones criminales en Norte América. Sin embargo, todavía se carece de una comprensión detallada del desarrollo de las poblaciones de las principales especies forenses encontradas en Costa Rica. Además, si bien existen estudios sobre la tasa de desarrollo de varias especies de *Lucilia*, no se han reportado investigaciones sobre el ciclo de vida de *L. eximia*. Por otra parte, debido al reciente aumento en el uso de la entomología forense en el país y la importancia de comprender la tasa de desarrollo en relación con la temperatura, se hace necesario contar con datos detallados que permitan estimaciones más precisas del intervalo *post mortem*. Por lo que el presente trabajo pretende analizar el desarrollo de *L. eximia* a diferentes temperaturas con el fin de proporcionar una base para la estimación del tiempo de muerte basado en esta especie.

4. Objetivos

4.1. *Objetivo general:* Estudiar la biología de los estadios inmaduros de la mosca de interés forense *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae) con el fin de obtener los datos necesarios para estimar el tiempo transcurrido después de la muerte de cuerpos humanos en estado de descomposición recolectados por el Organismo de Investigación Judicial.

4.2. *Objetivos específicos*

- Estudiar la duración del desarrollo de los estadios inmaduros de *L. eximia* a tres distintas temperaturas (20, 25 y 30°C), con el fin de construir curvas de crecimiento longitudinal que podrían ser utilizadas como un indicador del intervalo *post mortem*.
- Crear un procedimiento de operación normado específico para la Sección de Biología Forense que pueda ser utilizado para la cría de dípteros de interés forense y para la creación de curvas de crecimiento longitudinal.

5. Metodología

5.1. Lugar de estudio.

La investigación se llevó a cabo en la Sección de Biología del Departamento de Ciencias Forenses del Organismo de Investigación Judicial, ubicados en San Joaquín de Flores, Heredia, Costa Rica (10°00'14'' N, 84°09'51'' O; elevación 1028 msnm). La captura de moscas adultas se realizó en una zona verde de las instalaciones y posteriormente la obtención de datos se llevó a cabo en el laboratorio, donde se realizó la cría de larvas y medición de las mismas. Se realizaron cuatro capturas de individuos adultos, entre los meses de agosto y octubre del 2018. Todo el procedimiento de captura y cría de larvas se realizó hasta obtener tres replicadas para cada una de las temperatura estudiadas.

5.2. Obtención de individuos adultos de *L. eximia*.

La captura de especímenes adultos se realizó mediante la utilización de una trampa con cebo que atrae a los individuos por olor. Se utilizaron trampas de suelo, como las descritas por Morales (2014), que consisten en cajas de madera de 40x35x10 cm, con cedazo en el fondo y con una tapa, igualmente cubierta de cedazo, conteniendo un trozo de papel aluminio y sobre este 300 gramos de carne de res en descomposición (Anexo 1). Esta caja se colocó en el sitio de muestreo por aproximadamente una hora, hasta observar individuos adultos de *L. eximia*. Posteriormente se procedió a la captura de los mismos mediante el uso de redes entomológicas, los adultos capturados se sacaron de la red uno por uno utilizando tubos de ensayo transparentes, que permitían observar el individuo para su identificación preliminar por morfoespecie y su clasificación por sexo.

Los adultos seleccionados se colocaron en cajas para la cría de moscas adultas marca BugDorm, las cuales consisten en cajas de 30x30x30 cm, con soporte plástico y malla en sus costados, además la caja cuenta con una manga de tela que facilita la introducción y extracción de individuos (Anexo 2). En cada caja se colocaron un máximo de 20 individuos y en cada una se depositaron tanto hembras como machos, estos últimos en menor cantidad. Una vez capturadas como mínimo 20 moscas adultas, las cajas de cría se trasladaron al laboratorio, donde se colocaron por un minuto en un congelador entre -5 y 0 °C, para inducir un estado de letargo en los individuos y proceder con la identificación taxonómica, utilizando las claves elaboradas por Morales (2014). Una vez identificados todos los individuos se

trasladaron nuevamente a la caja de cría. Para obtener masas de huevos dentro de la caja con adultos se colocó una caja petri con 10 gramos de carne de res, expuesta a temperatura ambiente por 24 horas previas, esta como sustrato para la oviposición. La carne se revisó cada media hora a fin de determinar el momento de la oviposición de los huevos.

5.3. Crecimiento de larvas a temperatura constante.

Las masas de huevos obtenidas de las cajas con adultos se trasladaron a una caja de cría para larvas, las cuales consisten en un recipiente de vidrio de 18x12x6 cm, con una tapa plástica que fue cortada en la parte superior y se le colocó una tela delgada, tipo pantimedia. El fondo de los contenedores contenía 150 gramos de vermiculita, para proveer un sustrato seco que permita la pupación, pues las larvas pueden retardar la pupación en condiciones desfavorables. Sobre el sustrato de vermiculita se colocó un trozo de papel aluminio y sobre este 300 gramos de carne de res a temperatura ambiente (Anexo 2).

En cada caja de cría se colocó una masa de huevos sobre la carne y de inmediato los recipientes se colocaron en una cámara de ambiente controlado Panasonic MLR-352H (Anexo 3), programada a una de las temperaturas deseadas (20, 25 ó 30 °C). Las cámaras se programaron con una temperatura constante, con una humedad relativa de 80% y un fotoperiodo de 12:12 (D:N) horas. La temperatura de las cámaras se verificó mediante la colocación de un registrador de datos de temperatura, marca Testo, modelo 174H, el cual se configuró para archivar los datos de la temperatura cada hora. Al finalizar la cría de las larvas se inspeccionaron los datos registrados, para así garantizar que las incubadoras mantuvieran las temperaturas predeterminadas.

Una vez colocadas en la cámara de ambiente controlado las cajas de cría se revisaron cada tres horas, cinco veces al día, con el fin de determinar el momento de eclosión de los huevos, al detectar la eclosión se procedió a sacrificar tres larvas. A partir de este primer sacrificio se continuo con los mismos, extrayendo muestras cada tres horas entre las 7 a.m. y las 7 p.m., para un total de cinco sacrificios al día. Este procedimiento se realizó durante todo el desarrollo de las larvas y se finalizó al observar la aparición de las primeras pupas. Los sacrificios fueron realizados hirviendo las larvas en agua por un minuto y seguidamente se preservaron en solución FAA (formalina 35%, alcohol etílico 95%, ácido acético glacial y agua destilada, 6:15:2:30). Todos los individuos sacrificados se colocaron en viales de vidrio identificados con la fecha, hora del sacrificio y temperatura de crecimiento.

Al mismo tiempo, al realizar cada revisión de las cajas de cría, se observó el comportamiento de las larvas, al notar que estas pierden el interés en el consumo de la carne y reptan por la caja buscando un sitio para pupar, se retiró el papel aluminio con la carne y se colocó un nuevo trozo de papel aluminio limpio que cubra el sustrato de vermiculita, con el fin de que las larvas puedan terminar de efectuar la pupación. Posteriormente, al revisar las cajas todas las pupas encontradas en el sustrato se trasladaron a una caja para la cría de pupas, la cual consiste en dos contenedores plásticos conectados entre sí por un embudo (las pupas se colocan en la parte inferior, al emerger los adultos estos se trasladan a la parte superior de la caja a través del embudo; Anexo 2). La caja de cría con pupas también fue colocada en la cámara de ambiente controlado respectiva y se revisó cinco veces al día para detectar el momento en el cual emergen los adultos.

5.4. Análisis y medición de individuos.

Todas las larvas sacrificadas fueron observadas utilizando un estereoscopio ZEISS Discovery V8 y se clasificaron según su estadio de desarrollo en: primer estadio (L1), segundo estadio (L2) y tercer estadio (L3); esto según el número de fisuras presentes en el espiráculo posterior (Wang *et al.* 2016). Además, las larvas en tercer estadio que migran hacia el sustrato de pupación se clasificaron como larvas en fase de post alimentación. La longitud total de cada individuo fue determinada utilizando un pie de rey digital marca Mitutoyo (exactitud de medida 0.01 mm). Todas las mediciones de cada uno de los individuos se realizó por triplicado, entre los extremos anterior y posterior de la larva, tratando de que el cuerpo del espécimen estuviera en una posición lineal, sin generar fuerza que lo sobreestire o modifique su tamaño real. Se determinó el promedio de longitud para cada una de las larvas y posteriormente para cada tratamiento según las horas de desarrollo. Además, con el tiempo total de desarrollo y la duración de cada uno de los estadios de desarrollo de las larvas se determinó el porcentaje promedio de tiempo de cada una de estas etapas.

5.5. Análisis estadístico.

Se construyeron curvas de crecimiento longitudinal con los datos obtenidos a partir de la longitud promedio de las larvas (mm) durante su tiempo de desarrollo (horas), las curvas solamente incluyeron la fase de crecimiento, se excluyó la fase de post alimentación o deambulacion de las larvas. La relación entre la longitud del cuerpo de la larva y el tiempo de desarrollo se analizó mediante modelos de regresión lineal determinada a través del criterio de mínimos cuadrados con ponderación sencilla para las variables horas de desarrollo versus milímetros de longitud. Además, se utilizó un análisis de varianza de dos factores para determinar diferencias en el porcentaje de tiempo destinado del desarrollo a cada uno de los estadios de larvales para cada uno de los tratamientos. Los análisis se llevaron a cabo utilizando Microsoft Excel® 2019.

5.6. Elaboración de un procedimiento específico para la Sección de Biología Forense

Se elaboró un procedimiento normado específico para su uso en la Unidad de Zoología Forense de la Sección de Biología, Departamento de Ciencias Forenses, Organismo de Investigación Judicial. El procedimiento detalla los pasos a seguir para la cría de dípteros de interés forense y la construcción de curvas de crecimiento longitudinal para su uso en la determinación del tiempo de muerte (Anexo 4). El mismo se elaboró según las normativas establecidas por el Departamento de Ciencias Forenses para la elaboración de procedimientos.

6. Resultados

6.1. Desarrollo de *L. eximia* a 20 °C

La cámara de ambiente controlado utilizada para la cría de las larvas se mantuvo en promedio a 20.1 ± 0.4 °C, la menor temperatura registrada fue de 19.6°C y la máxima de 21.2°C. Los datos obtenidos muestran el incremento esperado en el tamaño de las larvas después de la eclosión de los huevos y se observa que la longitud de los individuos aumentó con el tiempo. El incremento en el tamaño de las larvas, correspondiente a la fase de crecimiento, se dio por cuatro días alcanzando una meseta en el desarrollo (Fig. 1). Luego de este punto se registra una disminución en la longitud, lo que indica el inicio del intervalo posterior a la alimentación, en el cual las larvas migran de la fuente de alimento en busca de un sitio de pupación. Las larvas se observaron en el sustrato para la pupación al iniciar el día cinco, con un total de 111 ± 4 horas de desarrollo (Fig. 1).

En promedio el desarrollo de las larvas del primer al tercer estadio (L1, L2 y L3) se completó en 99 ± 4 horas y las larvas de tercer estadio en fase de post alimentación requirieron de 81 ± 4 horas para completar su desarrollo y pupar (Cuadro 1). El desarrollo total de las larvas, desde la eclosión de los huevos hasta la pupación, se completó en un periodo de aproximadamente 180 ± 4 horas. Se observaron pupas en el día 10 y los adultos emergieron en aproximadamente 177 ± 4 horas (Cuadro 1). La longitud máxima de las larvas se registró el día cuatro, con un total de 90 ± 4 horas de desarrollo, alcanzando en promedio 14.46 ± 0.29 mm (Fig. 1).

La curva de crecimiento realizada muestra la variable longitud (mm) a lo largo del tiempo (horas), durante la fase de crecimiento de las larvas (Fig. 2). El modelo ajustado para la variable longitud correspondió a parámetros lineales que se definen como: $\hat{L} = 3.012 + 0.1339 t$, donde \hat{L} : longitud, t: tiempo de desarrollo. Durante la fase de crecimiento se muestreo un total de 198 larvas (66 larvas por réplica).

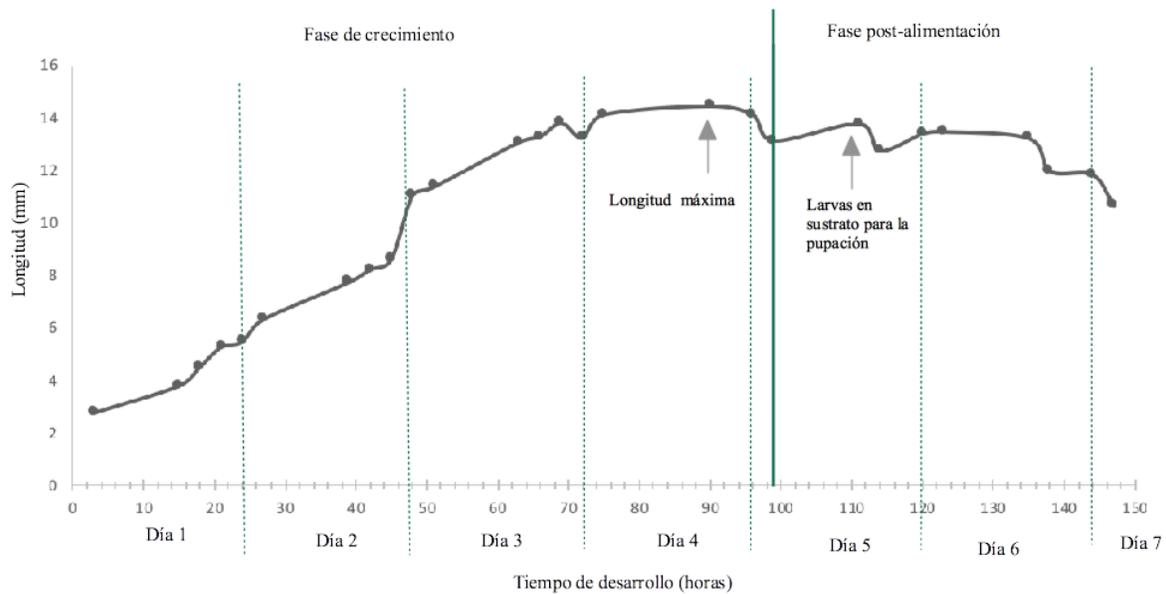


Figura 1. Desarrollo de *L. eximia* a una temperatura constante de 20 °C, se muestra la variable longitud a lo largo del tiempo (horas y días de desarrollo).

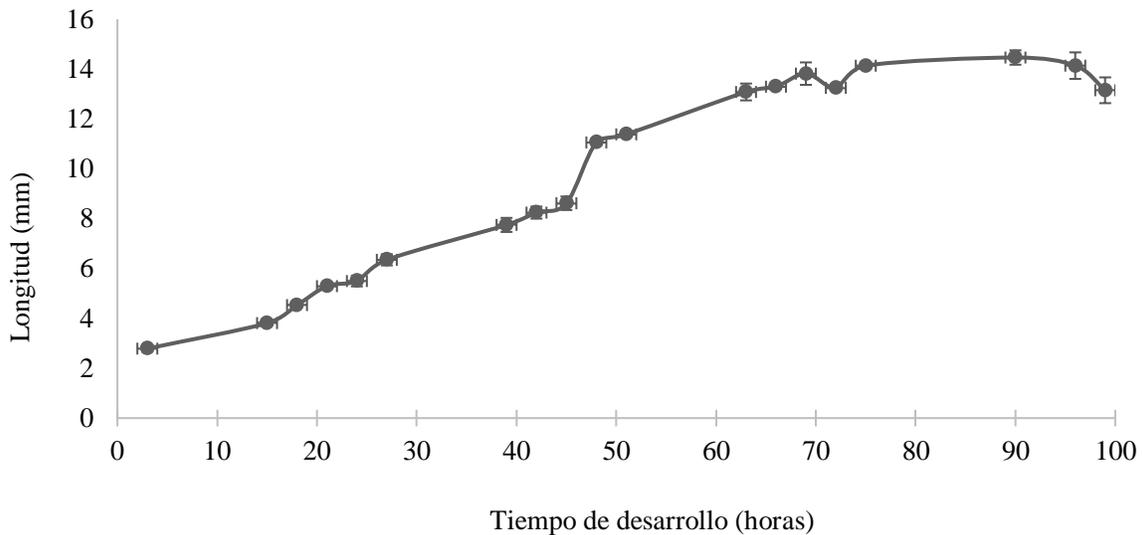


Figura 2. Curva de crecimiento de *L. eximia* a una temperatura de 20 °C, se muestra la variable longitud a lo largo del tiempo (promedio longitud y desviación estándar). El modelo ajustado para esta variable correspondió a parámetros lineales que se definen como: $\hat{L} = 3.012 + 0.1339 t$, donde \hat{L} : longitud, t : tiempo de desarrollo. Coeficiente de determinación $R^2=0.96$. La curva corresponde a la fase de crecimiento de las larvas.

6.2. Desarrollo de *L. eximia* a 25 °C

La cámara de ambiente controlado utilizada para la cría, se mantuvo en promedio a 24.9 ± 0.2 °C, la menor temperatura registrada fue de 24.6 °C y la máxima de 25.4 °C. Los datos obtenidos muestran el incremento esperado en el tamaño de las larvas después de la eclosión de los huevos y se observa un incremento en la longitud de los individuos al aumentar el tiempo de desarrollo. El incremento en el tamaño de las larvas, correspondiente a la fase de crecimiento, se observó en los primeros tres días y se alcanzó una meseta en el desarrollo (Fig. 3). Luego de este punto se registra una disminución en la longitud, lo que indica el inicio del intervalo posterior a la alimentación, en el cual las larvas migran de la fuente de alimento en busca de un sitio de pupación. La migración de las larvas en busca de un sitio de pupación fue observado al finalizar el día tres, con un total de 63 ± 7 horas de desarrollo (Fig. 3).

En promedio las larvas del primer al tercer estadio (L1, L2 y L3) completaron su desarrollo en 60 ± 7 horas y las larvas de tercer estadio en fase de post alimentación requirieron de 54 ± 7 horas para completar su desarrollo (Cuadro 1). El desarrollo total de las larvas, desde la eclosión de los huevos hasta la pupación, se completó en un periodo de aproximadamente 114 ± 7 horas. Se observaron las primeras pupas al finalizar el día cinco, mas no se observó la salida de adultos (Cuadro 1). La longitud máxima de las larvas se registró en el tercer día, con un total de 57 ± 7 horas de desarrollo, alcanzando en promedio 13.82 ± 0.29 mm (Fig. 3).

La curva de crecimiento realizada muestra la variable longitud (mm) a lo largo del tiempo (horas), durante la fase de crecimiento de las larvas (Fig. 4). El modelo ajustado para esta variable correspondió a parámetros lineales que se definen como: $\hat{L} = 5.907 + 0.1083 t$, donde \hat{L} : longitud, t: tiempo de desarrollo. Durante la fase de crecimiento se midieron un total de 135 larvas (45 larvas por réplica).

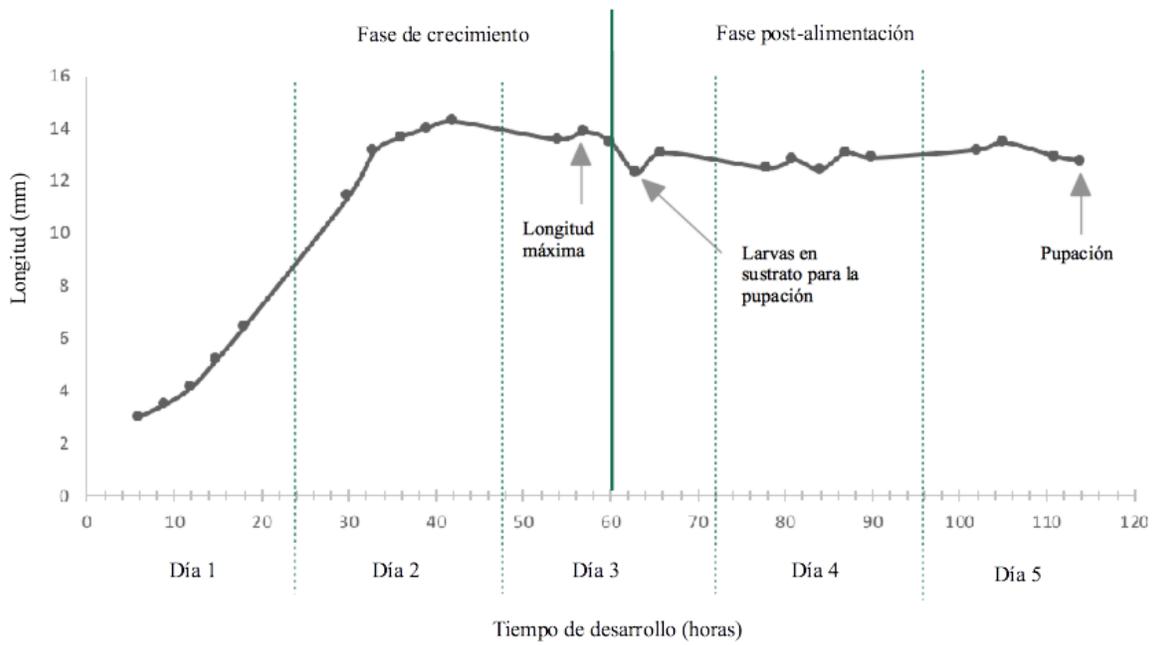


Figura 3. Desarrollo de *L. eximia* a una temperatura constante de 25 °C, se muestra la variable longitud a lo largo del tiempo (horas y días de desarrollo).

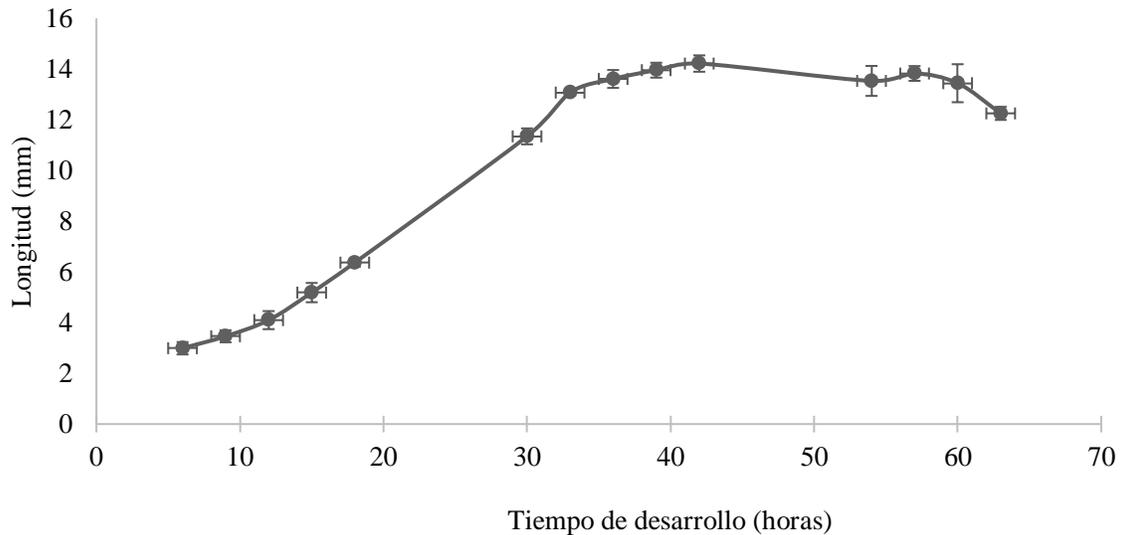


Figura 4. Curva de crecimiento de *L. eximia* a una temperatura de 25 °C, se muestra la variable longitud a lo largo del tiempo (promedio de longitud y desviación estándar). El modelo ajustado para esta variable correspondió a parámetros lineales que se definen como: $\hat{L} = 5.907 + 0.1083 t$, donde \hat{L} : longitud, t : tiempo de desarrollo. Coeficiente de determinación $R^2=0.71$. La curva corresponde a la fase de crecimiento de las larvas.

6.3. Desarrollo de *L. eximia* a 30 °C

La cámara de ambiente controlado utilizada para la cría se mantuvo en promedio a 29.4 ± 0.5 °C, la menor temperatura registrada fue de 27.8 °C y la máxima 30.6 °C. Los datos obtenidos muestran el incremento esperado en el tamaño de las larvas después de la eclosión de los huevos y se observa que la longitud de los individuos aumentó con el tiempo. El incremento en el tamaño de las larvas, correspondiente a la fase de crecimiento, se observó durante los dos primeros días y posteriormente se alcanzó una meseta en el desarrollo (Fig. 5), lo que indica el inicio del intervalo posterior a la alimentación, en el cual las larvas migran de la fuente de alimento en busca de un sitio de pupación. Las larvas se observaron en el sustrato para la pupación en el inicio del día tres, con un total de 61 ± 10 horas de desarrollo (Fig. 5)

En promedio las larvas del primer al tercer estadio (L1, L2, L3) completaron su desarrollo en 49 ± 7 horas y las larvas de tercer estadio en fase de post alimentación requirieron de 60 ± 7 horas para completar su desarrollo (Cuadro 1). El desarrollo total de las larvas, desde la eclosión de los huevos hasta la pupación, se completó en un periodo de aproximadamente 109 ± 7 horas. Se observaron pupas en el día cinco, mas no se observó la salida de adultos (Cuadro 1). La longitud máxima de las larvas se registró el día dos, con un total de 40 ± 10 horas de desarrollo, alcanzando en promedio 13.98 ± 0.44 mm (Fig. 5).

La curva de crecimiento realizada muestra la variable longitud (mm) a lo largo del tiempo (horas), durante la fase de crecimiento de las larvas (Fig. 6). El modelo ajustado para esta variable correspondió a parámetros lineales que se definen como: $\hat{L} = 2.592 + 0.2330 t$, donde \hat{L} : longitud, t: tiempo de desarrollo. En total durante la fase de crecimiento se midió la longitud de 99 larvas (33 larvas por réplica).

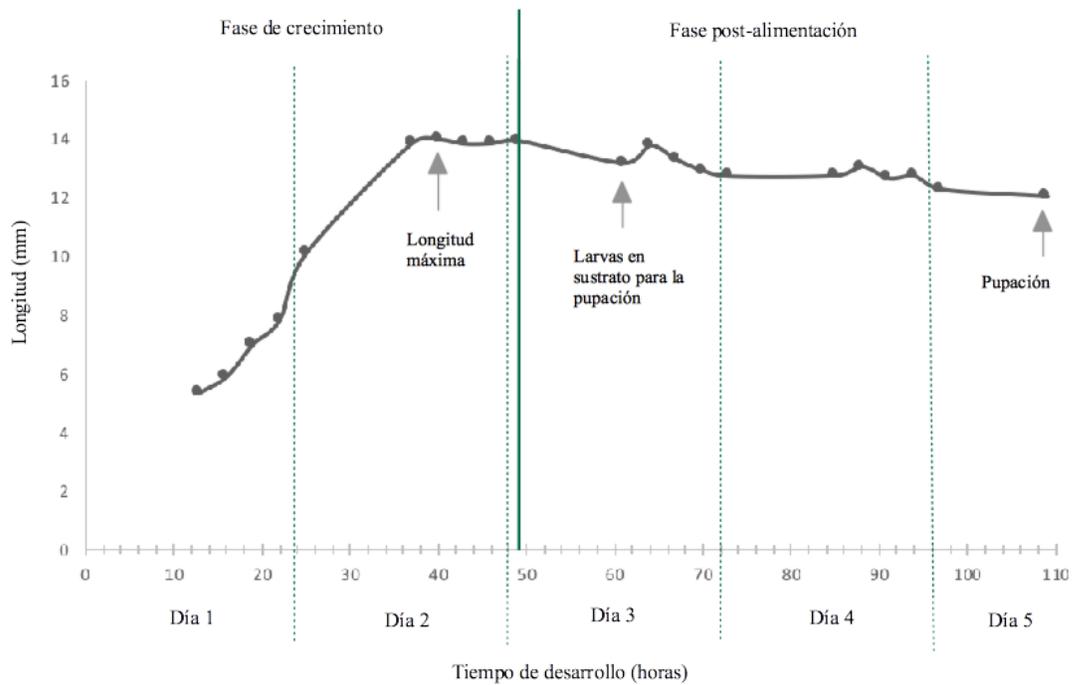


Figura 5. Desarrollo de *L. eximia* a una temperatura constante de 30 °C, se muestra la variable longitud a lo largo del tiempo (horas y días de desarrollo).

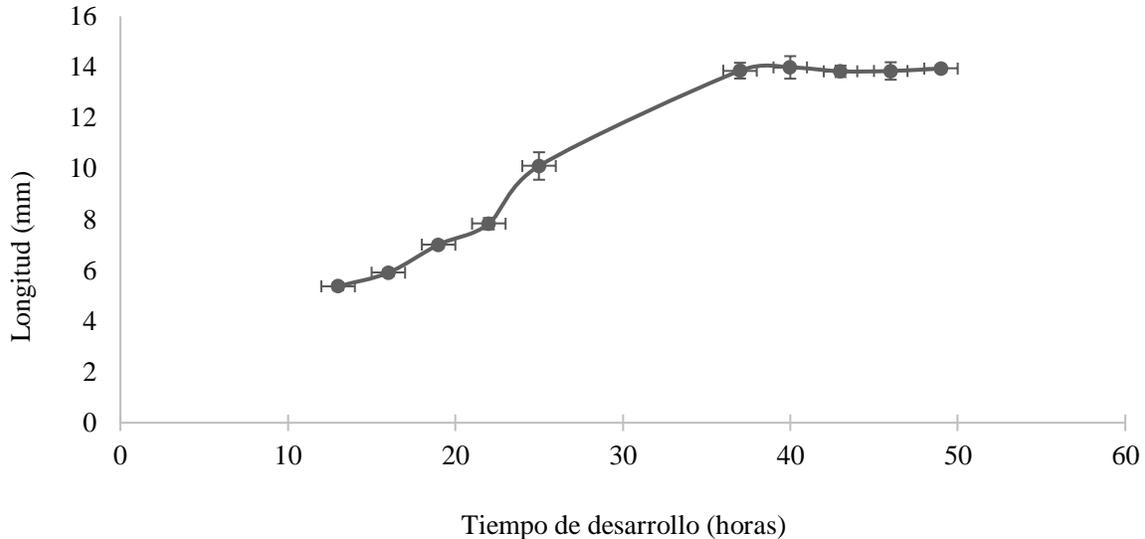


Figura 6. Curva de crecimiento de *L. eximia* a una temperatura de 30 °C, se muestra la longitud a lo largo del tiempo (promedio de la longitud y desviación estándar). El modelo ajustado para esta variable correspondió a parámetros lineales que se definen como: $\hat{L} = 2.592 + 0.2330 t$, donde \hat{L} : longitud, t: tiempo de desarrollo. Coeficiente de determinación $R^2=0.82$. La curva corresponde a la fase de crecimiento de las larvas.

Cuadro 1. Duración media del desarrollo de los estadios inmaduros de *L. eximia* a temperaturas constantes de 20, 25 y 30 °C.

Temperatura (°C)	Huevo	L1-L2-L3	Post alimentación	Pupa	Total desarrollo larval
20	18 ±4	99 ±4	81 ±4	177 ±4	180 ±4
25	14 ±7	60 ±7	54 ±7	-	114 ±7
30	10 ±7	49 ±7	60 ±7	-	109 ±7

6.4. Comparación del desarrollo de *L. eximia* a diferentes temperaturas

La duración total del desarrollo de las larvas de *L. eximia* a 20, 25 y 30 °C, desde la eclosión de los huevos hasta la pupación, tuvo una duración de 180 ± 4 , 114 ± 7 y 109 ± 7 horas, respectivamente (Cuadro 1); lo cual indica que el tiempo de desarrollo disminuye a medida que se aumenta la temperatura. En adición a estos estudios en los que se logró observar el desarrollo completo de los estadios inmaduros de *L. eximia*, se intentó realizar la cría de larvas a una temperatura de 35 °C, sin embargo, en las tres repeticiones realizadas los huevos no eclosionaron, por lo que se registra una supervivencia nula del huevo a esta temperatura.

Las curvas de crecimiento para cada temperatura y las ecuaciones asociadas a cada una muestran los cambios en la longitud del cuerpo de las larvas a lo largo del tiempo (Fig. 2, 4 y 6). Además, los datos obtenidos por el análisis de regresión muestran un buen ajuste utilizando los valores de coeficiente de determinación (R^2), F y P (Cuadro 2). El modelo ajustado de cada una de las curvas para la variable longitud (mm) corresponden a parámetros lineales que se definen como: $\hat{L} = \text{intercepto} + \text{pendiente} * t$, donde \hat{L} : longitud, t: tiempo de desarrollo. Las ecuaciones obtenidas para cada una de las curvas de crecimiento se encuentran en el Cuadro 2.

Se observó una variación discreta en los intervalos de las diferentes etapas de los estadios inmaduros a las diferentes temperaturas estudiadas. Por ejemplo, en las larvas expuestas a una temperatura de 20 °C el inicio del tercer estadio larval post alimentación se observó a las 111 ± 4 horas de desarrollo, a 25 °C se observó a 63 ± 7 horas y en las larvas desarrolladas a 30 °C se observó a las 61 ± 7 horas. Pero no existen diferencias significativas entre el porcentaje del tiempo total de desarrollo de las larvas destinado al desarrollo de la fase de crecimiento y a la fase post alimentación para cada uno de los tratamientos estudiados ($F_{(2/5)}=18.51$, $p=0.65$, Fig. 7).

Cuadro 2. Ecuaciones de simulación, valores F, valores P, coeficiente de determinación (R^2) e incerteza asociada a cada una de las curvas de crecimiento que describen la relación entre la longitud corporal (mm) de las larvas de *L. eximia* y el tiempo después de la eclosión (h), durante la fase de crecimiento de las larvas a tres temperaturas constantes.

Temperatura	Ecuación	R^2	F	P	Incerteza (horas)	n
20 °C	$\hat{L} = 1.574 + 0.1221 t$	0.96	24.3	$p < 0.005$	0,007	198
25 °C	$\hat{L} = 5.907 + 0.1083 t$	0.71	2.7	$p < 0.005$	0,025	135
30 °C	$\hat{L} = 2.592 + 0.2330 t$	0.82	4.5	$p < 0.005$	0,02	99

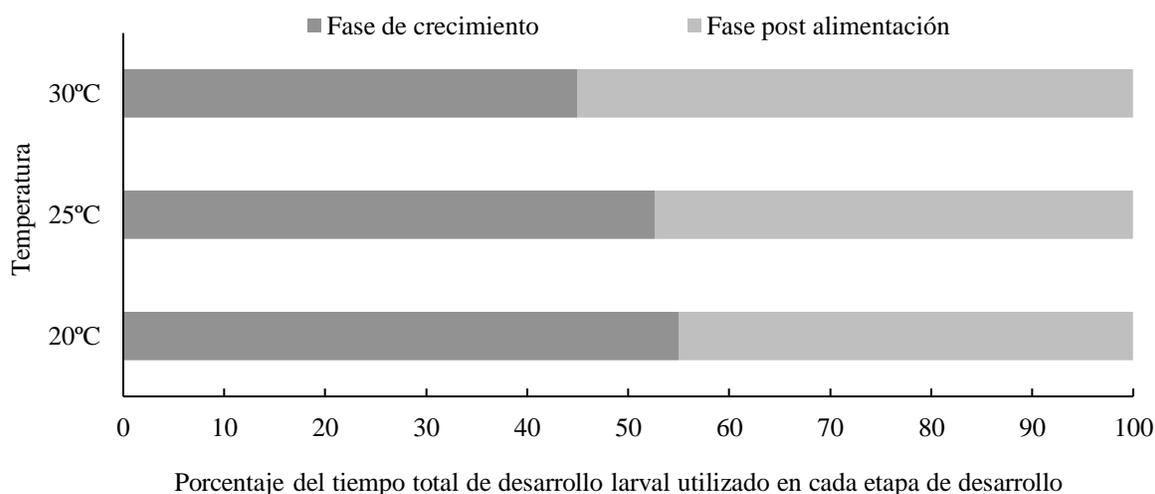


Figura7. Porcentaje del tiempo total de desarrollo larval que fue utilizado en el desarrollo de las larvas en la fase de crecimiento y en el desarrollo de las larvas en fase post alimentación, para cada uno de los tratamientos estudiados. No existen diferencias significativas entre el porcentaje del tiempo total de desarrollo de las larvas destinado al desarrollo de cada una de estas etapas ($F_{(2/5)}=18.51$, $p=0.65$).

7. Discusión

Es un hecho bien conocido que el desarrollo de los insectos depende de la temperatura, ya que la tasa metabólica normal aumenta con el incremento en la misma, lo que resulta en un desarrollo más rápido, que disminuye de manera lineal al aumentar la temperatura (Anderson 2000). En este estudio, se observó que la temperatura a la que se encuentran las larvas de *L. eximia* durante su crecimiento es un factor determinante en la duración del desarrollo, pues este se acelera con el aumento de la misma. Se observó que el desarrollo y crecimiento de las larvas, desde el momento de la eclosión de los huevos hasta la pupación, tomó 71 horas más en la temperatura más baja analizada en comparación con la temperatura más alta (Cuadro 1). A partir de los datos obtenidos en esta investigación se proporcionan curvas de crecimiento a tres temperaturas constantes 20 °C, 25 °C y 30 °C, que muestran el cambio de la longitud del cuerpo de las larvas de *L. eximia* a lo largo del tiempo (Fig. 2, 4 y 6).

Estos modelos de desarrollo pueden ser utilizados para estimar el PMI en investigaciones sobre muertes dudosas, sobre todo en cadáveres encontrados en una zona donde la temperatura ambiental promedio es cercana a las temperaturas estudiadas y cuando las larvas de *L. eximia* recolectadas en el cuerpo se encuentran en fase de alimentación. Si las larvas que se encuentran en el cadáver entraron en la fase de post alimentación las curvas de crecimiento no son el modelo más adecuado, ya que la relación entre el tiempo de desarrollo y la temperatura tiende a no ser lineal a medida que se aproxima a los umbrales máximo y mínimo de desarrollo de las larvas (Greenberg & Kunich 2002). Según Amendt *et al.* (2004) la relación entre la tasa de desarrollo y la temperatura es lineal en el rango medio de una curva, con un umbral superior e inferior por debajo del cual cesa el desarrollo.

El tiempo de desarrollo que posee una muestra de larvas recolectadas de un cuerpo se determina a partir de la longitud promedio de larvas con horas de desarrollo conocidas, mediante curvas de crecimiento elaboradas en condiciones de laboratorio controladas (Boatright & Tomberlin 2010; Baqué *et al.* 2015). De esta manera, se obtienen ecuaciones de regresión lineal que asocian la longitud de las larvas con las horas de desarrollo, las mismas se describen a través de una ecuación de regresión lineal que según el método de mínimos cuadrados tienen la forma: $y = b_0 + b_1 x$. En este caso “y” es el valor sobre el eje vertical representado por la longitud (variable dependiente), “x” es un valor sobre el eje

horizontal representado por las horas de desarrollo (variable independiente), b_0 es el punto donde la recta cruza el eje vertical y b_1 es la pendiente de la recta: el cambio medio que se produce en “y” por cada unidad de cambio que se produce en “x”. Por lo que, la curva de crecimiento se representa mediante la ecuación: $\text{Longitud} = b_0 + b_1 * \text{Tiempo de desarrollo}$ (Cuadro 2). En consecuencia, el tiempo de desarrollo de larvas de una muestra recolectada en un cuerpo se pueden obtener de la ecuación anterior despejando la variable desarrollo, donde: $\text{Tiempo de desarrollo} = (\text{Longitud} - b_0) / b_1$.

Es importante resaltar que la utilidad de las curvas de crecimiento depende de la historia térmica a la cual estuvieron expuestas las larvas y, para ser utilizadas, requieren de la evaluación de los datos de temperatura tanto de la escena de la muerte, como del cadáver y de las masas de larvas en el cuerpo. Todos estos datos deben compararse con los datos sobre la temperatura ambiental de la estación meteorológica más cercana y si son similares estos últimos pueden utilizarse para extrapolar las temperaturas en la escena del crimen (Amendt *et al.* 2004; Sukontason *et al.* 2008). Igualmente, se debe tomar en cuenta que si se utilizan estimaciones de la temperatura ambiente para calcular las tasas de desarrollo los datos no son necesariamente representativos de las temperaturas experimentadas por las larvas en el cadáver (Wells & LaMotte 1995). Por otra parte, Anderson (2000) indica que los datos de laboratorio generados a temperaturas constantes, son un indicador confiable de las tasas de desarrollo de las larvas que se encuentran en condiciones naturales con temperaturas fluctuantes. En muchas especies de insectos se ha demostrado que las tasas de desarrollo son las mismas a temperaturas constantes y a temperaturas fluctuantes, cuando las primeras representan la media de las temperaturas ambientales.

Según Wang *et al.* (2016) las larvas de dípteros tienen un comportamiento gregario y difícilmente pueden criarse individualmente, pues necesitan condiciones de crianza específicas que no afecten su desarrollo, el cual es perturbado tanto por factores bióticos como abióticos. Por ejemplo, las larvas que no posean suficiente alimento crecen a un mayor ritmo y emergen como adultos más pequeños, las larvas que experimentan niveles altos de humedad pasarán más tiempo alrededor de la fuente de alimento y por el contrario los bajos niveles de humedad conducirán a la desecación de los alimentos, al crecimiento anormal y muerte de las larvas. Por el contrario, demasiado alimento puede producir agua, materia en descomposición y un fuerte olor, lo que podría causar un desarrollo retardado e incluso la

muerte de las larvas. Además, si la población es grande pueden producirse masas de larvas que aumentan la temperatura y aceleran el desarrollo. De igual forma, el crecimiento también puede verse afectado por la manipulación del medio de cría y/o la toma de muestras con demasiada frecuencia.

Durante la presente investigación, se controló cuidadosamente el entorno del medio en el cual se desarrollaban las larvas, mediante la utilización de cajas de cría para larvas de gran tamaño respecto a la cantidad de individuos que se encontraban en la misma, para así evitar el aumento de la temperatura causada por agregación o masas de larvas. Sin embargo, este efecto debe tenerse en cuenta y considerarse a fondo en los casos forenses, pues algunos cadáveres pueden albergar miles de larvas, aumentando la temperatura a la cual se desarrollan (Niederegger *et al.* 2010). Por otra parte, en este estudio el muestreo y la observación de las cajas de cría se realizó de manera frecuente durante el día, por lo que podría existir un efecto del muestreo en el desarrollo de las larvas. Igualmente, debido al método de muestreo, la cantidad de larvas en la caja de cría disminuye con el tiempo, lo que podría tener un impacto en el comportamiento de la población restante (Niederegger *et al.* 2010), sin embargo, inicialmente la cantidad de larvas ya era pequeña, por lo que el efecto de la disminución de individuos podría considerarse insignificante.

La estimación de la edad de las larvas mediante curvas de crecimiento se realiza relacionando la longitud de un espécimen encontrado en un cadáver con los valores de referencia generados en condiciones de laboratorio. Por lo tanto, la precisión de dichos estudios de referencia son esenciales para la estimación del PMI, sin embargo, se ha observado que varias investigaciones informan diferentes tasas de desarrollo para las mismas especies de importancia forense. Se ha sugerido que estas diferencias podrían ser producto de variaciones en las poblaciones de zonas geográficamente distintas (Catts & Goff 1992; Baqué *et al.* 2015), por lo que resulta de suma importancia contar con información específica de las poblaciones de moscas de importancia forense del país. Los resultados reportados en este estudio proporcionan información útil para que *L. eximia* pueda usarse para calcular el PMI en investigaciones judiciales en el país. Aunque es necesario realizar más estudios considerando un mayor rango de temperaturas, se ha dado un paso hacia una mejor comprensión de la biología y desarrollo de la mosca de importancia forense *L. eximia*.

8. Conclusiones

Como una de las especies de moscas necrófagas más comunes en escenas de muerte en Costa Rica *L. eximia* es un insecto importante para estimar el intervalo *post-mortem*, pues la edad de las larvas encontradas en un cuerpo está estrechamente relacionada con el momento de la muerte. Este estudio proporciona datos sobre el desarrollo de las larvas de esta especie a tres temperaturas constantes, datos necesarios en la Sección de Biología Forense para calcular el PMI en investigaciones judiciales en el país.

La temperatura influyó, como se esperaba, en el tiempo de desarrollo de las larvas de *L. eximia*, observándose una disminución en la duración del desarrollo en condiciones térmicas más altas. La duración total del desarrollo de las larvas a 20, 25 y 30 °C, desde la eclosión de los huevos hasta la pupación, fue de 180 ±4, 114 ±7 y 109 ±7 horas, respectivamente.

Los procedimientos o protocolos estándar en laboratorios que realicen la cría y construcción de curvas de crecimiento de moscas de importancia forense son imprescindibles y deben ser parte de cada estudio realizado, para así descartar efectos en los resultados obtenidos debido al manejo de los individuos o a la cría. Mientras este no sea el caso, los cálculos de PMI son vulnerables a ser cuestionados en los tribunales.

Al estudiar el desarrollo de los estadios inmaduros de las moscas de importancia forense, en general, se debe considerar el efecto de factores abióticos (temperatura, recurso alimentario y el nivel de agregación de las larvas presentes) y como estos pueden afectar directamente el desarrollo y la determinación del intervalo *post mortem*.

9. Recomendaciones

Se recomienda realizar curvas de crecimiento considerando un mayor rango de temperaturas, basándose en la distribución de *L. eximia* en el país. Asimismo, realizar un mayor número de muestreos a lo largo de todo el día para observar la duración exacta de cada uno de los estadios larvales, además de determinar el momento exacto de la eclosión de los huevos. En cuanto a este último punto, se recomienda adicionalmente obtener las masas de huevos a primera hora para realizar el mayor número posible de observaciones y detectar el momento exacto de la eclosión.

Un adecuado control de las condiciones de las cajas de cría en las que se encuentran las larvas es de suma importancia para la determinación del tiempo de desarrollo, por lo que se recomienda, la documentación de la temperatura no solo de las cámaras de ambiente controlado sino también, de ser posible, la documentación de la temperatura dentro de las cajas de cría. Al mismo tiempo, controlar el número de individuos dentro de cada caja para evitar agregaciones o masas de larvas que aumentan la temperatura a la se encuentran expuestas.

Se recomienda agregar en el formulario que deben entregar los investigadores del Organismo de Investigación Judicial en la Sección de Biología sobre información del sitio del suceso y del cuerpo en descomposición, cuando solicitan la determinación del tiempo de muerte, un apartado sobre la descripción del comportamiento de las larvas cuando fue hallado el cuerpo (por ejemplo si se encuentran sobre el cuerpo o en estado de deambulación).

10. Bibliografía

- Amat, E., Vélez, M., & Wolff, M. (2008). Illustrated key for identification to genera and species of blowflies (Diptera: Calliphoridae) of Colombia. *Caldasia*, 30: 231-244.
- Amendt, J., Krettek, R. & Zehner, R. (2004). Forensic entomology. *Naturwissenschaften*. 91: 51. <https://doi.org/10.1007/s00114-003-0493-5>
- Anderson, G.S. (2000). Minimum and maximum development rates of some forensically important Calliphoridae (Diptera). *Journal of Forensic Sciences*, 45: 824-832.
- Anderson, M. & Kaufman, P.E. (2011). Common green bottle fly, sheep blow fly, *Lucilia sericata* (Meigen), (Insecta: Diptera: Calliphoridae). University of Florida, Entomology and Nematology Department, FDACS/DPI, EDIS, EENY-502. Disponible en: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/livestock/flies/lucilia_sericata.htm
- Arnott, S. & Turner, B. (2008). Post-feeding larval behaviour in the blowfly, *Calliphora vicina*: Effects on post-mortem interval estimates. *Forensic Science International*, 177: 162–167.
- Baqué, M., Filmann, N., Verhoff, M.A. & Amendt, J. (2015). Establishment of developmental charts for the larvae of the blow fly *Calliphora vicina* using quantile regression. *Forensic Science International*, 248: 1–9.
- Boatright, S.A. & Tomberlin, J.K. (2010). Effects of temperature and tissue type on the development of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology*, 47: 917-923.
- Byrd, J.H. & Castner, J.L. (2009). Insects of forensic importance , pp 39-126. *En*: Byrd, J.H. & Castner, J.L. (eds.). *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*, Second Edition. CRC Press, New York. 681 pp.
- Camacho, G.C. (2005). Sucesión de la entomofauna cadavérica y ciclo vital de *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) como primera especie colonizadora, utilizando cerdo blanco (*Sus scrofa*) en Bogotá. *Revista Colombiana de Entomología*, 31: 189-197.

- Campbell, A., Frazer, B.D., Gilbert, N., Gutierrez, A.P. & Mackauer, M. (1974). Temperature requirements of some aphids and their parasites. *Journal of Applied Ecology*, 11: 431–438.
- Campobasso, C.P., Di Vella, G. & Introna, F. (2001). Factors affecting decomposition and Diptera colonization. *Forensic Science International*, 120: 18–27.
- Carvalho C.J.B., Mello-Patiu, C. (2008). Key to the adults most common forensic species of Diptera in South América. *Revista Brasileira de Entomologia*, 52: 390–406.
- Castner, J.L. (2009). General Entomology and Insect Biology. *En*: Byrd, J.H. & Castner, J. L. (Eds.). *Forensic Entomology. The Utility of Arthropods in Legal Investigations*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 681 pp.
- Catts, E.P. & Goff, M.L. (1992). Forensic Entomology in Criminal Investigations. *Annual Review of Entomology*, 37:253-272.
- Chua, T.H. (2013). Use of temperature model in estimating postmortem interval in forensic entomology. *International Journal of Entomological Research*, 01: 11-15.
- Clark, K., Evans, L. & Wall, R. (2006). Growth rates of the blowfly, *Lucilia sericata*, on different body tissues. *Forensic Science International*, 156: 145–149.
- Elizondo-Delgado, J.I., Troyo, A. & Calderón-Arguedas, O. (2019). Determinación del intervalo *post mortem* mínimo (IPM) basado en un modelo de acumulación térmica con una cepa de *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae) de Costa Rica. *Revista Biomédica*, 20: 51-58.
- Evans, H.E. (1984). *Insect biology*. Addison-Wesley Publishing Co, Massachusetts. 436 pp.
- García-Espinoza, F., Valdés Perezgasga, M.A., Sánchez Ramos, F. J., Yusseff Vanegas, S.Z. & Quintero Martínez, M.T. (2012). Desarrollo larval y requerimientos calóricos de *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae) durante primavera y verano en Torreón, Coahuila. *Acta Zoológica Mexicana*, 28: 172-184.

- Goff, M.L. (2009). Forensic Entomology, pp. 381-386. *En*: Resh, V.H. & Cardé, R.T. (eds.). Encyclopedia of Insects. Second Edition. Academic Press, San Diego. 1132 pp.
- Goff, M.L., Omori, A.I. & Gunatilake, K. (1988). Estimation of postmortem interval by arthropod succession: three case studies from the Hawaiian Islands (U.S.A.). *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 9: 220-225.
- Grassberger, M. & Reiter, C. (2001). Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the isomegalen- and isomorphen-diagram. *Forensic Science International*, 120:32-36.
- Grassberger, M. & Reiter, C. (2002). Effect of temperature on development of the forensically important holarctic blow fly *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International*, 128: 177–182.
- Greenberg, B. & Kunich, J.C. (2002) *Entomology and the law: flies as forensic indicators*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hall, D.G. (1948). *The blowflies of North America*. The Thomas Say Foundation. Monumental Printing. Baltimore, Maryland, U.S.A. 477 pp.
- Higley, L. G. & Haskell, N.H. (2009). Insect development and forensic entomology, pp. 287-302. *En*: Byrd, J.H. & Castner, J. L. (Eds.). *Forensic Entomology. The Utility of Arthropods in Legal Investigations*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 681 pp.
- Joseph, I., Mathew, D. G., Sathyan, P., & Vargheese, G. (2011). The use of insects in forensic investigations: An overview on the scope of forensic entomology. *Journal of forensic dental sciences*, 3: 89–91.
- Morales, R. (2014). *Elaboración de una clave taxonómica para adultos y larvas de las especies de los géneros Lucilia y Hemilucilia (Diptera: Calliphoridae) de Costa Rica*. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- Murray, M.S. (2008). *Using degree days to time treatments for insect pests*. Utah State University.

- Niederegger, S., Pastuschek, J. & Mall, G. (2010). Preliminary studies of the influence of fluctuating temperatures on the development of various forensically relevant flies. *Forensic Science International*, 199: 72–78.
- Norris, K.R. (1965). The Bionomics of Blow Flies. *Annual Review of Entomology*, 10: 47-68.
- Sharma, R., Garg, R.K., & Gaur, J.R. (2015). Various methods for the estimation of the post mortem interval from Calliphoridae: A review. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 5: 1–12.
- Slone, D., Gruner, S. & Allen, J. (2005). Assessing Error in PMI prediction using a forensic entomological computer model. U.S. Department of Justice. Disponible en: <https://www.ncjrs.gov/pdffiles1/nij/grants/211760.pdf>
- Smith, K.G.V. (1986). *A Manual of Forensic Entomology*. Cornell University Press. Ithaca, New York. 205 pp.
- Solano, J.J., Wolff, M. & Castro, L.R. (2013). Identificación molecular de califóridos (Diptera: Calliphoridae) de importancia forense en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 39: 281-290.
- Sukontason, K., Piangjai, S., Siriwattananurongsee, S. & Sukontason, K.L. (2008). Morphology and developmental rate of blowflies *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya rufifacies* in Thailand: application in forensic entomology. *Parasitology Research*, 102:1207–1216.
- Townsend, L., Bessin, R. & Johnson, D. (2010). Predicting insect development using degree days. University of Kentucky, Department of Entomology, Entifact-123. <http://www2.ca.uky.edu/entomology/entifacts/ef123.asp>
- Vargas, J. (1999). Distribución y morfología de adultos e inmaduros de moscas califóridas (Diptera) de importancia forense en Costa Rica. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad de Costa Rica, Escuela de Biología. San José, Costa Rica. 105 pp.

- Vargas, J. & Wood, D.M. (2010). Calliphoridae (blow flies) (pp. 1297–1304). *En*: Brown, B.V., Borkent, A., Cumming, J.M., Wood, D.M., Woodley, N.E. & Zumbado, M.A. (Eds.). *Manual of Central American Diptera. Volume 2*. NRC Research Press, Ottawa.
- Vasconcelos, S., Barbosa, T., & Oliveira, T. (2015). Diversity of forensically-important dipteran species in different environments in northeastern Brazil, with notes on the attractiveness of animal baits. *The Florida Entomologist*, 98, 770-775.
- Wall, R., French, N. & Morgan, K.L. (1992). Effects of temperature on the development and abundance of the sheep blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Bulletin of Entomological Research*, 82: 125-131.
- Wang, Y., Li, L., Wang, J., Wang, M., Yang, L., Tao, L., Zhang, Y., Hou, Y., Chu, J. & Hou, Z. (2016). Development of the green bottle fly *Lucilia illustris* at constant temperatures. *Forensic Science International*, 267: 136-144.
- Wells, J.D. & Lamotte, L.R. (1995). Estimating maggot age from weight using inverse prediction. *Journal of Forensic Sciences*, 40: 585-590.
- Wells, J.D. & Lamotte, L.R. (2009). Estimating the postmortem interval (pp. 367-388). *En*: Byrd, J.H. & Castner, J.L (eds.). *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations. Second Edition*. CRC Press, Florida. 705 pp.
- Zumbado, M. (2006). *Dípteros de Costa Rica y la América Tropical*. INBio, Costa Rica. 267 pp.

11. Anexos

Anexo 1

Trampa de suelo utilizada para atraer y atrapar adultos



Anexo 2

Cajas utilizadas para la cría de adultos, larvas y pupas de dípteros de interés forense.

	<p>Caja de cría para adultos</p>
 	<p>Caja de cría para larvas</p>
	<p>Caja de cría para pupas</p>

Anexo 3

Cámara de ambiente controlado (Panasonic MLR-352H) utilizada para el desarrollo de larvas a temperaturas constantes.



Anexo 4

Procedimiento para la cría de dípteros de interés forense y construcción de curvas de crecimiento longitudinal

1. Objetivo:

Establecer el procedimiento a seguir para la cría de adultos y estadios inmaduros de dípteros de interés forense en condiciones de laboratorio, utilizando especies asociadas a cuerpos en descomposición que sean objeto de análisis en el contexto de una investigación criminal y que ingresan a la Sección de Biología provenientes de la Morgue Judicial u otras dependencias del Organismo de Investigación Judicial. La cría se realiza con el fin de construir curvas de crecimiento longitudinal, para cada especie a una temperatura específica, que permitan establecer la relación entre la longitud de las larvas encontradas en un cuerpo y el tiempo de desarrollo que poseen y de esta forma determinar el intervalo *post mortem* o tiempo de muerte.

2. Alcance:

El presente procedimiento se aplica para la cría de moscas adultas y larvas de diferentes especies de dípteros necrófagos asociados a cuerpos en descomposición, que sean objeto de análisis en el contexto de una investigación criminal y donde se conozca de previo la existencia de una especie específica en un caso particular.

3. Referencias

Byrd, J.H & Castner, J.L. (2009). Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations, Second Edition. CRC Press, New York. 681 pp.

4. Equipos y Materiales

Azúcar de uso doméstico.

Balanza granataria.

Cajas petri.

Cámara de ambiente controlado, Panasonic MLR-352H o similar.

Carne de res en trozos de aproximadamente 2x2 cm

Congelador, con rango de temperaturas entre -5 y 0 °C.

Formulario análisis de indicios entomológicos (actividad de cría).

Leche en polvo entera de uso doméstico.

Levadura granulada de uso doméstico.

Marcador de tinta indeleble.

Papel aluminio.

Red entomológica.

Registrador de temperatura y humedad, marca Testo, modelo 174H o similar.

Viales de vidrio con tapa de rosca de 20 mL.

Nota 1: Toda la cristalería debe lavarse con agua y jabón líquido desinfectante, dejar secar a temperatura ambiente.

5. Reactivos y Materiales de Referencia:

Solución FAA.

Vermiculita.

6. Condiciones ambientales:

N/A

7. Procedimiento

7.1. Recolección de especímenes

7.1.1 Proceda a la identificación de las larvas de dípteros asociados a un caso específico y posteriormente verifique la existencia de curvas de crecimiento realizadas en la sección para las especies involucradas en el caso y para las condiciones ambientales correspondientes, según como lo indica el Procedimiento para la Determinación de Tiempo de Muerte mediante Análisis Entomológico. Si no se encuentran curvas de crecimiento para la especie o una curva específica para esa especie a la temperatura requerida realice el siguiente procedimiento.

Nota 2: La curva de crecimiento utilizada para una especie específica debe realizarse basándose en la temperatura a la cual se encontraba la zona del hallazgo del cuerpo, como lo

indica el Procedimiento para la Determinación de Tiempo de Muerte mediante Análisis Entomológico

7.1.2 Verifique la distribución de la especie seleccionada para determinar el tiempo de muerte en la base de datos del INBio, según se establece en el Procedimiento para la Determinación de Traslado Mediante Análisis Entomológico.

7.1.2 Según los datos obtenidos sobre la distribución de la especie en el país seleccione el lugar menos distante a las instalaciones del Departamento de Ciencias Forenses en San Joaquín de Flores para recolección de individuos. Escoja preferiblemente un lugar con condiciones ambientales semejantes a las del sitio del hallazgo del cuerpo.

7.1.3 Programe una gira y trasládese hasta el lugar seleccionado para la captura de individuos, tenga en cuenta al organizar la gira que las capturas de individuos deben realizarse preferiblemente en la mañana. Asimismo, considere las condiciones meteorológicas pues no es posible la recolección bajo condiciones de lluvia.

Nota 3: Dos o tres días antes de la fecha programada para realizar la gira deje a temperatura ambiente, en un recipiente plástico con tapa, 300 gramos de carne de res, para que la misma se descomponga.

7.1.4 Programe al menos dos cámaras de ambiente controlado (siguiendo las instrucciones que se encuentran en el procedimiento para el manejo de esta), dos o tres días antes de la fecha establecida para la gira. Cada cámara debe programarse con una temperatura constante, de acuerdo con el promedio de temperatura de la zona del hallazgo del cuerpo. Además, programe una humedad relativa constante del 80% y un fotoperiodo de 12:12 (D:N) horas.

7.1.5 Cuando se encuentre en la zona establecida para realizar la captura, basándose en la biología de la especie en estudio, busque un lugar adecuado para iniciar con la recolección de individuos (por ejemplo: zonas urbanas, zonas verdes). Además, una vez en el lugar complete toda información del Formulario de Análisis de Indicios Entomológicos: Actividad de Cría, referente a las características de la zona de recolección. Toda la información sobre la recolección y la cría de especímenes deben anotarse en este formulario.

7.1.6 Para la obtención de especímenes coloque una trampa de suelo, la cual consiste en una caja de madera con cedazo en el fondo y una tapa también cubierta de cedazo. En el fondo de la caja coloque un trozo de papel de aluminio y sobre este último 300 gramos de carne de res en descomposición. Anote la hora a la que colocó la trampa.

7.1.7 Permanezca cerca de la trampa en espera de identificar el momento exacto en que arriban las primeras moscas de importancia forense, familias Calliphoridae y/o Sarcophagidae (Anexo 1). Anote la hora de arribo de las primeras moscas de estas familias.

7.1.8 Realice una identificación preliminar de las especies que llegan al cebo (Anexo 2) y anote las posibles especies observadas, indicando que se trata de una identificación preliminar.

7.1.9 Aléjese de la trampa y realice revisiones cada 30 minutos en procura de determinar la presencia de masas de huevos o larvas en la carne, para esto mueva con unas pinzas los trozos de carne. Una vez que detecte la presencia de masas de huevos, anote la hora. Deje que las moscas ovipositen por lo menos por una hora más.

7.1.10 Transcurrido este tiempo proceda con la captura adultos, para esto colóquese cerca de la trampa y espere a que se presenten moscas adultas sobre el cebo, con una red entomológica proceda a la captura de estas.

7.1.11 Extraiga los adultos capturados uno por uno utilizando tubos de ensayo transparentes. Identifique los individuos por morfoespecie (Anexo 1 y 2) y seleccione aquellos pertenecientes a la especie requerida para la determinación del tiempo de muerte. Coloque todos los especímenes seleccionados en una caja de cría para adultos.

7.1.12 Al seleccionar los especímenes capturados procure colocar en las cajas de cría una mayor proporción de hembras. Para esto observe, en las especies pertenecientes a la familia Calliphoridae, la posición de los ojos: los machos son holópticos (los ojos se tocan por encima de la cabeza) y las hembras son dicópticas (los ojos no se tocan en ningún punto por encima de la cabeza). Las moscas de familia Sarcophagidae no presentan dimorfismo sexual, por lo que no es posible realizar la selección por sexo.

7.1.13 Complete la captura cuando tenga entre 20 y 60 hembras adultas. Procure colocar un máximo de 20 individuos por caja.

Nota 4: Coloque las cajas de cría de adultos en un lugar a la sombra y preferiblemente fresco, nunca la deje expuesta al sol directo. Además, rotule la caja con el nombre de la especie y la información de la fecha y hora de la captura.

7.1.14 Extraiga, una vez finalizada la recolecta, la carne con masas de huevos y/o larvas de la trampa de suelo y colóquela en una caja de cría para larvas.

Nota 5: La caja de cría para larvas consiste en un recipiente de vidrio con aproximadamente 150 gramos de vermiculita en el fondo (como sustrato para la pupación), sobre esta se coloca un trozo de papel de aluminio y sobre este último la carne. La caja posee una tapa plástica, cortada en la parte superior y cubierta con una tela delgada tipo pantimedia (Anexo 3).

7.1.15 Regrese al laboratorio, evitando hacer el viaje entre las 10:00 y las 14:00 horas, sobre todo si se encuentra en zonas costeras o en la zona norte del país, pues la exposición de las cajas de cría a altas temperaturas puede generar la muerte de los especímenes.

7.2 Preparación de colonias de cría en el laboratorio

7.2.1 Masas de huevos y/o larvas del sitio de muestreo

7.2.1.1 Coloque, una vez en el laboratorio, todas las cajas de cría dentro de la cámara de ambiente controlado previamente programada. Anote la hora de la colocación de las cajas en la cámara.

7.2.1.2 De seguimiento diario a las cajas de cría de larvas verificando que siempre tengan carne disponible para su consumo, si nota que está por acabarse coloque 250 gramos de carne fresca a temperatura ambiente.

7.2.1.3 Cuando observe que las larvas pierden el interés en el consumo de la carne y reptan por la caja buscando un sitio para pupar, retire el papel aluminio con la carne. Coloque un trozo de papel aluminio limpio que cubra el sustrato de vermiculita, con el fin de que las larvas puedan efectuar la pupación.

7.2.1.4 Anote el día y la hora en que observó la migración de las larvas hacia el sustrato de pupación. De seguimiento diario y anote el día y la hora en que observó la formación de pupas.

7.2.1.5 Retire diariamente las pupas y trasládelas a recipientes específicos para este estadio de desarrollo (Anexo 3). Coloque las cajas en la cámara de ambiente controlado programada.

7.2.1.6 Verifique diariamente la emergencia de adultos, anote el día y la hora en la que se observa la misma.

7.2.1.7 Una vez que todos los adultos han emergido de las pupas, coloque la caja por aproximadamente un minuto en un congelador, entre -5°C y 0°C , hasta adormecer todos los individuos. Coloque los especímenes en una caja petri y proceda a realizar la identificación definitiva a especie de acuerdo con el Procedimiento para la Identificación Entomológica de Larvas y Adultos.

Nota 6: Recuerde que los especímenes no están muertos si no en estado de letargo, por lo que la identificación debe hacerse rápidamente. Si antes de finalizar la identificación del espécimen, este despierta vuélvalo a colocar en el congelador por un minuto.

7.2.1.8 Separe los especímenes pertenecientes a la especie que se debe estudiar en cajas de cría para adultos, anotando en la caja la especie y la proporción de sexos.

7.2.1.9 Suministre a cada colonia una caja de petri conteniendo un algodón húmedo con agua y otra caja con una porción de alimento, el cual consiste en 4 gramos de leche en polvo entera, 2 gramos de azúcar refinada y 2 gramos de levadura granulada, todo lo anterior mezclado en 5 ml de agua. Cambie diariamente el agua y la porción de alimento a cada caja.

7.2.2 Cajas de cría con adultos atrapados en el sitio de muestreo

7.2.2.1 Coloque, una vez en el laboratorio, las cajas de cría con adultos mencionadas en el punto 7.1.11, dentro de la cámara de ambiente controlado previamente programada. Anote la hora de la colocación de las cajas en la cámara.

7.2.2.3 Suministre a cada colonia una caja de petri conteniendo un algodón húmedo con agua y otra caja con una porción de alimento, el cual consiste en 4 gramos de leche en polvo entera, 2 gramos de azúcar refinada y 2 gramos de levadura granulada, todo lo anterior mezclado en 5 ml de agua.

7.3 Mantenimiento diario de las colonias

7.3.1 Cambie diariamente, en las primeras horas de la mañana, el agua y la porción de alimento en cada una de las colonias. En el caso de fines de semana y feriados realice un cambio adicional de agua y alimento antes del cierre y al finalizar el día, dejando doble ración por cada una de las cajas de cría para adultos.

7.3.2 Extraiga todos los días los individuos muertos de cada caja de cría para adultos, anotando la proporción de sexos de los individuos retirados. Verifique que siempre existan individuos de ambos sexos en la colonia, procurando que la porción de hembras en la colonia sea mayor a la de los machos.

7.4 Estudio del desarrollo longitudinal de las larvas

7.4.1 Un día antes de que se desee obtener huevos de la colonia de adultos para la cría de larvas, deje a temperatura ambiente 500 gramos de carne de res, en un recipiente plástico con tapa.

7.4.2 Introduzca en cada caja de cría para adultos, a primera hora en la mañana, una caja petri con 50 gramos de carne de res. Revise cada media hora las cajas petri para verificar la existencia de masas de huevos sobre la carne.

7.4.3 Al observar una masa de huevos traslade la carne a una caja de cría para larvas, como la descrita en la nota 5. Anote la hora a la que se observó la oviposición y además de la carne con los huevos, agregue 250 gramos de carne de res a temperatura ambiente. Solamente coloque una masa de huevos por caja de cría y colóquelas dentro de una de las cámaras de ambiente controlado programada con la temperatura deseada.

Nota 7: Las moscas de la familia Sarcophagidae no ponen masas de huevos, sino que colocan directamente las larvas sobre la carne, por lo que al detectar la presencia de larvas debe seguirse con el paso 7.4.5.

7.4.4 Revise las cajas cada hora, con el fin de determinar el momento de eclosión de los huevos. Anote el día y la hora en que observó la eclosión.

7.4.5 En el momento posterior a la detección de la eclosión proceda a sacrificar tres individuos, hirviendo las larvas en agua caliente por un minuto. Posteriormente preserve las larvas en un vial de vidrio con solución FAA, según las indicaciones establecidas en el Procedimiento para la Recolecta, Preservación y Preparación de Indicios Entomológicos.

7.4.6 A partir del primer sacrificio realice procedimiento descrito anteriormente cada tres horas, cinco veces al día (con un intervalo de 12 horas desde el último sacrificio hasta el día siguiente). Los sacrificios deben realizarse desde la eclosión de los huevos hasta el final del proceso de desarrollo de las larvas, es decir, hasta el momento de la pupación.

7.4.7 Todos los especímenes sacrificados deben ser colocados en viales de vidrio identificados con la especie, la fecha, hora de sacrificio y el total de horas de desarrollo con que contaban las larvas.

7.4.8 De seguimiento diario a las cajas de cría de larvas verificando que tengan carne disponible para su consumo, si nota que está por acabarse coloque 250 gramos de carne fresca a temperatura ambiente.

7.4.9 Cuando observe que las larvas pierden el interés en el consumo de la carne y reptan por la caja buscando un sitio para pupar, retire el papel aluminio con la carne. Coloque un trozo de papel aluminio limpio que cubra el sustrato de vermiculita, con el fin de que las larvas puedan efectuar la pupación.

7.4.10 Anote el día y la hora en que observó la migración de las larvas hacia el sustrato de pupación en el formulario respectivo. Anote el día y la hora en que observó la formación de las primeras pupas, en este momento de por finalizado el procedimiento de sacrificio de larvas.

7.4.11 Continúe con las revisiones de las cajas de cría y retire las pupas que observe, trasládelas a recipientes específicos para la cría de este estadio de desarrollo (Anexo 3). Coloque las cajas en la cámara de ambiente controlado programada.

7.4.12 Verifique la emergencia de adultos de las pupas, anote el día y la hora en la que se observa la misma. Coloque los adultos en una nueva caja de cría.

7.4.13 Este procedimiento debe realizarse por triplicado para cada especie a una temperatura específica.

7.4.14 Realice la medición, por triplicado, de la longitud de cada una de las larvas sacrificadas, según lo establecido en el Procedimiento para la Determinación de Tiempo de Muerte mediante Análisis Entomológico. Anote cada una de las mediciones realizadas y la información sobre la fecha, hora de sacrificio y el total de horas de desarrollo.

7.5 Curvas de crecimiento

7.5.1 En una hoja de cálculo realice un gráfico donde se muestre la relación entre el cambio en la longitud promedio de las larvas a lo largo del tiempo. Para esto utilice como variable explicativa el tiempo de desarrollo (que comprende el tiempo desde la eclosión de los huevos hasta el momento de la pupación) y como variable a explicar la longitud de las larvas.

7.5.2 Debe observar un incremento en la longitud durante las primeras horas de desarrollo, alcanzando un pico que corresponde a la longitud máxima de las larvas, posteriormente la longitud disminuye debido a la actividad de pre pupación, ya que las larvas dejan de alimentarse y comienzan a pupar. Observe el ejemplo de la Figura 1.

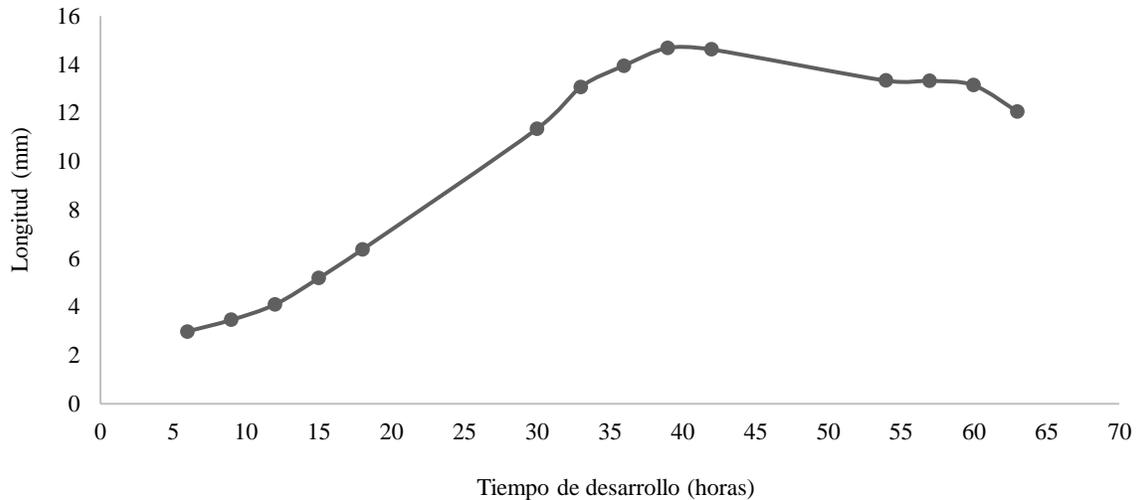


Figura 1. Curva de crecimiento longitudinal teórica a una temperatura constante determinada, se muestra la variable longitud de las larvas a lo largo del tiempo de desarrollo.

7.6 Ecuación de regresión lineal

Nota 8: El desarrollo de los estadios inmaduros de insectos que se alimentan de cuerpos humanos en estado de descomposición pueden correlacionarse estadísticamente con el tiempo de muerte de un individuo, debido a que los ciclos de vida de estos organismos pueden ser descritos a través de funciones matemáticas que consideran el crecimiento de los especímenes según las condiciones ambientales a las que se expongan durante su crecimiento. De esta manera, el tiempo de desarrollo que posee una muestra de larvas recolectadas de un cuerpo se puede determinar a partir de la longitud de larvas con horas de desarrollo conocidas, mediante la elaboración de curvas de crecimiento en condiciones de laboratorio controladas, de las cuales se obtienen ecuaciones de regresión lineal que asocian la longitud de las larvas con las horas de desarrollo. La relación entre la longitud de las larvas y el tiempo de desarrollo es lineal en el rango medio de una curva.

7.6.1 Calcule la longitud promedio de las larvas para cada hora de desarrollo obtenida anteriormente, así como la desviación estándar y el tamaño de muestra para cada uno de los grupos de desarrollo.

7.6.2 Realice una regresión lineal a través del criterio de mínimos cuadrados con ponderación sencilla, para las variables horas de desarrollo versus milímetros de longitud. Para realizar los cálculos respectivos, se ha desarrollado una plantilla en una hoja de cálculo, la misma se encuentra ubicada en la unidad de disco duro de la computadora del área de entomología de la sección.

7.6.3 Abra el archivo y digite los datos correspondientes a cada una de las variables del cálculo de regresión según se indica a continuación (solamente se deben ingresar datos en el área marcada con amarillo, Fig. 2):

- La columna n_x hace referencia a cada grupo de larvas que fueron sacrificadas y medidas, por lo que corresponde a un grupo y debe colocarse un valor de 1.
- En la columna x digite los valores de las horas de desarrollado con que contaba cada grupo de larvas sacrificadas.
- La columna e_x es el error asociado a las horas de desarrollo, en este modelo no hay errores asociados a x por lo que esta columna se deja en blanco.
- En la columna n_y digite el tamaño de muestra de cada uno de los grupos, según la metodología planteada se sacrificaron y midieron 3 larvas, por lo que el valor a digitar es 3.
- En la columna y_m digite la longitud promedio de cada uno de los grupos de larvas.
- En la columna S_y digite la desviación estándar de cada uno de los grupos de larvas que fueron medidas.

7.6.4 Cambie el nombre de la hoja de calculo indicando la especie estudiada y temperatura promedio de desarrollo utilizado. Guarde la hoja de calculo como un nuevo archivo en la unidad de disco duro de la computadora del área de entomología de la sección.

7.6.5 En el archivo podrá observar toda la información asociada al modelo de regresión lineal (columna A, fila 91), el mismo se encuentra con el nombre: 3) Regresión lineal con ponderación estadística.

Nota 9: Las proyecciones prácticas de tiempo de muerte a partir de la regresión se describen en el Procedimiento para la Determinación de Tiempo de Muerte mediante Análisis Entomológico.

 ORGANISMO DE INVESTIGACION JUDICIAL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES Hoja de Cálculo Determinación de tiempo de muerte mediante análisis entomológicos Código: H-DCF-ECT-BIO-09-R2 Versión N°1: Emitida y aprobada por la Sección de Biología Forense						
A) DATOS PARA REALIZAR EL AJUSTE (Solamente ingresar datos en el área amarilla)						
i ($i_{max}=k$)	n_x	x	e_x	n_y	y_m	s_x
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
Σ	0	0,000	0,000	0	0,000	0,0000
Prom. calc.	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	0,0000
Promedios	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Figura. 2. Hoja de cálculo utilizada para la realización de la regresión lineal a través del criterio de mínimos cuadrados con ponderación sencilla, se muestra el área amarilla donde deben ingresarse los datos correspondientes a las horas de desarrollo de las larvas y la longitud promedio de estas.

8. Criterios de aceptación o rechazo de resultados:

Ver Procedimiento para la Determinación de Tiempo de Muerte mediante Análisis Entomológico.

9. Cálculos y evaluación de la incertidumbre

Ver Procedimiento para la Determinación de Tiempo de Muerte mediante Análisis Entomológico.

10. Reporte de análisis y resultados

Ver Procedimiento para la Determinación de Tiempo de Muerte mediante Análisis Entomológico.

11. Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional

Deben seguirse las precauciones mínimas de seguridad que dictan las buenas prácticas de laboratorio, entre las que sobresalen:

- Deben utilizarse guantes descartables de látex o nitrilo en todos los trabajos que entrañen algún contacto con sangre, material infeccioso o animales infectados.
- Utilizar gabachas o uniformes de trabajo para evitar la contaminación. No se utilizará la ropa de laboratorio fuera de éste (cafetería, biblioteca, etc.).
- En la zona del laboratorio no se permitirá comer, guardar alimentos, beber, fumar, ni usar cosméticos.
- Las superficies de trabajo se descontaminarán según las indicaciones del Procedimiento de Limpieza y Mantenimiento de Áreas de Trabajo.
- Todos los desechos biológicos, deberán ser procesados según se indica en el Manual de Seguridad y Salud Ocupacional del DCF.
- Todo el personal se lavará las manos después de haber manipulado material o animales infecciosos, así como al abandonar el laboratorio.

- Los productos químicos pueden ser peligrosos por sus propiedades tóxicas, corrosivas, inflamables o explosivas. Muchos reactivos, particularmente los disolventes orgánicos, arden en presencia de una llama.
- No es recomendable prolongar las jornadas de observación microscópica por más de 4 horas diarias y se debe descansar la vista 15 minutos por cada hora de trabajo al microscopio.

12. Simbología

DCF: Departamento de Ciencias Forenses

IPM: Intervalo *post-mortem*

N/A: No aplica

PON: Procedimientos de Operación Normado

13. Terminología

Dípteros: Orden de insectos que posee un solo par de alas membranosas en el segundo anillo del tórax, un par de balancines (utilizados para mantener el equilibrio durante el vuelo) en el tercer anillo, y cuyas piezas bucales están dispuestas para la succión o para picar, como las moscas y el mosquito.

Huevo: Primer estadio de desarrollo de un insecto con metamorfosis completa, el cual es depositado por el individuo adulto sobre el sustrato de alimentación respectivo.

Insecto: Organismo vivo caracterizado por la presencia de 3 pares de patas articuladas.

Intervalo *post-mortem* (IPM) o tiempo de muerte: Periodo de tiempo transcurrido después de la muerte hasta que es encontrado el cuerpo.

Larva: Segundo estadio de desarrollo de un insecto con metamorfosis completa, durante el cual el organismo se alimenta vorazmente de un sustrato de naturaleza específica.

Pupa: Estadio por el que pasan algunos insectos en el curso de la metamorfosis que los lleva del último estado de larva al de imago o adulto.