



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA
LICENCIATURA EN CIENCIA FORENSE**

**PROPUESTA DE PROTOCOLO PARA LA
IDENTIFICACIÓN Y TRATAMIENTO DE INDICIOS
ENTOMOLÓGICOS EN EL LUGAR DE
INTERVENCIÓN Y EN LABORATORIO, CON FINES
DE IDENTIFICACIÓN HUMANA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN CIENCIA FORENSE**

P R E S E N T A:

VIRIDIANA CORONA PLASCENCIA



**CIENCIA
FORENSE
UNAM**

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. CARLOS S. PEDRAZA LARA**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del jurado: Dr. Carlos S. Pedraza Lara, Lic. Diego Ernesto Villanueva Hernández, Dr. Mirsha Quinto Sánchez, Dr. Alejandro Zaldívar Riverón y al Dr. Mariano Guardado Estrada, por el tiempo que le dedicaron a la revisión de este trabajo.

Al Programa de Becas Estudiantiles SEP-UNAM-FUNAM 2017 por la beca otorgada para realizar mi estancia académica en la Universidad Autónoma de Madrid.

Al Dr. José L. Bella Sombría y al equipo del Departamento de Biología (Genética), Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid por complementar mis conocimientos teóricos y prácticos para la realización de esta tesis.

Este proyecto se realizó bajo la dirección del Dr. Carlos Salvador Pedraza Lara.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme el conocimiento, habilidades y recursos necesarios para mi desarrollo profesional. Es un gran honor pertenecer a esta hermosa universidad.

Al Dr. Carlos Pedraza Lara por su asesoría, extensa paciencia y apoyo durante el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. José L. Bella Sombría y Dra. Francisca Arroyo por su enorme ayuda brindada para el desarrollo de mi conocimiento en genética, manejo de muestras y equipo de laboratorio.

A la M. en C. Magali Yadira Espinosa Sánchez por ayudarme en el desarrollo de esta tesis.

A la Mtra. Gabriela Ochoa y al Mtro. Bruno Ramírez Ornelas por su apoyo, extensas enseñanzas, tutoría y convivencias.

DEDICATORIAS

A mis padres María Antonieta Plascencia Huitrón y Marco Antonio Corona Ferreira por ser los mejores padres, ayudarme en todo momento para mi desarrollo como persona y en mi vida profesional. Gracias por todo su amor y proporcionarme más de lo que necesité. Estaré eternamente agradecida. Te amo María. Te amo, feo.

A mi hermana Jessica por ser mi confidente, mi apoyo y la valentía que necesité en diversas ocasiones. A pesar de las grandes diferencias, te agradezco tu hermandad y brindarme momentos de grandes risas. Te amo chamaca.

A mi tía Lydia por ser, al igual que mi madre, un ejemplo de fortaleza y de lucha, por animarme, sus extensas y divertidas pláticas, por estar orgullosa de mi y considerarme una excelente persona. A mi abuela Lulú por su apoyo, cariño y porras. A ambas las admiro y quiero.

A Ariel por tu apoyo en los momentos más difíciles de mi vida. Gracias por tus sabios consejos, interminables pláticas, análisis profundos y carcajadas.

A Alita, Dany y Alfredo por su amistad, apoyo y consejos de vida. Gracias por sus momentos de diversión, porras y sobre todo dejarme ser parte de cada uno. Los quiero.

A Magali y Saúl por su apoyo, principalmente durante la carrera, por escucharme, animarme y hacerme reír a carcajadas, sobre todo por permitirme ser mal tercio por mucho tiempo. A Monserrat por tu apoyo, risas y por tu compañía en esos momentos vergonzosos y accidentes, nada graves, en la universidad. A los tres los quiero mucho y estaré eternamente agradecida por sacarme adelante en la universidad.

A Héctor, Ulysses, Zaira, Jennifer y Brenda por hacerme pasar excelentes días, por compartir locas y risueñas aventuras en el campus y en el servicio social. Gracias por las porras y por las divertidas, bailadoras y muy calmadas reuniones en casa de Héctor.

Al Dr. Pepe, la Dra. Rosy y Dra. Paqui por convertirse en mi familia, guía turística durante mi estancia en Madrid, y abrirme las puertas de su país y su casa. Por todas las enseñanzas, mil gracias.

A la Mtra. Gabriela Ochoa y al Mtro. Bruno Ramírez Ornelas por ser excelentes profesores y tutores. Por su incondicional apoyo, confianza y motivación.

A la Lic. Liliana Hernández Padilla, al Mtro. Ricardo Ramírez Fuentes y al área de Criminalística de campo de Servicios Periciales por su instrucción, apoyo y confianza en el Servicio Social. Sin ustedes mi estancia no hubiera sido grandiosa.

A mi tutora María Estela Barrales Barrerra y tutor Fernando Montes Ordaz por su confianza y apoyo durante mi estancia en el Instituto de la Juventud.

Der totentanz (Munich, 1948)



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Entomología forense	1
1.2 Técnicas de biología molecular en identificación humana	1
1.3 Perfil genético humano como herramienta de identificación	3
1.4 Validación	3
2. ANTECEDENTES	6
2.1 Estudios previos a nivel mundial	6
2.2 Estudios previos en México	9
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
4. JUSTIFICACIÓN	12
5. OBJETIVOS	13
5.1 Objetivo general.....	13
5.2 Objetivos específicos	13
6. METODOLOGÍA	14
6.1 Búsqueda de estudios previos	14
6.2 Selección de trabajos	14
6.3 Diseño de la rúbrica de revisión de trabajos previos	14
6.4 Elaboración de la propuesta de protocolo para la identificación y tratamiento de indicios entomológicos en el lugar de intervención y en laboratorio, con fines de identificación humana.....	15
7. RESULTADOS	16
7.1 Tablas de estudios de identificación humana a partir de insectos	16
7.2 Propuesta de protocolo para la identificación y tratamiento de indicios entomológicos en el lugar de intervención y en laboratorio, con fines de identificación humana	38
INTRODUCCIÓN	42
OBJETIVOS DEL PROTOCOLO	43
Objetivo general.....	43
Objetivos específicos	43
I. Entomología Forense.....	44
I.1 Efectos sobre el tejido y ADN humanos en el proceso digestivo del insecto	44
I.2 Insectos necrófagos	46
I.2.1 Aplicación en identificación humana en genética forense	46

I.2.2	Consideraciones	47
I.3	Insectos hematófagos	48
I.3.1	Aplicación en identificación humana en genética forense	49
I.3.2	Consideraciones	51
II.	Identificación de insectos necrófagos	53
II.1	Orden Diptera.....	53
II.1.1	Suborden Brachycera	56
II.1.1.1	Familia Calliphoridae	57
II.1.1.2	Familia Muscidae	58
II.1.1.3	Familia Phoridae.....	59
II.1.1.4	Familia Piophilidae.....	60
II.1.1.5	Familia Sarcophagidae	62
II.1.1.6	Familia Sepsidae.....	64
II.1.1.7	Familia Stratiomyidae.....	65
II.2	Orden Coleoptera	67
II.2.1.1	Familia Dermestidae.....	68
II.2.1.2	Familia Nitidulidae	69
II.2.1.3	Familia Silphidae.....	71
III.	Identificación de insectos hematófagos.....	73
III.1	Orden Diptera.....	73
III.1.1	Suborden Nematocera	73
III.1.1.1	Familia Ceratopogonidae	73
III.1.1.2	Familia Culicidae	74
III.1.1.3	Familia Psychodidae	75
III.1.1.4	Familia Simuliidae	76
III.1.2	Suborden Brachycera	77
III.1.2.1	Familia Glossinidae.....	77
III.1.2.2	Familia Muscidae	78
III.1.2.3	Familia Rhagionidae	79
III.1.2.4	Familia Tabanidae	80
III.2	Orden Hemiptera.....	82
III.2.1	Familia Cimicidae	83
III.2.2	Familia Reduviidae	85

III.3 Orden Phthiraptera	87
III.3.1 Familia Pediculidae	88
III.3.2 Familia Pthiridae	89
III.4 Orden Siphonaptera.....	91
III.4.1 Familia Pulicidae.....	92
IV. Tratamiento de indicios entomológicos en el lugar de intervención.....	93
IV.1 Insectos necrófagos	94
Orden Diptera	94
Orden Coleoptera.....	94
IV.2 Insectos hematófagos	95
Orden Diptera	95
Orden Hemiptera	95
Orden Phthiraptera.....	96
Recomendaciones generales para la preservación	96
Cadena de Custodia	97
V. Tratamiento en laboratorio	98
V.1 Aislamiento del tejido humano del sistema digestivo del insecto	98
V.1.1 Insectos necrófagos	98
V.1.2 Insectos hematófagos	98
Orden Diptera.....	98
Orden Hemiptera.....	98
Orden Phthiraptera	99
V.2 Pruebas para establecer el origen de tejido	99
V.3 Extracción de ADN	99
V.3.1 Extracción orgánica.....	99
V.3.2 Extracción no orgánica.....	102
V.4 Cuantificación de ADN.....	104
V.4.1 Calidad del ADN	104
V.4.1.1 Pureza del ADN.....	105
V.4.1.2 Degradación del ADN	105
V.4.1.2.1 Muerte celular	106
V.4.1.2.2 Hidrólisis	106
V.4.1.2.3 Oxidación	106

V.4.1.2.4 Exposición a luz ultravioleta	107
V.4.1.3 Concentración de ácidos nucleicos.....	107
V.4.2 Métodos para determinar la cantidad y calidad del ADN	107
V.4.2.1 Electroforesis	107
V.4.2.2 Espectrofotometría UV.....	108
V.4.2.3 Espectroscopía fluorescente	109
V.4.2.4 PCR en tiempo real (QPCR)	109
V.5 Amplificación por PCR.....	110
V.6 Secuenciación	112
V.7 Short Tandem Repeats (STRs)	113
V.8 Variación en el ADN mitocondrial (mtADN) e identificación de haplogrupos	114
V.9 Interpretación del perfil genético humano	115
V.10 Análisis del perfil genético.....	117
Diagrama de flujo de la metodología para el tratamiento de indicios entomológicos..	119
8. DISCUSIÓN.....	121
9. CONCLUSIONES.....	126
10. BIBLIOGRAFÍA.....	127

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Entomología forense

La entomología forense es la ciencia que estudia y aplica el conocimiento de la biología de artrópodos que se relacionan con aspectos en el ámbito legal. Esta ciencia se divide en tres ramas: la entomología forense urbana, de alimentos almacenados y médico-legal (Pedraza-Lara y Vergara-Pineda, 2017).

La entomología forense urbana estudia los artrópodos que infestan principalmente edificios y cultivos, que pueden tener consecuencias legales o incluso afectación en la salud del ser humano. La entomología forense de alimentos almacenados realiza el estudio de artrópodos que contaminan productos principalmente alimenticios, por ejemplo: cucarachas, moscas, hormigas y escarabajos (Gennard, 2010; Pedraza-Lara y Vergara-Pineda, 2017).

La entomología forense médico-legal analiza los artrópodos que participan en el proceso de descomposición cadavérica y/o en el deceso de una persona. Esta rama cuenta con diversas aplicaciones como la estimación del intervalo *post mortem* (IPM), estimación de lesiones, detección de drogas o toxinas, e inferencia de un posible traslado del cadáver (Rivers y Dahlem, 2014; Pedraza-Lara y Vergara-Pineda, 2017). En las dos últimas décadas se han desarrollado y aplicado herramientas de la biología molecular para identificación humana a partir de la extracción de ADN humano del sistema digestivo de insectos necrófagos y hematófagos (Amendt *et al.*, 2010; Rivers y Dahlem, 2014).

1.2 Técnicas de biología molecular en identificación humana

En la Universidad de Leicestershire, Reino Unido, Alec Jeffreys y colaboradores (1985) encontraron que ciertas regiones del ADN contenían secuencias que se repetían un número de veces consecutivamente (en tándem) y que este número de repeticiones varía entre individuos. Estas secuencias, conocidas como VNTRs, se analizaron mediante una técnica utilizada por Jeffreys que consistió en extraer ADN y fragmentarlo con una enzima de restricción (RFLP). Posteriormente, realizó una electroforesis en gel de agarosa, y para detectar los *loci* polimórficos, utilizó la técnica Southern Blot (Goodwin *et al.*, 2011). El resultado final fue una serie de bandas en una película de rayos X, a la que Jeffreys llamó huella genética (*DNA fingerprinting*), actualmente conocida como *DNA typing* o *DNA profiling* (Jeffreys *et al.*, 1985; Butler, 2005; Rivers y Dahlem, 2014).

La aplicación del *DNA typing* revolucionó a la Ciencia Forense. Con este análisis de ADN en 1986, se pudo determinar al autor del homicidio de dos estudiantes en Leicestershire, Reino Unido (Hadi *et al.*, 2007). Por tal motivo, se convirtió en una práctica forense ampliamente utilizada en la investigación criminal, la identificación humana y exámenes de paternidad (Primoran y Schanfield, 2014; Roewer, 2013).

Los marcadores genéticos, utilizados para el análisis del ADN en Genética Forense, presentan la característica de ser altamente polimórficos, es decir, presenta variaciones en la secuencia del ADN (Dragan *et al.*, 2014). La alta tasa de variabilidad de estos marcadores genéticos permite diferenciar entre individuos de una población. Los marcadores nucleares utilizados son los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP), secuencias repetidas en tándem de número variable (VNTR), las secuencias cortas de repetición en tándem (STR) y los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), sin embargo, también existe los marcadores mitocondriales, los cuales proveen de información complementaria (Goodwin *et al.*, 2011; Villavicencio y Guardado, 2017).

Los VNTR o minisatélites de ADN fueron los primeros marcadores moleculares utilizados para la obtención de perfiles genéticos humanos en Genética Forense (Goodwin *et al.*, 2011). Estos minisatélites fueron examinados por el Dr. Jeffreys (1985) con la técnica de RFLP al utilizar una enzima de restricción que cortar regiones específicas del ADN y reconoce variaciones de longitud entre los sitios de restricción (Li, 2015). Los VNTR son altamente polimórficos y poseen un poder de discriminación muy alto (Goodwin *et al.*, 2011; Villavicencio y Guardado, 2017). Sin embargo, su implementación no fue exitosa porque se requiere de una gran cantidad de ADN de alto peso molecular. Además, la metodología para su análisis resulta laboriosa, se requiere de personal altamente capacitado para realizarla y el marcaje para la detección de los fragmentos de ADN implica material radioactivo (Villavicencio y Guardado, 2017).

Actualmente los STR o microsátélites son los marcadores más comunes utilizados en el análisis de ADN en Genética Forense. Las ventajas que presentan, en comparación con los VNTR, es que los STRs se pueden amplificar por PCR, se pueden utilizar para obtener un perfil genético de muestras de ADN degradado, están presentes en todas las regiones del genoma y tienen un alto poder de discriminación (Shewale y Liu, 2013; Villavicencio y Guardado, 2017; Beltrán, 2017).

Los SNP se presentan en diferentes partes del genoma en una sola base. Las ventajas que presentan es que son marcadores que se utilizan para analizar muestras altamente degradadas, sin

embargo, presenta un poder de discriminación por locus mucho más bajo que los STR, es decir, se necesitan de 50 a 60 SNPs para tener un alto poder de discriminación igual a los 13 STRs (Li, 2015).

El ADN mitocondrial (ADNmt) es utilizado como marcador en diferentes escenarios debido a que cuenta con un alto número de copias por célula, lo que permite el análisis cuando se cuenta con cantidades pequeñas de ADN nuclear en una muestra. El ADNmt también es útil para el análisis de material muy degradado y no es susceptible a un análisis con STRs (Goodwin *et al.*, 2011; Villavicencio y Guardado, 2017).

1.3 Perfil genético humano como herramienta de identificación

Para el análisis de ADN, en los laboratorios forenses se llevan a cabo una serie de pasos. Después de la recolección del material biológico, el ADN se extrae de su fuente biológica y posteriormente se cuantifica para evaluar la cantidad de ADN recuperado. Regiones específicas del ADN, recuperado de la fuente biológica, se amplifican mediante la técnica de biología molecular conocida como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y posteriormente distintos *loci* (*Short Tandem Repeat*) se separan utilizando la técnica de electroforesis en gel o capilares, pudiendo designar el perfil genético de ADN de la muestra. Finalmente, los perfiles generados se comparan con muestras de referencia conocidas y los resultados se interpretan estadísticamente para concluir si los perfiles genéticos coinciden o no (Alleyne *et al.*, 2009; Butler, 2011).

Un perfil genético humano es una combinación de genotipos de STRs individuales (Butler, 2005).

1.4 Validación

La validación es un proceso mediante el cual se evalúa si un determinado método de laboratorio es robusto, confiable y reproducible (Butler, 2011; Li, 2015). Estas tres cualidades son importantes para los métodos llevados a cabo en laboratorios forenses debido a que permite obtener resultados exitosos (robusto); precisos, reflejando correctamente la muestra que se prueba (confiable); e iguales o muy similares cada vez que se evalúa la muestra (repetibilidad) (Butler, 2011).

La validación de los métodos aplicados en un laboratorio forense se efectúa en dos etapas: validación de desarrollo y validación interna. La validación de desarrollo es la obtención de datos de prueba y la determinación de qué condiciones o limitantes existen en una nueva metodología de

análisis de ADN (Li, 2015). Este tipo de validación se realiza por los fabricantes de *kits* comerciales y grandes laboratorios forenses (Butler, 2011).

La validación interna es el proceso de verificar que los procedimientos establecidos, previamente validados por el desarrollo, funcionen efectivamente en el propio laboratorio en condiciones concretas. Esta validación es realizada en laboratorios de ADN forense locales y estatales (Butler, 2011).

La validación interna se realiza en diversos métodos de análisis siguiendo los criterios de la publicación “*Recommended Minimum Criteria for the Validation of Various Aspects of the DNA Profiling Process*” (ENFSI DNA Working Group, 2010), las guías de la publicación “*SWGDM Validation Guidelines for DNA Analysis Methods*” (SWGDM, 2016), y los estándares de “*Quality Assurance Standards for Forensic DNA Testing Laboratories*” (FBI,2000). Esto se establece por la “*European Network of Forensic Science Institutes*” (ENFSI), por el “*Scientific Working Group on DNA Analysis Methods*” y por el “*Federal Bureau of Investigation*”. El ENFSI realiza el intercambio de estudios en el campo de la ciencia forense para mejorar la calidad de su divulgación en Europa y el SWGDAM evalúa las metodologías llevadas a cabo en biología forense y protocolos. Además, estas son investigadas con el fin de mejorarlas y proporcionar recomendaciones sobre estándares de calidad en el análisis del ADN. En México y otros países de habla española, el Grupo de Habla Española y Portuguesa de la “*International Society for Forensic Genetics*” (GHEP-ISFG) difunde lo establecido por los otros dos grupos.

Los estudios de validación interna se deben realizar de acuerdo con los siguientes pasos (Dragan *et al.*, 2014; SWGDAM, 2016):

- Muestras conocidas: Los métodos deben evaluarse y probarse con muestras conocidas, y los resultados obtenidos deben compararse con resultados anteriores realizados en muestras conocidas (FBI, 2000; SWGDAM, 2016).
- Precisión y Exactitud: Se evalúa la exactitud y precisión de los resultados repetidos y reproducidos. La exactitud es el grado de proximidad entre el valor obtenido en el ensayo y el esperado, y la precisión es el grado de proximidad entre una serie de valores, medidas o resultados individuales obtenidos en un ensayo (FBI, 2000; SWGDAM, 2016).

- Repetibilidad: es la habilidad de obtener el mismo resultado al repetir el método con los mismos instrumentos y se lleve a cabo el mismo investigador (FBI, 2000; SWGDAM, 2016).
- Reproducibilidad: es la habilidad de obtener el mismo resultado al repetir el método cambiando los instrumentos y al investigador que lo realizó (FBI, 2000; SWGDAM, 2016).
- Contaminación: es la introducción de ADN, o material biológico que contiene ADN, a una muestra. La contaminación puede resultar de la exposición de la muestra al material biológico (Forensic Science Regulator, 2015). Esto puede provocar un análisis erróneo de la muestra o incluso, no permitir el análisis de esta. Para conocer una posible contaminación el laboratorio deberá evaluar, utilizando muestras control y muestras conocidas, la detección de contaminantes (SWGDAM, 2016).

2. ANTECEDENTES

2.1 Estudios previos a nivel mundial

Lord y colaboradores (1998) llevaron a cabo la extracción, amplificación y secuenciación de ADN mitocondrial humano obtenido del tracto digestivo de piojos adultos de la especie *Pthirus pubis* (nombre científico asignado por Lineo, 1758). Este estudio propuso por primera vez emplear el ADN aislado a partir de insectos como una posible herramienta de identificación humana en el área forense. Cabe destacar que el enfoque era la identificación del posible agresor, a quien el insecto pudo haber usado como fuente de alimentación (Lord *et al.*, 1998).

Esta propuesta de identificación humana en el ámbito forense permitió el desarrollo de diversos estudios similares a nivel mundial. En la tabla 1 se muestran los estudios llevados a cabo en el extranjero. Además, se expone brevemente lo realizado en el estudio, el país y año en que se desarrolló, y la especie de insecto utilizada.

Tabla 1. Estudios a nivel mundial en los que se ha llevado a cabo la obtención de ADN humano a partir de insectos hematófagos y necrófagos para la identificación forense.

País	Estudio	Especie utilizada	Descripción
EUA	(Lord <i>et al.</i> , 1998)	<i>Pthirus pubis</i> (Lineo, 1758) (Phthiraptera: Pthiridae)	Se logró la extracción y análisis de ADN mitocondrial humano. El mismo fue obtenido del tracto digestivo de piojos alimentados con tejido sanguíneo humano. Los piojos se sacrificaron mediante congelación y posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente. Δ
Austria	(Kreike y Kampfer, 1999)	Díptera: Culicidae	El estudio llevó a cabo exitosamente la extracción y caracterización de ADN humano a partir de mosquitos. Además, mostró que es posible extraer ADN humano de un mosquito hasta 26 horas después de haberse alimentado y reportó que la cantidad de ADN obtenida es suficiente y de buena calidad para obtener un “DNA typing”
EUA	(Chow-Shaffer <i>et al.</i> , 2000)	<i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).	El estudio analizó STRs de muestras humanas obtenidas del sistema digestivo de <i>Aedes aegypti</i> . Asimismo, mostró que el ADN humano no se degrada dentro de las 24 horas después de la alimentación en el sistema digestivo del mosquito. Para permitir esta condición, la temperatura ambiental debe ser de 29 °C. Aunado a

			ello, la cantidad de tejido sanguíneo que toma el mosquito es suficiente para la obtención de un perfil genético humano, condición otorgada cuando el culicido se alimenta solo de una persona.
EUA	(Wells <i>et al.</i> , 2001)	<i>Cynomyopsis cadaverina</i> (Robineau-Desvoidy, 1830) (Diptera: Calliphoridae)	Recabaron ADN mitocondrial humano del intestino de larvas, en tercer instar, alimentadas con tejido humano (hígado). Las larvas fueron preservadas en etanol al 70 % a -20 °C. Para la extracción del ADN humano, se extirpo solo el saco gástrico de la larva. Δ
EUA	(DiZinno <i>et al.</i> , 2002)	<i>Omosita spp.</i> (Coleoptera: Nitidulidae)	Realizaron la secuenciación de ADN mitocondrial humano obtenido del intestino de larvas alimentadas con tejido humano. Las larvas fueron recolectadas juntamente con restos humanos esqueletizados y almacenados en refrigeración. Δ
EUA	(Linville <i>et al.</i> , 2004)	<i>Calliphora vicina</i> (Robineau-Desvoidy, 1830) (Diptera: Calliphoridae)	Realizaron la extracción y secuenciación de ADN humano. Además, reportaron que, durante la extracción del ADN del saco gástrico de la larva, una cantidad considerable de ADN humano se pierde. Se preservó en etanol a bajas temperaturas. Esto permitió, incluso después de seis meses, secuencias ADN mitocondrial humano y un análisis de STRs. Δ
Alemania	(Zehner <i>et al.</i> , 2004)	Diptera: Calliphoridae, Sarcophagidae y Muscidae	Obtuvieron perfiles genéticos humanos completos (con marcadores STRs) a partir del análisis del contenido del saco gástrico de larvas de dípteros en tercer instar. Estas se alimentaron del tejido de cadáveres y fueron almacenadas en etanol al 70 %. Δ
Italia	(Campobasso <i>et al.</i> , 2005)	<i>Calliphora vicina</i> (Robineau-Desvoidy, 1830) (Diptera: Calliphoridae)	El estudio determinó que se puede obtener una buena cantidad de ADN humano de larvas en tercer instar, lo que permitió obtener un análisis con marcadores STRs exitoso.
Italia	(Spitaleri <i>et al.</i> , 2006)	Diptera: Culicidae	El estudio logró la amplificación de ADN humano. El ADN se obtuvo de los restos de un díptero (localizado sobre una mancha de sangre seca) en un muro de una escena del crimen. *
EUA	(Szalanski <i>et al.</i> , 2006a)	<i>Cimex lectularius</i> (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Cimicidae)	Analizaron hasta qué tiempo es posible la obtención de ADN humano de cimícidos después de su alimentación.

EUA	(Szalanski <i>et al.</i> , 2006b)	<i>Cimex lectularius</i> (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Cimicidae)	Aislaron exitosamente ADN humano del sistema digestivo de chinches. Los investigadores utilizaron marcadores nucleares y mitocondriales. Además, reportaron que la utilización de chinches tiene una ventaja sobre otros insectos hematófagos porque los hemípteros permanecen en una escena del crimen.
Turquía	(Kondakci <i>et al.</i> , 2009)	<i>Lucilia sericata</i> (Meigen, 1820) (Diptera: Calliphoridae)	Investigaron si es posible obtener un perfil genético de ADN humano aislado de larvas alimentadas con tejido de pacientes diabéticos. Δ
China	(Li <i>et al.</i> , 2011)	<i>Aldrichina grahami</i> (Aldrich, 1930) (Diptera: Calliphoridae)	Obtuvieron perfiles genéticos en la extracción de ADN humano del contenido gástrico de larvas en tercer instar y pupas. Se realizó un análisis de STRs. El enfoque del estudio fue la asociación de larvas y cadáver. *
Croacia	(Curic <i>et al.</i> , 2014)	Diptera: Culicidae	Amplificaron el ADN humano mediante la utilización de <i>kits</i> de PCR y se obtuvieron perfiles genéticos humanos completos. Los dípteros utilizados eran adultos pertenecientes a dos tipos de subfamilias: Anophelinae y Culicinae. Δ
Arabia Saudita	(Ibrahim, 2015)	<i>Culex pipiens</i> (Linnaeus, 1758) (Diptera: Culicidae)	Investigó el impacto de la edad del mosquito hembra sobre la muestra de ADN humano, obtenido de su alimento: tejido sanguíneo humano.
Arabia Saudita	(Ibrahim y Alaifan, 2015)	<i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) <i>Culex pipiens</i> (Linnaeus, 1758) (Diptera: Culicidae)	Analizaron cómo las condiciones de temperatura y el tiempo transcurrido después de alimentarse, afectan la concentración del ADN humano contenido en el sistema digestivo de dos especies de culícidos.
Kenia	(Njau <i>et al.</i> , 2015)	<i>Protophormia terraenovae</i> (Robineau-Desvoidy, 1830) (Diptera: Calliphoridae)	Evaluaron cómo la cantidad de ADN humano decrece por el tiempo transcurrido en el intestino de una larva en tercer instar. Estas larvas se mantuvieron en dos condiciones: alimentadas (con tejido animal no humano) y en ayuno, ambas condiciones dadas después de alimentarse de tejido humano. Δ
Italia	(Pilli <i>et al.</i> , 2016)	<i>Pediculus humanus capitis</i> (De Geer) (Phthiraptera: Pediculidae)	Aislaron ADN humano de piojos encontrados en la casa de una mujer que había muerto por causas desconocidas. Llevaron a cabo la aplicación de métodos de secuenciación de siguiente

generación y así, obtuvieron un perfil genético * Δ

EUA	(Schal <i>et al.</i> , 2018)	<i>Cimex lectularius</i> ((Lehane, 2005) (Hemiptera: Cimicidae)	Obtuvieron ADN humano en diversas cantidades de chinches investigando cómo se afecta con el paso del tiempo.
------------	------------------------------	---	--

*Estudios aplicados en la investigación de un delito

ΔEstudios publicados en el *Journal Forensic Science*

2.2 Estudios previos en México

Nava-Hernández y colaboradores (2008) llevaron a cabo en la Ciudad de México el primer estudio en el país que logró la obtención de un perfil genético a partir de ADN humano aislado del sistema digestivo de cinco especies de larvas de dípteros en tercer instar de las familias Calliphoridae y Sarcophagidae. Desde entonces se han llevado a cabo cuatro estudios enfocados en la obtención de ADN humano del tracto digestivo de especies de dípteros de las familias Calliphoridae, Sarcophagidae y Culicidae, y en una especie de coleóptero de la familia Dermestidae.

En la siguiente tabla se muestran los estudios realizados en el país sobre la obtención de ADN humano a partir de insectos hematófagos y necrófagos. Se describe brevemente lo realizado en cada estudio, el estado y año en que se desarrolló, y la especie o especies de insectos utilizadas. Estos estudios plantean procedimientos metodológicos diferentes, desde el tratamiento y recolección de las muestras entomológicas, hasta las condiciones de laboratorio.

Tabla 2. Estudios realizados en México en los que se ha llevado a cabo la obtención de ADN humano a partir de insectos hematófagos y necrófagos para la identificación forense.

Estado	Estudio	Especie utilizada	Descripción
Ciudad de México	(Nava-Hernández <i>et al.</i> , 2008)	<i>Chrysomya rufifacies</i> (Macquart, 1843) <i>Chrysomya megacephala</i> (Fabricius, 1794) <i>Cochliomyia macellaria</i> (Fabricius, 1775) <i>Lucilia sericata</i> (Meigen, 1820) <i>Lucilia cuprina</i> (Wiedemann, 1826) y <i>Sarcophaga sp.</i> (Diptera: Calliphoridae; Sarcophagidae)	Se obtuvo un perfil genético humano a partir de la extracción de tejido humano de larvas de dípteros. El tejido fue fijado en tarjetas FTA®, técnica que permitió dar un alto rendimiento para la amplificación de STRs.
Nuevo León	(Chávez-Briones <i>et al.</i> , 2013)	Diptera: Calliphoridae y Sarcophagidae	Se utilizó como herramienta de identificación humana donde, debido a las condiciones del cuerpo (altamente carbonizado), se optó por analizar el alimento en el sistema digestivo de

			larvas de dípteros localizadas sobre el cuerpo. Las larvas pertenecían a dos familias y se preservaron en etanol al 70 % a 4 °C. * Δ
Estado de México	(García, 2013)	<i>Lucilia sericata</i> (Méigen, 1826) (Diptera: Calliphoridae) y <i>Calliphora vicina</i> (Rodineau-Desvoidy, 1830) (Diptera: Calliphoridae)	Se desarrolló una tesis de licenciatura que reportó la obtención de un perfil genético humano a partir del contenido gástrico de larvas de dos especies de dípteros. Las larvas fueron colectadas en segundo y tercer instar. Las mismas fueron tratadas con agua hirviendo y posteriormente almacenadas en etanol al 70 % a 4 °C. T
Ciudad de México	(De la Cruz, 2014)	Diptera: Culicidae	Se realizó una tesina de licenciatura que reportó la obtención de un perfil genético humano de una muestra de tejido sanguíneo humano a partir de mosquitos hembra. T
Ciudad de México	(Ortega-Rosales <i>et al.</i> , 2016)	<i>Dermestes maculatus</i> (De Geer, 1774) (Coleoptera: Dermestidae)	Se obtuvo un perfil genético humano a partir del tejido extraído del saco gástrico de larvas de <i>D. maculatus</i> .

*Estudios aplicados en la investigación de un delito

ΔEstudios publicados en el *Journal Forensic Science*

T Estudios de tesis/tesina

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El incremento de personas desaparecidas en los últimos años y el hallazgo de cadáveres y/o restos humanos, principalmente en fosas clandestinas en gran parte de la República Mexicana, hace urgente contar con procedimientos para la identificación humana en una diversidad de circunstancias.

Por otra parte, al implementarse el sistema penal oral acusatorio, se debe unificar el procedimiento penal y realizar la investigación del delito explorando todas las líneas de investigación posibles que permitan allegarse de datos para el esclarecimiento del hecho como lo establece el artículo 212, párrafo segundo del Código Nacional de Procedimientos penales (2016). Además del deber de contar con protocolos que tiene que desarrollarse en la investigación pericial basados en evidencias científicas, como lo plantea el Código Nacional de Procedimientos Penales (2016), en su artículo décimo primero transitorio.

La presente propuesta de protocolo pretende estandarizar experimentalmente el tratamiento y análisis de indicios entomológicos y así, posibilite la obtención de perfiles humanos útiles para la identificación humana. Asimismo, informa sobre cómo pueden ser utilizados los insectos necrófagos y hematófagos en un caso forense y los factores que se deben tomar en cuenta para su utilización, además de asistir en su identificación y procesamiento en un lugar de intervención y en laboratorio.

4. JUSTIFICACIÓN

La identificación humana a través de la genética ha adquirido gran relevancia como parte de un análisis forense ya que hace posible la identificación de personas. El análisis genético permite obtener resultados en pocas horas, usando cantidades traza, así como indicios de distinta índole (muestras antiguas y con cierto grado de degradación), lo cual no es posible con otras técnicas de identificación. Existen un gran número de metodologías que permiten la obtención de ADN a partir de una fuente directa de tejido humano. En estudios previos se ha reportado que es posible llevar a cabo la identificación humana a partir de insectos necrófagos y hematófagos, ya sea porque el tejido humano no se encuentra en el lugar de intervención o bien, para confirmar que el insecto ha usado al humano como fuente de alimentación (Lord *et al.*, 1998; Kreike y Kampfer, 1999; Chow-Shaffer *et al.*, 2000; Wells *et al.*, 2001; DiZinno *et al.*, 2002; Linville *et al.*, 2004; Zehner *et al.*, 2004; Campobasso *et al.*, 2005; Spitaleri *et al.*, 2006; Szalanski *et al.*, 2006^a; Szalanski *et al.*, 2006^b; Nava-Hernández *et al.*, 2008; Kondakci *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011; Chávez-Briones *et al.*, 2013; García, 2013; Curic *et al.*, 2014; De la Cruz, 2014; Ibrahim, 2015; Ibrahim *et al.*, 2015; Njau *et al.*, 2015; Ortega-Rosales *et al.*, 2016; Pilli *et al.*, 2016; Schal *et al.*, 2018).

Pese a las ventajas potenciales del uso de insectos en la identificación genética humana, la información de las metodologías se encuentra dispersa en distintas publicaciones de casos específicos y no hay un estudio que integre la información disponible al respecto. Tampoco existe un protocolo para la identificación y el tratamiento de indicios entomológicos con fines de identificación humana.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General:

- Elaborar una propuesta de protocolo para la identificación y tratamiento de indicios entomológicos en un lugar de intervención y en laboratorio con fines de identificación humana.

5.2 Objetivos Específicos:

- Revisar las metodologías usadas para el tratamiento de indicios entomológicos a ser utilizados con fines de identificación humana en aspectos forenses.
- Identificar patrones metodológicos útiles para la identificación humana y elaborar con base en ellos una propuesta de protocolo para casos en que pueda aplicarse la identificación humana a partir de insectos.
- Desarrollar una guía visual que permita la identificación de grupos de insectos hematófagos y necrófagos.

6. METODOLOGÍA

6.1 Búsqueda de estudios previos

Se realizó una búsqueda de trabajos publicados utilizando las siguientes palabras claves: “*human DNA isolation by insects*”, “*human identification by insects*”, “*forensic entomology*”, “*forensic genetic*”, “*blood meal analysis*”, “*Human DNA profiling*”, en bases de datos de Bibliotecas y revistas: *Journal Forensic Science*, Elsevier, *International Journal of Mosquito Research*, *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), PubMed, SciELO, Sociedad Mexicana de Entomología, SIBIUNAM, Springer y en Google Scholar. De cada trabajo se realizó una revisión de los métodos de biología molecular empleados, el tratamiento de las muestras y el tipo de insecto utilizado.

6.2 Selección de trabajos

Los trabajos de investigación seleccionados cumplieron con todos los requisitos siguientes:

- Llevar a cabo algún método de biología molecular en insectos para la obtención de ADN humano.
- El método debió obtener el ADN humano del sistema digestivo del insecto.
- El estudio hiciera mención de su posible aplicación en el área forense o se hubiera aplicado en un caso forense

6.3 Diseño de la rúbrica de revisión de trabajos previos

Para la revisión, se diseñó una rúbrica enfocada a sintetizar la información sobre el método utilizado para el tratamiento de insectos necrófagos y hematófagos. La rúbrica se dividió en 11 apartados: (1) *Trabajo*, donde se colocó la cita del estudio; (2) *Especie de insecto* donde se escribió el nombre científico de la especie de insecto, así como la familia y el orden al que pertenece; (3) *objetivo del estudio*; (4) *tratamiento de la muestra*, tratamiento al que fue sometido el insecto desde su recolección y hasta antes de extraer el ADN humano; (5) *tamaño de la muestra*; incluso de las (6) *muestras control positivo y negativo* utilizadas en el estudio; (7) *método de extracción* de ADN nuclear o mitocondrial; (8) *método de cuantificación*; (9) *método de amplificación*; (10) *método de secuenciación*; y (11) *resultados* obtenidos en la investigación. Esta rúbrica fue aplicada a cada estudio que cumpliera con los criterios arriba mencionados.

6.4 Elaboración del protocolo para la identificación y tratamiento de indicios entomológicos en el lugar de intervención y en laboratorio, con fines de identificación humana

El protocolo se divide en cuatro partes tituladas: Entomología Forense, Identificación de insectos necrófagos y hematófagos, Tratamiento de indicios entomológicos en el lugar de intervención, y Tratamiento en laboratorio.

La primera parte, “Entomología Forense”, es un apartado donde se compiló información sobre generalidades de la ciencia, qué es un insecto necrófago y hematófago, cómo se aplica en la identificación humana en la genética forense y qué variables deben tomarse en cuenta para su utilización.

La segunda parte, “Identificación de insectos necrófagos y hematófagos”, se organizó en órdenes y familias. Cada orden y familia se ilustró con una especie y se informó sobre las características morfológicas y hábitat de distribución de esta.

En la tercera parte, “Tratamiento de indicios entomológicos en el lugar de intervención”, se indicó el material, equipo requerido y procedimientos para la recolección y preservación del insecto reportados en los estudios previos.

La última parte, “Tratamiento en laboratorio” se refirió al procedimiento que se realiza al insecto para la obtención y análisis del ADN humano a partir del sistema digestivo de este.

7. RESULTADOS

Se realizó una búsqueda a nivel internacional y nacional de estudios publicados, sin definir límites cronológicos, sobre la obtención de ADN humano a partir del sistema digestivo de insectos hematófagos y necrófagos, enfocados en su aplicación en el área forense. De esta búsqueda se obtuvo un total veinticuatro trabajos que cumplieron todos y cada uno de los criterios de selección indicados anteriormente. Del total de trabajos encontrados, diecinueve de ellos se desarrollaron a nivel internacional y cinco de ellos a nivel nacional.

La revisión de los trabajos fue de manera documental, empleando una rúbrica diseñada para sintetizar y conocer los métodos de biología molecular empleados, el tratamiento de las muestras y el tipo de insecto utilizado. La información obtenida de cada trabajo se presenta a continuación:

7.1 Estudios en identificación humana a partir de insectos

a) Estudio 1: “*Isolation, amplification, and sequencing of Human mitochondrial DNA obtained from Human Crab Louse, Pthirus Pubis (L.), Blood Meals*”

b) Rúbrica de revisión

Trabajo	Lord <i>et al.</i> , 1998	
Especie de insecto	<i>Pthirus pubis</i> (Lineo, 1758) (Phthiraptera: Pthiridae)	
Objetivo del estudio	Obtención de ADN mitocondrial humano de piojos	
Tratamiento de las muestras	Después de su recolección, los insectos fueron sacrificados por congelamiento y después se desecaron a 22 °C. Posteriormente cada individuo se lavó con agua destilada y se le realizó una disección longitudinal sobre la línea media en la región dorsal. Después se colocó (un piojo o grupo de tres) en 300 µl de buffer de extracción	
Tamaño de la muestra	8 piojos	
Muestras control	Positivo	Saliva humana
	Negativo	No se emplea
Método de extracción	Extracción orgánica: fenol/cloroformo/alcohol isoamílico	
Método de cuantificación	Sin mención	
Método de amplificación	Se amplificó la región hipervariable HV2 por PCR utilizando los oligonucleótidos: HV2-A L048/H285 HV2-B L172/H408	
Método de secuenciación	Secuenciación por Sanger	
Resultados	El análisis de ADN mitocondrial humano se logró con éxito utilizando a un individuo insecto y al emplear un grupo de tres insectos. Todas las secuencias realizadas, al compararse con la muestra de referencia (saliva), concordaron.	

a) Estudio 2: “*Isolation and characterization of human DNA from mosquitoes (Culicidae)*”

b) Rúbrica de revisión

Trabajo		Kreike y Kampfer, 1999
Especie de insecto		Díptera: Culicidae
Objetivo del estudio		Extraer ADN humano de culícidos hasta 26 horas después de alimentarse para observar la rapidez de digestión del mosquito.
Tratamiento de las muestras		2 culícidos fueron sacrificados por congelación y la sangre humana se colocó sobre papel y se desecó a temperatura ambiente. 2 culícidos se colocaron en tubos Falcon de 50 ml a temperatura ambiente durante 26 h. Posteriormente se sacrificaron por congelación.
Tamaño de la muestra		4 culícidos adultos
Muestras control	Positivo	Saliva humana
	Negativo	No se emplea
Método de extracción		No orgánica: Columnas de resina
Método de cuantificación		Sin mención
Método de amplificación		Se amplificó el marcador D1S80 por PCR
Método de secuenciación		Secuenciación por Sanger
Resultados		De varios mosquitos analizados, sólo se obtuvo ADN humano de cuatro. Tres de ellos contenían ADN humano de una sola persona, mientras que uno de ellos contuvo ADN de dos personas. Se observó que el ADN humano se presentó en cantidad y calidad necesarias, lo que permitió la amplificación del loci D1S80, sin embargo, estos datos no se mostraron en el estudio publicado.

a) Estudio 3: “*Laboratory and Field Evaluation of Polymerase Chain Reaction-Based Forensic DNA Profiling for Use in Identification of Human Blood Meal Source of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)*”

b) Rúbrica de revisión

Trabajo		Chow-Shaffer <i>et al.</i> , 2000
Especie de insecto		<i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)
Objetivo del estudio		Desarrollar una metodología de obtención de ADN humano a través de insectos que permita su utilización en campo
Tratamiento de las muestras		El insecto fue sacrificado por congelamiento y colocado sobre papel filtro. Después se procedió a cortar el abdomen y trasladarlo a papel filtro para comprimirlo con la ayuda de una espátula. La mancha de sangre obtenida se colocó con 400 µl de buffer a temperatura ambiente (Alternativamente se almacenó la mancha de sangre a temperatura ambiente y luego se colocó en el buffer)
Tamaño de la población		100 mosquitos

Muestras control	Positivo	Saliva humana
	Negativo	Mosquito hembra sin alimentarse
Método de extracción		Extracción orgánica: Fenol/cloroformo El ADN extraído se almacenó a dos temperaturas diferentes dependiendo del tiempo. a 4 °C (por una semana) y a -20 °C (por más de una semana)
Método de cuantificación		Slot Blot
Método de amplificación		Se amplificaron loci STRs CSF1PO, TPOX y THO1 por PCR
Método de secuenciación		Secuenciación por Sanger
Resultados		El tratamiento de las muestras demostró ser efectivo para la obtención de una buena cantidad de ADN humano. Para una buena amplificación se utilizó de 1 a 5 ng del ADN humano. Se demostró que la cantidad de ADN humano disminuye en el sistema digestivo del insecto. En promedio, durante las primeras 8 horas disminuye 67 % y 90 % durante las 24 h, ambos a una temperatura de 29 °C Se obtuvieron perfiles completos de 20 mosquitos y 10 de estos perfiles, concordaron con los perfiles de muestras de referencia.

a) Estudio 4: “*Human and Insect Mitochondrial DNA Analysis from Maggots*”

b) Rúbrica de revisión

Trabajo		Wells <i>et al.</i> , 2001
Especie de insecto		<i>Cynomyopsis cadaverina</i> (Robineau-Desvoidy, 1830) (Diptera: Calliphoridae)
Objetivo del estudio		Obtención de ADN mitocondrial humano del sistema digestivo de larvas
Tratamiento de las muestras		Larvas en tercer instar (12 mm de longitud) se recolectaron, preservaron en etanol al 70 % y almacenaron a -20 °C. Posteriormente a cada larva se le realizó una disección, obteniendo el saco gástrico (3 mm de longitud aproximadamente)
Tamaño de la muestra		5 larvas
Muestras control	Positivo	Sangre humana
	Negativo	Mosca adulta
Método de extracción		No orgánica: Utilización de columnas con membranas de sílice
Método de cuantificación		Sin mención
Método de amplificación		Se amplificó la región hipervariable 2 (HV2) por PCR utilizando los oligonucleótidos: F155 y R340
Método de secuenciación		Secuenciación por Sanger
Resultados		Se logró el análisis de ADN mitocondrial humano de tres de cinco larvas de <i>Cynomyopsis cadaverina</i> .

a) Estudio 5: “*Mitochondrial DNA sequencing of beetle larvae (Nitidulidae: Omosita) recovered from human bone*”

b) Rúbrica de revisión

Trabajo	DiZinno <i>et al.</i> , 2002	
Especie de insecto	<i>Omosita spp.</i> (Coleoptera: Nitidulidae)	
Objetivo del estudio	Obtener ADN mitocondrial del sistema digestivo de larvas de nitidúlidos	
Tratamiento de las muestras	Larvas y restos óseos se recolectaron conjuntamente y preservaron a bajas temperaturas. Posteriormente, las larvas y restos óseos se analizaron por separado. El exterior de cada larva se lavó con una solución de etanol al 70 %. Después se dividieron en dos grupos: Grupo 1: Se les realizó una disección en la región dorsal, a lo largo de la línea media. Grupo 2: Se mantuvieron intactas. Finalmente, una larva o grupo de 3 se colocaron en 300 µl de buffer de extracción.	
Tamaño de la muestra	Sin mención	
Muestras control	Positivo	Hueso humano
	Negativo	No se emplea
Método de extracción	Extracción orgánica: fenol/cloroforno/alcohol isoamílico	
Método de cuantificación	Electroforesis capilar	
Método de amplificación	Se amplificaron las regiones hipervariables 1 (HV1) y 2 (HV2) por PCR	
Método de secuenciación	Secuenciación por Sanger	
Resultados	A pesar de extraer una cantidad pequeña de ADN mitocondrial (5 ng/µl) del contenido gástrico de la larva, se obtuvo una secuencia. Esta secuencia y la secuencia de la muestra de referencia se analizaron y concordaron.	

a) Estudio 6: “*Mitochondrial DNA and STR Analyses of Maggot Crop Contents: Effect of Specimen Preservation Technique*”

b) Rúbrica de revisión

Trabajo	Linville <i>et al.</i> , 2004	
Especie de insecto	<i>Calliphora vicina</i> (Robineau-Desvoidy, 1830) (Diptera: Calliphoridae)	
Objetivo del estudio	Verificar qué técnica de preservación de muestras, por periodos de tiempo diferentes, afecta la obtención de ADN humano de larvas	
Tratamiento de las muestras	Las larvas se alimentaron con tejido de un bazo humano y recolectaron después de cuatro días de desarrollo. Posteriormente se formaron 24 grupos de tres larvas cada uno. Los grupos se preservaron con 8 maneras diversas por periodos de tiempo (2 semanas, 8 semanas y 6 meses). Después de la preservación, el exterior de la larva se lavó. El lavado consistió en colocar la larva en un tubo con 1 ml de solución de cloro al 20 % por 2 h. Después la larva se enjuagó dos veces con 1 ml de agua destilada.	

		<p>A continuación del lavado, se extrajo el saco gástrico mediante el corte de dos o tres segmentos posteriores de la larva y una incisión ventral desde la parte posterior hasta el extremo anterior de la larva</p> <p>Grupo control: 5 larvas se sacrificaron inmediatamente y disecaron</p> <p>Grupo 1.1: a -70 °C por 2 semanas</p> <p>Grupo 1.2: a -70 °C por 8 semanas</p> <p>Grupo 1.3: a -70 °C por 6 meses</p> <p>Grupo 2.1: a 4 °C por 2 semanas</p> <p>Grupo 2.2: a 4 °C por 8 semanas</p> <p>Grupo 2.3: a 4 °C por 6 meses</p> <p>Grupo 3.1: a 24 °C por 2 semanas</p> <p>Grupo 3.2: a 24 °C por 8 semanas</p> <p>Grupo 3.3: a 24 °C por 6 meses</p> <p>Grupo 4.1: en etanol al 70 % a 4 °C por 2 semanas</p> <p>Grupo 4.2: en etanol al 70 % a 4 °C por 8 semanas</p> <p>Grupo 4.3: en etanol al 70 % a 4 °C por 6 meses</p> <p>Grupo 5.1: en etanol al 70 % a 24 °C por 2 semanas</p> <p>Grupo 5.2: en etanol al 70 % a 24 °C por 8 semanas</p> <p>Grupo 5.3: en etanol al 70 % a 24 °C por 6 meses</p> <p>Grupo 6.1: en etanol al 95 % a 24 °C por 2 semanas</p> <p>Grupo 6.2: en etanol al 95 % a 24 °C por 8 semanas</p> <p>Grupo 6.3: en etanol al 95 % a 24 °C por 6 meses</p> <p>Grupo 7.1: en solución Kahle a 24 °C por 2 semanas</p> <p>Grupo 7.2: en solución Kahle a 24 °C por 8 semanas</p> <p>Grupo 7.3: en solución Kahle a 24 °C por 6 meses</p> <p>Solución Kahle: 30 ml de etanol al 95%, 12 ml de formaldehido, 4 ml de ácido acético glacial y 60 ml de agua</p> <p>Grupo 8.1: en formaldehido a 24 °C por 2 semanas</p> <p>Grupo 8.2: en formaldehido a 24 °C por 8 semanas</p> <p>Grupo 8.3: en formaldehido a 24 °C por 6 meses</p> <p>72 larvas más fueron utilizadas para repetir el procedimiento</p>	
Tamaño de la muestra		149 larvas	
Muestras control	Positivo	Tejido de bazo humano	
	Negativo	No se emplea	
Método de extracción		No orgánica: Columnas con membrana de sílice	
Método de cuantificación		Hibridación	
Método de amplificación		Se amplificó la región HV2 por PCR utilizando los oligonucleótidos F34 y R370.	Se amplificaron 16 loci STRs por PCR
Método de secuenciación		Secuenciación por Sanger	
Resultados		El estudio demostró que la cantidad de ADN disminuye al transcurrir el tiempo. Además de dar a conocer que preservar las muestras a -70 °C permite obtener con mayor éxito	

	<p>un perfil genético completo y este puede ser comparado con el perfil genético de la muestra de referencia.</p> <p>Las muestras almacenadas con etanol al 95 % y 70 % a temperatura ambiente (24 °C) preservaron el ADN, sin embargo, sólo el 42 % de estas muestras dieron perfiles genéticos completos.</p> <p>El almacenamiento de las muestras a 4 °C no detiene el proceso de degradación del ADN en el sistema digestivo de la larva, situación que ocurrió con las muestras a temperatura ambiente (24 °C).</p> <p>Se reportó la obtención con mayor éxito secuencias mtADN que secuencias de STRs</p>
--	---

a) Estudio 7: “*STR Typing of Human DNA from Fly Larvae Fed on Decomposing Bodies*”

b) Rúbrica de revisión

Trabajo	Zehner <i>et al.</i> , 2004	
Especie de insecto	Diptera: Calliphoridae, Sarcophagidae y Muscidae	
Objetivo del estudio	Analizar ADN humano obtenido del sistema digestivo de larvas necrófagas alimentadas con tejido en estado de putrefacción (con un IPM de hasta cuatro meses) y asociar las larvas y el cadáver	
Tratamiento de las muestras	Se colectaron larvas en tercer instar. Se sacrificaron en agua a 100 °C y almacenaron en etanol al 70 % por un rango de tiempo de 1 día a 2 meses. Posteriormente cada larva se diseccionó en la región dorsal y se obtuvo el saco gástrico (1 a 3 mm de largo).	
Tamaño de muestra	Sin mención	
Muestras control	Positivo	Tejido humano (obtenido de cadáveres en estado de putrefacción)
	Negativo	Larvas (Diptera: Calliphoridae) alimentadas con tejido de cerdo
Método de extracción	Extracción orgánica: fenol/cloroformo/alcohol	
Método de cuantificación	Sin mención	
Método de amplificación	Se amplificaron las regiones HV1 y HV2 por PCR utilizando los oligonucleótidos F15971/ R16410 para HV1, y L48/H408 para HV2. Además, se realizó un cambio en los ciclos: 32 ciclos en lugar de 29 para amplificar el ADN del saco gástrico	Se amplificaron 10 loci STRs por PCR utilizando el kit multiplex Profiler Plus (Applied Biosystem)
Método de secuenciación	Secuenciación por Sanger	
Resultados	Para un análisis exitoso de STR, se utilizó un grupo de más de cuatro larvas. En siete de los 13 casos, se obtuvo un perfil completo de STRs de las muestras obtenidas del saco gástrico. Todos los perfiles de STRs concordaron con el perfil obtenido de las muestras de tejido humano. La preservación de las larvas en etanol al 70 % resultó benéfico para la obtención de perfiles de STR, incluso después de 2 meses.	

a) Estudio 8: “*Forensic Genetic Analysis of Insect Gut Contents*”

b) Rúbrica de revisión

Trabajo	Campobasso <i>et al.</i> , 2005	
Especie de insecto	<i>Calliphora vicina</i> (Rodineau-Desvoidy, 1830) (Diptera: Calliphoridae)	
Objetivo del estudio	Determinar en qué etapa larval es posible obtener ADN en buenas condiciones para su análisis y determinar el tiempo post-ingesta en el que es posible obtener ADN humano de la larva cuando esta se deja de alimentar.	
Tratamiento de las muestras	Se recolectaron larvas en diferentes estadios larvales: con menos de dos días de edad, con entre 2 y 2.5 días de edad, con entre 2.5 y 4.5 días de edad (tercer instar), y con entre 4.5 y 6.5 días de edad. Un grupo de cada estadio larval se preservó inmediatamente después de su recolección Un grupo de cada estadio larval, después de su recolección, se mantuvo sin alimento hasta por 24 horas Un grupo de cada estadio larval, después de su recolección, se mantuvo sin alimento hasta por 48 horas	
Tamaño de la muestra	No se menciona	
Muestras control	Positivo	No se menciona
	Negativo	No se menciona
Método de extracción	No se menciona	
Método de cuantificación	Hibridación	
Método de amplificación	No se menciona	
Método de secuenciación	Secuenciación por Sanger	
Resultados	El análisis de STR fue exitoso sólo en larvas en tercer instar que se preservaron inmediatamente. Los investigadores argumentan que esto se debe a que el saco gástrico en este estadio larval mide aproximadamente 7 mm, lo que permite almacenar una gran cantidad de alimento (tejido humano). Este puede ser un factor que afecte la cantidad de ADN humano presente en el saco gástrico. Se documenta que es importante realizar la extracción del tejido humano del saco gástrico para la extracción del ADN y no realizar la extracción de la larva entera. Esto se debe a que, al terminar el tercer estadio larval, el cuerpo de la larva almacena altas concentraciones de lípidos, lo que puede afectar el análisis de ADN	

a) Estudio 9: “*Genotyping of human DNA recovered from mosquitoes found on a crime scene*”

b) Rúbrica de revisión

Trabajo	Spitaleri <i>et al.</i> , 2006
Especie de insecto	Diptera: Culicidae
Objetivo del estudio	Obtener un perfil genético humano de una mancha de sangre seca de restos de un mosquito
Tratamiento de las muestras	La mancha de sangre se recolectó con papel filtro húmedo y realizando un raspado. Los restos del díptero se recolectaron en un tubo.
Tamaño de muestra	1 mosquito adulto

Muestras control	Positivo	Sin mención
	Negativo	No se emplea
Método de extracción	No orgánica: kit con columnas con membrana de sílice	
Método de cuantificación	Sin mención	
Método de amplificación	Se amplificaron 16 loci STRs por PCR utilizando el sistema AmpFLSTR Identifier (Applied Biosystems)	
Método de secuenciación	Secuenciación por Sanger	
Resultados	Se obtuvo un perfil genético de 15 loci incompleto, sin embargo, este permitió su comparación con la muestra de referencia (de la víctima), dando como resultado la coincidencia de ambos.	

a) Estudio 10: “*Time course analysis of bed bug, Cimex lectularius L., (Hemiptera: Cimicidae) blood meals with the use of Polymerase Chain Reaction*”

b) Rúbrica de revisión

Trabajo	Szalanski <i>et al.</i> , 2006a	
Especie de insecto	<i>Cimex lectularius</i> (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Cimicidae)	
Objetivo del estudio	Conocer hasta qué tiempo post-ingesta es posible obtener ADN humano de chinches	
Tratamiento de las muestras	Se recolectaron cimícidos adultos machos y hembras. Después de alimentarse con sangre humana y se mantuvieron a una temperatura de 22 °C por intervalos de 1, 3, 7, 14, 30, 60 y 90 días hasta ser colocados en un vial. En este vial se mantuvieron a una temperatura de -20 °C hasta la extracción del ADN	
Tamaño de la muestra	84 cimícidos	
Muestras control	Positivo	No se emplea
	Negativo	No se emplea
Método de extracción	Extracción salting-out	
Método de cuantificación	Sin mención	
Método de amplificación	Se amplificó la región HRV1 de la región control por PCR utilizando los oligonucleótidos L15997 y R202	Se amplificó una región de 271 pb del loci D18S51 por PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos: 5'-CAAACCCGACTACCAGCAAC-3' y 5'-GAGCCATGTTTCATGCCACTG-3'
Método de secuenciación	Secuenciación por Sanger	
Resultados	La estabilidad del ADN humano en el sistema digestivo del hemíptero hasta por 60 días muestra la utilidad de investigar en estos insectos. Además, con el conocimiento del tiempo post-ingesta ayudaría a ubicar temporalmente a una persona. Se aisló y amplificó exitosamente ADNmt humano de cimícidos que se mantuvieron a una temperatura de 22 °C hasta por 7 días.	

	La extracción y amplificación de ADN humano con marcadores STR se logró en muestras que se mantuvieron hasta 60 días post-ingesta. A comparación con otros insectos, los cimícidos pueden mantenerse hasta por 1 año sin alimentarse
--	---

a) Estudio 11: “*Isolation and Characterization of Human DNA From Bed Bug, Cimex lectularius L., (Hemiptera: Cimicidae) Blood Meals*”

b) Rúbrica de revisión

Trabajo	Szalanski <i>et al.</i> , 2006b	
Especie de insecto	<i>Cimex lectularius</i> (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Cimicidae)	
Objetivo del estudio	Obtención de ADN humano nuclear y mitocondrial de cimícidos, y conocer la especie de insecto a través de un análisis de mtADN	
Tratamiento de las muestras	Se recolectaron 30 chinches. Trece chinches, recolectadas de viviendas de un condado de Nueva York, se preservaron en etanol al 90 %. Diecisiete chinches, recolectadas de viviendas de un condado de Texas, a – 20 °. Cinco chinches adicionales se alimentaron de tejido sanguíneo humano por 15 min y se mantuvieron a 25 °C por 24 h. Posteriormente se preservaron en etanol al 100 %.	
Tamaño de muestra	35 chinches	
Muestras control	Positivo	Saliva humana
	Negativo	No se emplea
Método de extracción	Extracción salting-out	
Método de cuantificación	Sin mención	
Método de amplificación	Se amplificó la región HRV1 de la región control por PCR utilizando los oligonucleótidos L15997 y R202	Se amplificó una región de 271-343 pb del loci D18S51 por PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos: 5'-CAAACCCGACTACCAGCAAC- 3' y 5'-GAGCCATGTTTCATGCCACTG-3'
Método de secuenciación	Secuenciación por Sanger	
Resultados	Se logró el análisis de ADN humano obtenido de las tres formas de preservación del insecto. La amplificación del loci D18S51 fue exitosa en 32 chinches y de la HVR1 fue exitosa en 30 chinches. De las cinco chinches adicionales se obtuvieron todas las secuencias de HVR1 y los patrones alélicos de STR. Aunado a ello, estas secuencias coincidieron con la muestra de referencia	

a) Estudio 12: Determinación de ADN humano en larvas de dípteros colectadas en distintos tejidos

b) Rúbrica de revisión

Trabajo	Nava-Hernández <i>et al.</i> , 2008	
Especie de insecto	<i>Chrysomya ruffacies</i> (Macquart, 1843) (Diptera: Calliphoridae) <i>Chrysomya megacephala</i> (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) <i>Cochliomyia macellaria</i> (Fabricius, 1775) (Diptera: Calliphoridae) <i>Lucilia sericata</i> (Meigen, 1820) (Diptera: Calliphoridae) <i>Lucilia cuprina</i> (Wiedemann, 1826) (Diptera: Calliphoridae) <i>Sarcophaga sp.</i> (Diptera: Sarcophagidae)	
Objetivo del estudio	Comparación de la eficacia de los medios de soporte empleados y tipo de tejido humano en el análisis de ADN humano	
Tratamiento de las muestras	Las larvas se sacrificaron mediante congelación, se lavaron con agua desionizada y se practicó una disección, obteniendo la región anterior del intestino de la larva. El contenido gástrico se recolectó con hisopos estériles (5 larvas) y con tarjetas Whatman FTA® (5 larvas) Se deshidrató cada muestra y almacenó por dos semanas. Transcurridas las dos semanas, se cortaron fragmentos de los hisopos y de las tarjetas, y se colocaron en microtubos.	
Tamaño de muestra	10 larvas en tercer estadio	
Muestras control	Positivo	Menciona su utilización, sin embargo, no menciona cuáles
	Negativo	Menciona su utilización, sin embargo, no menciona cuáles
Método de extracción	Extracción no orgánica: resinas paramagnéticas	
Método de cuantificación	Sin mención	
Método de amplificación	Se amplificaron 16 loci STRs por PCR	
Método de secuenciación	Secuenciación automática	
Resultados	El tratamiento empleado en las muestras y la colocación del ADN en tarjetas FTA® permitió un fácil manejo de las muestras y una preservación que evita la degradación de ADN humano. Las larvas alimentadas con tejido muscular permitieron un análisis de ADN obteniendo perfiles genéticos completos, caso contrario con tejido encefálico y hepático	

a) Estudio 13: “*STR and SNP analysis of human DNA from Lucilia sericata larvae's gut contents*”

b) Rúbrica de revisión

Trabajo	Kondakci <i>et al.</i> , 2009
Especie de insecto	<i>Lucilia sericata</i> (Meigen, 1820) (Diptera: Calliphoridae)
Objetivo del estudio	Obtención de perfiles genéticos a partir de la extracción del ADN humano del sistema digestivo de larvas de <i>Lucilia sericata</i> para asociar larvas con un cadáver específico
Tratamiento de las muestras	Se recolectaron de 8 a 15 larvas en tercer instar alimentadas con tejido humano de personas diabéticas. Las larvas fueron sacrificadas a una temperatura de -20 °C. Posteriormente se lavó el exterior de la larva con una solución de cloro 20% por 2 horas y después se enjuagó con agua destilada. Se aisló el saco gástrico de cada larva cortando con tijeras iris
Tamaño de la muestra	140 larvas

Muestras control	Positivo	Saliva humana
	Negativo	No se menciona
Método de extracción		No orgánica
Método de cuantificación		Espectrofotometría UV
Método de amplificación		Se amplificaron marcadores genéticos STRs y SNPs por PCR
Método de secuenciación		Secuenciación por Sanger
Resultados		En la mayoría de las muestras que se analizaron con marcadores STR se lograron obtener perfiles genéticos, sin embargo, sólo de tres muestras se obtuvieron completos. Esto debido a que el ADN se encontró degradado En las muestras analizadas con marcadores SNP se obtuvieron perfiles genéticos completos, incluso en muestras con ADN degradado. Los investigadores recomendaron la utilización de marcadores SNP cuando se presenten muestras degradadas o incluso no sea posible analizar con marcadores STRs

a) Estudio 14: “*Mitochondrial DNA and STR analyses from human DNA from maggots crop contents: A forensic entomology case from central-southern China*”

b) Rúbrica de revisión

Trabajo	Li <i>et al.</i> , 2011	
Especie de insecto	<i>Aldrichina grahmi</i> (Aldrich, 1930) (Diptera: Calliphoridae)	
Objetivo del estudio	Asociar larvas a cadáveres analizando el contenido gástrico de las larvas	
Tratamiento de las muestras	Se recolectaron larvas en tercer instar de dos cuerpos. Se sacrificaron con agua hirviendo y preservaron en tubos a -70 °C. Posteriormente el exterior de cada larva se lavó con una solución de cloro al 20%. Después la larva se enjuagó dos veces con 1 ml de agua destilada. A continuación, se extrajo el saco gástrico mediante la disección de los dos segmentos posteriores y la incisión ventral.	
Tamaño de muestra	Sin mención	
Muestras control	Positivo	Tejido hepático humano
	Negativo	No se empleo
Método de extracción	Sin mención	
Método de cuantificación	Sin mención	
Método de amplificación	Se amplificó la región HV2 por PCR utilizando los oligonucleótidos L48 y H480	Se amplificaron 16 loci STRs por PCR
Método de secuenciación	Secuenciación automática	
Resultados	La región HV2 del contenido gástrico se amplificó exitosamente, además de obtener perfiles completos de STRs humanos, siendo idénticos a la muestra de control positiva.	

a) Estudio 15: “*Identification of Human Remains by DNA Analysis of the Gastrointestinal Contents of Fly Larvae*”

b) Rúbrica de revisión

Trabajo	Chávez-Briones <i>et al.</i> , 2013	
Especie de insecto	Diptera: Calliphoridae y Sarcophagidae	
Objetivo del estudio	Identificación de un cuerpo (carbonizado) mediante el análisis genético del contenido gástrico de larvas de dípteros	
Tratamiento de las muestras	Cada larva fue colocada en un tubo estéril de 1.5 ml de capacidad y se preservó en etanol al 70 % a 4 °C. Posteriormente la larva fue lavada con una solución de cloro (20%) por el exterior y después se removió el saco gástrico	
Tamaño de muestra	3 larvas	
Muestras control	Positivo	Saliva humana (Del padre de la víctima)
	Negativo	No se emplea
Método de extracción	Extracción orgánica: fenol/cloroformo/etanol	
Método de cuantificación	Sin mención	
Método de amplificación	Se amplificaron 16 loci STRs por PCR	
Método de secuenciación	Secuenciación por Sanger	
Resultados	Los perfiles genéticos generados resultaron incompletos. Sin embargo, el perfil genético de 10 loci, fue suficiente para comparar con una muestra de referencia y así, identificar los restos humanos. Se observó que colocar las larvas en etanol al 70% a 4 °C preserva en buenas condiciones el ADN humano	

a) Estudio 16: Obtención de ADN humano a partir del contenido gástrico de larvas de dípteros alimentadas y colectadas en cadáveres humanos

b) Rúbrica de revisión

Trabajo	García, 2013	
Especie de insecto	<i>Phaenicia sericata</i> (Méigen) (Diptera: Calliphoridae) <i>Calliphora vicina</i> (Rodineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae)	
Objetivo del estudio	Obtener ADN humano a partir del contenido gástrico de larvas de dípteros colectadas y alimentadas de tejido humano en descomposición	
Tratamiento de las muestras	Se colectaron larvas en 2° y 3° estadio. Un grupo de larvas se sacrificaron con agua a 100 °C durante 1 min y posteriormente se preservaron en etanol al 70 % a 4 °C. Al segundo grupo se les realizó lavados (3-4) con agua y después se preservaron a -22 °C	
Tamaño de muestra	270 larvas	
Muestras control	Positivo	Hueso humano

	Negativo	No se emplea
Método de extracción		Extracción orgánica: fenol/cloroformo/alcohol isoamílico
Método de cuantificación		PCR en tiempo real
Método de amplificación		Se amplificaron loci STRs por PCR utilizando los sistemas Identifiler, MiniFiler, PowerPlex 21 System y Powerplex Y23 System
Método de secuenciación		Secuenciación por Sanger
Resultados		Se utilizó un grupo de 5 larvas para obtener la cantidad mínima de ADN humano de 1 ng/μl Se comparó el éxito en la obtención de perfiles genéticos a partir de ADN aislado del tracto digestivo de larvas de califóridos <i>Phaenicia sericata</i> y <i>Calliphora vicina</i> usando diferentes kits de amplificación, incluyendo los kits Identifiler, MiniFiler, PowerPlex 21 System y Powerplex Y23 System. Es el único estudio en su tipo y concluyó que la utilización de los kits “Identifiler” y “PowerPlex 21 System” favorecían la amplificación y caracterización del conjunto completo de marcadores. Particularmente PowerPlex 21 System fue el kit que proporcionó mejores resultados en comparación con los otros sistemas. Se observó un mayor rendimiento en la recuperación de ADN humano cuando la preservación del insecto se realizó con etanol al 70 % a 4 °C. De ambos estadios larvales (2° y 3°) se logró la recuperación de ADN humano. De larvas en 2° estadio se obtuvieron fragmentos cercanos a 400 pb y de larvas en 3° estadio se obtuvieron fragmentos mayores a 400 pb.

a) Estudio 17: “*Identification of person and quantification of human DNA recovered from mosquitoes (Culicidae)*”

b) Rúbrica de revisión

Trabajo		Curic <i>et al.</i> , 2014
Especie de insecto		Diptera: Culicidae (subfamilias: Culicinae y Anophelinae)
Objetivo del estudio		Establecer cómo el tiempo afecta la cantidad de ADN humano en el sistema digestivo del mosquito y si esa cantidad de ADN permite su análisis para la identificación humana
Tratamiento de las muestras		Se recolectaron mosquitos y sedaron por enfriamiento. Después, a intervalos de 8 h después de alimentar al mosquito y en grupo de 9 insectos, los abdómenes se comprimieron sobre tarjetas FTA®. Los intervalos de tiempo fueron de 8 a 72 h y de 80 a 152 h
Tamaño de muestra		177 mosquitos adultos
Muestras control	Positivo	Sin mención
	Negativo	Mosquitos hembra sin alimentar
Método de extracción		Extracción no orgánica: con resina
Método de cuantificación		Por PCR en tiempo real
Método de amplificación		Se amplificaron 16 loci STRs por PCR utilizando los kits Identifiler, MiniFiler y Quantifiler

Método de secuenciación	Secuenciación por Sanger
Resultados	Se destacó que, de mosquitos de la subfamilia Culicinae, se obtuvieron perfiles completos hasta 48 h después de alimentarse y, de la subfamilia Anophelinae, se obtuvieron algunos perfiles hasta 16 horas después de alimentarse. Se planteó que la probabilidad de obtener un perfil genético completo disminuye 15.5% cada 8 h en mosquitos de la subfamilia Culicinae. Esto depende de la actividad de enzimas digestivas del sistema digestivo del mosquito.

a) Estudio 18: Análisis de ADN humano obtenido de mosquitos hematófagos (De la Familia *Cullisidae*) con fines de identificación humana para posible aplicación en casos de privación ilegal de la libertad

b) Rúbrica de revisión

Trabajo	De la Cruz, 2014	
Especie de insecto	Diptera: Culicidae	
Objetivo del estudio	Obtener y caracterizar ADN humano de mosquitos hematófagos	
Tratamiento de las muestras	Se recolectaron dípteros sin vida. Posteriormente se colocaron sobre papel seda por un día a temperatura ambiente. Finalmente se almacenaron en un sobre.	
Tamaño de la población	43 mosquitos adultos	
Muestras control	Positivo	Saliva, sangre y fluidos corporales humanos
	Negativo	No se empleo
Método de extracción	Extracción orgánica: fenol/cloroformo. Además, se realizó una purificación.	
Método de cuantificación	Por PCR en tiempo real	
Método de amplificación	Se amplificaron loci STRs por PCR utilizando el sistema PowerPlex 16HS System	
Método de secuenciación	Secuenciación por Sanger	
Resultados	Se logró la obtención de un solo perfil genético completo utilizando un mosquito. De los 42 mosquitos restantes, se obtuvieron perfiles incompletos debido a la degradación de ADN.	

a) Estudio 19: “*Impact of adult age on forensic use of Culex pipiens mosquito (Diptera: Culicidae)*”

b) Rúbrica de revisión

Trabajo	Ibrahim, 2015	
Especie de insecto	<i>Culex pipiens</i> (Linnaeus, 1758) (Diptera: Culicidae)	

Objetivo del estudio	Determinar cómo afecta la edad de <i>C. pipiens</i> en la degradación del ADN humano en el sistema digestivo del mosquito a través de la contabilización de glóbulos rojos
Tratamiento de las muestras	Después de alimentarse a los mosquitos con sangre humana, se dividieron en dos grupos: Grupo 1: se mantuvieron vivos por 3 horas (a una temperatura de 28 °C) y después se extrajo el ADN humano Grupo 2: se mantuvieron vivos por intervalos de 3, 6, 12, 24, 48 y 72 h (a una temperatura de 28 °C) y posteriormente se contabilizó el número de glóbulos rojos presentes en la muestra de sangre
Tamaño de muestra	180 mosquitos hembras adultos
Muestras control	Positivo Para el grupo 1: sangre humana Para el grupo 2: Mosquitos hembra alimentadas con sangre humana y los glóbulos rojos se contabilizaron inmediatamente después de alimentarse
	Negativo Para el grupo 1: mosquitos hembras adultos alimentadas con azúcar Para el grupo 2: mosquitos hembra adultos alimentadas por 30 min con una solución de azúcar
Método de extracción	Extracción orgánica: fenol/cloroformo/etanol
Método de cuantificación	Por PCR en tiempo real
Método de amplificación	Se amplificaron 16 loci STRs por PCR
Método de secuenciación	Secuenciación por Sanger
Resultados	La edad de los mosquitos adultos utilizadas en el estudio fue de 0 a 10 días después de emerger. Se demostró que, de mosquitos con edades entre 0 y 3 días, se obtuvieron cantidades muy bajas de ADN, lo que no permitió un análisis de STRs. Los investigadores refieren que esto resulta porque a estas edades no se alimentan eficientemente de sangre humana ya que el sistema digestivo no está completamente desarrollado. Además, a la edad de 0 y 2 días, la cantidad de glóbulos rojos se reduce significativamente hasta 12 horas después de que el mosquito se alimentó. Se demostró que, de mosquitos con edades entre 4 y 10 días, la cantidad de glóbulos rojos se reduce más rápidamente (comenzando una reducción significativa a 6 horas después de la ingesta de alimento) porque el sistema digestivo está completamente desarrollado. Sin embargo, en esas edades (4-10 días), es posible obtener ADN suficiente para un análisis de STRs (1.25 a 1.51 ng/μl)

a) Estudio 20: “*Temporal analysis of 16 STR loci in human blood drawn from two culicid mosquitoes cultured at different temperatures*”

b) Rúbrica de revisión

Trabajo	Ibrahim <i>et al.</i> , 2015
Especie de insecto	<i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) <i>Culex pipiens</i> (Linnaeus, 1758) (Diptera: Culicidae)
Objetivo del estudio	Identificar el tiempo máximo en que el ADN humano puede mantenerse en el sistema digestivo del mosquito y que permita la obtención de un perfil genético humano completo, observando el efecto de la temperatura en que se desarrolla y el género del mosquito sobre la integridad del ADN humano
Tratamiento de las muestras	Se alimentaron a los mosquitos adultos por 30 min. Posteriormente se mantuvieron por 3, 6, 12, 14, 24, 48 y 72 h incubados a dos temperaturas diferentes (40 °C y 18 °C).

		Inmediatamente el abdomen fue separado del resto del cuerpo. Después se colocó en un tubo de 1.5 ml y almacenado a -70 °C
Tamaño de muestra		Sin mención
Muestras control	Positivo	Sangre humana
	Negativo	Mosquitos hembra adultos alimentadas con una solución de azúcar
Método de extracción		Extracción orgánica: fenol/cloroformo
Método de cuantificación		Por PCR en tiempo real (Se empleo un grupo de 10 mosquitos)
Método de amplificación		Se amplificaron 16 loci STRs por PCR
Método de secuenciación		Secuenciación de Sanger
Resultados		<p>Demostraron que las variables que afectan la cantidad de ADN humano en el sistema digestivo del mosquito son el tipo de especie de mosquito, el tiempo post-ingesta y la temperatura en que se desarrolla el insecto.</p> <p>En mosquitos de <i>Aedes aegypti</i>, la concentración de ADN se redujo a ambas temperaturas. A 18 °C, los investigadores obtuvieron perfiles genéticos completos hasta 48 horas post-ingesta. A 40 °C, se obtuvieron perfiles genéticos completos hasta 6 horas después de la ingesta de sangre humana.</p> <p>En mosquitos de <i>Culex pipiens</i>, se obtuvieron perfiles completos hasta 48 h post-ingesta y manteniéndolos a una temperatura de 18 °C. A 40 °C, se logró obtener perfiles genéticos completos hasta 72 horas, esto debido a que a las 24 h el 50 % de los insectos habían muerto y a las 48 h el 100 % de mosquitos habían muerto.</p>

a) Estudio 21: “*STR analysis of human DNA from maggots fed on the time period for successful analysis*”

b) Rúbrica de revisión

Trabajo	Njau <i>et al.</i> , 2015
Especie de insecto	<i>Protophormia terraenovae</i> (Robineau-Desvoidy, 1830) (Diptera: Calliphoridae)
Objetivo del estudio	Evaluar cómo afecta el periodo de tiempo transcurrido a la obtención de perfiles genéticos humanos. Además de la posible degradación del ADN humano en el sistema digestivo de larvas <i>Protophormia terraenovae</i> debido a la administración de otro tipo de alimento (no humano) a la larva y/o dejar de suministrarle alimento
Tratamiento de las muestras	<p>Se alimentaron larvas con tejido humano en descomposición y recolectaron larvas en tercer estadio. Se establecieron 14 grupos:</p> <p>Grupo control: 30 larvas, se sacrificaron inmediatamente después de haberse alimentado</p> <p>Los siguientes 6 grupos, de 10 larvas cada uno, se les retiró el alimento y se sacrificaron después de 2, 4, 5, 6, 8 y 10 días respectivamente.</p> <p>Los siguientes 6 grupos, de 10 larvas cada uno, se alimentaron con carne de res y se sacrificaron después de 2, 4, 5, 6, 8 y 10 días respectivamente.</p> <p>La técnica que se siguió para sacrificar fue colocarlas en agua casi hirviendo. Después se enjuagaban por 20 min en 1 ml de solución de cloro al 20 % y posteriormente se enjuagaban con 1 ml de agua destilada fría. Finalmente, se les realizó una disección en la región ventral y extrajo el saco gástrico. Donde no fue posible la extracción del saco gástrico, la larva completa fue homogenizada.</p>

Tamaño de muestra		170 larvas
Muestras control	Positivo	Tejido humano
	Negativo	No se emplea
Método de extracción		Extracción no orgánica: Columnas con membranas de sílice
Método de cuantificación		Por PCR en tiempo real
Método de amplificación		Se amplificaron 16 loci STRs por PCR
Método de secuenciación		Secuenciación automática
Resultados		Se demostró que la cantidad de ADN disminuye con el paso del tiempo. Por otro lado, concluyeron que es posible la obtención de un perfil genético humano completo de larvas a las que se les retiro el alimento y se sacrificaron hasta 2 días después de la ingesta de alimento. Incluso fue posible la obtención de ADN hasta 4 días después de la ingesta de alimento, a pesar de que la cantidad de ADN observada fue baja. Del grupo al que se le suministró alimento no humano, fue posible extraer ADN humano hasta los 2 días después de la ingesta de alimento de fuente humana.

a) Estudio 22: Extracción de ADN humano obtenido del tracto digestivo de larvas de *Dermestes maculatus* (De Geer, 1774) (Coleoptera: Dermestidae) alimentadas de tejido cadavérico

b) Rúbrica de revisión

Trabajo		Ortega-Rosales <i>et al.</i> , 2016
Especie de insecto		<i>Dermestes maculatus</i> (De Geer, 1774) (Coleoptera: Desmestidae)
Objetivo del estudio		Extraer ADN humano del tracto digestivo de larvas de <i>Dermestes maculatus</i> alimentadas con proporciones diversas de tejido adiposo y muscular humano
Tratamiento de las muestras		Se alimentaron a coleópteros de <i>Dermestes maculatus</i> en tres necrotrampas con tejido humano (tejido adiposo y tejido muscular, ambos deshidratados) y en diferentes porcentajes (50:50, 20:80 y 80:20). Se colectaron 10 larvas por necrotrampa, se congelaron y se diseccionaron en la región ventral, obteniendo el saco gástrico.
Tamaño de muestra		30 larvas
Muestras control	Positivo	Tejido humano
	Negativo	Un iniciador y agua para amplificación
Método de extracción		Extracción no orgánica: Resinas paramagnéticas. Se realizó la extracción por duplicado utilizando el kit DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell®16 (Promega). Posteriormente se realizó una purificación
Método de cuantificación		Por PCR en tiempo real
Método de amplificación		Se amplificaron loci STRs y Y-STRs por PCR

Método de secuenciación	Secuenciación por Sanger
Resultados	Se logró la amplificación de ADN humano del tracto digestivo de una sola larva en el cuarto estadio y alimentada de tejido adiposo y muscular en igual proporción (50:50). También se logró la obtención de un perfil genético humano masculino completo utilizando ambos kits y concordó con el perfil de la muestra control.

a) Estudio 23: “*Human identification by lice: A Next Generation Sequencing challenge*”

b) Rúbrica de revisión

Trabajo	Pilli <i>et al.</i> , 2016	
Especie de insecto	<i>Pediculus humanus capitis</i> (De Geer) (Phthiraptera: Pediculidae)	
Objetivo del estudio	La aplicación de técnicas de biología molecular de última generación para la determinar la presencia de ADN humano en el sistema digestivo de piojos <i>Pediculus humanus capitis</i> y resolver un caso de negligencia	
Tratamiento de las muestras	Los piojos (sin vida y secos) fueron almacenados en tubos Falcon estériles a temperatura ambiente. Después de retirar la cabeza y patas, el exterior del insecto fue lavado con una solución de cloro al 5 % por 30 segundos, en seguida fue se enjuagó con etanol al 100 % y al final con agua destilada. Después de dejarlos secar, se dividieron en dos grupos: insectos sin disección e insectos con disección. A estos últimos se les realizó una disección longitudinalmente a lo largo de la línea media de la región dorsal. Ambos grupos se colocaron en buffer Hexagon OBTI	
Tamaño de muestra	30 piojos adultos	
Muestras control	Positivo	Sangre humana
	Negativo	Sin mención
Método de extracción	Extracción no orgánica: Columnas de membrana de sílice utilizando el kit QIAmp DNA Investigator	
Método de cuantificación	Por PCR en tiempo real	
Método de amplificación	Se amplificaron marcadores genéticos STRs y SNPs por PCR	
Método de secuenciación	Secuenciación de siguiente generación (NGS)	
Resultados	Los piojos que se observaron con una tonalidad negruzca en la región abdominal dieron positivo en la presencia de sangre humana mediante la prueba de Hexagon OBTI. Sólo de insectos con disección, se obtuvo 3 pg/μl de ADN humano. Se obtuvieron pocos perfiles STRs humanos incompletos. Sin embargo, se obtuvo un perfil SNPs completo que mostraban algunos nucleótidos	

a) Estudio 24: “*Isolation, Identification, and Time Course of Human DNA Typing from Bed Bugs, Cimex lectularius*”

b) Rúbrica de revisión

Trabajo	Schal <i>et al.</i> , 2018	
Especie insecto de	<i>Cimex lectularius</i> ((Lehane, 2005) (Hemiptera: Cimicidae)	
Objetivo del estudio	Cuantificar el ADN humano a distintos tiempos post-ingesta a partir de chinches y generar perfiles genéticos de un solo o/y múltiples donadores.	
Tratamiento de las muestras	<p>Chinches machos adultos fueron separados en tres grupos para alimentarlos. El primer grupo, de 100 insectos, se alimentó de sangre de mujer. Otro grupo, de 10 insectos, se alimentó de sangre de hombre y el último grupo, de 90 insectos, se alimentó de una mezcla de sangre (sangre de hombre y sangre de mujer).</p> <p>Después las chinches se colocaron en tubos Eppendorf y se les añadió etanol al 95 % en intervalos de 12 horas, iniciando de 0 horas hasta 108 horas después de alimentarse. Los insectos fueron almacenados a -80 °C</p> <p>Posteriormente se realizó la extracción de la sangre humana del insecto. Esta consistió en lavar el exterior del insecto con etanol al 95 % y agua destilada. Primero el etanol fue removido y se le agregó 500 µl de agua destilada. Se vortexeo (para remover los restos de etanol) y se eliminó el agua destilada, repitiendo el proceso de lavado dos veces. Posterior al lavado, se agregó 10 µl de buffer del kit Rapid Stain Identification (RSID™) y se homogeneizó con el insecto. Después se removió todo el fluido que contenía sangre (10 µl aproximadamente) y se colocó en una tarjeta FTA</p>	
Tamaño de muestra	290 chinches machos adultos	
Muestras control	Positivo	No se menciona
	Negativo	No se emplea
Método de extracción	Extracción orgánica: fenol/cloroformo/alcohol isoamílico	
Método de cuantificación	PCR en tiempo real	
Método de amplificación	Se amplificaron marcadores genéticos STRs por PCR	
Método de secuenciación	Secuenciación por Sanger	
Resultados	<p>Los investigadores plantean la utilización de chinches como evidencia física para determinar la localización espacial y temporal de víctima (s) y/o victimario (s) en el lugar de los hechos.</p> <p>De ADN humano femenino se obtuvo de 1.225 a 0.013 ng/µl, con una cantidad promedio de 18.370 a 0.195 ng de ADN humano por chinche de 0 a 108 horas después de la ingesta de alimento.</p> <p>Del ADN humano masculino se obtuvo de 0.36 a 0.007 ng/l con un total de 5.4 a 0.105 de ng por chinche.</p> <p>De la mezcla de ADN humano se obtuvo de 0.366 a 0.009 ng/l con un total de 5.49 a 0.135 ng por chinche.</p> <p>Se obtuvieron perfiles genéticos completos humanos hasta 96 horas post-ingesta de muestras de sangre femenina, 86 horas post-ingesta de muestras de sangre masculina y hasta 72 horas post-ingesta de la mezcla de sangre.</p> <p>Se identificó el ADN de múltiples personas en una sola chinche alimentada de la mezcla de sangre.</p>	

Análisis de rúbricas

Se observó que la mayor parte de las publicaciones que han estudiado especies hematófagas se han hecho utilizando dípteros, específicamente culícidos, con un total de siete publicaciones

(Kreike y Kampfer, 1999; Chow-Shaffer *et al.*, 2000; Spitaleri *et al.*, 2006; Curic *et al.*, 2014; Ibrahim, 2015; Ibrahim y Alaifan, 2015; De la Cruz, 2014). En especies de hemípteros solo se documentaron tres estudios realizados en cimícidos (Szalanski *et al.*, 2006a; Szalanski *et al.*, 2006b; Schal *et al.*, 2018). En especies de fitirópteros se documentó un estudio en la especie *Pthirus pubis* (Pthiridae) y un estudio en la especie *Pediculus humanus capitis* (Pediculidae) (Lord *et al.*, 1998; Pilli *et al.*, 2016) (Figura 1). De los doce estudios que analizaron hematófagos, solo dos de ellos, en especies de culícidos y pediculidos, se aplicaron en la investigación de un delito (Spitaleri *et al.*, 2006; Pilli *et al.*, 2016) (Figura 1).

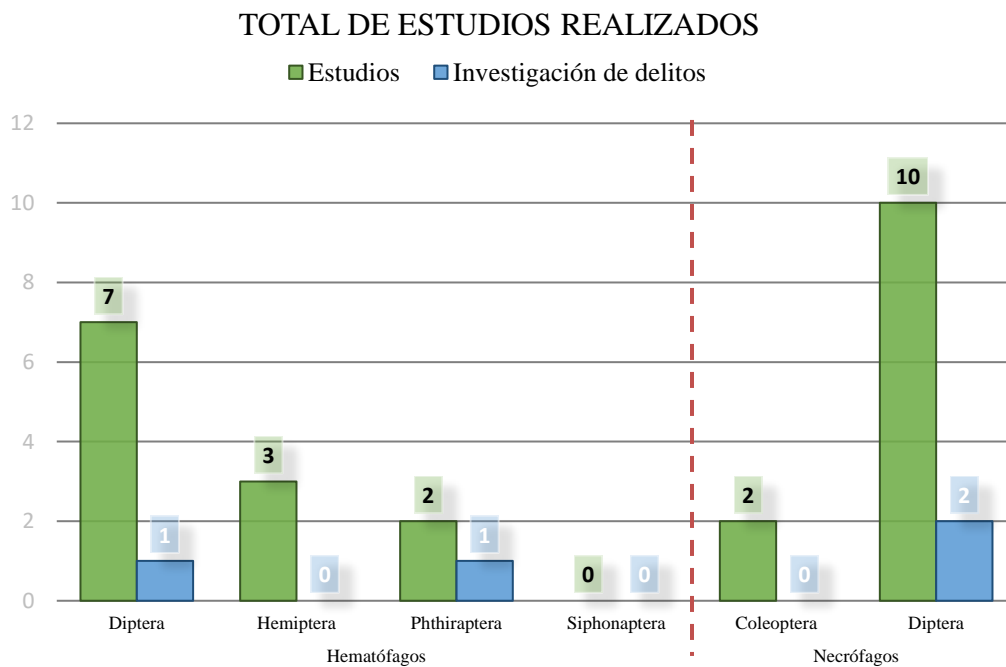


Figura 1. Cantidad de estudios realizados divididos por familia de especies necrófagas y hematófagas

Por su parte, los estudios en especies necrófagas estuvieron enfocados en dípteros pertenecientes a las familias Calliphoridae, Sarcophagidae y Muscidae, existiendo un total de diez estudios (Wells *et al.*, 2001; Linville *et al.*, 2004; Zehner *et al.*, 2004; Campobasso *et al.*, 2005; Kondakci *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011; Njau *et al.*, 2015; Nava-Hernández *et al.*, 2008; Chávez-Briones *et al.*, 2013; García, 2013). Los estudios realizados en coleópteros fueron sólo dos: en la

especie *Omosita spp.* (Nitidulidae) y en la especie de *Dermestes maculatus* (Desmestidae) (DiZinno *et al.*, 2002; Ortega-Rosales *et al.*, 2016).

En México, de los cinco estudios publicados tres de ellos analizaron larvas de dípteros pertenecientes a las familias Calliphoridae y Sarcophagidae (Nava-Hernández *et al.*, 2008; Chávez-Briones *et al.*, 2013; García, 2013). Un estudio analizó a la especie *Dermestes maculatus* (Desmestidae) (Ortega-Rosales *et al.*, 2016), y un estudio fue llevado a cabo con culícidos, sin mención de la especie que se analizó (De la Cruz, 2014). Solo una de estas publicaciones se realizó en la investigación de un delito, analizando larvas de la familia Calliphoridae y Sarcophagidae (Chávez-Briones *et al.*, 2013) (Figura 2).



Figura 2. Cantidad de estudios realizados en México divididos por familia de especies necrófagas y hematófagas.

Por otra parte, se observó que la mayoría de los estudios analizados no hacen mención de si consideraron algún sistema de control de calidad. Catorce de los veinticuatro carecen de controles negativos (Lord *et al.*, 1998; Kreike y Kampfer, 1999; DiZinno *et al.*, 2002; Linville *et al.*, 2004; Campobasso *et al.*, 2005; Szalanski *et al.*, 2006b; Kondakci *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011; Chávez-Briones *et al.*, 2013; García, 2013; De la Cruz, 2014; Njau *et al.*, 2015; Pilli *et al.*, 2016;

Schal *et al.*, 2018) y cuatro más no los mencionan (Spitaleri *et al.*, 2006; Szalanski *et al.*, 2006^a; Nava-Hernández *et al.*, 2008). También, once estudios no cuentan con un diseño experimental pertinente, en cuanto a la inclusión de repeticiones necesarias. Otra limitante observada es que algunos estudios no reportan con precisión las especies con que trataron. Esto es importante dado que algunos procesos fisiológicos como la velocidad de digestión pueden variar considerablemente entre especies (Curic *et al.*, 2014; Ibrahim *et al.*, 2015) y con ello probablemente afectar la calidad y constitución del ADN analizado. Otro aspecto observado fue la variación en la metodología realizada desde la extracción hasta el análisis del ADN humano extraído del insecto, lo que no permitió estandarizar una metodología, ya que muchos estudios estuvieron enfocados en analizar los factores que afectan la cantidad de ADN humano en el sistema digestivo del insecto. Por ello, en esta parte del protocolo sólo se informó de la técnica utilizada por cada estudio.

PROPUESTA DE PROTOCOLO PARA LA IDENTIFICACIÓN Y TRATAMIENTO DE INDICIOS ENTOMOLÓGICOS EN EL LUGAR DE INTERVENCIÓN Y EN LABORATORIO, CON FINES DE IDENTIFICACIÓN HUMANA

Corona-Plascencia Viridiana

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	42
OBJETIVOS DEL PROTOCOLO.....	43
Objetivo general.....	43
Objetivos específicos	43
VI. Entomología Forense.....	44
VI.1 Efectos sobre el tejido y ADN humanos en el proceso digestivo del insecto	44
VI.2 Insectos necrófagos	46
VI.2.1 Aplicación en identificación humana en genética forense	46
VI.2.2 Consideraciones	47
VI.3 Insectos hematófagos	48
VI.3.1 Aplicación en identificación humana en genética forense	49
VI.3.2 Consideraciones	51
VII. Identificación de insectos necrófagos	53
VII.1 Orden Diptera.....	53
VII.1.1 Suborden Brachycera	56
VII.1.1.1 Familia Calliphoridae.....	57
VII.1.1.2 Familia Muscidae	58
VII.1.1.3 Familia Phoridae	59
VII.1.1.4 Familia Piophilidae	60
VII.1.1.5 Familia Sarcophagidae	62
VII.1.1.6 Familia Sepsidae	64
VII.1.1.7 Familia Stratiomyidae	65
VII.2 Orden Coleoptera	67
VII.2.1.1 Familia Dermestidae	68
VII.2.1.2 Familia Nitidulidae.....	69
VII.2.1.3 Familia Silphidae.....	71
VIII. Identificación de insectos hematófagos.....	73
VIII.1 Orden Diptera.....	73
VIII.1.1 Suborden Nematocera	73
VIII.1.1.1 Familia Ceratopogonidae	73

VIII.1.1.2	Familia Culicidae	74
VIII.1.1.3	Familia Psychodidae	75
VIII.1.1.4	Familia Simuliidae	76
VIII.1.2	Suborden Brachycera	77
VIII.1.2.1	Familia Glossinidae.....	77
VIII.1.2.2	Familia Muscidae	78
VIII.1.2.3	Familia Rhagionidae	79
VIII.1.2.4	Familia Tabanidae	80
VIII.2	Orden Hemiptera	82
VIII.2.1	Familia Cimicidae	83
VIII.2.2	Familia Reduviidae	85
VIII.3	Orden Phthiraptera	87
VIII.3.1	Familia Pediculidae.....	88
VIII.3.2	Familia Pthiridae	89
VIII.4	Orden Siphonaptera.....	91
VIII.4.1	Familia Pulicidae.....	92
IX.	Tratamiento de indicios entomológicos en el lugar de intervención.....	93
IX.1	Insectos necrófagos	94
Orden Diptera	94	
Orden Coleoptera.....	94	
IX.2	Insectos hematófagos	95
Orden Diptera	95	
Orden Hemiptera	95	
Orden Phthiraptera.....	96	
Recomendaciones generales para la preservación	96	
Cadena de Custodia	97	
X.	Tratamiento en laboratorio.....	98
X.1	Aislamiento del tejido humano del sistema digestivo del insecto	98
X.1.1	Insectos necrófagos	98
X.1.2	Insectos hematófagos	98
Orden Diptera.....	98	
Orden Hemiptera.....	98	
Orden Phthiraptera	99	

X.2 Pruebas para establecer el origen de tejido	99
X.3 Extracción de ADN	99
X.3.1 Extracción orgánica.....	99
X.3.2 Extracción no orgánica.....	102
X.4 Cuantificación de ADN.....	104
X.4.1 Calidad del ADN	104
X.4.1.1 Pureza del ADN.....	105
X.4.1.2 Degradación del ADN	105
X.4.1.2.1 Muerte celular	106
X.4.1.2.2 Hidrólisis	106
X.4.1.2.3 Oxidación	106
X.4.1.2.4 Exposición a luz ultravioleta.....	107
X.4.1.3 Concentración de ácidos nucleicos.....	107
X.4.2 Métodos para determinar la cantidad y calidad del ADN	107
X.4.2.1 Electroforesis	107
X.4.2.2 Espectrofotometría UV.....	108
X.4.2.3 Espectroscopía fluorescente	109
X.4.2.4 PCR en tiempo real (QPCR)	109
X.5 Amplificación por PCR.....	110
X.6 Secuenciación	112
X.7 Short Tandem Repeats (STRs)	113
X.8 Variación en el ADN mitocondrial (mtADN) e identificación de haplogrupos	114
X.9 Interpretación del perfil genético humano	115
X.10 Análisis del perfil genético.....	117
Diagrama de flujo de la metodología para el tratamiento de indicios entomológicos	
.....	119

INTRODUCCIÓN

Determinar la identidad de una persona que ha intervenido en un delito, como víctima o autor, es crucial para esclarecer el hecho y reparar el daño causado. La identificación es el proceso de establecer la identidad de la persona. Se realiza a través de la aplicación de diversas herramientas aportadas por la Antropología Biológica, la Odontología, la Dactiloscopia y a partir de 1984, la aplicación del “*DNA profiling*” (Jeffreys *et al.*, 1985; Rivers y Dahlem, 2014).

A partir de 1998 la Entomología Forense utilizó herramientas de la biología molecular para la identificación de personas (Lord *et al.*, 1998). El estudio del ADN humano aislado a partir de insectos ha demostrado su utilidad en la identificación humana y por ende de víctimas. Sin embargo, los estudios existentes son escasos y se encuentran dispersos en distintas publicaciones de casos específicos. Por lo anterior, hace falta identificar e integrar los patrones metodológicos útiles y proponer una serie de métodos de utilidad para el tratamiento y análisis de indicios entomológicos con fines de identificación humana.

Esta propuesta de protocolo pretende asistir en la identificación y procesamiento de fauna entomológica en un lugar de intervención y en laboratorio.

OBJETIVOS DEL PROTOCOLO

Objetivo General:

- Asistir en la identificación y tratamiento de indicios entomológicos en un lugar de intervención y en laboratorio.

Objetivos Específicos:

- Relacionar los casos en que se pueden utilizar insectos necrófagos y hematófagos para la identificación humana.
- Revisar las metodologías utilizadas para el tratamiento de indicios con fines de identificación humana en aspectos forenses.
- Identificar los factores que pueden afectar la obtención de un perfil genético humano.
- Con base en lo reportado previamente, emitir recomendaciones sobre la metodología idónea para el tratamiento de indicios entomológicos y para su análisis en el laboratorio, con fines de identificación humana.
- Proporcionar una guía visual para identificación de grupos de insectos necrófagos y hematófagos.
- Servir de guía en el tratamiento de indicios entomológicos en un lugar de intervención y en laboratorio.

I. Entomología Forense

La entomología forense es la ciencia que estudia y aplica el conocimiento de la biología de artrópodos que se relacionan con aspectos legales (Pedraza-Lara y Vergara-Pineda, 2017). Esta ciencia cuenta con diversas aplicaciones como la estimación del intervalo *post mortem* (IPM), estimación de lesiones, detección de drogas o toxinas, e inferencia del posible traslado de un cadáver (Rivers y Dahlem, 2014). En las dos últimas décadas se han aplicado métodos de biología molecular para identificación humana a partir de la extracción de ADN humano del sistema digestivo de insectos necrófagos y hematófagos (Amendt *et al.*, 2010; Rivers y Dahlem, 2014).

I.1 Efectos sobre el mantenimiento de tejido y ADN humanos en el proceso digestivo del insecto

El ADN puede conservarse por determinado tiempo en el sistema digestivo de los insectos que se han alimentado de tejido humano. Dentro del insecto, el tejido humano recorre el tracto digestivo de manera semejante a cualquier fuente nutricia (Gullan y Cranston, 2005). El sistema digestivo de un insecto está compuesto por tres regiones principales: estomodeo o intestino anterior, mesodeo o intestino medio y proctodeo o intestino posterior (Figura 1a), además de válvulas que ayudan al control del movimiento del alimento y fluidos a través de estas regiones (Villeda *et al.*, 2008).

El estomodeo se encarga de la ingestión, almacenamiento, molienda y transporte del alimento a la siguiente región. En el caso de los insectos hematófagos, la ingesta de alimento se da de dos formas, dependiendo del tipo de piezas bucales que posee el mismo. El insecto perfora la piel del vertebrado y succiona el tejido de los vasos sanguíneos (hemípteros, phthirapteros, siphonapteros y culícidos) o, el insecto rasga, desgarrar o corta la piel del vertebrado y posteriormente el tejido sanguíneo acumulado se succiona (tabánidos y simúlidos). Para permitir la ingestión del alimento, se secreta saliva que permite la dilución del alimento. La saliva contiene anticoagulantes, vasodilatadores y sustancias antibacteriales (Lehane, 2005; Waniek, 2009). En los estados larvales de los insectos necrófagos, el aparato bucal se conforma por un par de ganchos que desgarran y cortan el alimento (Byrd y Castner, 2009). En ambos, hematófagos y necrófagos, el almacenamiento del alimento se realiza en una región llamada saco gástrico (Figura 1).

En el intestino medio se producen y secretan enzimas que permiten la digestión, y se da la absorción del alimento (Zehner *et al.*, 2004; Gullan y Cranston, 2005) (Figura 1).

El proctodeo se encarga de la excreción y está compuesto por el íleo, colon y recto (Gullan y Cranston, 2005; Villeda *et al.*, 2008) (Figura 1).

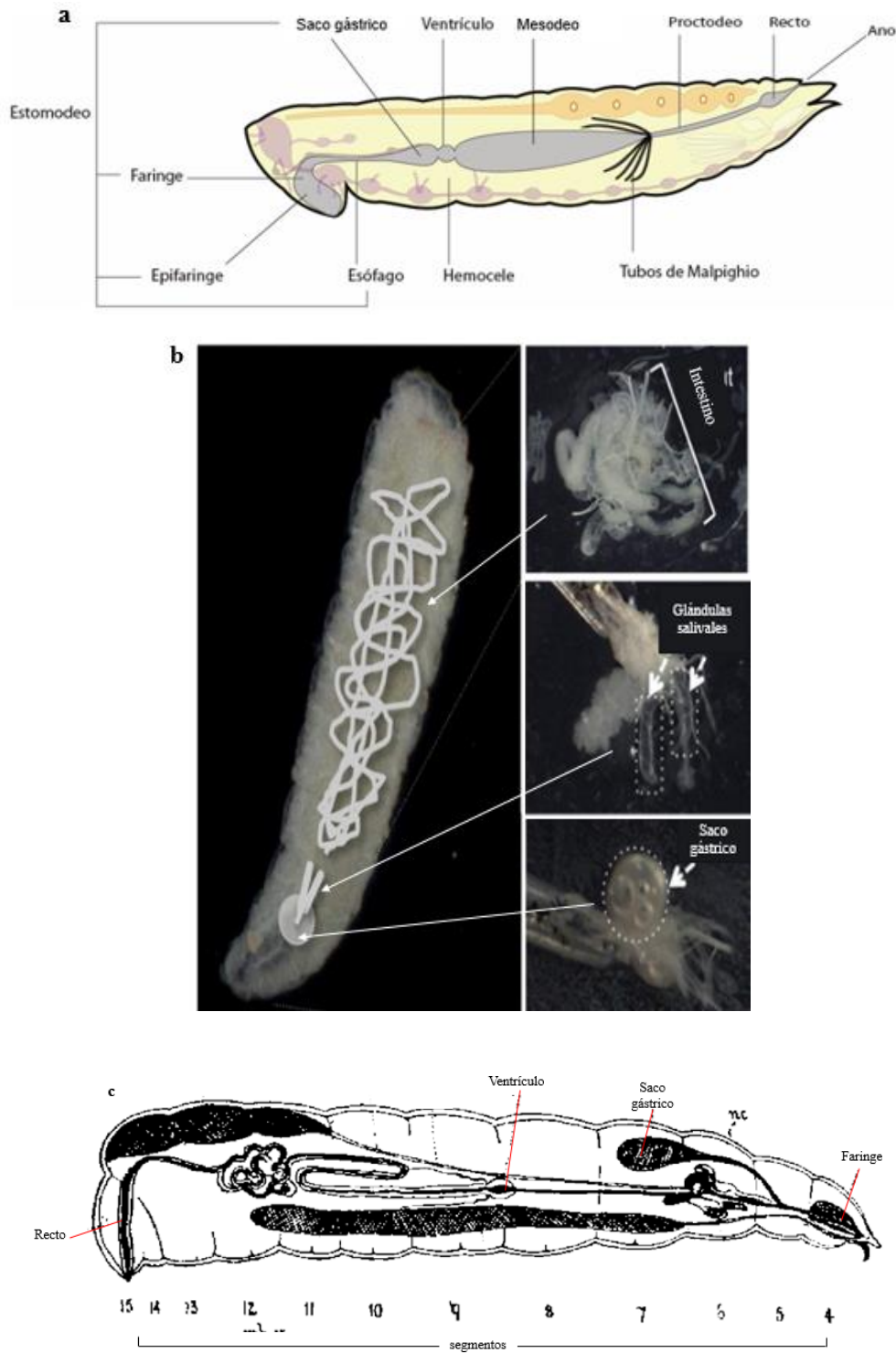


Figura 1. Esquemas modificados de las regiones del sistema digestivo de (a) un insecto adulto y (b y c) una larva de díptero. Tomados de <http://elmodernoprometeo.blogspot.com/2013/01/anatomia-de-artropodos-torax.html>, Blenkiron *et al.*, 2015 y Lowne, 1892.

I.2 Insectos necrófagos

Los insectos necrófagos intervienen en la descomposición de un cuerpo alimentándose del mismo (Amendt *et al.*, 2010). No obstante, existen otras categorías que interactúan con el cuerpo: especies parasitas y depredadoras, así como omnívoras, y oportunistas. Los depredadores se alimentan de especies necrófagas, principalmente de estadios larval y pupario. Los omnívoros se alimentan de insectos necrófagos e incluso de tejido en descomposición al igual que de otras fuentes nutricias. Los insectos oportunistas llegan al lugar donde se encuentra el cadáver y lo utilizan como una extensión del hábitat natural (Smith, 1986; Gennard, 2012; Rivers y Dahlem, 2014).

Principalmente los órdenes Diptera y Coleoptera cuentan con especies necrófagas (Tabla 1) (Amendt *et al.*, 2010; Rivers y Dahlem, 2014).

Tabla 1. Familias de insectos con especies necrófagas (Amendt, *et al.*, 2010; Rivers y Dahlem, 2014).

Orden	Familia	
Diptera	Calliphoridae	
	Sarcophagidae	
	Muscidae	
	Brachycera	Piophilidae
		Phoridae
		Sepsidae
		Stratiomyidae
Coleoptera	Dermestidae	
	Nitidulidae	
	Silphidae	

I.2.1 Aplicación en identificación humana

La identificación humana a través del análisis de ADN aislado a partir de insectos necrófagos se ha llevado a cabo exitosamente a partir de 2001 (Wells *et al.*, 2001). Esta estrategia ha reportado su utilidad en la investigación de distintos delitos (Li, 2011; Chávez-Briones, 2011). Los casos en

que se pueden aplicar son, por ejemplo, cuando en el lugar se localizan larvas necrófagas, pero no se encuentra la fuente de alimento, pudiendo existir el traslado de un cadáver. Sin embargo, para llevar a cabo la investigación de un posible hecho delictivo, es necesario saber si esas larvas se han alimentado de tejido humano y no de otro tejido biológico (Wells *et al.*, 2001; Zehner *et al.*, 2004; Kondakci *et al.*, 2009). Otro caso es el de estimar el intervalo *post mortem*. Para determinar este intervalo a través de la utilización de larvas, es necesario asociar los insectos con el cadáver conociendo si efectivamente se han alimentado del cadáver y no de otra fuente, lo que llevaría a inferir un intervalo *post mortem* erróneo (Wells *et al.*, 2001; Zehner *et al.*, 2004; Li, 2011; Pedraza-Lara y Vergara-Pineda, 2017). Esto tendría importancia, por ejemplo, en posibles escenarios de fosas clandestinas donde se localizan cuerpos o restos de más de una persona, o bien cuando existen diversas fuentes potenciales de alimento para un insecto. Un caso más se presentaría cuando se requiera la identificación de restos humanos en avanzado estado de descomposición y no exista la posibilidad de obtener muestras de tejido humano directamente de los restos. Para ello pueden utilizarse estadios inmaduros de insectos necrófagos para la identificación humana (DiZinno *et al.*, 2002; Kondakci *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2011; García, 2013; Chávez-Briones *et al.*, 2013).

I.2.2 Consideraciones

Existen diversos factores a considerar en el uso de estas metodologías, que permitirán o no al investigador, la obtención de perfiles genéticos humanos completos. Entre los factores registrados en estudios previos, los cuales se han hecho principalmente en larvas de dípteros necrófagos, se encuentran los siguientes:

- 1) Tiempo post-ingesta. Estudios previos han encontrado que conforme aumenta el tiempo que ha transcurrido desde la ingesta de tejido, la cantidad de ADN útil para el genotipado disminuye. Esto probablemente se relaciona con el avance en el proceso digestivo, durante el cual, el tejido humano pasa del saco gástrico al intestino medio, donde inicia la acción de enzimas digestivas, lo que probablemente afecta la integridad del ADN (Zehner *et al.*, 2004; Gullan y Cranston, 2005; Njau *et al.*, 2015). Njau y colaboradores (2015) reportaron que en larvas de *Protophormia terraenovae*, el tiempo post-ingesta máximo para obtener un perfil genético humano completo fue hasta 2 días después de la última ingesta de alimento. Sin embargo, estos investigadores documentaron que a ese tiempo post-ingesta no fue posible obtener un perfil genético completo si la larva ingiere alimento de otra fuente no humana.

- 2) Tipo de tejido humano. Estudios previos han encontrado que el tipo de tejido humano del que se alimentan los insectos es un factor que afecta la obtención de un perfil genético humano completo. Nava-Hernández y colaboradores (2008) reportaron que de larvas que se alimentaron de tejido muscular, se obtuvieron mejores rendimientos de extracción y amplificación (obteniendo concentraciones máximas de 30 ng/μl de ADN) en comparación con larvas alimentadas con tejido hepático o masa encefálica. Ortega-Rosales y colaboradores (2016) documentaron obtener un perfil genético humano completo de una sola larva de *Dermestes maculatus*. Ésta fue alimentada con tejido adiposo y tejido muscular en una proporción 50:50. Además, refirieron que esto se debió a que las células del tejido muscular son multinucleadas, y por ello, poseen más información genética.
- 3) Estado larval. Todos los estudios reportados sobre el tema, que han utilizado larvas de dípteros, han sido hechos con larvas del tercer estadio (Wells et al., 2001; Linville et al., 2004; Zehner et al., 2004; Nava-Hernández et al., 2008; Li et al., 2011; García, 2013). García (2013) obtuvo fragmentos de ADN humano de más de 400 pb del contenido gástrico de larvas en este estadio. Además, reportó el análisis del contenido gástrico de larvas en estadio 2. De estas muestras obtuvo fragmentos menores a 400 pb. Por otra parte, Ortega-Rosales y colaboradores (2016) reportaron la obtención de mayores cantidades de ADN humano de larvas de *Dermestes maculatus* en estadio 4, en comparación con el tercer y quinto estadios.
- 4) Cantidad de insectos. Investigaciones reportaron la utilización de más de un insecto para obtener la cantidad suficiente de ADN humano. Zehner y colaboradores (2004) utilizaron un grupo de hasta 4 larvas de dípteros. Dos estudios, realizados en años posteriores, utilizaron un grupo de 5 larvas de dípteros para obtener una cantidad mínima de 1 ng/μl de ADN humano (Nava-Hernández et al., 2008; García, 2013). Sin embargo, Ortega-Rosales y colaboradores (2016) emplearon una sola larva de *Dermestes maculatus* que tuvo la una cantidad de 0.012 ng de ADN humano, lo cual fue suficiente para el análisis genético.

I.3 Insectos hematófagos

Los insectos hematófagos se alimentan de tejido sanguíneo. La diversidad de especies con este tipo de alimentación se encuentra principalmente en los órdenes Diptera, Hemiptera, Phthiraptera y Siphonaptera (Tabla 2) (Robinson, 2005; Lehane, 2005). Existe una amplia diversidad de especies conocidas por ser hematófagas y a su vez, vectores de enfermedades. Las más conocidas alrededor

del mundo son la mosca tsetsé, los mosquitos, los flebótomos, triatominos, las pulgas y los piojos (OMS, 2017).

Tabla 2. Familias de insectos con especies hematófagas conocidas alrededor del mundo (Robinson, 2005).

Orden	Suborden	Familia
		Ceratopogonidae
	Nematocera	Culicidae
		Psychodidae
		Simuliidae
		Glossinidae
Diptera		Hippoboscidae
		Muscidae
	Brachycera	Nycteribiidae
		Rhagionidae
		Streblidae
		Tabanidae
Hemiptera		Cimicidae
		Reduviidae
Phthiraptera		Pediculidae
		Pthiridae
Siphonaptera		Pulicidae

I.3.1 Aplicación en identificación humana

La identificación humana a partir de insectos hematófagos puede ser útil en diversos casos. Un caso planteado es situar una persona en un lugar. Lo anterior debido a que estos insectos pueden alimentarse de algunos de los intervinientes (víctima y/o victimario) del delito en un lugar cerrado y dar pauta a los investigadores de establecer una guía de investigación al indicar que estas personas se localizaban en el lugar (Lord *et al.*, 1998; Kreike y Kampfer, 1999; Spitaleri *et al.*, 2006;

Szalanski *et al.*, 2006b; De la Cruz, 2014). Szalanski y colaboradores (2006b) y Schal y colaboradoras (2018) plantean la utilización de chinches (Hemiptera: Cimicidae) argumentando que son insectos que se mantienen en las cercanías del lugar de intervención por no poseer alas, a comparación de dípteros hematófagos. Por otro lado, De la cruz (2014) plantea la utilización de mosquitos (Diptera: Culicidae) en casos de secuestro porque son material poco controlado por los victimarios.

Spitaleri y colaboradores (2006) ayudaron a la resolución de un caso forense. Se logró situar a la víctima de homicidio en el domicilio del victimario al realizar una búsqueda de indicios en la casa, propiedad de este, y localizar un mosquito muerto de *Culex pipiens*. Se realizó el análisis de la mancha de sangre donde se localizó al mosquito y se obtuvo un perfil genético humano que coincidió con la víctima. Además, un examen entomológico realizado al mosquito concluyó la imposibilidad del traslado del insecto desde el lugar del hallazgo de la víctima hasta la casa del sospechoso.

Además de situar a la persona en un lugar, se plantea la posibilidad de ubicarla temporalmente. De acuerdo con Ibrahim y Alaifan (2015), la contabilización de glóbulos rojos del contenido gástrico puede ser útil para determinar el tiempo transcurrido después de que una persona estuvo presente en el lugar del delito. Esto podría realizarse comparando el número de células sanguíneas presentes en la muestra extraída con un control de referencia y así, establecer una relación entre el tiempo transcurrido después de que el mosquito se alimentó y el número de células sanguíneas presentes en el tracto digestivo del mosquito. Por otro lado, Szalanski *et al.* (2006a); Curic *et al.* (2014), y Schal *et al.*, (2018), respectivamente, plantearon que basta con saber qué cantidad de ADN humano es obtenido del insecto y así, establecer el tiempo transcurrido después de la ingesta de alimento.

Otra posibilidad es la utilización de piojos (Phthiraptera: Pthiridae) como herramienta en la investigación en un delito de violación. Esto se podría aplicar en casos donde el autor presente pediculosis púbica y no se tenga una muestra biológica directa. Así, puede emplearse la búsqueda de estos insectos en el área genital de la víctima, aplicar un análisis genético del contenido gástrico del ftiráptero e identificar al autor (Lord *et al.*, 1998; Clery *et al.*, 2001).

I.3.2 Consideraciones

Para emplear esta metodología deben tomarse en cuenta los factores que permitirán o no al investigador obtener un perfil genético humano completo (Chow-Shaffer *et al.*, 2000; Ibrahim *et al.*, 2015). Entre los factores que afectaron la cantidad de ADN humano en el sistema digestivo del insecto en investigaciones científicas están:

- 1) Tiempo post- ingesta. El tiempo post-ingesta máximo que permitió la obtención de un perfil genético completo, ha sido analizado principalmente en culícidos adultos. Kreike y Kampfer (1999) aislaron ADN humano de culícidos hasta 26 horas después de la ingesta de alimento. Chow-Shaffer y colaboradores (2000) reportaron que en promedio el ADN humano, en el sistema digestivo del mosquito *Aedes aegypti*, disminuyó un 67 % durante las primeras 8 horas y hasta un 90 % durante las primeras 24 h. Esto cuando el insecto se mantuvo a una temperatura ambiente de 29 °C. Curic y colaboradores (2014) estudiaron a especies de la subfamilia *Culicinae*. Reportaron que fue posible obtener un perfil genético humano completo hasta 48 horas post-ingesta y que la probabilidad de obtenerlo disminuyó 15.5% cada 8 h post-ingesta. Ibrahim y colaboradores (2015) reportaron la obtención de un perfil genético humano completo de *Culex pipiens* y *Aedes aegypti*, ambas especies de la familia Culicidae, hasta 48 horas post-ingesta. Esto fue posible al mantener al insecto a una temperatura de 18 °C. Szalanski y colaboradores (2006a) determinaron que el tiempo post-ingesta máximo para aislar y amplificar exitosamente ADN humano en cimícidos fue de hasta 60 días.
- 2) Especie de insecto. Conocer la especie de insecto hematófago es relevante porque se reportó trabajos previos han reportado que existen diferencias en el proceso de digestión del alimento entre subfamilias. Curic y colaboradores (2014) reportaron que en especies de la subfamilia Anophelinae el proceso de digestión es más rápido que en especies de la subfamilia Culicinae. De esta última subfamilia se obtuvo un perfil genético humano completo hasta 48 horas post-ingesta, lo que no ocurrió con especies de Anophelinae. Ibrahim y colaboradores (2015) encontraron diferencias al cultivar *Aedes aegypti* y *Culex pipiens* a una temperatura de 40 °C. Publicaron la obtención de un perfil genético completo de *Aedes aegypti* hasta 6 horas post-ingesta, y de *Culex pipiens* hasta 72 horas post-ingesta.

- 3) Edad del insecto. Ibrahim (2015) analizó cómo afectó la edad de *Culex pipiens* en la degradación del ADN humano. Realizó un análisis genético del contenido gástrico en mosquitos con edades entre 4 y 10 días. De ellos extrajo una cantidad de ADN humano (1.25 a 1.51 ng/ μ l). Sin embargo, reportó que los glóbulos rojos de la muestra se degradan rápidamente (comenzó 6 horas después de la ingesta de alimento) como resultado del completo desarrollo del sistema digestivo. En mosquitos con edades entre 0 y 3 días, la degradación es lenta (comenzó hasta 12 horas después de la ingesta de alimento) pero la ingesta de sangre humana no es suficiente porque el sistema digestivo no está completamente desarrollado.
- 4) Temperatura ambiental. La temperatura ambiental en la que se desarrolla el insecto es otro factor por considerar. Ibrahim y colaboradores (2015) publicaron la obtención de perfiles genéticos completos. Mientras que mosquitos de *Aedes aegypti* y *Culex pipiens*, desarrollados a una temperatura de 18 °C, se obtuvieron perfiles completos hasta 48 horas después de la ingesta de alimento, a una temperatura de desarrollo de 40 °C, de *Aedes aegypti* se obtuvo un perfil completo hasta 6 horas post-ingesta, y de *Culex pipiens* hasta 72 horas post-ingesta.
- 5) Cantidad de insectos. Distintos estudios han documentado el empleo de más de un insecto para obtener una cantidad de ADN humano suficiente para un análisis genético. Lord y colaboradores (1998) compararon el empleo de un solo piojo de *Pthirus pubis* con un grupo de tres insectos. Concluyeron que, el empleo de uno o grupo de tres, no afectó el análisis de ADN mitocondrial porque se obtuvo ADN humano suficiente. Curic y colaboradores (2014) utilizaron un grupo de 9 mosquitos, lo que les permitió obtener cantidades de ADN suficientes para obtener perfiles genéticos completos hasta 48 horas después de alimentarse. Sin embargo, diferentes estudios han reportado la utilización de un solo insecto del que se obtuvo ADN suficiente para un perfil genético completo (Lord *et al.*, 1998; Kreike y Kampfer, 1999; Szalanski *et al.*, 2006b; De la Cruz, 2014).

II. Identificación de Insectos necrófagos

II.1 Orden Diptera

De acuerdo con Carles-Tolrá (2015) se han descrito 160,591 especies de dípteros, lo que representa el segundo grupo más diverso de seres vivos, es decir, que del 15 al 20% de las especies animales conocidas son dípteros (Carles-Tolrá, 2015). En México se conocen 2,091 especies descritas (Llorente-Bousquets, 2008).



Figura 2. Halterios en un díptero de la familia Tabanidea. Fotografía de Alexander L Wild. Tomada de <https://www.alexanderwild.com/Insects/Insect-Orders/Fabulous-Flies/i-BSCcx7Q/A>

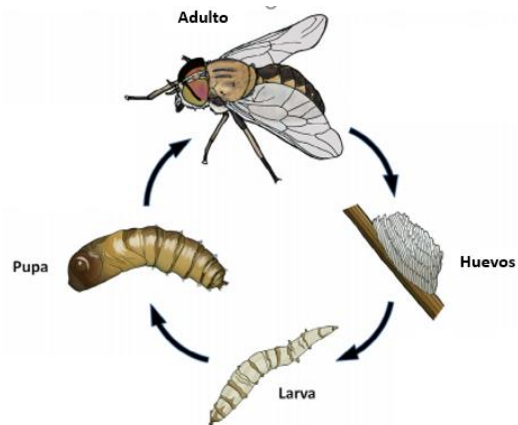
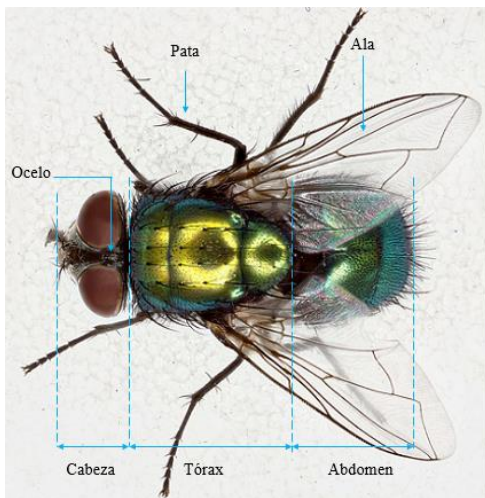
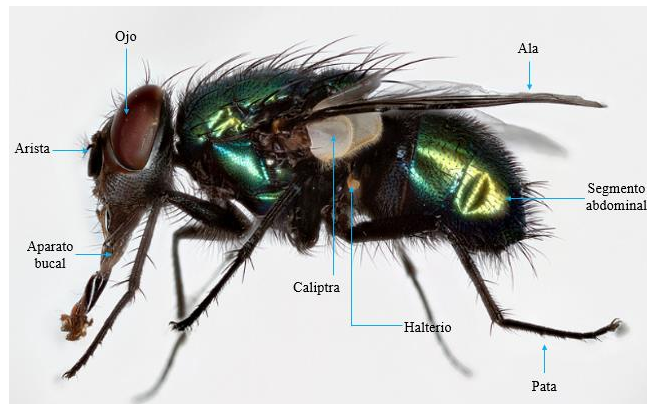


Figura 3. Ciclo de vida holometábolo de díptero. Esquema realizado por Baldacchino F., Ink: Bosco G. Tomado de Baldacchino *et al.*, 2014

Los dípteros son insectos caracterizados por tener, además de un par de alas, una transformación de las alas posteriores en órganos llamados halterios (Figura 2), que permiten su estabilidad mientras vuelan (Byrd y Castner, 2009). Algunas especies de dípteros poseen caliptras (Figura 4b), extensión de la región posterior basal del ala en forma de lóbulo. Entre las familias que poseen caliptras se encuentran las siguientes: Calliphoridae, Sarcophagidae, Anthomyiidae, Muscidae y Tachinidae (Rivers y Dahlem, 2014). Los dípteros son holometábolos (Figura 3), es decir, llevan a cabo una metamorfosis completa que incluye cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto (Carles-Tolrá, 2015).



(a)



(b)

Figura 4. Esquema de la anatomía de díptero (a) vista dorsal y (b) vista lateral. Fotografías tomadas de <https://www.flickr.com/photos/zpyder/9140735679/in/photostream/>. Esquema realizado por la autora de este trabajo.

Su cuerpo se encuentra dividido en tres partes: cabeza, tórax y abdomen (Figura 4a). La cabeza tiene un par de ojos compuestos, tres ocelos, un par de alas y un aparato bucal. Los ojos se clasifican en dicópticos, si ambos se tocan entre sí, y holópticos, si ambos ojos se tocan dorsalmente. El par de antenas son sensoriales, formadas de segmentos llamados artejos que son variables en forma, cantidad y tamaño. El primer artejo es llamado escapo, el segundo pedicelo y el resto de los artejos son llamados flagelos. El aparato bucal, asimismo llamado probóscide, comúnmente realiza la función de succionar, sin embargo, existen especies que además de tener esta función, cuentan con la función de picar. El tórax

x está compuesto por tres segmentos, cada uno porta un par de patas: el primero o prototórax; el segundo o mesotórax, donde se encuentra localizado el par de alas; y el tercero o metatórax. El abdomen está dividido en segmentos (Gullan y Cranston, 2005; Carles-Tolrá, 2015; Scudder y Cannings, 2006).

Los estadios inmaduros, específicamente larvas, son de importancia en el campo forense. Las larvas de dípteros se desarrollan en tres estadios o instars y poseen una forma cilíndrica (Figura 6). El cuerpo se divide en 12 segmentos: un segmento anterior o cabeza (segmento I), un segmento protorácico (segmento II), un segmento mesotorácico (segmento III), un segmento metatorácico (segmento IV) y ocho segmentos abdominales (V-XII) (Figura 5). La cabeza es delgada y

puntiaguda, sin embargo, no se presenta diferenciada. Además, presenta el esqueleto cefalofaríngeo, extendiéndose desde la cabeza hasta el tórax, conjunto de escleritos y los espiráculos anteriores, protuberancias que sobresalen del cuerpo ubicados a cada lado del segmento protorácico. Estos se presentan generalmente en el segundo instar. El extremo posterior es redondeado y plano. Además, presenta un par de espiráculos, estructuras de color oscuro y fungen como aparato respiratorio de la larva, que a su vez poseen una serie de slits rodeados por el peritrema, y tubérculos que rodean el segmento (Byrd y Castner, 2009; Amendt *et al.*, 2010) (Figuras 5 y 6).

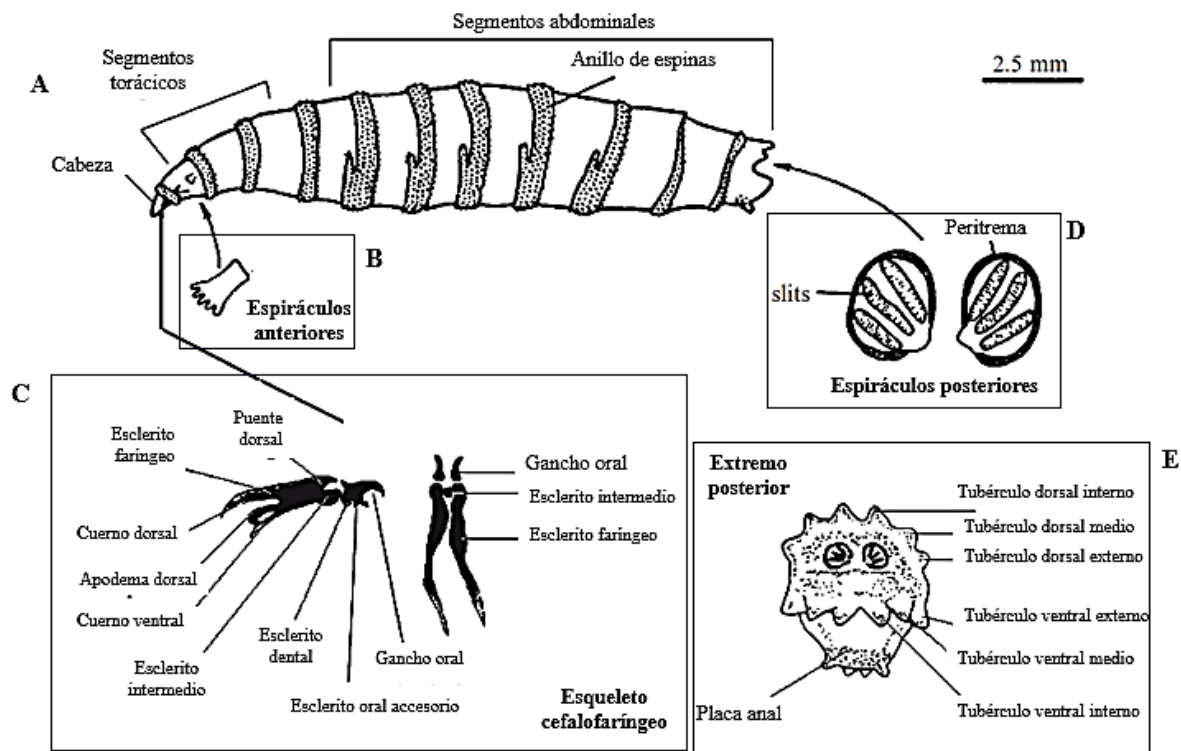


Figura 5. Estructura general de larva de díptero. (A) El cuerpo se divide en 12 segmentos: un segmento anterior o cabeza (segmento I), cuatro segmentos torácicos (II-IV) y ocho segmentos abdominales (V-XII). La cabeza presenta (B) espiráculos anteriores y (C) el esqueleto cefalofaríngeo. El extremo posterior de la larva presenta (D) espiráculos posteriores y (E) tubérculos que rodean el segmento posterior. Tomado de Amendt *et al.*, 2010.

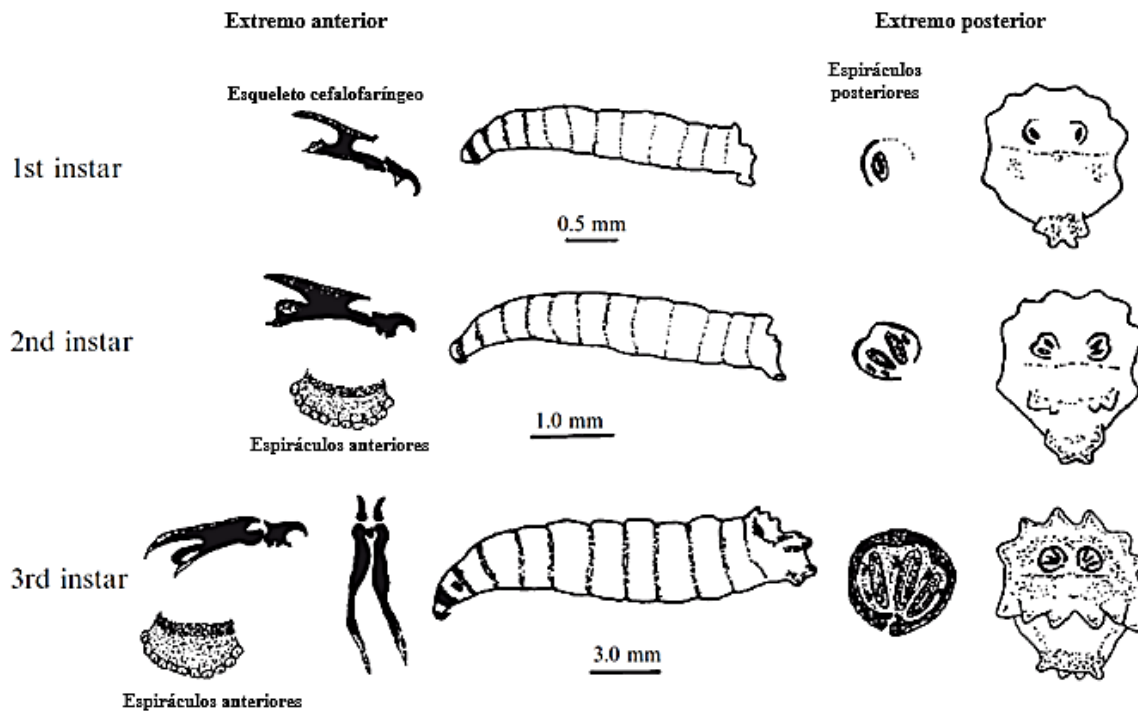


Figura 6. Desarrollo general de una larva. En el esquema se observa la aparición de los espiráculos anteriores hasta el segundo estadio larval y el desarrollo de los espiráculos posteriores y tubérculos en el extremo posterior. Tomado de Amendt *et al.*, 2010.

Actualmente los dípteros se dividen en dos subórdenes: Nematocera y Brachycera (Gennard, 2012). Entre las principales diferencias que presentan los subórdenes están la estructura de las antenas, palpos maxilares, mandíbula de la etapa larval y la cantidad de segmentos en los flagelos de las antenas (Scudder y Cannings, 2006).

II.1.1 Suborden Brachycera

Este suborden incluye entre otras, a las familias Calliphoridae, Muscidae, Phoridae, Piophilidae, Sarcophagidae, Sepsidae y Stratiomyidae, que a su vez incluye a algunas de las especies necrófagas más comunes (Uribe *et al.*, 2004; Amendt, *et al.*, 2010; Martín-Vega, 2011; Rivers y Dahlem, 2014).

II.1.1.1 Familia Calliphoridae



Figura 7. Díptero adulto de la especie *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794). Tomada de https://diptera.info/photogallery.php?photo_id=2646

Generalidades

La literatura refiere que se conocen aproximadamente 150,000 especies descritas y cerca de 10,000 géneros de la familia Calliphoridae (Perez y Wolff, 2011). Estas especies contribuyen a la descomposición de un cuerpo, alimentándose principalmente de tejido y fluidos corporales expuestos (Scudder y Cannings, 2006; Gennard, 2012). Amendt y colaboradores (2010) reportaron que especies de califóridos pueden encontrarse en cadáveres enterrados bajo una capa de tierra de hasta 40 centímetros de grosor.

Características morfológicas

Los adultos son azul y verde metálico (Figura 7), incluso existen especies que no presentan dicha coloración. Presentan una longitud de 4 a 16 milímetros. Las antenas poseen aristas plumosas, algunas especies presentan el cuerpo cubierto por sedas (Scudder y Cannings, 2006; Byrd y Castner, 2009). Poseen alas con caliptras (Rivers y Dahlem, 2014).

Las larvas presentan una coloración blanca o beige y en tercer instar miden de 8 a 23 milímetros de largo (Figura 8). Su esqueleto cefalofaríngeo usualmente cuenta con una coloración oscura y tiene mandíbulas formadas por dos ganchos bucales. En el último segmento corporal presentan tubérculos en forma de cono que cubre el perímetro del segmento (Figura 9a) y espiráculos (Figura 9b) (Byrd y Castner, 2009).

Hábitat

Las especies de la familia Calliphoridae habitan en todas las regiones geográficas del mundo (Martínez *et al.*, 2016).



Figura 8. Larva *Calliphora vomitoria* (arriba) y *Chrysomya albiceps* (abajo), ambas en tercer instar. Tomado de Byrd y Castner, 2009 y Almennt *et al.*, 2010.

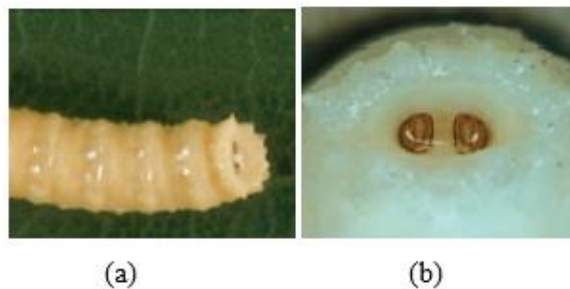


Figura 9. (a) Tubérculos de forma triangular en el último segmento de la larva y (b) espiráculos

II.1.1.2 Familia Muscidae



Figura 11. Larvas de *Musca domestica* (Linneo, 1758). Fotografía de Clemson University - USDA Cooperative Extension Slide Series. Tomada de <https://www.insectimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1234161>

Generalidades

Las larvas de la familia Muscidae se alimentan de materia vegetal y/o animal en descomposición, madera, hongos y otros artrópodos (Perez y Wolff, 2011).

Características morfológicas

Las larvas presentan tres estadios, una forma cilíndrica y no presentan la región cefálica diferenciada. Son color blanco, amarillas o beige (Figura 11). En tercer instar llegan a medir 12 milímetros de longitud. La mayoría de las especies tiene una superficie lisa, no obstante, existen especies que presentan protuberancias y tubérculos laterales en cada segmento. En el segmento posterior presentan espiráculos (Byrd y Castner, 2009). Se alimentan de materia orgánica en descomposición de origen animal o vegetal y algunas son depredadores de insectos (Scudder y Cannings, 2006).

Hábitat

La familia Muscidae se distribuye en todo el mundo, con mayor predominancia en zonas boscosas y áreas de alta pluviosidad (Byrd y Castner, 2009; Perez y Wolff, 2011).

II.1.1.3 Familia Phoridae



Figura 12. Adulto macho *Megaselia rufipes* (Meigen, 1804). Tomada de <https://sites.google.com/site/dipterabrachyceracyclorrhapha/suborder-brachycera/phoridae-scuttle-fly/genus-megaselia/megaselia-rufipe>



Figura 13. Larva de la especie *Megaselia rufipes* (Meigen, 1804). Tomada de <https://sites.google.com/site/dipterabrachyceracyclorrhapha/suborder-brachycera/phoridae-scuttle-fly/genus-megaselia/megaselia-rufipes>

Generalidades

Los fóridos cuentan con aproximadamente 2,500 especies distribuidas alrededor del mundo (Carles-Tolrá, 2007; Byrd y Castner, 2009). Se alimentan de materia orgánica en descomposición, de materia vegetal, aunque también hay especies parásitas, parasitoides, micófitas, depredadoras, etc. (Carles-Tolrá, 2007). Algunas especies son conocidas por causar miasis en animales, incluidos los humanos (Scudder y Cannings, 2006).

Características morfológicas

Los adultos son de tamaño pequeño, con una longitud que oscila entre 0.5 y 6 milímetros de longitud. El cuerpo presenta una coloración diversa, desde colores oscuros hasta colores claros como gris, amarillo y naranja. Se caracterizan porque la región dorsal del tórax es jorobada. Otra característica que representa a esta familia son las sedas largas, que pueden llegar a ser plumosas, las cuales se localizan en cabeza y patas (Carles-Tolrá, 2007; Gennard, 2012) (Figura 12).

Las larvas presentan formas diversas: aplanadas dorsoventralmente, cilíndricas o alargadas (Figura 13). Frecuentemente tiene doce segmentos con pequeñas protuberancias. Disney (2011) refiere que ciertas especies de larvas son acuáticas. Su alimentación es a base de materia orgánica en descomposición, ya sea de origen animal o vegetal, sin embargo, hay especies que se desarrollan en hongos, nidos de hormigas, etc. (Disney, 2011).

Hábitat

Las especies de la familia Phoridae se distribuyen alrededor del mundo, localizándose en todo tipo de hábitats terrestres, excepto en zonas extremadamente frías o secas (Carles-Tolrá, 2007).

II.1.1.4 Familia Piophilidae



Figura 14. Díptero adulto de la especie *Piophila casei* (Linnaeus, 1758). Tomado de https://diptera.info/forum/viewthread.php?thread_id=51654&pid=221923



Figura 15. Larva de la especie *Piophila casei* (Linnaeus, 1758). Tomado de <http://davidavid.blogspot.com/2006/12/leaping-larvae.html>

Generalidades

Familia compuesta por 82 especies en todo el mundo (Martín-Vega, 2011).

Características morfológicas

Los adultos son de color negro brillante (Figura 14), marrón opaco o amarillo y su longitud oscila entre 2.5 y 8 milímetros (Brown *et al.*, 2010). Se encuentran sobre materia orgánica expuesta en avanzado estado de descomposición (Martín-Vega, 2011), desechos humanos, huesos y piel, incluso se asocian con fuentes de alimento ricos en proteínas (Byrd y Castner, 2009).

Las hembras ponen aproximadamente de 100 a 480 huevos en tres lotes (Gennard, 2012). Estos huevos se desarrollan en un promedio de 3 días a una temperatura en laboratorio de 18 °C (Gennard, 2012). Las larvas en tercer instar pueden llegar a medir de 5 a 10 milímetros de longitud. Son de color blanco, no presentan la región cefálica diferenciada, de forma cilíndrica y con anillos entre cada segmento (Brown *et al.*, 2006) (Figura 15). En el segmento terminal presenta de tres a cuatro pares de tubérculos pequeños (Brown *et al.*, 2006). Cuentan con unos pequeños ganchos en el segmento anal (Byrd y Castner, 2009; Rivers y Dahlem, 2014). Al igual que los adultos, se alimentan de materia en descomposición, aunque también existen larvas que son ectoparásitos de aves. Se conoce que larvas de ciertas especies saltan como mecanismo de migración (Rivers y Dahlem, 2014). En un cadáver es común localizarlas en estados avanzados de putrefacción y al interior de huesos largos, esto debido a que se alimentan de médula ósea (Gennard, 2012; Rivers y Dahlem, 2014).

Se ha reportado que los géneros *Piophila*, *Stearibia* y *Prochyliza*, pertenecientes a la subtribu Piophilina, y la subtribu Thyreophorina, están frecuentemente asociados a la entomofauna cadavérica (Martín-Vega, 2011).

Hábitat

La familia Piophilidae se distribuye principalmente en regiones del hemisferio norte con clima templado (Martín-Vega, 2011).

II.1.1.5 Familia Sarcophagidae



Figura 16. Díptero adulto del género *Sarcophaga*. Tomado de <https://bugguide.net/node/view/921680/bgimage>

Generalidades

Los dípteros de la familia Sarcophagidae son necrófagos, coprófagos, parásitos y depredadores de insectos, caracoles, reptiles y aves. Según Gennard (2012) existen especies del Neártico y Paleártico que son capaces de desarrollarse en cadáveres enterrados.

Características morfológicas

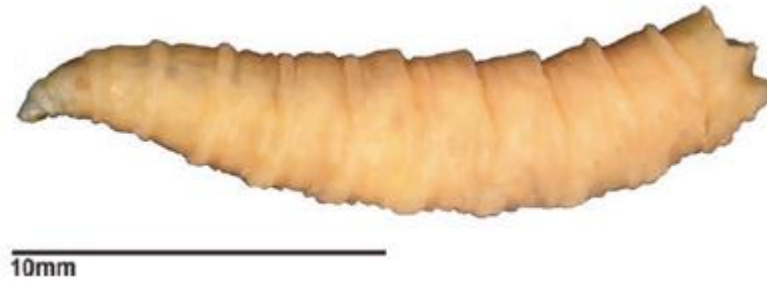
Los adultos son de gran tamaño, llegando a medir de 10 a 25 milímetros de longitud. Son de color gris y poseen ojos color rojo (Rivers y Dahlem, 2014). Se caracterizan por poseer tres líneas negras dibujadas en el tórax y un tipo de patrón moteado o de tablero de ajedrez de color negro en el abdomen (Gennard, 2012; Brown *et al.*, 2010). Poseen caliptras (Rivers y Dahlem, 2014) (Figura 16).

Las hembras son ovovivíparas, es decir, los huevos eclosionan en el interior de la hembra, de manera que las larvas salen hasta 4 o 5 días de madurez, tiempo que dependerá de las condiciones ambientales (Gennard, 2012). Las hembras depositan larvas, en primer instar, sobre los restos en descomposición (Byrd y Castner, 2009).

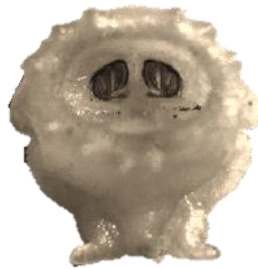
Las larvas tienen forma cilíndrica y son de color blanco (Figura 17a). En el borde del segmento posterior poseen una gran cantidad de tubérculos y cuentan con espiráculos posteriores dentro de una cavidad (Gennard, 2012) (Figura 17b). Son coprófagas y saprófagas, y se desarrollan en materia orgánica en descomposición (Romera *et al.*, 2003).

Hábitat

Las especies de la familia Sarcophagidae habitan ambientes tropicales o regiones cálidas (Byrd y Castner, 2009).



(a)



(b)



(c)

Figura 17. (a) larva *Sarcophaga caerulescens* en tercer instar que muestra el aparato bucal de color negro en el extremo izquierdo y tubérculos en el extremo derecho (b) vista de la región posterior y (c) espiráculo característico de la familia Sarcophagidae. Tomadas de Amendt *et al.*, 2010.

II.1.1.6 Familia Sepsidae



Figura 18. Díptero de la especie *Sepsis sp.* Fotografía de Steve Marshall, University of Guelph. Tomada de <http://diptera.myspecies.info/category/diptera-classification/sciomyzoidea>

Generalidades

Familia distribuida por todo el mundo con menos de 240 especies descritas (Byrd y Catsner, 2009). Se ha reportado que esta familia está presente en los últimos estados de putrefacción (Gennard, 2012).

Características morfológicas

Los adultos miden entre 2 y 7 milímetros de longitud y son generalmente de color negro brillante, café, morado o rojo (Byrd y Catsner, 2009; Brown *et al.*, 2010). La cabeza es de forma redondeada y la base del abdomen es estrecho (Figura 18), morfología parecida a hormigas y avispas. Los adultos poseen patas delgadas y alas con una pigmentación oscura en la base (Scudder y Cannings, 2006). Byrd y Catsner (2009) reportan que esta familia se caracteriza por agitar las alas hacia afuera mientras caminan. Se desarrollan en materia orgánica en descomposición, incluso sobre heces fecales.

Las larvas en tercer instar llegan a medir de 3 a 6 milímetros de longitud (Figura 19). Al igual que los adultos, se alimentan de materia orgánica en descomposición y heces fecales (Brown *et al.*, 2010). Su desarrollo se completa entre 7 y 32 días, tiempo que dependerá de la temperatura y humedad. Además, realiza movimiento de salto como diversas especies de la familia Piophilidae. La etapa pupal dura entre 8 y 13 días con clima cálido y hasta 19 semanas en clima frío (Robinson, 2005).

Hábitat

De acuerdo con Muhammad y colaboradores (2017), especies de la familia Sepsidae habitan en todas las zonas geográficas del mundo.



Figura 19. Larva en tercer instar de la especie *Nemopoda nitidula*. Tomada de Almedt *et al.*, 2010.

II.1.1.7 Familia Stratiomyidae



Figura 20. Vista dorsal de la especie *Hermatia illucens* (Linnaeus, 1758). Fotografía de Maury J. Heiman. Tomada de <https://bugguide.net/node/view/184752>

Generalidades

Se ha reportado que se conoce aproximadamente 250 especies descritas y habitan comúnmente en áreas húmedas, así como sobre tejido en descomposición de origen vegetal y animal (Byrd y Castner, 2009). Los adultos son conocidos como moscas soldados debido a que ciertas especies poseen espinas en el tórax, especialmente sobre el escutelo (Byrd y Castner, 2009).

Características morfológicas

Los adultos poseen un color corporal variado: negro, verde, azul o amarillo. Su tamaño es diverso dependiendo de la especie: de 3 a 20 milímetros de longitud. Su cuerpo se caracteriza por estar

ligeramente plano dorsoventralmente. Las antenas tienen tres segmentos, el último es alargado o redondeado (Scudder y Cannings, 2006) (Figura 20).

Las larvas en tercer instar llegan a medir de 4 a 40 milímetros. Son alargadas y aplanadas dorsoventralmente (Scudder y Cannings, 2006) (Figura 21). Algunas especies se desarrollan en ambientes acuáticos y otras en ambientes terrestres. Las larvas que se desarrollan en ambientes terrestres, generalmente se alimentan de materia orgánica en descomposición de origen vegetal o animal, raíces y heces fecales, sin embargo, algunas veces son depredadores (Gennard, 2012; Byrd y Castner, 2009).

Hábitat

Los adultos habitan comúnmente cerca de bosques y áreas húmedas con basta vegetación (Byrd y Castner, 2009).



Figura 21. Larva en tercer instar de *Hermatia illucens* (Linnaeus, 1758). Tomada de Byrd y Castner, 2009.

II.2 Orden Coleoptera

A nivel mundial se conocen alrededor de 358,000 especies descritas. En México se reporta la existencia de aproximadamente 35,500 especies de coleópteros (Galindo *et al.*, 2012). Los coleópteros son holometábolos (Figura 22). Los adultos, comúnmente conocidos como escarabajos, poseen un exoesqueleto rígido en la mayor parte de su estructura corporal y el primer par de alas modificado en una estructura rígida llamada élitros (Alonso-Zarazaga, 2015).

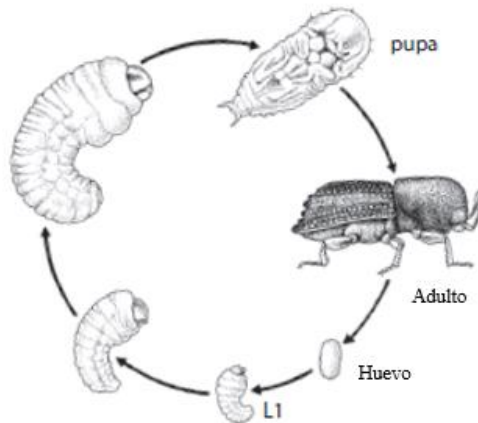


Figura 22. Esquema del ciclo de vida del orden Coleoptera. Tomado de Beutel *et al.*, 2014.

El cuerpo de los coleópteros está dividido en tres regiones: cabeza, tórax y abdomen (Figura 23a). En la cabeza poseen un par de antenas, con un máximo de once artejos en ciertas especies, un par de ojos y el aparato bucal tipo masticador (Alonso-Zarazaga, 2015).

El tórax tiene tres pares de patas y dos pares de alas. Estas últimas caracterizan a los coleópteros debido a que el par anterior, llamadas élitros, son rígidas y protegen las alas posteriores (Galindo *et al.*, 2012) (Figura 23b). Las alas posteriores o metatorácicas, son membranosas y las utilizan para volar, ciertas veces pueden estar reducidas o ausentes (Rivers y Dahlem, 2014). El tórax se divide en protórax y pterotórax. El abdomen se divide en diez u once segmentos, sin embargo, sólo son visibles cinco o seis esternitos. El esternito VIII y el segmento IX corresponden a los genitales (Alonso-Zarazaga, 2015).

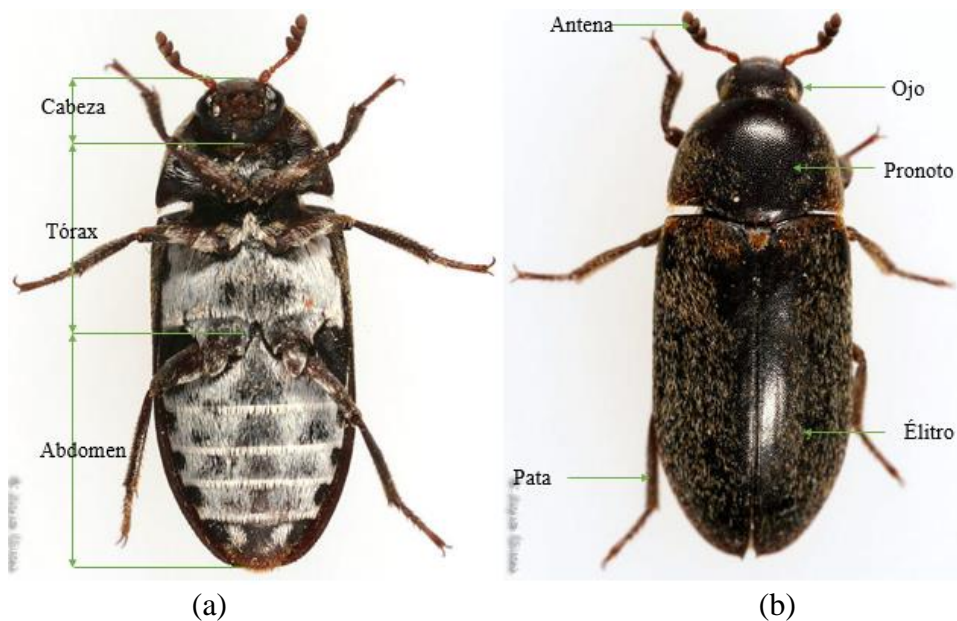


Figura 23. Esquema de la anatomía externa de *Dermestes maculatus* (DeGeer, 1774): (a) vista ventral y (b) vista dorsal. Fotografías tomadas de <https://bugguide.net/node/view/39726>. Esquema realizado la autora de este trabajo.

Las larvas de coleópteros poseen una apariencia muy variada y, a diferencia de las larvas de dípteros, la región cefálica se encuentra diferenciada y poseen seis patas (Byrd y Castner, 2009). Se han reportado especies necrófagas en las familias Dermestidae, Nitidulidae y Silphidae (Uribe *et al.*, 2004; Amendt *et al.*, 2010; Rivers y Dahlem, 2014).

II.2.1 Familia Dermestidae



Figura 24. Vista dorsal de coleóptero adulto *Dermestes maculatus* (DeGeer, 1774). Fotografía de Joyce Gross, Universidad de California. Tomado de http://entnemdept.ufl.edu/creatures/misc/beetles/hide_beetle.htm



Figura 25. Larva *Dermestes maculatus* (DeGeer, 1774). Fotografía de Lyle y Shaver, Universidad de Florida. Tomada de http://entnemdept.ufl.edu/creatures/misc/beetles/hide_beetle.htm

Generalidades

Los derméstidos se encuentran distribuidos alrededor del mundo con aproximadamente 500 especies conocidas (Byrd y Castner, 2009). Esta familia está asociada con los últimos estados de descomposición de un cadáver, después de que la mayor parte del tejido ha sido consumido (Rivers y Dahlem, 2014). Adultos y larvas se alimentan de piel, cabello, cartílago y restos similares, incluso los adultos son depredadores de larvas de su misma especie (Rivers y Dahlem, 2014). De acuerdo con Gennard (2012) los derméstido tienden a huir de la luz.

Características morfológicas

Los adultos presentan un tamaño que oscila entre 2 y 12 milímetros de longitud. Tienen una forma ovalada (Figura 24) y estas cubiertos con escamas que pueden formar patrones (Robinson, 2005). Se alimentan de tejido animal seco, especialmente el género *Dermestes*.

Lar larvas miden entre 4 y 12 milímetros de longitud. Son de color café y la mayoría de las especies están cubiertas con sedas largas (Robinson, 2005) (Figura 25). En un cadáver se ubican durante las últimas etapas de putrefacción, alimentándose de tejido seco (Byrd y Castner, 2009). Se desarrollan principalmente en ambientes cálidos.

Hábitat

Los derméstidos se distribuyen en todas las regiones alrededor del mundo (Byrd y Castner, 2009).

II.2.2 Familia Nitidulidae

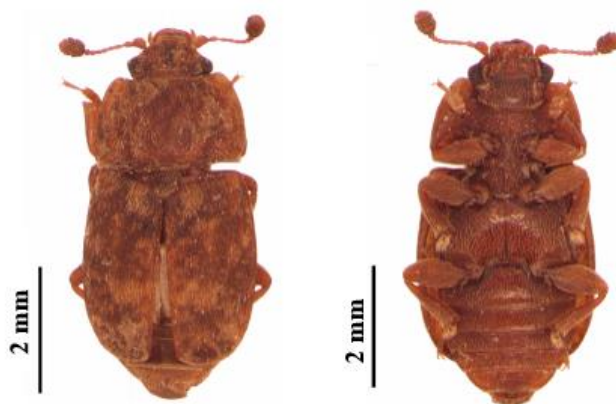


Figura 26. Vista dorsal (izquierda) y vista ventral (derecha) de *Osmosita colon* (Linnaeus, 1758). Tomada de Hernández *et al.*, 2018.

Generalidades

La familia Nitidulidae son coleópteros con más de 2,500 especies distribuidas alrededor del mundo, y son conocidos comúnmente como escarabajos de la savia (Byrd y Castner, 2009). Algunas especies son atraídas por la materia orgánica en descomposición, presentándose durante etapas avanzadas (Byrd y Castner, 2009). Los géneros *Nitidula*, *Omosita* y *Carpophilus*, incluyen especies útiles en investigaciones forenses (Smith 1986; Hernández *et al.*, 2018).

Características morfológicas

Los adultos poseen características morfológicas diversas: ovalada o aplanada. La mayoría de las especies son de color oscuro, pero pueden presentar manchas amarillas, rojas, cafés o negruzcas (Hernández, 2013). Llegan a medir entre 4 y 12 mm de longitud. Presentan generalmente élitros cortos dejando visibles dos o tres segmentos abdominales, sin embargo, existen especies que presentan élitros largos que cubre todo el abdomen (Byrd y Castner, 2009) (Figura 26).

Las larvas llegan a medir menos de 3 mm y hasta 6 mm de longitud. Presentan una coloración amarillenta, excepto la cabeza y segmento anal, que puede presentar una coloración marrón en la región dorsal. Morfológicamente son alargadas, delgadas y planas dorsoventralmente. Además, el cuerpo está cubierto con finas sedas. El dorso y vientre se encuentran esclerotizados, aunque el vientre es menos esclerotizado que el dorso. La cabeza presenta un par de antenas y las patas mesotorácicas se encuentran divididas en cinco segmentos. El abdomen posee diez segmentos visibles (Hernández, 2013; Díaz-Aranda *et al.*, 2018) (Figura 27 y 28).

Hábitat

La familia Nitidulidae habitan principalmente en bosques, prados, tierras de cultivo, playas, desiertos, grutas y nidos de abeja, alrededor del mundo (Hernández, 2013).

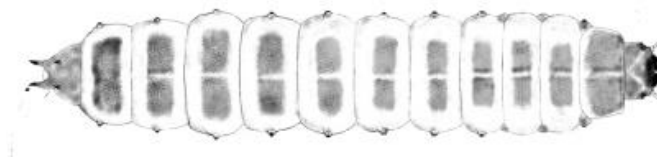


Figura 27. Esquema de la vista dorsal de *Osmosita colon* (Linnaeus, 1758). Tomada de Díaz-Aranda *et al.*, 2018

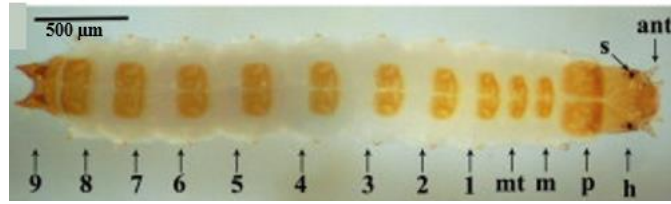


Figura 28. Esquema de la vista dorsal de *Nitidula carnaria* (Schaller 1783). 1-9: segmentos abdominales; *ant*: antena; *h*: cabeza; *m*: mesotórax; *mt*: metatórax; *p*: prototórax; *s*: ojo simple. Tomada de Ortloff *et al.*, 2014.

II.2.3 Familia Silphidae



Figura 29. Coleóptero adulto de la especie *Nicrophorus mexicanus* (Matthews, 1888). Tomado de <https://bugguide.net/node/view/1388478/bgimage>

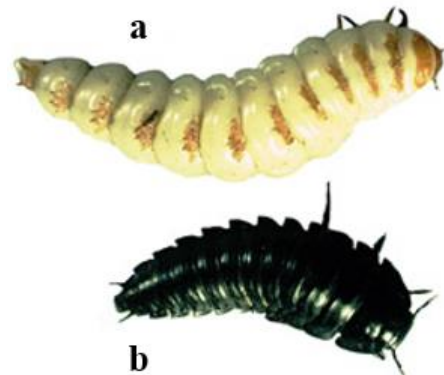


Figura 30. Larva de a) *Nicrophorus* sp. y b) Silphinae. Tomada de Sikes, 2005.

Generalidades

La familia Silphidae tiene más de 1,500 especies descritas y distribuidas alrededor del mundo. Se han identificado al enterrar restos de materia orgánica en descomposición como reserva de alimento para sus larvas (Byrd y Castner, 2009). Se divide en dos subfamilias: Silphinae, conocidos comúnmente como escarabajos carroñeros, y Nicrophorinae, conocidos como escarabajos enterradores (Gennard, 2012).

Características morfológicas

Los adultos son de color oscuro brillante con manchas naranjas, amarillas o rojas sobre los élitros (Rivers y Dahlem, 2014) (Figura 29). Su tamaño oscila entre los 10 y 35 milímetros de longitud. Los élitros son generalmente cortos y dejan expuestos varios segmentos abdominales (Byrd y Castner, 2009). Algunos autores los colocan en la clase trófica de las especies omnívoras, esto

debido a que los adultos se alimentan de huevos y larvas de dípteros (Byrd y Castner, 2009; Rivers y Dahlem, 2014).

Larvas pertenecientes a la familia Silphidae se desarrollan y alimentan de materia orgánica en descomposición. Se localizan a menudo durante las últimas etapas de descomposición de un cadáver. Morfológicamente las larvas son planas dorsoventralmente y la subfamilia Silphidae presentan una protección externa, que no presentan larvas de Nicrophorinae, particularmente el género *Nicrophorus* (Sikes *et al.*, 2005; Byrd y Castner, 2009) (Figura 30).

Hábitat

Los sílfidos son comúnmente encontrados en ambientes rurales o zonas boscosas y raramente en ambientes urbanos (Rivers y Dahlem, 2014).

III. Identificación de insectos hematófagos

III.1 Orden Diptera

III.1.1 Suborden Nematocera

Incluye a hematófagos de las familias Ceratopogonidae, Culicidae, Psychodidae y Simuliidae.

III.1.1.1 Familia Ceratopogonidae



Figura 31. Díptero adulto de la especie *Culicoides* sp. Tomado de https://diptera.info/photogallery.php?photo_id=9145

Generalidades

Los dípteros de la familia Ceratopogonidae son conocidos de manera coloquial como chaquistes o chaquistles (Robbinson, 2005). Las hembras adultas, principalmente las pertenecientes al género *Austroconops*, *Culicoides*, *Forcipomyia* y *Leptoconops* se alimentan de tejido sanguíneo de vertebrados (Robbinson, 2005; González *et al.*, 2012).

Características morfológicas

Los adultos son de color oscuro, miden aproximadamente de 1 a 6 milímetros de longitud y tienen alas moteadas (Figura 31). Las larvas son de color amarillo o translúcidas y miden aproximadamente de 3 a 5 milímetros de largo (Robbinson, 2005; Scudder y Cannings, 2006).

Hábitat

Los ceratopogónidos se desarrollan en áreas costeras arenosas con clima cálido y distribuyen alrededor del mundo a excepción de la Antártida (Robbinson, 2005; González *et al.*, 2012).

III.1.1.2 Familia Culicidae



Figura 32. Mosquito adulto de la especie *Culex quinquefasciatus* (Say, 1826). Fotografía de Lyle Buss, University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences. Tomado de <https://medicalxpress.com/news/2018-04-mosquito-species-zika.html>

Generalidades

La familia Culicidae, llamados comúnmente como mosquitos, son los insectos hematófagos más conocidos. Cuenta con aproximadamente 3,300 especies (Service, 2008). Se divide en tres subfamilias: Anophelinae, Culicinae y Toxorhynchitinae, aunque las especies de la subfamilia Toxorhynchitinae no son hematófagos. Principalmente las especies de los géneros *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Haemagogus*, *Ochlerotatus*, *Psorophora*, y *Sabethes* son conocidas como hematófagos vectores de enfermedades humanas (Lehan, 2005; Curic *et al.*, 2014).

Características morfológicas

Los adultos miden de 3 a 19 milímetros. Poseen escamas de diversos colores en la mayor parte del cuerpo. Tienen una probóscide visible, larga, delgada y proyectada hacia adelante; y una franja de escamas a lo largo del margen posterior de las alas (Robinson, 2005) (Figura 32).

Las hembras adultas se alimentan de sangre ya que requieren de esta para la producción de huevos (Robinson, 2005). Generalmente se alimentan durante estaciones cálidas en regiones con climas templados o todo el año en regiones tropicales y subtropicales (Rozendaal, 1997; Mehlhorn, 2008). Son capaces de desarrollarse en variedad de ambientes, colonizando cuerpos de agua temporales o permanentes de diversos tamaños. Los mosquitos que ingresan a asentamientos humanos a menudo permanecen en el lugar durante algunas horas después de alimentarse (Rozendaal, 1997). Si han completado su alimentación, pueden permanecer en el lugar de dos a cinco horas o salir del mismo (Jones y Pilitt, 1973). Esto con el propósito de buscar un lugar de

descanso aislado donde pueda digerir el alimento y comience la producción de huevos (Rozendaal, 1997).

Pueden llegar a desplazarse entre 100 m a 5 km, aunque pueden llegar a trasladarse a distancias mayores debido a las corrientes de aire o por su traslado a través de transporte humano (Rozendaal, 1997; Mehlhorn, 2008).

Hábitat

Las especies de Culicidae se distribuyen alrededor del mundo, excepto en la Antártida (Lehane, 2005).

III.1.1.3 Familia Psychodidae



Figura 33. Especie de la familia Psychodidae, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz y Neiva, 1912). Fotografía del Dr. Ray Wilson. Tomada de www.raywilsonbirdphotography.co.uk

Generalidades

Esta familia cuenta con más de 700 especies distribuidas alrededor del mundo. En México se han registrado aproximadamente 40 especies (Ibáñez-Bernal, 2000). Los géneros *Lutzomyia* y *Phlebotomus*, pertenecientes a la subfamilia Phlebotominae, se alimentan de sangre humana (Lehane, 2005; Robinson, 2005).

Características morfológicas

Los adultos flebótomos miden entre 1.5 y 4 milímetros de largo aproximadamente. Se caracterizan por tener un cuerpo delgado y patas largas, ambos revestidos de sedas (Figura 33). Los flebótomos

pueden moverse hasta 2 km de distancia (Lehane, 2005). En México son conocidas como jejenes o papalotillas y viven en ambientes tropicales.

Hábitat

Las especies de la familia Psuchodidae habitan en zonas templadas y en trópicos. En zonas templadas están presentes solo en los meses de verano, mientras que en los trópicos pueden estar presentes durante todo el año (Lehane, 2005).

III.1.1.4 Familia Simuliidae



Figura 34. *Simulium argyreatum* (Meigen, 1838). Fotografía de A. Renz. Tomado de <https://www.riverblindness.eu/onchocerciasis/simulium-vectors/>

Generalidades

Los dípteros pertenecientes a la familia Simuliidae son llamados comúnmente como moscas negras. Sólo las hembras adultas de tres géneros se alimentan de sangre humana: *Prosimulium*, *Austrosimulium* y *Simulium*. La literatura reporta que los simúlidos son insectos de hábitos predominantemente diurnos (Robinson, 2005; Ruiz *et al.*, 2014).

Características morfológicas

Los adultos miden entre 2 y 5 milímetros de longitud. Por lo general son de color negro, pero presentan una variedad de colores como gris, naranja o amarillo. Se diferencian de otros dípteros por el gran tamaño del tórax, cubierto por sedas cortas. Las antenas son cortas y gruesas. Tiene patas cortas y robustas (Figura 34). Tienen una vida promedio de 3 semanas y son capaces de desplazarse de 15 a 35 km de distancia (Lehane, 2005; Robinson, 2005; Ruiz *et al.*, 2014).

Hábitat

Los simúlidos son especies cosmopolitas, desarrollándose principalmente en lugares con presencia de vegetación adyacente a ríos o lagos (Lehane, 2005).

III.1.2 Suborden Brachycera

El suborden Brachycera incluye especies hematófagas pertenecen a las familias Glossinidae, Muscidae, Rhagionidae y Tabanidae (Robinson, 2005).

III.1.2.1 Familia Glossinidae



Figura 35. Díptero macho *Glossina morsitans* (Westwood). Tomado de https://diptera.info/photogallery.php?photo_id=2075

Generalidades

Existen 23 especies descritas, pertenecientes a los grupos fusca, palpalis y morsitans, coloquialmente conocidas como moscas tse-tsé (Lehane, 2005). El nombre deriva de un zumbido agudo que produce cuando absorben calor (Lehane, 2005). Lehane (2005) refiere que la distribución de la familia se limita al continente africano. Sin embargo, Huerta (2015) reportó en la base de datos de la CONABIO “Actualización de la Colección de Artrópodos con importancia médica (CAIM)”, haber identificado especies de la familia Glossinidae en territorio mexicano en los años 1957, 1958 y 1959: *Glossina fuscipes quanzensis*, *Glossina fuscipes*, *Glossina palpalis*, *Glossina morsitans* y *Glossina schwetzi*.

Características morfológicas

Los adultos son de color café, con cuerpo largo y delgado. Su tamaño es diverso y oscila entre 6 y 14 milímetros de longitud. Poseen un par de alas que, al permanecer en reposo, se pliegan como tijeras cerradas sobre la región dorsal del díptero (Figura 35). La probóscide se proyecta hacia

delante y tiene la misma longitud que los palpos. La mayoría de las especies son diurnas, presentando mayor actividad en este lapso del día (Lehane, 2005).

Hábitat

Los glosínidos habitan zonas desérticas áridas, selvas tropicales y bosques de tierras bajas (Lehane, 2005).

III.1.2.2 Familia Muscidae



Figura 36. Adulto de la especie *Stomoxys calcitrans* (Linneo, 1758). Esta especie se caracteriza porque la proyección de la probóscide es hacia adelante. Tomada de https://diptera.info/photogallery.php?photo_id=1627

Generalidades

Sólo los adultos del Género *Stomoxys* y *Haematobia* son hematófagos (Perez y Wolff, 2011). Estos dípteros hematófagos poseen partes bucales que penetran la piel de vertebrados, por ejemplo, la especie *Stomoxys calcitrans* (Lehane, 2005) (Figura 36).

Características morfológicas

Los múscidos adultos llegan a medir hasta 14 milímetros de longitud. Poseen una coloración corporal amarilla, gris o negra; incluso algunas especies llegan a presentar una coloración azul o verde metálico. Se caracterizan por tener líneas oscuras a lo largo del tórax (Scudder y Cannings, 2006; Gennard, 2012) (Figura 36). Poseen caliptras de color blanco o café oscuro (Perez y Wolff, 2011; Rivers y Dahlem, 2014).

Estos dípteros son ovíparos y ovovivíparos (Meier *et al.*, 1999 citado por Perez y Wolff, 2011). Las hembras adultas, al igual que los califóridos, colocan sus huevos en orificios de un cuerpo en descomposición y lesiones presentes en el mismo (Byrd y Castner, 2009).

Hábitat

La familia Muscidae se distribuye en todo el mundo, localizada principalmente en zonas boscosas y áreas de alta pluviosidad (Byrd y Castner, 2009; Perez y Wolff, 2011).

III.1.2.3 Familia Rhagionidae



Figura 37. Díptero del Género *Symphoromyia*. Fotografía de Alexander Wild. Tomado de <https://www.alexanderwild.com/Insects/Insect-Orders/Fabulous-Flies/i-ZLLZJG8>

Generalidades

La familia Rhagionidae cuenta con aproximadamente 500 especies descritas mundialmente (Carles-Tolrá, 2001). Es una familia poco estudiada. Sin embargo, se conoce que son depredadores de insectos y algunas especies alimentan de tejido sanguíneo como *Atherix spp.* Las especies *Atherix spp.* son conocidas por distribuirse en regiones de América de Norte y Europa (Lehane, 2005; Robinson, 2005).

Características morfológicas

Las especies que son hematófagas (género *Symphoromyia*) tiene piezas bucales que utiliza para cortar y perforar la piel para succionar su alimento (Lehane, 2005). El cuerpo de los adultos del género *Symphoromyia* es de color gris, su tamaño es pequeño, carece de sedas, tienen un abdomen

alargado y patas largas y delgadas (Figura 37). Las alas son anchas, largas, opacas y tiene bandas oscuras. Poseen caliptras (Robinson, 2005; Scudder y Cannings, 2006).

Hábitat

Los adultos pueden localizarse en zonas húmedas y sombrías de bosques, cerca de cursos de agua, pantanos, etc. (Carles-Tolrá, 2001).

III.1.2.4 Familia Tabanidae



Figura 38. Díptero adulto *Chrysops flavidus* (Wiedemann, 1821). Fotografía de John R. Maxwell. Tomado de <https://bugguide.net/node/view/1167654/bgp>

Generalidades

La familia Tabanidae tiene aproximadamente 4,300 especies descritas (Lehane, 2005; Robinson, 2005). Son muy conocidos porque las hembras, pertenecientes a los géneros *Chrysops*, *Haematopota* y *Tabanus*, son hematófagas (Lehane, 2005).

Características morfológicas

Las especies de la familia Tabanidae son dípteros de gran tamaño, llegan a medir hasta 30 milímetros de longitud, y presentan diversos colores corporales: negro, café, verde y amarillo (Lehane, 2005) (Figura 38). El par de ojos compuestos es prominente y de colores brillantes con patrones en color rojo, amarillo o azul, esta característica se presenta en los géneros *Chrysops* y *Haematopota* (Robinson, 2005). En el macho los ojos son holópticos y en la hembra son dicotópicos. Posee antenas gruesas con 5 a 11 segmentos. La probóscide es rígida y cuenta con

piezas bucales en forma de cuchillo que utilizan para morder. El abdomen es ancho y siete de los segmentos que lo conforman son visibles (Scudder y Cannings, 2006).

Hábitat

Los tabánidos habitan en áreas boscosas, húmedas y cerca de arroyos durante primavera y verano alrededor del mundo (Lehane, 2005; Robinson, 2005).

III.2 Orden Hemiptera

Los hemípteros se dividen en dos subordenes: Heteroptera y Homoptera. Dentro de los heterópteros se encuentran tres familias con especies hematófagas: Cimicidae, Reduviidae y Polyctenidae. Esta última solo se alimenta de la sangre de murciélagos (Lehane, 2005).

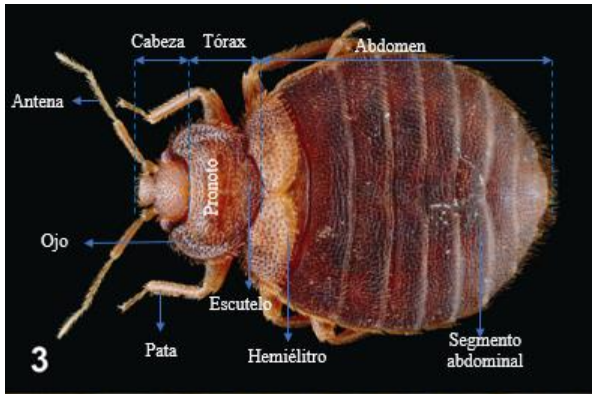


Figura 39. Esquema de la morfología externa de Cimicidae (vista dorsal). Fotografía tomada de Goula y Mata, 2015. Esquema realizado por la autora de este trabajo.

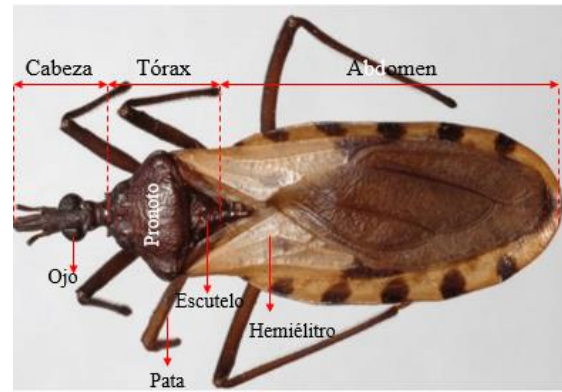


Figura 40. Esquema de la morfología externa de Reduviidae (vista dorsal). Fotografía tomada de Carzola, 2016. Esquema realizado por la autora de este trabajo.

Los heterópteros cuentan con más de 40,000 especies distribuidas alrededor del mundo (Goula y Mata, 2015). Su ciclo de vida es hemimetábolo, es decir, las larvas de estos insectos son de forma similar a los adultos, al igual que su alimentación (Rivers y Dahlem, 2014; Goula y Mata, 2015) (Figura 42).

Los heterópteros dividen su cuerpo en cabeza, tórax y abdomen (Figura 39 y 40). El cuerpo puede presentar sedas o no. La cabeza es más estrecha que el pronoto. Tiene un par de antenas en la región frontal, un par de ojos compuestos y algunas especies presentan un par de ocelos. Las antenas presentan de tres a cinco segmentos, llamados antenómeros. Al igual que en otros grupos de insectos, el tórax se divide en tres segmentos: protórax, mesotórax y metatórax. El dorso del prototórax forma el pronoto. En el tórax se insertan tres pares de patas. El abdomen está formado por siete u ocho segmentos (Goula y Mata, 2015).

Los heterópteros pueden o no presentar dos pares de alas: anteriores y posteriores. Las alas anteriores, llamadas hemiélitros, tienen la región basal endurecida y la región distal membranosa. Los hemiélitros pueden ser tan largos hasta alcanzar el séptimo segmento abdominal o tan cortos que pueden alcanzar solo la base del abdomen. Las alas posteriores son completamente membranosas y ligeramente más cortas que las alas anteriores (Goula y Mata, 2015). Presentan un

aparato bucal tipo perforador-succionador, utilizadas para succionar la savia de las plantas o para succionar el tejido sanguíneo (Triplehorn *et al.*, 2005).

III.2.1 Familia Cimicidae



Figura 41. *Cimex lectularius* (izquierda) y *Cimex hemipterus* (derecha). Tomado de Zorrilla *et al.*, 2015.

Generalidades

Todas las especies, hembras, machos y estados inmaduros, de la familia Cimicidae se alimentan de sangre, principalmente de murciélagos, aves y mamíferos (Lehane, 2005; López-Hernández *et al.*, 2016). Se distribuyen en todo el mundo, y secretan un olor característico y desagradable causado por aldehídos y cetonas (Lehane, 2005; Dettner y Peters, 2011).

Los cimícidos son comúnmente nombrados chinches y su ciclo de vida es hemimetábolo (Figura 42) (López-Hernández *et al.*, 2016). Las dos especies mayormente conocidas por alimentarse de sangre humana son *Cimex lectularius* y *Cimex hemipterus* (Lehane, 2005) (Figura 41). Su alimentación es nocturna y son capaces de dejar de alimentarse por un intervalo de tiempo largo que oscila entre 12 y 18 meses (Lehane, 2005; Zorrilla-Vaca *et al.*, 2015). Estos insectos se alimentan con poca frecuencia, generalmente cada 4-7 días (Schal *et al.*, 2018).

Características morfológicas

Los adultos son insectos de forma oval, aplanados dorsoventralmente, color café, tiene hemielitros cortos y el tamaño de su cuerpo oscila entre 4 y 12 milímetros de longitud (Lehane, 2005; Weirauch y Gerry, 2016). Tienen glándulas metatorácicas y abdominales que producen un olor característico (Weirauch y Gerry, 2016).

La hembra deposita alrededor de ocho huevos a la semana (Lehane, 2005). Su ciclo de vida consta de cinco estados ninfales. Las ninfas son más pequeñas y de color más claro que los adultos, tomando tonos más oscuros en cada muda (Rivers y Dahlem, 2014) (Figura 40).

Hábitat

Las especies *Cimex lectularius* y *Cimex hemipterus* se distribuyen en las regiones tropicales de la mayor parte del mundo (Lehane, 2005; Dettner y Peters, 2011).

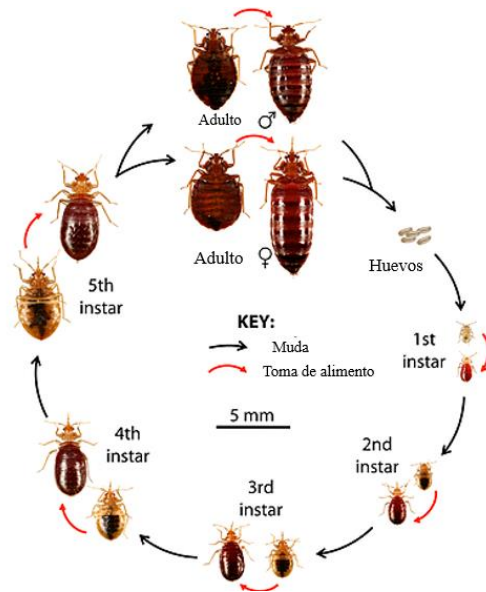


Figura 42. Ciclo de vida de la chinche *Cimex lectularius*. Tomado de <https://www.proshield.ae/bed-bugs-control>

III.2.2 Familia Reduviidae



Figura 43. Vista dorsal de la especie *Triatoma dimidiata* (Usinger, 1944). Tomado de <http://unibio.unam.mx/irekani/handle/123456789/5565?proyecto=Irekani>

Generalidades

Los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*, pertenecientes a la subfamilia Triatominae, se alimentan de sangre de vertebrados y se conocen comúnmente como chinches besuconas (Lehane, 2005; Stevens *et al.*, 2011).

Su ciclo de vida es hemimetábolo y presentan cinco estadios ninfales (Figura 44) (Stevens *et al.*, 2011). Se conoce que estos insectos pueden ingerir una gran cantidad de alimento, hasta tres veces su peso corporal y esta actividad la realizan por la noche (Lehane, 2005).



Figura 44. Esquema modificado del ciclo de vida de la especie *Triatoma dimidiata* (Usinger, 1944). Huevos, cinco estadios ninfales (N1, N2, N3, N4 Y N5) y adulto (de derecha a izquierda). Tomado de <https://www.jica.go.jp/project/spanish/guatemala/0700558/activities/01.html>

Características morfológicas

Los adultos poseen un tamaño que oscila entre 12 y 36 milímetros de longitud y se distinguen por ser de colores oscuros y tener manchas amarillas o anaranjadas en el abdomen, pronoto y en la base de las alas anteriores (Lehane, 2005; Stevens *et al.*, 2011). Su cabeza es alargada, tiene un par de ojos prominentes y un par de antenas, estas últimas se componen de cuatro segmentos y están localizadas en las regiones laterales de la cabeza (Lehane, 2005). Poseen tres pares de patas que se caracterizan por ser prensiles (Goula y Mata, 2015) (Figura 43).

Las hembras llegan a depositar de 10 a 30 huevos después de alimentarse. Los huevos son de forma oval, miden aproximadamente 2 milímetros de longitud y son de color blanco, amarillo y rosa, color que dependerá de la especie (Lehane, 2005; Stevens *et al.*, 2011).

Hábitat

Los redúvidos se distribuyen en zonas tropicales, primordialmente en el continente americano (Stevens *et al.*, 2011). Variedad de especies están asociados con el entorno doméstico humano y la periferia de este. Se localizan fácilmente en grietas o lugares donde pueden esconderse en el transcurso del día (Lehane, 2005).

III.4 Orden Phthiraptera

El orden Phthiraptera se clasifica en cuatro subórdenes: Anoplura, Ischnocera, Amblycera y Rhynchophthirina (Pérez, 2015). El suborden Anoplura y algunos géneros del suborden Amblycera tienen especies hematófagas (Pérez, 2015; Ibáñez-Bernal, 2002).



Figura 45. Ciclo de vida de *Pediculus humanus capitis*. Tres estadios ninfales (N1, N2, y N3) y dos adultos (macho y hembra). Tomado de <https://www.std.gov.org/blog/body-lice/>

Especialmente las familias Pediculidae y Pthiridae, pertenecientes al suborden Anoplura, presentan especies que se alimentan de sangre humana (Robinson, 2005). Estos insectos son comúnmente conocidos como piojos. Son hemimetábolos, presentando cinco fases: huevo, tres etapas ninfales y adulto (Figura 45), y son ectoparásitos durante todo su ciclo de vida. Pueden llegar a consumir alimento hasta obtener un tercio de su propio peso corporal en pocas horas (Lehane, 2005).

Son insectos que miden en promedio de 2 a 3 milímetros de longitud. Su cuerpo es aplanado dorsoventralmente, tiene antenas cortas y no tienen alas (Figura 46) (Lehane, 2005). Los huevos son conocidos como liendres y se ovopositan en lotes de hasta seis huevos por día, esto específicamente en piojos que se alimentan de sangre humana (Lehane, 2005).

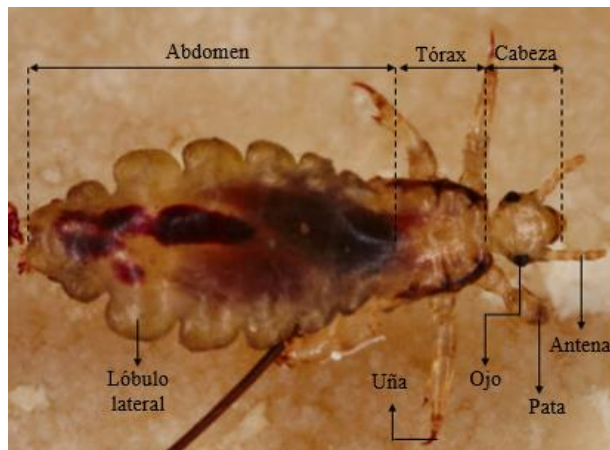


Figura 46. Esquema de la morfología externa de *Pediculus humanus* (vista dorsal). Imagen tomada de <https://www.express.co.uk/life-style/health/920580/head-lice-treatment-eggs-nits-shampoo-comb-how-to-get-rid>. Esquema realizado la autora del trabajo.

III.3.1 Familia Pediculidae



Figura 47. Piojo adulto *Pediculus humanus* (Haeckel, 1896). Tomado de (Pilli *et al.*, 2016).

Generalidades

La familia Pediculidae posee dos subespecies de *Pediculus humanus* (Haeckel, 1896) que se alimentan de sangre humana: *P. h. humanus* y *P. h. capitis*, (Robinson, 2005). *Pediculus humanus* (Linnaeus, 1758) es conocido comúnmente como piojo del cuerpo.

Características morfológicas

Las hembras adultas miden entre 2.4 y 3.6 milímetros de longitud y los adultos machos entre 2.3 y 3 milímetros de longitud. Presentan una coloración corporal gris, en tonos claros y oscuros. Posee una cabeza pequeña, un par de ojos y un par de antenas con 3 segmentos. El abdomen tiene lóbulos laterales. Las patas son robustas y tienen una uña de gran tamaño (Robinson, 2005; Dettner y Peters, 2011) (Figura 47).

Su desarrollo se completa en un promedio de 8 a 12 días, y se alimentan durante los estados larvales y adulto. Se localizan sobre la superficie de la ropa de una persona. Pueden moverse a una velocidad de 23 centímetros por minuto (Robinson, 2005).

Pediculus humanus capiti (De Geer) es conocido comúnmente como piojos de la cabeza. Las hembras adultas miden entre 2.4 y 3.3 milímetros de longitud y los machos entre 2.1 y 2.6 milímetros de largo. Poseen un color corporal gris o son transparentes. Tienen una cabeza pequeña, un par de ojos y un par de antenas con 5 segmentos. El abdomen tiene lóbulos laterales. Las patas son robustas y tienen una uña de gran tamaño (Robinson, 2005; Dettner y Peters, 2011). Se localizan en la extremidad cefálica y cuello de una persona. La hembra deposita en promedio 7 huevos en 24 horas sobre el elemento piloso, aproximadamente a 1 milímetro de la base (Robinson, 2005).

Hábitat

Los pedicúlicos son insectos cosmopolitas y ectoparásito del hombre, alojándose en la extremidad cefálica y cuello de una persona (Burkhart y Burkhart, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2009).

III.3.2 Familia Pthiridae



Figura 48. *Pthirus pubis* (Lineo, 1758). Tomado de <http://web.bioucm.es/cont/ea/sesiones.php?sesion=83&bloque=3>

Generalidades

La especie *Pthirus pubis* (Lineo, 1758) (Figura 48) es conocida comúnmente como ladilla, piojo cangrejo o piojo púbico. Este nombre se deriva por su tendencia a localizarse en la región púbica

del humano, sin embargo, pueden estar localizados también en las axilas, bigote, barba y cejas (Robinson, 2005). Dependen de su huésped para sobrevivir, obteniendo alimento y calor. Además, se trasladan fácilmente de un huésped a otro por contacto directo entre ellos o a través de sus ropas (López *et al.*, 2003). La infestación con *Pthirus pubis* provoca pediculosis, enfermedad de transmisión sexual debido al contacto físico, especialmente con las parejas sexuales infestadas (Dehghani, 2013).

Características morfológicas

Los adultos tienen un tamaño que oscila entre 1.5 y 2 milímetros de longitud. Se caracterizan por tener forma de un cangrejo y poseer un tórax ancho que está en contacto con el abdomen (Figura 48). El abdomen tiene cuatro pares de tubérculos laterales esclerotizados (Robinson, 2005). Las ninfas comienzan a alimentarse a partir del segundo o cuarto día. El estadio de larva dura entre 10 y 15 días, y el adulto vive aproximadamente 30 días. El piojo se alimenta varias veces al día (López *et al.*, 2003).

Hábitat

Pthirus pubis es cosmopolita y ectoparásito de humanos localizado en la región púbica, axilas, bigote, barba y cejas (Robinson, 2005).

III.4 Orden Siphonaptera

El orden Siphonaptera se conoce comúnmente como pulgas. Existen aproximadamente 3,000 especies y subespecies distribuidas por todo el mundo en diversidad de hábitats (Acosta-Gutiérrez, 2014). En México se han registrado 138 especies de sifonápteros (Acosta y Morrone, 2003). Los sifonápteros son insectos ectoparásitos de mamíferos, roedores en su mayoría, y aves. Se alimentan de tejido sanguíneo (Acosta-Gutiérrez, 2014; Beaucournu y Gomez-Lopez, 2015). Son insectos holometábolos (Figura 49). Los huevos son depositados entre los elementos pilosos del huésped. Las larvas, que pasaran por tres estadios, se desarrollan y alimentan de materia orgánica y detritus (Acosta-Gutiérrez, 2014).

Los adultos tienen un tamaño que oscila entre 1 y 8 milímetros de longitud. Generalmente presentan colores oscuros como café, pero pueden llegar a ser de colores claros amarillentos. Son aplanados lateralmente y no poseen alas (Lehane, 2005) (Figura 50). Poseen una cabeza de forma triangular y pequeña con un par de ojos que pueden estar presentes o no. Ambos sexos cuentan con piezas bucales adaptadas perforar la piel y succionar sangre (Beaucournu y Gomez-Lopez, 2015). Su cuerpo está esclerotizado y cubierto por sedas. Las patas son cortas y la mayoría de las especies presentan un fémur de gran tamaño (Robinson, 2005). El abdomen tiene 11 segmentos visibles. La morfología que presentan les permite moverse rápidamente entre el pelo de sus huéspedes (Acosta-Gutiérrez, 2014).

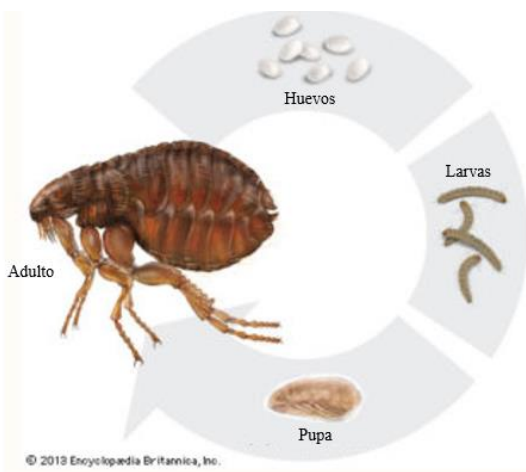


Figura 49. Ciclo de vida de la especie *Pulex irritans*. Tomado de <https://www.alamy.es/foto-ciclo-de-vida-de-las-pulgas-84972322.html>

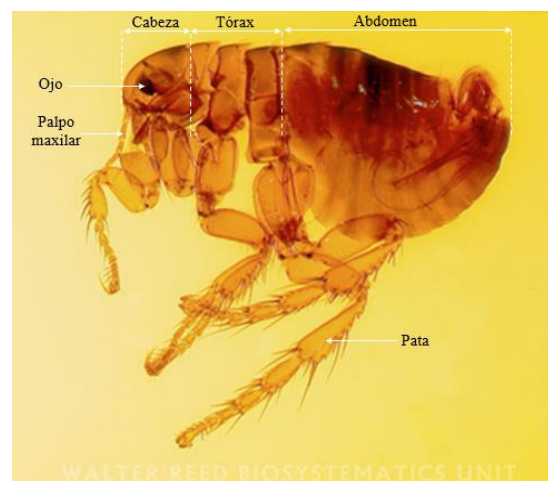


Figura 50. Esquema de la morfología externa de la especie *Pulex irritans* (Vista dorsal). Imagen tomada de http://www.wrbu.org/flID/fleas_repGG.html. Esquema realizado por la autora de este trabajo

III.4.1 Familia Pulicidae



Figura 51. Pulga hembra de la especie *Pulex irritans* (Linnaeus, 1758). Tomado de http://www.wrbu.org/images/FL/PUirrGG1243_09f.jpg

Generalidades

La familia Pulicidae está compuesta por pulgas que parasitan una gran variedad de animales, principalmente animales domésticos como gatos y perros. Sin embargo, existe una especie dentro de esta familia que parasita con frecuencia seres humanos: *Pulex irritans* (Linnaeus, 1758) (Robinson, 2005) (Figura 51).

Características morfológicas

Los adultos de la especie *Pulex irritans* (Linnaeus, 1758) llegan a medir una longitud de 2 milímetros. Presentan un color corporal amarillo y café. La cabeza es más larga que ancha y no presenta el peine pronotal. Pueden vivir sin alimento hasta 125 días de los 513 aproximados que llegan a vivir (Robinson, 2005).

Hábitat

Las especies que conforman la familia Pulicidae son cosmopolitas y, a menudo, son transportadas por seres humanos alrededor del mundo (Robinson, 2005).

IV. Tratamiento de indicios entomológicos en el lugar de intervención

El equipo requerido para la recolección de insectos incluye: guantes, lápices o lapiceros, marcadores indelebles, papel vegetal o albanene, etiquetas de diversos tamaños, pinzas entomológicas estériles, cucharas estériles, viales estériles de diferentes capacidades, frascos estériles de vidrio o plástico transparente con tapa de 15 ml, termómetro para medir la temperatura del cuerpo y la temperatura ambiental, etanol (70-95 %), cinta adhesiva para sellar el embalaje, red entomológica y contenedor con hielo para almacenar insectos vivos (Amendt *et al.*, 2005; Gennard, 2012). El equipo de recolección dependerá del tipo de insecto (necrófago, hematófago), del orden (Diptera, Coleoptera, Hemiptera, Pthiraptera, Siphonaptera) y estadio del insecto (adulto, larva) que se pretenda analizar.

El etiquetado de indicios entomológicos es por duplicado. Una etiqueta se coloca en el interior del recipiente, donde se encuentra el insecto y la solución que lo conserva. Otra se coloca adherida al exterior del recipiente de recolección. Ambas etiquetas deben estar escritas con lápiz y no con tinta, esto debido a que la tinta se remueve fácilmente con etanol. La información que debe contener el etiquetado es el número de carpeta de investigación, la hora de recolección, fecha, ubicación geográfica, la ubicación del insecto en el cadáver o restos y el nombre de la persona que realizó la recolección (Byrd y Castner, 2009) (Figura 52).



(a)



(b)

Figura 52. Ejemplo de etiquetado de indicios entomológicos. (a) Etiqueta externa y (b) etiqueta interna. Tomadas de Byrd y Castner, 2009.

IV.1 Insectos necrófagos

La recolección se realiza en el lugar de intervención antes del levantamiento del cuerpo. Es importante tomar insectos visibles, localizados en la superficie del cuerpo, y/o durante la autopsia principalmente en orificios naturales, ojos y lesiones que presente el cadáver. Aunado a ello, se debe buscar y recolectar larvas en pliegues de ropa, bolsillos, calcetines y calzado, en el material donde se encuentre o pudo ser envuelto el cuerpo, por ejemplo, alfombras, bolsa, etc.; y en zonas adyacentes al cuerpo: debajo del cuerpo o en el sustrato donde se encuentre el cadáver (Amendt *et al.*, 2005; Byrd y Castner, 2009).

Las larvas pueden recolectarse manualmente o con la ayuda de instrumentos. Los instrumentos que se utilizan son cucharas o pinzas, ambas estériles. Sin embargo, se debe tener cuidado con estas últimas para no comprimir fuertemente la larva con ellas (Byrd y Castner, 2009). La literatura recomienda la toma de temperatura de la zona donde se encuentran las larvas debido a que, si se encuentra una gran cantidad de larvas juntas, éstas son capaces de elevar la temperatura, lo que puede afectar en el desarrollo larvario (Gennard, 2012).

Orden Diptera

Se recolectan de 15 a 30 larvas vivas en 2° y 3° instar y coloca cada larva en un vial estéril de 1.5 ml. El motivo de tomar larvas preferentemente en 3° instar es porque que el saco gástrico en este estadio larval mide aproximadamente 7 mm, lo que permite el almacenaje de una gran cantidad de alimento (tejido humano) (Campobasso *et al.*, 2005). Se preserva preferentemente a una temperatura de -80 °C, no obstante, puede preservarse en etanol (70-95 %) a temperatura ambiente (24 °C). Esto permite preservar el ADN humano en buenas condiciones hasta por 6 meses (Linville *et al.*, 2004; Zehner *et al.*, 2004; Chávez-Briones *et al.*, 2013; García, 2013).

Orden Coleoptera

Se recolectan de 5 a 15 larvas de coleópteros vivas en últimos estadios larvales y se coloca cada una en un tubo estéril. Se preservan a una temperatura de -20 °C hasta por 1 hora (Ortega-Rosales *et al.*, 2016).

IV.2 Insectos hematófagos

Los insectos hematófagos se recolectan en etapa adulta en el lugar de intervención y/o durante el examen externo de cadáver en el anfiteatro, según sea el caso.

Orden Diptera

La búsqueda de dípteros se realiza en el interior del lugar de intervención y en los alrededores de éste, según sea el caso. Los lugares para la captura de dípteros en vuelo o en reposo son primordialmente en habitaciones utilizadas como dormitorio, armarios y entre prendas de vestir, sin embargo, es indispensable revisar todas las áreas del lugar (Godínez e Ibáñez-Bernal, 2010).

Se recolectan de preferencia de 10 a 20 dípteros adultos vivos. Esto para tener muestras de reserva en casos de que la cantidad de ADN no sea suficiente. La recolección es mediante la utilización de redes entomológicas o aspiradores entomológicos manuales o de mochila (Godínez e Ibáñez-Bernal, 2010; Curic *et al.*, 2014). Los insectos se colocan en frascos estériles y preservan a una temperatura de -20 °C hasta por 1 hora (Kreike y Kampfer, 1999; Chow-Shaffer *et al.*, 2000; Curic *et al.*, 2014).

Orden Hemiptera

La búsqueda de hemípteros en el lugar de intervención se lleva a cabo principalmente en colchones, base de colchón, alfombras, sillones, grietas y ranuras encontradas en muros, suelo y techo, donde se observa la presencia de pequeñas manchas oscuras, es decir, heces fecales. (Criado *et al.*, 2011; Potter, 2012; Uribarren, 2018) (Figura 53a-d).



(a)



(b)



Figura 53. Localización de pequeñas manchas negras en (a) colchón, (b) sillón, (c) y (d) alfombra. Tomadas de Potter, 2012.

Se recolectan de 10 a 20 hemípteros vivos de forma manual. Estos se colocan en tubos o viales estériles, y para su preservación, se colocan en etanol (90-100%) o se mantienen a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Szalanski *et al.*, 2006b; Schal *et al.*, 2018).

Orden Phthiraptera

La recolecta es a través de un peinado en la zona púbica utilizando un peine de púas finas. Esto se debe realizar durante el examen externo de cadáver en el anfiteatro. Se recolectan entre 5 y 15 piojos que presenten una tonalidad negruzca en la región abdominal (Pill *et al.*, 2016). Esta característica se analiza mediante la observación a través de un microscopio estereoscópico (Pill. *et al.*, 2016). Los piojos, vivos o muertos, se colocan en viales o tubos estériles. Los piojos vivos se sacrifican a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta por 1 hora y posteriormente se mantienen a temperatura ambiente, y los piojos muertos se mantienen a temperatura ambiente ($22\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Lord *et al.*, 1998; Pill. *et al.*, 2016).

Recomendaciones generales para la preservación

Las recomendaciones generales para la preservación del ADN humano contenido en las muestras entomológicas es mantenerlas a bajas temperaturas porque permite la preservación del ADN al inhibir las nucleasas y evita la evaporación del etanol. La temperatura establecida en cada orden de insectos es con base en las publicaciones realizadas. El transporte y resguardo de las muestras debe ser cuidadoso. Se debe evitar la radiación UV, colocarlas en sitios con humedad o que estas muestras entomológicas tengan contacto con otros tejidos porque pueden contaminarse y degradarse el ADN.

Cadena de custodia

Además, como lo establece el Código Nacional de Procedimientos Penales (2016) en su capítulo III, y el Acuerdo A009/2015, se debe tener el Registro de cada una de las etapas de la Cadena de Custodia. Las etapas que comprende la Cadena de Custodia son: (I) Procesamiento de los indicios, (II) Traslado, (III) Análisis, (IV) Almacenamiento, y (V) Disposición final (A009/2015). El Procesamiento de los indicios comienza desde la búsqueda de indicios, abarcando las fases de identificación, documentación, recolección, embalaje hasta la entrega de estos al personal correspondiente para su traslado. El Almacenamiento se realiza en las bodegas de indicios o en su caso, lugares condicionados para la preservación o conservación de los indicios, y (V) Disposición final. La aplicación de la Cadena de Custodia permitirá conocer si las condiciones de recolección, preservación, empaque y traslado fueron las adecuadas y será uno de los factores que permitirá o no la obtención de ADN humano de los indicios entomológicos.

V. Tratamiento en laboratorio

El equipo requerido para el tratamiento de insectos, antes de la extracción de ADN humano, incluye: pinzas entomológicas estériles, tijeras quirúrgicas estériles, espátulas estériles, etanol (70-95 %), agua destilada, piseta, microscopio estereoscópico, tarjetas FTA®, cajas Petri de vidrio, viales estériles, pipetas de plástico (Amendt *et al.*, 2005; Gennard, 2012).

V.1 Aislamiento del tejido humano del sistema digestivo del insecto

Este paso se realiza para evitar la contaminación y asegurar que el ADN humano analizado sea de la muestra obtenida del sistema digestivo, saco gástrico del insecto (Linville y Wells, 2002). Además, en el caso de especies necrófagas, se sugiere aislar el tejido de la larva porque el cuerpo de la larva presenta lípidos que pueden interferir con la extracción del ADN (Campobasso *et al.*, 2005).

V.1.1 Insectos necrófagos

A cada larva se le realiza un lavado exterior con 2 mililitros de agua destilada. Posteriormente se realiza una incisión en la región ventral, sobre la línea media de los segmentos abdominales y se toma el contenido gástrico con una tarjeta FTA®. Esto permitirá una mejor conservación del ADN y fácil manejo de la muestra (Linville *et al.*, 2002; Linville *et al.*, 2004; Nava-Hernández *et al.*, 2008).

V.1.2 Insectos hematófagos

Orden Diptera

Se lava el exterior del díptero con agua destilada. Posteriormente se separa el abdomen del resto del cuerpo, se coloca sobre una tarjeta FTA® y comprime con ayuda de una espátula (Kreike y Kampfer, 1999; Curic *et al.*, 2014).

Orden Hemiptera

Si el insecto se preservó a una temperatura de -20 °C, el exterior del cuerpo del hemíptero se sumerge en etanol al 95% y, posteriormente, este se remueve. A partir de ahí, el procedimiento para ambas técnicas de preservación es el mismo. Se agrega 500 µl de agua destilada, se realiza un vortex (que permite eliminar los restos de etanol) y elimina el agua. Este proceso se repite dos

veces (Schal *et al.*, 2018). Después de lavar el exterior del hemíptero, se realiza un corte en la región dorsal sobre la línea media y se coloca en un buffer de extracción.

Orden Phthiraptera

Se lava el exterior del insecto con agua destilada, después se le realiza una incisión en la región dorsal a lo largo de la línea media y el insecto se coloca en el buffer de extracción (Lord *et al.*, 1998).

V.2 Pruebas para establecer el origen del tejido

Posterior a la extracción del tejido humano del sistema digestivo del insecto, es importante determinar que el contenido gástrico obtenido del insecto es tejido humano porque, a pesar de que se puede localizar estos insectos en un lugar de intervención, estos también pueden alimentarse de tejido animal no humano. Es importante mencionar que estas pruebas deben llevarse a cabo en todos los casos para así, evitar analizar muestras que no tengan un origen humano y evitar gastos innecesarios de reactivos, material y tiempo.

Las pruebas empleadas son inmunoensayos basados en una reacción antígeno-anticuerpo, detectando la presencia de hemoglobina humana. Hexagon OBTI y ABACard® HemaTrace son kits conocidos por su uso en el área forense (Johnston *et al.*, 2003; Johnston *et al.*, 2008). Hexagon OBTI fue utilizado como prueba confirmatoria de sangre humana en un estudio llevado a cabo para la extracción y detección de ADN humano en piojos (Pilli *et al.*, 2016).

V.3 Extracción de ADN

Existen diversos métodos para la extracción de ADN de una muestra de interés forense, los cuales pueden ser agrupados en dos grandes categorías, extracción orgánica y extracción no orgánica (Prieto, 2002).

V.3.1 Extracción Orgánica

La extracción orgánica (Figura 54) es popular por su efectividad para remover gran cantidad de inhibidores de PCR y extraer ADN a partir de tejidos en cantidades mínimas (Goodwin, 2016). Existen diversas variantes de esta extracción, siendo la más conocida la extracción fenol-cloroformo. En general, este método de extracción consta de cinco fases: homogeneización del

tejido, lisis celular, separación de la fase acuosa de la orgánica, precipitación y redisolución del ADN (Velázquez *et al.*, 2014).

Homogeneización

La homogeneización del tejido consiste en la ruptura de uniones celulares para facilitar la relación con soluciones de lisis. Esta puede ser mecánica o química. La homogeneización mecánica puede utilizar pistilos u homogeneizadores y se utiliza en muestras pequeñas y tejidos blandos. La muestra se coloca en un tubo con buffer de lisis y se introduce un pistilo u homogeneizador, la literatura recomienda la colocación del tubo sobre una cama de hielo para no generar calor que provoque la fragmentación del ADN. El pistilo u homogeneizador disgrega la muestra mediante la fricción y compactación de esta contra la pared del tubo (Velázquez *et al.*, 2014).

En la homogeneización química, la muestra se mantiene a alta temperatura y en una solución de detergentes, enzimas y agentes caotrópicos que permiten la ruptura entre las células y la membrana celular. Esta homogeneización se utiliza en muestras pequeñas de tejidos frescos o sangre (Velázquez *et al.*, 2014).

Lisis celular

La lisis celular permite la liberación del ADN mediante la utilización de un buffer y enzimas. La enzima utilizada es la proteinasa K, permite la digestión de las proteínas que protegen las moléculas de ADN (Dragan *et al.*, 2014). El buffer está compuesto de sustancias como hidroximetil amino metano (TRIS), dodecilsulfato sódico (SDS) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). La función del TRIS es mantener el pH de la solución constante. El SDS rompe la membrana celular y actúa como agente solubilizante de proteínas, tejidos y membranas. El EDTA inhibe la acción de las nucleasas y proteger al ADN, capturando los iones magnesio y evitando que actúen como cofactores de las nucleasas (Prieto, 2002; Sambrook, 2003; Velasco, 2005; Primorac y Schanfield, 2014).

Separación de proteínas

La separación de proteínas y lípidos del ADN se efectúa con solventes orgánicos como fenol, cloroformo y alcohol isoamílico, en diferentes fases (acuosa y orgánica) y ciclos de centrifugación. En la fase acuosa se encontrará el ADN y en la fase orgánica las proteínas y lípidos (Prieto, 2002; Sambrook, 2003; Primorac y Schanfield, 2014; Velázquez *et al.*, 2014).

Precipitación

Posterior a la eliminación de proteínas y lípidos, el ADN se recupera lavando con etanol y para la obtención de este, se centrifuga y finalmente elimina el etanol (Prieto, 2002; Sambrook, 2003; Primorac y Schanfield, 2014). Para facilitar la precipitación del ADN suelen añadirse sales de Sodio (Na^+), Potasio (K^+) o Amonio (NH_4^+) (Salazar *et al.*, 2013).

Redisolución del ADN

Eliminado el etanol, el ADN se hidrata manteniéndolo en solución y a una temperatura de incubación (Velázquez *et al.*, 2014).

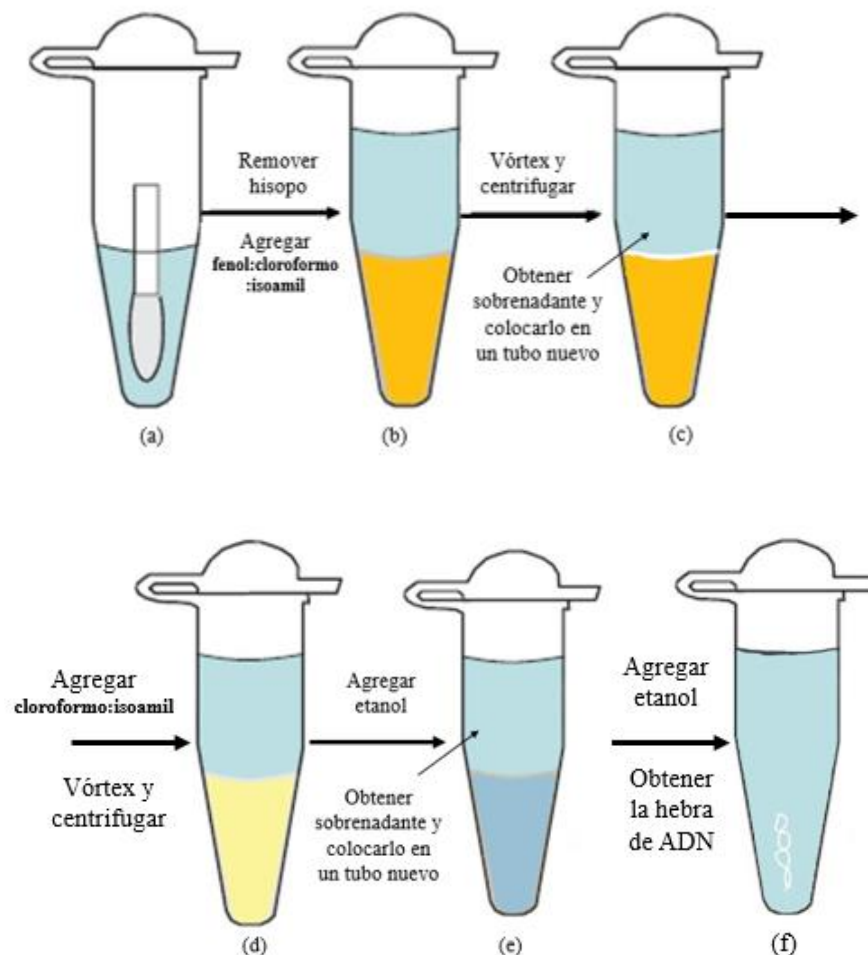


Figura 54. Esquema del método de extracción fenol-clorofomo de ADN humano de células epiteliales recolectadas con hisopo. (a) Se coloca el hisopo con la muestra en la solución de buffer y proteinasa K, se incuba y se retira el hisopo. (b) Se agrega fenol: cloroformo: isoamil y se agita por vórtex y centrifuga. (c) Se obtiene el sobrenadante y se coloca en un tubo eppendorf nuevo (d) Se agrega cloroformo: isoamil y se centrifuga. (e) Se obtiene el sobrenadante, se coloca a un tubo nuevo y se agrega etanol. (f) Se agita hasta observar la hebra de DNA. Tomado de Goodwin *et al.*, 2011. Modificado por la autora de este trabajo.

“Salting out”

Este método de extracción de ADN elimina proteínas con la ayuda de sales. Al agregar una alta concentración de sales, la solubilidad de las proteínas disminuye y precipitan, permitiendo su eliminación (Cariaga-Martínez y Zapata, 2007; Riera *et al.*, 2010). Las sales que se utilizan son acetato de sodio, tiocianato de guanidina o cloruro de sodio, y durante el proceso de extracción, en vez de utilizar solventes orgánicos para la lisis celular y la extracción de proteínas, se añade alguna de ellas (Butler, 2011; Goodwin *et al.*, 2011; Salazar *et al.*, 2013).

V.3.2 Extracción No Orgánica

La extracción no orgánica, presentes en *kits* comerciales, consiste en utilizar una matriz inorgánica, y soluciones de lisis, unión y lavado. La matriz posee una carga positiva que permite la unión del ADN a ella. A su vez, permite la separación del ADN del resto de las biomoléculas. La matriz inorgánica puede ser una membrana de sílice o perlas magnéticas (Goodwin *et al.*, 2011; Velázquez *et al.*, 2014).

Las membranas de sílice se localizan dentro de un microtubo o columna, un ejemplo de ello es el QIAamp® DNA Investigator Kit. Las perlas magnéticas se encuentran suspendidas en una solución amortiguadora. (Alejo *et al.*, s.f.; Goodwin *et al.*, 2011; Velázquez *et al.*, 2014). QIAamp® DNA Investigator Kit (Figura 55) es uno de los métodos más utilizados por la comunidad forense. Cuenta con diversos protocolos para los distintos tipos de muestras. El *kit*, además de permitir la purificación total de ADN nuclear y mitocondrial, es rápido y eficiente. Asimismo, el *kit* está diseñado para la inexistencia de contaminación cruzada, siempre y cuando se sigan las precauciones necesarias que el *kit* sugiere (Primorac y Schanfield, 2014; QIAamp DNA, 2016).

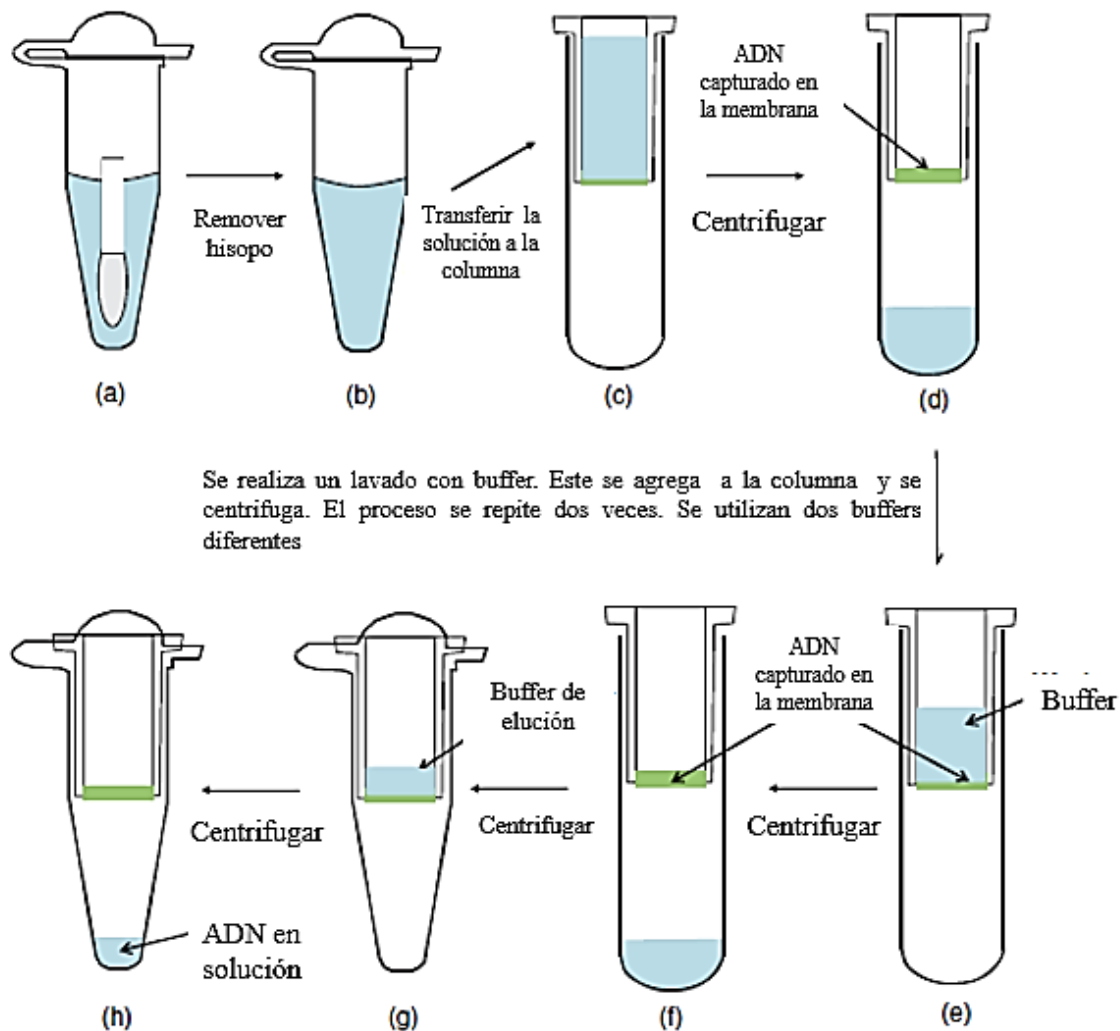


Figura 55. Esquema modificado del método de extracción de ADN de células epiteliales usando QIAamp® Blood Mini Kit. (a) El material celular se le agrega el buffer de lisis y la proteinasa K, se incubaba a 56°C por 15 minutos. (b) Se agrega etanol para proporcionar las condiciones óptimas de unión del ADN. (c) La solución se transfiere a la columna con una membrana que permite la unión del ADN a ella- (d) La columna se centrifuga permitiendo la unión del ADN. (e) El buffer de lavado se agrega a la columna y (f) pasa a través de la membrana cuando se centrifuga. (g) Se añade un buffer de elución a la membrana, liberando el ADN de la membrana y (h) es recuperado en la solución. Tomado de Goodwin *et al.*, 2011.

Existen *kits* comerciales que utilizan resinas como *Chelex*®100, y El DNA IQ System (Promega) (Primorac y Schanfield,2014). *Chelex*®100 es una resina quelante. Se coloca con la muestra en maceración para posteriormente elevar la temperatura y así, liberar el ADN. La solución obtenida permite ser añadida directamente a la reacción de PCR. El *Chelex*®100 fue uno de los primeros métodos adoptados por la comunidad forense. No obstante, tiene una capacidad limitada para remover inhibidores de PCR (Goodwin, 2016). DNA IQ™ System emplea resinas y un buffer, ambos diseñados para eliminar los inhibidores de PCR que se encuentran en las muestras. Hace

posible la extracción de ADN de muestras en mínimas cantidades (Primorac y Schanfield, 2014; Promega 2016).

Almacenamiento de soluciones de ADN

En el laboratorio, una vez extraído el ADN de la muestra, éste debe ser almacenado en condiciones que permitan su conservación, evitando así, el crecimiento de bacterias y hongos, la contaminación y degradación del ADN. Las condiciones exactas para el almacenamiento dependen de la naturaleza de la muestra (Goodwin *et al.*, 2011). No obstante, la temperatura se determina en función del periodo de tiempo en que el ADN se almacenará hasta su análisis (Goodwin *et al.*, 2011; Butler, 2011). Si una muestra de ADN se almacena por un periodo de tiempo corto, se recomienda mantenerla a una temperatura de 4 °C. Para muestras que se almacenan por un periodo de tiempo largo, se recomienda mantenerla en un rango de temperatura que oscile entre los -20 °C y -80 °C.

Butler (2011) refiere que las moléculas de ADN que se mantienen en seco poseen mejores condiciones, evitando una posible hidrólisis y protegiendo el ADN de las endonucleasas.

V.4 Cuantificación de ADN

Para una apropiada amplificación y obtención de un perfil genético humano es fundamental conocer la cantidad y calidad del ADN presente en una muestra. En un caso forense se desconocen las condiciones de las muestras recolectadas de un lugar de intervención, que pueden llegar a afectar la calidad y cantidad del ADN.

Actualmente la “*DNA Advisory Board*” en Estados Unidos, adoptó normas que hacen obligatoria la cuantificación de ADN humano en muestras de interés forense, debido a que los principales métodos que se utilizaban para cuantificar el ADN de una muestra no determinaban el origen humano de la misma (Nicklas y Buel, 2003; Goodwin *et al.*, 2011). Asimismo, los Estándares de Garantía de Calidad del FBI indican realizar la cuantificación de ADN específica para humanos (Board, 2000).

V.4.1 Calidad del ADN

La calidad del ADN puede ser evaluada utilizando diversos métodos: electroforesis en gel de agarosa o por espectrofotometría (Applied Biosystems, 2009). En una electroforesis en gel de

agarosa el ADN purificado, de alto peso molecular y de buena calidad, se puede ver como una sola banda con un tamaño de 20,000 pb (Butler, 2011).

V.4.1.1 Pureza del ADN

Para evaluar la pureza del ADN, se mide la absorbancia del ADN de 230 nanómetros (nm) a 320 nm para detectar otros posibles contaminantes. Los nucleótidos de ADN y ARN muestran una absorción máxima a una longitud de onda de 260 nm, las proteínas a una longitud de onda de 280 nm, los contaminantes como sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos a 230 nm, y turbidez en la solución a 320 nm (Mendoza *et al.*, 2010; Promega, 2018). Posterior a la medición de absorbancia por espectrofotometría, se aplican diversos cálculos matemáticos que darán como resultado valores. El primer cálculo es el de la turbidez:

$$\text{Pureza del ADN } (A_{260}/A_{320}) = (A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$$

Después se calculan las relaciones de absorbancia A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} :

$$\text{Pureza del ADN} = \text{absorbancia 260 nm} / \text{absorbancia 280 nm}$$

$$\text{Pureza del ADN} = \text{absorbancia 260 nm} / \text{absorbancia 230 nm}$$

En la relación A_{260}/A_{280} , un valor entre 1.8 y 2.0, indica que el ADN posee una pureza óptima; un valor menor a 1.8 indica una posible contaminación por proteínas (particularmente aminoácidos aromáticos); y un valor mayor a 2.1 indica una posible presencia de ARN en la muestra (Applied Biosystems, 2009; Benito y Espino, 2013; Promega, 2018). En la relación A_{260}/A_{230} , un valor entre 1.5 y 2.2 indica pureza en el ADN; un valor menor a 1.5 indica la presencia de contaminantes (Promega, 2018; Banco Nacional de ADN Carlos III, 2018).

V.4.1.2 Degradación del ADN

La degradación del ADN significa dañar, destruir o fragmentar las moléculas de este. Esta degradación es resultado de la exposición de una muestra (que contiene ADN) a una combinación de diversos factores, internos y externos, que afectan el grado de conservación de la muestra (Burger *et al.*, 1999; Limpose *et al.*, 2014). Después de la muerte celular, el ADN comienza un proceso de degradación que aumenta conforme pasa el tiempo. Las condiciones externas como la temperatura, humedad, el pH y la radiación ultravioleta modifican la velocidad y el grado de degradación (Fondevila *et al.*, 2008).

V.4.1.2.1 Muerte celular

Durante el proceso de descomposición de un cuerpo, se pueden dar dos procesos de muerte celular: apoptosis y necrosis (Alaeddini *et al.*, 2010). La apoptosis es la muerte celular programada dependiente de energía, caracterizada por la degradación del ADN cromosómico en oligómeros de aproximadamente 180 pb mediante la activación de las endonucleasas (Alaeddini *et al.*, 2010).

La necrosis es la muerte celular por un colapso metabólico pasivo que, debido a las enzimas lisosómicas liberadas, generan un patrón de degradación aleatorio del ADN (Alaeddini, 2012). La necrosis se da frecuentemente por la exposición extrema de la célula a condiciones ambientales externas como la hipoxia, o por la acción de tóxicos activos de membrana y venenos respiratorios como el cianuro (Dive *et al.*, 1992).

Los fragmentos de ADN pueden degradarse por nucleasas endógenas liberadas por células o nucleasas exógenas liberadas por microorganismos e invertebrados exógenos. Aunado a ello, la degradación del ADN se verá agravada por procesos de hidrólisis y oxidación (Alaeddini, 2012). Ambos procesos de muerte celular, influenciados por factores como la temperatura, niveles de oxígeno y actividad microbiana, provocan la fragmentación del ADN (Hughes-Stamm, 2012).

V.4.1.2.2 Hidrólisis

Una muestra forense expuesta a condiciones de humedad puede provocar una hidrólisis en el enlace glucosídico entre la base nitrogenada y el azúcar (desoxirribosa) y esto generar un sitio llamado AP (apurínico o apirimidínico) (Limponse *et al.*, 2014). Otro factor que provoca la ruptura de la cadena del ADN es el pH del entorno acuoso donde puede ser encontrado. Si el pH es ácido, cataliza la depurinación del ADN (Alaeddini, 2012).

V.4.1.2.3 Oxidación

La radiación ionizante y el metabolismo microbiano de bacterias anaeróbicas que colonizan un cuerpo en descomposición producen especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) (Alaeddini *et al.*, 2010). Las ROS como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^-) provocan un daño oxidativo en el ADN (Limponse *et al.*, 2014). El daño oxidativo provoca la ruptura de la cadena de ADN, modificación de las bases de ADN,

generación de sitios AP, entre otros (Zorrilla *et al.*, 2004). Cabe destacar que los microorganismos, encargados de la descomposición, proliferan en condiciones de altas temperaturas y humedad.

V.4.1.2.4 Exposición a luz ultravioleta

La exposición del ADN a luz ultravioleta produce la unión entre dos pirimidinas con enlaces dobles, conocido como dimerización de pirimidinas (Goodsell, 2011). Esto detiene a la polimerasa y la replicación del ADN durante la PCR (Hughes-Stamm, 2012).

V.4.1.3 Concentración de ácidos nucleicos

La concentración de ácidos nucleicos se obtiene a través de diversos métodos.

V.4.2 Métodos para determinar la cantidad y calidad del ADN

V.4.2.1 Electroforesis

La electroforesis es un método para cuantificar y conocer la calidad del ADN extraído. Consiste en aplicar una corriente eléctrica a través de un gel o capilar que permite el desplazamiento de fragmentos de ADN y ARN, dependiendo de su tamaño, y visualizarlos mediante tinción (Butler, 2005; Fierro, 2014).

Gel de poliacrilamida

Los geles comúnmente utilizados en laboratorios de genético forense son de poliacrilamida. Este gel está compuesto por poliacrilamida y buffer TAE (Tris-Acetato EDTA) o TBE (Tris-Borato EDTA). Además, tiene pocillos que se forman con la ayuda de un peine. Los geles de poliacrilamida son utilizados para obtener separaciones de alta resolución de pequeñas moléculas de ADN (menores de 1000 o 500 pb), se corren de forma vertical y su elaboración es más complicada que con el gel de agarosa (Butler, 2005; Fierro, 2014).

La técnica consiste en sumergir el gel en un buffer de electroforesis. Después la solución de ADN se coloca en los pocillos y se aplica una corriente eléctrica a través del gel y el ADN, que tiene carga negativa, migra hacia el ánodo (Figura 56). Las moléculas de ADN más pequeñas se mueven a través del gel más rápidamente que las moléculas de ADN más grandes. El ADN de alto peso molecular y de buena calidad se puede ver como una sola banda con un tamaño por encima 20,000 pb, mientras que el ADN degradado aparece como un barrido con un tamaño menor a

20,000 pb. Si el ADN está degradado, disminuye las posibilidades de amplificar diferentes loci (Sambrook, 2003; Hadi *et al.*, 2011; Butler, 2011). Finalmente, las moléculas de ADN se detectan mediante tinción y el ADN se visualiza mediante iluminación con luz UV de 260 nm.

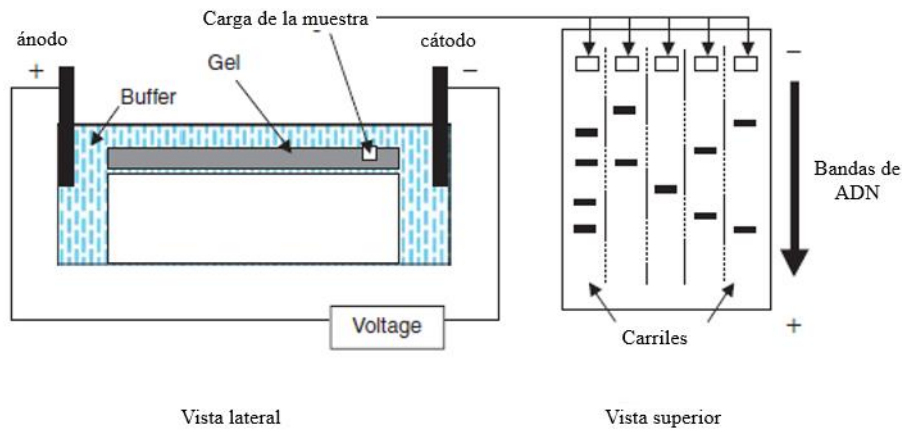


Figura 56. Electroforesis en gel. Tomado de Butler., 2005.

V.4.2.2 Espectrofotometría UV

La espectrofotometría UV (Figura 57) es el método utilizado para la cuantificación de ácidos nucleicos en una solución. No obstante, no es utilizado por la comunidad forense debido a que no distingue entre ADN o ARN, no cuantifica específicamente ADN humano, y es difícil cuantificar pequeñas cantidades de ADN mediante este método (Shewale y Liu, 2013; Dragan *et al.*, 2014). Se basa en medir la absorbancia (cantidad de luz absorbida) a una longitud de onda determinada (Promega, 2018). Para ello, en una celda del espectrofotómetro se hace pasar un haz de luz ultravioleta. Esta atraviesa la solución y un fotodetector mide la intensidad de la luz absorbida. A mayor concentración de ácidos nucleicos, más luz absorbe la muestra (Salazar *et al.*, 2013).

Una unidad de absorbancia (densidad óptica OD) a 260 nm equivale a una concentración de 50 ng/μl en el caso del ADN, 33 ng/μl en el ADN de una cadena, y de 40 ng/μl en el caso del ARN (Applied Biosystems, 2009; Benito y Espino, 2013).

La concentración de ADN se determina midiendo la absorbancia a 260 nm, ajustando la medición de A_{260} para la turbidez (medida por absorbancia a 320 nm), multiplicando por el factor de dilución y usando una relación que un A_{260} de 1.0 = 50 μg / ml de ADN puro.

$$\text{Concentración } (\mu\text{g/ml}) = (A_{260} - A_{320}) \times (\text{Factor de dilución}) \times (50 \mu\text{g/ml})$$

Donde:

A_{260} y A_{320} = Valores de absorbancia obtenidos a 260 nm y 320 nm respectivamente.

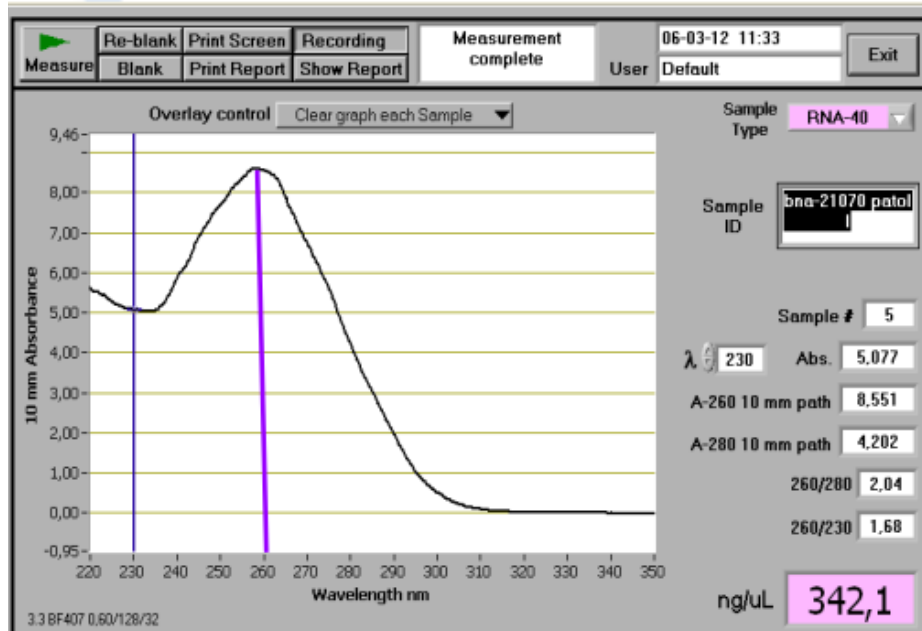


Figura 57. Espectrofotometría UV (Tomado de Goodwin *et al.*, 2011).

V.4.2.3 Espectroscopía fluorescente

La espectroscopía fluorescente cuantifica pequeñas cantidades (hasta 250 picogramos) de ADN o ARN en una solución. Es un método mil veces más sensible en comparación con espectrofotometría UV al utilizar colorantes fluorescentes (fluoróforos) que se unen regiones específicas del ADN. Además, es menos susceptible a interferencias por proteínas y contaminantes presentes en una solución (Salazar *et al.*, 2013; Li, 2015). Sin embargo, este método no diferencia entre ADN humano y no humano, y no proporciona información sobre la pureza o la posible degradación del ADN o ARN (Shewale y Liu, 2013).

La fluorescencia, proporcional a la cantidad de ADN, se cuantifican comparando con una curva estándar que utiliza muestras con cantidades de ADN conocidas (Butler, 2011; Li, 2015). Algunos de los colorantes usados son Hoechst-33258, PicoGreen®, and OliGreen® (Shewale y Liu, 2013). Los colorantes Hoechst-33258 y PicoGreen® se unen al ADN bicatenario, OliGreen® se une al ADN monocatenario y Hoechst-33258 se une a regiones de ADN ricas en AT (Shewale y Liu, 2013).

V.4.2.4 PCR en tiempo real (QPCR)

La PCR en tiempo real es una técnica que realiza la amplificación y la detección de productos de PCR simultáneamente en cada ciclo de la PCR. Se utiliza un indicador fluorescente, conocido como fluorocromo o fluoróforo, que puede estar añadido a un cebador como *primers* LUX, sondas específicas como sondas TaqMan o agentes intercalantes como SyberGreen o SyberSafe (Higuchi *et al.*, 1993; Butler, 2011; Salazar *et al.*, 2013). A diferencia de otros métodos de cuantificación, utiliza una curva estándar para determinar los valores de cuantificación (Goodwin *et al.*, 2013).

El fluorocromo es excitado y emite una señal, misma que es detectada para medir la cantidad de ADN sintetizado en cada momento. Esta emisión producida en la reacción es proporcional a la cantidad de producto de PCR formado (Costa, 2004; Tamay de Dios *et al.*, 2013; Salazar *et al.*, 2013). Las ventajas de este método sobre los métodos de espectrofotometría UV y espectroscopía fluorescente son que la PCR en tiempo real es específico para el objetivo que se amplifica, tiene mayor sensibilidad al realizar mediciones más precisas en pequeñas cantidades de ADN, tiene la capacidad de detectar inhibidores de PCR, y el tiempo empleado es menor al ser un método automatizado (Shewale y Liu, 2013).

V.5 Amplificación por PCR

La amplificación de ADN mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR; Mullis *et al.*, 1986) consiste en realizar miles de millones de copias de un fragmento específico de ADN. Permite replicar cantidades mínimas de ADN, ADN degradado, incluso contaminado (Butler, 2011). Este proceso enzimático realiza la desnaturalización, hibridación y extensión del ADN molde o ADN complementario (ADNc) (Figura 58). La amplificación de ADN requiere distintos reactivos, como se muestra en la siguiente tabla (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Tabla 3. Elementos y su concentración óptima utilizados para la amplificación por PCR (Tomada de Butler, 2011).

Elementos	Concentración óptima
Tris-HCl, pH 8.3 (25 °C)	10-50 mM
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	1.2-2.5 mM
Cloruro de potasio (KCl)	50 mM
Deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs)	200 µM de cada dATP, dTTP, dCTP, dGTP
ADN polimerasa, termo estable	0.5-5 U

Albúmina (BSA)	100 µg/mL
Oligonucleótidos o cebador	0.1-1.0 µM
ADN molde (ADNc)	1-10 ng ADN genómico

El buffer o solución amortiguadora, compuesto por Tris-HCl y KCl, proporciona un pH y concentración de sales adecuadas para la correcta función de la ADN polimerasa. El cloruro de magnesio (MgCl₂) actúa como cofactor de la ADN polimerasa; los deoxinucleotidos trifosfato (dNTPs) son requeridos para la elongación de la cadena, alineándose complementariamente a ella. La ADN polimerasa es una enzima empleada para la extensión del ADN molde. Los oligonucleótidos o cebadores son secuencias cortas de ADN, generalmente con una longitud entre 18 y 30 nucleótidos, que se alinean al ADN molde. Se utiliza un par de ellos (En sentido y anti-sentido) y se diseñan procurando un contenido de nucleótidos Guanina/Citosina de 40 a 60%, de manera que no sean complementarios con ellos mismos o con ningún otro cebador presente en la reacción, y el ADN molde es un fragmento pequeño de ADN que actúa como iniciador de la enzima polimerasa (Goodwin *et al.*, 2011). Generalmente en el ámbito forense la cantidad de ADN molde es baja. Diversos *kits* requieren entre 0.5 ng y 20.5 ng de ADN para obtener resultados óptimos (Goodwin *et al.*, 2011; Salazar *et al.*, 2013).

Etapas térmicas de la PCR

Desnaturalización: El ADN se eleva a una temperatura de 95 °C durante un periodo de 20 a 30 segundos, tiempo que dependerá del ADN molde. Se ocasiona la ruptura de los puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas, obteniendo así, la separación de la estructura de doble cadena (Tamay de Dios *et al.*, 2013) (Figura 58, Paso 1).

Hibridación: Los oligonucleótidos se alinean al extremo 3' del templado e hibridan (Figura 58 Paso 2) a una temperatura de hibridación, mejor conocida como “*melting temperature*” (T_m) en inglés. Esta oscila entre 50 °C y 60 °C. El resultado es el complejo molde-cebador (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Extensión: La extensión de cada cadena se realiza en dirección de la síntesis de ADN (5' a 3') a una temperatura de 72 °C. La enzima (se utiliza comúnmente *Taq* polimerasa) actúa sobre el complejo molde-cebador y agrega dNTPs complementarios para sintetizar la cadena de ADN (Figura 58 Paso 3), formando amplicones o productos de PCR (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

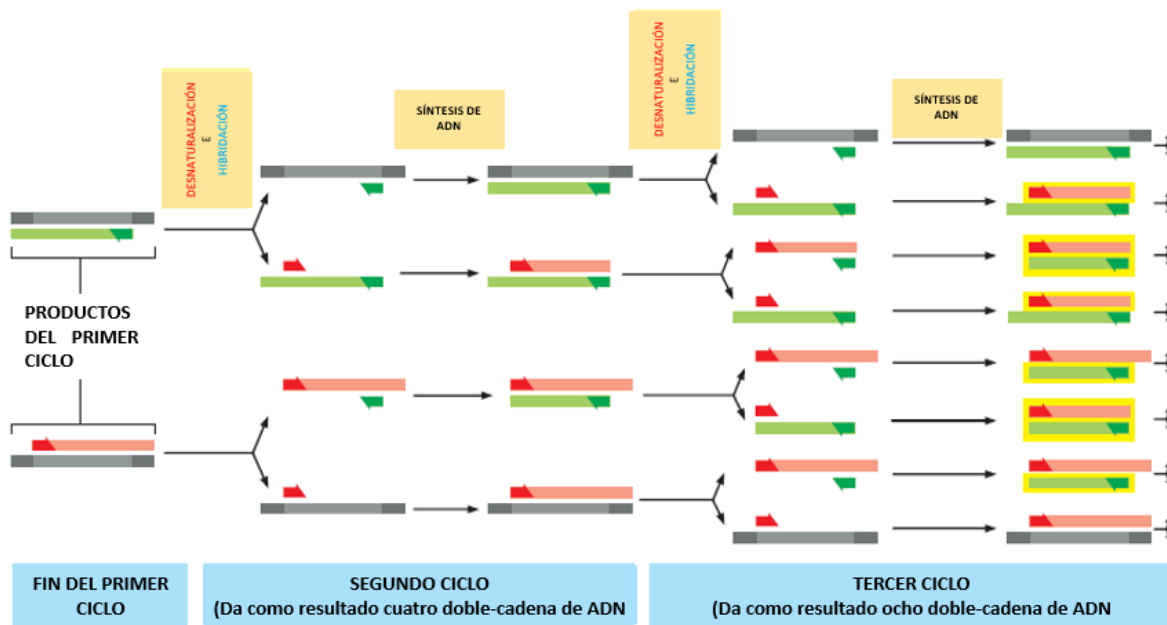
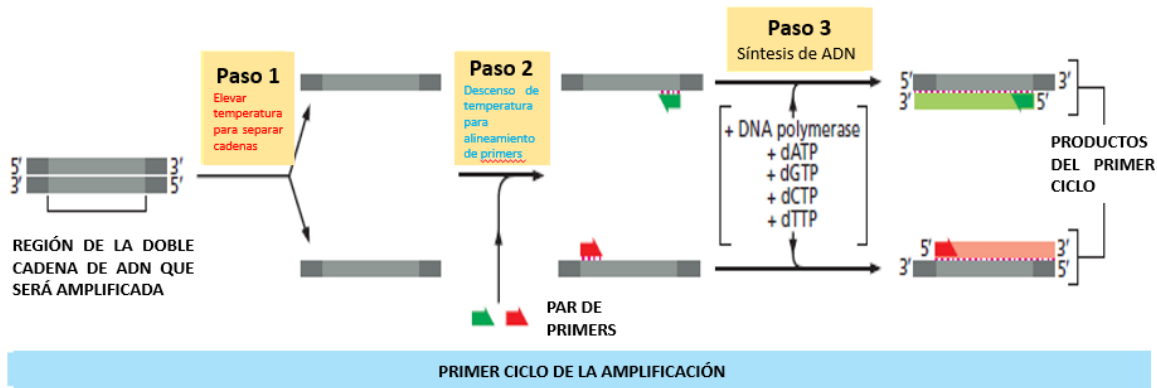


Figura 58. Esquema modificado de la amplificación por PCR. (Paso 1) Desnaturalización. (Paso 2) Hibridación y (Paso 3) Extensión. Para amplificar el ADN, el ciclo se repite varias veces. Tomado de Alberts, *et. al.*, 2014.

V.6 Secuenciación

El método de secuenciación, conocido como secuenciación por terminación de cadena, fue desarrollado por Sanger y colaboradores (1977). El método permite determinar el orden de las bases de los nucleótidos de un fragmento de ADN. Para llevar a cabo la secuencia, se realizan copias de una región específica del ADN (Alleyne *et al.*, 2009; Alonso 2011). Actualmente se realiza una secuenciación automática que se diferencia del método de Sanger por el tipo de marcaje. En el método automático se utiliza fluorescencia en vez de radiactividad (Ramírez *et al.*, 2014). El método se lleva a cabo utilizando una enzima ADN polimerasa; un cebador; los cuatro nucleótidos de ADN (dATP, dTTP, dCTP, dGTP); los terminadores de la cadena o versiones didesoxi de los

cuatro nucleótidos (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP); y el molde de ADN que será secuenciado. El cebador, por complementariedad, se une al molde de ADN y la ADN polimerasa añade nucleótidos hasta incorporar un ddNTP (Applied Biosystems, 2009; Alberts, 2014). Los dideoxinucleótidos (ddNTP) terminan la extensión de la cadena por ausencia de 3'-OH y se encuentran marcados con fluorocromos. Los fluorocromos empleados son cuatro para cada base (Alberts, 2014).

Al término de la reacción se obtienen fragmentos que son introducidos a un secuenciador automatizado. En este equipo se lleva a cabo una electroforesis capilar para separar los fragmentos por tamaños: los fragmentos pequeños migran con mayor rapidez al final del capilar a diferencia de los fragmentos más grandes. Al final del capilar se excitan los fluorocromos (por medio de un láser) y emiten fluorescencia a una longitud de onda distinta. Esta longitud de onda es detectada por un dispositivo que convierte y procesa la información. Por último, los datos se mostrarán como un electroferograma (Applied Biosystems, 2009; Ramírez *et al.*, 2014; Alberts, 2014) (Figura 59).

V.7 Short Tandem Repeats (STRs)

Un perfil genético humano actualmente se basa en el análisis de marcadores nucleares de ADN conocidos como secuencias cortas de repetición en tándem (STR) o microsatélites (Allelyne *et al.*, 2009; Villavicencio y Guardado, 2017; Phillips *et al.*, 2017). Estos marcadores se utilizan porque son útiles en el análisis de muestras degradadas, requieren de poca cantidad de ADN (6 nanogramos), y cuando se analizan al menos trece microsatélites (en base de datos CODIS), tienen un alto poder de discriminación (Allelyne *et al.*, 2009; Villavicencio y Guardado, 2017).

Los microsatélites tienen una longitud de 2 a 7 pares de bases (pb) y se repiten numerosas veces en un *locus* (Dragan *et al.*, 2014). La mayoría de *loci* utilizados para la identificación de individuos son tetranucleótidos (4 pb). Éstos son polimórficos y estables, aunque se encuentran en menor cantidad en el genoma (Dragan *et al.*, 2014; Villavicencio y Guardado, 2017). En la actualidad existen *kits* comerciales que permiten la amplificación múltiple de ocho o más marcadores simultáneamente (Butler, 2011). Las compañías que fabrican los *kits* STR y se utilizan en el análisis forense son: Promega, Life Technologies y Qiagen (Butler, 2012; Dragan *et al.*, 2014).

Después de amplificar los marcadores *loci* STR, los productos de PCR (fragmentos) se secuencian automáticamente obteniendo un electroferograma (Figura 59).

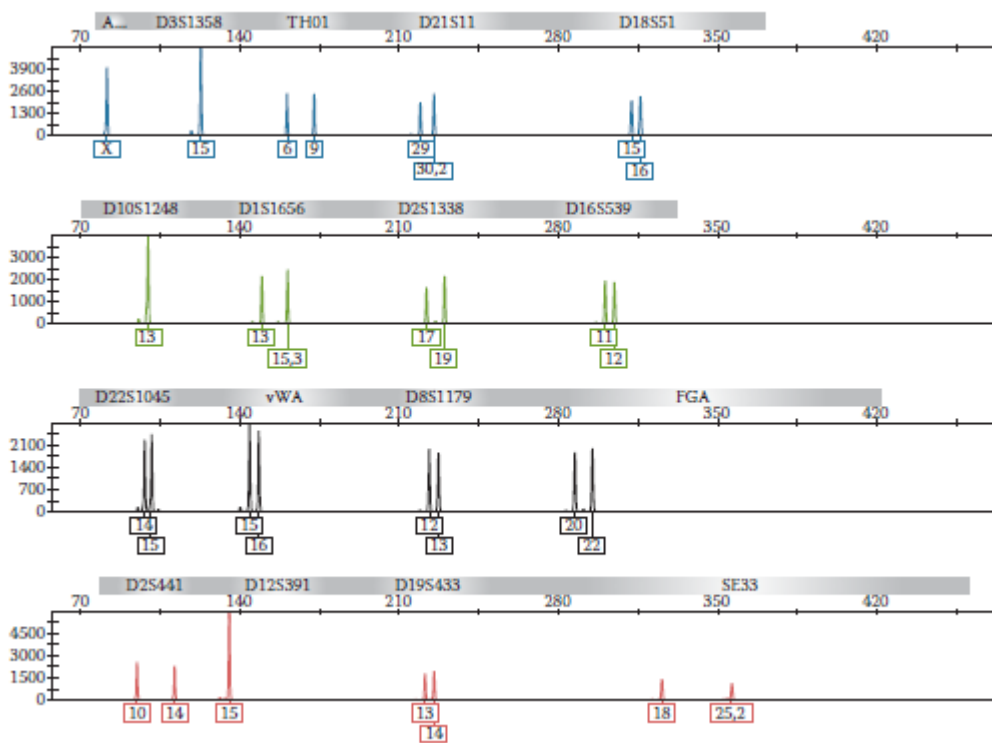


Figura 59. Electroferograma obtenido con un kit de Promega. Tomado de Dragan *et al.*, 2014

V.8 Variación en el ADN mitocondrial (mtADN) e identificación de haplogrupos

El ADN mitocondrial humano es una molécula circular de 16,569 pb de longitud (Dragan *et al.*, 2011) (Figura 60). El ADN mitocondrial está localizado en el citoplasma de las células eucariotas, es heredado por vía materna y está presente en múltiples copias en cada mitocondria (Goodwin *et al.*, 2011). La tasa de mutación en el ADN mitocondrial es de 10 a 17 veces mayor que la del ADN nuclear (Graterol, 2015).

El mtADN presenta polimorfismos que permiten determinar el linaje parental. Los haplogrupos mitocondriales son agrupaciones de haplotipos, es decir, conjunto de variaciones (polimorfismos) encontradas en posiciones determinadas del genoma que caracteriza a los individuos con un mismo origen, pertenecientes a una misma población y que se distribuyen alrededor del mundo con un patrón geográfico específico (Martín *et al.*, 2011; Gómez-Gutiérrez, 2017; Guardado-Estrada *et al.*, 2018). Los haplogrupos del ADN mitocondrial pueden ser utilizados para definir poblaciones genéticas (Graterol, 2015). Los nativos americanos pueden ser agrupados en cinco haplogrupos mitocondriales diferentes, designados como A, B, C, D y X. Estos han sido identificados a partir de marcadores RFLP o de la región hipervariable I (HV-I). Los

haplogrupos A, B, C y D se encuentran distribuidos con distintas frecuencias en todo el continente americano, y con menor frecuencia el X (Guardado-Estrada *et al.*, 2008; Nores y Demarchi, 2011).

En el área forense, se utiliza como marcador genético para la identificación humana. Esto se realiza analizando la variación de secuencia de dos regiones hipervariables (HV1 y HV2). Al ser heredado por vía materna, permite la identificación humana utilizando como muestras de referencia a parientes que provengan del mismo linaje materno (Shewale y Liu, 2013; Villavicencio y Guardado, 2018). Los miles de copias de mtADN ante las dos copias de ADN nuclear, presentes en una célula, es una ventaja para la extracción de este en muestras con material altamente degradado (Shewale y Liu, 2013).

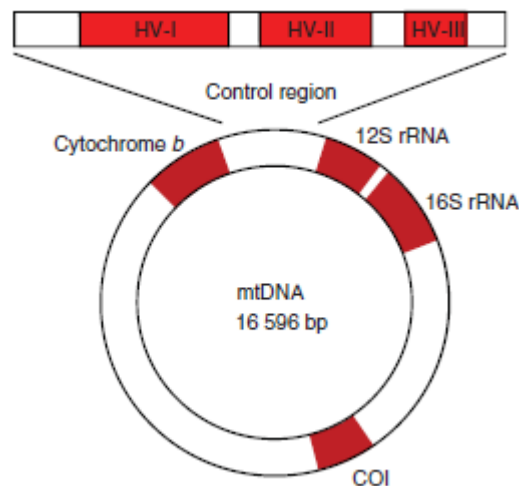


Figura 60. Esquema del ADN mitocondrial. Tomado de Goodwin et a., 2011.

El ADNmt se aísla con métodos de extracción similares a los de ADN nuclear. La cantidad de ADNmt puede ser cuantificado por PCR en tiempo real, amplificado por PCR y secuenciado por el método Sanger (Li, 2015).

V.9 Interpretación del perfil genético humano

El análisis de un electroferograma de STRs es obtenido a través de la comparación de los picos que se observan. Cada grupo de picos corresponde a un *loci*. Cada pico contenido en un *loci* corresponde a un alelo. Los *loci* heterocigóticos producen dos picos y los *loci* homocigóticos producen un pico (Figura 61). Cabe destacar que la presencia de más de dos picos puede establecer la presencia de más de dos muestras (Dragan *et al.*, 2014).

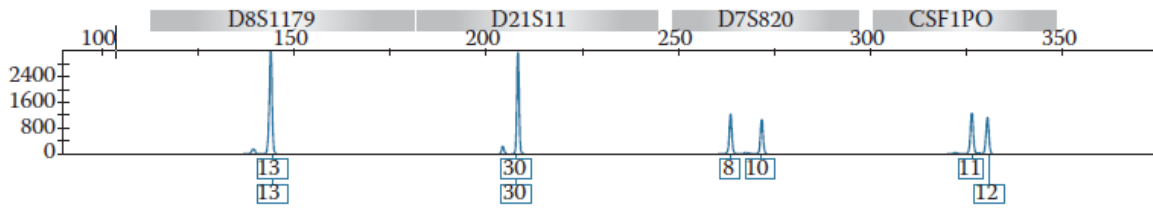


Figura 61. Loci homocigóticos (izquierda) y heterocigóticos (derecha). Tomado de (Dragan *et al.*, 2014).

La posición de los picos en el electroferograma determina el tamaño de la molécula. Los fragmentos más pequeños se posicionarán en el lado izquierdo y los fragmentos más grandes en el lado derecho del electroferograma. Para conocer su tamaño, se utiliza un estándar interno (Goodwin *et al.*, 2011). La altura de los picos proporciona información sobre la cantidad de ADN amplificado. Picos muy altos (Figura 62a) aportan información sobre una amplificación de una cantidad excesiva de ADN, además se observarán artefactos en el electroferograma como los *pull-ups* y picos *split* (Goodwin, 2011) (Figura 63a). Por el contrario, picos bajos o ausentes (*drop out*) (Figura 62b y Figura 63d) son el resultado de la utilización de poca cantidad de ADN, o bien, de que la amplificación no se dio bajo condiciones óptimas (Butler, 2011; Goodwin, 2011).

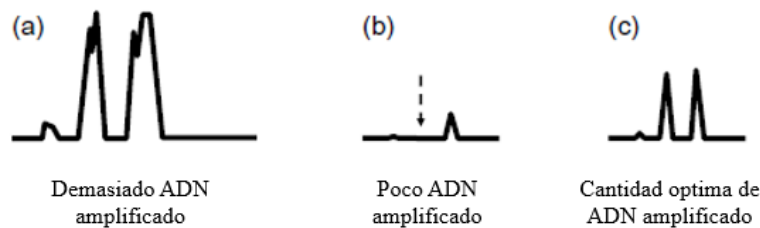


Figura 62. Esquema donde se muestra la altura de los picos dependiente de la cantidad de ADN utilizada para la amplificación. (a) Picos altos por la utilización de una cantidad de ADN excesiva, (b) Picos ausentes por la utilización de poca cantidad de ADN y (c) Picos equilibrados y a escala por la utilización de una correcta cantidad de ADN. Tomado de Butler, 2011.

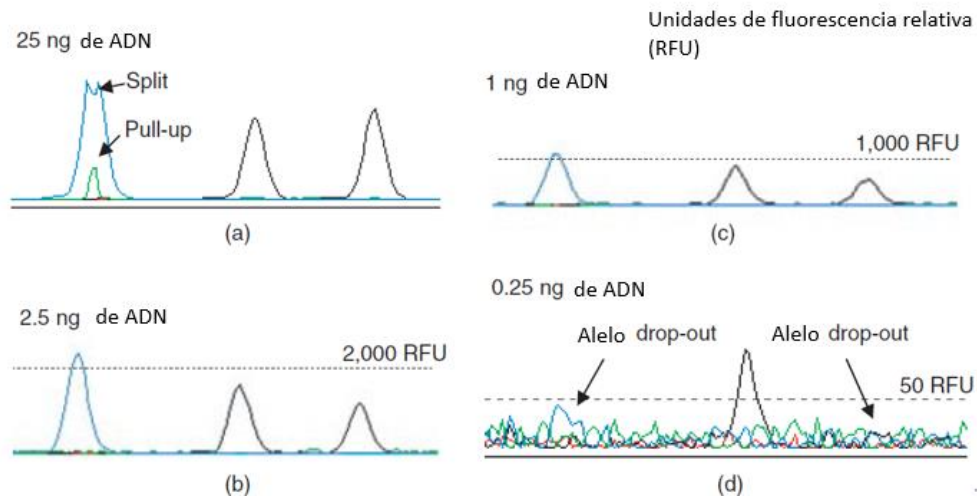


Figura 63. Esquema que ejemplifica los artefactos que pueden estar presentes en un perfil genético. (a) Si la amplificación tiene una cantidad excesiva de ADN se observan picos con artefactos como picos *Split* y *pull-ups*. (b y c) Representación de una cantidad óptima de ADN mostrando picos equilibrados. (d) Representación de picos ausentes o *drop out*. Tomado de Goodwin *et al.*, 2011.

Otro de los aspectos que puede observarse en un electroferograma es la degradación de ADN. El electroferograma muestra una reducción gradual de los picos, es decir, una reducción en la cantidad de producto a medida que incrementa de tamaño (Goodwin *et al.*, 2011) (Figura 64).

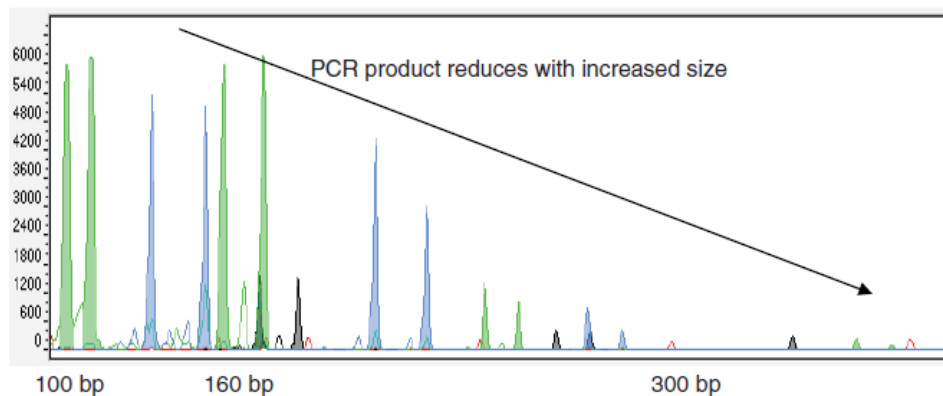


Figura 64. Electroferograma típico de muestras degradadas. Tomado de Goodwin *et al.*, 2011.

V.10 Análisis del perfil genético

Para establecer la relación entre una muestra y una persona o entre dos personas, es decir, determinar si un perfil genético obtenido de una muestra de fuente desconocida coincide (*match*) o no (*no-match*) con el perfil genético de una muestra de referencia, se realiza una comparación (Promega, 2018) (Figura 65). Del proceso de comparación del perfil genético de la muestra

dubitada con el perfil genético de la muestra de referencia se puede obtener alguno de los siguientes resultados: excusión (no coincide), no concluyente o no interpretable, e inclusión (coincide) (Butler, 2011; Butler, 2014). Cuando se llega a la conclusión de coincidencia (*match*), se requiere de un análisis estadístico conocido como probabilidad de coincidencia al azar, es decir, la probabilidad de que un individuo tomado al azar en una determinada población presente el mismo perfil genético que el de la muestra analizada (Butler, 2014; SWGDAM, 2017).

El análisis de los datos se realiza utilizando diversos softwares como GeneMapper® y Genotyper. Estos programas permiten incrementar la eficiencia al analizar los datos automáticamente, utilizando datos de referencia (Applied Biosystems, 2009).

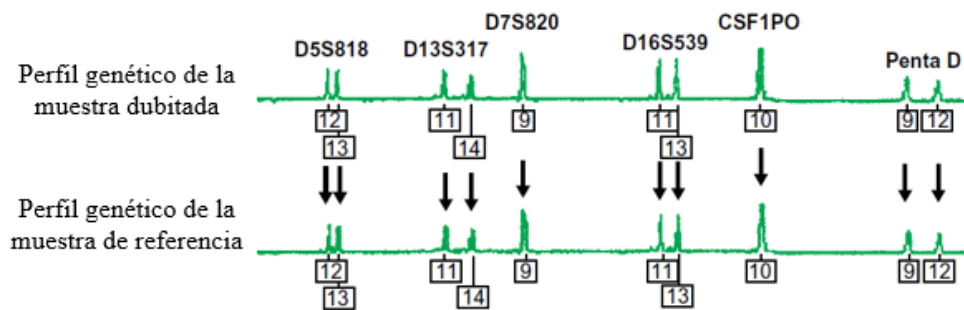
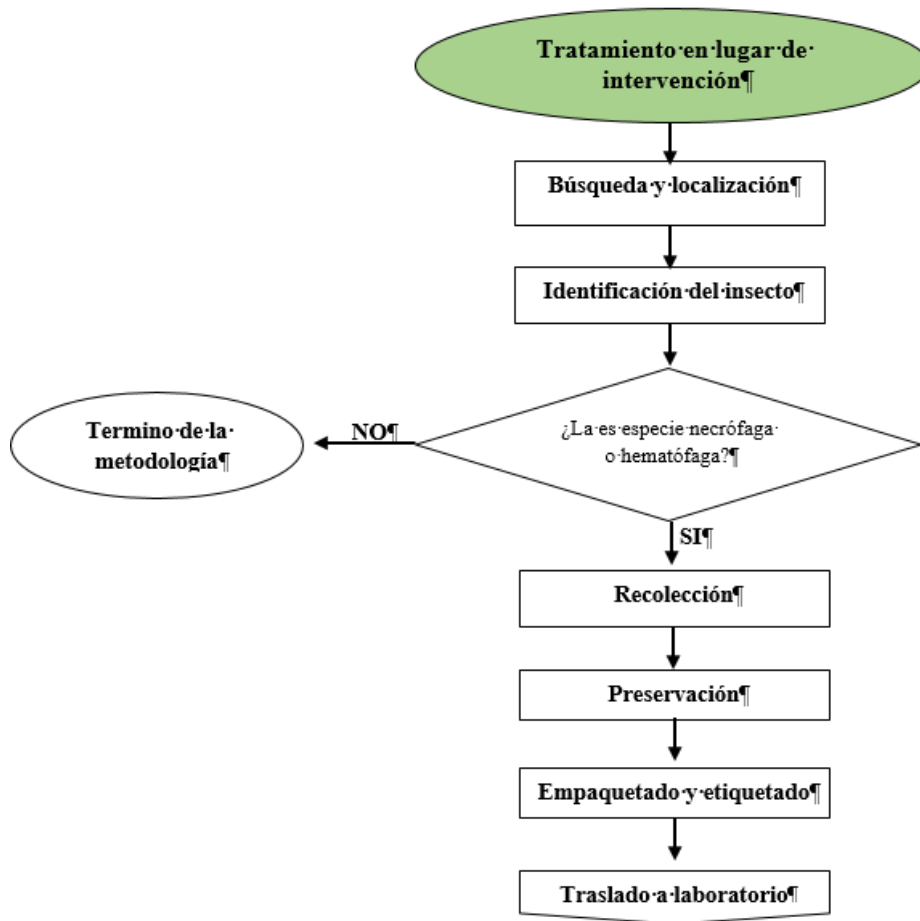


Figura 65. Comparación directa entre perfiles genéticos de muestra de referencia y muestra dubitada. Tomado de Butler, 2011.

Diagrama de flujo de la metodología para el tratamiento de indicios entomológicos

La metodología que aquí se plantea, desde la búsqueda y localización de insectos necrófagos y hematófagos hasta la obtención de un perfil genético a partir del ADN humano aislado del sistema digestivo de estos insectos, se sintetiza en el siguiente diagrama de flujo (Figura 66).



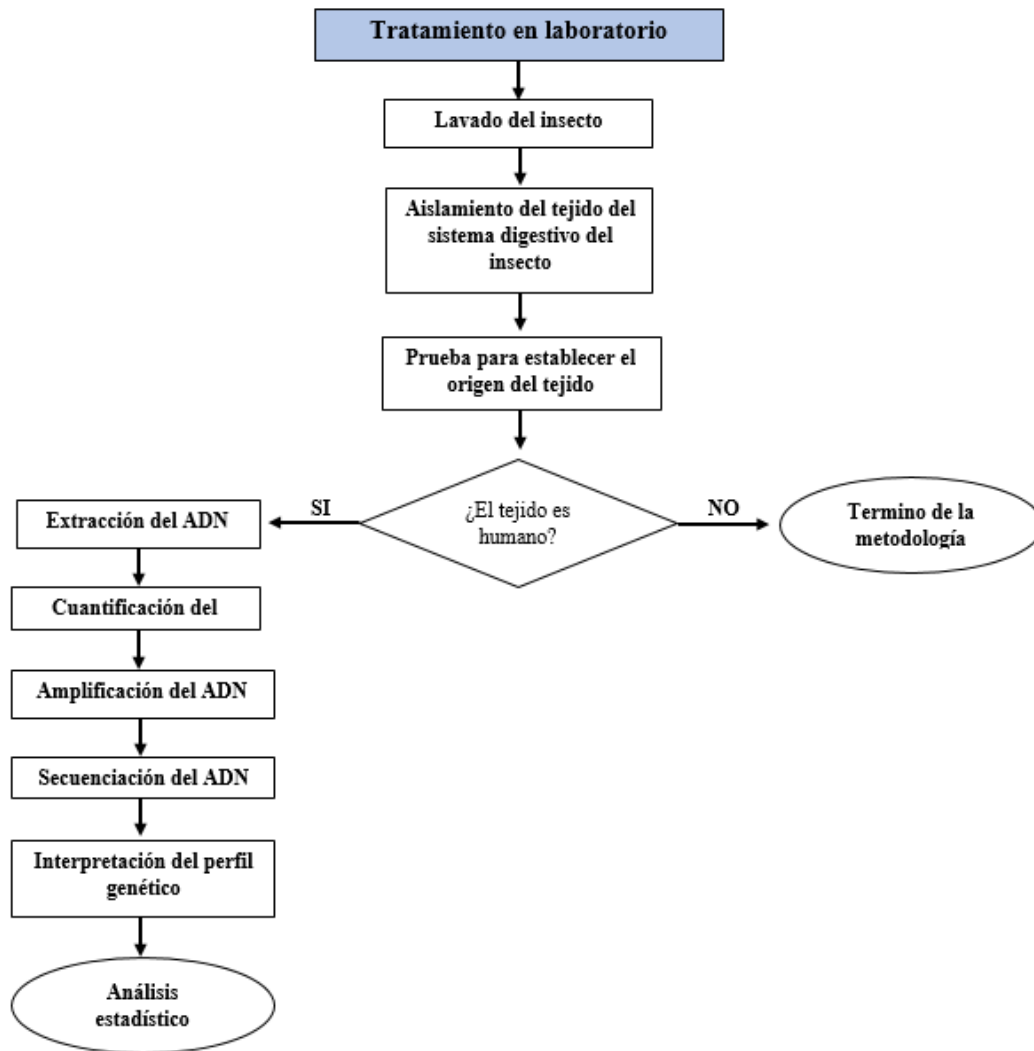


Figura 66. Diagrama de flujo de la metodología llevada a cabo para la obtención y análisis de ADN humano aislado del sistema digestivo de insectos necrófagos y hematófagos.

8. DISCUSIÓN

A nivel mundial y en México los estudios realizados sobre la obtención de ADN humano a partir del sistema digestivo de insectos necrófagos y hematófagos han sido escasos. Por lo tanto, la creación de materiales de consulta y apoyo de fácil comprensión para los usuarios de la Entomología Forense es un campo promisorio, que puede representar un incentivo para la aplicación de herramientas forenses novedosas como esta. El presente trabajo es el primer estudio en México que, a partir del análisis de la literatura publicada, plantea una propuesta de protocolo con el fin de establecer una metodología estándar para la identificación y tratamiento de insectos necrófagos y hematófagos en un lugar de intervención y en un laboratorio de genética forense con fines de identificación humana.

Esta propuesta de protocolo se basa en extractos de información básica actualizada en un contexto nacional e internacional, lo que brindará a las personas interesadas en el tema (criminalistas, antropólogos y otros especialistas forenses), un panorama general de la utilidad y pertinencia de este protocolo para la investigación de un delito.

El diseño del protocolo se hizo con base en el método criminalístico y la Cadena de Custodia, desde la búsqueda de los indicios entomológicos, su identificación, hasta su traslado a laboratorio, mencionando las herramientas útiles para el análisis del ADN en un laboratorio de biología molecular o genética forense. Dentro de él, además de plantear aquellos factores que deben considerarse para la obtención de perfiles genéticos humanos completos, o bien, que pueden limitar o impedir esta aplicación, se desarrolló una pequeña guía visual para la identificación de familias de insectos necrófagos y hematófagos reportadas. Esta guía informa sobre generalidades, características morfológicas y lugar donde habitan estas especies.

Esta propuesta permite la optimización tanto de las actividades del personal que interviene en el lugar de investigación como del personal en el laboratorio en cuanto al tratamiento que

deberán dar a las muestras, lo que garantiza obtención de resultados de calidad y confiables. Por otra parte, sugiere las medidas a observar para la aplicación de una herramienta más para la identificación humana, permitiendo obtener datos cualitativos y cuantitativos de manera ordenada con base en las especificaciones que se proponen, bajo el cumplimiento de las buenas prácticas del trabajo en el lugar de intervención y en el laboratorio.

8.1 Análisis de publicaciones

El análisis de las publicaciones en el tema permite discutir algunos aspectos. En primer término, la metodología, aunque recientemente se ha explorado en nuestro país, se planteó por primera vez como posible aplicación forense en el año 1998. Esto habla de que el interés por esta metodología tiene 21 años a nivel internacional. La situación de su falta de desarrollo y aplicación en México probablemente esté relacionada a su vez con el estado desarrollo de la entomología forense. Entre los motivos para esta falta de transferencia de conocimiento del ámbito internacional al nacional pueden mencionarse los siguientes: dificultad de contar con tejidos humanos para la experimentación de acuerdo a la legislación aplicable en los países en que fueron hechos los estudios; el nulo o poco acceso a un lugar y equipo adecuado para criar al insecto; el difícil acceso a publicaciones internacionales; o la falta de estrategias de actualización y, apropiación del conocimiento para los practicantes y académicos en el tema. De igual forma, es necesario estipular la integración entre disciplinas forenses, ya que, en este caso, la colaboración entre entomólogos y genetistas es fundamental.

8.2 Casos en los que este protocolo es aplicable

Los casos planteados para su aplicación en el área forense por las diferentes publicaciones son:

- a) Localización de indicios entomológicos, pero no de una fuente de alimento, por lo que el traslado de un cadáver es una hipótesis de trabajo. Es importante notar que, para

Llevar a cabo la investigación de un posible hecho delictivo, es necesario saber si esas larvas se han alimentado de tejido humano y no de otro tejido biológico.

- b) En el escenario de fosas clandestinas además de localizar insectos necrófagos también se requiere estimar un intervalo *post mortem*. Para ello será necesario asociar los insectos con el cadáver y conocer si efectivamente se han alimentado del cadáver y no de otra fuente.
- c) Cuando se requiera identificar restos humanos, pero se encuentren en avanzado estado de descomposición lo que hace casi imposible obtener muestras de tejido humano directamente de los restos. Sin embargo, pueden estar presentes insectos necrófagos en estadios inmaduros alimentándose de los restos humanos que pueden ser una fuente de ADN.
- d) Si el investigador requiere situar temporal y espacialmente una persona (víctima y/o victimario) en el lugar de investigación, deberá realizar una búsqueda y localización de insectos que pudieron alimentarse de alguno de los involucrados, tanto en el lugar del suceso, en objetos e inclusive en algún sospechoso. En casos de secuestro porque los insectos suelen ser poco controlados por los autores del delito.
- e) En el delito de violación donde no se cuente con un fluido biológico del agresor sobre la víctima, y esta haya sido contagiada de pediculosis púbica, es posible hacer un análisis genético del contenido gástrico del fitiráptero para identificar al autor del hecho.

Es importante mencionar que la presente propuesta de protocolo tendrá que ser revisada y evaluada por expertos, los cuales decidirán si es la mejor evidencia disponible, es decir, determinar si lo propuesto en este protocolo es idóneo para la identificación humana, si es viable su adecuada implementación, si la metodología planteada es efectiva para la obtención de un perfil genético humano y si la misma comunidad forense acepta y tiene los recursos necesarios para su utilización

en la investigación de casos específicos. Para determinar lo anterior debe emplearse una jerarquización de evidencia, esto es, aplicar los niveles de evidencia y grados de recomendación a esta propuesta de protocolo y estudios similares. Cabe destacar que será importante crear estos niveles de jerarquización aplicados a investigaciones forenses como los formulados para la Medicina basada en evidencias.

Posteriormente, esta propuesta debe validarse experimentalmente y aprobarse por profesionales del área de Entomología Forense, Genética, y áreas periciales, para garantizar que su aplicación se llevará a cabo cumpliendo con la normatividad correspondiente, como los siguientes: Protocolo de Cadena De Custodia, el Código Nacional de Procedimientos Penales, Leyes Orgánicas de las procuradurías estatales, de la Fiscalía General de la República y manuales establecidos en cada instituto de investigación forense.

A la par de la validación experimental, se deben desarrollar estudios que permitan conocer especies necrófagas y hematófagas existentes, desde su clasificación, identificación, taxonomía y su distribución en la República Mexicana. Esto debido a la poca información publicada cuyo objetivo sea el estudio y conocimiento de especies de importancia forense y médica, además de que las existentes muchas veces no están actualizadas. También se deben publicar claves taxonómicas aplicables en México, estudiar los ciclos de vida de los insectos y estudiar los factores que afectan la cantidad de ADN humano en el sistema digestivo del insecto como la edad del insecto, temperatura ambiental de desarrollo, tipo de tejido del que se alimentan (especies necrófagas), el tratamiento del insecto y el tiempo post-ingesta.

Posterior a la aprobación de su implementación, será necesario difundir la existencia de este tipo de metodologías y sus aplicaciones en la investigación de delitos, impartir cursos de actualización y capacitar a entomólogos forenses, criminalistas y aquellas personas que interviene en un lugar de investigación. Especialmente, puede iniciarse con la difusión de este trabajo a los

grupos especializados en entomología existentes en los servicios periciales de las Fiscalías de los estados de Chihuahua, Colima, Ciudad de México, Hidalgo, Nayarit, Nuevo León, Puebla, en el Instituto de Ciencias Forenses de la Ciudad de México (INCIFO), Jalisco, específicamente el Instituto Jalisciense de Ciencias Forenses y la Fiscalía General de la República.

9. CONCLUSIONES

La aportación principal de este trabajo fue el diseño de una propuesta de protocolo para el tratamiento e identificación de insectos hematófagos y necrófagos en un lugar de intervención y en un laboratorio, con fines de identificación humana forense.

Para la revisión de metodologías se elaboró una rúbrica para la síntesis y valoración de la información planteada en las publicaciones. Esto permitió identificar y elegir aspectos generales y así, proponer una metodología útil para el tratamiento de los insectos hasta su análisis en laboratorio. No se logró plantear una metodología única que abarcara desde la extracción del ADN humano del insecto hasta el análisis de un perfil genético humano obtenido. Esto al no encontrar patrones metodológicos o estudio alguno que evaluará la efectividad de su uso. Esta propuesta se enfocó a identificar diversos factores que deben tomarse en cuenta para aplicar esta metodología en la investigación de un delito.

Para la identificación de las especies necrófagas y hematófagas, se elaboró una guía visual, que pretende dar la información necesaria para identificar las especies de interés, conocer su morfología y generalidades de relevancia.

La presente propuesta de protocolo podrá ser de ayuda para futuras investigaciones de delitos en la que sea conveniente situar una víctima o un sospechoso en sitios específicos. Esta propuesta debe evaluarse por expertos y validarse para su completa aplicación.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Acuerdo A009/2015. Diario Oficial de la Federación Mexicana. México. 12 de febrero de 2015
- Acosta-Gutiérrez, R. y Morrone J. 2003. Clave ilustrada para la identificación de los taxones supraespecíficos de Siphonaptera en México. *Acta Zoológica Mexicana* 89: 39-53
- Acosta-Gutiérrez, R. 2014. Biodiversidad de Siphonaptera en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85: 345-352. <https://dx.doi.org/10.7550/rmb.35267>
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K. y Walter P. 2014. Molecular Biology of the cell. *Garland Science*. E.U.A. 445-481.
- Alaeddini R., Walsh S. J. y Abbas A. 2010. Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA—A review. *Forensic Science International: Genetics* 4; 148–157
- Alaeddini Reza, 2012. Forensic implications of PCR inhibition—A review. *Forensic Science International: Genetics* 6; 297–305
- Alonso A. 2011. ADN forense, investigación criminal y búsqueda de desaparecidos. *SEBBM*.
- Alonso-Zarazaga M. A. 2015. Clase Insecta. Orden Coleoptera. *IDE@-SEA*, 55:1-18.
- Amendt J., Campobasso C. P., Gaudry E., Reiter C., LeBlanc H. N. y Hall M. J. 2007. Best practice in forensic entomology—standards and guidelines. *International journal of legal medicine*, 121(2), 90-104.
- Amendt, J., Goff, M.L., Campobasso, C.P., Grassberger, M. (Eds.). 2010. Current Concepts in Forensic Entomology. (Vol. 376). *Springer Science+ Business Media BV*. 11-15, 25-63.
- Alleyne L., Al Maezooqui A., Bastisch I., Callaghan T., Chen S., Forest D., Gotru N., Hitchin S., Joubert P., Nilsen R., Scheinhauer R., Schuller W., Tompkins A., Walsh S. y Wechner C. 2009. Manual de INTERPOL sobre el intercambio y la utilización de datos relativos al ADN. Recomendaciones del grupo de expertos en ADN de INTERPOL. International Criminal Police Organization (INTERPOL).
- Applied Biosystems, 2009. DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis. Applied Biosystems Chemistry Guide.
- Banco Nacional de ADN Carlos III, 2018. Programa control de calidad de muestras.
- Board DNA Advisory (BDA), 2000. Quality assurance standards for forensic DNA testing laboratories. *Forensic Science Communications*, 2(3).
- Beaucournu J. C. y Gomez-Lopez M. S. 2015. Orden Siphonaptera. *Revista IDE@-SEA*, 61^a:1-11.
- Benecke M. 2001. A brief history of forensic entomology. *Forensic science international*, 120(1-2), 2-14.

- Benito C. y Espino F. J. 2013. Genética. Conceptos esenciales. *Editorial Médica Panamericana*. España. 503-537
- Bertola P. B., Aires C. C., Favorito S. E., Gracioli G., Amaku M. y Pinto-da-Rocha, R. 2005. Bat flies (Diptera: Streblidae, Nycteribiidae) parasitic on bats (Mammalia: Chiroptera) at Parque Estadual da Cantareira, São Paulo, Brazil: parasitism rates and host-parasite associations. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(1), 25-32.
- Beutel R. G., Friedrich F., Yang X. K. y Ge S. Q. 2014. Insect morphology and phylogeny: a textbook for students of entomology. *Walter de Gruyter*. 516.
- Blenkiron C., Tsai P., Brown L. A., Tintinger V., Askelund K. J., Windsor J. A. y Phillips A. R., 2015. Characterisation of the small RNAs in the biomedically important green-bottle blowfly *Lucilia sericata*. *PLoS One*, 10(3), e0122203.
- Brown B.V., Borkent A., Cumming J. M., Wood D. M., Woodley N. E., Zumbado M. A. 2010. Manual of Central American Diptera volume 2. *NRC Research Press*. Ottawa. 1281-1336
- Burger, J., Hummel, S., Herrmann, B., & Henke, W. 1999. DNA preservation: A microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *ELECTROPHORESIS: An International Journal*, 20(8), 1722-1728.
- Burkhart C. N. y Burkhart C. G. 2005. Head lice: scientific assessment of the nit sheath with clinical ramifications and therapeutic options. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 53(1), 129-133.
- Burke A. F., Cibrián-Tovar D., Llanderal-Cázares C., Plascencia-González A. y López-Pérez I. 2011. Adiciones y aportaciones para el género *Enoclerus* Gahan (Coleoptera: Cleridae) en bosques de clima templado en México. *Acta zoológica mexicana*, 27(1), 145-167.
- Butler, John M. 2005. Forensic DNA Typing: biology, technology, and genetics of STR markers. Elsevier. E.U.A. 647.
- Butler, John M. 2011. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. *Elsevier* Inglaterra. 680.
- Butler John. M. 2014. *Advanced topics in forensic DNA typing: interpretation*. Academic Press.
- Butler J. M., Hill C. R. y Coble M. D. 2012. Variability of new STR loci and kits in US population groups. *Profiles in DNA*. E.U.A. 28.
- Byrd J. H. 2002. *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*. CRC press.
- Cano Santana y Romero Mata, 2016. Piojos (Phthiraptera). En: La biodiversidad en la Ciudad de México, vol II. *CONABIO/SEDEMA*. México. 297-300.

- Campobasso C. P., Linville J. G., Wells J. D. e Introna, F. 2005. Forensic genetic analysis of insect gut contents. *The American journal of forensic medicine and pathology*, 26(2), 161-165.
- Cariaga-Martinez A. E y Zapata P. D. 2007. El laboratorio de Biología Molecular: una guía práctica. *Edición ampliada. Editorial Universitaria de Misiones, Serie Cátedra*.
- Carles-Tolrá M. 2001. Ragiónidos nuevos para la Península Ibérica (Diptera, Rhagionidae). S.E.A., nº 28: 131.
- Carles-Tolrá M. 2007. Phoridae: Familia nueva de dípteros para Andorra (Diptera, Phoridae). *Boletín Sociedad Aragonesa* 40, 419-422.
- Carles-Tolrá M. 2015. Orden Diptera. *IDE@-SEA*, 63, 1–22.
- Carvalho F., Dadour I. R., Groth D. M. y Harvey M. L. 2005. Isolation and detection of ingested DNA from the immature stages of *Calliphora dubia* (diptera: Calliphoridae). *Forensic science, medicine, and pathology*, 1(4), 261-265.
- Casas Martínez, M., Orozco A. y Bond J. G. 2012. Diversidad y distribución geográfica de las especies de culícidos de importancia médica en la región centro–occidental de México. *Instituto Nacional de Salud Pública. Centro Regional de Investigación en Salud Pública. Informe final SNIB-CONABIO, proyecto No. FE009. México, D.F.*
- Casas M. 2006. Especies de Anopheles en el sur de México y su distribución geográfica actual con enfoque en taxonomía clásica y molecular. *Secretaría de Salud. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. V019. México*
- Castillo R. M. 2014. *Leptoconops bequaerti* (Kieffer): un nuevo informe en la provincia de Santiago de Cuba. *MEDISAN* 5, 653.
- Chávez-Briones M., Hernández-Cortés R., Díaz-Torres P., Niderhauser-García A., Ancer-Rodríguez J., Jaramillo-Rangel G. y Ortega-Martínez M. 2013. Identification of human remains by DNA analysis of the gastrointestinal contents of fly larvae. *Journal of Forensic sciences*, 58(1), 248-250.
- Chow-Shaffer E., Sina B., Hawley W., De Benedictis J. y Scott T. 2000. Laboratory and Field Evaluation of Polymerase Chain Reaction-Based Forensic DNA Profiling for Use in Identification of Human Blood Meal Sources of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 37(4):492-502. DOI: <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-37.4.492>

- Clery, J. M. 2001. Stability of prostate specific antigen (PSA), and subsequent Y-STR typing, of *Lucilia (Phaenicia) sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) maggots reared from a simulated postmortem sexual assault. *Forensic science international*, 120(1-2), 72-76.
- Código Nacional de Procedimientos Penales. Diario Oficial de la Federación de los Estados Unidos Mexicanos, 17 de junio de 2016. México. 145.
- Comisión Nacional de los Derechos Humanos. 2017. Informe especial de la Comisión Nacional de los Derechos Humanos sobre desaparición de personas y fosas clandestinas en México. CNDH. México. 683.
- Costa J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica* 5, 299-305.
- Coulson R., Curtis C., Ready P., Hill N. y Smith D. 1990. Amplification and analysis of human DNA present in mosquito bloodmeals. *Medical and Veterinary Entomology* 4, 357-366.
- Crespillo M. 2017. Acreditación de laboratorios forense: validación de métodos y calidad de resultados. En José Alonso Aguilar (Comité Organizador). Workshop Internacional. Retos en Genética Forense: Análisis genético-poblacional, mezclas y acreditación de laboratorios. Grupo de habla español-portuguesa International Society of Forensic Genetics. México
- Criado P. R., Junior W. B., Criado R. F. J., Silva R. V. y Vasconcellos, C. 2011. Bedbugs (*Cimicidae* infestation): the worldwide renaissance of an old partner of human kind. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15(1), 74-80.
- De la Cruz A. 2004. Tesina de licenciatura: Análisis de ADN humano obtenido de mosquitos hematófagos (de la familia *Cullisidae*) con fines de identificación humana para posible aplicación en casos de privación ilegal de la libertad. *Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza*. México.
- Dehghani R., Limoe M. y Ahaki A. R. 2013. Research Note First report of family infestation with pubic louse (*Pthirus pubis*; Insecta: Anoplura: Pthiridae) in Iran—a case report. *Tropical biomedicine*, 30(1), 152-154.
- Departamento de Zoología, Instituto de Biología, 2015. *Anopheles maculipes aztecus*, ejemplar de: Colección Nacional de Insectos (CNIN), Diptera. En Portal de Datos Abiertos UNAM (en línea), México, *Universidad Nacional Autónoma de México*. México.
- Díaz-Aranda L. M., Martín-Vega D., Baz A. y Cifrián B. 2018. Larval identification key to necrophagous Coleoptera of medico-legal importance in the western Palearctic. *International journal of legal medicine*, 1-10.

- Dive C., Gregory C. D., Phipps D. J., Evans D. L., Milner A. E. y Wyllie A. H. 1992. Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1133(3), 275-285.
- DiZinno L., Collins-Morton, W. y Goff. 2002. Mitochondrial DNA sequencing of beetle larvae (Nitidulidae: Omosita) recovered from human bone. *Journal Forensic Science* 47, 1337-1339
- European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI), 2010. Recommended Minimum Criteria for the Validation of Various Aspects of the DNA Profiling Process. *ENFSI DNA working group*.
- Board, D. A. (2000). Quality assurance standards for forensic DNA testing laboratories. *Forensic Science Communications*, 2(3).
- Federal Bureau of Investigation (FBI), (2000), Quality Assurance Standards for Forensic DNA Testing Laboratories. *Forensic Science Communications*. Volume 2, Number 3.
- Fierro, F. F. 2014. Electroforesis de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, 27.
- Fish J., Miller L., Braswell M. y Wallace E. 2014. Crime Scene Investigation. *Elsevier*, pp 337-342.
- Fondevila M., Phillips C., Naverán N., Cerezo M., Rodríguez A., Calvo R., Fernández L. M., Carracedo Á. y Lareu M. V. 2008. Challenging DNA: assessment of a range of genotyping approaches for highly degraded forensic samples. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 1(1), 26-28.
- Forensic Science Regulator (FSG). 2015. The Control and Avoidance of Contamination in Laboratory Activities involving DNA Evidence Recovery and Analysis.
- Gaffigan Thomas, Wilkerson Richard, Pecor James, Stoffer Judith y Anderson Thomas, 2015. Systematic Catalog of Culicidae. *Walter Reed Biosystematics Unit*
- Galindo C., Cárdenas L., Ramírez J., Rivas S., Domínguez N., Torres El., Arreola R. y Domínguez I. 2012. Biodiversidad mexicana. Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Dirección de Comunicación Científica. México.
- García E. 2013. Tesis de licenciatura: Obtención de ADN humano a partir del contenido gástrico de larvas de dípteros alimentadas y colectadas en cadáveres humanos. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México.

- Gennard D. 2012. Forensic Entomology. An Introduction. *Wiley-Blackwell*. Inglaterra. 244.
- Godínez A.e Ibáñez–Bernal S. 2010. Catálogo de Psychodidae (Diptera) de la Colección de Artrópodos con Importancia Médica del INDRE, Secretaría de Salud, México. *Acta zoológica mexicana*, 26(1), 99-121.
- González M., López S. y Goldarazena A. 2012. Bioecología de Culicoides Tauricus Gutsevich, 1959 (Diptera: Ceratopogonidae) en el País Vasco (Península Ibérica): dinámicas de vuelo y zonas de cría en explotaciones ovinas. *Boletín de la SEA*, (50), 465-469.
- Gómez de Dios M. A., Baeza A., Carrasco G. y Rodríguez S. 2015. Contribución al conocimiento de los Cléridos (Coleoptera: Cleridae) de Almería (Andalucía, España). *Zool. baetica*, 26: 101-144.
- Gómez-Gutiérrez A. 2018. Caracterización genética de los primeros pobladores de los Andes nororientales en Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 41(161), 418-434.
- Goodsell D. S. 2001. The molecular perspective: ultraviolet light and pyrimidine dimers. *The oncologist*, 6(3), 298-299.
- Goodwin W., Hadi S. y Linacre A. 2011. An introduction to Forensic Genetics. *John Wiley & Sons Ltd*. Inglaterra. 680.
- Goodwin W. 2016. Forensic DNA Typing Protocols. *Human Press*. Inglaterra. 298
- Goula M. y Mata L. 2015. Clase Insecta. Orden Hemiptera. Suborden Heteroptera. Ibero Diversidad Entomológica.
- Graterol D. J. 2015. Tesis de doctoral: Relación entre los haplogrupos del ADN mitocondrial y la sordera por cisplatino. Universidad Autónoma de Barcelona. España.
- Guardado-Estrada M., Queipo G., Meraz-Ríos M. y Berumen-Campos J. 2008. Diversidad genética en la población mexicana: utilización de marcadores de ADN. *Revista Médica del Hospital General de México*, 71(3), 162-174.
- Gullan y Cranston. 2005. Insects: An Outline of Entomology. *Blackwell Publishing*, 505.
- Gutiérrez M. M., Stefanazzi N., Werdin González J., Benzi V. y Ferrero A. A. 2009. Actividad fumigante de aceites esenciales de Schinus molle (Anacardiaceae) y Tagetes terniflora (Asteraceae) sobre adultos de Pediculus humanus capitis (Insecta; Anoplura; Pediculidae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(3).

- Curic G., Hercog R., Verselja Z. y Wagner J. 2014. Identification of person and quantification of human DNA recovered from mosquitoes (Culicidae). *Forensic Science International: Genetics* 8: 109-112
- Dettner K. y Peters W. (Eds.). 2011. *Lehrbuch der Entomologie*. Springer-Verlag.
- Hernández H. 2013. Tesis de maestría: Escarabajos de la savia (Coleoptera: Nitidulidae) de Coahuila, México. Universidad Autónoma de Agraria Antonio Narro. México.
- Hernández H., García O., Salazar I., Aguirre L. A. y Sánchez S. R. 2018. Primer registro de *Osmosita colon* (Linnaeus) (Coleoptera: Nitidulidae: Nitidulijae) recolectada en cadáveres de cabrito (*Capra aegagrus hircus* Linnaeus) en Buenavista, Alttillo Coahuila, México. *Insecta Mundi. A Journal of World Insect Systematics*.
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger, G. y Watson R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nature Biotechnology*, 11(9), 1026.
- Hofreiter M., Serre D., Poinar H. N., Kuch M. y Pääbo S., 2001. Ancient DNA. *Nature Reviews Genetics*, 2(5), 353.
- Huerta H. 2007. Datos del material tipo de Culicoides (*Drymodesmyia*) *bakeri* Vargas (Diptera: Ceratopogonidae). *Acta zoológica mexicana*, 23(1), 23-28.
- Huerta H. 2015. Actualización de la Colección de Artrópodos con importancia médica (CAIM), Laboratorio de Entomología, InDRE. Instituto Nacional de Diagnóstico y referencia Epidemiológicos. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyectos No. HA006 CC011, G011. México, D. F.
- Hughes-Stamm S. 2012. Tesis de doctorado: DNA Typing methods of highly degraded samples. *Bond University. Faculty of Health Science and Medicine*. Alemania. 402.
- Ibáñez-Bernal S. 2000. Tesis Doctoral: Los Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. *Universidad Nacional Autónoma de México*. México. 291.
- Ibrahim A. 2015. Impact of adult on forensic use of *Culex pipiens* mosquito (Diptera: Culicidae). *International Journal of Mosquito Reserch* 2 (2);28-32
- Ibrahim A. y Alaifan S. 2015. Forensic markers in human blood drawn from *Culex pipiens* mosquito (Diptera: Culicidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies* 3 (3): 14-19
- Ibrahim A., Alrakan L., Alaifan S. A., Al-Mekhlafi F. y Kassab A. 2015. Temporal Analysis of 16 STR loci in human blood drawn from culicid mosquitoes cultured at different temperatures. *Entomological Research* 45: 268-274

- International Criminal Police Organization (INTERPOL). 2009. Manual de INTERPOL sobre el intercambio y la utilización de datos relativos al ADN. Recomendaciones del grupo de expertos en ADN de INTERPOL. Francia. 117.
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica. 2009. Proyecto de Salud S008-2009-01-114902: Guía de Colecta Entomológica. *CONACYT*
- Jeffreys A. J., Brookfield, J. F., y Semeonoff R. 1985. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature*, 317(6040), 818.
- Jones J.C. y Pilitt D.R. 1973. Blood-feeding behavior of adult *Aedes aegypti* mosquitoes, *Biol. Bull.* 145 (1); 127–139.
- Joseph I., Mathew DG, Sathyan P, Vargheese G. 2011. The use of insects in forensic investigations: An overview on the scope of forensic entomology. *Journal of Forensic Dental Science* 3, 89-91.
- Johnston S., Newman J. y Frappier R. 2003. Validation study of the Abacus Diagnostics ABACard® HemaTrace® membrane test for the forensic identification of human blood. *Canadian Society of Forensic Science Journal*, 36(3), 173-183.
- Johnston E., Ames C. E., Dagnall K. E., Foster J. y Daniel B. E. 2008. Comparison of presumptive blood test kits including hexagon OBTI. *Journal of forensic sciences*, 53(3), 687-689.
- Kai L., Gong-Yin Y., Jia-Ying Z. y Cui H. 2007. Detection of food source by PCR analysis of the gut contents of *Aldrichina grahami* (Aldrich) (Diptera: Calliphoridae) during post-feeding period. *Insect Science* 14; 47-52
- Kreike J. y Kampfer S. 1999. Isolation and characterization of human DNA from mosquitoes (Culicidae). *International Journal of Legal Medicine* 112: 380-382
- Kondakci G. O., Bulbul O., Shahzad M. S., Polat E., Cakan H., Altuncul H. y Filoglu G. 2009. STR and SNP analysis of human DNA from *Lucilia sericata* larvae's gut contents. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2(1), 178-179.
- Li X., Cai J. F., Gou Y. D., Xiong F., Zhang L., Feng H., Meng F. M., Fu Y., Li J. B. y Chen Y. Q. 2011. Mitochondrial DNA and STR analyses for human DNA from maggots crop contents: A forensic entomology case from central-southern China. *Tropical Biomedicine* 28(2): 333–338
- Lehane M. 2005. The biology of blood-sucking in insects. *Cambridge University*. Londres. 321.
- Li R., 2015. Forensic Biology. *CRC Press*. E.U.A 567.
- Limponse K., Corbett A.H. y Doetsch P. 2014. DNA Damage. *John Wiley & Sons*.

- Linville J. G. y Wells J.D. 2002. Surface sterilization of a maggot using bleach does not interfere with mitochondrial DNA analysis of crop contents. *J Forensic Sci* 47(5):1055–9.
- Linville J. G., Hayes J. y Wells J. D. 2004. Mitochondrial DNA and STR analyses of maggot crop contents: effect of specimen preservation technique. *Journal of Forensic Science*, 49, 341-344.
- Lord W., DiZinno J., Wilson M., Budowle B., Taplin D. y Meinking T. 1998. Isolation, Amplification, and Sequencing of Human Mitochondrial DNA Obtained from Human Crab Louse, *Pthirus Pubis* (L.), Blood Meals. *Journal of Forensic Science* 43 (5), 1097-1100.
- Llorente-Bousquets, J., y Ocegueda S. 2008. Estado del conocimiento de la biota, en *Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad*. CONABIO, México, 283-322.
- Lopes R. 2010. Jejenes (Diptera: Ceratopogonidae: Culicoides), luego de la estación de lluvias, en la Reserva de Desarrollo Sostenible Itatupã-Baquiá, Gurupá, Pará, Brasil. *Pan-Amaz Saude* 1(2), 121-130.
- López García J. S., García Lozano I. y Martínez Garchitorena J. 2003. Phthiriasis palpebral: diagnóstico y tratamiento. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, 78(7), 365-374.
- López-Hernández J., Hernández-Rodríguez S., Valdés-Perezgasga M. T., Sánchez F. J., Hernández-Hernández V. y Castillo A. 2016. Chinchas de cama (Hemiptera: Cimicidae) En el área rural de Torreón, Coahuila, México. *Entomología mexicana*, 3:754-758.
- Martín S. C., Valverde L., Palencia L., Quintana J. C. L. y Lizasu A. G. 2011. Análisis de ADN mitocondrial en los restos humanos de la cueva de Santimamiñe (Kortezubi, Bizkaia). *kobie. Bizkaiko Arkeologi Indusketak= Excavaciones Arqueológicas en Bizkaia*, (1), 383-392.
- Martínez M., Remedios M. y Goñi B. 2016. Lista de los Calliphoridae (Diptera: Muscomorpha) del Uruguay. *Bol. Soc. Zool. Uruguay (2ª época)*. 25 (1): 38-51.
- Martín-Vega Daniel, 2011. Skipping clues: Forensic Importance of the family Piophilidae (Diptera). *Forensic Science International* 212: 1-5.
- Mehlhorn H. 2008. Encyclopedia of Parasitology. *Springer, Heidelberg*. Alemania. 860.
- Mendoza D. F., Arbelaez H. M. y Bravo N. C. 2010. Prácticas de laboratorio de biología molecular: su aplicación en genética básica. *Universidad del Rosario*. Colombia. 71.

- Monsalve D. M. 2014. Tesis doctoral: Implicación de las quinasas humanas VRN1 y VRK2 en las rutas de respuestas a daño génico y apoptosis. *Universidad de Salamanca*. España.
- Muhammad A. H., Imran B., Khalid M. y Ansa T. 2017. New distributional records of black scavenger flies (Diptera: Sepsidae) from District Skardu, Gilgit-Baltistan. *Asian J. Agri & Bio.* 5 (2): 51-55.
- Nartshuk E. P. 2009. The character of soldier fly distribution (Diptera, Stratiomyidae) in Eastern Europe. *Entomological review*, 89(1), 46-55.
- Nava-Hernández M., Basurto-Pineda A., Molina-Chávez H. A., Luy-Quijada J. A., Gutiérrez-R. S. I. y Galindo-Miranda N. E. 2008. Determinación de ADN humano en larvas de dípteros colectadas en distintos tejidos. *Entomología Mexicana*, 7: 779-783
- Njau D.G., Muge E. K., Kinyanjui P. W., Omwandho C. O. A. y Mukwana S. 2015. STR analysis of human DNA from maggots fed on decomposing bodies: Assessment of the time period for successful analysis. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 6(3), 261-269.
- Nores R., y Demarchi D. A. 2011. Análisis de haplogrupos mitocondriales en restos humanos de sitios arqueológicos de la provincia de Córdoba/Analysis of mitochondrial haplogroups in human remains from archaeological sites of the province of Córdoba. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 13(1), 43-54.
- Organización Mundial de la Salud, 2017. Enfermedades transmitidas por vectores.
- Ortega-Rosales M., Cortés-Cruz A. G., Vega-Navarrete M. L. y Víctor-Rosas L. J. 2016. Extracción de ADN humano obtenido del tracto digestivo de larvas de *Dermestes maculatus* (De Geer, 1774) (Coleoptera: Dermestidae) alimentadas de tejido cadavérico. *Entomología mexicana* 3:715-721
- Ortloff A., Zanetti N., Centeno N., Silva R., Bustamante F. y Olave A. 2014. Ultramorphological characteristics of mature larvae of *Nitidula carnaria* (Schaller 1783) (Coleoptera: Nitidulidae), a beetle species of forensic importance. *Forensic science international*, 239, e1-e9.
- Pavan W. 2016. Glosario Hablado de Términos Genéticos. National Human Genome Research Institute. <https://www.genome.gov/glossary/>
- Pedraza-Lara C. y Vergara-Pineda S. 2017. El estado del arte de la entomología forense en México. En: García-Castillo Z., M.E. Bravo-Gómez. El estado del arte de las ciencias forenses en México. *Tirant Lo Blanch*. 235-356.
- Pérez M. 2015. Orden Phthiraptera. *Revista IDE@ - SEA, n° 51*: 1-11.

- Perez S. y Wolff M. 2011. Miscidae (Insecta, Diptera): Importancia y diversidad para Colombia. *Boletín del Museo Entomológico Francisco Luís Gallego* 2 n°2: 13-22.
- Pilli E., Agostino A., Vergani D., Salata E., Ciuna I., Berti A., Caramelli D. y Lambiase S. 2016. *Forensic Science International* 266: e71-e78.
- Potter M. 2012. Bed Bugs. *Universidad de Kentucky*. E.U.A. 11
- Prieto L. 2002. Tesis de doctorado: Estudios de polimorfismos de ADN en restos humanos antiguos y muestras forenses críticas: valoración de estrategias y resultados. *Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid*. España. 218.
- Primoran D. y Schanfield M. 2014. Forensic DNA Application. An Interdisciplinary perspective. *Taylor & Francis Group*. E.U.A. 382
- Procuraduría General de la República, 2015. Protocolo para el tratamiento e identificación forense. México. 87.
- Promega. 2018. How do I determine the concentration, yield and purity of a DNA sample?
- Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE). 1998. Principios de Buenas prácticas de laboratorio de la OCDE. Francia. 44.
- QIAamp DNA. 2016. Mini and Blood Mini Handbook. *Qiagen*. 372.
- Ramírez M. E., De Novoa M. A., Náder E. y Monsalvo A. 2014. Manual de prácticas de biología molecular. *Instituto Politécnico Nacional México*. 150.
- Riera M. A., Rojas M. E. y Zapata P. D. 2010. Protocolo de extracción de DNA por salting-out para pequeños volúmenes de sangre. *Revista de Ciencia y Tecnología*, (14), 4-7.
- Robinson W. 2005. Urban insects and arachnids. *Cambridge University*. Inglaterra. 321.
- Rockefort S., Giroux M., Savage J. y Wheeler T. 2015. Key to Forensically Important Piophilidae (Diptera) in the Naearctic Region. *Canadian Journal of Arthropod Identification* 27.
- Romera E., Arnaldos M. I., García M. D. y González-Mora D. 2003. Los Sarcophagidae (Insecta, Diptera) de un ecosistema cadavérico en el sureste de la Península Ibérica. *Anales de Biología* 25: 49-63.
- Rozendaal J.A. 1997. Vector control: Methods for Use by Individuals and Communities, *World Health Organization*. Inglaterra. 7-323
- Rueda-Salazar, A.M. y Cano-Santana Z. 2009. Biodiversidad del Pedregal de San Ángel. *Universidad Nacional Autónoma de México*. México. 171-201
- Ruiz I., Alarcón E., Figueras L., Delacour-Estrella S., Muñoz A., Kotter H., Pinal R. y Lucientes J. 2014. Expansión de los simúlidos (Díptera: Sumiliidae) en España: un nuevo reto para la

- salud pública y sanidad animal. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa (S.E.A.)*, 54: 193–200.
- Roewer L. 2013. DNA fingerprinting in forensics: past, present, future. *BioMed Central*, 4:22.
- Rivers D. y Dahlem G. 2014. The Science of Forensic Entomology. *John Wiley & Sons*
- Salazar A., Sandoval A. y Armendáriz J. 2013. Biología Molecular. *Mc Graw Hill*. México. 99-180
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T.,2003. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold spring harbor laboratory press*. 451-453.
- Sánchez I. y Carles-Tolrá M. 2007. Primera cita del género *Icosta* Speiser para la Península Ibérica (Diptera, Hippoboscidae). *Sociedad Entomológica Aragonesa*, n° 1 40: 226.
- Sanger F., Nicklen S. y Coulson R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (12): 5463-5467
- Schal C., Czado N., Gamble R., Barrett A., Weathers K. y Lodhi K. M. 2018. Isolation, Identification, and Time Course of Human DNA Typing from Bed Bugs, *Cimex lectularius*. *Forensic Science International*. 293, 1-6.
- Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM), 2016. Validation Guidelines for DNA Analysis Methods.
- Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM), 2017. Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing by Forensic DNA Testing Laboratories. 90
- Scudder y Cannings, 2006. The Diptera Families of British Columbia. *University of British Columbia*. Canadá. 158.
- Shewale J. G. y Liu R. H. (Eds.). 2013. Forensic DNA Analysis: Current Practices and Emerging Technologies. *CRC Press*. E.U.A. 432
- Sikes, D. S., Stephen T. y Stewart B. P. 2005. Silphidae Latreille 1807. Large carrion and burying beetles. Version 07 February 2005 (under construction). <http://tolweb.org/Silphidae/9620/2005.02.07> in The Tree of Life Web Project.
- Smith, K. G., 1986. *A manual of forensic entomology*. Inglaterra. 205.
- Sorensen A., Rahman E., Canela C. y Gangitano D. 2016. Preservation and rapid purification of DNA from decomposing human tissue samples. *Forensic Science International: Genetics* 25, 182–190

- Spitaleri S., Romano C., Di Luise E., Ginestra E. y Saravo L. 2006. Genotyping of human DNA recovered from mosquitoes found on a crime scene. In *International Congress Series* (Vol. 1288, pp. 574-576). *Elsevier*.
- Stevens L., Dorn P. L., Schmidt J. O., Klotz J. H., Lucero D. y Klotz S. A. 2011. Kissing Bugs. The Vectors of Chagas. *Elsevier Ltd. 75*: 169-192. DOI: 10.1016/B978-0-12-385863-4.00008-3
- Szalanski A. L., Austin J. W., McKern J. A., McCoy T., Steelman C. D. y Miller D. M. 2006a. Time course analysis of bed bug, *Cimex lectularius* L., (Hemiptera: Cimicidae) blood meals with the use of polymerase chain reaction. *J. Agric. Urban Entomol*, 23(4), 237-241.
- Szalanski A., Austin J., McKern J., Dayton S., Miller D. y Gold R. 2006b. Isolation and Characterization of Human DNA from Bed Bug, *Cimex Lectularius* L., (Hemiptera: Cimicidae) Blood Meals. *J. Agric. Urban Entomol. Vol. 23, No. 3*; 189-194
- Tamay de Dios L., Ibarra C. y Velasquillo C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad 2* (2), 70-78.
- Thomson T. y Black S. 2007. Forensic Human Identification. An Introduction. *Taylor & Francis Group*. E.U.A. 499
- Triplehorn C., Johnson N., Borror D. 2005. Borror and DeLong's introduction to the study of insects. *Brooks/Cole, Cengage Learning*.
- Uribe S., Ramón F., y Giraldo P. A. 2004. Principios de entomología forense. Colombia. 102.
- Uribarren T. 2018. Enfermedad de Chagas. Departamento de Microbiología y Parasitología- Recurso en Parasitología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Velasco R. 2005. Marcadores moleculares y la extracción de ADN. *Dialnet 3*, 14-18.
- Velázquez L. P. A., Martínez M. D. C. A. y Romero, A. C. 2014. Extracción y purificación de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, 1*.
- Vidal L. y Vargas C. 2014. Medicion de la absorbancia óptica de soluciones acuosas mediante la instrumentación virtual y el control. *Scientia et Technica Año XIX, Vol. 19, No 1*: 49-53.
- Villeda M. P., Barrera H., González M. J. y Lara J. A. 2008. Histología del tubo digestivo de *Dythemis velox* (Libellulidae: Odonata). *Revista de Zoología*, 19.
- Yount L. 2007. Forensic science: from fibers to fingerprints. *Chealsea House*. Nueva York. 125.
- Wanick P. J. 2009. The digestive system of human lice: current advances and potential applications. *Physiological entomology*, 34(3), 203-210.

- Weirauch C. y Gerry A. 2016. Bed Bugs, *Cimex lectularius*, *Cimex hemipterus* and *Leptocimex boueti* (Heteroptera: Cimicidae). *University of Californis, Riverside*.
- Wells J., Introna F., Di Vella G., Campobasso C., Hayes J. y Sperling F. 2001. Human and Insect Mitochondrial DNA Analysis from Maggots. *Journal Forensic Science* 46 (3): 685-687.
- Zehner, R., Amendt y Krettek. 2004. STR typing of human DNA from fly larvae fed on decomposing bodies. *J. Forensic Sci.* 49: 1-4.
- Zorrilla A. E., Eirez M. y Izquierdo M. 2004. Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 23(1), 51-57.
- Zorrilla-Vaca A., Silva-Medina S. M. y Escandón-Vargas K. 2015. Bedbugs, *Cimex* spp.: their current world resurgence and healthcare impact. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 5 (5):342-352.