



# Tema 4. Métodos de recolección y procesado. Metodología de estudios experimentales



## LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN PRINCIPALES

### Conocimiento de la fauna artropodiana y su secuenciación

Diferentes hábitats y lugares geográficos  
Estudios estacionales

### Desarrollo de ciclos vitales de Dípteros

Diferentes condiciones de humedad y temperatura  
Detectar sustancias en tejidos en descomposición  
Entomotoxicología

### Tipificación de ADN en relación con la Entomología Forense

Identificar especies  
Evidencia asociativa



**METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE SUCESIÓN SARCOSAPRÓFAGA**

**Modelo animal**

Imposibilidad de utilizar cadáveres humanos (excepción granjas de cuerpos)

Tipos de cebos utilizados: aves, ratones, cerdos, perros, elefantes, impalas, gatos, reptiles....



**METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE SUCESIÓN SARCOSAPRÓFAGA**

## Modelo animal

Cerdo:

### VENTAJAS

- Posibilidad de obtener ejemplares de tamaño uniforme
- Facilidad de manejo y accesibilidad
- Coste
- Patrón de descomposición similar al humano
- Talla recomendada 23 kg.

### INCONVENIENTES

- Panículo adiposo
- Tipo de piel



**METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE SUCESIÓN SARCOSAPRÓFAGA**

**Modelo animal**

Estado:

- Fresco o congelado
- Intacto o con heridas
- Modo de sacrificio
- Con piel y plumas/pelo o no



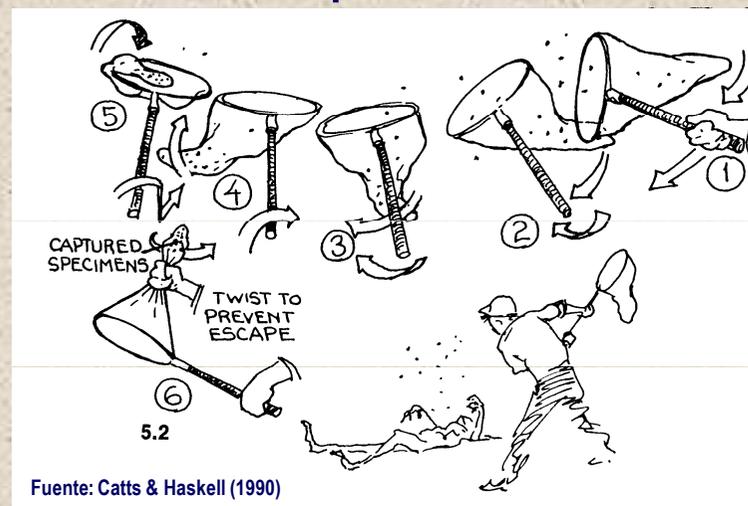
METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE SUCESIÓN SARCOSAPRÓFAGA

# Modos de recolección

Cuerpos expuestos

Métodos clásicos de recolección de artrópodos:

- Manga entomológica
- Pincel
- Pinzas
- ....



Protección contra vertebrados carroñeros

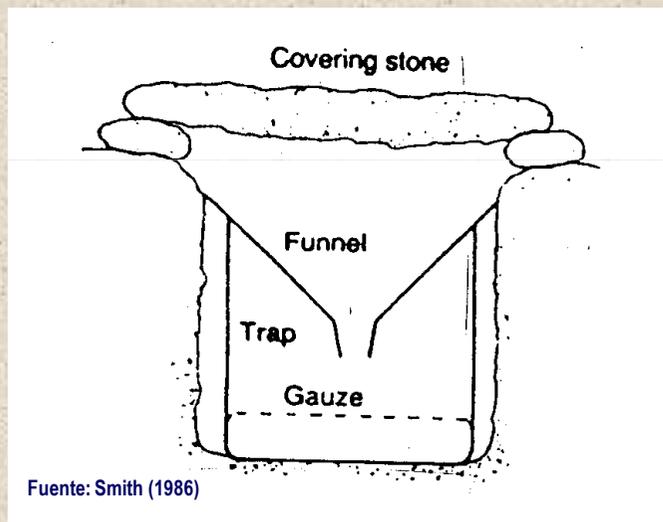


METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE SUCESIÓN SARCOSAPRÓFAGA

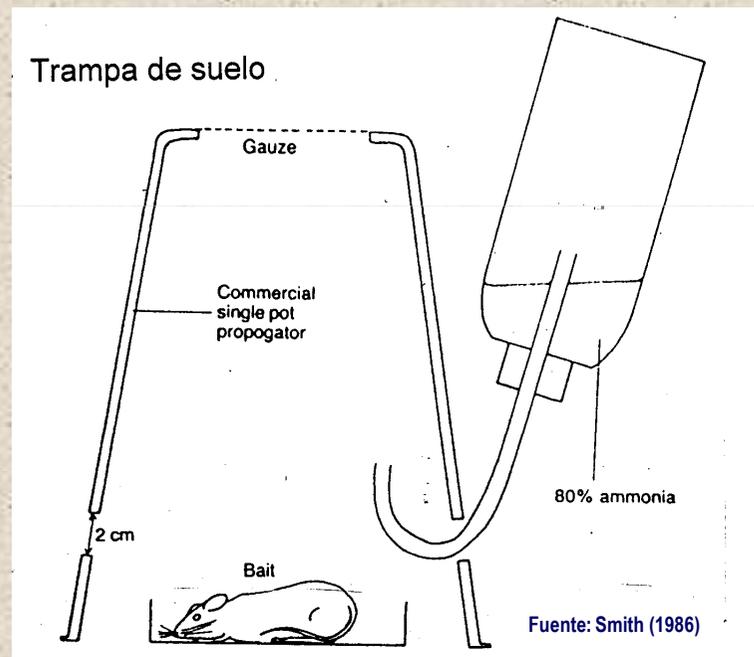
# Modos de recolección

Cuerpos expuestos

## TIPOS DE TRAMPAS



Trampa de caída



Trampa de suelo

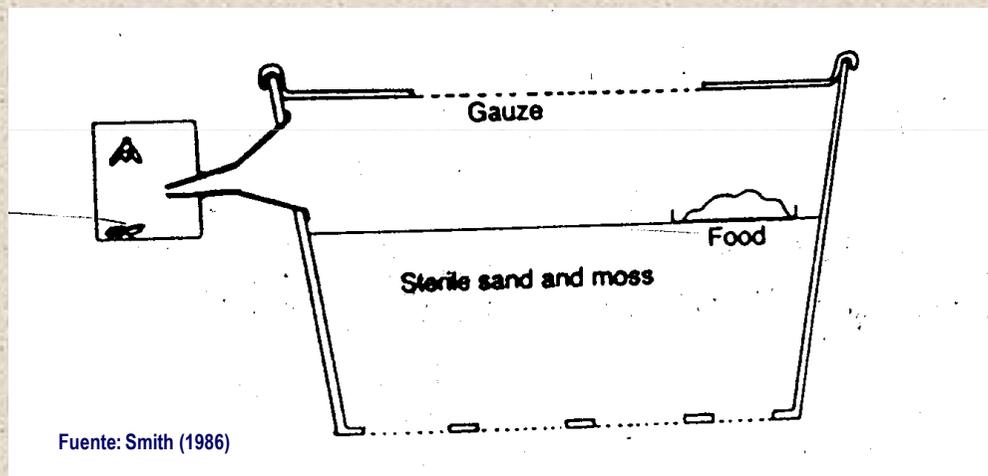


METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE SUCESIÓN SARCOSAPRÓFAGA

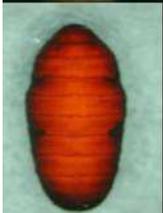
# Modos de recolección

Cuerpos expuestos

## TIPOS DE TRAMPAS



Trampa NUORTEVA

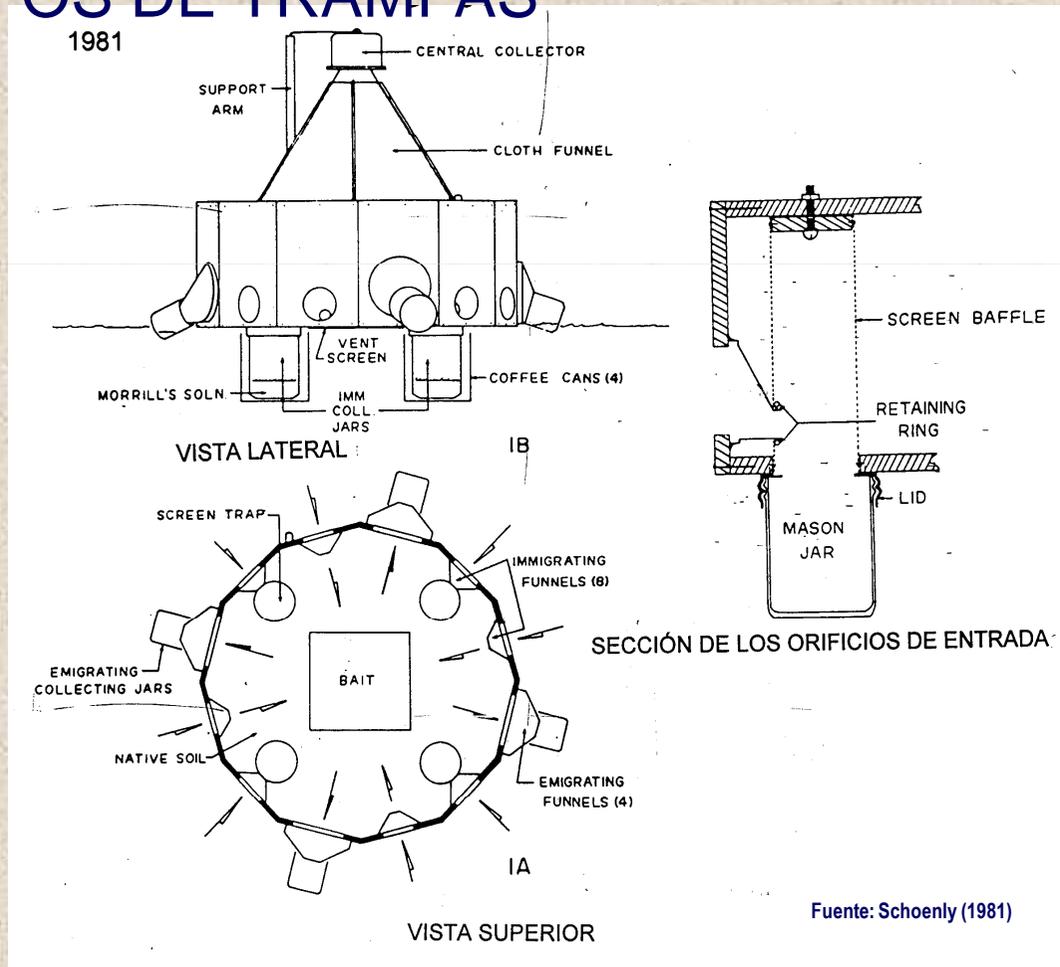


METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE SUCESIÓN SARCOSAPRÓFAGA

# Modos de recolección

Cuerpos expuestos

## TIPOS DE TRAMPAS



Trampa  
SCHOENLY  
(1981)

Demographic Bait Trap



METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE SUCESIÓN SARCOSAPRÓFAGA

# Modos de recolección

Cuerpos expuestos

## TIPOS DE TRAMPAS

### Trampa SCHOENLY (1981) Demographic Bait Trap

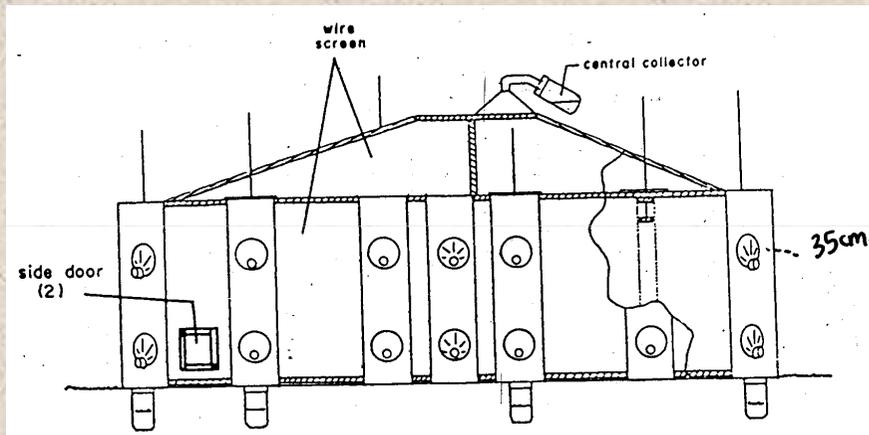


METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE SUCESIÓN SARCOSAPRÓFAGA

# Modos de recolección

Cuerpos expuestos

## TIPOS DE TRAMPAS



Fuente: Schoenly et al. (1991)

Trampa SCHOENLY et al. (1991)

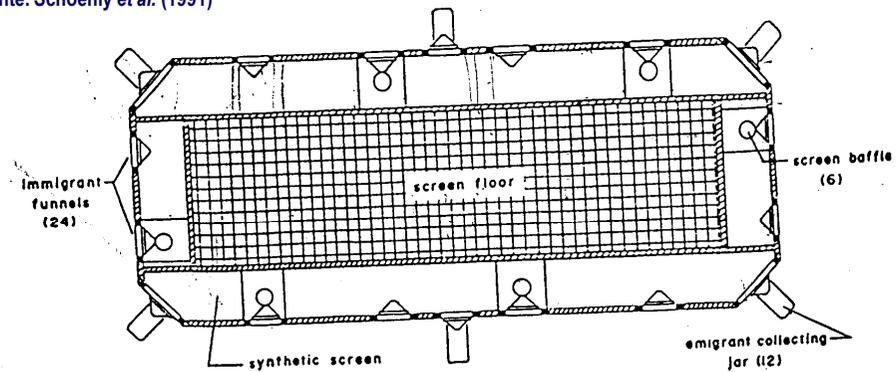


FIG. 2—Overhead view of trap shown without hinged roof.



METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE SUCESIÓN SARCOSAPRÓFAGA

# Modos de recolección

Cuerpos expuestos

## TIPOS DE TRAMPAS

Trampa SCHOENLY *et al.* (1991)

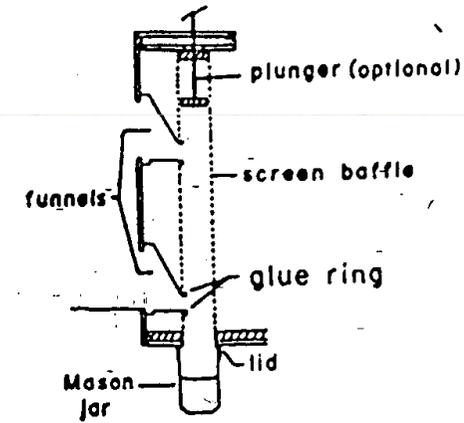
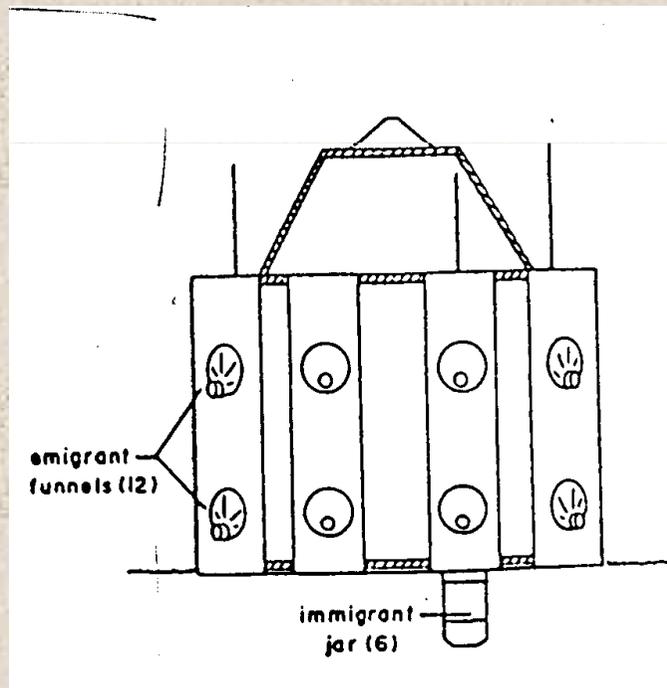


FIG. 4—Half-section of one of the six funnel-baffle-pitfall units.

Fuente: Schoenly *et al.* (1991)



METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE SUCESIÓN SARCOSAPRÓFAGA

Modos de recolección

Cuerpos expuestos



Trampa  
SCHOENLY  
*et al.* (1991)

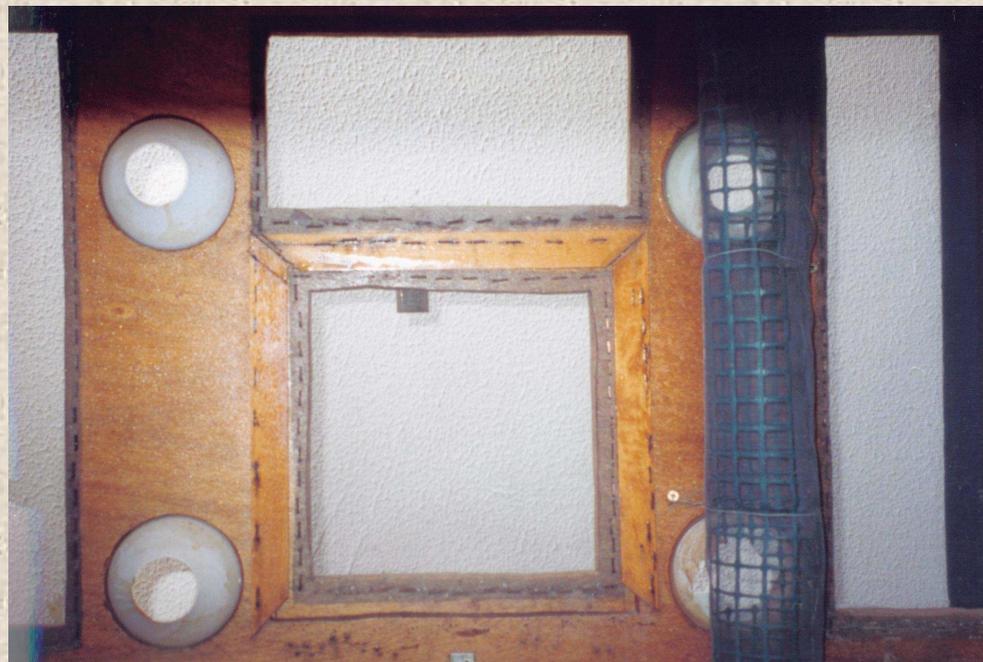


METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE SUCESIÓN SARCOSAPRÓFAGA

Modos de recolección

Cuerpos expuestos

Trampa SCHOENLY *et al.* (1991)



METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE SUCESIÓN SARCOSAPRÓFAGA

# Modos de recolección

Cuerpos enterrados

Métodos clásicos de recolección de artrópodos:

- Manga entomológica
- Pincel
- Pinzas
- .....



METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE SUCESIÓN SARCOSAPRÓFAGA

# Modos de recolección

Cuerpos sumergidos

Métodos clásicos de recolección de artrópodos acuáticos:

- Salabres
- Pincel
- Pinzas
- Redes
- .....



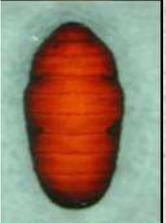
**METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE SUCESIÓN SARCOSAPRÓFAGA**

**Modos de recolección**

En los botes de captura de trampas:

**SOLUCIÓN DE MORRIL (1975)**

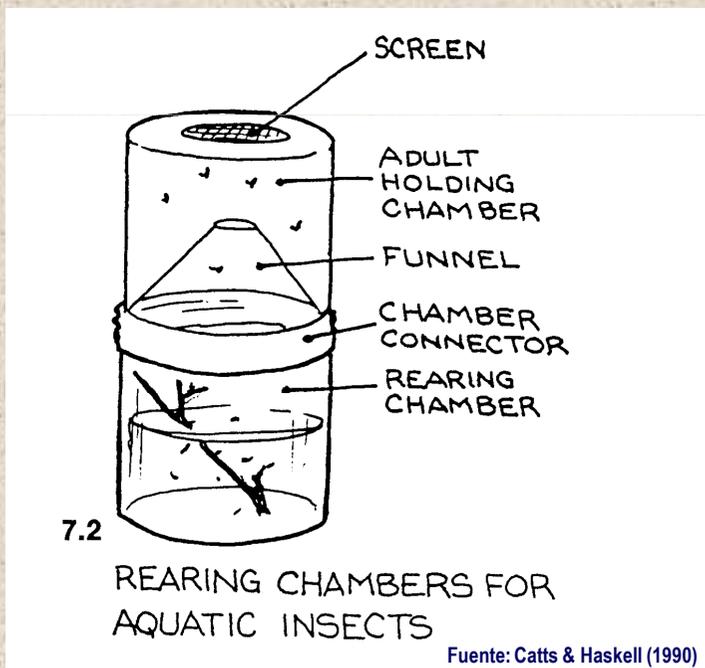
- 600 ml agua
- 400 ml etilenglicol
- 5 ml formaldehído
- 1-2 ml detergente



METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE SUCESIÓN SARCOSAPRÓFAGA

# Modos de recolección

Ejemplares acuáticos- traslado:



**METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE DESARROLLO DE CICLOS VITALES**

**De gran interés forense**

**Utilidad práctica a la hora de determinar los IPM**

**IPM en etapas tempranas**



## Tema 4. Métodos de recolección y procesado. Metodología de estudios experimentales

### METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE DESARROLLO DE CICLOS VITALES

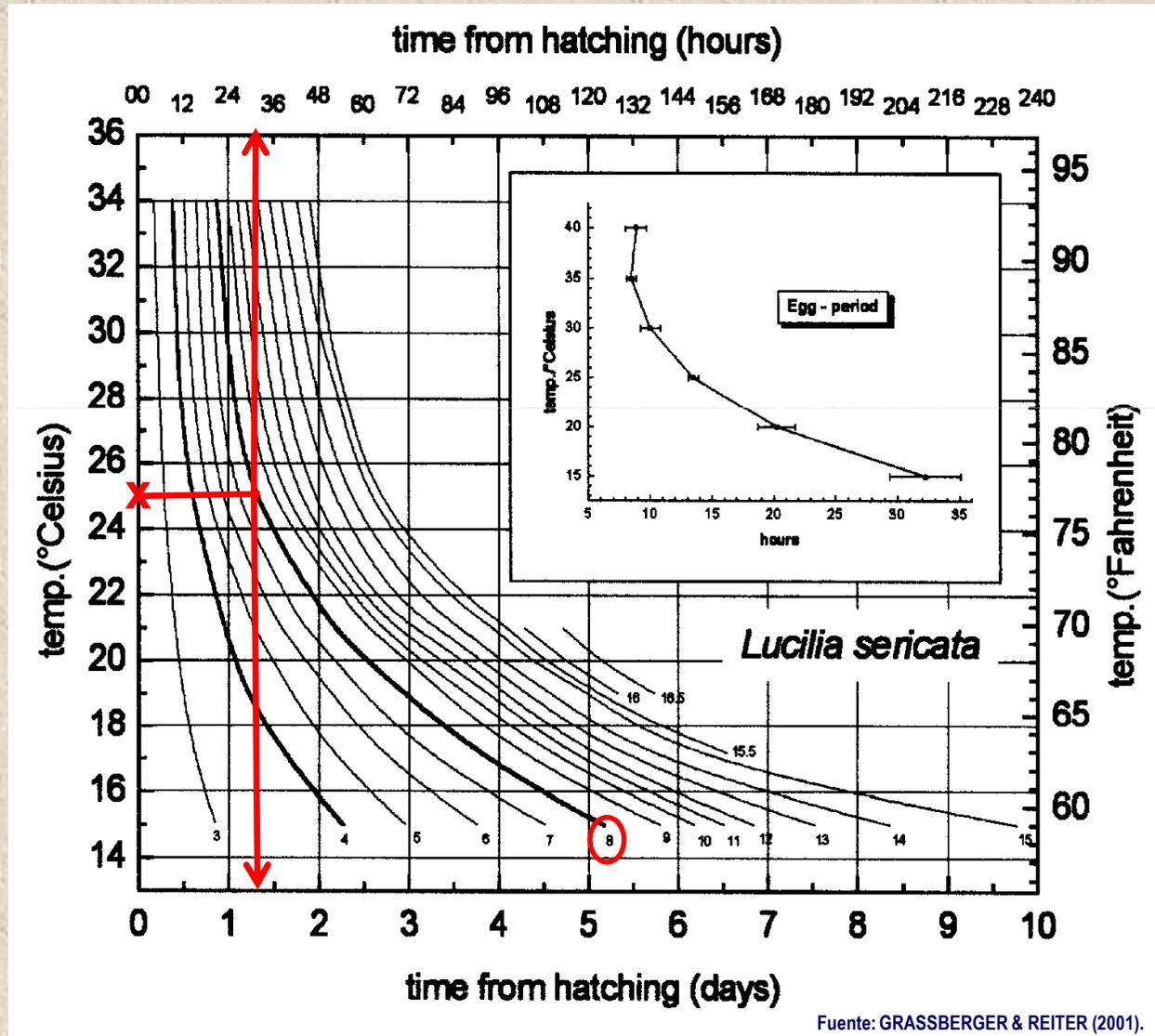
Especies	T <sup>a</sup> (°C)	Huevo	LI	LII	LIII	Pupación	Fuente
<i>Calliphora vomitoria</i>	12.5	64.8	55.2	60.0	434.4	71766	Greenberg & Kunich, 2002
	23.0	21.6	25.2	19.2	214.8	247.2	
	26.7	26.0	24.0	48.0	420.0	348.0	Kamal, 1958
<i>Calliphora vicina</i>	15.8	41.4	41.6	45.0	166.0	425.7	Anderson, 2000
	20.6	22.5	34.5	27.0	129.0	301.0	
	26.7	24.0	24.0	20.	176.0	288.0	Kamal, 1958
<i>Lucilia sericata</i>	17.0	28.0	39.0	54.0	279.0	442.0	Grassberger & Reiter, 2001
	20.0	22.0	24.0	35.0	161.0	209.0	
<i>Lucilia illustris</i>	21.8	19.3	28.7	45.0	136.0	229.0	Anderson, 2000
	15.0	70.3	75.0	135.0	573.0	458.0	Byrd & Allen, 2001
<i>Phormia regina</i>	20.0	21.2	30.0	55.0	274.0	244.0	
	25.0	18.9	25.0	44.0	251.0	209.0	
<i>Protophormia terraenovae</i>	12.5	91.2	290.4	240.0	832.8	722.4	Greenberg & Kunich, 2002

Duración media (en horas) del ciclo biológico de algunas especies de importancia forense. Adaptado y ampliado de GENNARD (2007).



# Tema 4. Métodos de recolección y procesado. Metodología de estudios experimentales

## METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE DESARROLLO DE CICLOS VITALES





## **Tema 4. Métodos de recolección y procesado. Metodología de estudios experimentales**



### **METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE DESARROLLO DE CICLOS VITALES**



**Conocer los requerimientos nutricionales y ambientales para el desarrollo óptimo de los Dípteros sarcosaprófagos de interés en el tanatocronodiagnóstico.**



**Lograr colonias estables, en el laboratorio, de las especies de dípteros sarcosaprófagos mas importantes.**

**Conocer las etapas de desarrollo de las especies criadas en el laboratorio.**



**Describir, en los casos de que no se conozcan, los diferentes estadios preimaginales de las especies.**



**Estudiar biométricamente los diferentes estadios larvarios y determinar los tiempos empleados en cada etapa del desarrollo bajo diferentes supuestos.**



**Elaborar tablas y gráficos de longitud en función del tiempo (horas y días) para la aplicación del estudio al cronotanatodiagnóstico en la práctica forense.**

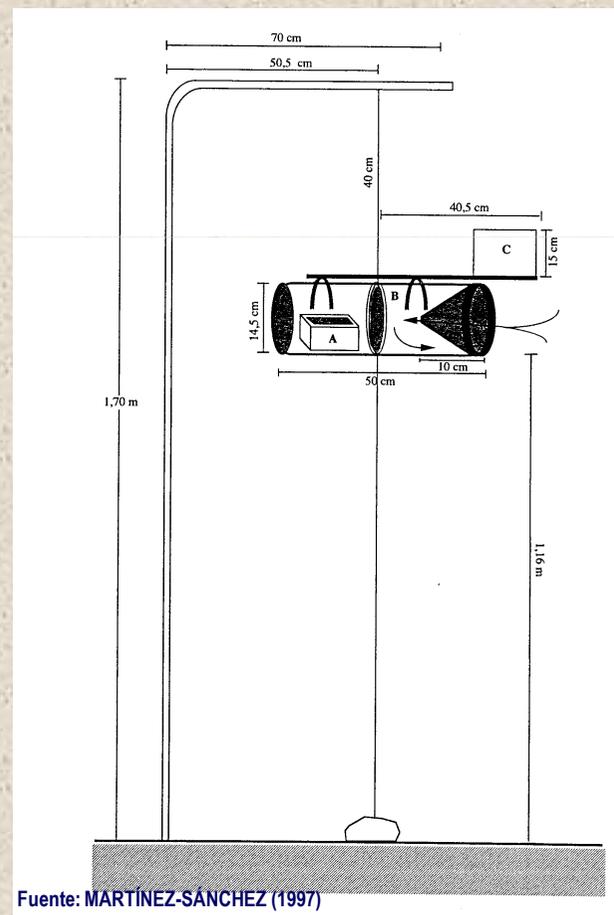


METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE DESARROLLO DE CICLOS VITALES

# Obtención de ejemplares

Exposición cebo (huevos)

Trampa WOT (adultos)



Fuente: MARTÍNEZ-SÁNCHEZ (1997)



**METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE DESARROLLO DE CICLOS VITALES**

**Mantenimiento en el laboratorio**



Jaula adultos



**METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE DESARROLLO DE CICLOS VITALES**

**Mantenimiento en el laboratorio**



**Jaula adultos**



**METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE DESARROLLO DE CICLOS VITALES**

**Mantenimiento en el laboratorio**



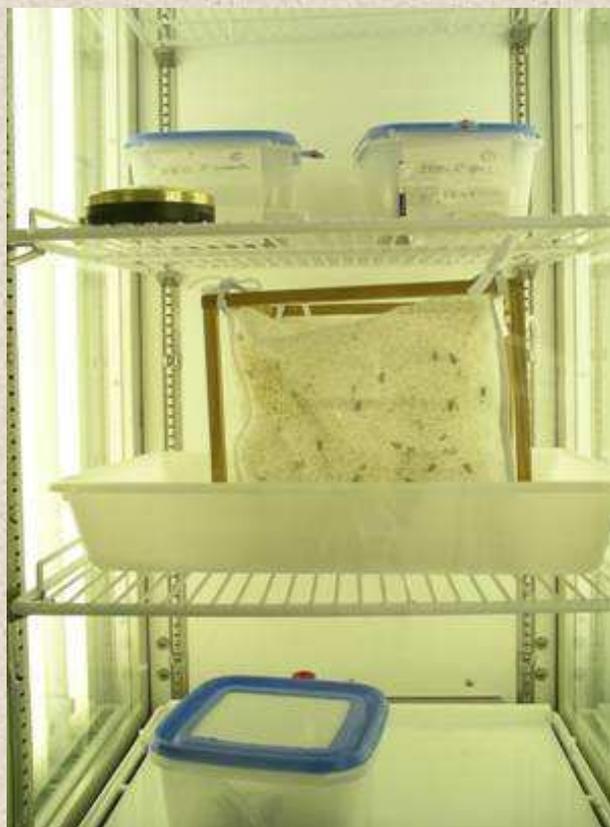
Jaula adultos

Tipos de dieta y sustrato de puesta: en función de la especie a criar

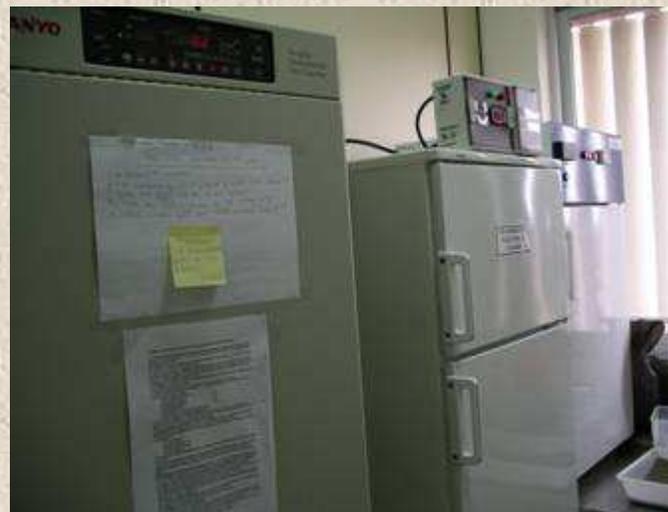


**METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE DESARROLLO DE CICLOS VITALES**

**Mantenimiento en el laboratorio**



**Jaula adultos y larvas**



**Cámaras de cría**

METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE DESARROLLO DE CICLOS VITALES

Mantenimiento en el laboratorio

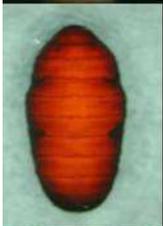


Jaula de larvas



**METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE DESARROLLO DE CICLOS VITALES**

**Mantenimiento en el laboratorio**



**Laboratorio**

**METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE DESARROLLO DE CICLOS VITALES**

**ESTABILIZACIÓN DE  
COLONIAS EN EL  
LABORATORIO**



**Conocer sus fases de desarrollo**



**Huevo**



**Larva**



**Pupa**

**A diferentes temperaturas**

**Con diferentes  
sustancias,  
estupefacientes,  
tóxicos...**



# METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE DESARROLLO DE CICLOS VITALES

## ENTOMOTOXICOLOGÍA

Detección de diferentes sustancias en las larvas

Cambios en el ciclo vital de los dípteros

### Benzodiazepines

Nordiazepam	4	228, 776, 125, 21
Oxazepam	3	44, 153, 200
Lorazepam	1	155
Bromazepam	1	810
Alprazolam	1	27
Triazolam	1	204

### Barbiturates

Phenobarbital	3	761, 2,250, 500
Amobarbital	1	1,540

### Antidepressants

Amitriptyline	1	133
Clomipramine	1	28
Dothiepin	1	280
Fluoxetine	1	16
Venlafaxine	1	59

### Phenothiazine

Chlorpromazine	2	551, 16
Cyamemazine	2	103, 489
Levomepromazine	1	45
Alimemazine	1	22

### Opiates/Opioids

Morphine	3	137, 182, 90
Codeine	3	22, 59, 12
Pholcodine	1	13
Propoxyphene	1	867

### Miscellaneous

THC-COOH	2	16, 39
11-Hydroxy-THC	1	11
Meprobamate	2	4,439, 718
Digoxin	1	21
Nefopam	1	880

**METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE DESARROLLO DE CICLOS VITALES**  
**ENTOMOTOXICOLOGÍA**

Factores a considerar:

Modo de difusión sustancia

Mezclado

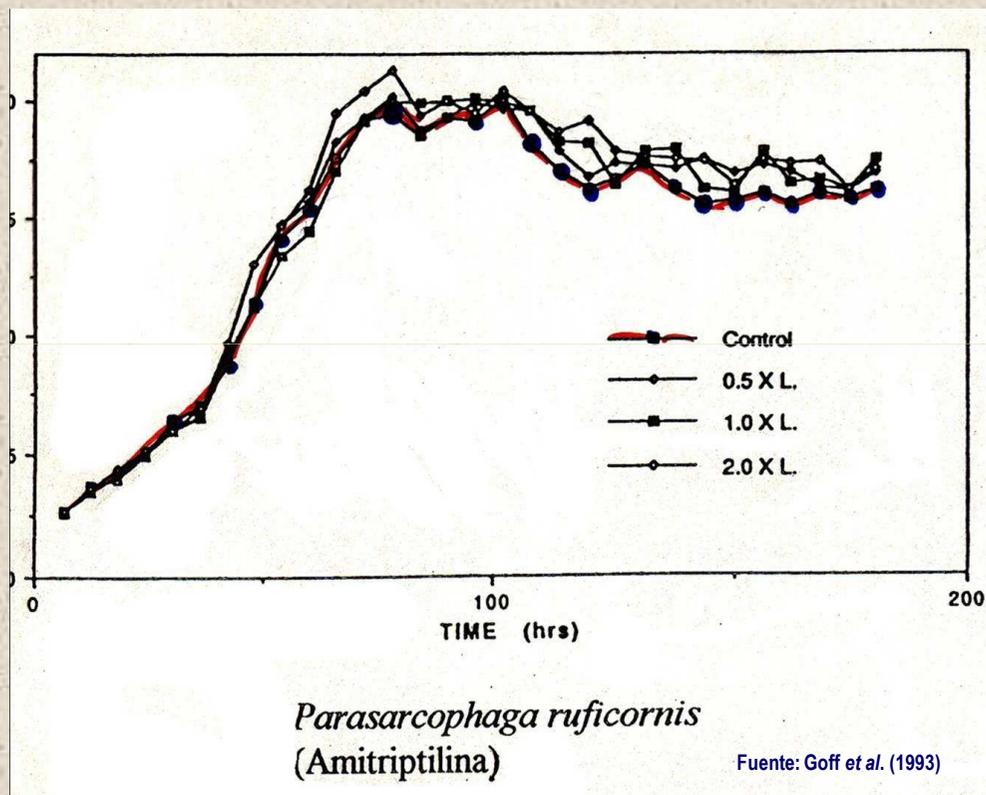
Inyectada

Tiempo de exposición para ovoposición/larviposición

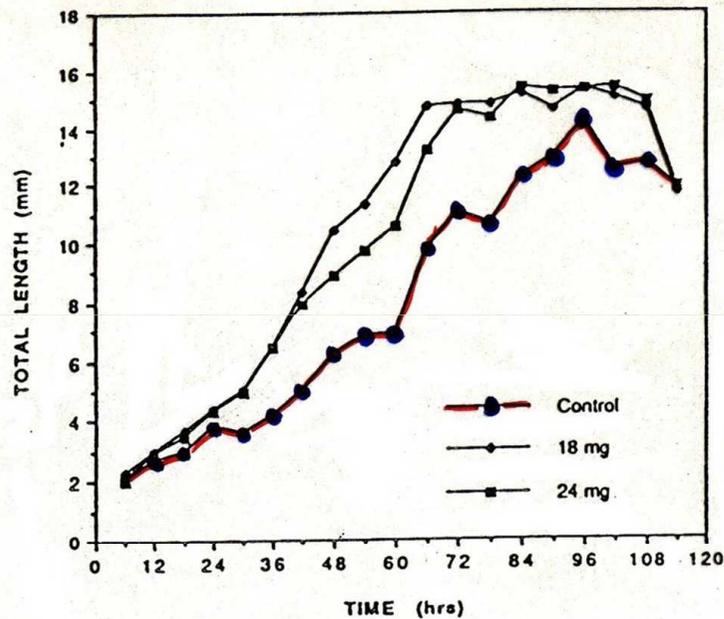
Número de ejemplares extraídos



# METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE DESARROLLO DE CICLOS VITALES ENTOMOTOXICOLOGÍA

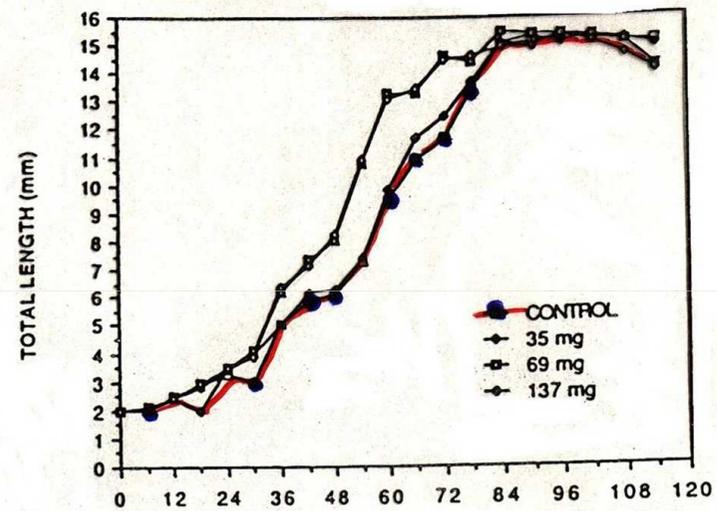


# METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE DESARROLLO DE CICLOS VITALES ENTOMOTOXICOLOGÍA



*Boettcherisca peregrina*  
(Heroína)

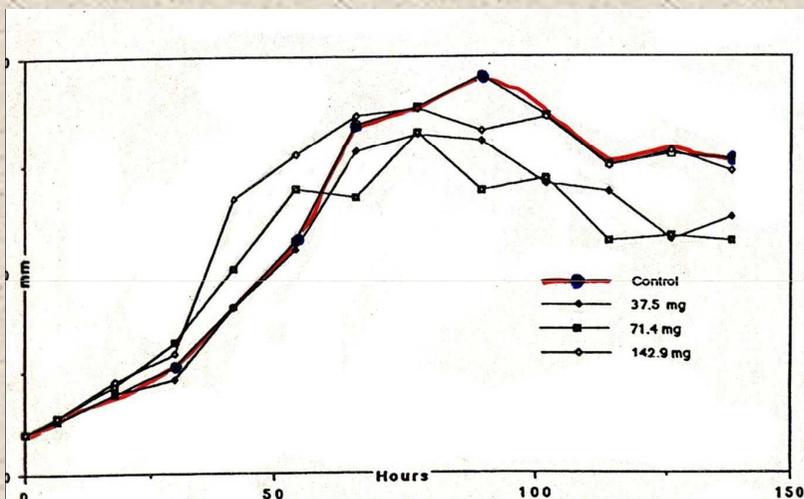
Fuente: Goff et al. (1991)



*Boettcherisca peregrina*  
(Cocaína)

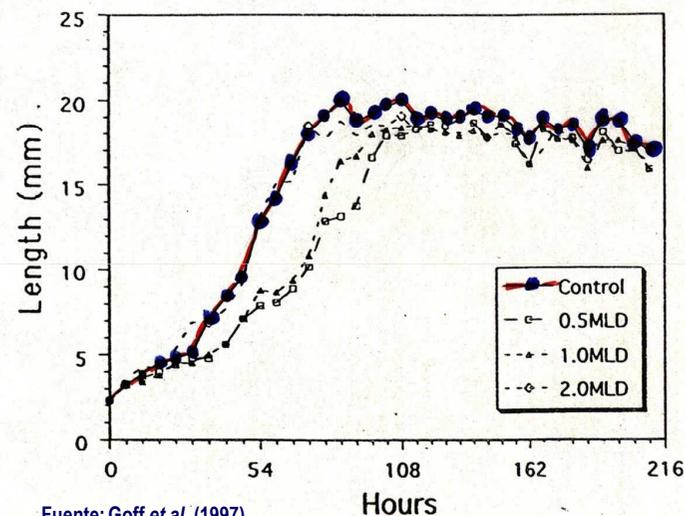
Fuente: Goff et al. (1989)

# METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE DESARROLLO DE CICLOS VITALES ENTOMOTOXICOLOGÍA



*Parasarcophaga ruficornis*  
(Metanfetamina)

Fuente: Goff et al. (1992)



Fuente: Goff et al. (1997)

*Parasarcophaga ruficornis*  
(3,4 metilendioximetanfetamina)

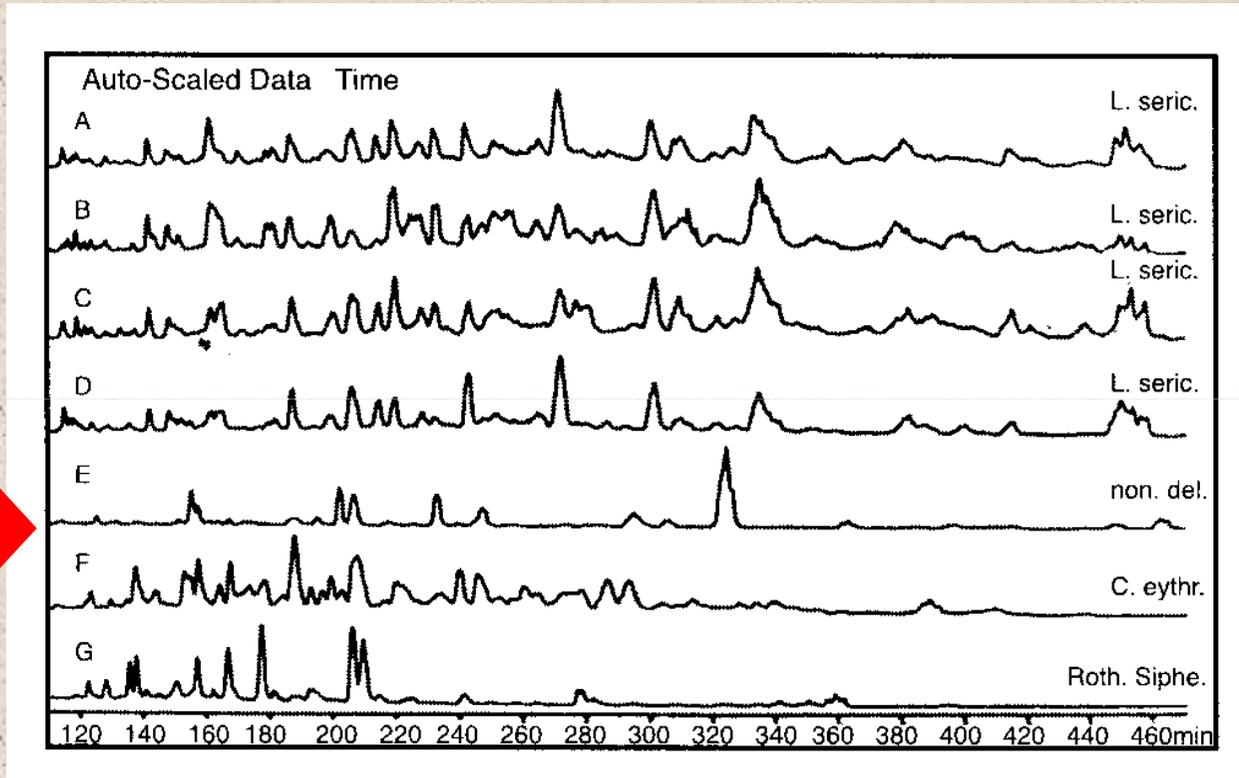


**TIPIFICACIÓN DE ADN EN RELACIÓN CON LA ENTOMOLOGÍA FORENSE**

- Identificación de estados preimaginales de algunos insectos.
- Evidencia asociativa



TIPIFICACIÓN DE ADN EN RELACIÓN CON LA ENTOMOLOGÍA FORENSE



Fuente: Beneke & Wells, (2001)

RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA)



**TIPIFICACIÓN DE ADN EN RELACIÓN CON LA ENTOMOLOGÍA FORENSE**

**Tipo de ADN**

- ADN nuclear
- ADN mitocondrial



**Genes Citocromooxidasa I y II (CO I, CO II)**



TIPIFICACIÓN DE ADN EN RELACIÓN CON LA ENTOMOLOGÍA FORENSE

# Modo de conservación de los especímenes

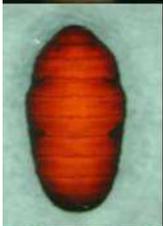
- Secos
- Etanol
- Congelados
- ...



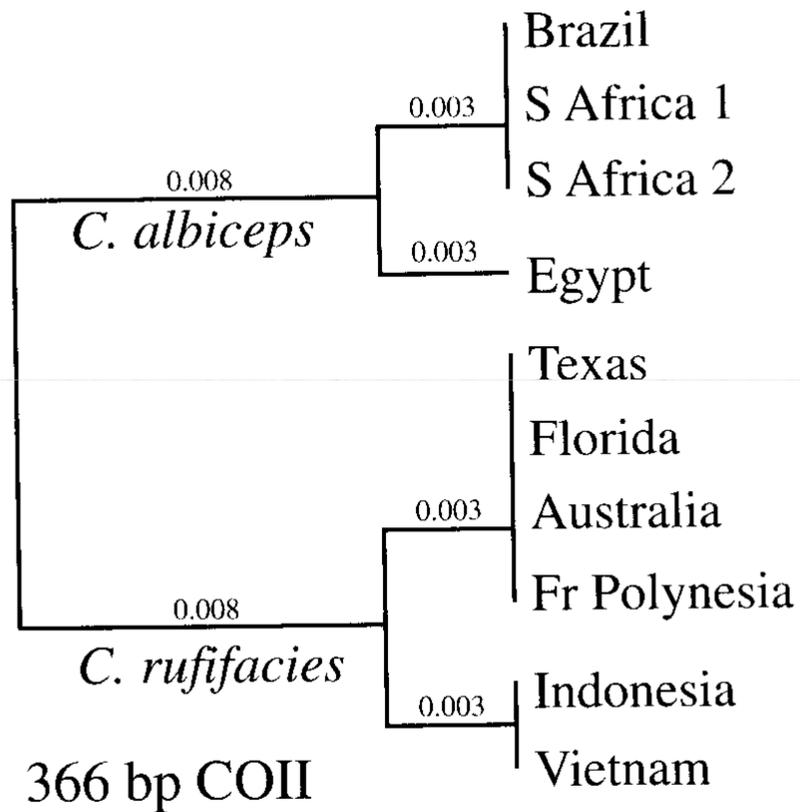
**TIPIFICACIÓN DE ADN EN RELACIÓN CON LA ENTOMOLOGÍA FORENSE**

**Métodos**

- Extracción de ADN
- PCR (Polimerase Chain Reaction)
- Secuenciación de nucleótidos
- Análisis de los datos



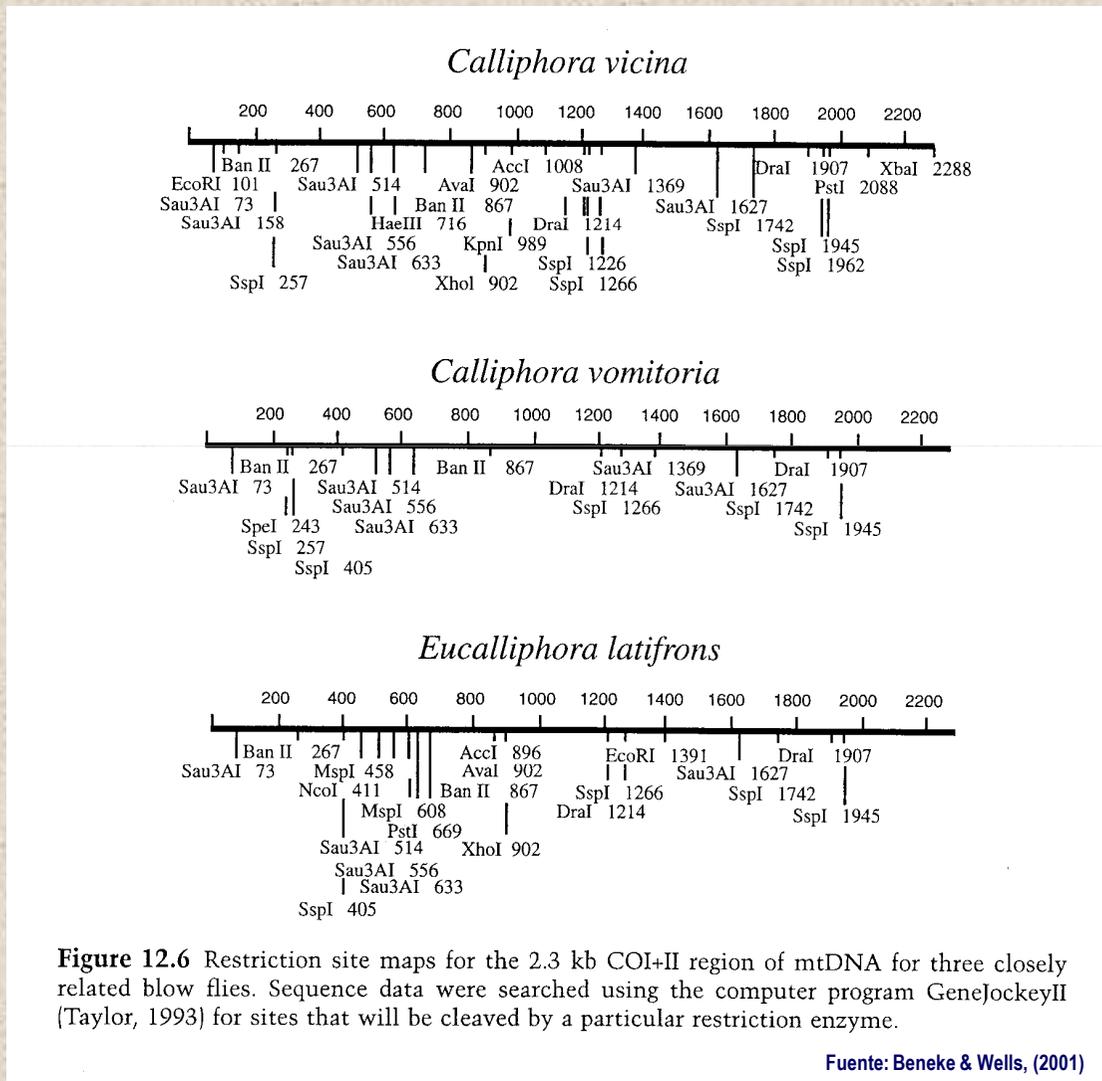
TIPIFICACIÓN DE ADN EN RELACIÓN CON LA ENTOMOLOGÍA FORENSE



Fuente: Wells & Sperling, (1999)



TIPIFICACIÓN DE ADN EN RELACIÓN CON LA ENTOMOLOGÍA FORENSE



## Tema 4. Métodos de recolección y procesado. Metodología de estudios experimentales

### TIPIFICACIÓN DE ADN EN RELACIÓN CON LA ENTOMOLOGÍA FORENSE

**Table 1** Pairwise sequence differences (%) for the analyzed regions of CO I (lower left) and ND 5 (upper right)

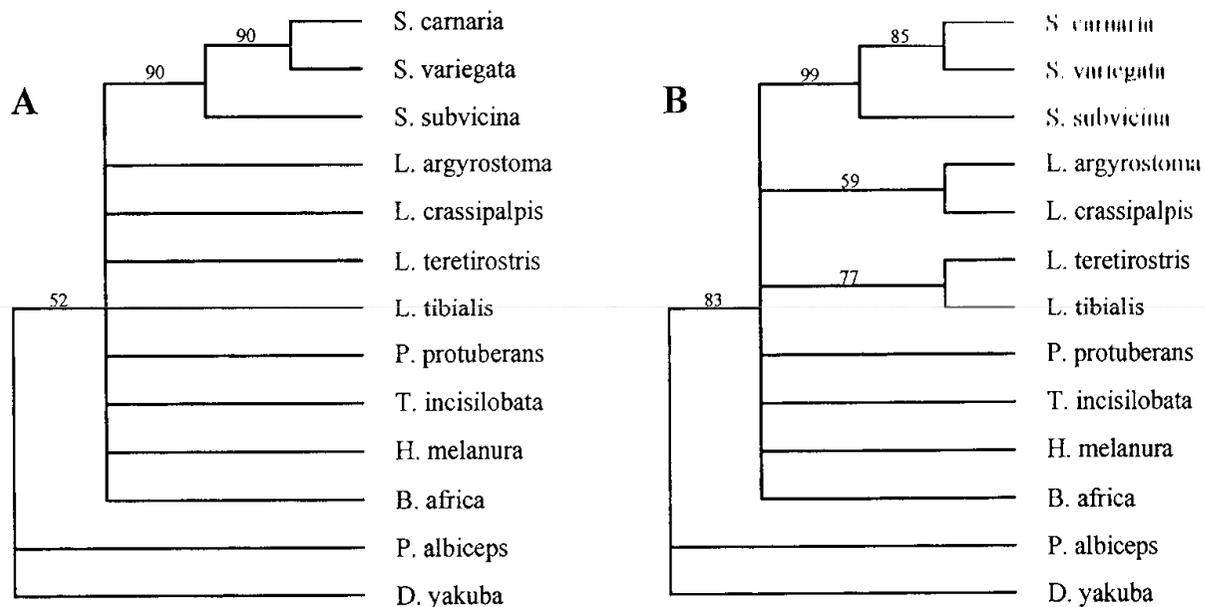
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	<i>Sarcophaga carnaria</i>	–	4.1	2.3	11.9	9.8	10.9	11.1	10.9	10.1	11.9	7.8	8.0	26.2
2	<i>Sarcophaga subvicina</i>	4.7	–	3.9	10.6	9.8	9.3	10.6	10.1	9.1	10.4	8.3	7.0	27.5
3	<i>Sarcophaga variegata</i>	2.7	4.1	–	10.9	9.3	10.4	10.6	11.1	9.3	11.1	7.5	7.0	26.9
4	<i>Parasarcophaga albiceps</i>	8.4	8.1	8.1	–	7.8	9.3	10.4	10.9	10.4	12.2	11.4	8.8	23.3
5	<i>Bercaea africa</i>	9.5	9.1	8.4	9.8	–	7.5	8.5	10.9	8.8	8.8	9.3	7.5	24.6
6	<i>Liopygia argyrostoma</i>	6.8	6.1	7.1	7.8	7.4	–	7.0	11.1	9.8	9.8	8.3	7.0	26.7
7	<i>Liopygia crassipalpis</i>	8.4	8.1	7.8	8.1	6.1	6.1	–	12.4	10.6	11.1	9.1	8.5	26.2
8	<i>Liosarcophaga teretirostris</i>	8.4	7.8	8.8	7.8	8.8	8.1	7.8	–	9.1	13.2	11.4	9.8	27.5
9	<i>Liosarcophaga tibialis</i>	9.1	8.1	8.8	6.4	9.1	7.1	8.8	7.1	–	11.7	11.1	8.0	26.9
10	<i>Pandelleana protuberans</i>	9.8	8.8	8.8	7.8	10.1	9.5	9.5	8.8	9.1	–	10.1	8.8	25.9
11	<i>Thyrsocnema incisilobata</i>	8.4	7.1	7.8	8.8	9.5	7.4	8.8	9.5	8.4	10.5	–	6.5	24.6
12	<i>Helicophagella melanura</i>	9.5	8.4	8.4	8.1	8.8	6.8	7.4	8.4	8.1	8.4	7.1	–	25.6
13	<i>Drosophila yakuba</i>	13.5	14.2	13.5	14.5	12.2	11.8	12.5	13.9	15.2	15.2	14.5	14.2	–

Fuente: Zehner et al. (2004)



TIPIFICACIÓN DE ADN EN RELACIÓN CON LA ENTOMOLOGÍA FORENSE

**Fig. 1** Bootstrap 50% majority rule consensus tree (1,000 replicates) based on the analysed CO I (A) and ND 5 (B) regions. *D. yakuba* was defined as an outgroup



Fuente: Zehner *et al.*(2004)



**TIPIFICACIÓN DE ADN EN RELACIÓN CON LA ENTOMOLOGÍA FORENSE**

Los insectos pueden ser una fuente de ADN del organismo del cual se han alimentado (vivo o muerto)

Análisis de los contenidos estomacales



## Tema 4. Métodos de recolección y procesado. Metodología de estudios experimentales

### Referencias bibliográficas :

- BENEKE M. & WELLS J. 2001. *DNA techniques in forensic entomology* en: en: BIRD J.H. & CASTNER J.L. (eds.) 2001. *Forensic Entomology. The Utility of Arthropods In legal investigations*. CRC Press. Boca Ratón FL
- CATTS, E.P. & HASKELL, N.H. (eds.). 1990. *Entomology & Death: A Procedural Guide*. Joyce's Print Shop, Inc.
- GENNARD D.E. 2007. *Forensic Entomology. An Introduction*. John Wiley & sons Ltd. England.
- GOFF, M.L., BROWN, W.A. & OMORI, A.I. 1992. Preliminary Observations of the Effects of Methamphetamine in Decomposing Tissues on the Development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and Implications of this Effect on Estimations of Postmortem Intervals. *Journal of Forensic Sciences, JFSCA*, Vol. 37, nº 3 pp. 867-872.
- GOFF, M.L., BROWN, W.A., HEWADIKARAM, K.A. & OMORI, A.I. 1991. Effect of Heroin in Decomposing Tissues on the Development Rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae) and Implications of This Effect on Estimation of Postmortem Intervals Using Arthropod Development Patterns. *Journal of Forensic Sciences, JFSCA*, Vol. 36, nº 2, pp. 537-542.
- GOFF, M.L., OMORI, A.I. & GOODBROD, J.R. 1989. Effects of Cocaine in Tissues on the Development Rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae). *Journal of Medical Entomology* 26(2): 91-93.
- GOFF, M.L., BROWN, W.A., OMORI, A.I. & LAPOINTE, D.A. 1993. Preliminary Observations of the Effects of Amitriptyline in Decomposing Tissues on the Development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this Effect to Estimation of Postmortem Interval. *Journal of Forensic Sciences, JFSCA*, Vol. 38, nº 2 pp. 316-322.
- GOFF, M.L., BROWN, W.A., OMORI, A.I. & LAPOINTE, D.A. 1994. Preliminary Observations of the Effects of Phencyclidine in Decomposing Tissues on the Development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae). *Journal of Forensic Sciences, JFSCA* , Vol. 39, nº 1 pp. 123-128
- GRASSBERGER M. & REITER C. 2001. Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the isomegalen- and isomorphen- diagram. *Forensic Science International* 120:32-36
- MARTÍNEZ SÁNCHEZ A.I. 1997. *Ecología de la comunidad de Califóridos (Diptera, Calliphoridae) asociada a un Agrosistema de Dehesa*. Universidad de Alicante – Facultad de Ciencias. Departamento de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales. 146 pp



## Tema 4. Métodos de recolección y procesado. Metodología de estudios experimentales

### Referencias bibliográficas :

- PRADO E CASTRO C., CHINCHORRO D., SERRANO A. & GARCIA MD. 2009. A Modified version of Schoenly trap for collecting sercosaprophagous arthropods. Detailed plans and construction. *Anales de Biología* 31: 1-6
- SMITH, K.G.V., 1986. *A manual of Forensic Entomology*. Trustees of the British Museum (Natural History). London.
- SCHOENLY, K. 1981. Demografic Bait Trap. *Environ. Entomol.* 10: 615-617.
- SCHOENLY, K., GRIEST, K. & RHINE, S. 1991. An experimental field protocol for investigating the postmortem interval using multidisciplinary indicators. *Journal of Forensic Sciences, JFSCA*, Vol. 36, nº 5, pp. 1395-1415.
- TRACQUI A. KEYSER-TRAQUI C. KINTZ & RUDES B. 2004 Entomotoxicology for the forensic toxicologist: much ado about nothing?. *Int. J. Legal Med.* 118:194-196
- WELLS J.D. & SPERLING F.A.H. 1999. DNA-based identification of forensic important Chrysominae (Diptera: Calliphoridae) *Forensic Science International*, 120: 110-115
- ZEHNER R., AMENDT J., SCHÜTT S., SAUER J., KRETTEK R. & POVOLNY D. 2004. Genetic identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). *International Journal of Legal Medicine* 118:245-247

- <http://biodidac.bio.uottawa.ca/>
- <http://bancoimagenes.isftic.mepsyd.es/>

