

ENTOMOLOGÍA MOLECULAR FORENSE

MARIAN M. DE PANCORBO¹, RODRIGO RAMOS²,
MARTA SALOÑA³, PAULA SÁNCHEZ⁴

Resumen: La entomología forense (EF) es una herramienta científica aplicada al estudio de la sucesión de insectos o artrópodos cuyo principal objetivo es establecer la estima del intervalo *post-mortem* (PMI). Además, la EF resulta de ayuda para determinar «donde» se ha producido una muerte, lo que sin duda es relevante para el Derecho, ya que concreta el órgano jurisdiccional que será competente (art. 15 LECr).

Es generalmente imposible establecer la especie de dípteros en fase de huevo o pupa mediante estudios morfológicos. Sin embargo, la EF molecular basada en el análisis de los genes citocromo oxidasa I y II mitocondriales, ayuda a resolver este problema. En este trabajo, se muestra que otro gen, citocromo b, de uso habitual en la determinación de especies de vertebrados por parte de los laboratorios forenses, puede ser también de interés en la identificación de las especies entomológicas.

Palabras clave: Entomología forense. Identificación molecular de especies. Citocromo b.

Abstract: Forensic Entomology is a scientific tool applied to arthropod or insect succession which principal objective is to establish death data by the estimation of *post-mortem* interval (PMI). Dating a death is fundamental for Law, but also where that death has happened is important not only for sear-

¹ Catedrática de Biología Celular y Responsable del Servicio General de Investigación Genómica: Banco de ADN. Universidad del País Vasco, UPV/EHU.

² Licenciado en Biología y en Ciencia y Tecnología de la Alimentación. Dpto. de Zoología y Biología Celular Animal. Universidad del País Vasco UPV/EHU.

³ Profesora Titular de Zoología. Dpto. de Zoología y Biología Celular Animal. Universidad del País Vasco UPV/EHU.

⁴ Licenciada en Derecho. Universidad del País Vasco UPV/EHU.

ching evidences, also to determinate which Judge or Court would be competent.

It is almost impossible to establish morphologically diptera kind when they still are on pupa phase. Forensic molecular entomology based on the analysis of mitochondrial cytochrome oxidase subunits I and II genes is of great utility. In this work we shown that another gene, cytochrome b, usually applied on vertebrate species determination by forensic laboratoires, can be also interesting for determinate entomologic species.

Key words: Forensic entomology. Molecular identification of species. Cytochrome b.

I. INTRODUCCIÓN

La entomología forense o médico-legal es el estudio de los insectos asociados a un cuerpo muerto. Bergeret, en 1855, fue el primero en aplicar la entomología a la determinación de la fecha de la muerte. Estos estudios sirvieron de punto de partida a Brouardel, quien solicitó el concurso de Mégnin para ampliarlos (1). Mégnin (2), en su libro «La faune des cadavres» (1894), estableció la base de la entomología que consiste en el registro de la sucesión, o diferentes «oleadas», de insectos que colonizan un cuerpo. Desde entonces, y durante la primera mitad del siglo xx se han realizado diversos estudios que han ido determinando la evolución de la entomología forense. Entre ellos cabe destacar los que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

Evolución de la entomología forense hasta la década de 1980 (3,4)

Straug (1912)	«El comportamiento biológico de las diferentes especies de insectos no está suficientemente estudiado como para alcanzar conclusiones respecto al tiempo de la muerte del organismo colonizado»
Meixner (1922)	Duración del desarrollo larvario y destrucción de los cadáveres.
Bianchini (1929)	Lesiones <i>postmortem</i> producidas por los insectos
Pietrusky y Leo (1929)	El desarrollo de los insectos se encuentra influido por factores externos, principalmente, por las condiciones climáticas.
Merkel (1925, 1930)	Composición de las sucesiones de especies, oviposición y estimación del intervalo <i>post-mortem</i> .
Walcher (1933)	Profundización de las larvas en los tejidos.

Tabla 1 (Cont.)

Schranz (1935)	Desarrollo de las especies entomológicas forenses, sin considerar la importancia de la temperatura.
Weimann (1940)	Datos sobre el desarrollo de especies de importancia forense, influencia de la temperatura en el desarrollo y discusión sobre la oviposición nocturna.
Bequaert (1945)	Entomofauna cadavérica e intervalo <i>post-mortem</i>
Leclercq (1949-1960)	Aplicación de la entomología forense
Schönberg (1951)	Accesibilidad al cadáver y su influencia en la estima del periodo <i>post-mortem</i> .
Green (1951)	Dispersión larvaria.
André (1951)	Desarrollo larvario en función de la temperatura y su relación con la estima del periodo <i>post-mortem</i> .
Wagner (1960)	Influencia de las sustancias químicas en el desarrollo de los insectos necrófagos o entomotoxicología.
Berg (1975)	Señala las aberraciones que se producen en el cálculo del intervalo <i>post-mortem</i> basado en la colonización del cadáver por insectos, si bien la entomología es de interés para realizar estimas aproximadas.
Reiter (1980)	Estudio del desarrollo de especies de dípteros de importancia forense

La entomología forense es una herramienta científica aplicada al estudio de la sucesión de insectos o artrópodos en la escena de un crimen o de una muerte accidental o natural (5), cuyo principal objetivo es establecer la data de la muerte mediante la estima del intervalo *post-mortem* (PMI).

Un cuerpo es un lugar muy atractivo para los insectos, puede considerarse un «punto caliente» en un ecosistema (6). Un cuerpo en descomposición es un sustrato en rápido cambio en el que se van sucediendo diversas especies de insectos. La fauna de artrópodos encontrada en los cuerpos en descomposición es selectivamente atraída hacia ellos en momentos determinados, ya que muchos de estos insectos prefieren una etapa definida de la descomposición. Parece posible que la actividad de una especie acondicione el sustrato para las que le siguen, de manera que se originan complejas y dinámicas comunidades de especies necrófagas y sus predadores, parásitos y parasitoides. Esta sucesión de especies es la principal herramienta en la datación de la muerte o estima del PMI.

La estimación del PMI basada en la sucesión de las especies de la entomofauna cadavérica requiere el conocimiento de las especies y la estimación de los tiempos de desarrollo según las características biogeográficas del lugar donde se halle el cadáver.

Marian M. de Pancorbo, Rodrigo Ramos, Marta Saloña y Paula Sánchez

Como señalan Arnaldos et al. (2005) (7), cada grupo de insectos artrópodos juega un papel determinado en los diferentes estadios de descomposición de la materia orgánica y pueden clasificarse en una división particular según los hábitos de alimentación de sus miembros. La clasificación habitual de sarcosaprófagos los divide en cinco grupos ecológicos distintos: necrófagos, los primeros en llegar y colonizar el cuerpo; necrófilos, se alimentan de los necrófagos por predación o parasitismo; omnívoros, se alimentan del cuerpo y de la fauna asociada; oportunistas, usan el cuerpo como refugio, fuente de calor, etc.; y accidentales, cuya presencia es debida a la casualidad.

En general, necrófagos, necrófilos y omnívoros son los más importantes desde la perspectiva forense (figura I).

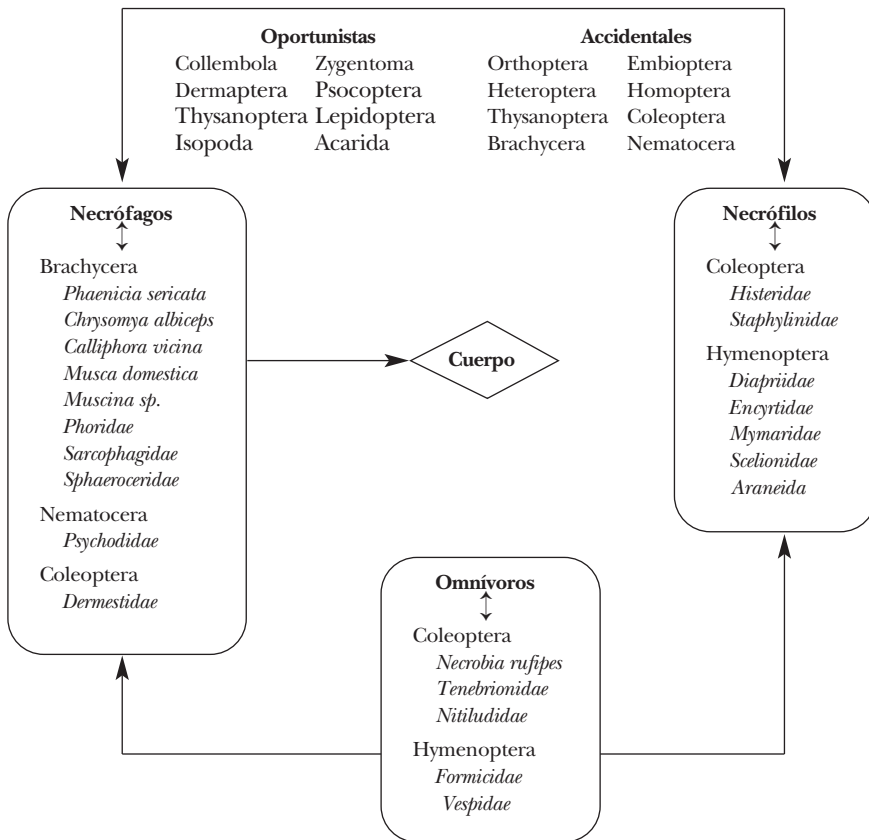


Figura I. Clasificación de la entomofauna sarcosaprófaga en relación con sus hábitos alimenticios; modificado de Arnaldos et al. 2005 (7).

Los rápidos y continuos cambios en el microsistema cadavérico no permiten alcanzar un equilibrio entre las comunidades animales; se produce por tanto una serie de sucesiones faunísticas que puede ser de ayuda para determinar cuándo y dónde ocurrió la muerte.

II. DETERMINACIÓN DE LA DURACIÓN DEL INTERVALO *POST-MORTEM*

El intervalo *post-mortem* (PMI) equivale al tiempo transcurrido entre la muerte y el descubrimiento del cadáver, o también, al periodo de tiempo que ha estado un cadáver expuesto al ambiente.

La observación de los insectos que colonizan un cuerpo proporciona dos métodos para determinar el tiempo transcurrido desde la muerte. El primero consiste en estimar la edad de las larvas y la tasa de desarrollo. El segundo método se basa en la sucesión de las especies de insectos que participan en la descomposición del cuerpo. El primero de estos métodos se suele utilizar durante las primeras fases de la descomposición, donde intervienen una o unas pocas especies de insectos, particularmente dípteros. Las estimas en este caso se basan en el grado de desarrollo de las especies implicadas y su comparación con las curvas de crecimiento obtenidas en condiciones biogeográficas similares. El segundo método se utiliza en estadios más avanzados de la descomposición y se basa en la comparación de la fauna hallada en el cuerpo con patrones de sucesión faunística típicos del hábitat donde se haya encontrado el cadáver. Este método tiene también en cuenta las tasas de desarrollo de las especies que intervienen en la sucesión para poder llegar a una estima del PMI. Por tanto, la identificación de las especies, el conocimiento de sus ciclos de vida, la duración de cada etapa según la temperatura y otros factores abióticos, son datos necesarios para determinar el PMI.

II.1. EDAD DE LAS LARVAS Y TASA DE DESARROLLO

Las moscas en estadios inmaduros y adultos son unos de los invertebrados primarios principales consumidores de materia orgánica animal en descomposición que se desarrollan a través de un ciclo de vida establecido y a una velocidad predecible, basada principalmente en la temperatura. Por tanto, si se conoce la especie, la temperatura y el estadio del insecto, resulta posible determinar el periodo que los insectos llevan colonizando un cuerpo y por tanto, el tiempo mínimo transcurrido desde la muerte.

Las moscas atraídas por los cadáveres depositan huevos que eclosionan tras un periodo de tiempo predecible en larvas de 1^{er} estadio. Estas delgadas larvas se alimentan de proteína líquida durante un tiempo y después mudan a la forma de larvas de 2^o estadio, que se alimentan durante otro periodo y posteriormente se transforman en larvas de 3^{er} estadio o etapa

Marian M. de Pancorbo, Rodrigo Ramos, Marta Saloña y Paula Sánchez

final. Los insectos en esta fase se alimentan vorazmente. Después abandonan la fuente de comida en busca de un lugar seco y seguro para pupar, lo que ocurre cuando las larvas completan su desarrollo, o la fuente de alimento se agota. Las larvas se alejan de la fuente de comida para buscar lugares adecuados a la pupación, un proceso conocido como dispersión de las larvas post-alimentación. Fuera del animal, la pupa forma una cubierta externa y tiene lugar la metamorfosis. Después de unos cuantos días, emerge la mosca adulta y el pupario vacío es la evidencia de que ha ocurrido este ciclo.

El tiempo de desarrollo varía según la temperatura. Salvo raras excepciones, los insectos despliegan su actividad normal entre los 5°C y los 28-32°C. En el rango de 1-4°C suelen entrar en letargo del cual salen con facilidad en cuanto sube la temperatura. Por debajo del punto de congelación se produce la muerte. Por encima del límite superior del rango de temperatura, despliegan gran actividad, pero mueren cuando se alcanzan valores límites. Así, el desarrollo se acelera con temperaturas elevadas y se hace más lento con temperaturas bajas, siendo estas últimas las que condicionan el desarrollo cuando se combinan ambas en climas con ritmos circadianos extremos.

II.2 MÍNIMO INTERVALO *POST-MORTEM*

Las estimas de los intervalos *post-mortem* tienen en cuenta la edad de las larvas de moscas en un cuerpo y se derivan de curvas estandarizadas del desarrollo larvario. Estas curvas son generadas mediante estudios de crecimiento de larvas, generalmente alimentadas con hígado, en un rango de diferentes temperaturas. Sin embargo, es posible que las especies, u órganos, con que se alimentan las larvas, puedan alterar significativamente la tasa de crecimiento.

El estudio de Clark et al. (2006) (8) comparó el desarrollo de *Lucilia sericata* (Meigen) según su alimentación fuera en pulmón, hígado y corazón de vacas y cerdos. Las larvas crecieron de forma significativamente más rápida y dieron lugar a adultos más grandes cuando se alimentaron de víscera de cerdo, en comparación con las alimentadas con vísceras de vaca. Las larvas alimentadas con pulmón completaron su alimentación y abandonaron la fuente 31h antes, y crecieron 2 mm más, que cuando se alimentaron con hígado. La estructura del tejido, íntegra o licuada, no tuvo influencia.

Estos resultados resaltan la importancia de registrar la posición de las larvas cuando son recogidas de un cuerpo, ya que los diferentes tejidos pueden afectar al tiempo del desarrollo larvario y por tanto a la estima del PMI que se deduce de este factor. Además, debiera tenerse extremo cuidado cuando se extrapolan las tasas de desarrollo basadas en curvas estándar de larvas alimentadas en un medio único, especialmente cuando se han obtenido de larvas alimentadas con hígado.

La comprensión de la dispersión larvaria post-nutrición puede ser útil para determinar el PMI de los cadáveres humanos, particularmente porque este intervalo puede ser subestimado si no se tiene en cuenta la dispersión de las larvas más viejas. Gomes et al. (2005, 2006) (9, 10) han investigado la dispersión de *Chrysomya albiceps* empleando un área circular para permitir la dispersión radial de las larvas desde el centro. Los resultados mostraron una correlación positiva entre profundidad de las larvas en el cuerpo y distancia, y una correlación negativa entre distancia y peso de las pupas. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de tener en cuenta la dispersión larvaria para introducir factores de corrección en la estima del intervalo *post-mortem*.

De lo anteriormente expuesto se deduce la importancia de la estima de la edad de las larvas. Gaudry et al (2006) (11) han abordado este problema mediante el análisis de la cantidad y naturaleza de hormonas ecdisoides presentes en las pupas de *Protophormia terranova*, para determinar si podían correlacionarse con la edad de las pupas halladas en los cuerpos y por tanto, podían dar información sobre el PMI. Estudiaron pupas frescas y otras desecadas experimentalmente. Observaron un pico de ecdisteroides entre 36-96h después de la pupación en animales frescos que no apareció en animales experimentalmente desecados. Sin embargo, la naturaleza de las hormonas ecdisteroides no fue informativa, ya que el principal componente es 20-hidroxiecdisona, sin especificidad de edad pupal. Así, la cuantificación de ecdisteroides puede ser utilizada, dentro de ciertos límites, para estimar la edad de las pupas, y por tanto, podría dar indicios sobre el PMI.

Los cuerpos de personas socialmente aisladas pueden permanecer en sus domicilios sin ser descubiertos durante prolongados periodos de tiempo. Ocasionalmente, el cuerpo permanece "in situ" un periodo suficientemente largo como para alcanzar un estado de esqueletización parcial o completa. La investigación de estos casos es compleja por la degradación y contaminación de la evidencia (12). La entomología, mediante el estudio de la sucesión de insectos colonizadores, puede contribuir a estimar el tiempo mínimo de la muerte y/o la estación en la que ocurrió. El examen entomológico puede también confirmar si un cuerpo ha permanecido «in situ» durante un considerable periodo.

La evaluación del PMI se basa en tablas de sucesión faunística en cadáveres humanos. La interpretación de esta sucesión proporciona información para determinar los límites máximo y mínimo del PMI. Los primeros intentos de establecer la data de la muerte en estimas basadas en la sucesión de especies de la entomofauna cadavérica se debieron a Mégnin y Johnston y Villeneuve en el siglo XIX. Sus tablas de sucesión faunística se utilizan todavía, si bien con cambios propuestos por algunos autores más recientes que consisten en la corrección de los periodos en función de la región geográfica, la latitud, el ecosistema, clima, etc.

Marian M. de Pancorbo, Rodrigo Ramos, Marta Saloña y Paula Sánchez

La entomología forense se encuentra bien desarrollada en Gran Bretaña y también en el centro y norte de Europa. Por ello, las tablas de sucesión faunística se refieren a especies de este continente y los ciclos de vida de los insectos son calculados según los promedios de temperaturas de estos lugares. Sin embargo, los estudios llevados a cabo en determinadas áreas biogeográficas pueden no ser siempre extrapolables a otras áreas cuyas condiciones ambientales son específicamente diferentes. En este sentido, los trabajos de Turchetto y Vanin (2004) (6) y de Arnaldos et al. (2001) (13) en el área mediterránea, son de gran interés para aumentar la precisión de las estimas del PMI en el continente europeo.

En el área mediterránea de la Península Ibérica, Arnaldos et al. (2005) (7) han reunido datos procedentes de trabajos experimentales. Sus resultados señalan que Calliphoridae y Muscidae son los Diptera más abundantes. Los más importantes desde el punto de vista forense son *Phaenicia sericata* (Meigen), *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy y *Chrysomya albiceps* (Wiedemann), que mostraron una clara preferencia estacional, *P. sericata* (primavera), *C. albiceps* (otoño) y *C. vicina* (invierno), siendo también más frecuente *Musca domestica* en verano y otoño, pero ausente en invierno. Por tanto, la presencia, o ausencia, de estas especies puede contribuir a determinar la datación estacional de la muerte.

Los insectos necrófagos, que aparecen según una secuencia predecible, son los más importantes para establecer el tiempo de la muerte. Los necrófilos y los omnívoros pueden aparecer en cualquier momento, y permanecer durante todas las etapas de la descomposición, por lo que resultan de menos utilidad para la datación, sin embargo, también pueden proporcionar gran cantidad de información referente al propio cuerpo, por ejemplo, posibles manipulaciones y/o datos de las condiciones peri-mortem.

La mayor parte de las tablas de sucesión de la entomofauna cadavérica han sido obtenidas utilizando modelos experimentales animales, principalmente pollo y cerdo, dada la imposibilidad de utilizar cadáveres humanos para este fin. Arnaldos et al. (2005) (7) han comparado los resultados obtenidos del estudio experimental de las sucesiones con los observados en casos forenses reales, llegando a la conclusión de que los datos experimentales derivados de modelos experimentales con aves para establecer la dinámica de la comunidad de artrópodos asociada con los cuerpos, pueden considerarse representativos de las circunstancias que concurren en un cadáver humano, y pueden servir como una base inicial válida de la fauna sapsrosacrófaga en el área de referencia.

II.3 CONTAMINACIÓN

Las pupas y puparios pueden contaminar las muestras entomológicas en la escena del crimen, tanto si son de origen humano como de origen animal o de otro material orgánico en descomposición. Estos contami-

nantes pueden alargar erróneamente las estimas del intervalo *post-mortem* cuando no hay pupas o puparios genuinamente asociadas con el cuerpo.

La sospecha de contaminación puede ser debida a la falta de actividad de los puparios recogidos en las proximidades del cuerpo, la presencia de restos animales próximos o la contaminación del suelo por restos animales previos, e incluso por insectos del mortuorio (12).

III. ENTOMOFAUNA Y MIASIS

La miasis es la infestación de vertebrados vivos con larvas de dípteros que, durante al menos un periodo de tiempo, se alimentan de tejidos muertos o vivos, fluidos corporales o el alimento ingerido por el huésped. Esto puede ocurrir cuando una lesión o la presencia de excrementos hacen de los tejidos vivos una fuente de atracción para los insectos.

Las «moscas que causan miasis» es un término genérico que engloba especies de numerosas familias de dípteros, entre las cuales Calliphoridae y Oestridae son las más importantes. Las diferentes especies causantes de miasis pueden ser clasificadas como saprófagas (especies que viven libres), facultativas o parásitos obligados y se caracterizan por la habilidad de sus larvas para desarrollarse en tejidos animales.

Muchas de estas moscas son de gran importancia médica y veterinaria, ya que actúan como reservorios de pestes por insectos y vectores de patógenos, además de ser consideradas evidencias de importancia legal en el campo de la entomología forense (14).

La miasis suele ocurrir en los animales salvajes, pero también puede tener lugar en animales domésticos e incluso en humanos. En los animales domésticos da lugar a importantes daños económicos, por ejemplo cuando ataca a las ovejas. La relevancia forense de la miasis se debe que en algunos casos su causa puede ser la negligencia deliberada o el maltrato.

En lo que se refiere a las especies domésticas, un estudio de Anderson y Huitson (2004) (15) en Columbia Británica, ha mostrado que los perros son los animales más frecuentemente atendidos por miasis en las clínicas veterinarias, seguidos por conejos y en último lugar gatos. Esto puede ser debido a las diferencias en los hábitos de la higiene de estos animales, ya que la mayoría de los casos de miasis se deben a una herida no cuidada, al pelo apelmazado o a restos de excrementos, lo que indica que el cuidado del propietario tiene un importante papel para prevenir la miasis.

En casos de negligencia o maltrato deliberado, el análisis entomológico puede llegar a ser una poderosa evidencia para datar el periodo de tiempo de abuso o negligencia. Hay dos aspectos que deberían examinarse en la búsqueda de insectos para estimar el tiempo transcurrido desde la colonización. La primera es el propio animal: los huevos y larvas de 1^{er}, 2^o

Marian M. de Pancorbo, Rodrigo Ramos, Marta Saloña y Paula Sánchez

y 3^{er} estadio pueden hallarse sobre y dentro de las heridas. En el caso de que las larvas no hayan sobrepasado el 3^{er} estadio se encontrarán en el animal, pero cuando han superado esta etapa, es necesario inspeccionar los lugares próximos o favoritos del animal para buscar larvas post-alimentación y pupas; si el animal tiene un lugar para dormir, debería examinarse ese sitio para buscar especímenes más viejos. Cuando la miasis ha ocurrido durante un periodo más largo que el ciclo vital de los insectos pueden hallarse pupas vacías que se distinguen porque presentan un orificio en un extremo, lo que las diferencia de las pupas que contienen insectos en metamorfosis.

En los seres humanos, la miasis ocurre cuando hay negligencia en el aseo e incide en los individuos muy jóvenes o muy ancianos, así como otros que no tienen la capacidad de asegurar su higiene básica o el cuidado de sus heridas. En casos de negligencia o maltrato deliberado, el análisis entomológico puede llegar a ser una poderosa evidencia para datar el periodo de tiempo de abuso o negligencia.

La miasis puede ocurrir justo antes de la muerte. Sukontason et al. (2005) (16) han reportado el caso de un hombre infestado por dos especies, *Chrysomya megacephala* y *Chrysomya rufifacies* (Macquart), en tres estadios de desarrollo, próximas a una severa lesión tumoral. La presencia de tres estadios, de aproximadamente cinco días, en el momento de la muerte pone de manifiesto una potencial complicación y error en la estimación del PMI debido a la concurrencia de miasis, por lo que se debe tener en cuenta la predisposición a infestación por moscas. Las heridas de las personas vivas son una diana potencial para las mismas moscas que viven o se alimentan de los cadáveres. Esto puede conducir a complicaciones en la estima del PMI, pero también conduce a información adicional que podría ser de valor para determinar malos tratos o negligencia en el cuidado (17).

La negligencia en el cuidado de los ancianos es un severo problema en las sociedades envejecidas. Desde el punto de vista jurisdiccional, es muy difícil establecer si un cuidador es culpable o no de negligencia. La entomología forense puede contribuir a esclarecer la dinámica y falta de cuidados recibidos por una persona mediante la investigación de los insectos que rodean al cadáver. Asimismo, la entomología forense puede ayudar a exculpar a los cuidadores al poder determinar si la infestación de larvas de una persona ha ocurrido durante un intervalo normal de no-visitas.

En los casos de miasis activa, la estima de que las larvas tienen 2 o 3 días es probablemente una subestima, ya que los insectos más viejos pueden no haber sido recolectados ya que abandonan el cuerpo para pupar. Habitualmente esto no es un problema en casos humanos ya que el área que rodea a la víctima suele ser cuidadosamente investigada en busca de otros indicios, así resulta posible descubrir y medir las larvas pre-pupales, las pupas y los adultos. En muchos casos de miasis, la entomología forense

es capaz de indicar solamente que los insectos ovopositaron un mínimo de tres días antes del examen; por tanto, la herida o la negligencia ocurrieron durante un periodo mínimo de tres días. Es probable que el examen de una herida permita afinar mejor el tiempo, sin embargo, la estima será función de la experiencia personal del médico, lo que resulta difícil de defender en el proceso jurisdiccional; la entomología forense, por otro lado, proporciona una fuerte evidencia científica que puede ser defendida con éxito. De esta manera, la evidencia entomológica puede ser muy útil para corroborar la estimación realizada por el personal sanitario.

IV. APLICACIONES SANITARIAS

En la mayoría de los casos, los insectos que colonizan a una persona viva se alimentan de los tejidos muertos, pero no de los vivos. La habilidad de tales insectos para eliminar el tejido muerto ha sido usada en medicina desde hace siglos. La popularidad de la terapia con larvas declinó con la llegada de los antibióticos, pero durante los últimos 20 años su uso ha resurgido y se considera una alternativa viable a la cirugía, por ejemplo en la limpieza de heridas gangrenadas o del tejido necrosado de los tumores (16). *Lucilia illustris* y *Phaenicia sericata* son especies de moscas comunes y ubicuas en casos forenses que implican tanto humanos como animales. *Lucilia illustris* es considerada una especie más rural y una de las primeras implicadas en la miasis de las ovejas. *Phaenicia sericata* se considera más frecuente en las especies urbanas. Tanto *L. illustris* como *P. sericata* son utilizadas en terapia de eliminación de tejidos necrosados. *Curterebra jellisoni* es otra especie causante de miasis comúnmente encontrada en animales salvajes, particularmente conejos, que se alimenta tanto de tejido muerto como vivo (15).

V. APLICACIONES JURÍDICAS

Determinar «cuándo» se ha producido una muerte es sin duda relevante para el Derecho, pero de igual modo lo es determinar «dónde»; no exclusivamente para la búsqueda de fuentes de prueba, como se tiende a creer, sino también para determinar qué órgano jurisdiccional será competente, ya que «cuando no conste el lugar en que se haya cometido una falta o delito será competente para conocer de la causa el Juez o Tribunal del término municipal, partido o circunscripción en que se hayan descubierto pruebas materiales del delito» (Artículo 15 de la Ley de Enjuiciamiento Criminal (LECr) (18).

En lo que se refiere a la búsqueda de fuentes de prueba, resulta fundamental la tarea del Juez Instructor del examen del *cuero del delito*, debiendo entender por tal, como señala el Artículo 335 LECr (18), la descripción detallada del estado y circunstancias de la persona o cosa objeto del delito, ya que puede llevar a hallar larvas y pupas que hagan presumir si el

cuerpo ha sido trasladado (e incluso de dónde y en qué momento posterior a la muerte en función de los insectos encontrados) además del PMI. Esta información será complementada mediante la práctica preceptiva de autopsia, cuando la instrucción tuviere lugar por causas de muerte violenta o sospechosa de criminalidad, aun cuando por la inspección exterior pueda presumirse la causa de la muerte (art. 343 LECr) (18). El problema puede surgir en el caso contemplado en el art. 770.4 LECr (18), que recoge el supuesto de que se hubiere producido la muerte de alguna persona y el cadáver se hallare en la vía pública, en la vía férrea o en otro lugar de tránsito: en estos casos se ha de proceder al traslado del cadáver de modo urgente, para poder reestablecer el paso interrumpido, obteniendo fotografías y señalando el lugar y posición del cuerpo. En estas circunstancias, se plantea la duda de si por este alzamiento precipitado se perdería la referencia de las pupas y larvas, debido a la dificultad de distinguir los ejemplares relevantes de otros no relevantes desde el punto de vista de la entomología forense. Por ello, además de la descripción del cuerpo del delito y de la autopsia, suele recurrirse al auxilio pericial (Artículo 456 LECr: «El Juez acordará el informe pericial cuando, para conocer o apreciar algún hecho o circunstancia importante en el sumario, fuesen necesarios o convenientes conocimientos científicos o artísticos») (18).

Además, la entomología forense tiene relevancia en otros ámbitos jurídicos. Puede suceder, por ejemplo, que la miasis aparezca en animales domésticos, en cuyo caso se podría recurrir al art. 337 del Código Penal: «*Los que maltrataren con ensañamiento e injustificadamente a animales domésticos causándoles la muerte o provocándoles lesiones que produzcan un grave menoscabo físico serán castigados con la pena de prisión de tres meses a un año e inhabilitación especial de uno a tres años para el ejercicio de profesión, oficio o comercio que tenga relación con los animales*» (19). En primer lugar, hay que aclarar que ese maltrato puede ser producto tanto de una conducta activa, como de una omisión; siempre que la miasis sea producto de la falta de observancia de los deberes inherentes a la condición de dueño (y por tanto responsables de la salud de los animales), podría encajarse dicha conducta en el citado tipo delictual. Pero no es necesario ser responsables penales para que el Derecho imponga ciertos deberes: existe, además, una responsabilidad civil por los daños que, en este caso, la aparición de la miasis provoque, así como por el perjuicio que esa nueva situación origine (que puede traducirse económicamente en un lucro cesante). Esta responsabilidad civil puede derivarse de la existencia de una relación contractual entre el causante del daño y aquel que sufre el perjuicio (responsabilidad contractual). Pero la existencia de una relación previa no es *condictio sine qua non*, ya que también se amparan los perjuicios causados fuera de la misma mediante la figura de la responsabilidad extracontractual, siendo ambas variantes de la responsabilidad civil acumulables a la penal en el caso de que concurran.

En lo que respecta del ámbito sanitario el Código Penal español también recoge, en los arts. 618 y 619 (19), una responsabilidad penal por omisión de auxilio o asistencia a personas de edad avanzada, menores e

incapaces, así como por el incumplimiento de los deberes familiares, tipificándolos como falta. Existe en torno a estas personas un deber de cuidado (entre otros muchos deberes), debiendo entender como tales los más elementales que necesita una persona, que por supuesto incluyen el aseo y la asistencia sanitaria. Por ello, la mera inactividad del sujeto responsable conlleva una sanción, sin necesidad de que la falta de actividad produzca un daño; eso sí, dicha omisión debe ser dolosa (es decir, debe existir una intención de dejar de asistir a la persona, previendo que ello pueda derivar en un daño). Según Miguel Armenteros León, Fiscal de la Audiencia Provincial de Pontevedra, la negligencia en el cuidado de una persona de edad avanzada no encajaría en este tipo. Sin duda puede resultar fundamental el estudio entomológico de la víctima o del cadáver, así como del entorno, para determinar el tiempo de inasistencia, lo que permite calificar dicha omisión como negligente o como dolosa, con la correspondiente existencia o no de responsabilidad penal. Eso sí, en caso de que llegue a materializarse un daño por dicha ausencia de cuidado, las faltas a las que se hace mención serán absorbidas por el tipo delictivo en el que pueda enmarcarse dicho daño, generalmente el delito del Artículo 226 CP, de consecuencias mucho más gravosas (19).

VI. ENTOMOLOGÍA MOLECULAR

A la vista de la importancia de la fauna entomológica cadavérica para ayudar a establecer el PMI, el lugar, e incluso el lugar y la manera de la muerte (20-24), es de crucial importancia, en el curso de la investigación de los hechos, la determinación precisa de las especies de las larvas halladas en los cadáveres, así como de las pupas que los rodean (25). La principal representación de los dípteros que intervienen en la descomposición cadavérica está constituida por larvas en las que la identificación específica mediante su morfología resulta de gran dificultad. Asimismo, es generalmente imposible establecer morfológicamente la especie de dípteros en fase de huevo o pupa, por lo que es necesario esperar a la eclosión para proceder a la clasificación taxonómica. Incluso en moscas adultas, la identificación exacta de la especie es complicada por la similitud anatómica/morfológica entre diferentes especies pertenecientes al mismo género.

La diferenciación basada en caracteres morfológicos de los ejemplares de la entomofauna cadavérica suele resultar todavía más difícil de llevar a cabo, debido a un amplio rango de factores: (1) especímenes dañados o carentes de caracteres taxonómicos; (2) ligeras diferencias frecuentes en estadios inmaduros tales como huevos o larvas (22,26); (3) recolección de insectos muertos (27-29); (4) ausencia de larvas para criar, puparios vacíos o larvas muertas y necrosadas como único material de recolección disponible.

La identificación de especies en estos casos, donde los métodos morfológicos fracasan, ha sido intentada mediante otros procedimientos. Los

Marian M. de Pancorbo, Rodrigo Ramos, Marta Saloña y Paula Sánchez

primeros análisis moleculares consistieron en la discriminación mediante hemoglobina o ácidos grasos (30-34). Sin embargo, estas técnicas no resultaron suficientemente discriminantes entre especies próximas, especialmente en etapas pre-imago. Para evitar estas dificultades, se han buscado alternativas que proporcionen una identificación más específica, sensible y rápida (22).

A la vista del interés de la identificación molecular de las especies que intervienen en la etapa *post-mortem*, se ha señalado la utilidad del análisis de la variación genética del ADN para obtener información fiable sobre la especie de los insectos (21). Para solucionar este problema se ha comenzado a utilizar la información específica contenida en la molécula de ADN que se caracteriza por su inmutabilidad durante todas las fases del ciclo de vida de los insectos, su presencia en cualquiera de sus tejidos (huevo, larva, pupa e imago) y elevada estabilidad, lo que facilita la identificación taxonómica en cualquier etapa del insecto, independiente de los métodos de preservación (21,27,35). Consecuentemente, las técnicas basadas en el análisis del ADN en general, y del ADN mitocondrial en particular, presentan numerosas ventajas sobre la identificación morfológica cuando los especímenes están dañados o carecen de las características necesarias para la clasificación morfológica (36,37). Además, estas técnicas permiten identificar la especie en cualquiera de las fases del ciclo de vida de los especímenes.

Los métodos de secuenciación del ADN proporcionan una gran cantidad de información referente a la variabilidad intra- e inter-específica. Los marcadores más utilizados al respecto han sido las subunidades I y II de citocromo oxidasa (*COI* y *COII*) (20,22,27). Estos marcadores han sido aplicados en estudios principalmente sistemáticos, evolutivos y de genética de poblaciones, lo que explica la gran cantidad de información de estos genes en el orden Diptera contenida en el GenBank.

La mayor parte de los estudios que implican estos marcadores se han realizado desde una perspectiva de clasificación sistemática, y sólo en algunos casos se ha mencionado la utilidad de este procedimiento en relación con la entomología forense. Desde la perspectiva forense destaca el trabajo de Saigusa et al. (2005) (38) basado en el análisis de 304 pb de *COI* para la identificación de especies de tres géneros de Calliphoridae (*Calliphora lata*, *C. vicina*, *Lucilia cuprina*, *L. illustris*, *L. sericata* y *Chrysomya pinguis*) y dos especies de Sarcophagidae (*Parasarcophaga crassipalpis*, *P. similis*). Estas especies difieren en cuanto a su hábitat y estación dominante. Sin embargo, las características morfológicas de las cinco especies de Calliphoridae y las dos especies de Sarcophagidae son similares entre géneros, y por otro lado, *Chrysomya pinguis*, tiene una apariencia verde metálica similar a *Lucilia*. Las secuencias de *COI* de cada especie fueron únicas y distinguibles entre sí, aunque mostraron alta homología. Este trabajo puso de manifiesto que la identificación de especies de dípteros inmaduros por

análisis de secuencias del ADN resulta sencilla, economiza tiempo al eliminar la necesidad de esperar a la emergencia del adulto y elimina el requerimiento de un conocimiento altamente especializado de claves morfológicas. Además, proporciona información, no sólo del intervalo *post-mortem*, sino también de las condiciones ambientales que rodean a los cuerpos.

A diferencia del uso común de los genes anteriores en los estudios de especies de invertebrados, los laboratorios moleculares forenses, en los que la identificación de especies suele concernir a vertebrados, utilizan fundamentalmente el gen mitocondrial del citocromo b (cyt-b) (34,40-42). Aunque el cyt-b ha estado principalmente enfocado a la identificación de especies mamíferos donde ha obtenido una amplia aplicación en el trabajo de rutina forense, también existen algunos ejemplos de aplicaciones a la identificación de especies de dípteros (39,43-44).

El análisis molecular puede no solo proporcionar información taxonómica de la entomofauna, sino que también puede ser de interés en casos de sospecha de contaminación larvaria, ya que el ADN recuperado del intestino de las larvas puede ser usado para identificar lo que éstas habían comido; así, es posible confirmar o descartar que las larvas procedan del cuerpo (45).

A la vista del interés del análisis molecular entomológico en Genética Forense, nos hemos planteado el objetivo de investigar la utilidad del citocromo b del ADN mitocondrial en la identificación de especies relacionadas con la entomofauna forense, ya que este marcador es de amplio uso en los laboratorios forenses.

La capacidad de identificación de las especies entomológicas por parte del cyt-b está aún por ser determinada. Para ello, es necesario establecer un método de análisis del cyt-b apropiado para estas especies. En este sentido, la amplificación PCR y posterior secuenciación del producto amplificado son el procedimiento de elección; la eficacia de este método se basa en la utilización de primers capaces de dar lugar a la amplificación del cyt-b en las distintas especies de interés en la entomofauna forense. Así, la primera fase de la investigación consiste en la búsqueda de *primers* adecuados para cada especie o grupos de especies. Esta tarea presenta la dificultad de que no se conoce la secuencia del cyt-b en la mayoría de las especies a estudiar, por lo que el diseño de los *primers* debe hacerse en base a las secuencias de las especies filogenéticamente más próximas de las que se dispone de información. En segundo lugar, se hace necesario realizar un estudio de la variabilidad intra-específica del cyt-b, con la finalidad de estimar si la variabilidad interna es tan amplia que compromete la utilidad del marcador, o por el contrario, si cada especie presenta una variabilidad reducida que pueda permitir obtener una secuencia consenso del cyt-b propia de cada especie. Por último, se hace necesario el análisis de la variación inter-específica para observar si las secuencias del cyt-b entre las distintas especies son suficientemente diferentes como para permitir su

diferenciación, de tal manera que sea posible llegar a la identificación especie-específica, y en consecuencia a su clasificación taxonómica.

VI.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

A continuación se muestra el procedimiento seguido para instaurar un método de identificación de especie mediante secuencias del cyt-b mitocondrial de *Stearibia nigriceps*, cuyas larvas fueron encontradas en la escena de un crimen en el País Vasco (figura II).

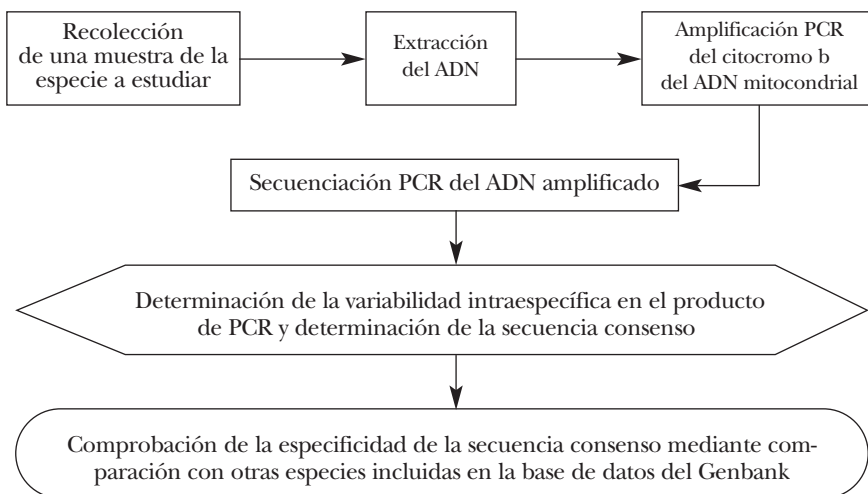


Figura II. Diseño experimental para la determinación de la especie mediante el análisis de la secuencia de un fragmento del gen mitocondrial citocromo b.

VI.2. METODOLOGÍA

La recolección de la muestra consistió en la recogida de numerosas larvas tanto en el suelo de la escena del crimen como en la sala de autopsias. Una parte de estas larvas fue tratada a alta temperatura (choque térmico en agua 95 °C) y conservada en etanol 70% y otra parte fue criada en el laboratorio de Entomología Forense de la Universidad del País Vasco hasta que emergieron los adultos que fueron analizados morfológicamente para establecer la especie, *Stearibia nigriceps* (= *Piophila nigriceps*) (Meigen, 1826).

Diecisiete larvas fueron utilizadas para el análisis genético. Tras la homogeneización del tejido de cada larva, se extrajo el ADN mediante lisis proteolítica con proteinasa K, se purificó con fenol cloroformo y se precipitó con etanol. El ADN obtenido fue valorado espectrofotométricamente.

Una parte alícuota del ADN obtenido de cada ejemplar fue utilizada para la amplificación PCR utilizando los primers de Parson et al. (2000), en condiciones de hot start 95 °C-11 min, seguido de 35 ciclos 94 °C-30 sec; 50 °C- 45 sec, 72 °C- 45 sec.

El producto de PCR consistió en un fragmento de 356 pb que fue secuenciado mediante el método de terminadores marcados en un ABI Prism 310 DNA sequencer.

La determinación de la variabilidad intraespecífica se llevó a cabo tras la edición de las secuencias con ChromasPro y su alineamiento con ClustalX 1.83 (46). La diversidad nucleotídica y de secuencias se estimó con ayuda del programa Arlequin v. 2000 (47).

El análisis intraespecífico permitió obtener una secuencia consenso del citocromo b de *S. nigriceps* que posteriormente pudo ser utilizada para el análisis interespecífico con otras especies de dípteros de los cuales existe una secuencia de citocromo b equivalente en el GenBank.

Para realizar el análisis interespecífico se procedió en primer lugar a la búsqueda de secuencias similares del citocromo b mediante búsqueda BLAST. Esto permitió obtener un grupo de secuencias que muestran parecido con el citocromo b de *S. nigriceps*. A continuación, se utilizó el programa PHYLIP versión 3.63 (48) para estimar las distancias genéticas y el programa TreeView 1.6.6 (49) para obtener una representación gráfica de las mismas.

VI.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las secuencias analizadas fueron editadas en un fragmento de 305 pb a partir del primer forward. Se obtuvieron 14 haplotipos diferentes, cuya composición nucleotídica y variabilidad intraespecífica se muestra en la tabla 2.

Tabla 2
Variabilidad intraespecífica de las secuencias de citocromo b analizadas en las 17 larvas de *S. nigriceps* analizadas.

Porcentaje bases	C	T	A	G
	13,29	42,78	27,81	16,12
Diversidad de secuencias	0,9706 ± 0,0323			
Diversidad de nucleótidos	0,017502 ± 0,009943			
Nº promedio de diferencias nucleotídicas entre secuencias	5,338235 ± 2,709668			

La composición de bases muestra un alto porcentaje de bases adenina y timina (70,6%). Este hecho coincide con el alto porcentaje de estas bases previamente hallado en varios estudios del ADN mitocondrial de insectos, incluidos los del orden Diptera (27,50-51).

Marian M. de Pancorbo, Rodrigo Ramos, Marta Saloña y Paula Sánchez

Las 17 larvas analizadas pertenecen a 14 linajes matrilineales diferentes, lo que parece indicar que son representativas de puestas diferentes y por tanto, los resultados que ofrecen son válidos para realizar una estimación de la variabilidad intraespecífica de esta especie en la región geográfica estudiada.

Se observa que a pesar de mostrar variabilidad intraespecífica, la probabilidad de hallar un cambio nucleotídico en una posición concreta es muy reducida, $0,0175 \pm 0,0099$, siendo el número promedio de diferencias entre las secuencias de $5,3382 \pm 2,7097$.

El alineamiento de estas secuencias mostró variaciones en 21 posiciones, todas ellas transiciones (tabla 3). Del total de las transiciones observadas, 17 aparecen en sólo algunas de las secuencias, mientras que 4 posiciones (161, 164, 296 y 302) son altamente variables.

Tabla 3
Posiciones variables halladas en las secuencias de las larvas de *S. nigriceps* analizadas.

Especimen	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3		
	0	2	4	3	5	6	6	7	0	1	2	3	3	3	4	4	5	6	9	9	0		
	5	3	4	1	2	1	4	6	0	8	4	3	5	6	6	8	1	6	3	6	2		
	C	T	G	T	T	R	R	T	A	G	T	C	C	T	G	T	A	C	A	Y	R		
1	•	•	•	C	•	A	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	G	T	G	
2	•	•	•	•	•	A	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	G	C	A	
3	•	•	•	•	•	A	A	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	G	
4	•	C	A	•	C	G	A	•	•	•	C	T	•	C	•	•	•	•	•	•	T	A	
5	•	•	•	•	C	G	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	G	T	•	T	A	
6	•	•	•	•	•	A	A	•	•	A	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	G	
7	•	•	•	•	•	A	A	•	•	A	•	•	•	•	•	•	•	G	T	•	T	A	
8	•	•	•	•	•	A	A	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	G	
9	•	•	•	•	•	A	A	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	G	
10	•	•	•	•	•	G	G	C	•	•	•	•	•	•	•	A	C	G	T	•	C	A	
11	•	•	•	•	•	G	G	•	G	A	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	C	A	
12	•	•	•	•	•	A	A	•	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	T	G	
13	•	•	•	•	•	A	A	•	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	T	G	
14	•	•	A	•	•	A	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	A	
15	•	•	•	•	•	A	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C	A	
16	T	•	•	•	•	A	A	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C	•	•	•	C	A	
17	•	•	•	•	•	G	A	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	G	•	•	C	A

Tras el análisis de las secuencias, fue posible obtener una secuencia consenso de 305 pb (figura III), donde aparecen resaltadas las bases variables de la tabla anterior.

Entomología molecular forense

	TTG	GCT	CTT	TAC	TTG	GGT
19	TAT	GTT	TAA	TTA	TTC	AAA
37	TTT	TAA	CGG	GTT	TAT	TTT
55	TAG	CTA	TAC	ATT	ATA	CAG
73	CAG	ATA	TTA	ATT	TAG	CTT
91	TCA	ATA	GAG	TTA	ATC	ATA
109	TTT	GTC	GTG	ATG	TAA	ATT
127	ATG	GTT	GAT	TAT	TAC	GAA
145	CAC	TAC	ATG	CTA	ATG	GRG
163	CRT	CAT	TCT	TCT	TTA	TTT
181	GTA	TTT	ATC	TTC	ATG	TAG
199	GAC	GAG	GAA	TTT	ATT	ATG
217	GGT	CAT	ATC	TTT	ATA	CCC
235	CTA	CCT	GAT	TAG	TTG	GAG
253	TAA	TTA	TTT	TAT	TCT	TAG
271	TAA	TAG	CAA	CAG	CCT	TTA
289	TAG	GAT	AYG	TAT	TRC	CT

Figura III. Secuencia consenso de un fragmento de citocromo b de *S. nigriceps*: bases constantes subrayadas; bases variables intra-específicas resaltadas en gris.

La variabilidad intraespecífica se encuentra distribuida por todo el segmento estudiado, salvo una región de 86 pb que se mantiene constante en todos los especímenes analizados. Esta región constante aparece subrayada y se extiende desde la base 45 a la 130.

La búsqueda de esta secuencia altamente conservada en el GenBank, mediante el motor de búsqueda BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), no mostró resultados coincidentes. Esta observación pudiera ser debida al azar, sin embargo, en caso de confirmarse en futuros trabajos, esta secuencia altamente conservada podría ser utilizada como un marcador distintivo de la especie *S. nigriceps*.

La validez de un marcador para ser utilizado como identificador molecular de una especie está determinada por su especificidad. Para comprobar esta especificidad se ha realizado un análisis inter-específico entre la secuencia consenso obtenida y las secuencias de citocromo b contenidas hasta la fecha en la base de datos del GenBank.

La secuencia consenso procesada via BLAST permitió hallar las especies cuyas secuencias de citocromo b son más próximas a *S. nigriceps*. Las mayores similitudes se hallaron con la especie necrófaga *Chrysomya putoria* (89%; NC_002697), la mosca causante de miasis *Cochliomyia hominivorax* (89%; AF260826), y tres especies de *Drosophila*: *Drosophila simulans* (88%; NC_5781), *Drosophila melanogaster* (87%; NC001709) y *Drosophila sechellia*

Marian M. de Pancorbo, Rodrigo Ramos, Marta Saloña y Paula Sánchez

(86%; NC_005780) y las especies *Ceratitis capitata* (86%; U12925) y *Dermatobia hominis* (84%; AY463155).

Con la finalidad de obtener una representación gráfica de las relaciones interespecíficas, se compararon las secuencias anteriormente referidas utilizando el software PHILIP 3.63. Se llevó a cabo un análisis de máxima verosimilitud cuya ventaja es la falta de suposición de modelos evolutivos. Se utilizó como secuencia outgroup la del nematodo *Caenorhabditis elegans* (NC_001328). Se realizó en primer lugar un remuestreo aleatorio mediante SEQBOOT para obtener 1000 conjuntos de datos; el archivo resultante fue importado por el programa DNAML (DNA maximum likelihood), con la opción de entrada aleatoria del orden de las secuencias; a continuación se aplicó la opción CONSENSE y se representó gráficamente el resultado obtenido mediante el program TREEVIEW 1.6.6. (figura IV).

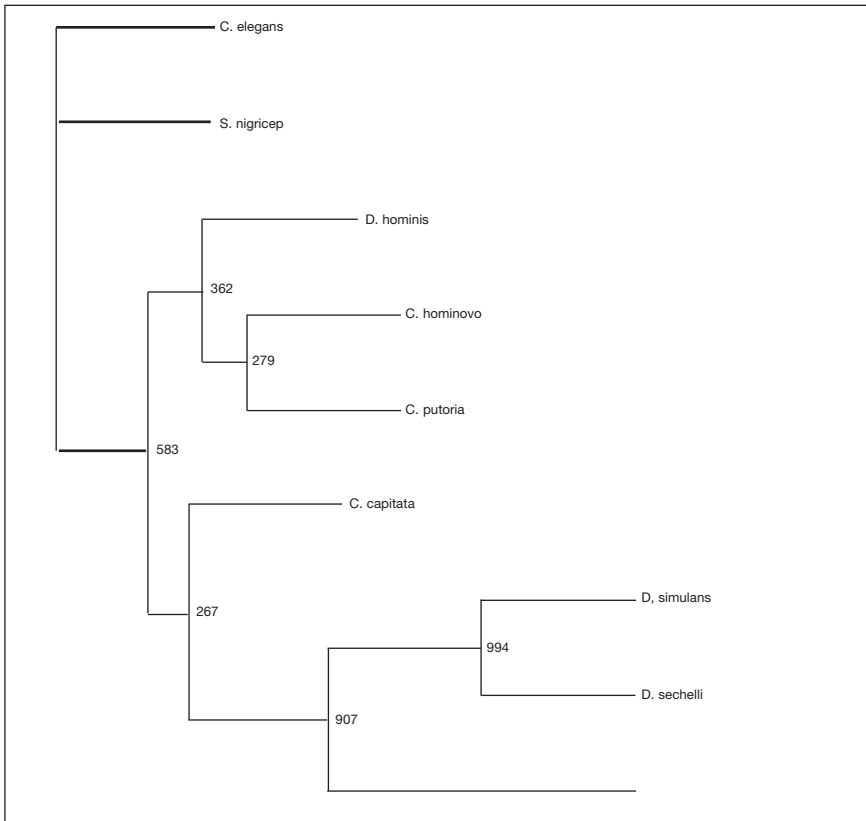


Figura IV. Árbol representativo de la comparación por el método de máxima verosimilitud de las secuencias de citocromo b de *S. nigriceps* y las especies del GenBank que mayor similitud han mostrado (outgroup *C. elegans*).

Los números entre paréntesis corresponden a los valores *bootstrap*.

Este árbol muestra que las secuencias de cyt-b de las moscas de la fruta, *C. capitata*, *D. melanogaster*, *D. sechellia* y *D. simulans*, se agrupan en una misma rama. Las especies causantes de miasis, *D. hominis* y *C. hominivorax* y la mosca necrófaga *C. putoria* forman un grupo separado. La secuencia consenso de citocromo b de *S. nigriceps* no se agrupa con las especies más próximas en cuanto a este marcador que están descritas en la base de datos del GenBank.

Este resultado pone de manifiesto la utilidad del citocromo b para la identificación de especies en la entomofauna forense, ya que las especies genéticamente más próximas se agrupan entre sí, como puede observarse en el caso de las tres especies de *Drosophila* y se diferencian de *S. nigriceps*.

En lo que respecta a la eficacia del cyt-b para caracterizar *S. nigriceps*, puede observarse que esta especie necrófaga posee una gran divergencia en su secuencia de bases con respecto a la única especie necrófaga *C. putoria* de la que se dispone de datos en el GenBank, lo que parece indicar que el citocromo b puede ser un valioso marcador para la identificación molecular de especies de moscas necrófagas.

VI.4. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, podría concluirse que el citocromo b parece ser un gen adecuado para la identificación molecular de *S. nigriceps* por lo que su uso en los laboratorios forenses no debiera quedar restringido a la identificación de vertebrados, sino que podría extenderse a la identificación de especies de la entomofauna cadavérica.

BIBLIOGRAFÍA

1. GIBERT CALABUIG J. A. *Medicina Legal y Toxicología* (4ª ed). Masson-Salvat Medicina. Barcelona, 1991, pp 190-192.
2. MÉGNIN P. La faune des cadavres de l'entomologie a la médecine légale. *Encyclopedie scientifique des Aides-Memoirés*, Marson, Paris, Gauthiers-Villars, Paris, 1894.
3. KLOTZBACH H, KRETTEK R, BRATZKE H, PUSCHEL K, ZEHNER R, AMENDT J. The history of forensic entomology in German-speaking countries. *Forensic Sci Int.* 2004 Sep 10; 144(2-3):259-63.
4. BENECKE M. A brief history of forensic entomology. *Forensic Sci Int.* 2001; 120(1-2):2-14.
5. PÉREZ SP, DUQUE P, WOLFF M. Successional behavior and occurrence matrix of carrion-associated arthropods in the urban area of Medellín, Colombia. *J Forensic Sci.* 2005; 50(2):448-54.

6. TURCHETTO M, VANIN S. Forensic entomology and globalisation. *Parassitologia*. 2004; 46(1-2):187-90.
7. ARNALDOS MI, GARCIA MD, ROMERA E, PRESA JJ, LUNA A. Estimation of *postmortem* interval in real cases based on experimentally obtained entomological evidence. *Forensic Sci Int*. 2005; 149(1):57-65.
8. CLARK K, EVANS L, WALL R. Growth rates of the blowfly, *Lucilia sericata*, on different body tissues. *Forensic Sci Int*. 2006; 156(2-3):145-9.
9. GOMES L, ZUBEN CJ. Postfeeding radial dispersal in larvae of *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae): implications for forensic entomology. *Forensic Sci Int*. 2005; 155(1):61-4.
10. GOMES L, GODOY WA, VON ZUBEN CJ. A review of postfeeding larval dispersal in blowflies: implications for forensic entomology. *Naturwissenschaften*. 2006; 93(5):207-15.
11. GAUDRY E, BLAIS C, MARIA A, DAUPHIN-VILLEMANT C. Study of steroidogenesis in pupae of the forensically important blow fly *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Sci Int*. 2006; 160(1):27-34.
12. ARCHER MS, RANSON DL. Potential contamination of forensic entomology samples collected in the mortuary: a case report. *Med Sci Law*. 2005; 45(1):89-91.
13. ARNALDOS I, ROMERA E, GARCIA MD, LUNA A. An initial study on the succession of sarcosaprophagous Diptera (Insecta) on carrion in the southeastern Iberian peninsula. *Int J Legal Med*. 2001; 114(3):156-62.
14. AZEREDO-ESPIN AM, LESSINGER AC. Genetic approaches for studying myiasis-causing flies: molecular markers and mitochondrial genomics. *Genetica*. 2006; 126(1-2):111-31.
15. ANDERSON GS, HUITSON NR. Myiasis in pet animals in British Columbia: the potential of forensic entomology for determining duration of possible neglect. *Can Vet J*. 2004; 45(12):993-8.
16. SUKONTASON KL, NARONGCHAI P, SRIPAKDEE D, BOONCHU N, CHAIWONG T, NGERNKLUN R, PIANGJAI S, SUKONTASON K. First report of human myiasis caused by *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae) in Thailand, and its implication in forensic entomology. *J Med Entomol*. 2005; 42(4):702-4.
17. BENECKE M, JOSEPHI E, ZWEIHOFF R. Neglect of the elderly: forensic entomology cases and considerations. *Forensic Sci Int*. 2004; 146 Suppl:S195-9.
18. Ley de Enjuiciamiento Criminal Española (LECr); promulgada por Real Decreto en 1882
19. Código Penal Español; LO 10/1995.
20. WALLMAN JF, DONNELLAN SC. The utility of mitochondrial DNA sequences for the identification of forensically important blowflies (Diptera: Calliphoridae) in southeastern Australia. *Forensic Sci Int*. 2001; 120(1-2):60-7.
21. WELLS JD, SPERLING FA. DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Sci Int*. 2001; 120(1-2):110-5.
22. ZEHNER R, AMENDT J, SCHUTT S, SAUER J, KRETTEK R, POVOLNY D. Genetic identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). *Int J Legal Med*. 2004; 118(4):245-7.

23. AMENDT J, KRETTEK R, ZEHNER R, BRATZKE H. Practice of forensic entomology—usability of insect fragments in the estimation of the time of death. *Arch Kriminol.* 2004; 214(1-2):11-8.
24. AMENDT J, CAMPOBASSO CP, GAUDRY E, REITER C, LEBLANC HN, J R HALL M. Best practice in forensic entomology—standards and guidelines. *Int J Legal Med.* 2006 Apr 22; [Epub ahead of print].
25. STEVENS J, WALL R. Genetic relationships between blowflies (*Calliphoridae*) of forensic importance. *Forensic Sci Int.* 2001; 120(1-2):116-23.
26. BYRD JH, CASTNER JL Insects of forensic importance. In: Byrd JH, Castner JL (eds) *Forensic entomology –the utility of arthropods in legal investigations.* CRC Press, Boca Raton, 2001, pp 173-200.
27. HARVEY ML, DADOUR IR, Gaudieri S. Mitochondrial DNA cytochrome oxidase I gene: potential for distinction between immature stages of some forensically important fly species (Diptera) in western Australia. *Forensic Sci Int.* 2003; 131(2-3):134-9.
28. HARVEY ML, MANSELL MW, VILLET MH, DADOUR IR. Molecular identification of some forensically important blowflies of southern Africa and Australia. *Med Vet Entomol.* 2003; 17(4):363-9.
29. HARVEY ML. An alternative for the extraction and storage of DNA from insects in forensic entomology. *J Forensic Sci.* 2005; 50(3):627-9.
30. TAYLOR AJ, WEIR RL, HUTTON T, GREEN B. Potential of electrospray mass spectrometry for meat pigment identification. *Meat Sci* 1993; 33: 15-83.
31. ANDRASKO J, ROSEN B. Sensitive identification of haemoglobin in bloodstains from different species by high performance liquid chromatography with combined UV and fluorescence detection. *J Forensic Sci.* 1994; 39: 1018-1025.
32. ESPINOZA EO, LINDLEY NC, GORDON KM, EKHOFF JA, KIRMS MA. Electrospray ionization mass spectrometric analysis of blood for differentiation of species. *Anal Biochem* 1999; 268: 252-261.
33. CZESNY S, DABROWSKI K, CHRISTENSEN JE, VAN EENENNAAM J AND DOROSHOV S. Discrimination of wild and domestic origin of sturgeon ova based on lipids and fatty acids analysis. *Aquaculture*, 2000; 189:145-153.
34. BELLIS C, ASHTON KJ, FRENEY L, BLAIR B, GRIFFITHS LR. A molecular genetic approach for forensic animal species identification. *Forensic Sci Int* 2003; 134: 99-108.
35. SPERLING FA, ANDERSON GS, HICKEY DA. A DNA-based approach to the identification of insect species used for *postmortem* interval estimation. *J Forensic Sci.* 1994 Mar; 39(2):418-27.
36. WELLS JD, INTRONA F JR, DI VELLA G, CAMPOBASSO CP, HAYES J, SPERLING FA. Human and insect mitochondrial DNA analysis from maggots. *J Forensic Sci* 2001; 46: 685-687.
37. MALGORN Y, COQUOZ R. DNA typing for identification of some species of Calliphoridae. An interest in forensic entomology. *Forensic Sci Int.* 1999 ; 102(2-3):111-9.
38. SAIGUSA K, TAKAMIYA M, AOKI Y. Species identification of the forensically important flies in Iwate prefecture, Japan based on mitochondrial cytochrome oxidase gene subunit I (COI) sequences. *Leg Med (Tokyo).* 2005; 7(3):175-8.

Marian M. de Pancorbo, Rodrigo Ramos, Marta Saloña y Paula Sánchez

39. ZEHNER R, ZIMMERMANN S, MEBS D. RFLP and sequence analysis of the cytochrome b gene of selected animals and man: methodology and forensic application. *Int J Legal Med.* 1998; 111: 323-327.
40. PARSON W, PEGORARO K, NIEDERSTÄTTER H, FÖGER M, STEINLECHNER M. Species identification by means of the cytochrome b. *Int J Legal Med.* 2000; 114: 23-28.
41. HSIEH HM, CHIANG HL, TSAI LC, LAI SY, HUANG NE, LINACRE A, LEE JC. Cytochrome b gene for species identification of the conservation animals. *Forensic Sci Int.* 2001; 122: 7-18.
42. BRANICKI W, KUPIEC T, PAWLOWSKI R. Validation of cytochrome b sequence analysis as a method of species identification. *J Forensic Sci.* 2003 Jan; 48(1): 83-7.
43. BATAILLE M, CRAINIC K, LETERREUX M, DURINGON M, DE MAZNCOURT P. Multiplex amplification of mitochondrial DNA for human and species identification in forensic evaluation. *Forensic Sci Int.* 2001; 99: 165-170.
44. VINCENT S, VIAN JM, CARLOTTI MP. Partial sequencing of the cytochrome oxidase b subunit gene I: a tool for the identification of European species of blow flies for *postmortem* interval estimation. *J Forensic Sci.* 2000; 45(4):820-3.
45. CAMPOBASSO CP, LINVILLE JG, WELLS JD, INTRONA F. Forensic genetic analysis of insect gut contents. *Am J Forensic Med Pathol.* 2005; 26(2):161-5.
46. THOMPSON JD, GIBSON TJ, PLEWNIAK F, JEANMOUGIN F, HIGGINS DG. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997; 24:4876-4882.
47. SCHNEIDER S, ROESSLI D, EXCOFFIER L. Arlequin ver. 2000: A software for population genetic data analysis. 2000. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
48. FELSENSTEIN J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. 2005. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
49. Page RDM. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci.* 1996; 12: 357-358.
50. LEWIS DL, FARR CL, KAGUNI LS. *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA: completion of the nucleotide sequence and evolutionary comparisons. *Insect Mol Biol.* 1995; 4(4):263-78.
51. BERNASCONI MV, PAWLOWSKI J, VALSANGIACOMO C, PIFFARETTI JC, WARD PI. Phylogeny of the Scathophagidae (Diptera, Calyptratae) based on mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol.* 2000; 16: 308-315.