



Universidad de Concepción

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Programa de Magíster en Ciencias con mención en Zoología

**EFECTOS TOXICOLÓGICOS EN LA TASA DE
DESARROLLO LARVARIO DE *COCHLIOMIA
MACELLARIA* (FABRICIUS, 1775) INDUCIDOS POR
DERIVADOS DE LA CODEINA Y BENZODIZEPINA**

**Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de
la Universidad de Concepción para optar al grado académico de
Magíster en Ciencias con mención en Zoología**

POR: JOAQUÍN IGNACIO FERNÁNDEZ GARRIDO

Profesor Guía: Luis Eduardo Parra Jiménez

Septiembre de 2020

Concepción – Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento



INDICE

1. Introducción.....	1
1.1. Entomología Forense.....	1
1.2. Descomposición.....	3
1.3. Estados de descomposición.....	5
1.4. Gremios ecológicos.....	6
1.5. Intervalo Post mortem (IPM).....	8
1.6. Entomotoxicología.....	15
1.7. Benzodiazepinas y analgésicos opioides.....	19
1.8. Diptera.....	20
1.9. <i>Cochliomyia macellaria</i> (Fabricius, 1775).....	22
2. Materiales y Métodos.....	25
2.1. Localización.....	25
2.2. Metodología de campo.....	25
2.2.1. Instalación de las trampas.....	25
2.3. Metodología de laboratorio.....	28
2.3.1. Crianza en laboratorio de <i>C. macellaria</i>	28
2.3.2. Sustrato.....	29
2.3.3. Tasa de mortalidad toxicológica.....	30
2.3.4. Bioensayo de crecimiento.....	31
2.3.5. Estimación de HGA.....	35
3. Resultados.....	37
3.1. Bioensayos de mortalidad.....	37
3.2. Bioensayos de crecimiento.....	38
3.3. Ciclo de desarrollo.....	41
3.4. Cambios morfológicos por toxinas.....	47
3.5. Duración del ciclo de desarrollo.....	50
3.6. Estimación de Horas Grados Acumulados (HGA).....	54
4. Discusión.....	58
5. Conclusiones.....	69
6. Bibliografía.....	72

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Zona de captura de material biológico, Fundo El Guindo, Concepción.....	27
Figura 2. Trampa entomológica Schoenley.....	27
Figura 3. Diseño metodológico bioensayo de toxicidad.....	31
Figura 4. Incubadoras usadas durante los bioensayos.....	33
Figura 5. Incubadoras usadas durante los bioensayos.....	33
Figura 6. Diseño metodológico para bioensayos de desarrollo.....	34
Figura 7. Longitud promedio de grupo de control y grupos tratados con codeína.....	40
Figura 8. Longitud promedio de grupo de control y grupos tratados con benzodiazepina.....	41
Figura 9. Detalle del cuerpo de una larva L II de <i>C. macellaria</i>	43
Figura 10. Detalle del extremo posterior y espiráculos posteriores de una larva L II de <i>C. macellaria</i>	44
Figura 11. Detalle del extremo frontal y los ganchos bucales de una larva L II de <i>C.</i> <i>macellaria</i>	44
Figura 12. Detalle del espiráculo anterior de una larva L II de <i>C. macellaria</i>	45
Figura 13. Detalle del extremo anterior y los ganchos bucales de una larva L III de <i>C. macellaria</i>	45
Figura 14. Cuerpo entero de una larva LIII de <i>C. macellaria</i>	46
Figura 15. Detalle de los espiráculos posteriores de una larva LIII de <i>C. macellaria</i>	46
Figura 16. Detalle del espiráculo anterior de una larva L III de <i>C. macellaria</i>	47
Figura 17. Espiráculos anteriores de larva tratada con benzodiazepina.....	49
Figura 18. Espiráculos anteriores de larva tratada con codeína.....	49
Figura 19. Duración del estadio de huevo para todos los grupos de estudio.....	51
Figura 20. Duración del estadio LI para todos los grupos de estudio.....	52
Figura 21. Duración del estadio LII para todos los grupos de estudio.....	52
Figura 22. Duración del estadio LIII para todos los grupos de estudio.....	53
Figura 23. Duración del estadio pupa para todos los grupos de estudio.....	53
Figura 24. Duración de los distintos estadios del ciclo de desarrollo de <i>C. macellaria</i> para todos los grupos de estudio CO: codeína, BZ: benzodiazepina.....	55

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de cromatografía realizada al sustrato.....	30
Tabla 2. Porcentajes de mortalidad, mortalidad corregida y duración de ciclo para cada uno de los fármacos y sus respectivas concentraciones.....	37
Tabla 3. Longitud promedio de larvas (mm) y horas de exposición al sustrato (horas) de larvas de <i>C. macellaria</i> CO: codeína, BZ: benzodiazepina.....	38
Tabla 4. Duración (horas) de los ciclos de desarrollo de los diferentes instars de <i>C. macellaria</i> para cada tratamiento CO: codeína, BZ: benzodiazepina.....	51
Tabla 5. Tiempo de desarrollo total, HGA y HDA estimados para todos los grupos de estudio en <i>C. macellaria</i>	54
Tabla 6. Diferencia en horas de los resultados para estimación de IPM mediante el método de HGA en <i>C. macellaria</i> CO: codeína, BZ: benzodiazepina.....	57



RESUMEN:

El potencial del uso de insectos para detectar drogas ha sido ampliamente demostrado por la entomotoxicología. La presencia de drogas en tejidos cadavéricos puede afectar el desarrollo de larvas de moscas necrófagas que se alimentan del sustrato. Esta información resulta de utilidad al momento de trabajar con las estimaciones de intervalos post mortem. La presente investigación evalúa los efectos sobre la mortalidad y el crecimiento de larvas de *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) que fueron sometidas a concentraciones de benzodiazepina y codeína. Para lograr este objetivo se realizaron colectas de la especie estudiada en el área de Concepción con el fin de crear una colonia para la obtención de huevos. Las larvas fueron sometidas, a un bioensayo preliminar en el que se midió el nivel de toxicidad de los fármacos utilizados, para luego realizar el bioensayo en el que se compararon los efectos de ambos fármacos en sus diversas concentraciones sobre el crecimiento de las larvas. Para estimar la relevancia práctica de este efecto en la tasa de crecimiento, se estimaron los valores de HGA para los grupos de control y los grupos tratados con fármacos. Los resultados muestran que: 1) los grupos tratados con benzodiazepina muestran una mayor mortalidad que el grupo de control y los grupos tratados con codeína; 2) los bioensayos de crecimiento muestran que ambas concentraciones de codeína tienen crecimiento acelerado en comparación al grupo de control, mientras que las concentraciones de benzodiazepina mostraron comportamientos diferentes, acelerando y retrasando el crecimiento de manera considerable; 3) se observaron cambios morfológicos en espiráculos anteriores y posteriores, al igual que en las estructuras bucales.

Palabras clave: Entomotoxicología, crecimiento larval, intervalo post mortem.

ABSTRACT:

The potential of using insects to detect drugs has been amply demonstrated by entomotoxicology. The presence of drugs in cadaveric tissues can affect the development of larvae that feed on the substrate. This observation has been studied for a variety of substances such as: heroin, cocaine, various analgesics and benzodiazepines, among others. This information is useful when working with estimates of post-mortem intervals. The present investigation evaluates the effects on mortality and growth of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) larvae that were subjected to concentrations of benzodiazepine and codeine of common prescription. To achieve this objective, collections of the *C. macellaria* were carried out in the Concepción area in order to create a colony to obtain eggs. The individuals obtained from the colony were subjected, in the first instance, to a preliminary bioassay in which the level of toxicity of the drugs used was measured, to later carry out the bioassay in which the effects of both were compared through periodic sampling in their various concentrations on the growth of the larvae. To estimate the practical relevance of this effect on growth rate, HGA values were estimated for the control groups and the drug-treated groups. The results show that: 1) the benzodiazepine-treated groups show higher mortality than the control group and the codeine-treated groups; 2) the growth bioassays show that both concentrations of codeine have accelerated growth compared to the control group, while the concentrations of benzodiazepine showed different behaviors, accelerating and delaying growth considerably; 3) morphological changes were observed in anterior and posterior spiracles, as well as in oral structures.

Key words: Entomotoxicology, larval growth, post mortem interval

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Entomología Forense

La Entomología Forense es generalmente descrita como el estudio de insectos y otros artrópodos asociados con eventos criminales. García-Rojo (2004) define la Entomología Forense como el estudio de los artrópodos que se encuentran cercanos a los cadáveres y que entregan información útil en las investigaciones judiciales, siendo la aportación más común la estimación de la data de muerte de la víctima.

La Entomología forense es la disciplina científica encargada de interpretar información concerniente a muertes usando insectos en función de obtener datos que resultan inaccesibles con los métodos tradicionales de la medicina forense. La Entomología Forense está intrínsecamente ligada a áreas como la taxonomía y la patología forense, cuyo principal uso es la estimación del intervalo post mortem (IPM) sustentado en los estados de desarrollo y la ecología de sucesión de los insectos que forman parte del bioma que genera la materia orgánica en descomposición, más específicamente un cadáver (Wolff *et. al.*, 2001).

La Entomología Forense opera bajo el hecho de que todo cadáver, como sustrato orgánico, está sujeto a transformaciones debido a los procesos de descomposición (Oliva, 1997), producto de los cuales se inicia una colonización por una sucesión de organismos entre los que se pueden distinguir cuatro categorías según Leclercq (1976): 1) necrófagos que se alimentan del cadáver mismo, 2) necrófilos que ejercen dinámicas de depredación y

parasitismo sobre los anteriores, 3) omnívoros que consumen tanto la carroña como a los necrófagos, y 4) oportunistas que son aquellos que usan el cadáver como refugio.

Los organismos que se alimentan de la carroña presentan una dinámica de sucesión faunística temporal relacionada a los estados de descomposición por los que atraviesa un cadáver. Cada uno de estos estados genera distintos cambios físico/químicos que a su vez atraen distintas especies de insectos. Esta constante variación del cadáver genera un fenómeno de secuencia de colonización (sucesión sarcosaprófaga), la que una vez conocida puede preverse con elevada precisión. En este contexto el término “sucesión sarcosaprófaga” es utilizado en referencia a la aparición, desarrollo y reemplazo de grupos y especies por otras en el cadáver (Arnaldos *et al.*, 2005).

La sucesión de insectos es fundamental para establecer el intervalo post-mortem (IPM) basado en el análisis de especies y ciclos fenológicos. Sin embargo, existen aspectos menos desarrollados y de carácter más experimental que el análisis de especies de insectos es capaz de ofrecer entre estas se encuentran: 1) la determinación del lugar donde un individuo ha fallecido y poder concluir si existió algún tipo de traslado desde dicho lugar, 2) estudios toxicológicos para determinar la presencia de determinadas sustancias en el cuerpo de la víctima y por ultimo 3) identificación de víctimas por ADN, ante la falta de tejido cadavérico puede realizarse un examen al tracto digestivo de los insectos y en base a esa evidencia realizar exámenes de identificación genética.

El principal uso de la Entomología en casos de connotación criminal, consiste en el análisis de la sucesión de especies en los procesos de colonización de cadáveres en descomposición para determinar el IPM. Experiencias previas de investigación, permiten determinar el orden de arribo de los diferentes insectos al cadáver. Sin embargo, existen otros métodos de análisis

a insectos para el mismo fin (determinación de IPM), que se centran en el estudio de las larvas y pupas. En estas se analizan aspectos como el tamaño, color y temperatura de los estados inmaduros, basado en la relación de estos aspectos con el tiempo transcurrido desde la ovipostura para establecer un intervalo desde la colonización del sustrato por estas especies, obteniendo un rango estimado de tiempo transcurrido desde el inicio de los procesos de descomposición (Catts y Goff, 1992).

Hay muchos trabajos relativos al proceso de descomposición en cadáveres, pero la mayor parte de ellos no analiza en profundidad la relación entre este proceso y la intervención de la entomofauna asociada que acude al cuerpo muerto. Para que la Entomología Forense pueda ser validada y aceptada en los Tribunales de Justicia como disciplina que permita establecer la data de la muerte con fiabilidad, es necesario disponer de un profundo conocimiento de la taxonomía, fisiología y ecología de los artrópodos de interés forense en el área (García-Rojo, 2004).



1.2 Descomposición

La muerte es un proceso más que un evento. A medida que el ambiente al interior de un cuerpo se vuelve más anóxico, debido a la estasis circulatoria, la desorganización dentro de la química celular conduce a los signos macroscópicos comunes de descomposición (Gill-King, 1997).

Una gran diversidad de organismos están asociados con restos animales en descomposición, esto incluye microorganismos, invertebrados y vertebrados. Todos estos organismos están constantemente compitiendo por alimento (DeVault *et al.* 2003). Los insectos, al igual que los microbios, son más efectivos en climas cálidos y húmedos. Este tipo de climas es ideal

para un rápido crecimiento de bacterias y hongos, donde los artrópodos ayudan aún más a una rápida descomposición al transferir los organismos descomponedores al cadáver, así como también para alimentarse ellos mismos (Zhu *et al.* 2013). Los carroñeros vertebrados pueden superar a los insectos y microbios en estos ambientes; sin embargo, deben acceder rápidamente al cadáver, ya que los insectos y microbios pueden por si solos consumir hasta un 85% de un cuerpo relativamente grande (50 kg) en 7 días a partir del deceso (Spicka *et al.* 2011). Por esta misma razón, los insectos son uno de los factores principales en la descomposición de restos de vertebrados.

Los artrópodos son excelentes descomponedores de tejido blando dada su prevalencia en la mayoría de ambientes naturales. Tienen un papel ecológico fundamental, ya que reciclan gran parte de la biomasa de los cadáveres, asegurando la disponibilidad de nutrientes para otros organismos. Los restos cadavéricos se vuelven atractivos para los insectos casi inmediatamente después de la muerte. Sin embargo, la llegada de las distintas especies seguirá un patrón de sucesión a medida que el recurso alimentario se modifique durante el periodo de descomposición (Anderson, 2010). Esta sucesión ecológica variará según la región en función del clima, dinámicas intraespecíficas e interespecíficas entre otros factores (Kreitlow, 2010). El cadáver, sus habitantes y el ambiente que lo rodea son en sí mismos una comunidad ecológica. En la mayoría de los ecosistemas, los artrópodos estarán presentes durante todo el proceso de descomposición, especialmente especies de dípteros y coleopteros manteniéndose incluso en los restos en un avanzado estado de descomposición (Weatherbee *et al.* 2017).

Los artrópodos son atraídos por la carroña en tan solo minutos después de ocurrido el deceso, principalmente dípteros califóridos y sarcófágidos que llegan a los restos durante las primeras

etapas de descomposición (autólisis) debido a la atracción que ejercen compuestos volátiles que emanan desde los orificios de los restos en descomposición (Zhu *et al.* 2013).

1.3 Estados de descomposición

Uno de los principales aportes de la entomología forense es conocer e identificar los distintos estados del proceso de descomposición. Prácticamente todos los estudios que analizan la descomposición de un cadáver, han intentado dividir el proceso en diferentes estados. Sin embargo, este proceso es continuo y definirlo en estados discretos, caracterizados por fenómenos físicos y oleadas de insectos, es simplemente un modelo de estudio. Sin embargo, aunque sean solo aproximaciones teóricas, estos estados de descomposición resultan útiles pues permiten una fácil organización de informes de investigación y discusión, además de simplificar su aplicación en contextos jurídicos (Velasquez, 2015).

Actualmente, la clasificación más aceptada es la propuesta por Lord y Goff (2003), basada en estudios realizados en Hawái y con una probada efectividad en zonas templadas. Esta clasificación propone cinco estados: fresco, hinchado, descomposición, post descomposición y esquelético.

Estado fresco: comienza en el momento de la muerte y continúa hasta que la hinchazón del cuerpo se hace evidente.

Estado hinchado: se inicia el componente principal de la descomposición, la putrefacción. Las bacterias anaerobias presentes en el intestino y otras partes del cuerpo comienzan a digerir los tejidos. Sus procesos metabólicos dan como resultado la producción de gases, que primero causan una ligera inflamación en el abdomen. A medida que la putrefacción avanza, el cuerpo puede llegar a asumir la forma de un globo completamente inflado.

Estado descompuesto: Si bien los puntos de inicio y finalización de los estados de descomposición son en gran parte subjetivos, existe un evento físico que marca el inicio del estado de descomposición. Este evento corresponde a cuando las actividades de alimentación de las larvas y la putrefacción bacteriana, resultan en la ruptura de la capa externa de la piel y el escape de los gases del abdomen.

Estado post descompuesto: A medida que el cuerpo se reduce a piel, cartílago y hueso, los dípteros se hacen cada vez menos frecuentes, dejando a los coleópteros como los insectos dominantes.

Estado esquelético: Esta etapa se alcanza cuando solo quedan huesos y cabello. Por lo general, no se observan taxones carroñeros en esta etapa.

1.4 Gremios ecológicos

Los gremios de artrópodos carroñeros son necrófagos, depredadores, parásitos, parasitoides y omnívoros. Algunas especies están restringidas a un gremio ecológico, mientras que otras son más versátiles; sin embargo, en lugar de agrupar todos los taxones versátiles al gremio omnívoro-generalista, se divide la fauna de artrópodos carroñeros según el gremio más frecuente (Goodbrod y Goff, 1990).

Necrófagos: los necrófagos estrictos, o sea aquellos que se alimentan directamente de la carroña, incluyen principalmente larvas de Calliphoridae y Sarcophagidae (Diptera) y adultos y larvas de Silphidae, Dermestidae y Trogidae (Coleoptera). Las moscas necrófagas son mucho más frecuentes en las primeras etapas de la sucesión cadavérica, cuando los tejidos blandos se licúan fácilmente lo que hace más fácil obtener nutrientes de la carroña. Dermestidae, Trogidae y Piophilidae tienden a ser más abundantes en estados tardíos de la

sucesión especializándose en las partes más secas de los cadáveres, como tendones y piel momificada. Tinedae está entre los pocos representantes de Lepidoptera que pueden ser consideradas entre los artrópodos carroñeros, ya que sus larvas se alimentan de porciones de carroña a base de queratina como cabello, lana, uñas o cuernos.

Depredadores: los depredadores obligados se alimentan de la arthropofauna necrobionte, incluyendo adultos y larvas de algunos coleopteros de la familia Staphylinidae, Histeridae y Silphidae. La mayoría de los califóridos son en primera instancia necrófagos, pero algunas especies del género *Chrysomya* (por ejemplo *C. rufifaces* y *C. albiceps*) están bien adaptadas para depredar larvas, incluso de la misma especie, que cohabiten en la carroña. Entre los coleopteros, la mayoría de los silfidos son necrófagos, pero tampoco parece tener problemas en ejercer depredación facultativa. Gran parte de los Staphylinidae que se encuentran en las comunidades de artrópodos necrobiontes actúan como depredadores, pero pueden alimentarse de tejido en descomposición, así también parasitar pupas de dípteros (Goodbrod y Goff, 1990).

Parásitos y Parasitoides: los parásitos y parasitoides de otros artrópodos carroñeros generalmente son himenópteros de las familias Braconidae y Pteromalidae. Ocasionalmente también se incluyen los coleopteros estafilínidos del género *Aleochara* como parasitoides de larvas de dípteros. El rango de hospedadores (algunos amplios y otros más reducidos) y el desarrollo dependiente de la temperatura de estos parásitos y parasitoides también los hace ideales para la interpretación forense (Voss *et al.* 2010)

Omnívoros: los omnívoros se alimentan tanto de la carroña como de la fauna que llega a ésta. Este grupo incluye hormigas, termitas, cucarachas, avispas y muchas especies de coleopteros.

Pastores: esta categoría fue recientemente propuesta por Merritt y De Jong (2016) y se refiere a aquellas especies que se ven atraídos por las delgadas películas de microbios asociadas con material en descomposición, más que por la carroña en si misma u otros macro organismos. Por ejemplo, las larvas de la mayoría de Sphaeroceridae (Diptera) son pastores microbiales (Pechal *et al.* 2013).

Accidentales: esta categoría incluye aquellos taxa que usan cadáveres simplemente como una extensión de su hábitat y que no presentan una relación especial con él, pero aun así tienen una considerable presencia.

1.5 Intervalo post mortem (IPM)

El tiempo transcurrido desde la muerte o intervalo post mortem (IPM), es un aspecto crucial en las investigaciones de homicidios y otras muertes imprevistas. Incluso en casos de muerte natural, el tiempo de muerte puede tener implicancias legales (Wells y Lamotte, 2013).

Los cambios post mortem dependen de muchos factores tanto bióticos como abióticos y el IPM puede ser difícil de estimar. Cualquier cambio físico o biológico, cuya progresión ocurre en función del tiempo puede proveer datos potencialmente útiles. En los primeros estados de descomposición, las consecuencias físicas y químicas en este proceso, suelen ser los indicadores más confiables del IPM (Henssge *et al.* 1995). No obstante, a medida que la descomposición avanza los métodos de análisis físico-químico se vuelven menos a la vez que los datos ecológicos adquieren relevancia. Un cadáver atrae variados animales carroñeros vertebrados e invertebrados, así como también la descomposición pueden alterar la flora y fauna del suelo sobre el que están los restos (Wells y Lamotte, 2001).

La principal herramienta para estimar el IPM en restos con estado avanzado de descomposición son las evidencias entomológicas. Para estimar la edad de un estadio inmaduro de un díptero es necesario conocer las fases, los tiempos y diferencias morfológicas de los diferentes estados de desarrollo.

La estimación de la edad de un insecto inmaduro que se ha alimentado de un cuerpo en descomposición entrega un valor de IPM mínimo, ya que las hembras adultas no depositan huevos en hospederos vivos (con algunas excepciones). Además este método no se usa para estimar un valor de IPM máximo debido a que puede transcurrir un periodo incierto de tiempo entre el momento de la muerte y la ovoposición por parte de la hembra. Dependiendo de la especie y las condiciones de la escena del crimen, el grado de desarrollo puede indicar IPM desde menos de un día hasta más de un mes (Smith, 1986).

Otro proceso dependiente del IPM es la sucesión de especies encontradas en un cuerpo en descomposición. La sucesión de insectos en gran parte de los estudios publicados tienen un enfoque descriptivo ecológico más que forense, en que los datos se presentan como un patrón generalizado de sucesión agregada, los que no son muy útiles para estimar intervalos de sucesión (Pérez *et al.* 2014).

El modelo de sucesión incluye información sobre el intervalo de tiempo ocurrido entre la muerte y la aparición de determinadas especies de artrópodos y sus distintos estadios de desarrollo, periodo conocido como intervalo de sucesión (IS). El intervalo de sucesión puede ser usado para estimar el IPM mínimo y máximo. Según Schoenley (1996), el modelo de sucesión más sencillo es aquel en que el entomólogo estima tanto el tiempo de desarrollo larvario como el intervalo entre la muerte y la llegada al cadáver por parte de la especie en

cuestión. Los datos obtenidos mediante análisis de IS y cruzados con los datos de desarrollo larval son altamente precisos hasta un periodo de 52 días, luego pierden algo de precisión.

La actividad entomológica en cadáveres ha sido descrita como una serie de respuestas fisiológicas y conductuales de los insectos en respuesta a señales específicas del cadáver y su flora microbiana asociada (Tomberlin *et al.*, 2011). El uso de restos en descomposición por parte de los insectos está determinado por un proceso de detección neurosensorial y activación conductual, seguido por la búsqueda y localización del cadáver previo a la colonización, definido como el periodo de actividad de insectos (PAI). El intervalo de tiempo transcurrido entre la detección de los restos por parte de un insecto adulto hasta la colonización se define como intervalo de pre colonización (pre-CI). El intervalo pre colonización aún está poco estudiado. Trabajos recientes evidencian que factores como actividad bacteriana, temperatura, humedad y velocidad del viento pueden tener un impacto significativo en la duración del pre-CI en grupos como los califóridos y coleópteros (George *et al.* 2013; Berg y Benbow. 2018). Los insectos adultos representan la fase con más movilidad dentro de una comunidad de artrópodos carroñeros, lo que influye en la distribución geográfica y la interacción entre especies. La movilidad también influye en la velocidad a la cual los individuos de distintas especies pueden llegar a un cadáver y colonizarlo (Mohr y Tomberlin, 2014).

Igualmente hay estudios sobre las interacciones de los insectos carroñeros y bacterias y como éstas pueden modificar comportamientos tales como la ovipostura y la llegada de diferentes especies a los restos (Zhu *et al.* 2013). Las larvas de ciertos dípteros, excretan sustancias antimicrobianas para eliminar bacterias potencialmente patógenas o que inutilicen el sustrato pudiendo alterar su comportamiento y ecología (Tomberlin *et al.* 2012). Las bacterias pasan

por una sucesión comunitaria en cadáveres en descomposición. Los mecanismos que regulan las respuestas conductuales de los dípteros, por ejemplo atracción y colonización, están regulados en parte por compuestos orgánicos volátiles asociados con la degradación microbiana de aminoácidos (Liu *et al.* 2016). Flores *et al.* (2017) sugieren que los microbios pueden ser usados como mecanismo regulador de los patrones de sucesión de artrópodos. Ciertas bacterias asociadas con determinadas especies pueden afectar el desarrollo de las larvas de otras especies competidoras. Estas interacciones pueden dar como resultado que las bacterias patógenas asociadas a restos en descomposición puedan proliferar o verse suprimidas. Por lo tanto, esta compleja relación entre bacterias e insectos puede mediar la aparición y colonización de insectos carroñeros en un cadáver (Tomberlin *et al.* 2017)

Un área de constante preocupación para la entomología forense es el establecer metodologías que disminuyan la incertidumbre en estimaciones del tiempo de desarrollo de los insectos. La incertidumbre o error asociados a la estimación de IPM basado en evidencia entomológica se debe principalmente al desconocimiento del tiempo transcurrido entre el fallecimiento y la colonización inicial del cadáver por parte de los insectos (pre-CI), y por variaciones individuales en el desarrollo o el tamaño de insectos recolectados desde el cadáver (Faris *et al.*, 2016). En los últimos 10 años, la entomología forense se ha enfocado en entender de mejor manera el intervalo de pre colonización, evaluando como los factores abióticos afectan la colonización de dípteros califóridos (George *et al.* 2013) y coleopteros (Matuszweski y Szafalowicz, 2013).

Estudios recientes proponen formulas basadas en temperatura para calcular el intervalo de pre aparición (Tomberlin *et al.*, 2011), que corresponde a un segmento del intervalo pre colonización que no incluye la fase de aceptación; sin embargo otros estudios han mostrado

que no es aplicable (Matuszweski et al. 2014). Por otra parte el intervalo post colonización de las especies de importancia forense está bien estudiado en la progresión de desarrollo y el tamaño del cuerpo de estados inmaduros. Sin embargo, la variabilidad en el desarrollo de cada individuo puede llevar a error en la subsecuente estimación de edad (Owings et al. 2014).

Asumiendo que el acceso al cadáver no está restringido por envolturas, entierro, ropas u otros artrópodos, se asume que la duración de los periodos pre y post colonización están mayormente afectados por la temperatura ambiental, tanto en la tasa de ovoposición de los adultos y la tasa de desarrollo de huevos, larvas y pupas (Zhu *et al.* 2012). Por lo tanto la incertidumbre sobre la temperatura ambiental del área donde fue encontrado un cadáver, así como la temperatura específica a la que este fue expuesto, contribuyen a una estimación poco precisa del intervalo post mortem (Faris *et al.* 2016).

En la estimación del intervalo post mortem, particularmente entre las primeras dos a cuatro semanas, se asume que los insectos se desarrollarán a una razón predecible dada por las condiciones ambientales. Si bien es cierto que existe influencia de la temperatura en el metabolismo y desarrollo del insecto, existen otros factores que pueden afectarlo y que deben considerarse (Baia *et al.*, 2016). Determinar estos factores y sus efectos ha sido uno de los temas de mucho interés en el último tiempo en entomología forense. Los siguientes factores son de especial importancia:

Temperatura: La temperatura tiene un fuerte impacto en la tasa metabólica y de desarrollo de los insectos. Generalmente dentro de cierto rango de temperatura, el desarrollo se acelera a medida que aumenta la temperatura, esto hasta que se alcanza la tolerancia máxima de cada especie, a partir de dicho límite las temperaturas son fatales (Chapman, 1982). Algunas

especies pueden entrar en un estado de diapausa larval en respuesta a estímulos ambientales, lo que puede aumentar el tiempo que dura cada estadio de desarrollo, incluso si la temperatura es relativamente cálida. Especies filogenéticamente cercanas pueden tener distintos comportamientos de diapausa, lo que evidencia la necesidad de un profundo entendimiento del ciclo de desarrollo de los insectos para la estimación de IPM (Ash y Greenberg, 1975).

Masa larvaria: Las larvas de dípteros saprófagos suelen tener una tasa metabólica y de alimentación mayor que los estados inmaduros de otros insectos. Un número elevado de larvas agrupadas en un espacio reducido genera una temperatura considerablemente más alta que la del ambiente causando lo que se conoce como efecto de masa larvaria, fenómeno que se ve aumentado en la temporada fría (Greenberg, 1991).

Variación geográfica: Existe poca investigación disponible sobre el posible efecto de la variación regional en estudios de entomología forense. Cyr (1993), reporta no haber encontrado diferencias significativas en la duración de los distintos estadios de desarrollo de *Phormia regina* (Meigen) en tres regiones de Estados Unidos. En contraste, varios estudios sugieren que el comportamiento de moscas carroñeras puede variar de acuerdo a la región. Por ejemplo, *Chrysomya rufifacies* (Macquart), es comúnmente hallada en vertebrados tanto en carroña como sobre individuos vivos (Wells y Greenberg, 1994), pero en algunas regiones se han registrado ovoposiciones en carroña fresca o en ganado no infectado (Shishido y Hardy, 1969).

Características propias de cada especie: La identificación precisa de las muestras recogidas es prioritaria en un análisis de evidencia entomológica. La implicación más importante para la estimación del IPM es que las especies de insectos carroñeros difieren en tasas de crecimiento, tiempo de llegada y posición dentro del intervalo de sucesión. Sin embargo otros

factores relevantes de la historia natural o fisiológica solo pueden considerarse si existe una correcta identificación. También se ha señalado que aquellos taxa que muestran una presencia intermitente durante el periodo de sucesión cadavérica pueden distorsionar las estimaciones de IPM. Dicha intermitencia puede señalar imprevisibilidad (Schoenly *et al.* 1996).

Sustrato: Las larvas carroñeras pueden desarrollarse en una amplia gama de sustancias. Existen registros de especies como *Megaselia scalaris* (Loew), que se ha encontrado alimentándose de invertebrados vivos y muertos, así como también de una variedad de materia orgánica, incluyendo pintura. Sin embargo su tasa de desarrollo varía de manera considerable dependiendo del sustrato, siendo mucho más elevada al alimentarse de carne en descomposición de vertebrados (Disney, 1994). Por lo tanto, es altamente probable que un cambio extremo en el tipo de sustrato, afecte en la tasa de desarrollo (Goff *et al.* 1991).

Colonización previa a la muerte: La miasis corresponde a la infección de un vertebrado vivo por parte de un insecto carroñero (James, 1947). Aunque esta situación es poco común, si un individuo ya se encontraba infestado al momento de morir, los insectos presentes en ese momento pueden causar una sobrestimación del IPM.

Método de preservación: El tratamiento dado a la muestra, así como también el tipo de fluido usado para preservarlas puede alterar la longitud de las larvas recolectadas. Estas alteraciones deben ser tomadas en cuenta si las muestras son preservadas con métodos y materiales distintos a los típicamente estudiados (Tantawi Greenberg, 1993).

Drogas y Toxinas: Los químicos en la víctima, como aquellos que pueden causar intoxicación, pueden tener una variedad de efectos. El proceso de descomposición por acción de los insectos puede verse alterado dependiendo de la sustancia y su concentración. La

presencia de dichas sustancias puede ser confirmada por un análisis toxicológico a tejido de la víctima o de los insectos.

1.6 Entomotoxicología

La entomotoxicología es una rama reciente de la entomología forense que se encarga del uso de análisis toxicológicos de insectos sarcosaprófagos en función de identificar drogas y toxinas presentes en los distintos tejidos de un cadáver. También estudia los efectos que las drogas tienen en el ciclo de vida de los insectos y de esta manera estimar correctamente el intervalo post mortem (Introna *et al.*, 2001).

Las muertes relacionadas con el abuso de drogas han aumentado exponencialmente en varios países. Generalmente el cuerpo de las víctimas permanece sin ser descubierto por periodos que suelen ir desde unos pocos días hasta meses después de haber fallecido (Goff y Lord, 1994).

Dichas sustancias pueden ser detectadas en larvas, siempre y cuando las tasas de acumulación metabólicas excedan las tasas de excreción. Actualmente no se entiende del todo, como ocurren estos procesos en las larvas. Sin embargo, estas alteraciones deben tomarse en cuenta y determinarse para estimar con precisión los IPM.

Los insectos y principalmente las larvas de dípteros, han sido frecuentemente usados ante la ausencia de muestras para análisis toxicológicos en casos de avanzada descomposición, e incluso han mostrado algunas ventajas sobre el uso de tejidos o fluidos corporales. Es posible detectar drogas y toxinas en insectos que se alimentan directamente del cuerpo o de algún tejido corporal, siempre que no hayan estado expuestos a fuentes de contaminación por otras sustancias (Kintz *et al.* 1990). El análisis de insectos encontrados en restos descompuestos

es útil no solo como evidencia criminal o como herramienta de estimación de intervalo post mortem (IPM), sino también como un indicador cualitativo y cuantitativo para la identificación de drogas (Beyer *et al.* 1980). Los dípteros en estadio de larva que se alimentan de cadáveres contaminados, ingieren también las drogas y toxinas tomadas recientemente por el individuo antes de fallecer. Estas sustancias se transfieren a través de la cadena alimenticia, incluso llegando a acumularse en artrópodos que depredan o parasitan las larvas de dípteros (Introna *et al.* 2001).

Las muestras de insectos homogeneizadas pueden analizarse con bastante facilidad a través de procedimientos toxicológicos como: análisis radio inmune (RIA), cromatografía de gases (GC), cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y análisis de masa de gases (GC-MS). El procedimiento más indicado es fraccionar las muestras mediante cromatografía seguido de análisis de espectrometría de masas porque su precisión combinada permite separar, identificar y cuantificar sustancias ilícitas en cantidades mínimas (Moore y Casale, 1994).

Las ventajas de usar larvas en vez de tejidos corporales se pueden ver en las cromatografías. Los cromatogramas obtenidos de muestras de larvas presentan picos endógenos menos contaminados que los cromatogramas de extractos de un cuerpo humano. Esto es particularmente útil si el cadáver está demasiado descompuesto, además de que los insectos son fáciles de obtener y mantener en laboratorio (Kintz *et al.* 1990).

Algunos experimentos han descrito una correlación directa entre la concentración de drogas en larvas con la concentración de los tejidos de donde fueron extraídas, no obstante otros estudios no han encontrado dicha relación o incluso han demostrado que la concentración encontrada en larvas es significativamente menor que en las muestras corporales. Sadler *et*

al. (1997) realizaron estudios sobre los efectos de analgésicos y barbitúricos en larvas de *Calliphora vicina* y concluyeron que es imposible predecir sobre la base de la estructura química qué fármacos son susceptibles de ser detectados. Por esta razón, la ausencia de toxinas en muestras entomológicas no siempre significa que no haya sustancias en el cuerpo.

Varios hallazgos experimentales parecen demostrar correlaciones cualitativas y cuantitativas entre concentraciones de sustancias en larvas, tejidos, pupas y heces de insectos. Sin embargo Pounder (1991) no encontró ninguna correlación entre las concentraciones toxicológicas de larvas y tejidos, sugiriendo que las larvas tendrían una relevancia más de tipo cualitativo, ya que los análisis de tipo cuantitativo no contarían con la precisión necesaria. Esto se puede apreciar incluso en investigaciones criminales modernas donde se han encontrado diferencias en la concentración de toxinas entre fluidos humanos recolectados poco después de la muerte de la víctima y los insectos recolectados días o meses después de hallado el cadáver. Esto puede ser el resultado de alguna redistribución interna del medicamento a través del cuerpo después de ocurrida la muerte, alteraciones del medicamento y variaciones farmacocinéticas entre especies de artrópodos y sus diferentes estados de desarrollo o incluso el uso simultáneo de varios otros medicamentos (Tracqui *et al.* 2004).

Además la concentración del fármaco varía según el tipo de tejido y la variabilidad de sitio a sitio dentro de un órgano. Williams y Pounder (1997) observaron que tejidos como el músculo esquelético no son homogéneos con respecto a las concentraciones de diferentes fármacos en casos de sobredosis mortal. Tales hallazgos sugieren que los resultados pueden verse afectados por esta variabilidad complicando especialmente los análisis cuantitativos.

De esta manera, se puede encontrar una variación significativa en la concentración de un amplio espectro de sustancias dependiendo del lugar de donde se extraen muestras. En

análisis toxicológicos realizados en individuos vivos, incluso se han encontrado variaciones según se usa sangre arterial o venosa. Entonces, las concentraciones pueden variar considerablemente dentro un mismo órgano o región de un cadáver, lo que puede causar que larvas que colonizan un mismo cadáver, pero son recolectadas de distintos tejidos, pueden arrojar diferencias importantes en análisis toxicológicos (Knight, 1991).

Se ha propuesto que los sustratos contaminados pueden causar alteraciones sobre la morfología de larvas de dípteros (Introna *et al.* 2001). Los resultados sugieren que la mayoría de las alteraciones involucran deformaciones y/o disminución de tamaño. Estas se concentran en cuatro estructuras: las estructuras bucales, los espiráculos anteriores, el extremo posterior y los espiráculos posteriores (Shaheen y Fathy, 2008).

Dentro de las sustancias tanto lícitas como ilícitas que pueden causar muerte por sobredosis, los fármacos son un grupo de extrema atención, puesto que a pesar de que su venta y distribución está regulada, el abuso y la adquisición ilegal son temas frecuentes. Entre estos medicamentos, los que más se asocian a sobredosis son los calmantes con componente activo de benzodiazepina y los analgésicos opioides.

Por ejemplo, medicamentos como el clonazepam y el diazepam, contienen benzodiazepina. Carvalho *et al.* (2001) evaluaron los efectos del diazepam en el desarrollo del ciclo de vida de moscas califóridas y se encontró que aceleraba las tasas de desarrollo de insectos en comparación con los grupos de control, aunque no se encontró una correlación directa entre el tipo de sustrato hepático y las concentraciones toxicológicas de las larvas. Entonces las larvas que se alimentan de los tejidos que contienen el fármaco se desarrollaron más rápido que aquellas larvas no expuestas al fármaco, el tiempo necesario para la pupación y la

aparición de adultos fue considerablemente más corto, lo que sugiere que el fármaco es capaz de acelerar el desarrollo de estas moscas y por lo tanto alterar una posible estimación de IPM.

1.7 Benzodiazepina y analgésicos opioides

Benzodiazepina: constituyen uno de los grupos de medicamentos más prescritos en la práctica médica sin embargo su uso indiscriminado con resultados de daño a la salud o muerte es frecuente. El abuso de derivados de benzodiazepina es la primera causa de intoxicación con medicamentos en Chile con un 40,3% de los casos documentados (Mena *et al.*, 2004). Es recurrente que drogas asociadas a prescripciones de salud mental, como las benzodiazepinas, los antidepresivos y antipsicóticos, estén presentes en sobredosis con resultado de muerte (Jones *et al.* 2013).

Las benzodiazepinas se tienden a absorber por vía oral. La velocidad de absorción depende de la liposolubilidad (entre 30 y 240 minutos). Por vía intramuscular la absorción es lenta e irregular. En su distribución se unen en elevada proporción (90%) al sitio II de la albúmina humana pero su elevado volumen de distribución hace que su desplazamiento de las proteínas no tenga consecuencias nocivas importantes salvo en ocasiones especiales como casos de insuficiencia renal y quemados. Estos fármacos se metabolizan a nivel microsomal hepático por oxidación, desalquilación e hidroxilación. Después son conjugados con glucurónico o sulfato y posteriormente eliminados por el riñón. Los metabolitos hidroxilados y desalquilados son muy activos, algunos de ellos con vidas medias superiores a las del fármaco original. Algunos autores dividen las benzodiazepinas según su vida media en 3 grupos: de acción ultracorta, corta y larga (Gaméz y Irala, 1996).

Codeína: dentro del grupo de los analgésicos opioides, son la principal fuente de intoxicaciones a nivel farmacológico con resultado de muerte en Estados Unidos en 75% de los casos registrados (Jones *et al.*, 2013). Recientemente a nivel global, se ha observado un elevado aumento de la sobredosis por codeína, en parte atribuido a la alta tasa de consumo recreacional de codeína entre jóvenes en forma de tragos conocidos como “Purple Drank”, por lo que se han expuesto en varias ocasiones sus efectos nocivos sobre la salud (Cone, 2006; Van Hout, 2014), lo que ha generado debate sobre la creciente tendencia a prescribir opiáceos de manera regular.

Clínicamente la codeína es metilmorfina (opiáceo), utilizada como analgésico, sola o asociada a otros analgésicos-antiinflamatorios, o como antitusígeno y antidiarreico. Pocos opiáceos poseen una potencia analgésica tan elevada como la codeína por vía oral. La farmacocinética de la codeína es independiente del tipo de sal, ya sea fosfato o sulfato. El inicio de acción se produce dentro de los 10-30 minutos después de la administración intramuscular y 30-60 minutos después de la administración oral. Los efectos analgésicos máximos se alcanzan después de 30 a 60 minutos después de la administración intramuscular y 60 a 90 minutos después de la administración oral y se mantienen durante 4-6 horas. La actividad antitusiva pico se alcanza a las 1-2 horas de la administración oral y puede durar 4-6 horas (Lafarga y Cruz, 1993).

1.8 Diptera

El orden Diptera está compuesto mayormente por aquellas especies denominadas moscas o moscardones, de las cuales se registran alrededor de 153.000 especies en 150 familias donde alrededor de 31.000 son endémicas de la región Neotropical, representando un quinto de la diversidad de moscas a nivel mundial (Evenhuis *et al.* 2007).

Los dípteros de importancia forense se encuentran en su mayoría en el suborden Brachycera, el que está dividido en tres subórdenes, de los cuales el más relevante en términos forenses es Muscomorpha. Este grupo se caracteriza por tener antenas con setas y tres estados larvales en que la distinción morfológica entre cuerpo y cabeza es prácticamente inexistente. Destaca en este grupo la familia Calliphoridae.

Calliphoridae es una de las familias más extensas de moscas de tamaño medio, con más de 1000 especies a nivel mundial distribuidas en 6 subfamilias y 150 géneros aproximadamente. Rognes (1997), indica que dicha familia sería parafilética, ya que no habría autapomorfías que la definan. Esta familia incluye las típicas moscas verde botella (*Phaenicia* y *Lucilia*), azul botella (*Calliphora*), así como también los gusanos barrenadores (*Cochliomyia*). Además de su importancia forense, esta familia es extremadamente valiosa en el reciclaje de nutrientes y la ecología comunitaria en función de su eliminación y descomposición de los cadáveres de vertebrados (Pechal y Benbow, 2016).

La mayoría de las especies de califóridos adultos tienen una coloración metálica, con colores como verde, azul, café y negro.

Las larvas de califóridos tienen un tamaño entre 8 a 23 mm de largo. Usualmente tienen coloración blanca o crema. El segmento terminal del cuerpo de la larva tiene entre 6 o más protuberancias cónicas, dependiendo de la especie. En este segmento también se encuentran los espiráculos posteriores, que funcionan como los aparatos primarios de respiración. Las pequeñas hendiduras al interior de cada espiráculo se inclinan hacia el centro de la larva, lo que las diferencia de las larvas sarcófagidas, donde estas hendiduras se inclinan de manera opuesta (Artigas, 1994).

Las moscas califóridas son atraídas por carroña en descomposición y excremento, con algunas especies incluso habitando heridas abiertas (miasis) (Byrd y Castner, 2001). Junto con Sarcophagidae y Muscidae, son los grupos más importantes al momento de obtener información que permita estimar el intervalo post mortem (Benecke, 1998).

Los califóridos están entre las primeras especies en descubrir y colonizar restos en descomposición de vertebrados. En estudios experimentales, se han registrado califóridos a pocos minutos de la exposición de restos descompuestos. Oviponen generalmente grandes cantidades de huevos en lugares abiertos del cadáver, como la boca, la nariz y otras cavidades corporales, también en las áreas con heridas expuestas (Introna *et al.* 1998). Debido a esto, las formaciones de masas larvales con evidente adelanto en el grado de desarrollo pueden ser indicativo de lesiones pre o perimortem (Greenberg, 1991).

1.9 *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775)

Cochliomyia macellaria es una especie de díptero califórido necrófago de importancia médica, veterinaria y forense que está ampliamente distribuida en la región Neotropical con reportes desde el sur de Canadá y el área continental de Estados Unidos. Los adultos son fácilmente diferenciados de la mayoría de otros califóridos debido a su coloración azul-verde metálico, con tres franjas longitudinales pronunciadas de color verde oscuro en la superficie dorsal del tórax entre la base de las alas; estas franjas no se extienden hasta el abdomen (Byrd y Castner, 2001). Los especímenes de esta especie se pueden identificar fácilmente por la presencia de sétulas pálidas fuera de la hilera de setas frontales y el microtomentum plateado pronunciado sobre las áreas laterales del quinto terguito. Estos caracteres pueden ser difíciles de observar en especímenes viejos y dañados. Para las hembras, la basicosta amarillenta es

distintiva. El número de setas orbitales proclinadas es variable, usualmente dos de cada lado, algunas veces, una sola seta en uno o en ambos lados (Whitworth, 2006).

Es común encontrarla en ambientes con influencia antrópica incluyendo el interior de las casas, y generalmente se alimenta de materia orgánica en descomposición y heces humanas. Se alterna entre los sustratos y la comida humana, convirtiéndose así en un vector eficiente de patógenos entéricos como la Salmonela (Alvarez Garcia *et al.* 2017). *C. macellaria* es considerada generalmente como un gusano barrenador secundario, ya que causa miasis facultativa cuando sus larvas se alimentan de tejido necrótico (Byrd y Butler, 1996).

Estas miasis han sido documentadas en humanos y animales domésticos como perros, caballos, pollos, vacas, ovejas y cerdos. Sin embargo, esta especie podría ser usada en terapia larval de manera efectiva y segura, ya que los inmaduros se alimentan solo del tejido lesionado y facilitan su recuperación (Masiero *et al.* 2019)

En un contexto forense, *C. macellaria* es capaz de colonizar cuerpos en descomposición, sus larvas se han encontrado en cuerpos humanos y en varios estudios sucesivos de fauna cadavérica. En casos forenses, en donde ésta especie está involucrada, el conocimiento del ciclo de su vida y duración de las etapas de desarrollo es esencial para calcular el intervalo post-mortem (IPM, tiempo que ha transcurrido desde la muerte y el descubrimiento del cadáver). Este puede ser calculado, por ejemplo, estudiando el tiempo de eclosión del huevo o utilizando el parámetro de crecimiento y longitud larval (Alvarez *et al.*, 2017).

C. macellaria presenta una alta abundancia en los meses de verano, siendo el californido con mayor presencia en la zona de Concepción durante enero y febrero (Gomes *et al.*, 2017), por

lo que el estudio de su ciclo de desarrollo y los factores que puedan alterarlo, resultan de gran importancia para futuros estudios e investigaciones.

Considerando los antecedentes antes mencionados: 1) la importancia de los dípteros en el proceso de descomposición cadavérica; 2) la estimación del IPM a través de los tiempos de duración de cada uno de los estados y estadios de desarrollo de las especies estudiadas, y 3) las variaciones en el desarrollo de las especies debido a factores como exposición de estadios larvales a diferentes toxinas, es esperable que el efecto toxicológico de derivados de benzodiacepina y codeína modifiquen de manera la tasa de crecimiento y desarrollo larval de *C. macellaria*, y que dicho efecto altera los resultados de estimación de IPM a través del modelo predictivo HGA. Por lo que la presente propuesta tiene por finalidad estudiar los efectos sobre la mortalidad y la tasa de crecimiento de larvas de *C. macellaria* sometidas a diferentes concentraciones de dos diferentes fármacos (Benzodiazepina y Codeína) de uso frecuente por la población en Chile



2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Localización

El proceso de obtención de muestra se realizó en los terrenos del fundo El Guindo, ubicado a un costado de la Universidad de Concepción ($36^{\circ}49'55.10''$ S y $73^{\circ} 1'45.53''$ O, a 130 m sobre el nivel del mar) (Figura 1). Se realizaron jornadas de colectas de larvas tres veces a la semana en el periodo del 15 de enero al 15 de abril de 2019.

El lugar consistía en un fragmento de bosque con una amplia diversidad de flora nativa, inserto en una matriz de plantación forestal. El sitio específico donde se instalaron las trampas estaba mayormente compuesto por eucalipto (*Eucalyptus globulus*, Labill, 1800), pino insigne (*Pinus radiata*, Don, 1836) y pino marítimo (*Pinus pinaster*, Ait, 1789).

2.2 Metodología de campo

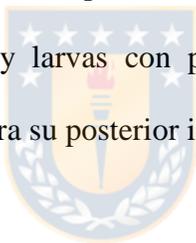
2.2.1 Instalación de trampas

Se instalaron 3 trampas entomológicas Schoenly, cada una con 2 agujeros de entrada y 4 agujeros equipados con botellas de 250 ml para atrapar adultos (Figura 2). En cada una se depositó como cebo 1 kg de músculo abdominal de cerdo (músculo oblicuo externo del abdomen) y 25 g de carne molida en cada botella. Las trampas fueron ubicadas en una disposición triangular con una distancia de 4 metros aproximadamente entre sí, en lugares que aseguraran la estabilidad de las trampas y tiempos similares de exposición a luz solar. Para evitar complicaciones causadas por la intromisión de fauna carroñera vertebrada, se fijaron las trampas al suelo con estacas de fierro de 1 m de largo y se cerraron las tapas de las trampas con cerrojos. También para evitar la entrada de roedores, se enrolló alambre de

púas en los agujeros de entrada, dejando solo el espacio suficiente para permitir la entrada de insectos.

También se instalaron cebos secundarios para reducir la presencia de especies que pudieran depredar o parasitar a aquellos individuos relevantes para el estudio y reducir su frecuencia. Estos cebos consistieron en trampas caseras de insectos, hechas con botellas desechables de 1 l y amarradas con alambre a árboles circundantes al sitio de muestreo, en los cuales se depositaban 100 g de despuntes de carnicería. Estos cebos se reponían cada 6 días.

La recolección de individuos adultos se realizó mediante la extracción de las botellas ubicadas en los agujeros de las trampas. Estas se recolectaban cada 3 días para ser transportadas a laboratorio y reemplazadas por otras botellas con sustrato (carne molida). Igualmente se recolectaron huevos y larvas con pinzas desde el mismo cebo, siendo depositadas en frascos de muestras para su posterior identificación.



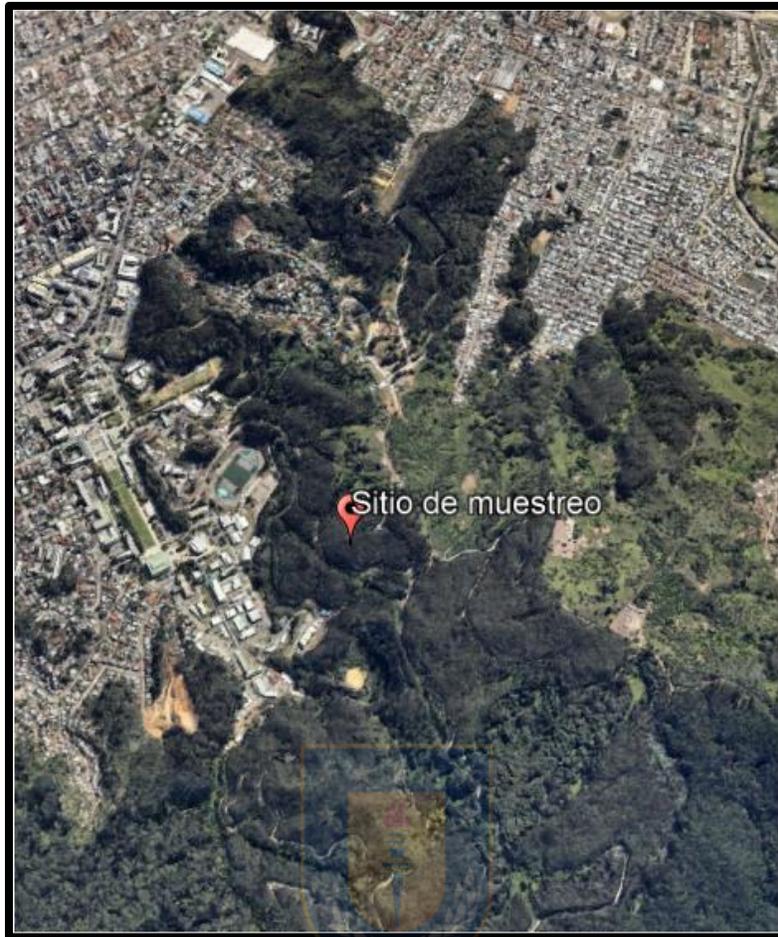


Figura 1. Zona de captura de material biológico, Fundo El Guindo, Concepción.



Figura 2. Trampa entomológica Schoenley

2.3 Metodología de laboratorio

2.3.1 Crianza en laboratorio de *C. macellaria*

En primer lugar se preparó el contenedor utilizado como ambiente para criar los insectos con los que se trabajaría posteriormente. Este consistía en una caja transparente plástica con una capacidad de 60 l, en la que se dispuso una capa de 2 cm de tierra para ser usado como sustrato de pupación. Para asegurar un correcto suministro de aire se realizaron agujeros de 0,5 m en los costados de la caja, donde además se dispuso un pequeño ventilador conectado a una batería para hacer circular el aire y mantener una proporción adecuada de temperatura y humedad. Para la mantención de los individuos se agregaron recipientes con leche en polvo mezclada con sacarosa y algodones humedecidos en agua los que se cambiaban cada día.

Una vez recolectadas las muestras, se procedió a identificar y separar a los miembros de *C. macellaria*. En el caso de los individuos adultos, al ser compleja su manipulación, estos eran dormidos mediante un eterizador. Una vez inmóviles, se procedía a identificar a los individuos bajo lupa siguiendo las claves propuestas por Artigas (1994). Los ejemplares de *C. macellaria* se depositaron en una caja plástica, si por el contrario era un ejemplar de otra especie, este se dejaba libre. La identificación de larvas, al ser más fáciles de manipular, no era necesario someterlas al éter, por lo que pasaban directamente a ser identificadas. Al igual que los adultos, si el ejemplar correspondía a una larva de *C. macellaria*, este se depositaba en una caja plástica y si no lo era se dejaba libre. Este proceso se repitió cada vez que se incluyeron nuevos ejemplares obtenidos de las jornadas de recolección.

Una vez identificados todos los individuos pertenecientes a *C. macellaria* se les suministró hígado fresco de res, pasados siete días de la emergencia de los adultos, con la finalidad de sincronizar la ovoposición de las hembras y lograr una mayor cantidad de huevos por masa. Este proceso fue necesario debido a que la maduración sexual de las hembras no siempre se da al mismo tiempo. Las larvas para los bioensayos se obtuvieron de la eclosión de los huevos obtenidos.

2.3.2 Sustrato

Con el fin de prevenir un desarrollo alterado por otros fármacos ajenos a los estudiados en el presente proyecto, el sustrato utilizado en los bioensayos (hígado de res) se seleccionó en base a poseer la menor concentración de hormonas o antibióticos de uso común en la industria ganadera. Esto mediante la obtención del sustrato a través granjas no industrializadas, donde el uso de los fármacos mencionados es menor. Sin embargo, a fin de corroborar totalmente la ausencia de otro tipo de fármacos en el sustrato, se encargó un análisis químico a la empresa “Laboratorios Eurofins” a una muestra de 700 g del hígado que posteriormente fue usado en los bioensayos. Se realizó un análisis de cromatografía líquida con espectrometría de masas confirmando la ausencia de 16 tipos de benzimidazoles de uso común (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de cromatografía realizada al sustrato.

Producto:	HIGADO VACUNO	Dirección del Laboratorio :	Avda. Parque Antonio Rabat Sur 6165, Vitacura, Santiago Province
Descripción de la muestra:	HIGADO VACUNO	Temperatura de recepción:	-2.5 °C
Muestra recepcionada :	04/06/2019	Guía de remisión :	ORDEN DE SERVICIO 29-05-2019
		Fecha de inicio de análisis:	11-06-2019 13:19
		Fecha fin de análisis:	14-06-2019 13:34
Fecha de recepción	04-06-2019 11:00:00	Lugar de Analisis (Sede)	Santiago
Entidad muestreadora	EL CLIENTE		

Cromatografía		Resultados	LOD	LOQ
VI01Z	VI	Bencimidazoles en hígado por LC/MSMS		
		Método: Método interno, LC-MS/MS / PTCA03 Rev. 16		
		Fecha de inicio de análisis: 11/06/2019 13:19		
(m)	Albendazol	ND µg/kg	5	10
(m)	Albendazol Sulfon	ND µg/kg	1	2
(m)	Albendazol Sulfoxido	ND µg/kg	1	2
(m)	Albendazol-2-amino Sulfon	ND µg/kg	3	6
(m)	Fenbendazol	ND µg/kg	5	10
(m)	Flubendazol	ND µg/kg	5	10
(m)	Ketotriclabendazol	ND µg/kg	5	10
(m)	Mebendazol	ND µg/kg	5	10
(m)	Oxfendazol	ND µg/kg	5	10
(m)	Oxfendazol sulfona	ND µg/kg	5	10
(m)	Oxibendazol	ND µg/kg	5	10
(m)	Tiabendazol	ND µg/kg	5	10
(m)	Tiabendazol-5-hidroxi	ND µg/kg	5	10
(m)	Triclabendazol	ND µg/kg	5	10
(m)	Triclabendazol sulfona	ND µg/kg	5	10
(m)	Triclabendazol sulfoxido	ND µg/kg	5	10

OBSERVACIONES
Opiniones e interpretaciones:
Ensayo acreditado por A2LA, certificado 4744-01 según ISO/IEC 17025:2017
ND: No Detectado / LOD: Límite de detección / LOQ: Límite de cuantificación.

2.3.3 Tasa de mortalidad toxicológica

Se analizó la potencial mortalidad de las concentraciones de benzodiazepina (Clonazepam® de 2,0 mg, MINTLAB Co. S.A.) y codeína (Codetol® de 120 ml, Laboratorio Chile) sobre larvas de *C. macellaria* mediante un bioensayo preliminar (Figura 3). Ambos fármacos fueron donados por el Dr. Víctor Díaz Valenzuela, médico legista del Servicio Médico Legal.

El bioensayo para evaluar mortalidad consistió en 15 frascos de 30 larvas cada uno, divididos en grupos de 3 por fármaco y concentración, (Control, CO 25%/50% y BZ 25%/50%) con 3 repeticiones cada una, incluyendo un grupo de control que no estuvo expuesto a ningún fármaco. Se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura ($27 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad

relativa ($70\pm 10\%$) y fotoperiodo (12:12). No se manipularon estas unidades hasta la emergencia de los adultos, las unidades experimentales fueron contrastadas con el grupo de control y revisadas hasta la emergencia de los adultos sobrevivientes o hasta que todos los individuos de cada muestra estuvieron muertos (cero sobrevivencia).

Una vez recolectada esta información se determinó la tasa de mortalidad utilizando la fórmula de Abbott (1925):

$$\text{Mortalidad} = (\% \text{ Mort. Tratadas} - \% \text{ Mort. Control} / 100 - \% \text{ Mort. Control}) * 100$$

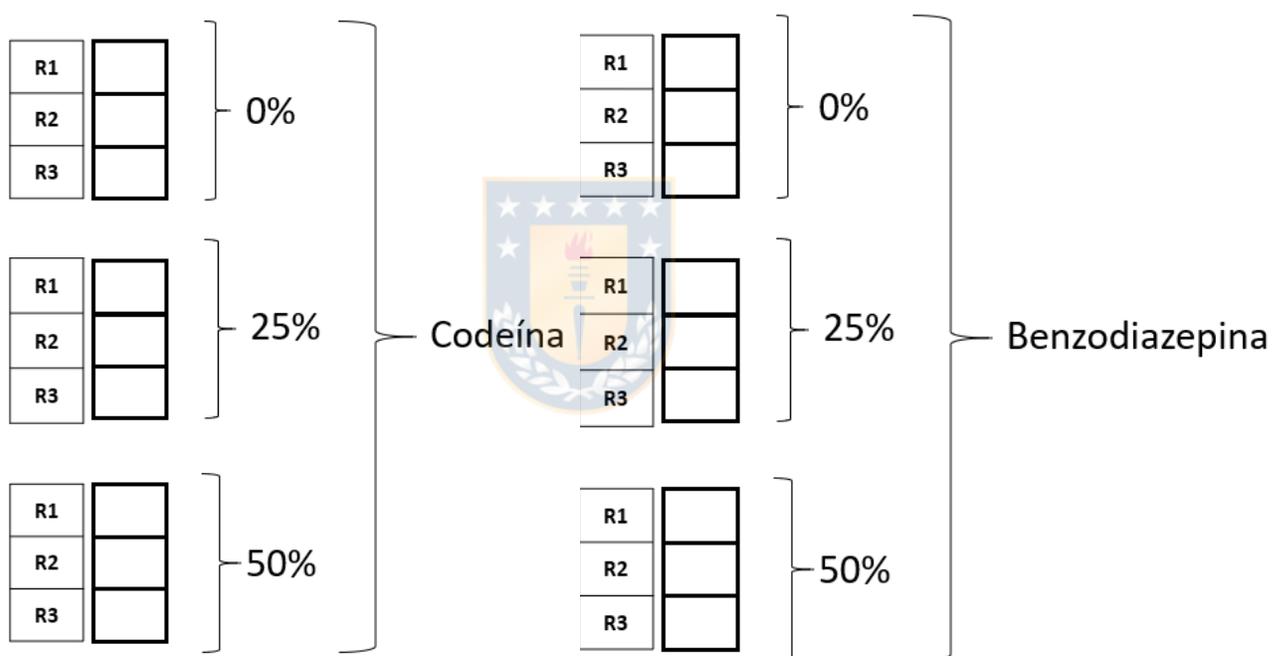


Figura 3. Diseño metodológico bioensayo de toxicidad.

2.3.4 Bioensayo de crecimiento

Para determinar la tasa de desarrollo larvario, se realizaron una serie de bioensayos en los cuales se expuso el sustrato (40 g de hígado de res) a los fármacos anteriormente mencionados, específicamente a concentraciones de 25% y 50%, junto con un grupo de

control libre de fármacos para cada grupo. Siguiendo lo señalado por Gunn *et al.* (2006), con el fin de asegurar una exposición eficaz de los individuos al sustrato, la impregnación de los fármacos se hizo mediante disoluciones con 1,5 ml agua destilada. Con el fin de albergar a los sujetos de estudio y mantener las condiciones ambientales estables se construyeron tres incubadoras de fabricación propia con termostato integrado (Figura 4 y 5).

Las pruebas toxicológicas se realizaron en 1080 larvas de *C. macellaria* dispuestas en una batería de 108 frascos plásticos de 250 ml, de los cuales 36 frascos formaron el grupo de control, 36 frascos estuvieron expuestos a codeína (18 a 25% y 18 a 50%) y los restantes 36 frascos a benzodiazepinas (18 a 25% y 18 a 50%) (Figura 6). Cada frasco contenía 20 g de hígado molido y 1,5 ml del fármaco diluido. En cada frasco se dispusieron 5 larvas, lo que correspondió a la unidad básica de análisis. Estos frascos se mantuvieron en incubadoras con regímenes constantes de temperatura ($27 \pm 1^\circ\text{C}$) y humedad relativa ($70 \pm 10\%$) y fotoperiodo (12:12).

Los muestreos se hicieron en intervalos de 12 horas a partir de la aplicación del tratamiento hasta 72 horas después, para comprobar el estadio de desarrollo de los individuos. Se tomaron 3 repeticiones de unidad básica de análisis por muestreo para cada concentración de toxinas. Para un mejor manejo de la muestra, los individuos recolectados fueron hervidos en agua por 15 segundos, se fijaron mediante inmersión en formaldehído (37%) y posteriormente se almacenaron en etanol (70%). Las muestras se almacenaron en base a una clasificación de 3 criterios: toxina utilizada (CO, BZ), concentración (0%, 25%, 50%) y tiempo de muestreo (12, 24, 36, 48, 60, 72 hrs.)

Se midió el largo de los individuos (longitud boca-espiráculo) de manera manual utilizando lupa y un vernier a fin de obtener un registro detallado de la tasa de crecimiento. Se trabajó

con la longitud boca-espiráculo promedio por unidad básica de análisis, la que fue registrada junto con el estadio larval, donde cada estadio se diferenció en base a la morfología. Se registró la cantidad de individuos muertos en cada unidad básica de análisis en base a la respuesta a estímulos mecánicos para estimar la tasa de mortalidad por concentración de toxinas.

Los datos obtenidos fueron ordenados en base a dos criterios principales: Tiempo de exposición al sustrato (horas) y tratamiento (Control, CO 25%, CO 50%, BZ, 25% y BZ 50%). Se calcularon medias de tamaño cada 12 horas. Con esta información se generaron líneas de crecimiento específicas para cada grupo.

Igualmente a estos datos se les aplicó el test de Levene para evaluar homogeneidad de varianza para determinar si posteriormente utilizar pruebas paramétricas o no paramétricas. Para determinar si existió una diferencia significativa entre los grupos estudiados se utilizó una prueba de ANOVA de una vía en el software Statistica.



Figuras 4 y 5. Incubadoras usadas durante los bioensayos

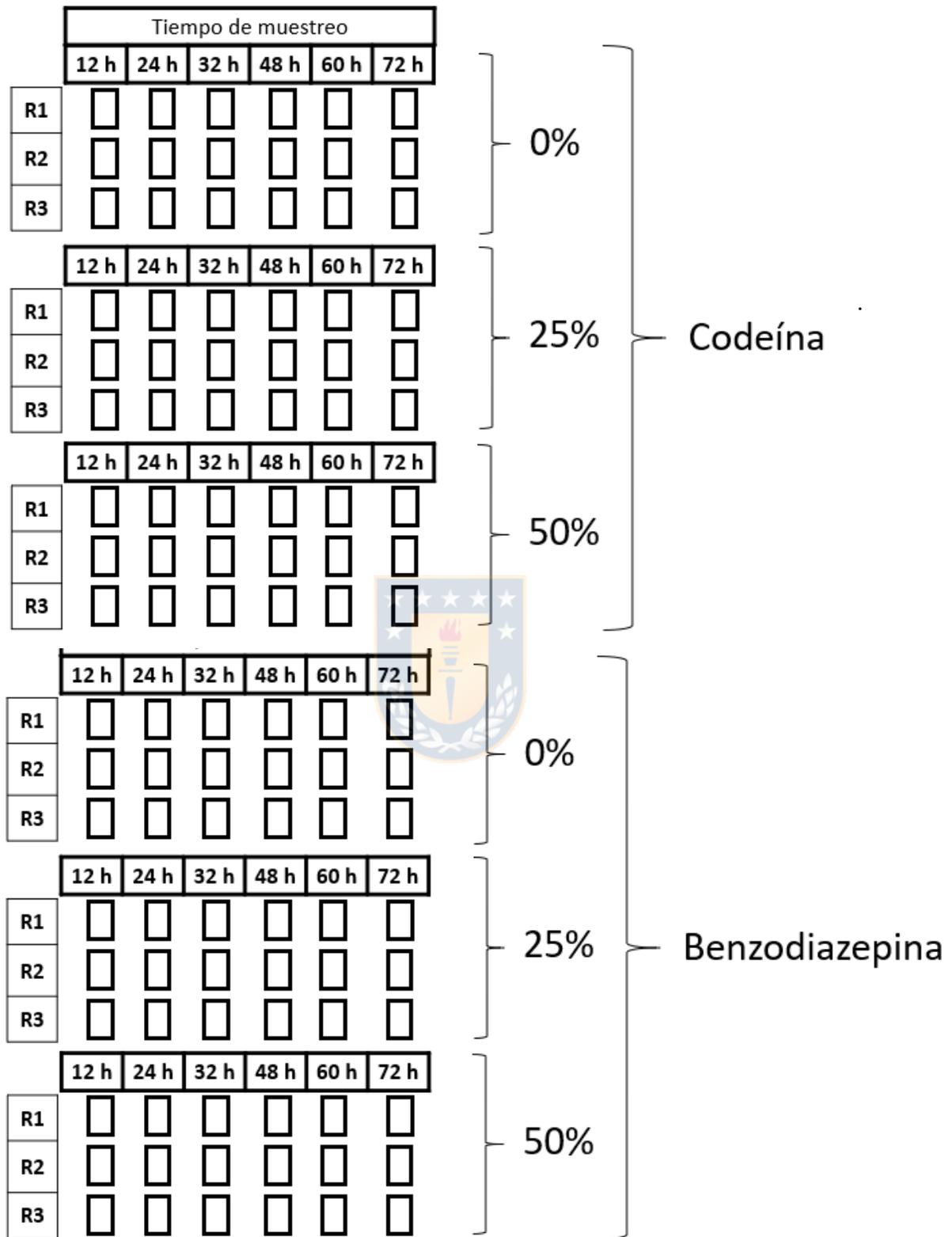


Figura 6. Diseño metodológico para bioensayos de desarrollo.

2.3.5 Estimación de Horas Grados Acumulados (HGA)

Siguiendo la metodología propuesta por Marchenko (2001), se generó un modelo de estimación HGA en base a los nuevos datos obtenidos para la especie en el grupo de control, así como también un modelo corregido para los individuos expuestos a fármacos. Se trabajó en función del tiempo de desarrollo (h) y la talla (mm) por estadios para estimar días-grados acumulados (DGA) y horas-grados acumulados (HGA).

Para determinar el tiempo de desarrollo se estimó un promedio de duración en horas de cada estadio desde huevo hasta LIII. Se realizó un procedimiento similar con la talla, estimando un promedio de longitud boca-espiráculo para cada estadio.

Para estimar HGA se utilizó la ecuación:


$$HGA = h * (T - TB)$$

Donde:

HGA= horas grados acumuladas necesarias para el desarrollo del insecto.

h= Es el tiempo en horas de desarrollo del insecto.

T= Temperatura a la cual se desarrolló el insecto.

TB= Temperatura basal en la cual no hay desarrollo del insecto.

Según el diseño experimental propuesto, la temperatura en la que se desarrollaron los individuos en las incubadoras será de 27° C y como temperatura basal se ocupó el valor de 10° C propuesto por Marchenko (2001) para los Calliphoridae.

Una vez obtenido HGA se estimó DGA utilizando la ecuación:

$$DGA = HGA/24$$

Donde:

DGA= días grados acumulados necesarios para el desarrollo del insecto.

HGA= horas grados acumuladas necesarias para el desarrollo del insecto.

Este proceso se aplicó de manera separada al grupo de control y a cada una de las concentraciones de ambas toxinas, a fin de conseguir resultados que ponderen las variaciones en la tasa de desarrollo y permitan evitar estimaciones erróneas.

Una vez obtenidos los resultados, se aplicó el test de Levene para evaluar homogeneidad de varianza. Mediante el test de Kruskal-Wallis ($p = 0,05$) se determinó si existían diferencias significativas en los tiempos de desarrollo y valores de HGA y HDA entre el grupo de control y los tratamientos. Estos análisis se realizaron usando el software Statistica.



3. RESULTADOS

3.1 Bioensayo de mortalidad.

Los bioensayos realizados para evaluar la mortalidad de cada una de las concentraciones, confirmaron que estas eran seguras para trabajar. Se obtuvieron mortalidades más altas para los grupos de estudio tratados con benzodiazepina

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2. Estos indican que las concentraciones utilizadas son seguras para los bioensayos de crecimiento.

Se observaron diferencias en la cantidad de tiempo requerida hasta la emergencia de los imagos, aunque ninguna de ellas fue estadísticamente significativa. En la mayor parte de los casos el ciclo se acelera en relación al grupo de control, mientras que solo en el grupo tratado con benzodiazepina al 50% se ralentiza. Esto puede ser considerado como un buen indicador preliminar de los efectos de ambos fármacos y concentraciones sobre el crecimiento que se obtuvieron en los bioensayos posteriores.

Tabla 2. Porcentajes de mortalidad, mortalidad corregida y duración de ciclo para cada uno de los fármacos y sus respectivas concentraciones.

Grupo de estudio	Nro. Individuos muertos	Mortalidad (%)	Mortalidad corregida (%)	Duración (h)
Control	1	3,3	3,3	175.2
Codeína (25%)	3	10	6,9	161.4
Codeína (50%)	4	13,3	10,3	158.2
Benzodiazepina (25%)	5	16,7	13,9	168
Benzodiazepina (50%)	7	23,3	20,1	221.8

3.2 Bioensayos de crecimiento

Los resultados de los bioensayos de crecimiento mostraron que transcurridas 72 horas de exposición al sustrato, ambos grupos tratados con codeína presentan una longitud promedio significativamente mayor que la del grupo de control. Los grupos tratados con benzodiazepina presentan comportamientos distintos dependiendo de la concentración: el grupo tratado al 25% no presentó diferencias significativas con el grupo de control hasta las 72 horas de exposición al sustrato y el grupo tratado al 50% presentó longitudes significativamente menores al grupo de control hasta las 72 horas de exposición al sustrato.

La tabla 3 muestra la tasa de crecimiento de las larvas de *C. macellaria* sometidas a los distintos tratamientos con codeína y benzodiazepina.

Tabla 3. Longitud promedio de larvas (mm) y horas de exposición al sustrato (horas) de larvas de *C. macellaria* CO: codeína, BZ: benzodiazepina.

Tiempo (h)	Control	CO25%	CO50%	BZ25%	BZ50%
12	3 ± 1,6	3,25 ± 0,96	3 ± 1,8	3 ± 0,8	3,5 ± 1,1
24	6 ± 0,6	5,3 ± 1	5,8 ± 1,1	5,8 ± 1,2	5,3 ± 0,8
36	9 ± 1,6	8,8 ± 1,3	9,6 ± 1,6	10 ± 1,9	7,8 ± 1,3
48	12 ± 1,3	13,6 ± 1,1	13,8 ± 1,4	13 ± 1,5	10 ± 1,3
60	12,7 ± 1,1	14,1 ± 0,6	14,9 ± 1,1	13,3 ± 1,6	10,25 ± 0,8
72	11,4 ± 1,1	14,8 ± 0,9	15,5 ± 1	13,1 ± 1,1	10,9 ± 1

Para las longitudes promedio de las primeras 12 horas, se confirmó la homogeneidad de varianzas con el test de Levene ($p = 0,7$). El ANOVA realizado no muestra diferencias significativas en las longitudes promedio entre grupos ($p = 0,9$)

Para las longitudes promedio a las 24 horas se confirmó la homogeneidad de varianzas con el test de Levene ($p = 0,6$). El ANOVA realizado no muestra diferencias significativas en las longitudes promedio entre grupos ($p = 0,9$)

Las longitudes promedio a las 36 horas de exposición al sustrato fueron las siguientes: para el grupo de control fue de $9 \pm 1,6$ mm; para los grupos tratados la menor longitud se encontró en el grupo tratado con benzodiazepina con $7.8 \pm 1,3$ mm. La mayor longitud se encontró en el grupo tratado con benzodiazepina al 50% con $10 \pm 1,9$ mm.

Para las longitudes promedio a las 36 horas, se rechazó la homogeneidad de varianzas con el test de Levene ($p = 0,002$), por lo que se opta por un test no paramétrico. El test de Kruskal-Wallis no muestra diferencias significativas entre la longitud promedio de los grupos ($p = 0,2$)

Para las longitudes promedio a las 48 horas, se confirmó la homogeneidad de varianzas con el test de Levene ($p = 0,9$). El ANOVA realizado mostro diferencias significativas en la longitud promedio entre grupos ($p = 0,001$). Según la prueba de especificidad de Tukey, a excepción del grupo tratado con benzodiazepina al 25% ($p = 0,5$), todos los grupos presentan diferencias significativas con el grupo de control. El grupo con menor longitud corresponde al grupo tratado con benzodiazepina al 50%, mientras que el grupo con mayor longitud fue el grupo tratado con codeína al 50%

Para las longitudes promedio a las 60 horas, se confirmó la homogeneidad de varianzas con el test de Levene ($p = 0,7$). El ANOVA realizado confirmó diferencia significativa entre la longitud de los grupos ($p = 0,7$). Según la prueba de especificidad de Tukey, el único grupo que no presenta diferencia significativa con el grupo de control es el grupo tratado con

benzodiazepina al 25% ($p = 0,6$). El grupo con menor longitud fue el grupo tratado codeína al 50%, mientras que el grupo con mayor longitud fue grupo tratado con benzodiazepina al 50%.

Para las longitudes promedio a las 72 horas, se confirmó la homogeneidad de varianzas con el test de Levene ($p = 0,8$). El ANOVA confirmó diferencia significativa entre la longitud de grupos ($p = 0$). Según el test de Tukey, el único grupo que no presenta diferencia significativa con el grupo de control en el grupo tratado con benzodiazepina al 50% ($p = 0,8$). El grupo con mayor longitud fue el grupo tratado con codeína al 50% y el grupo con menor longitud fue el grupo tratado con benzodiazepina al 50%.

Las figuras 7 y 8 grafican los resultados mencionados anteriormente separados por fármacos y comparadas al patrón de crecimiento del grupo de control.

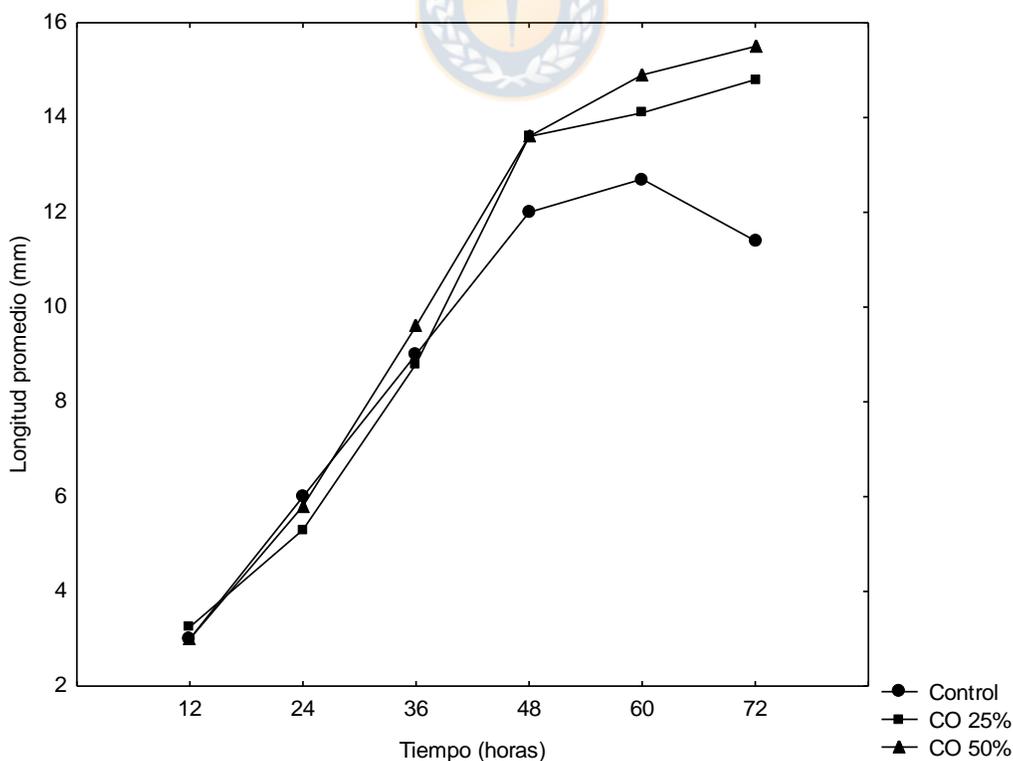


Figura 7. Longitud promedio de grupo de control y grupos tratados con codeína

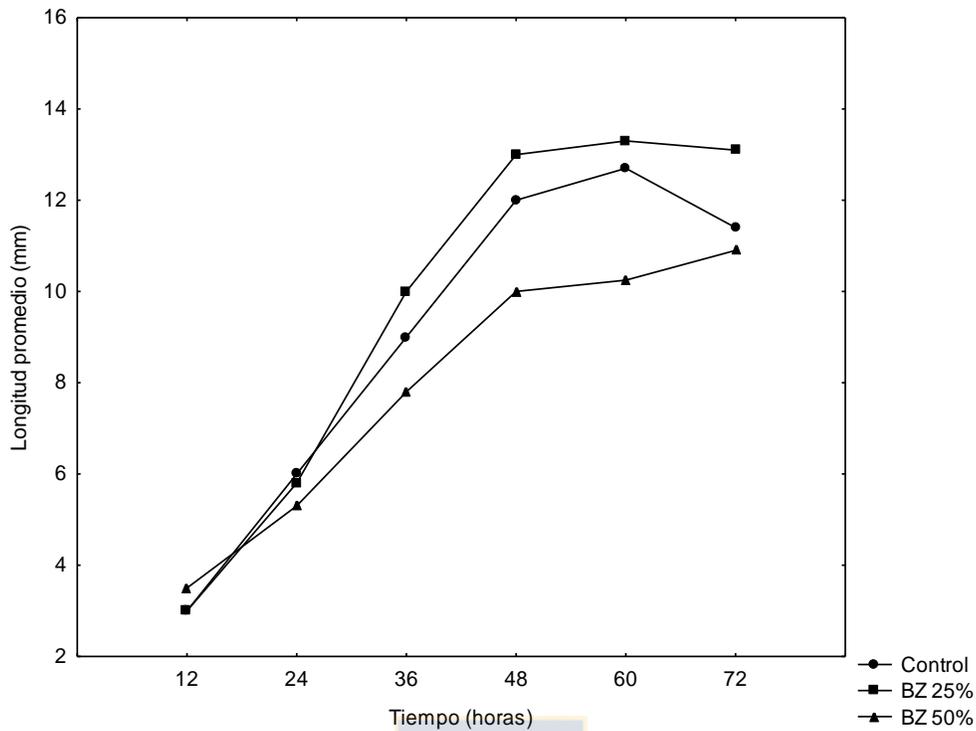


Figura 8. Longitud promedio de grupo de control y grupos tratados con benzodiazepina

3.3 Ciclo de desarrollo

A continuación se describen morfológicamente los distintos estadios larvales de *C. macellaria*:

L1:

Tamaño promedio $3 \pm 1,6$ mm de largo. Con 12 segmentos corporales (uno cefálico, tres torácicos y ocho abdominales) separados por anillos de espinas. Los segmentos 2 a 9 presentan anillos de espinas completos, en el segmento 10 está incompleto en el área dorsal.

La región cefálica tiene una línea longitudinal que divide el primer segmento en dos lóbulos, en cada uno de ellos están dispuestas las antenas y los palpos maxilares. Los espiráculos anteriores aún no son visibles, por lo que se asume una respiración estrictamente metapneústica.

Extremo posterior larval romo, solo los tubérculos anales son claramente visibles ya que los demás aún son demasiado pequeños. No se distinguen los ganchos bucales del resto del esqueleto cefalofaríngeo. Espiráculos posteriores conspicuos, solo se observan una abertura en cada espiráculo y el peritrema incompleto.

L2:

Tamaño promedio $7 \pm 1,9$ mm de largo. Este estadio conserva varios rasgos del estadio anterior. Con anillos completos de espinas desde el segmento 2 hasta el segmento 9. En el segmento 10 se observa un anillo de espinas incompleto dorsalmente (Figura 9).

El peritrema aún se encuentra abierto y se observan dos aberturas en cada espiráculo posterior (Figura 10).

Hay un mayor desarrollo de la región cefálica y las antenas y los palpos maxilares son más conspicuos (Figura 11).



Los espiráculos anteriores se componen de una hilera en semicírculo de entre 11 a 12 ramificaciones (Figura 12). Esto implica un cambio a una respiración de tipo anfipneústico.

L3:

Tamaño promedio $12,1 \pm 1,3$ mm de largo. Región cefálica conspicua. Bandas de espinas de los intersegmentos como las del resto del cuerpo conspicuas. Los palpos maxilares son mucho más notorios, rodeados de estructuras lisas y plegadas, parecidas a crestas (Figura 13). Segmentos 2 a 10 con anillos de espinas completos, líneas en los segmentos 6 y 7 incompletas. Último segmento abdominal con patrón de espinas basales en forma de “V” (Figura 14).

Las aberturas de los espiráculos posteriores muestran una orientación radial. Peritrema cerrado. Cicatriz escidial está ausente (Figura 15).

Espiráculos anteriores en una hilera semicircular con 12 ramificaciones (Figura 16).



Figura 9. Vista lateral de larva L II de *C. macellaria* (grupo de control).

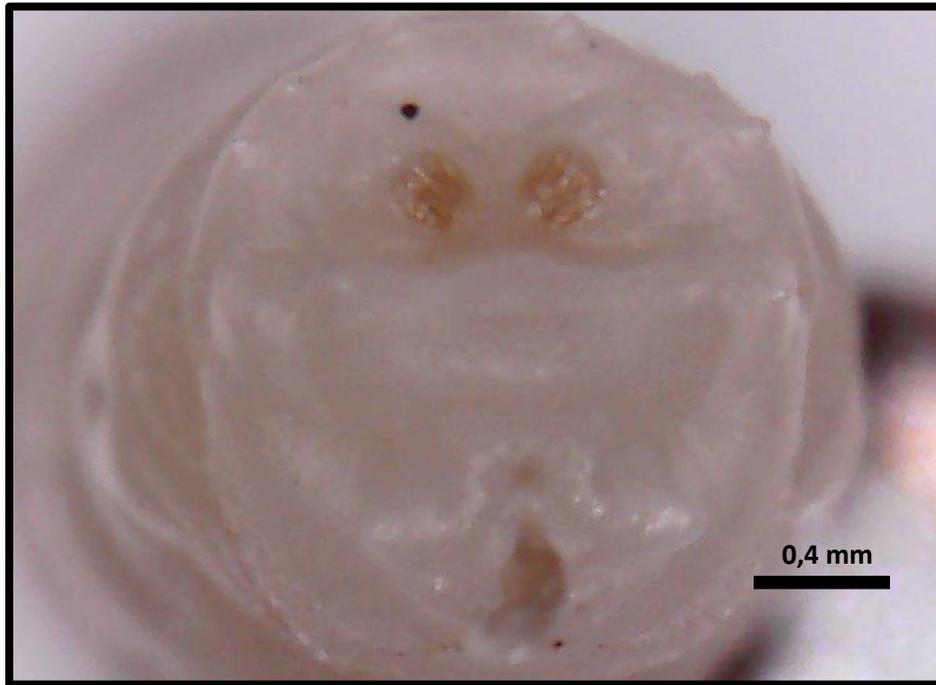


Figura 10. Vista posterior y espiráculos posteriores de una larva L II de *C. macellaria* (grupo de control)..

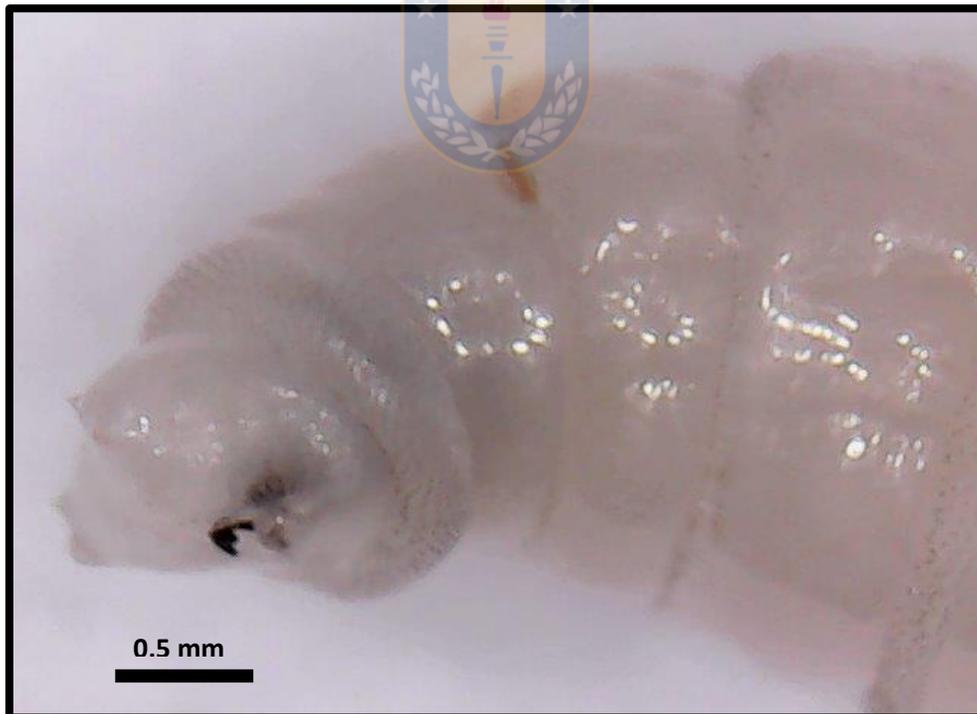


Figura 11. Detalle del extremo frontal y los ganchos bucales de una larva L II de *C. macellaria* (grupo de control).

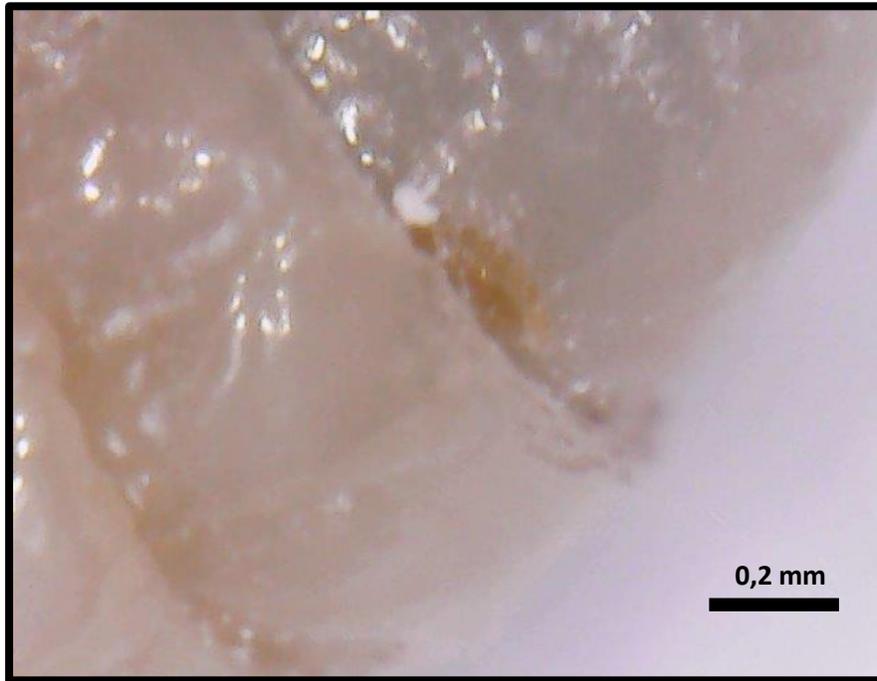


Figura 12. Detalle del espiráculo anterior de una larva L II de *C. macellaria* (grupo de control).



Figura 13. Detalle del extremo anterior y los ganchos bucales de una larva L III de *C. macellaria* (grupo de control).



Figura 14. Vista lateral de una larva LIII de *C. macellaria* (grupo de control).

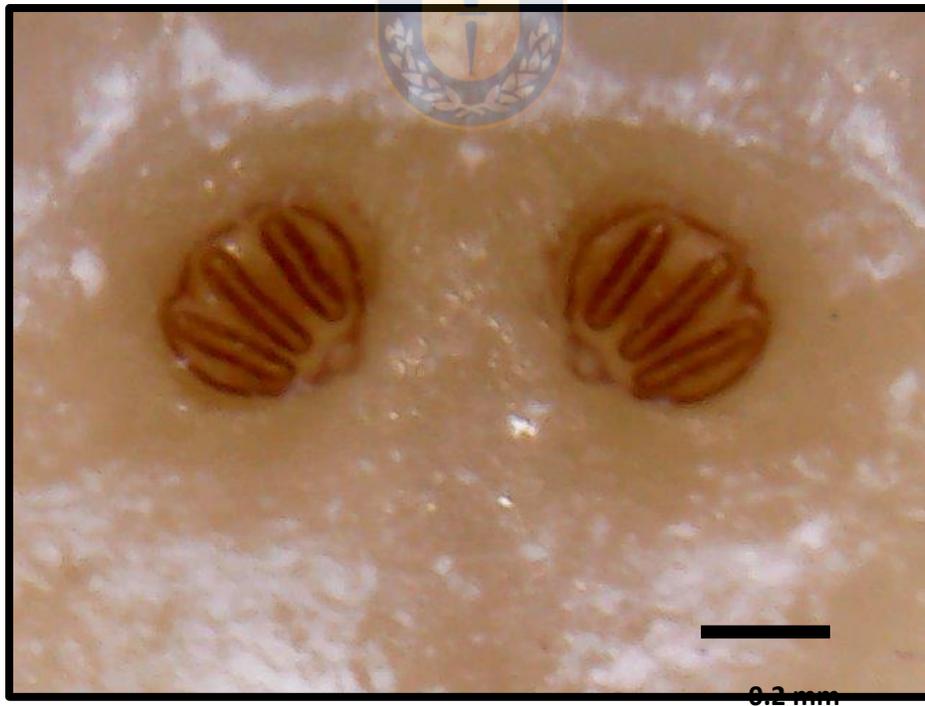


Figura 15. Detalle de los espiráculos posteriores de una larva LIII de *C. macellaria* (grupo de control).

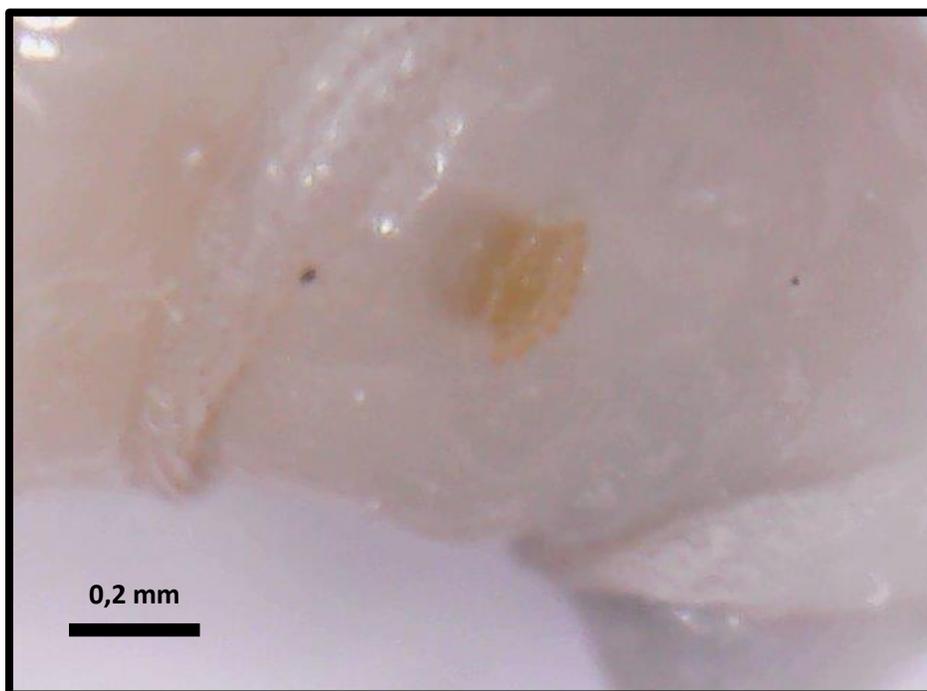


Figura 16. Detalle del espiráculo anterior de una larva L III de *C. macellaria* (grupo de control).

3.4 Cambios morfológicos por toxinas

A lo largo de los bioensayos, junto con los cambios en la duración del ciclo de desarrollo y las diferencias en la longitud de los individuos en cada grupo, se observaron varias alteraciones morfológicas en los especímenes de los grupos tratados con respecto al grupo de control. Las diferencias se concentraron en tres estructuras: ganchos bucales, espiráculos anteriores y espiráculos posteriores.

Benzodiazepina:

En los grupos de estudio con Benzodiazepina, el grupo tratado al 25% no presenta diferencias morfológicas observables, conservando una estructura general similar a la del grupo de control.

La totalidad de los individuos con alteraciones morfológicas se concentran en el grupo tratado al 50%. Junto con ser el grupo con menor longitud promedio, se observaron alteraciones importantes en el desarrollo de los espiráculos posteriores. Las aberturas del espiráculo presentan una forma irregular y poco definida. El peritrema también presenta una forma irregular e incluso incompleta en algunos individuos (Figura 17).

Codeína:

En ambos grupos tratados con codeína se observaron cambios similares.

Los espiráculos anteriores presentaron una notable disminución de tamaño en relación al grupo de control, igualmente en algunas ocasiones estos se observan fusionados o con algún grado leve de deformidad (Figura 18).

Los espiráculos posteriores, a pesar de verse definidos y completos, son mucho más pequeños en relación al cuerpo y a diferencia del grupo de control no se encuentran correctamente centrados.

Los ganchos bucales se presentan más pequeños que en el grupo de control, e incluso algunos casos llegan a ser difíciles de ver.



Figura 17. Espiráculos posteriores de larva tratada con benzodiazepina al 50%

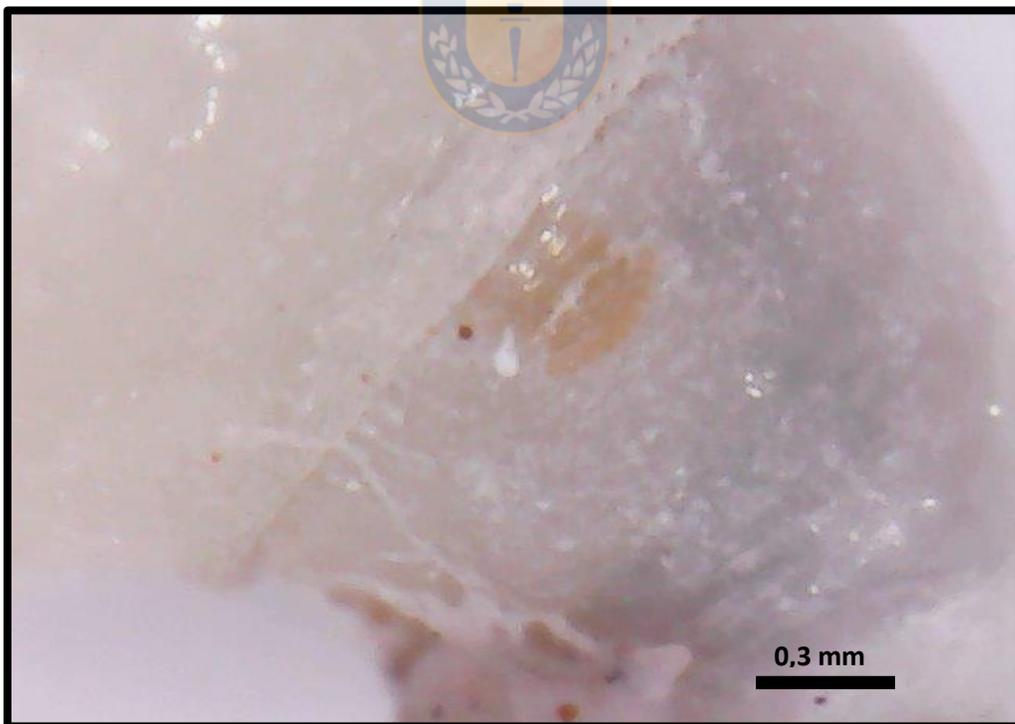


Figura 18. Espiráculos anteriores de larva tratada con codeína al 50%

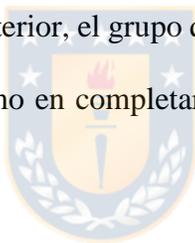
3.5 Duración del ciclo de desarrollo

La duración de cada uno de los estados inmaduros de *C. macellaria* bajo los distintos tratamientos se resume en la tabla 4.

Huevo: El grupo que menos se demoró en completar el estadio fue el grupo tratado con benzodiazepina al 25%, por el contrario el grupo que más se demoró fue grupo tratado con benzodiazepina al 50% (Figura 19).

Larva I: El grupo que tardo más tiempo en pasar al siguiente estadio fue el grupo tratado con benzodiazepina al 50%, por el contrario el grupo con el ciclo más corto fue el tratado con codeína al 50% (Figura 20).

Larva II: Al igual que en el estadio anterior, el grupo que menos tiempo demoró fue el grupo tratado con codeína al 50% y el ultimo en completar este estadio fue el grupo tratado con benzodiazepina al 50% (Figura 21).



Larva III: A diferencia de estadios anteriores, ambos grupos tratados con codeína fueron los que menos se demoraron con una duración de 52 horas, por lo que el grupo tratado al 25% fue el que tuvo un ciclo más corto por solo algunos minutos de diferencia (Figura 22).

Pupa: El grupo que menos se demoró en completar el estadio fue el grupo tratado con codeína al 25%, por el contrario el grupo que más se demoro fue el grupo tratado con benzodiazepina al 50% (Figura 23).

Tabla 4. Duración (horas) de los ciclos de desarrollo de los diferentes instars de *C. macellaria* para cada tratamiento CO: codeína, BZ: benzodiazepina.

	Control	CO25%	CO50%	BZ25%	BZ50%
Huevo	12	11,9	12	11,8	12,1
Larva I	16	13,2	12,9	15,1	20,2
Larva II	19	16,4	16,2	17,4	25,1
Larva III	59	52,5	52,6	56	76,3
Pupa	69,2	67,4	64,5	67,7	88,1

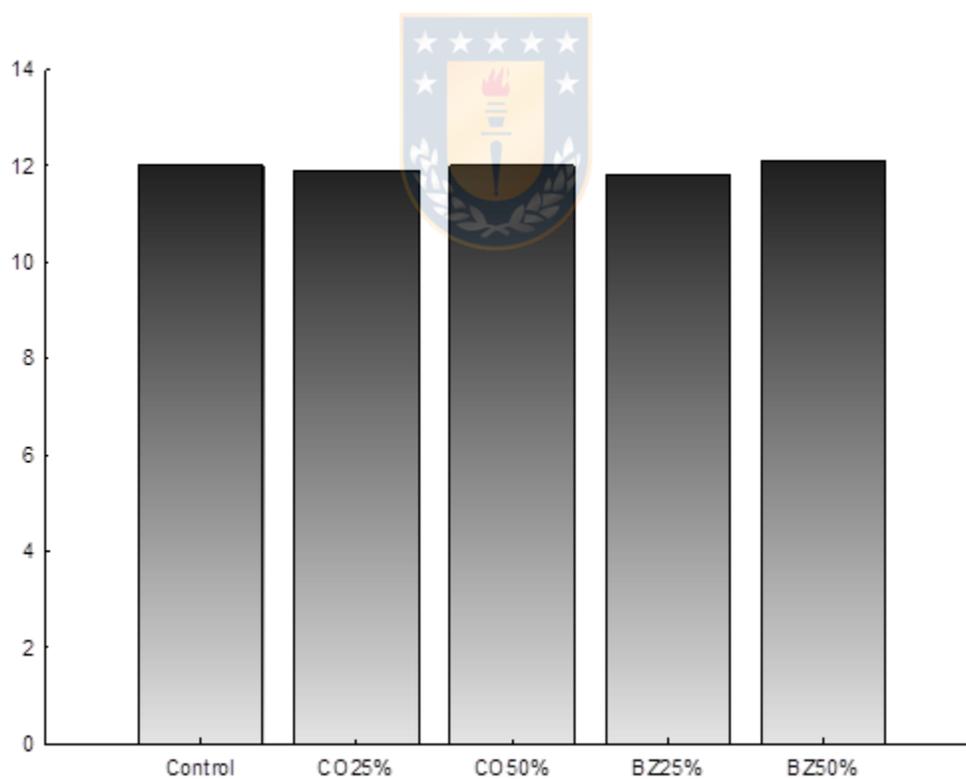


Figura 19. Duración en horas del estadio de huevo para todos los grupos de estudio

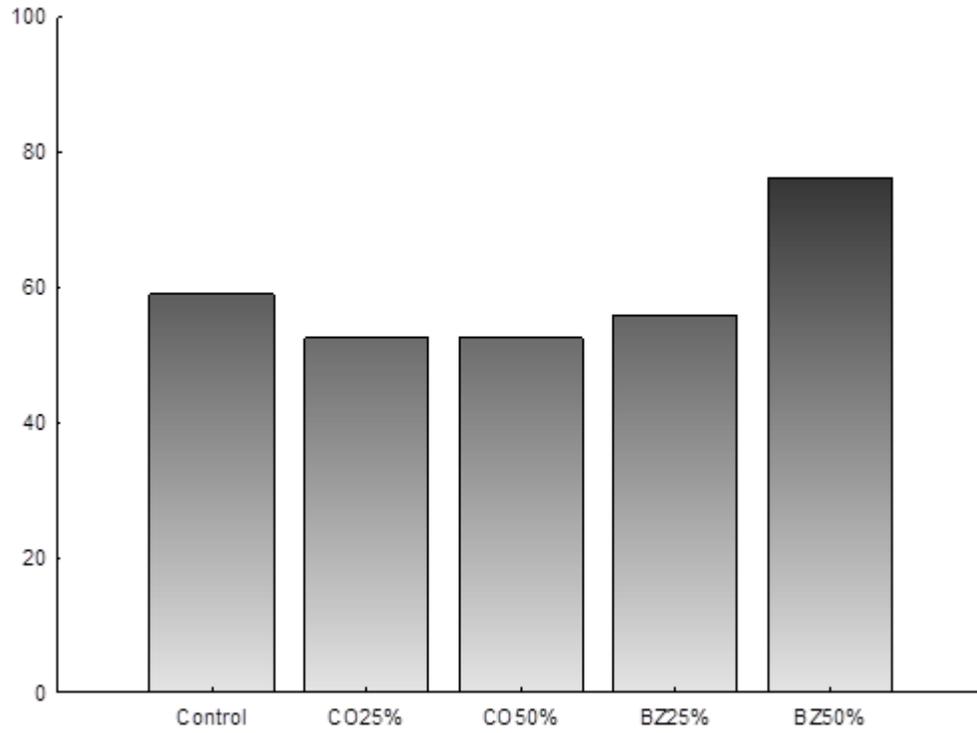


Figura 20. Duración en horas del estadio LI para todos los grupos de estudio

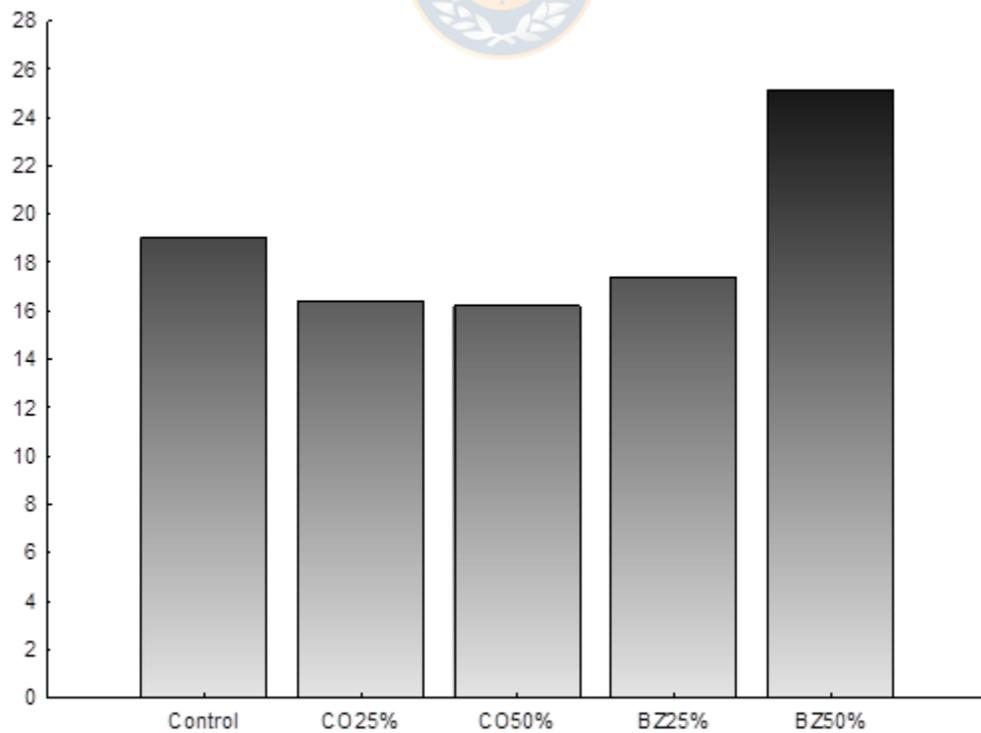


Figura 21. Duración en horas del estadio LII para todos los grupos de estudio

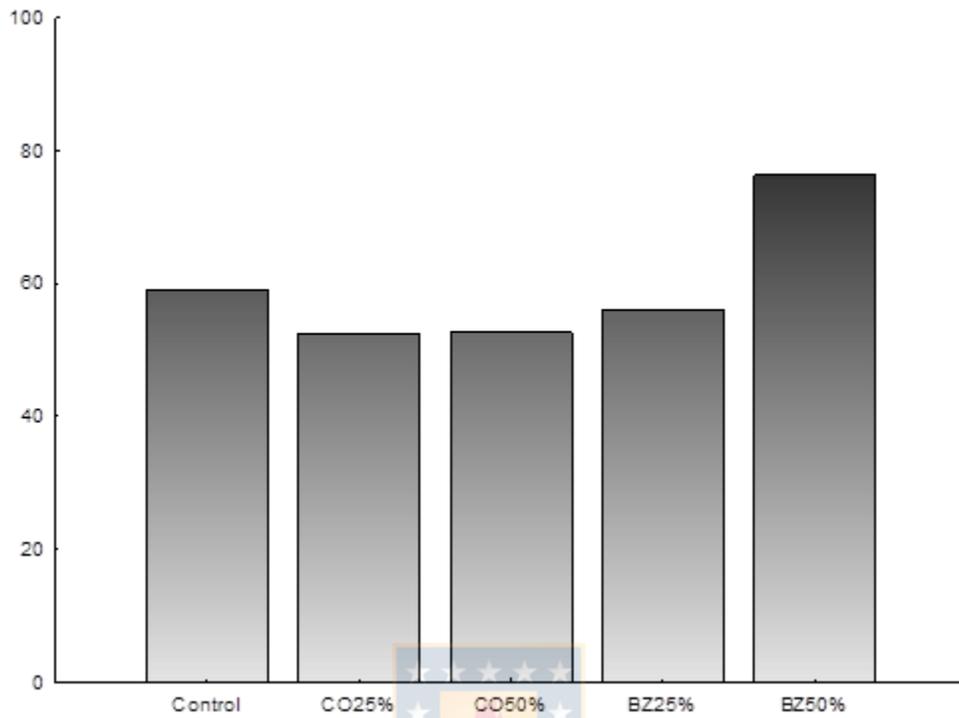


Figura 22. Duración en horas del estadio LIII para todos los grupos de estudio

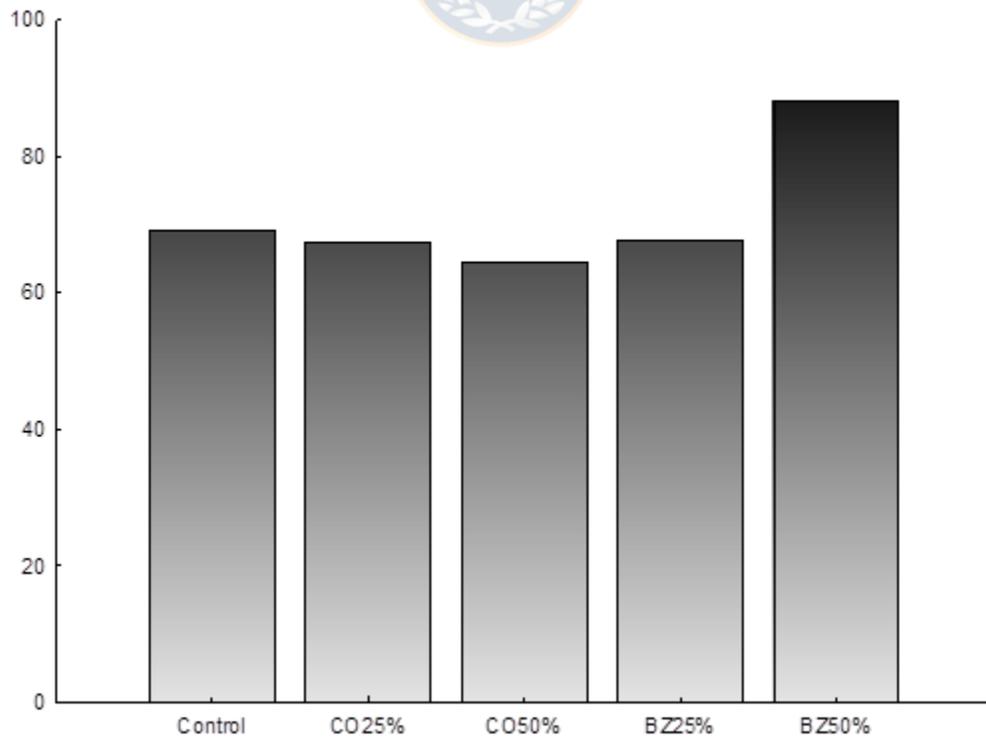


Figura 23. Duración en horas del estadio pupa para todos los grupos de estudio

3.6 Estimación de Horas grados acumulados (HGA)

Se estimaron las HGA sobre la base de la duración completa del ciclo de desarrollo para todos los grupos estudiados (Figura 24). Esto comprende desde el estadio de huevo hasta la emergencia de los imagos. Igualmente para poder realizar el cálculo se incluyó la temperatura de desarrollo (27° C) y la temperatura base para *C. macellaria* (10° C). Sobre la base de estos antecedentes, se obtuvieron valores totales de HGA y HDA para todos los grupos. Los resultados se resumen en la tabla 5.

Tabla 5. Tiempo de desarrollo total, HGA y HDA estimados para todos los grupos de estudio en *C. macellaria*

Grupo de estudio	Tiempo de desarrollo total (horas)	Tiempo de desarrollo total (días)	HGA total	HDA total
Control	175,2	7,3	2978	124,1
Codeína (25%)	161,4	6,8	2743,8	114,3
Codeína (50%)	158,2	6,7	2689,4	112,1
Benzodiazepina (25%)	168	7	2856,1	119
Benzodiazepina (50%)	221,8	9,2	3770,8	157,2

El grupo de control tardó 175,2 horas en completar su ciclo de desarrollo, equivalente a 7,3 días. Las HGA totales obtenidas en este periodo de tiempo fue de 2978 y las HDA totales fueron 124,1.

En los grupos de estudio con codeína el grupo tratado al 25% las HGA totales obtenidas fueron 2743,8, mientras que el grupo tratado al 50% el valor total para las HGA fue de 2689,4. Los ciclos de desarrollo más cortos se reflejan en que ambos grupos tratados con codeína son menores que el valor de HGA para el grupo de control.

En los grupos tratados con benzodiazepina, el grupo tratado con una concentración de 25% obtuvo un HGA total de 2856,1. Para el grupo tratado con una concentración al 50% las HGA totales estimadas fueron 3770,8 y los HDA totales fueron 119. Este último grupo fue el único que presentó un val

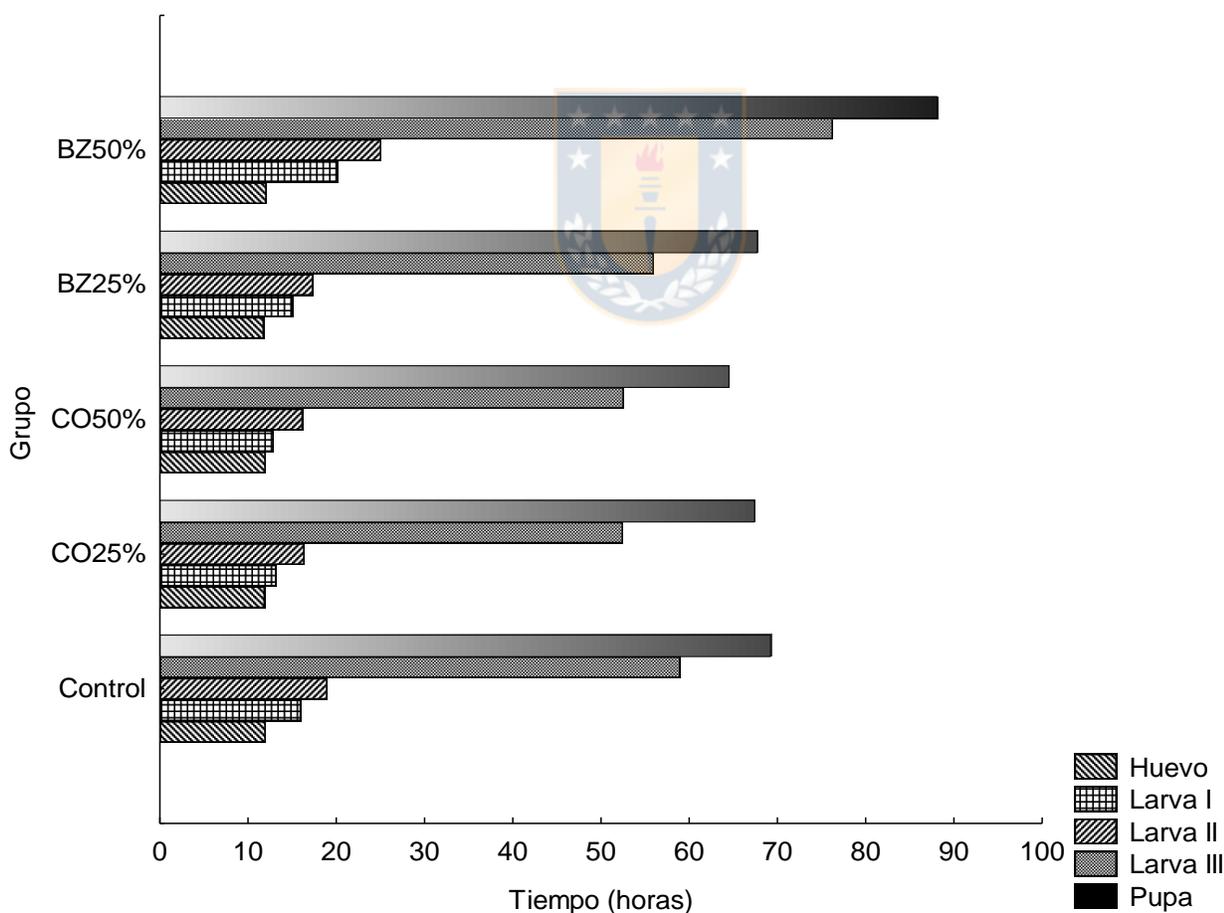


Figura 24. Duración de los distintos estadios del ciclo de desarrollo de *C. macellaria* para todos los grupos de estudio CO: codeína, BZ: benzodiazepina. or de HGA mayor que el grupo de control.

Se determinó la homogeneidad de las varianzas de los datos obtenidos para cada estadío aplicando el test de Levene. Los valores obtenidos en la prueba de ANOVA para todos los grupos resultan en diferencias no significativas.

Para cuantificar el impacto de estas variaciones en los valores de HGA, se generó un modelo con las variables usadas en los bioensayos para cada grupo. Con una temperatura constante de 27° C y considerando 24 horas de desarrollo se obtuvo un valor HGA de 648 y un valor de HDA de 27 para cada día. En base a estos datos, se estimaron las diferencias en completar ciclos de desarrollo entre el grupo de control y los grupos tratados, posteriormente se convirtieron estos resultados al margen de error en horas que estas variaciones pueden causar al estimar IPM con métodos matemáticos basados en temperatura.

El grupo tratado con benzodiazepina al 25% presentó el menor margen de error, con una diferencia de 4,5 horas menos con respecto al grupo de control al estimar su tiempo de desarrollo con HGA, mientras que el grupo tratado al 50% presentó un margen más amplio sumando 7,9 horas más a la estimación.

En los grupos tratados con codeína, el grupo tratado al 25% tuvo un margen de error de 5,6 horas menos que el grupo de control, mientras que el grupo tratado al 50% fue el que más diferencia presentó con el grupo de control con un error de 10,6 horas menos.

La tabla 6 resume los resultados obtenidas al comparar las estimaciones de HGA del grupo de control con los valores obtenidos para los grupos tratados con fármacos.

Tabla 6. Diferencia en horas de los resultados para estimación de IPM mediante el método de HGA en *C. macellaria* CO: codeína, BZ: benzodiazepina.

Grupo	Diferencia con el grupo de control (horas)
CO25%	5,6
CO50%	10,6
BZ25%	4,5
BZ50%	7,9



4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos permiten confirmar la hipótesis de que la presencia de fármacos derivados de la codeína y benzodiazepina alteran el ciclo de desarrollo de larvas de *C. macellaria*, afectando así la estimación de IPM a través del modelo HGA, por lo que se acepta la hipótesis propuesta. Los bioensayos realizados mostraron diferencias de los grupos tratados con respecto al grupo de control en tamaño, duración del ciclo de desarrollo y morfología. Los análisis realizados permiten confirmar que todos los grupos presentaron alteraciones en la estimación de IPM, agregando o quitando horas en comparación al grupo de control.

Los califóridos representan posiblemente el grupo de mayor importancia dentro de la evidencia entomológica en contexto forense, por lo que su estudio bajo todas las variables y condiciones posibles, representa un esfuerzo necesario para aumentar la precisión de los métodos de análisis entomológico asociado a casos criminales. Anderson (1999) señala que sin desestimar su importancia en otras áreas como descomposición, polinización y aplicaciones médicas, la aplicación más relevante que este grupo puede ofrecer es el estudio de sus ciclos de vida y desarrollo en investigaciones criminales para determinar la data de muerte en casos de homicidio, suicidio, etc.

Si bien no existen estudios previos que analicen los cambios morfológicos inducidos por causas toxicológicas en *C. macellaria*, los cambios observados en este estudio resultan similares a los encontrados por Shaheen y Fathy (2008) al exponer larvas de *C. albiceps* a sustratos contaminados con fosfato de codeína. En ambos estudios se encontraron cambios morfológicos en estructuras bucales, espiráculos anteriores y posteriores. Sin embargo el estudio realizado en larvas de *C. albiceps* menciona una gran cantidad de cambios que no

podieron ser confirmados en este estudio debido a limitaciones técnicas, como son daño estructural en ganchos bucales y erupciones en los tubérculos anales. La verificación de este tipo de cambios morfológicos podrían resultar útiles como indicadores preliminares de intoxicación de un cadáver. La detección de presencia de drogas en casos forenses, se facilitaría simplemente con un análisis visual de las larvas colectadas sobre el sustrato y de este modo indicar y/o solicitar la realización de análisis toxicológicos del occiso(a).

Otros autores, como Bourel *et al.* (2001) mencionan cambios más sutiles en la morfología larval, específicamente que la acción de opiáceos como la morfina, afectan el metabolismo de los califóridos, generando pequeñas manchas en la hemolinfa y partes de la cutícula. Estos resultan complicados de analizar sin equipo de laboratorio, pero pueden ser útiles como indicadores, ya que al encontrarse una relación entre la cantidad de tejido manchado y la concentración de morfina consumida, resultaría especialmente útil para análisis toxicológicos cuantitativos más rápidos.



Los resultados obtenidos en los bioensayos de mortalidad se ubican dentro de lo observado en otros bioensayos con benzodiazepina. En varios estudios, los fármacos con benzodiazepina aumentan el porcentaje de mortalidad de las larvas de varias especies de moscas califóridas la que crece en función de la concentración de benzodiazepina en el sustrato.

Altunsoy *et al.* (2005), obtuvieron resultados similares a los del presente estudio, al exponer larvas de *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830 y *Calliphora loewi* Enderlein, 1903 a distintas concentraciones de Lorazepam. El grupo de control presentó una mortalidad de 3,6%, mientras que los cinco grupos tratados variaron en un rango de 7,3% a 36,2% de

mortalidad total. Los resultados del grupo de control son considerablemente similares a los obtenidos en este estudio.

Lyubimov *et al.* (2005), analizaron los efectos de dosis letales de Diazepam sobre larvas de *Wohlfahrtia nuba* Wiedemann, 1830. Los resultados fueron de un 8,05% de mortalidad para el grupo de control, de 15,8% para la colonia R1 (dosis letal) y de 25,5% para la colonia R2 (doble dosis letal). Aunque el porcentaje de mortalidad del grupo de control fue más alto que el obtenido en nuestro estudio, los porcentajes de los grupos tratados siguen un patrón bastante similar.

Baia *et al.* (2016), estudiaron los efectos del Flunitrazepam en *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1974), si bien no indican el porcentaje exacto de mortalidad para cada uno de los grupos de estudio, señalan que obtuvieron un rango de mortalidad desde un 14,96% para el grupo de control hasta un 29,23% para el grupo tratado con concentración más alta del fármaco (16 ng).

Todos estos estudios presentan tasas de mortalidad mayores en grupos expuestos a benzodiazepina que en los grupos de control; sin embargo, hay resultados contradictorios. Carvalho *et al.* (2001) realizaron bioensayos con Diazepam en dos especies de moscas califóridas: *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) y *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830). *C. albiceps* en su grupo de control presentó una mortalidad de 1,8%, mientras que el grupo tratado con el fármaco obtuvo 22,6% de mortalidad, lo que se ajusta a los resultados obtenidos en el presente estudio. Sin embargo, para *C. putoria* el grupo de control tuvo 10% de mortalidad y el grupo tratado tuvo una mortalidad de 9,2%. Este último caso muestra un resultado poco documentado en los bioensayos con benzodiazepina, en el que el grupo tratado presenta menor mortalidad que el grupo control. Aunque sobre la base del

conocimiento actual aparenta ser un caso aislado, esto desafía lo que comúnmente se observa en estudios de este tipo y de llegar a corroborarse en estudios a futuro, el comportamiento de *C. putoria* sería un caso a analizar con cuidado, ya que demostraría que no todos los califóridos presentan igual resistencia a los sustratos contaminados con benzodiazepinas.

En los bioensayos para evaluar el crecimiento, las mayores longitudes se encontraron en los grupos tratados con codeína. En ambas concentraciones se observó un aumento considerable en la longitud promedio con respecto al grupo de control. Tanto el grupo tratado al 25% como al 50% presentaron un comportamiento similar de crecimiento, con longitudes que no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos a lo largo de todo el bioensayo. A partir de las 48 horas, todas las mayores longitudes promedio se encontraron en el grupo tratado al 50% hasta el final del bioensayo. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Fathy *et al.* (2008), quienes realizaron estudios sobre los efectos de dosis letales de codeína en el crecimiento de larvas de *C. albiceps*. Sus resultados basados en el análisis del peso de las larvas en función del tiempo de exposición, sugieren un claro efecto de aumento del crecimiento de las larvas a partir de las 12 horas de exposición al sustrato. Los grupos tratados mantuvieron un mayor peso a lo largo de todo el estudio, alcanzando a las 72 horas una diferencia de hasta 130 mg en promedio entre el grupo de control y el grupo tratado.

Kharbouche *et al.* (2008), obtuvieron resultados similares al exponer larvas de *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) a distintas concentraciones de derivados del opio, entre ellos la codeína. Concluyeron que las larvas criadas en muestras tratadas con codeína presentaban mayor aceleración en su crecimiento con respecto al resto de fármacos y al grupo de control. Igualmente, mencionan que la codeína parece tener un efecto del “todo o nada”, ya que aunque los grupos tratados con codeína mostraban las mayores longitudes, la diferencia entre

concentraciones nunca fue significativa, lo que también se observa en los resultados de este estudio. Esto confirmaría que el efecto de la codeína sobre el crecimiento no es tan sensible a la concentración de ésta en el sustrato.

Los grupos tratados con benzodiazepina presentaron muy poca diferencia en la longitud de las larvas con respecto al grupo de control y en el caso que hubo, estas fueron inferiores. En el grupo tratado con benzodiazepina al 25% se observó que, a diferencia del resto de grupos de estudio, las longitudes obtenidas no presentaban diferencias significativas sino hasta las 72 horas de exposición al sustrato. El grupo tratado al 50%, comenzó a presentar diferencias significativas a las 48 horas, estas fueron debido a una fuerte disminución en las longitudes obtenidas en comparación al grupo de control; sin embargo, a las 72 horas se reduce la diferencia debido a la disminución en la longitud promedio del grupo de control. Dicha disminución también generó que el grupo tratado al 25% obtuviera diferencias significativas con el grupo de control.

Carvalho *et al.* (2001), determinaron que para las dos especies incluidas en su estudio (*C. albiceps* y *C. putoria*), las larvas que se alimentaron de tejidos contaminados con Diazepam, se desarrollaron más rápido que las larvas del grupo de control.

Los resultados de los bioensayos de Lyubimov *et al.* (2005) sugieren una leve aceleración del desarrollo para los grupos tratados con Diazepam en relación al grupo de control durante un rango de 24 horas a 72 horas de exposición al sustrato. También señalan que el nivel de alteración del crecimiento no estaría relacionado con la concentración de benzodiazepina en el sustrato, aunque la explicación a esto se deja para futuras investigaciones.

Sin embargo, Altunsoy *et al.* (2015) en su análisis de los efectos de varias concentraciones de Lorazepam en el crecimiento de larvas de *C. vicina* y *C. loewi*, determinaron que la presencia de benzodiazepinas afecta el crecimiento de las larvas y que está fuertemente ligado a la concentración del fármaco en el sustrato. Así los grupos tratados con menores concentraciones vieron acelerado su desarrollo por sobre el resto de grupos; sin embargo aquellos grupos tratados con concentraciones mayores vieron ralentizado de manera significativa su desarrollo respecto al grupo de control.

Pien *et al.* (2004), en bioensayos con larvas de *C. vicina*, exponiéndolas a distintas concentraciones de Nordiazepam, obtuvieron resultados similares. De los tres grupos tratados en el estudio, solo uno presentó diferencias significativas pasado el tercer día de exposición al sustrato.

Baia *et al.* (2016), encontraron pequeñas diferencias en el patrón de crecimiento de los grupos tratados con Flunitrazepam y el grupo de control; sin embargo ninguna estadísticamente significativa. Esto puede deberse en parte, a que las concentraciones usadas en este estudio, fueron las más bajas dentro de aquellos realizados con derivados de la benzodiazepinas y como se ha mencionado previamente, la evidencia disponible en la literatura, sumada a lo observado en el presente estudio sugieren al menos para los califóridos, que el grado de alteración producido por la benzodiazepina en el crecimiento de larvas está relacionado con la concentración.

Durante las primeras 36 horas del bioensayo, todos los grupos de estudio, tanto el grupo de control como los grupos tratados, presentaron un patrón de crecimiento similar, sin que los grupos expuestos a los fármacos presentaran diferencias significativas en sus longitudes con respecto al grupo de control, ni tampoco un efecto claro de los fármacos sobre las longitudes.

A partir de las 48 horas se observan patrones claros de comportamiento para cada tratamiento. Aunque no existe un rango acotado del tiempo en el que tardan en hacer efectos los fármacos sobre el crecimiento de las larvas, este suele variar entre las 12 horas a las 36 horas para la codeína y entre 36 horas y 72 horas para la benzodiazepina.

La duración del ciclo de desarrollo de los dípteros, sobre todo aquellos de relevancia médico legal es una variable complicada de abordar, especialmente si se considera la cantidad de evidencia que advierte sobre los riesgos de generalizar los resultados de bioensayos incluso entre una misma especie. Aunque solo recientemente esto se ha tomado en cuenta en la práctica, los datos que demuestran esta incongruencia se conocen hace más de 30 años, principalmente a través de las comparaciones de los trabajos de Marchenko (1980, 1988, 2001) y Greenberg (1985, 1991, 1993), sobre los efectos de distintas variables en el crecimiento de varias especies de dípteros en Rusia y Estados Unidos, respectivamente. Estos estudios encontraron discrepancias de hasta 1,3 días en el ciclo de desarrollo de especímenes de las mismas especies bajo iguales condiciones de desarrollo pero en distintas localidades geográficas. Esto dió las primeras señales de que los resultados obtenidos para los ciclos de desarrollo perdían precisión al aplicarse en áreas geográficamente muy distantes.

Owings *et al.* (2014), plantearon que esta diferencia en los ciclos de desarrollo podía encontrarse incluso al comparar grupos de individuos de la misma especie con poca distancia geográfica entre ellos. En su análisis de la variación en el ciclo de desarrollo de *C. macellaria*, demostraron que 3 colonias derivadas de poblaciones en distintos puntos geográficos, todos ellos ubicados dentro del territorio del estado de Texas diferían en tiempo de desarrollo y tamaño. Estos resultados más la evidencia previa, señalan categóricamente que los datos de desarrollo, incluso aquellos conoespecíficos, no deben ser aplicados universalmente.

Byrd y Butler (1996), probaron los efectos de distintas temperaturas sobre el crecimiento y la duración de cada estadio larval de *C. macellaria*. Los resultados obtenidos para el desarrollo completo varían en un rango de 588 horas para la temperatura más baja (15,6° C) y hasta 170 horas para la temperatura más alta (32,2° C). El grupo criado a 26,7° C demoró 177 horas en completar su ciclo. Estos resultados son bastante congruentes con la temperatura usada en el presente estudio (27° C), pues se ajustan bastante a las 175,2 horas que tardó el grupo de control en completar su ciclo.

Chaudhury y Skoda (2013), realizaron bioensayos para analizar los efectos de distintos tipos de dietas sobre el crecimiento de larvas de *C. macellaria* y la duración de sus estadios. Sus resultados confirman que entre los tipos de sustrato utilizados (sangre, músculo e hígado) no se encontraron diferencias significativas en la duración de cada estadio o el crecimiento de las larvas. Sin embargo, el hecho de que estas pequeñas diferencias no tenga significación estadística, no expresa que no puedan alterar la estimación del IPM, por lo que igual debe considerarse con precaución.

Álvarez García *et al.* (2017), analizaron el ciclo de desarrollo de larvas de varias especies de califoridos procedentes de Sincelejo (Colombia) a una temperatura constante de 29,14° C. Los resultados de sus bioensayos arrojan un ciclo de desarrollo total de 18,30 días (439,2 horas) para machos y 21,23 días (509,52 horas) para hembras. Esto representa un ciclo sumamente largo si se toma en cuenta que la temperatura en que se mantuvieron las larvas durante el bioensayo suele ser más alta que la mayoría de estudios del área y sin embargo los resultados coinciden con los ciclos desarrollados en las temperaturas más bajas. Igualmente, la desviación estándar del tiempo de desarrollo total fue de 10,13 días (243,12 horas) para

machos y 10,23 días (245,52 horas) para hembras, márgenes de dispersión demasiado amplios para considerar su aplicación al contexto forense.

Las diferencias en los resultados entre estudios puede deberse a una gran cantidad de factores, tanto intrínsecos como extrínsecos. Los factores intrínsecos corresponden a los discutidos anteriormente en el estudio de Owings *et al.* (2014), como son las respuestas específicas de cada población a las condiciones geográficas. Por su parte, los factores extrínsecos están relacionados a las condiciones experimentales, como la densidad de individuos en las masas larvarias, temperatura ambiental, tipo y disponibilidad de sustrato, etc.

Estas diferencias en la duración de los ciclos, ya sea por factores intrínsecos o extrínsecos es una complicación importante a la hora de generar modelos de estimación de IPM como los modelos de HGA y HDA. Los valores obtenidos en este estudio para las HGA y los HDA presentan diferencias lo suficientemente grandes para inducir errores en la estimación del IPM. Si bien estas diferencias varían entre grupos y en los grupos tratados con concentraciones mayores son mucho más evidentes, las diferencias encontradas en los grupos tratados con concentraciones menores igualmente pueden alterar en algún grado la estimación de IPM.

La importancia de realizar estos análisis radica en que una simple comparación y análisis estadístico puede entregar evidencia de modificaciones en la longitud y tiempos de crecimiento. No obstante aquellos cambios que pueden ser considerados irrelevantes por no ser estadísticamente significativos, igualmente pueden alterar los resultados obtenidos por modelos matemáticos de predicción, entre ellos aquellos basados en temperatura (HGA, HDA).

El grupo de estudio tratado con benzodiazepina al 25% no presentó diferencias morfológicas o de crecimiento sino hasta las 72 horas, por lo que los análisis estadísticos indican que no existen diferencias significativas, ni en tamaño ni en la duración total de los ciclos. Sin embargo, si se revisan los resultados obtenidos dentro de un modelo, a pesar de presentar diferencias estadísticas mínimas, estas variaciones pueden llevar a un error de estimación de 4,5 horas. Aunque parece poco tiempo, este nivel de margen de error puede invalidar el uso de evidencia entomológica en contexto judicial. Es de esperar que si un grupo que mantuvo un patrón de crecimiento similar al grupo de control, genera ese grado de error, aquellos grupos con diferencias mayores pueden inutilizar completamente el uso de modelos predictivos.

Weatherbee *et al.* (2017), analizaron los resultados para valores de HGA obtenidos en sus bioensayos, y los compararon con los resultados de Byrd y Butler (1996) y Byrd y Allen (2001) para *C. macellaria* y *Phormia regina* (Meigen). El análisis contemplaba determinar si los datos entre estudios se ajustan, y al mismo tiempo generar rangos para una correcta estimación de HGA. A pesar de generar rangos medianamente acotados, los autores son claros en mencionar que existe variabilidad sustancial en el tiempo de desarrollo de larvas, que puede influir en la estimación de IPM con métodos basados en HGA.

La comprensión de estas fuentes de variabilidad en un contexto natural tiene el potencial de encausar de mejor manera la construcción de modelos predictivos de IPM. De hecho, la importancia de refinar los modelos predictivos existentes o desarrollar nuevos modelos que consideren más variables, es probablemente el principal esfuerzo actual de la disciplina (Weatherbee, 2017).

Futuras investigaciones deberían determinar si los efectos mencionados se mantienen en sustancias metabolizadas en el cuerpo de una víctima, junto con aplicar los métodos detallados a lo largo de este estudio para determinar si estas diferencias generarían un impacto en la estimación de IPM en métodos predictivos en base a temperatura.

Finalmente, resulta importante estudiar a futuro los efectos de otros tipos de sustancias comunes en casos de sobredosis en aquellas especies de uso común en la Entomología Forense, en la mayor cantidad de lugares posibles a fin de poder reducir el margen de error causado por la generalización de los datos, incluso entre individuos de la misma especie.



5. CONCLUSIONES

El presente estudio tuvo como objetivo, demostrar que sustratos contaminados con fármacos de prescripción común, pueden inducir cambios en el crecimiento que alteren la estimación de HGA, también demostrando diferencias en los tiempos de desarrollo y cambios morfológicos en las larvas.

1. Los resultados de los bioensayos de mortalidad en los grupos de estudio con benzodiazepina señalan una tasa de mortalidad corregida de 13,9% para el grupo tratado al 25% y 20,1% para el grupo tratado al 50%. Los bioensayos de mortalidad realizados con codeína muestran una mortalidad corregida de 6,9% para el grupo tratado al 25% y 10,3% para el grupo tratado al 50%.

2. Existe una menor diferencia de mortalidad entre los grupos tratados con codeína, lo que podría sugerir que el efecto sobre las larvas es menos dependiente de la concentración, al contrario de lo que ocurre en los bioensayos realizados con benzodiazepina.

3. Los grupos de estudio tratados con codeína presentaron variaciones significativas con respecto al grupo de control tanto en longitud como en la duración de su ciclo. Ambas concentraciones mostraron mayor longitud corporal que el grupo de control, registrando diferencias de hasta 4 mm a las 72 horas de exposición al sustrato. El crecimiento ocurrió de manera acelerada, con tiempos de desarrollo mucho más cortos que el resto de grupos de estudio. No obstante se observó que el efecto de la codeína se ve poco influenciado por la concentración en el sustrato, al no encontrarse diferencias significativas entre ambas concentraciones estudiadas.

4. Los grupos tratados con benzodiazepina presentaron distintos comportamientos dependiendo de la concentración. El grupo tratado con benzodiazepina al 25%, presentó solo un pequeño aumento de longitud que llegó a ser significativo a las 72 horas de exposición al sustrato. No obstante, el grupo tratado con benzodiazepina al 50%, fue el único grupo que presentó una reducción de tamaño respecto al grupo de control con hasta 5 mm de diferencia en 72 horas. El crecimiento presentó un comportamiento similar, con el grupo tratado al 25% creciendo a un ritmo similar al grupo de control a lo largo de casi todo el bioensayo y el grupo tratado al 50% fue el único cuyo ciclo de desarrollo tardó más que el grupo de control.

5. La estimación de HGA para los distintos grupos reflejan los resultados obtenidos en los bioensayos de crecimiento. Se encontraron diferencias para estos índices en todos los grupos tratados respecto al grupo de control, ninguna de ellas significativas. Con los datos obtenidos se estimó el margen de error en horas que estas diferencias pueden generar en un modelo teórico. Se encontraron diferencias de 4,5 horas (benzodiazepina al 25%), 5,6 horas (codeína al 50%) y 10,6 horas (codeína al 50%), con el grupo tratado con benzodiazepina al 50%, todas estas diferencias representan horas restadas a las estimaciones del grupo de control. El grupo tratado con benzodiazepina al 25% fue el único cuya diferencia representa horas agregadas a la estimación, sumando 7,9 horas al error de las estimaciones.

6. Se encontraron cambios morfológicos inducidos por la presencia de fármacos en el sustrato. Los grupos tratados con benzodiazepina concentraron sus cambios en aquellos ejemplares tratados con la concentración más alta. Entre estas se encuentran, junto con tener la menor longitud promedio, un desarrollo alterado de los espiráculos posteriores, con aberturas irregulares y peritrema poco definido. Los grupos tratados con codeína presentaron cambios similares entre grupos, con cambios en los espiráculos anteriores (fusiones y

deformidad). Los espiráculos anteriores igualmente son poco definidos y más pequeños. También se observan alteraciones en los ganchos bucales, siendo más pequeños que los del grupo de control.

7. Los resultados obtenidos en este estudio confirman los efectos que fármacos derivados de la codeína y benzodiazepina pueden causar sobre el ciclo de desarrollo de larvas de *C. macellaria*, por lo que la importancia del presente estudio radica en confirmar que hay alteraciones, las identifica y determina sus repercusiones en la estimación de IPM. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio no deberían ser aun aplicados directamente en contexto forense, ya que aunque se confirman efectos como la alteración en la duración de ciclo, en el crecimiento y en las alteraciones morfológicas, no se puede confirmar que el compuesto activo de los fármacos metabolizados en el cuerpo de una víctima, genere el mismo grado de efectos que al consumirse directamente como se ha hecho en los bioensayos.



6. BIBLIOGRAFIA

- Abbott, W. S. (1925). *A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide*. Journal of Economic Entomology, 18(2): 265–267.
- Álvarez, D. (2016). *Diversidad de Calliphoridae (Diptera: Calypttratae) y tabla de vida de Cochliomyia macellaria (Fabricius, 1775) en el área urbana del municipio de Sincelejo, (Sucre, Colombia) (Tesis de pregrado)*. Universidad de Sucre, Colombia.
- Alvarez Garcia, D., Pérez-Hérazo, A., y Amat, E. (2017). *Life History of Cochliomyia macellaria (Fabricius, 1775) (Diptera, Calliphoridae), a Blowfly of Medical and Forensic Importance*. Neotropical Entomology, 46(6), 606–612.
- Anderson, G. S. (1999). *Wildlife Forensic Entomology: Determining Time of Death in Two Illegally Killed Black Bear Cubs*. Journal of Forensic Sciences, 44(4), 856–859.
- Anderson, G. (2010) *Factors that influence insect succession on carrion*, en: Byrd, J., Castner J., Eds.), en *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations*, CRC Press.
- Artigas, J. (1994). *Entomología económica: Insectos de interés agrícola, forestal, médico y veterinario (nativos, introducidos y susceptibles de ser introducidos)*. Dos volúmenes (1128 + 948 pp.), Ediciones Universidad de Concepción. Concepción, Chile.
- Arnaldos, M., García, M., Romera, E., Presa, J. y Luna, A. (2005) *Estimation of postmortem Interval in real cases based on experimentally obtained entomological evidence*. Forensic Science international, 149(1): 57-65.
- Ash, N., y Greenberg, B. (1975). *Developmental Temperature Responses of the Sibling Species Phaenicia sericata and Phaenicia pallescens*. Annals of the Entomological Society of America, 68(2): 197–200.
- Baia, T., Campos, A., Wanderley, B., y Gama, R. (2016). *The Effect of Flunitrazepam (Rohypnol®) on the Development of Chrysomya megacephala (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) and its Implications for Forensic Entomology*. Journal of Forensic Sciences, 61(4): 1112–1115.
- Benecke, M. (1998). *Six Forensic Entomology Cases: Description and Commentary*. Journal of Forensic Sciences, 43(4): 14309J.
- Berg, M., y Benbow M. (2013). *Environmental factors associated with Phormia regina (Diptera: Calliphoridae) oviposition*. Journal of Medical Entomology 50: 451-457.
- Bertone, M., Courtney, G., y Wiegmann, B. (2008). *Phylogenetics and temporal diversification of the earliest true flies (Insecta: Diptera) based on multiple nuclear genes*. Systematic Entomology, 33(4): 668–687.
- Beyer, J., Enos, W., y Stajčić, M. (1980). *Drug identification through analysis of maggots*. Journal of forensic sciences, 25(2): 411–412.
- Byrd, J. H., y Butler, J. F. (1996). *Effects of temperature on Cochliomyia macellaria (Diptera: Calliphoridae) development*. Journal of medical entomology, 33(6), 901–905.

- Byrd, J. y Castner J. (2001). *Forensic Entomology: The utility of arthropods in legal investigations*. Primera edición, Boca Raton, CRC Press.
- Carvalho, L., Linhares, A. y Trigo, J. (2001). *Determination of drug levels and the effect of diazepam on the growth of necrophagous flies of forensic importance in southeastern Brazil*. *Forensic Science International*, 120(1-2): 140–144.
- Catts, E. y Goff, M. (1992). *Forensic entomology in criminal investigations*. *Annual Review of Entomology*, 37: 253-272.
- Chapman, R.F. (1982). *The Insects: Estructure and Function*. Tercera edición. Harvard University Press, Cambridge.
- Cone, E. J. (2006). *Ephemeral profiles of prescription drug and formulation tampering: Evolving pseudoscience on the Internet*. *Drug and Alcohol Dependence*, 83: S31– S39.
- Cyr, T.L., (1993). *Forensic implications of biological differences among geographic races of *Phormia regina* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae)*. (Tesis de Magister), Washington State University, Pullman, Washington, USA.
- DeVault, T. L., Rhodes, O. E. y Shivik, J. A. (2003). *Scavenging by vertebrates: behavioral, ecological and evolutionary perspectives on an important energy transfer pathway in terrestrial ecosystems*. *Oikos* 102: 225–234.
- Disney R. (1994) *Scuttle Flies: The Phoridae*. Chapman & Hall; London.
- Evenhuis, N.I., Pape, T., Pont, A.C. y Thompson, (2007). *Biosystematics Data base of world Diptera* (Ver. 9. 5, <http://www.diptera.org/biosys.htm>).
- Faris, A., Wang, H., Tarone, A. y Grant, W. (2016). *Forensic Entomology: Evaluating Uncertainty Associated With Postmortem Interval (PMI) Estimates With Ecological Models*. *Journal of Medical Entomology*, 53(5): 1117–1130.
- Flores M, Crippen T y Longnecker M. (2017) *Non-consumptive effects of predatory *Chrysomya rufifacies* larval cues on larval *Cochliomyia macellaria* growth and development*. *Journal of Medical Entomology*, 54(5):1167–1174.
- Gámez M., Irala C. (1996) *Selección de Benzodiacepinas. Bases para su utilización en el Hospital*. *Farmacia Hospitalaria*, 21 (2): 117-122.
- García-Rojo, A. (2004). *Estudio de la sucesión de insectos en cadáveres en Alcalá de Henares (Comunidad Autónoma de Madrid) utilizando cerdos domésticos como modelos animales*. *Boletín de Sociedad Entomológica Aragonesa*, 34: 263-269.
- George, K., Archer, M. y Toop, T. (2013). *Abiotic environmental factors influencing blowfly colonisation patterns in the field*. *Forensic Science International*, 229(1-3): 100–107.
- Gill-King, H. (1997). *Chemical and ultrastructural aspects of decomposition*, en *Forensic Taphonomy: The Postmortem Fate of Human Remains* (Haglund W. y Sorg, M., Eds.). CRC Press.

Goodbrod, J. y Goff, M. (1990). *Effects of larval population density on rates of development and interactions between two species of Chrysomya (Diptera: Calliphoridae) in laboratory culture*. Journal of Medical Entomology 27 (3): 338-343.

Goff, M., Brown, W., Hewadikaram, K. y Omori, A. (1991) *Effect of heroin in decoposing tissues on the development of Boettcherisca peregrina (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect on estimation of postmortem intervals using arthropod development patterns*. Journal of Forensic Science 36(2): 537-542.

Goff, M., y Lord, W. (1994). *Entomotoxicology. A new area for forensic investigation*. The American journal of forensic medicine and pathology, 15(1): 51-57.

Gomes, R., Parra, L., Fernández, J., Hinojosa, S., (2017). *Análisis entomológico forense para la estimación del intervalo post mortem, en la VIII Región de Chile: Un abordaje preliminar*. Revista Científica Forense, 6: 191-211.

Gunn, J. A., Shelley, C., Lewis, S. W., Toop, T. y Archer, M. (2006). *The determination of morphine in the larvae of Calliphora stygia using flow injection analysis and HPLC with chemiluminescence detection*. Journal of Analytical Toxicology, 30(8): 519-523.

Greenberg, B. (1985) *Forensic entomology: case studies*. Bulletin of the Entomological Society, 31:25-28.

Greenberg, B. (1991). *Flies as Forensic Indicators*. Journal of Medical Entomology, 28(5): 565-577.

Greenberg, B., y Tantawi, T. (1993). *Different Developmental Strategies in Two Boreal Blow Flies (Diptera: Calliphoridae)*. Journal of Medical Entomology, 30(2), 481-484.

Henssge, C., Madea, B., Knight, B., Nokes, L. y Krompecher, T. (1995). *The Estimation of the time since death in the Early Postmortem Period*, Arnold, London.

Introna, F., Campobasso, C. y Goff, M. (2001). *Entomotoxicology*. Forensic science international, 120(1-2): 42-47.

James, M. (1947). *The flies that causes myiasis in man*. United States Department of Agriculture. Miscellaneous Publications, 631: 1-175.

Jones, C., Mack, K y Paulozzi, L. (2013). *Pharmaceutical overdose deaths*, United States, 2010. Journal of the American Medical Association, 309(7): 657-659.

Kintz, P., Tracqui, A., Ludes, B., Waller, J., Boukhabza, A., Mangin, P., Lugnier, A. y Chaumont, A. (1990). *Fly larvae and their relevance in forensic toxicology*. The American journal of forensic medicine and pathology, 11(1): 63-65.

Knight, B. (1991). *Forensic Pathology*, Oxford University Press, New York, 518pp.

Kreitlow, K. (2010). *Insect sucesion in a natural enviroment*, en *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations* (Byrd, J. y Castner J., Eds). CRC Press.

- Lafarga, P. y Cruz, C. (1993). *Codeína en insuficiencia renal. A propósito de un caso*. Revista de Ciències de La Salut de La Reial Acadèmia de Medicina de Les Illes Balears, 8(3): 147–152.
- Leclercq, M. (1976) *Entomologie et médecine légale: Sarcophaga argyrostoma Robineau-Desvoidy (Diptera: Sarcophagidae) et Phaenicia sericata (Meigen) (Diptera. Calliphoridae)*. Bulletin et Annales de la Société royale Belge d'Entomologie, 112: 119-126.
- Liu W., Longnecker M. y Tarone M. (2016) *Response of Lucilia sericata (Diptera: Calliphoridae) to compounds from microbial decomposition of larval resources*. Animal Behavior, 115:217–225.
- Lord, W. y Goff, M. (2003) *Forensic entomology: application of entomological methods to the investigation of death*. En Handbook of forensic pathology, 2nd edn. (Froede R., Ed) CAP, Illinois.
- Marchenko M. (1980). *Classifying of cadaveric entomofauna. Biology of flies: the forensic medical role*. Sudebno-Meditsinskaia Ekspertiza, 23:17–20.
- Marchenko M. (1988). *Medico-legal relevance of cadaver entomo-fauna for the determination of the time since death*. Acta Medicinae Et Socialis Organe Officiel De L'Academie Inter-nationale De Medicine Legale Et De Medicine Sociale 38:257–302.
- Marchenko M. I. (2001). *Medicolegal relevance of cadaver entomofauna for the determination of the time of death*. Forensic science international, 120(1-2): 89–109.
- Masiero, F., Aguiar, E., Pereira, D. y Thyssen, P. (2019). *First Report on the Use of Larvae of Cochliomyia macellaria (Diptera: Calliphoridae) for Wound Treatment in Veterinary Practice*. Journal of Medical Entomology, X, 1–4.
- Matuszewski, S. y Szafałowicz, M. (2013). *Temperature-dependent appearance of forensically useful beetles on carcasses*. Forensic Science International, 229(1-3): 92–99.
- Matuszewski, S., Konwerski, S., Frątczak, K. y Szafałowicz, M. (2014). *Effect of body mass and clothing on decomposition of pig carcasses*. International Journal of Legal Medicine, 128(6): 1039–1048.
- Merritt, R. y De Jong, G. (2016). *Arthropod communities in terrestrial environments*. En, Carrion ecology, evolution, and their applications. (Benbow, M., Tomberlin, J. Tarone A. Eds.) CRC Press.
- Mena, C, Bettini, M, Cerda,P, Concha, F. y Paris, E. (2004). *Epidemiología de las intoxicaciones en Chile: una década de registros*. Revista médica de Chile, 132(4): 493-499.
- Moore J. y Casale J. (1994) *In depth chromatography analyses of illicit cocaine and its precursor, cocas leaves*. Journal of Chromatography, 674: 165–205.
- Mohr, R. y Tomberlin, J. (2014). *Development and validation of a new technique for estimating a minimum postmortem interval using adult blow fly (Diptera: Calliphoridae) carcass attendance*. International Journal of Legal Medicine, 129(4): 851–859.

- Oliva A. (1997). *Insectos de interés forense de Buenos Aires (Argentina). Primera lista ilustrada y datos bionómicos*. Revista de Museo Argentino de Ciencias Naturales' Bernardino Rivadavia' Entomología, 7: 13-59.
- Owings, C., Spiegelman, C., Tarone, A. y Tomberlin, J. (2014). *Developmental variation among Cochliomyia macellaria Fabricius (Diptera: Calliphoridae) populations from three ecoregions of Texas, USA*. International Journal of Legal Medicine, 128(4): 709–717.
- Pechal, J. L., Crippen, T. L., Tarone, A. M., Lewis, A. J., Tomberlin, J. K. y Benbow, M. E. (2013). *Microbial Community Functional Change during Vertebrate Carrion Decomposition*. PLoS ONE, 8(11): e79035.
- Pechal J. y Benbow M. (2016) *Microbial ecology of the salmon necrobiome: evidence salmon carrion decomposition influences aquatic and terrestrial insect microbiomes*. Environmental Microbiology, 18:1511–1522
- Pérez, A. E., Haskell, N. H. y Wells, J. D. (2014). *Evaluating the utility of hexapod species for calculating a confidence interval about a succession based postmortem interval estimate*. Forensic Science International, 241: 91–95.
- Pounder D. J. (1991). *Forensic entomo-toxicology*. Journal - Forensic Science Society, 31(4): 469–472.
- Rognes K. (1997) *The Calliphoridae (Blowflies) (Diptera: Oestroidea) are not a monophyletic group*. Cladistics, 13: 27-66.
- Sadler, D. W., Richardson, J., Haigh, S., Bruce, G. y Pounder, D. J. (1997). *Amitriptyline accumulation and elimination in Calliphora vicina larvae*. The American journal of forensic medicine and pathology, 18(4): 397–403.
- Schoenly K. (1992) *Statistical analysis of successional patterns in carrion-arthropod assemblages: implications for forensic entomology and determination of the postmortem interval*. Journal of Forensic Science, 37(6): 1489-1513.
- Schoenly, K., Goff, M. L., Wells, J. D. y Lord, W. D. (1996). *Quantifying Statistical Uncertainty in Succession-Based Entomological Estimates of the Postmortem Interval in Death Scene Investigations: A Simulation Study*. American Entomologist, 42(2): 106–112.
- Shaheen, M. y Fathy, H., (2008). *Surface ultrastructural changes on third instar larvae of Chrysomya albiceps (Diptera: Calliphoridae) induced by codeine phosphate*. Mansoura Journal of Forensic Medicine & Clinical Toxicology, XVI(1), 61–72.
- Shishido, W. y Hardy, D. (1969). *Myiasis of new-born calves in Hawaii*. Proceedings of the Hawaiian Entomological Society, 20: 435–438.
- Smith, K. (1986). *A Manual of Forensic Entomology*, Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Spicka, A., Johnson, R., Bushing, J., Higley, G. y Carter, O. (2011). *Carcass mass can influence rate of decomposition and release of ninhydrin-reactive nitrogen into gravesoil*. Forensic Science International, 209(1-3): 80–85.

- Tantawi T. y Greenberg B. (1993) *The effect of killing and preservative solutions on estimates of maggot age in forensic cases*. Journal of Forensic Science, 38(3): 702-707.
- Tomberlin, J., Benbow, M., Tarone, A. y Mohr, R. (2011). *Basic research in evolution and ecology enhances forensics*. Trends in Ecology & Evolution, 26(2): 53–55.
- Tomberlin, J., Crippen, T., Tarone, A., Singh, B., Adams, K., Rezenom, Y., Benbow, E. Flores, M., Longnecker, M., Pechal, J., Russell, D., Beier, R. y Wood, T. (2012). *Interkingdom response of flies to bacteria mediated by fly physiology and bacterial quorum sensing*, Animal Behavior 84:1449–1456,
- Tomberlin. J., Crippen T., Tarone A., Chaudhury, M., Singh, B., Cammack, J. y Meisel, R. (2017) *A review of bacterial interactions with blow flies (Diptera: Calliphoridae) of medical, veterinary, and forensic importance*. Annals of the Entomological Society of America 110:19–36
- Tracqui, A., Keyser-Tracqui, C., Kintz, P. y Ludes, B. (2004). *Entomotoxicology for the forensic toxicologist: much ado about nothing*. International journal of legal medicine, 118(4): 194–196.
- Van Hout, MC. Bergin, M., Foley, M., Rich, E., Rapca, A., Harris, R. y Norman I. (2014) *A Scoping Review of Codeine Use, Misuse and Dependence, final report*. CODEMISUSED Project European Commission 7th Framework Programme, EU. Brussels.
- Velasquez, K. (2015). *Necesidad de la aplicación de la Entomología Forense como herramienta para establecer la muerte de una persona en Guatemala*. (Tesis de pregrado)Universidad Rafael Landívar, Ciudad de Guatemala, Guatemala.
- Voss, S. C., Spafford, H. y Dadour, I. R. (2010). *Temperature-dependant development of Nasonia vitripennison five forensically important carrion fly species*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 135 (1): 37-47.
- Weatherbee, C., Pechal, J., Benbow, M. (2017) *The dynamic maggot mass microbiome*. Annals of the Entomological Society of America, 110(1):45–53
- Wells, J. D. y Greenberg, B. (1994). *Effect of the Red Imported Fire Ant (Hymenoptera: Formicidae) and Carcass Type on the Daily Occurrence of Postfeeding Carrion-Fly Larvae (Diptera: Calliphoridae, Sarcophagidae)*. Journal of Medical Entomology, 31(1): 171–174.
- Wells, J. y LaMotte, L. (2001) *Estimating the postmortem interval*. In *Forensic Entomology*. En *The Utility of Arthropods in Legal Investigations*, (Byrd, J., Castner, J., Eds.), Boca Raton, CRC Press.
- Williams, K. y Pounder, J. (1997). *Site-to-site variability of drug concentrations in skeletal muscle*. The American journal of forensic medicine and pathology, 18(3): 246–250.
- Wolff, M., Uribe, A., Ortiz, A. y Duque, P. (2001). *A preliminary study of forensic entomology in Medellín, Colombia*. Forensic Science International, 120: 53-59.
- Whitworth, T. (2006). *Keys to the genera and species of blow flies (Diptera: Calliphoridae) of America north of Mexico*. Proceedings of the Entomological Society of Washington, 108, 689–725.

Zhu, J., Chaudhury, M., Tangtrakulwanich, K., y Skoda, S. (2013). *Identification of Oviposition Attractants of the Secondary Screwworm, Cochliomyia macellaria (F.) Released from Rotten Chicken Liver*. *Journal of Chemical Ecology*, 39:11–12.

