

Efecto de la Temperatura Controlada en el Ciclo Biológico de *Cochliomyia Macellaria* Fabricius, 1775; *Chrysomya Rufifacies* Macquart, 1843 y *Phaenicia Eximia* Wiedemann, 1819 (Diptera: Calliphoridae)

Effect of Controlled Temperature on Biological Cycle of *Cochliomyia Macellaria* Fabricius, 1775; *Chrysomya Rufifacies* Macquart, 1843 Y *Phaenicia Eximia* Wiedemann, 1819 (Diptera: Calliphoridae)

Efeito da temperatura controlada no ciclo biológico de *Cochliomyia Macellaria* Fabricius, 1775; *Chrysomya Rufifacies* Macquart, 1843 e *Phaenicia Eximia* Wiedemann, 1819 (Diptera: Calliphoridae)

Autor: Yunier Lamoth Mayet

Doctor en Ciencias Policiales.

Unidad de Preparación y Ciencia, Dirección de Criminalística, La Habana, Cuba.

Correo electrónico: ylamothm@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-6845-8050>

Tipo de publicación. Original

RESUMEN

Cochliomyia macellaria Fabricius, 1775; *Chrysomya rufifacies* Macquart, 1843 y *Phaenicia eximia* Wiedemann, 1819, pertenecen a la familia Calliphoridae y son consideradas por la comunidad científica internacional de interés criminalístico; debido a que son frecuentes en la mayoría de los estados de descomposición de un cadáver. Los estudios sobre la taxonomía e influencia de factores climatológicos en el desarrollo de estadios inmaduros de califóridos, es una vertiente investigativa sin precedentes en la Cuba. Los insuficientes referentes sobre esta fauna en particular, impiden la utilización de estas especies para determinar el intervalo postmortem en la Criminalística cubana. El objetivo de esta investigación fue evaluar la influencia de la temperatura en condiciones controladas de laboratorio a (30° C y 70-90 % de humedad relativa), en la duración del ciclo biológico de estas especies. Los califóridos adultos se recolectaron mediante la técnica de jameo y se identificaron mediante claves dicotómicas del grupo en el Neotrópico. Las características morfológicas de los estadios inmaduros observadas bajo el microscopio óptico fueron descritas e ilustradas para posteriormente ser identificadas.



Se presentan curvas de crecimiento larval para cada una de las seleccionadas. La morfología de los estadios inmaduros permitió facilitar de manera correcta su identificación taxonómica, así como la determinación de la transición de sus estadios larvales. Este estudio es el primero realizado con Calliphoridae. Los resultados obtenidos enriquecen la taxonomía sobre esta familia de insectos; se fortalece el conocimiento de estos en apoyo a su utilidad práctica y constituye una herramienta alternativa y novedosa para la estimación del intervalo postmortem.

Palabras clave: Calliphoridae; Criminalística; Cuba; Díptero; Larvas.

ABSTRACT

Cochliomyia macellaria Fabricius, 1775; *Chrysomya rufifacies* Macquart, 1843 y *Phaenicia eximia* Wiedemann, 1819, they belong to the family Calliphoridae and they are considered by the international scientific community of criminalistic interest; because they are frequent in most of the states of decomposition of a carcass. The studies on the taxonomy and influence of climatological factors in the development of immature stadiums of blowflies, it is an investigative slope without precedents in the Cuba. The insufficient ones relating on this faune in particular, they impede the use of these species to determine the interval postmortem in the Cuban Criminalistic. The objective of this investigation was to evaluate the influence of the temperature under controlled conditions of laboratory to (30° C and 70-90 % of relative humidity), in the duration of the biological cycle of these species. The adult blowflies was gathered by means of the jameo technique and they were identified by means of key dichotomous of group in Neotropic. The morphological characteristics of the immature stadiums observed under the optic microscope were described and cultured for later on to be identified. They are presented curved of larval growth for each one of those selected. The morphology of the immature stadiums allowed it facilitated in a correct way its identification taxonómica, as well as the determination of the transition of its larval stadiums. This study is the first one carried out with Calliphoridae. The obtained results enrich the taxonomy on this family of insects; strengthens the knowledge of these in support to their practical utility and it constitutes an alternative and novel tool for the estimate of the interval postmortem.

Key words: Calliphoridae; Criminalistic; Cuba; Fly; Worms.

RESUMO

Cochliomyia macellaria Fabricius, 1775; *Chrysomya rufifacies* Macquart, 1843 e *Phaenicia eximia* Wiedemann, 1819, pertencem à família *Calliphoridae* e são consideradas pela comunidade científica internacional como sendo de interesse criminalístico, devido ao facto de serem frequentes na maioria dos estados de decomposição de um cadáver. Os estudos sobre a taxonomia e a influência de factores climatológicos no desenvolvimento de estágios imaturos de *califóridos* são uma vertente de investigação sem precedentes em Cuba. A insuficiência de referências sobre esta fauna em particular impede a utilização destas espécies para determinar o intervalo pós-morte na criminalística cubana. O objectivo desta investigação foi avaliar a influência da temperatura em condições controladas de laboratório (30 °C e 70-90 % de humidade relativa) na duração do ciclo biológico destas espécies. Os *califoros* adultos foram recolhidos através da técnica de jameo e identificados através de chaves dicotómicas do grupo no Neotrópico. As características morfológicas dos estágios imaturos observadas ao microscópio óptico foram descritas e ilustradas para posterior identificação. São apresentadas curvas de crescimento larval para cada uma das espécies seleccionadas. A morfologia dos estágios imaturos facilitou a identificação taxonómica correcta, bem como a determinação da transição dos seus estágios larvais. Este estudo é o primeiro realizado com *Calliphoridae*. Os resultados obtidos enriquecem a taxonomia sobre esta família de insectos; reforça-se o conhecimento sobre os mesmos, apoiando a sua utilidade prática e constituindo uma ferramenta alternativa e inovadora para a estimativa do intervalo pós-morte.

Palavras-chave: Calliphoridae; Criminalística; Cuba; Díptero; Larvas.

INTRODUCCIÓN

La presencia o ausencia de ciertas especies de moscas en la escena del crimen puede proporcionar pistas en cuanto a cuándo, dónde y cómo aconteció el mismo (Merrit et al., 2000). La identificación de estos insectos se convierte, en un elemento crucial en el campo de la Entomología Criminalística. En cambio, si la determinación de las especies es incorrecta, la interpretación del insecto puede no ser válida (Byrd & Castner, 2010). Las moscas califóridas son un grupo de interés criminalístico por sus hábitos necrófagos (Akbarzadeh et al., 2015). Estas moscas son las primeras en arribar y colonizar un cadáver, completan su ciclo de vida y caracterizan etapas particulares de la descomposición (Goff, 2000; Pechal et al., 2014).

Las larvas se usan fundamentalmente para establecer el tiempo transcurrido desde la muerte hasta el hallazgo del cuerpo, conocido como intervalo post mortem (IPM) (Sharma et. al, 2015). Para obtener un IPM confiable se necesita un conocimiento adecuado de las especies y de los cambios que suceden en su ciclo de vida ante las variaciones de las condiciones ambientales (Moffatt et al., 2016). La identificación específica de los diferentes estadios del desarrollo de califóridos en ocasiones resulta difícil porque ciertas especies son muy similares morfológicamente. En muchos casos, no hay buenas referencias para distinguirlas entre ellas, especialmente en algunas áreas geográficas (Ubero-Pascal et al., 2012). La fauna de califóridos de las Antillas y en especial de Cuba, permanece sin un tratamiento que permita la determinación de las especies inmaduras y su distribución (Naranjo et al., 2009).

Algunas claves ayudan al reconocimiento de los géneros y especies neotropicales como lo de Amat et al., (2008) y Whitworth, (2010; 2012; 2014). Cuba cuenta con los aportes de Alayo & García (1983) y Alayo & Garcés (1989), lo cual indica que el conocimiento de las moscas califóridas en nuestro archipiélago no es favorable. En relación con el ciclo de vida y los estadios inmaduros el problema se intensifica aún más, al no contar con trabajos realizados. Actualmente en Cuba sólo se ha estudiado la entomofauna asociada al proceso de descomposición cadavérica (Dariel, 2016; Jiménez-Gómez, 2010; Lamothe, 2011; Megna et al., 2021; Naranjo, 2009). Al no existir estudios que faciliten la identificación de los estadios inmaduros de las moscas califóridas, el presente trabajo pretende contribuir al conocimiento estas especies de interés criminalístico; a partir de la descripción morfométrica de los estadios inmaduros (huevo, larvas y pupa) además de caracterizar su desarrollo larval en condiciones de laboratorio.

DESARROLLO

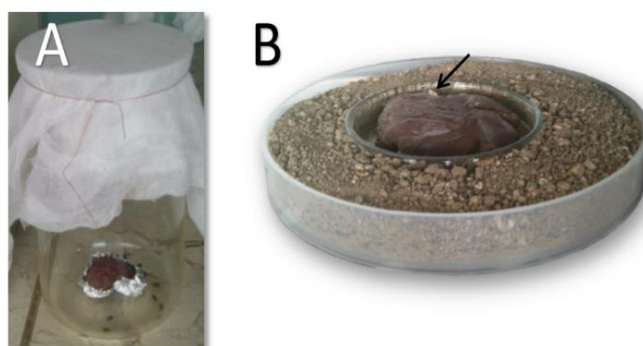
Para el estudio se seleccionaron las especies *Chrysomya rufifacies* Macquart, 1844, *Cochliomyia macellaria* Fabricius, 1775 y *Lucilia eximia* Wiedemann, 1819. Estas se caracterizan por colonizar cadáveres, participan activamente en el proceso de descomposición hasta completar su ciclo de vida (Vélez & Wolff, 2008). Las colonias que se usaron se obtuvieron mediante la recolecta de moscas adultas, con la ayuda de una red entomológica y frascos. Las capturas de los ejemplares y el estudio se efectuaron en el Laboratorio Provincial de Criminalística de la provincia Camagüey, Cuba (21°21'17.2"N- 77°52'22.8"W). Para atraer las moscas se utilizaron cebos de carne de res situados entre la vegetación. Los adultos se

identificaron y se separaron basados en su morfología, para esto se recurrió a las claves taxonómicas de Amat et al (2008); Grella et al (2015); Whitworth (2010).

Las hembras grávidas se ubicaron en vasos de precipitados (beaker) de 5 000 ml cubiertos con gasa, que contenían una fracción de hígado de cerdo doméstico (≈ 100 g) en papel aluminio (Fig. 1A). El papel aluminio proporciona espacios oscuros, protegidos y húmedos preferidos por las moscas en la oviposición (García-Espinoza et al., 2012). La carne en papel aluminio se revisó cada cuatro horas para detectar las puestas de huevos. Las masas de huevos se recogieron y distribuyeron en placas de Petri, rotuladas con el número asignado y el nombre de la especie. En cada placa, el alimento suministrado consistió en 40 g de hígado de cerdo colocado sobre gasa. Las placas se identificaron como A y B.

Figura 1.

Condiciones establecidas para el mantenimiento en el laboratorio. A) Beaker preparado para la obtención de huevos. B) Placas de Petri montadas para la cría de las larvas.



Nota: Utensilios empleados durante la experimentación.

Las placas con los huevos se colocaron en una incubadora con una humedad relativa entre 70 y 90 % y una temperatura de 30° C. Se incorporó en la incubadora un recipiente con 90 ml de agua, que se reemplazó cada 24 horas, para mantener una adecuada humedad relativa. La temperatura y la humedad se registraron con un termohigrómetro (ColeParmer, $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$) cada cuatro horas. Estas condiciones se mantuvieron hasta que las especies completaron su ciclo de vida. Algunas porciones de hígado fresco de cerdo se agregaron en la medida que las primeras porciones se consumían, hasta que las larvas entraron en la fase post-alimentaria. Sólo las pupas permanecieron en la arena de las placas, las cuales se mantuvieron tapadas hasta que emergieron los adultos. Las placas se revisaron cada cuatro horas para confirmar el comienzo de la fase post alimentaria y cada ocho horas para verificar la emergencia de los adultos.

Montaje y descripción

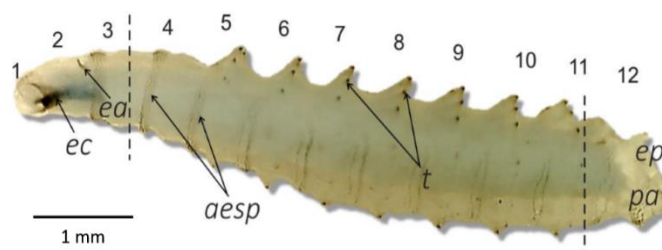
Huevo. Al verificar la oviposición se recolectaron 10 huevos de cada especie. Se enjuagaron en solución salina y se conservaron en frascos con etanol (75%) por 24 horas. Luego fueron transferidos a un portaobjetos y se separaron con una aguja enmangada. Los rasgos morfológicos se describieron luego de usar una técnica de tinción con permanganato de potasio (KMnO₄) (Sukontason et al., 2004a). La morfología de la región media que rodea al micrópilo y la escultura del corion se observaron y fotografiaron bajo el microscopio óptico (Olympus, Japón). Para esto se usó una cámara digital acoplada DP72 y su software de procesamiento de imágenes CELLSens Dimension. El largo y ancho de los huevos se midió con un programa de procesamiento de imágenes digitales (ImageJ, versión 1.42q).

Larvas. Se determinó la morfología y la tasa de desarrollo de la etapa larval (1er, 2do y 3er estadios). Larvas de cada estadio se obtuvieron de la cría en condiciones de laboratorio y se sacrificaron en un beaker con agua caliente (80° C) por 30 segundos para evitar la posterior reducción del tamaño (Adams & Hall, 2003) y se preservaron en frascos con etanol (75 %). Una parte de las larvas obtenidas se destinaron al estudio morfológico, para el cual se aplicó la técnica de aclaramiento con ácido clorhídrico (HCl) sugerida por Sukontason et al (2004b).

Las larvas preservadas se diseccionaron en dos sitios para obtener tres porciones del cuerpo. Fueron realizados con bisturí y bajo el microscopio estereoscópico (VWR). El primer corte se realizó a través de la mitad del tercer segmento torácico para mirar el esqueleto céfalo-faríngeo interno y el espiráculo anterior externo. El segundo corte se efectuó a través del 11no segmento del cuerpo para observar las características de los espiráculos posteriores (Fig. 2). Las larvas se fotografiaron con un microscopio comparativo Proyectina UCM y su software PIA 7000 4.01. El largo y ancho se midieron para cada estadio larval con el programa (ImageJ). Los espiráculos y el esqueleto céfalo-faríngeo fueron observados y fotografiados bajo el microscopio óptico (Olympus).

Figura 2.

Vista lateral de la larva 2 de Chrysomya rufifacies (Macquart) mostrándose los cortes en el 3er y 11no segmentos para observar los rasgos morfológicos típicos del estadio larval; ec, esqueleto céfalo-faríngeo; ea, espiráculo anterior; aesp, anillos de espinas; t, tubérculos; ep, espiráculo posterior; pa, protuberancia anal 1 mm



Pupa. Se estudió la morfología del puparium. Las características más importantes de la región anterior y posterior fueron observadas y fotografiadas con el microscopio comparativo Proyectina. Se midieron el largo y ancho de las pupas con el programa (ImageJ).

Evaluación de la tasa de desarrollo

A intervalos de cuatro horas fue extraída una larva de cada placa y destinada al estudio de la tasa de desarrollo. El momento de la eclosión de los huevos se consideró como la hora cero y el comienzo de la migración de las larvas como el fin del muestreo. De esta manera se obtuvo una serie de frascos con larvas (rotulados con la identidad de su placa y las horas de desarrollo larval), hasta que estas entraron en la fase post-alimentaria. Luego, se midió la longitud del cuerpo de cada larva de igual manera que para el estudio morfológico.

Análisis estadístico

El experimento se realizó con dos repeticiones para cada especie. Se calcularon la media (X) y la desviación estándar (D.E.) para todas las mediciones. La prueba Kolmogorov Smirnov fue aplicada a las mediciones tomadas con el objetivo de comprobar que cumplieran una distribución normal ($p < 0,05$). En la comparación de dos medidas de una misma variable fue utilizada la prueba no paramétrica U de Mann Whitney. En la comparación de más de dos medidas de una misma variable fue utilizada una prueba Kruskal-Wallis, con su test posterior de comparación múltiple de Dunn. En todos los casos fue considerada una diferencia estadística significativa a los valores de $p < 0,05$. Se realizaron curvas de crecimiento del desarrollo larval con los valores de longitud promediados y se aplicaron regresiones lineales polinomiales de orden 3 para modelar la relación entre las variables. Este análisis y la elaboración de los gráficos se realizaron con el programa estadístico STATISTICA versión 8.

Descripción morfométrica de los estadios inmaduros

Cochliomyia macellaria Fabricius

Huevo: Sus dimensiones promedio son 1.32 ± 0.02 mm de largo y 0.32 ± 0.01 mm de ancho (Tabla I). Su proporción es aproximadamente 1/4 de relación ancho y largo; 4.13 veces más largo que ancho. Elipsoidal en su contorno y su superficie dorsal cóncava. La cubierta es suave y de color blanco. La región anterior es ligeramente ahusada en comparación con la región posterior. La línea de eclosión corre desde la región anterior hasta casi el extremo posterior del huevo (Fig. 3A). En la región anterior se encuentra el micrópilo en forma de “Y”. El micrópilo es una abertura central con protuberancias alrededor (Fig. 3B).

Tabla I.

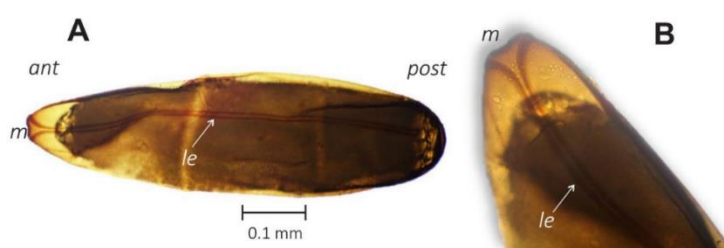
Dimensiones (Media \pm D.E.) de los huevos. Las medias con letras distintas en la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0.05$; KW)

Especies	n	Largo (mm)	Ancho (mm)
<i>Chrysomya rufifacies</i>	10	1.34 ± 0.02^a	0.31 ± 0.01^a
<i>Cochliomyia macellaria</i>	10	1.32 ± 0.02^a	0.32 ± 0.01^a
<i>Lucilia eximia</i>	10	1.14 ± 0.02^b	0.28 ± 0.01^b

Nota: Datos adquiridos durante las mediciones de los huevos.

Figura 3.

Huevo de Cochliomyia macellaria Fabricius. A) Vista completa del huevo. B) Detalles de la región anterior del huevo; ant, región anterior; post, región posterior; m, micrópilo; le, línea de eclosión



Nota: Imágenes tomadas durante el estudio.

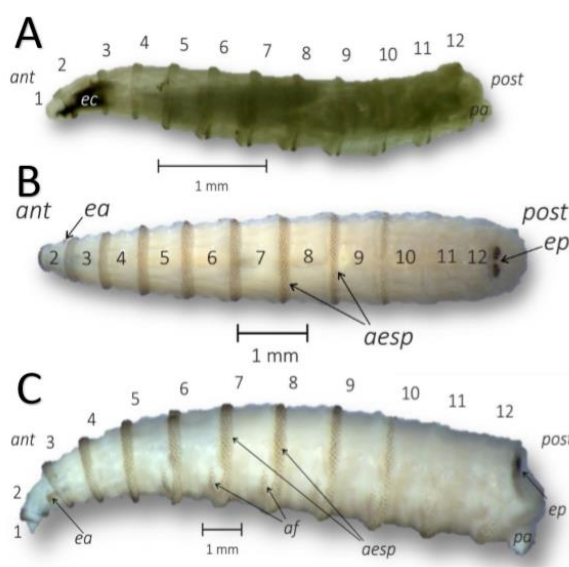
Larva 1: La longitud promedio es 4.95 ± 1.15 mm ($n=5$). En la región cefálica se observa una línea longitudinal que divide el primer segmento en dos lóbulos. El esqueleto céfalo faríngeo mide 1 mm o menos. Espiráculos anteriores poco visibles. Los segmentos están separados por

grupos de espinas de diferentes tamaños y formas (Fig. 4A). Segmentos 2–9 con anillos de espinas completo, segmento 10 con anillo de espinas incompleto dorsalmente y segmentos 11 y 12 con anillos de espinas incompletos que llegan hasta la mitad del cuerpo. Segmentos 5–10 con áreas fusiformes. Sólo los tubérculos anales son claramente visibles en el último segmento. Espiráculos posteriores con peritrema incompleto y dos ranuras (aberturas espiraculares).

Larva 2: La longitud promedio es 7.77 ± 1.58 mm (n=5). El cuerpo es muy parecido en forma al primer estadio. La región cefálica está más desarrollada y las antenas y el complejo de palpos maxilares son más visibles. Los espiráculos anteriores son visibles y presentan 11 papilas (branquias). Las espinas presentan la misma distribución en los segmentos, pero son más abundantes y rígidas (Fig. 4B). Patrón de espinas basales de los últimos segmentos en forma de “V”. Espiráculos posteriores con peritrema incompleto y dos ranuras.

Figura 4.

Larva de Cochliomyia macellaria (Fabricius). A) Larva 1 en vista lateral. B) Larva 2 en vista dorsal C) Larva 3 en vista lateral. ant, región anterior; post, región posterior; ec, esqueleto céfalo-faríngeo; ea, espiráculo anterior; af, áreas fusiformes; aesp, anillos de espinas; ep, espiráculos posteriores; pa, protuberancia anal



Nota: Imágenes tomadas durante el estudio.

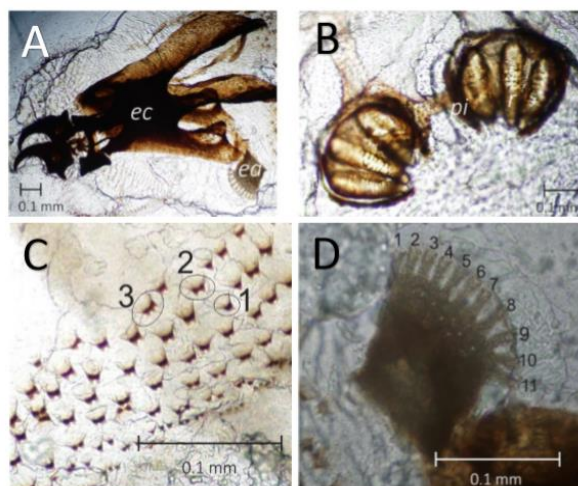
Larva 3: La longitud promedio es 14.02 ± 0.70 mm (n=5). El aspecto general es similar a los estadios larvales anteriores. Esqueleto céfalo-faríngeo bien desarrollado (Fig. 5A). Esclérito oral no pigmentado. Espiráculos anteriores con 11 papilas (Fig. 5D). Segmentos 2–9 con anillos

de espinas completo, segmento 10 con anillo de espinas incompleto dorsalmente y segmentos 11 y 12 con anillos de espinas incompletos hasta la mitad del cuerpo. Segmentos 5–10 con áreas fusiformes (Fig. 4C). Espinas fuertemente pigmentadas con una, dos o tres puntas (Fig. 5C). Espiráculos posteriores con peritrema incompleto o abierto, fuertemente pigmentado, sin botón y con tres ranuras con una orientación radial (Fig. 5B). Segmento caudal (segmento 12) con pequeños tubérculos alrededor de los espiráculos.

Pupa: El puparium mide 8.02 ± 0.13 mm de largo y 2.86 ± 0.06 de ancho ($n=5$). Es de color pardo oscuro. La región cefálica se encuentra retraída y los espiráculos anteriores sobresalen a ambos lados del segundo segmento (protórax) (Fig. 6). El extremo posterior es romo mientras que el anterior es ligeramente más agudo. Los segmentos mantienen los anillos de espinas característicos de la etapa larval, pero estos se encuentran replegados. En el extremo posterior pueden observarse los espiráculos posteriores con las tres aberturas espiraculares distribuidas radialmente.

Figura 5.

Estructuras distintivas de la larva 3 de Cochliomyia macellaria (Fabricius). A) Detalles del esqueleto céfalo-faríngeo y del espiráculo anterior. B) Detalles de los espiráculos posteriores. C) Detalles de las espinas que forman los anillos. D) Detalles del espiráculo anterior con el número de papilas; ec, esqueleto céfalo faríngeo; ea, espiráculo anterior; pi, peritrema incompleto; r, ranuras



Nota: Imágenes tomadas durante el estudio.

Figura 6.

Puparium de Cochliomyia macellaria Fabricius. ant, região anterior; post, região posterior; ea, espiráculo anterior



Nota: Imagem realizada durante el estudio.

Chrysomya rufifacies Macquart

Huevo: Sus dimensiones promedio son 1.34 ± 0.02 mm de largo y 0.31 ± 0.01 mm de ancho ($n=10$) (Tabla I). Su proporción es aproximadamente 1/4 de relación ancho y largo; 4.32 veces más largo que ancho. Es elipsoidal, su superficie dorsal cóncava, la cubierta es suave y de color amarillo claro. Es similar en forma al huevo de *Co. Macellaria* y no presenta diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$; KW) en sus dimensiones. La línea de eclosión es estrecha y llega casi hasta el extremo final del huevo. En la región anterior se encuentra el micrópilo en forma de “Y”.

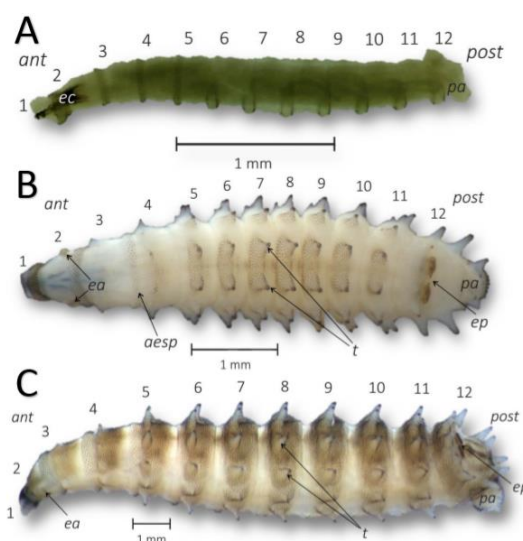
Larva 1: La longitud promedio es 3.12 ± 0.77 mm ($n=5$). Esqueleto céfalo-faríngeo evidente y fuertemente pigmentado. Espiráculos anteriores no visibles. Segmentos 2–5 con anillo de espinas completo en su parte anterior, 6–12 con espinas hasta 1/4 del segmento (Fig. 7A). Ausencia de áreas fusiformes y de tubérculos. Espiráculos posteriores con peritrema abierto, sin botón y con dos ranuras.

Larva 2: La longitud promedio es 9.18 ± 2.55 mm ($n=5$). Esqueleto céfalo-faríngeo fuertemente pigmentado. Espiráculos anteriores visibles. Segmentos 2–5 con anillo de espinas completo, 6–12 con espinas sólo hasta 1/2 del segmento. Segmentos de 5–11 con hileras de tubérculos en las regiones dorsal y lateral, ubicados en el centro de los segmentos (Fig. 7B), 6–11 presenta algunos tubérculos pequeños ventralmente. Espiráculos posteriores con peritrema abierto y con dos ranuras.

Figura 7.

Larva de Chrysomya rufifacies (Macquart). A) Larva 1 en vista lateral. B) Larva 2 en vista dorsal C) Larva 3 en vista lateral. ant, região anterior; post, região posterior; ec, esqueleto

céfalo-faríngeo; ea, espiráculo anterior; aesp, anillos de espinas; t, tubérculos; ep, espiráculos posteriores; pa, protuberancia anal

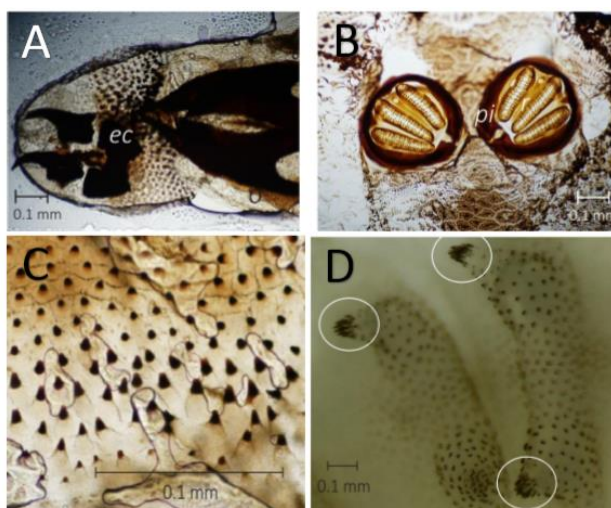


Nota: Imágenes tomadas durante el estudio.

Larva 3: La longitud promedio es 14.65 ± 1.19 mm (n=5). Esqueleto céfalo-faríngeo bien desarrollado y pigmentado (Fig. 8A). Espiráculos anteriores con 11 branquias. Segmentos 3–12 con hileras de tubérculos conspicuos dorsalmente, 3 y 4 con tubérculos más pequeños, los tubérculos ventrales son de menor tamaño (Fig. 7C). Tubérculos dorsales con espinas apicales gruesas y dispuestas hacia afuera (Fig. 8D). Segmentos 2–4 con anillo de espinas completo. Espinas de los anillos con una sola punta y fuertemente pigmentadas (Fig. 8C). Segmento caudal (segmento 12) con tubérculos fuertemente pronunciados. Espiráculos posteriores con peritrema incompleto, muy pigmentado, sin botón y con tres ranuras dispuestas radialmente (Fig. 8B).

Figura 8.

Estructuras distintivas de la larva 3 de *Chrysomya rufifacies* (Macquart). A) Detalles del esqueleto céfalo-faríngeo. B) Detalles de los espiráculos posteriores. C) Detalles de las espinas que forman los anillos. D) Detalles de los tubérculos con las espinas apicales; ec, esqueleto céfalo-faríngeo; pi, peritrema incompleto; r, ranuras

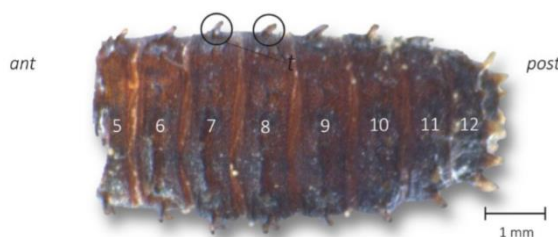


Nota: Imágenes tomadas durante el estudio.

Pupa: El puparium mide 7.80 ± 0.20 mm de largo y 2.82 ± 0.08 de ancho ($n=5$). Es similar en forma y coloración al de *Co. macellaria*, pero se distingue por la presencia de los tubérculos (Fig. 9). La región cefálica se encuentra retraída. Los segmentos se encuentran replegados. En el extremo posterior se observan los espiráculos posteriores con las tres aberturas espiraculares distribuidas radialmente.

Figura 9.

Puparium de Chrysomya rufifacies (Macquart). ant, región anterior; post, región posterior; t, tubérculos



Nota: Imagen tomada durante el estudio.

Lucilia eximia (Wiedemann)

Huevo: Es semejante en forma y coloración al huevo de *Co. macellaria*, pero más pequeño. Presentó diferencias estadísticas significativas en sus dimensiones con respecto a las otras especies ($p < 0.05$; KW). Mide 1.14 ± 0.02 mm de largo y 0.28 ± 0.01 mm de ancho ($n=10$) (Tabla I). Su proporción es 1/4 de relación ancho y largo; 4.07 veces más largo que ancho. Es elipsoidal, su superficie dorsal cóncava, la cubierta es suave y de color blanco. La región

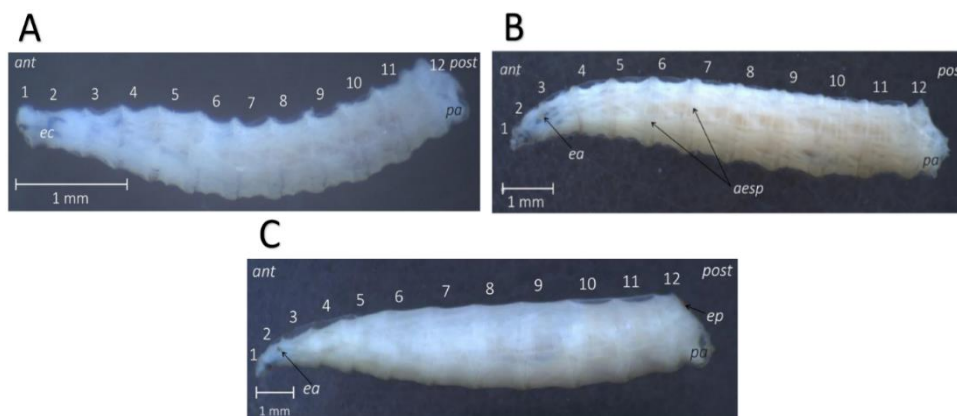
anterior es ligeramente ahusada en comparación con la región posterior. La línea de eclosión es más ancha y llega casi hasta el extremo final del huevo. En la región anterior se encuentra el micrópilo en forma de “Y”, aunque no tan evidente como en *C. rufifacies*.

Larva 1: La longitud promedio es 4.61 ± 1.26 mm (n=5). Esqueleto céfalo-faríngeo pigmentado, con los cuernos dorsal y ventral de igual longitud (Fig. 10A). Espiráculos anteriores no evidentes. Segmentos 2–7 con anillo de espinas completo, 8 con anillo incompleto dorsalmente y 9 con espinas hasta 3/4 del segmento, 10–12 con espinas hasta 1/2 del segmento. Espiráculos posteriores con peritrema incompleto y con dos ranuras.

Larva 2: La longitud promedio es 8.15 ± 1.43 mm (n=5). Esqueleto céfalo-faríngeo fuertemente pigmentado. Espiráculos anteriores con 8 branquias. Segmentos 2–8 con anillo de espinas completo y 9–12 con espinas en porción ventral. Sin áreas fusiformes (Fig. 10B). Espiráculos posteriores con peritrema incompleto y dos ranuras.

Figura 10.

Larva de Lucilia eximia Wiedemann. A) Larva 1 en vista lateral. B) Larva 2 en vista lateral C) Larva 3 en vista lateral. ant, región anterior; post, región posterior; ec, esqueleto céfalo-faríngeo; ea, espiráculo anterior; aesp, anillos de espinas; ep, espiráculos posteriores; pa, protuberancia anal



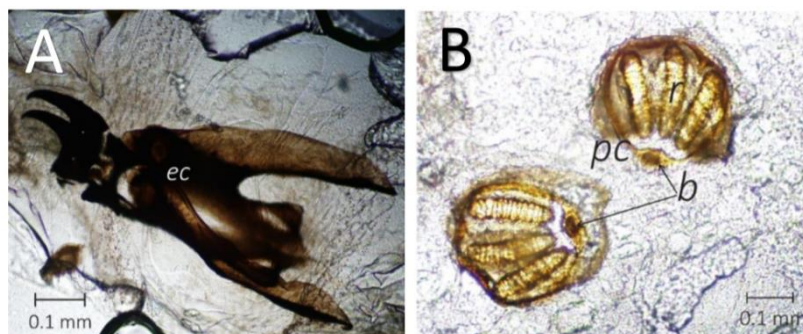
Nota: Imágenes tomadas durante el estudio.

Larva 3: La longitud promedio es 12.43 ± 0.67 mm (n=5). Esqueleto céfalo-faríngeo bien desarrollado y con esclérito oral no pigmentado (Fig. 11A). Espiráculos anteriores con 8 branquias. Larva con segmentos 2–8 con anillo de espinas completo, 9–12 con espinas en porción ventral. Espinas levemente pigmentadas y de una punta. Ausencia de tubérculos y de

áreas fusiformes (Fig. 10C). Espiráculos posteriores con peritrema completo, delgado, con el botón bien definido y tres ranuras distribuidas radialmente (Fig. 11B).

Figura 11.

Estructuras distintivas de la larva 3 de Lucilia eximia Wiedemann. A) Detalles del esqueleto céfalo-faríngeo. B) Detalles de los espiráculos posteriores. ec, esqueleto céfalo-faríngeo; pc, peritrema completo; r, ranuras; b, botón



Nota: Imágenes tomadas durante el estudio.

Duración de los estadios inmaduros

Durante las colectas de adultos se observó una marcada sucesión de moscas califóridas sobre los cebos. *Co. macellaria* y *C. rufifacies* fueron observados e identificados como los califóridos dominantes en el proceso de descomposición de los cebos. *Co. macellaria* fue la primera especie en instalarse y depositar huevos. *C. rufifacies* y *L. eximia* fue abundante horas después de la exposición de los cebos.

Co. macellaria completó su desarrollo a las 170.5 ± 2.12 horas mientras que *C. rufifacies* lo hizo a las 155 ± 7.07 horas. *L. eximia* no culminó su desarrollo pues murió el ejemplar durante la fase de formación de pupa. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las especies en la duración del desarrollo embrionario, en la larva 2 y en la larva 3 ($p < 0.05$; KW). Sin embargo, no se detectaron diferencias entre la duración del primer estadio larval, la pupa y desarrollo total entre *C. rufifacies* y *L. eximia* (Tabla II).

Tabla II.

Duración en horas (Media \pm D.E.) de los estadios inmaduros. Las medias con letras distintas en la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0.05$; KW)

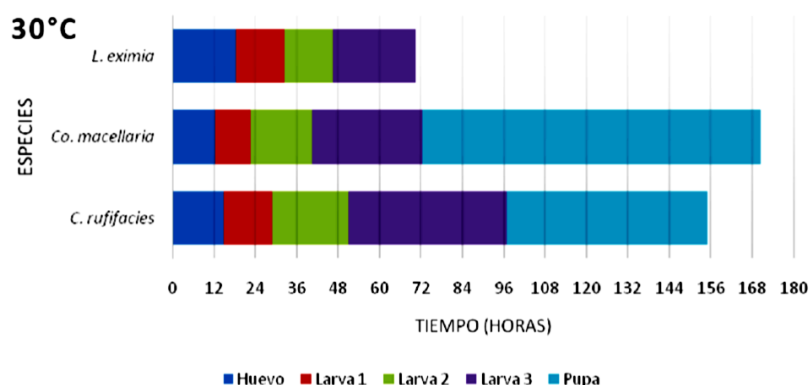
Especies	n	Huevo	Larva 1	Larva 2	Larva 3	Pupa	Total
<i>Chrysomya rufifacies</i>	2	15 ± 1.41 ^a	14 ± 2.83 ^a	22 ± 2.83 ^a	46 ± 2.83 ^a	58 ± 2.83 ^a	155 ± 7.07 ^a
<i>Cochliomyia macellaria</i>	2	12.5 ± 0.71 ^b	10 ± 2.83 ^b	18 ± 2.83 ^b	32 ± 0.0 ^b	98 ± 2.83 ^a	170.5 ± 2.12 ^a
<i>Lucilia eximia</i>	2	18.5 ± 0.71 ^c	14 ± 2.83 ^a	14 ± 2.83 ^c	24 ± 0.0 ^c	Muerte	—

Nota: Datos obtenidos durante la experimentación.

El desarrollo embrionario de *L. eximia* fue el de mayor duración (18.5 ± 0.71 horas). Durante la etapa larval *Co. macellaria* y *L. eximia* se desarrollaron rápidamente hasta entrar en la fase post-alimentaria, mientras que *C. rufifacies* tardó más en completar esa etapa. Sin embargo, ocurrió lo contrario durante la fase de pupa, en la cual el desarrollo de *Co. macellaria* duró prácticamente el doble del tiempo que demoró *C. rufifacies* en emerger (Fig. 12). Una vez culminada la fase de alimentación, las tres especies migraron desde el cebo hacia la arena, en busca de un lugar seco y propicio para pupar. Durante algunas horas se observó un movimiento continuo de larvas sobre la arena hasta que estas se enterraron. La emergencia de adultos ocurrió en horas de la mañana. Toda la descendencia de *C. rufifacies* fueron hembras, mientras que la de *Co. macellaria* de ambos sexos.

Figura 12.

Duración en horas del desarrollo de los estadios inmaduros de las especies L. eximia, Co. macellaria y C. rufifacies



Nota: Descripción del desarrollo total de las especies de estudio a 30°C.

Tasa de desarrollo larval

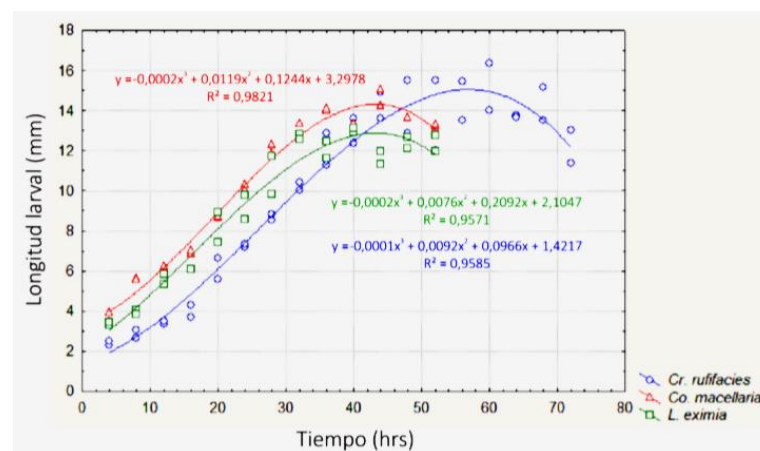
Las curvas de crecimiento de las larvas en función del tiempo siguen la forma de una función polinomial de tercer grado, de la forma $a_0x^3 + a_1x^2 + a_2x + a_3$ (Fig. 13). El desarrollo larval de las especies se caracteriza por un crecimiento rápido durante el primer tramo de la curva



hasta alcanzar la máxima longitud larval. En el tramo final de las curvas se observa un decrecimiento en la longitud de la larva. La disminución en el crecimiento de *L. eximia* y *Co. macellaria* comienza sobre las 40 horas del desarrollo, mientras que *C. rufifacies* continúa su crecimiento hasta cerca de las 60 horas de desarrollo larval. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el desarrollo de las especies estudiadas ($p < 0.05$; KW) (Tabla III).

Figura 13.

Curvas de crecimiento del desarrollo larval a partir de regresiones lineales polinomiales.



Nota: Datos obtenidos durante la experimentación.

Tabla III.

Longitud larval (Media \pm D.E.) de los estadios inmaduros en cada muestreo. NS, estadísticamente no significativo ($p < 0.05$; KW)

HORARIO DE MUESTREO (HRS)	ESPECIES			KRUSKAL-WALLIS	
	<i>L. eximia</i>	<i>Co. macellaria</i>	<i>C. rufifacies</i>	p	Signif.
4	3,365 \pm 0,120	3,71 \pm 0,33	2,405 \pm 0,163	0,1017	NS
8	3,935 \pm 0,120	5,625 \pm 0,049	2,83 \pm 0,27	0,1017	NS
12	5,585 \pm 0,375	6,115 \pm 0,134	3,415 \pm 0,120	0,1017	NS
16	6,085 \pm 0,021	6,945 \pm 0,120	4,01 \pm 0,42	0,1017	NS
20	8,175 \pm 1,039	8,7 \pm 0,04	6,1 \pm 0,72	0,1801	NS
24	9,18 \pm 0,83	10,21 \pm 0,18	7,3 \pm 0,1	0,1017	NS
28	10,78 \pm 1,36	12,1 \pm 0,3	8,67 \pm 0,23	0,1017	NS
32	12,69 \pm 0,17	12,98 \pm 0,55	10,21 \pm 0,29	0,1561	NS
36	12,05 \pm 0,57	14,08 \pm 0,06	12,08 \pm 1,15	0,1801	NS
40	13,02 \pm 0,13	13,22 \pm 0,21	12,1 \pm 0,9	0,8669	NS
44	11,64 \pm 0,47	14,67 \pm 0,54	14,26 \pm 0,91	0,1561	NS
48	12,4 \pm 0,4	13,66 \pm 0,02	14,2 \pm 1,9	0,1801	NS
52	12,36 \pm 0,55	13,25 \pm 0,08	13,77 \pm 2,44	0,3679	NS

Nota: Procesamiento de datos posterior al muestreo.



La muerte durante la formación de la pupa en otras especies de *Lucilia* ha sido reportada por Kotzé et. al (2015), debido al efecto de altas temperaturas. Resultaría novedoso estudiar las condiciones óptimas de temperatura a la que estas especies completan su desarrollo y las variaciones ante los cambios ambientales más comunes en Cuba, con el objetivo de perfeccionar las estimaciones del intervalo postmortem (IPM) en cadáveres humanos.

Las longitudes de las larvas, obtenidas en función del tiempo en horas de los indicios entomológicos *Co. macellaria*, *C. rufifacies* y *L. eximia* se pueden utilizar como modelo para establecer el intervalo postmortem a la temperatura de estudio. De forma general, las características del huevo, la larva y la pupa de *Co. macellaria*, *C. rufifacies* y *L. eximia* coincide con lo registrado en la literatura (Florez & Wolff, 2009; Mendonça et al., 2014; Sukontason et al., 2006b).

La importancia criminalística de los indicios entomológicos estudiados se resume de la siguiente manera: para *Co. macellaria* la detección de huevos representaría un IPM aproximado menor o igual a 12 h. La primera generación de larvas ocurre a partir de las 12 h, mientras que los diferentes estadios larvales concluyen su desarrollo aproximadamente a las 72 h (3 días), así, la longitud de las larvas puede usarse para estimar con cierta precisión el IPM (Tabla III). Las pupas de la primera generación se presentan a las 72 (3 días) y los adultos de la primera generación emergen cerca de las 172 h (7.1 días). Los datos obtenidos muestran que para las larvas con longitudes entre 13.2 y 13.64 mm sólo es preciso decir que su IPM se ubica entre 12 h y 72 h (1.5 a 3 días) para la temperatura de estudio.

En *C. rufifacies* la detección de huevos representaría un IPM aproximado menor o igual a 14 h. La primera generación de larvas ocurre a partir de las 14 h, mientras que los diferentes estadios larvales concluyen su desarrollo aproximadamente a las 96 h (4 días), por lo que, la longitud de las larvas puede usarse para estimar con cierta precisión el intervalo postmortem (IPM) (Tabla III). Las pupas de la primera generación se presentan a las 96 (4 días) y los adultos de la primera generación emergen cerca de las 155 h (6.4 días). Por lo que para las larvas con longitudes entre 13.7 y 14.2 mm sólo es preciso decir que su IPM se ubica entre 14 h y 96 h (-24 a 4 días) a la temperatura de estudio.

La presencia de huevos de *L. eximia* representaría un intervalo postmortem aproximado menor o igual a 18 h. El aparecimiento de la primera generación de larvas ocurre aproximadamente a las 18 h (menos de 24 horas), mientras que los diferentes estadios larvales concluyen

aproximadamente a las 67 h (próximo a los 3 días), así, la longitud de las larvas puede usarse para estimar con precisión el intervalo postmortem (IPM) (Tabla III). Durante la fase experimental la temperatura utilizada provocó la muerte de *L. eximia*. A partir de los datos obtenidos las larvas con longitudes entre 12 y 12.4 mm sólo es preciso decir que su IPM se ubica entre 48 h y 67 h (2 a 2.7 días), estos datos sólo son válidos para la temperatura reportada en este estudio.

Cuba está dentro de uno de los puntos calientes de biodiversidad a nivel global (Myers, et. al, 2000) y tiene altos niveles de endemismo dentro de su flora y fauna (Hedges, 2001). La utilización de insectos necrófagos y necrófilos para la estimación del IPM debería ser más estudio y validado como medio de prueba. De esta forma favorecería a la Criminalística de una herramienta que apoyaría el IPM. Según Amendt et al (2010); Rivers & Dahlem (2014) y Tomberlin & Benbow (2015), los califóridos tienen ciclos de vida bastante exactos y constantes, al conocer el tiempo de duración de los ciclos de vida a la temperatura que se desarrollan, podemos estimar el momento de su llegada a un cadáver, utilidad plenamente establecida plenamente en el campo de la ciencia criminalística.

CONCLUSIONES

- 1) Con el estudio propuesto se describieron los ciclos biológicos de los indicios entomológicos *Cochliomyia macellaria* Fabricius, 1775; *Chrysomya rufifacies* Macquart, 1843 y *Phaenicia eximia* Wiedemann, 1819.
- 2) El desarrollo larval de los califóridos investigados diferentes para cada especie a partir de la temperatura a la que fueron sometidos y la información que ofrecen las curvas de crecimiento obtenidas, pueden ser usadas para estimar el IPM en Cuba.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, Z. & Hall, M. (2003). Methods used for the killing and preservation of blowfly larvae, and their effect on postmortem larval length. *Forensic Science International*, (138), 50–61.
- Akbarzadeh, K., Wallman, J., Sulakova, H. & Szpila, K. (2015). Species identification of Middle Eastern blowflies (Diptera, Calliphoridae) of forensic importance. *Parasitol. Res*, (114), 1463–1472.
- Alayo, P., & Garcés, G. (1989). *Introducción al estudio del Orden Diptera en Cuba*. Editorial Oriente, Santiago de Cuba, Cuba, 224.



- Alayo, P., & García, I. (1983). *Lista anotada de los dípteros de Cuba*. Editorial Científico-Técnica, La Habana, Cuba, 201.
- Amat, E., Vélez, M. & Wolff, M. (2008). Clave ilustrada para la identificación de los géneros y las especies de califóridos (Diptera: Calliphoridae) de Colombia. *Caldasia*, 30(1), 231–244.
- Amendt, J., Goff, M. L., Campobasso, C. P., & Grassberger, M. (2010). *Current concepts in forensic entomology*, London: Springer.
- Byrd, J., & Castner, J. (2010). Insects of Forensic Importance. En: Byrd, J. H. & J. L. Castner (Eds.), *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations*. 2da Edn., Boca Raton, FL: CRC Press LLC, 39–126.
- Florez, E., & Wolff, M. (2009). Descripción y Clave de los Estadios Inmaduros de las Principales Especies de Calliphoridae (Diptera) de Importancia Forense en Colombia. *Neotropical Entomology*, 38(3), 418–429.
- García-Espinoza, F., Valdés, M., Sánchez, F., Yusseff, S. Z., & Quintero, M. (2012). Desarrollo larval y requerimientos calóricos de *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae) durante primavera y verano en Torreón, Coahuila. *Acta Zoológica Mexicana*, 28(1), 172–184.
- Goff, M. L. (2000). *A Fly for the Prosecution: how insect evidence helps solve crimes*. Harvard University Press, Cambridge, 224.
- Grella, M., Savino, A. G., Paulo, D. F., Mendes, F. M., Azeredo-Espin, A. M., Queiroz, M. M., Thyssen, P. J., & Linhares, A. X. (2015). Phenotypic polymorphism of *Chrysomya albiceps* Wiedemann (Diptera: Calliphoridae) may lead to species misidentification. *Acta Tropica*, (141), 60–72.
- Hedges, S. B. (2001). *Patterns of Endemism and biogeography of Cuban Insects*. En: Woods, C. A. y F. E. Sergile (eds.). *Biogeography of the West Indies. Patterns and Perspectives*. pp. 15– 33. 2nd ed. CRC Press, 582.
- Jiménez-Gómez, I. (2010). *Caracterización de la coleopterofauna asociada a la descomposición de cadáveres de cerdo en dos localidades con diferente grado de antropización: ciudad de la Habana y Nueva Paz (Cuba)*. Tesis de Diploma, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba, 68.

- Kotzé, Z., Villet, M. H., & Weldon, C. W. (2015). Effect of temperature on development of the blowfly, *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) *Int. J. Legal Med.*, DOI: 10.1007/s00414-015-1153-y.
- Lamoth, Y. (2011). *Sucesión de artrópodos en cadáveres de cerdos vestidos, al aire libre*. Tesis de Maestría en Zoología y Ecología Animal. Universidad de Oriente, Cuba, 66.
- Megna, Y. S., Lamoth, Y., & Jiménez, Y. (2021). Primer reporte del género *Chrysomya* Robineau-Desvoidy (Diptera: Calliphoridae) en Cuba: su importancia criminalística. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa (S.E.A.)*, (68), 194–198.
- Mendonça, P. M., Barbosa, R. R., Cortinhas, L. B., Santos-Mallet, J. R., & Carvalho, M. M. (2014). Ultrastructure of immature stages of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae), a fly of medical and veterinary importance. *Parasitol. Res.*, DOI: 10.1007/s00436-014-4032-4.
- Merrit, R. W., Higgins, M. J., & Wallace, J. R. (2000). *Entomology*. En: Siegel, J. A., G. C. Knupfer y P. J. Saukko (Eds.), *Encyclopedia of Forensic Science*. Academic Press, Ltd.: London, 699–705.
- Moffatt, C., Heaton, V., & Haan, D. (2016). The distribution of blowfly (Diptera: Calliphoridae) larval lengths and its implications for estimating post mortem intervals. *Int. J. Legal Med.*, 287–297.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Fonseca, G. A. B. & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities, *Nature*, (403), 853–858.
- Naranjo, C., Cruz, Y., & Mayea, Y. (2009). Artrópodos presentes en la putrefacción de cadáveres de cerdos (*Sus scrofa*) en Santiago de Cuba, Cuba. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, (44), 441–447.
- Pechal, J. L., Moore, H., Drijfhout, F., & Benbow, M. E. (2014). Hydrocarbon profiles throughout adult Calliphoridae aging: A promising tool for forensic entomology. *Forensic Science International*, (245), 65–71.
- Rivers, D. B., & Dahlem, G. A. (2014). *The science of forensic entomology*, Oxford: Wiley Blackwell.

- Sánchez, D. (2016). *Análisis de la sucesión de insectos asociados a la descomposición de cadáveres de cerdos bajo condiciones de refugio y encierro, en Artemisa (Cuba)*. Tesis de diploma. Universidad de la Habana.
- Sharma, M., & Singh, D. (2015). Historical approach of Forensic Entomology: A review. *IJARSET*, 2(9), 838–845.
- Sukontason, K. L., Narongchai, P., Kanchai, C., Vichairat, K., Piangjai, S., Boonsriwong, W., Bunchu, N., Sripakdee, D., Chaiwong, T., Kuntalue, B., Siri Wattanarungsee, S., & Sukontason, K. (2006b). Morphological comparison between *Chrysomya rufifacies* (Macquart) and *Chrysomya villeneuvei* Patton (Diptera: Calliphoridae) puparia, forensically important blowflies. *Forensic Science International*, (164), 230–234.
- Sukontason, K., Methanitikorn, R., Sukontason, K. L., Piangjai, S., & Olson, J. K. (2004b). Clearing technique to examine the cephalopharyngeal skeletons of blow fly larvae. *Journal of Vector Ecology*, 29(1), 192–195.
- Sukontason, K., Sukontason, K. L., Piangjai, S., Boonchu, N., Kurahashi, H., Hope, M., & Olson, J. K., (2004a). Identification of forensically important fly eggs using a potassium permanganate staining technique. *Micron*, 35(5), 391–395.
- Tomberlin, J. K., & Benbow, E. M. (2015). *Forensic entomology. International dimensions and frontiers*, London: CRC Press.
- Ubero-Pascal, N., Arnaldos, I., López-Esclapez, R., & García, M. D. (2010). Microscopy and forensic entomology. En: Méndez-Vilas A. y J. Díaz (Eds.), *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*, 1548–1556.
- Ubero-Pascal, N., López-Esclapez, R., García, M. D., & Arnaldos, M. I. (2012). Morphology of preimaginal stages of *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830 (Diptera, Calliphoridae): A comparative study. *Forensic Science International*, (219), 228–243.
- Vélez, M. C., & Wolff, M. (2008). Rearing five species of Diptera (Calliphoridae) of forensic importance in Colombia in semicontrolled field conditions. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 48(6), 41–47.
- Whitworth, T. (2010). Keys to the genera and species of blowflies (Diptera: Calliphoridae) of the West Indies and description of a new species of *Lucilia* Robineau-Desvoidy. *Zootaxa*, (2663), 1–35.

Whitworth, T. (2012). Identification of Neotropical blowflies of the genus *Calliphora* Robineau-Desvoidy (Diptera: Calliphoridae) with the description of a new species. *Zootaxa*, (3209), 1–27.

Whitworth, T. (2014). A revision of the Neotropical species of *Lucilia* Robineau Desvoidy (Diptera: Calliphoridae). *Zootaxa*, 3810(1), 1–76.