UNIVERSIDAD NACIONAL "PEDRO RUIZ GALLO"

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA

HONGOS PRESENTES DURANTE LA DESCOMPOSICION CADAVERICA DE *Sus scrofa L.* (CERDO), EXPUESTOS EN CONDICIONES DE CAMPO Y SU UTILIDAD EN LA DETERMINACION DEL INTERVALO POST MORTEM. LAMBAYEQUE-PERÚ, SETIEMBRE 2016 –FEBRERO 2017.

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Presentado por:

Bach. MEGO JULCA, GUSTAVO

Asesora: Dra. LLONTOP BARANDIARAN, Gianina

Co asesor: Lic. CARRASCO SOLANO Fransk Amarildo

Lambayeque – Perú

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL
“PEDRO RUIZ GALLO”
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA

TESIS

Hongos presentes durante la descomposición cadavérica de *Sus scrofa L.* (cerdo), expuestos en condiciones de campo y su utilidad en la determinación del intervalo *post mortem*. Lambayeque-Perú, Setiembre 2016 –Febrero 2017.

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Presentado por:

Bach. MEGO JULCA, GUSTAVO

Asesora: Dra. LLONTOP BARANDIARAN, Gianina

Co asesor: Lic. CARRASCO SOLANO Fransk Amarildo

Lambayeque – Perú

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL
“PEDRO RUIZ GALLO”
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA

TESIS

Hongos presentes durante la descomposición cadavérica de *Sus scrofa L.* (cerdo), expuestos en condiciones de campo y su utilidad en la determinación del intervalo post mortem. Lambayeque-Perú, Setiembre 2016 –Febrero 2017.

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Presentado por:

Bach. GUSTAVO MEGO JULCA

Aprobado por:

Dra. Llontop Barandiaran Gianina	**Dr. Tejada Sánchez Eduardo**
ASESORA	**PRESIDENTE**
Dra. Carmen Calderón Arias	**Lic. Julio Cesar Silva Estela**
SECRETARIA	**VOCAL**

Lic. Carrasco Solano Fransk Amarildo

CO ASESOR

DEDICATORIA

A Mi Padre Terno

Quien en cada una de las vicisitudes que he pasado, por más pequeñas que están hayan sido, siempre ha estado con migo, protegiéndome y guiándome por el camino de la luz, de la verdad.

A mis Padres Adriano Mego Díaz

Hilaria Julca Vásquez.

Por su amor, cariño, comprensión y apoyo incondicional. Por ser el estímulo que me impulsa a seguir superándome día tras día. Por inculcar amor, humildad, respeto y una lista infinita de valores en mí persona.

A mis tíos Pacífico Mego Díaz

Teresa de Jesús Julca Vásquez.

Por el buen ejemplo, por los buenos consejos y por la confianza depositada en mí.

A mi hermosa y querida sobrina Nicole Alexandra

Quien alegra mis días y es la luz de mis ojos. Quien con solo sonrisa me ayuda a afrontar momentos en que la desesperanza y la tristeza quieren embargar mi ser.

AGRADECIMIENTO

*A mi **Padre Terno.** Por iluminar mi camino, Por permitirme empezar y terminar esta investigación de manera satisfactoria y por estar siempre con migo.*

A la Dra. Llontop Barandiaran Gianina, al profesor Lic. Carrasco Solano Fransk y al Mg. Fupuy Chung Jorge por guiarme en la realización de este proyecto y por brindarme parte de su valioso tiempo.

A todos los trabajadores del centro de esparcimiento ex – fundo, especialmente al licenciado don José Alberto Silva Baldera, por su gran apoyo y buena amistad.

*A mis Padres: **ADRIANO E HILARIA,** por el apoyo que siempre me han brindado.*

Mi vida no alcanzará para poder agradecerles todo lo que ustedes hacen por mí.

*A mis hermanos **Víctor, Isabel, Guillermo, Anselmo, Wilder, Clara, Lucio, Matilde y Walter.***

A todos mis amigos, por el apoyo siempre brindado…

INDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN……..…1

II. MARCO TEÓRICO……..….4

2.1 Antecedentes de la investigación…….……...4

2.2 Base teórica……..…...6

2.2.1 Intervalo post mortem (IPM)……7

2.2.2 Micología Forense……7

2.2.3 Consideraciones Bioéticas……..……8

2.2.4 La eutanasia en los animales……...……..9

2.2.5 Fases de descomposición cadavérica…...…….……10

III. MATERIAL Y MÉTODOS……..14

3.1 Materiales……...……14

3.1.1 Material biológico……...14

3.1.2 Población y muestra de estudio……..14

3.2 Métodos……14

3.2.1 Variables de estudio……..……..……14

3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis……..14

3.2.3 Zona de estudio……..15

3.2.4 Diseño de la jaula ……..…….……..17

3.2.5 Sacrificio y distribución al lugar de estudio……..……17

3.3 Procedimiento……19

3.3.1 Aislamiento e identificación de los hongos…….....21

3.3.1.1 Identificación de hongos de aspecto micelial…..……22

3.3.1.2 Identificación de hongos de aspecto levaduriforme……....25

3.3.2 Relación de los hongos identificados durante las fases de descomposición cadavérica de *Sus scrofa* L. (cerdo) expuestos en condiciones de campo con el establecimiento del intervalo post mortem…….……..…….……26

3.4 Organización y análisis de datos……....28

IV. RESULTADOS…….29

4.1 Identificación de los hongos presentes durante las fases de descomposición cadavérica de *Sus scrofa L.* (cerdo), expuestos en condiciones de campo…….....……29

4.1.1 Hongos filamentosos aislados e identificados durante las fases de descomposición cadavérica de *Sus scrofa L.* (cerdo), expuestos en condiciones de campo….……...……30

4.1.2 Hongos levaduriformes aislados e identificados durante las fases de descomposición cadavérica de *Sus scrofa L.* (cerdo), expuestos en condiciones de campo…….40

4.2 Relación de los Hongos identificados durante las fases de descomposición cadavérica de *Sus scrofa L.* (cerdo), expuestos en condiciones de campo, con el establecimiento del intervalo *post mortem*……...……..45

4.2.1 Hongos identificados de la descomposición cadavérica de *Sus scrofa L.* (cerdo), y su relación con las fases de descomposición……..53

V. DISCUSIÓN……..61

VI. CONCLUSIONES……..…..65

VII. RECOMENDACIONES……..……....66

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS……67

IX. ANEXOS……...73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Hongos presentes durante la descomposición cadavérica de *Sus scrofa L.* (cerdo), durante el periodo de estudio……..……..……29

Tabla 2.- Ausencia y presencia de hongos en la boca del primer cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo), durante el periodo de estudio……..45

Tabla 3.- Ausencia y presencia de hongos en la boca del segundo cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo), durante el periodo de estudio……..46

Tabla 4.- Ausencia y presencia de hongos en el lomo del primer cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo), durante el periodo de estudio…….……46

Tabla 5.- Ausencia y presencia de hongos en el lomo del segundo cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo), durante el periodo de estudio…….……47

Tabla 6.- Ausencia y presencia de hongos en el ano del primer cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo), durante el periodo de estudio……..47

Tabla 7.- Ausencia y presencia de hongos en el ano del segundo cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo), durante el periodo de estudio……..48

Tabla 8.- Sucesión de especies fúngicas en relación a las fases de descomposición cadavérica de *Sus scrofa L*. (cerdo), durante el periodo de estudio ……..……..……56

Tabla 9.- Ausencia y presencia de hongos en las fases de descomposición cadavérica de *Sus scrofa* L. (cerdo), durante el periodo de estudio…..57

Tabla 10.- Índice de Similaridad de Jaccard (IS_J) entre las especies fúngicas asociadas a las fases de descomposición cadavérica de *Sus scrofa L.* (cerdo), durante el periodo de estudio ……..…58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Zona de estudio…….……15

Figura 2.- Área de estudio……..….16

Figura 3.- Diseño de la jaula……...……17

Figura 4.- Sacrificio del espécimen biológico……..…….....18

Figura 5.- Distribución del espécimen biológico al lugar de estudio…..……18

Figura 6.- Colecta y toma de muestras……..…….….20

Figura 7.- Implementos de bioseguridad…….…….21

Figura 8.- Hongos desarrollados……..…..22

Figura 9.- Técnica de cinta pegante……..…24

Figura 10.- Técnica de microcultivo……...……24

Figura 11.- Tinción de Gram……..…….…27

Figura 12.- Fermentación de carbohidratos…….27

Figura 13.- *Penicillium sp*……31

Figura 14.- *Aspergillus sp*…….…...33

Figura 15.- *Mucor sp*…….…...36

Figura 16.- *Rhizopus sp*…….……..36

Figura 17.- *Bipolaris sp*……..……..39

Figura 18- *Fusarium sp*……..….…39

Figura 19.- *Candida sp*……40

Figura 20.- *Candida albicans*……..41

Figura 21.- *Candida tropicalis*…….....42

Figura 22.- *Rhodotorula sp*……..…44

Figura 23.- Presencia de especies fúngicas en *Sus scrofa L.* (cerdo), durante el periodo de estudio……...……49

Figura 24.- Presencia de especies fúngicas según lugar de aislamiento en *Sus scrofa L.* (cerdo), durante el periodo de estudio……..……49

Figura 25.- Dendrograma de Similaridad entre las especies fúngicas asociadas a la boca del segundo cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo), durante el periodo de estudio……...……..…51

Figura 26.- Dendrograma de Similaridad entre las especies fúngicas asociadas al lomo del primer cadáver de *Sus scrofa L*. (cerdo), durante el periodo de estudio…….……51

Figura 27.- Dendrograma de Similaridad entre las especies fúngicas asociadas al lomo del segundo cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo), durante el periodo de estudio…….……52

Figura 28.- Dendrograma de Similaridad entre las especies fúngicas asociadas al ano del segundo cadáver de *Sus scrofa L. (*cerdo), durante el periodo de estudio…….…….……....52

Figura 29.- Fases de descomposición cadavérica…...…….……..55

Figura 30.- Dendrograma de Similaridad entre las especies fúngicas asociadas a las fases de descomposición cadavérica de *Sus scrofa L.* (cerdo), durante el periodo de estudio……..……..58

Figura 31.- Temperatura registrada durante la descomposición del primer cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo), durante el periodo de estudio……...59

Figura 32.- Temperatura registrada durante la descomposición del segundo cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo), durante el periodo de estudio……..……60

RESUMEN

Las ciencias forenses aplican diversos métodos con los cuales se puede lograr determinar el tiempo de muerte de una determinada persona. Dichos métodos son valorados independientemente o en su conjunto, logrando así una mayor exactitud en dicha determinación.

Uno de estos métodos podría ser la aplicación de la micología forense, dado que al estudiar los hongos presentes en los cadáveres, es posible determinar el tiempo aproximado de muerte. En ese sentido se ha realizado la presente investigación cuyo objetivo fue identificar a los hongos presentes durante la descomposición cadavérica de *Sus scrofa L*. (cerdo), expuestos en condiciones de campo y determinar su utilidad en la determinación del intervalo *post mortem.*

Para este propósito, se tomaron muestras con hisopos estériles en dos especímenes de *Sus scrofa L.* (cerdo), durante los meses de octubre – noviembre de 2016 y los meses de enero – febrero de 2017, los cuales se sembraron en agar Sabouraud como medio de cultivo primario, incubándose a una temperatura de 26-28 °C por 5 días, para luego ser conservadas en agar papa dextrosa (PDA). Lográndose obtener un total de 10 muestras fúngicas, de los cuales 6 correspondieron a hongos filamentosos (*Penicillium sp, Aspergillus sp, Bipolaris sp, Mucor sp, Rhizopus sp y Fusarium sp*) y 4 a levaduras (*Candida sp, C. albicans, C. tropicalis y Rhodotorula sp*). Se concluyó que la sucesión fúngica en cadáveres aun no ofrece un patrón determinante como indicadores del IPM. Sin embargo este estudio ofrece importante contribución a la micología forense ya que se logró determinar que el mayor porcentaje de permanencia lo obtuvieron *Candida sp, Aspergillus sp y Penicillium sp.*

Palabras clave: Hongos, Intervalo P*ost Mortem* (IPM), Micología forense.

SUMMARY

The forensic sciences apply sundry methods with which it is possible to be able to determine the time of death of a certain person. Such methods are evaluated independently or as a set, thus achieving greater accuracy in said determination.

One of these methods could be the application of forensic mycology, given that by studying the fungi present in cadavers, it is possible to determine the approximate time of death. In this sense the present research was carried out whose objective was to identify the present fungi during the cadaveric decomposition of Sus scrofa L. (pig), exposed under field conditions and to determine its usefulness in the determination of the postmortem interval.

For this purpose, samples were taken with sterile swabs in two specimens of Sus scrofa L. (pork), during the months of October - November 2016 and January - February 2017. Which were seeded on Sabouraud agar as a primary culture medium, incubated at a temperature of 26-28 °C for 5 days, and then conserved on potato dextrose agar (PDA). Obtaining a total of 10 fungal samples, Of which 6 corresponded to filamentous fungi (*Penicillium sp, Aspergillus sp, Bipolaris sp, Mucor sp, Rhizopus sp y Fusarium sp*) And 4 yeasts (*Candida sp, C. albicans, C. tropicalis y Rhodotorula sp*). It was concluded that fungal succession in cadavers still does not provide a determinant pattern as indicators of MPI. However, this study offers an important contribution to the forensic mycology since it was possible to determine that the greatest percentage of permanence were *Candida sp, Aspergillus sp and Penicillium sp.*

Keywords: Fungi, Forensic Mycology, Interval *Post Mortem* (IPM).

I. INTRODUCCIÓN

La micología en el campo forense es relativamente nueva, y está basada principalmente en el uso de los hongos en investigaciones judiciales y penales. Así como también en aquellos grupos de hongos que se encuentran presentes en la descomposición cadavérica, con la intención de poder determinar el intervalo *post mortem* (IPM). Determinar este intervalo de tiempo es fundamental en la investigación de homicidios y otras muertes intempestivas, puesto que puede ayudar a identificar al criminal y a la víctima para descartar sospechosos (Catts y Goff, 1992).

Cuando se llega a descubrir un cadáver, éste puede estar en ambientes y lugares muy diversos, a veces son abandonados en lugares inaccesibles, con el único afán de no ser encontrado, escondiendo o tratando de esconder la prueba irrefutable de un delito (Mego, 2016 a). Ante ello surge la siguiente interrogante: ¿Cuánto tiempo lleva dicho cadáver expuesto en ese lugar? Para este fin, se aplican diversos métodos por los cuales se logra determinar el tiempo de muerte de una determinada persona; tales como medir la temperatura corporal (*Algor mortis*), observar la lividez cadavérica (*Livor mortis*), la rigidez cadavérica (*Rigor mortis*), realizar exámenes bioquímicos a los fluidos corporales, especialmente del humor vítreo; entre otras. La más conocida quizás es la entomología forense, en el que por medio de la sucesión de insectos y sus larvas en el cadáver, se puede lograr determinar el intervalo *post mortem* (Mego, 2016 b).

Algunos de estos métodos deben estar basados en información ya obtenida de estudios realizados con modelos animales semejantes a los humanos respecto a los procesos de descomposición (Schoenly *et al*., 2006), esto se debe básicamente a las objeciones éticas y morales para el uso de cadáveres humanos para tales fines (Catts y Goff, 1992). No existe un modelo perfecto extrapolable al hombre, pero existen una infinidad de especímenes, cuyas respuestas fragmentarias

incrementan el significado biológico del fenómeno observado (Vásquez, 2007). Dentro de los especímenes más utilizados para estos fines está el cerdo, dado que estos animales presentan una similitud anatómica interna semejante a la del ser humano, el tamaño de los órganos, la distribución de la grasa, el pelo, la dieta omnívora, la microbiota intestinal y los procesos de putrefacción ocurren aproximadamente en la misma proporción que un ser humano del mismo peso (Byrd y Castner, 2010; Campobasso *et al*., 2001).

La poca información existente sobre hongos en cadáveres, queda comprobada en la Investigación realizada por Alves *et al*., 2012, quienes revisaron la base de datos de acceso abierto como SciELO, PubMed y BIREME entre los periodos 1991-2011,encontrando solo 13 artículos relacionados netamente con el tema. Siendo Sousa *et al*. (2013) y Burkhardt (2014) quienes desarrollaron investigaciones de la presencia de hongos en cadáveres de *Sus scrofa L*. (cerdo), para determinar el intervalo *post mortem*.

En la actualidad en Perú son muy escasos los trabajos relacionados con la sucesión fúngica en cadáveres y su aplicación en la determinación del intervalo *post mortem*. Las investigaciones que más se realizan para esta determinación están en base a la entomología forense, pero existen referencias donde se detalla que dependiendo de las circunstancias donde se encuentre el cadáver la entomología forense no logra cumplir este objetivo. Esto sucede cuando los cadáveres se encuentran en avanzado estado de descomposición, en climas muy fríos o en lugares que resultan muy difíciles de acceder para los insectos (Hitosugi *et al*., 2006; Hawksworth y Wiltshire, 2011).

Por lo tanto y en vista a la escasa información existente se planteó el siguiente problema: ¿Qué tipos de hongos existen en la descomposición cadavérica de *Sus scrofa L*. (cerdo), expuestos en condiciones de campo y cuál es su utilidad en la determinación del intervalo *post mortem*?. Considerando que ciertas especies de hongos se aíslan de *Sus scrofa L*. (cerdo) en diferentes fases de la descomposición y que dicha información es útil en la determinación del intervalo *post mortem*, se planteó el presente estudio cuyos objetivos son:

Objetivo general:

- Determinar los hongos presentes durante las fases de descomposición cadavérica de *Sus scrofa L*. (cerdo) expuesto en condiciones de campo y su utilidad en el establecimiento del intervalo *post mortem*.

Objetivos específicos:

- Aislar e identificar los diferentes hongos micelíales y hongos levaduriformes que aparecen durante las fases de descomposición cadavérica de *Sus scrofa L.* (cerdo) expuesto en condiciones de campo.

- Relacionar los hongos identificados durante las fases de descomposición cadavérica de *Sus scrofa L.* (cerdo) expuesto en condiciones de campo, con el establecimiento del intervalo *post mortem.*

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

En las investigaciones criminales o autopsias, los médicos forenses son conocedores de la existencia de hongos en cadáveres humanos, pero hasta el momento no se ha dado la importancia que realmente merece esta ciencia emergente, como es la micología forense. Marchiafava (citado por Illana, 2013), menciona que el género Mucor, caracterizado por delicados filamentos tubulares blancos, es el hongo responsable de la resorción ósea de los huesos enterrados. Estos hongos presentan unas estructuras llamadas hifas que pueden penetrar en los huesos y producirse el lixiviado de los minerales, por la acción enzimática que estos presentan (Piepenbrink citado por Illana, 2013).

Las primeras luces en la micología forense se atribuyen a los investigadores belgas Van de Voorde y Van Dijck (1982) quienes encontraron el cuerpo acuchillado de una mujer en su habitación; el cadáver tenia colonias de hongos en parpados y el cuerpo. Los investigadores cultivaron dichos hongos a la misma temperatura que se encontraba el cadáver (12 °C), para poder ver el crecimiento y tener así una referencia del tiempo que el cuerpo estaba en ese lugar. Los hongos encontrados fueron congelados, para detener así su crecimiento. Luego de las mediciones diarias, se logró estimar que el tiempo de muerte de la mujer se produjo 18 días antes de ser encontrado. Los hongos identificados fueron pertenecientes a los géneros: *Cladosporium, Fusarium, Geotrichum, Hormodendron, Mortierella y Penicillium.*

Hitosugi *et al*. (2006) manifiesta sobre un caso sucedido al noreste de Japón en donde se encontró el cuerpo de un hombre de avanzada edad dentro de un pozo de aproximadamente 6 metros de profundidad. Presentaba poca presencia de larvas de insectos, esto por las bajas temperaturas existentes en el pozo. Los investigadores observaron crecimiento de hongos en el rostro del cadáver, los cuales fueron aislados e identificados como pertenecientes a los géneros

Aspergillus y Penicillium. Con los datos que aportaron las colonias de hongos y el estado de descomposición de algunos órganos, la policía dedujo que el anciano tenía muerto aproximadamente 10 días.

Ishii *et al.* (2006) ejecutó una investigación en Japón para determinar la presencia de hongos en 2 cadáveres humanos. El primero era el cuerpo momificado de un anciano de 72 años que llevaba perdido 10 meses y el segundo aparentemente se había ahorcado en un árbol hacia 6 meses. Presentando en ambos casos crecimiento de hongos amarillentos y blancos en la superficie de la escapula derecha, pubis derecho y el acetábulo. Los hongos aislados e identificados fueron: *Eurotium repens, E. chevalieri, Gliocladium sp y Aspergillus terreus.*

El continente americano no está excluido de las investigaciones micológicas en cadáveres, así Sidrim *et al*. (2009) realizó un trabajo en el estado federal de Ceará noreste de Brasil, el cual consistió en investigar la presencia de hongos en 60 cadáveres humanos del cementerio y de la morgue del pueblo, en tres etapas de descomposición: distinción abdominal o hinchada (34 cadáveres), putrefacción (6 cadáveres) y esqueletización (20 cadáveres). Las muestras fúngicas fueron tomadas mediante hisopos estériles, de los sitios con mayor probabilidad de crecimiento: la boca, el recto, la vagina, el prepucio, los pulmones, la piel, el cabello, la ropa y sus alrededores, siendo los principales hongos aislados: *Aspergillus, Penicillium y Candida*.

Sousa *et al*. (2013) realizó una investigación con cadáveres de 2 cerdos de 6 Kg de peso cada uno, los cuales fueron expuestos al ambiente y acondicionados en jaulas para evitar la acción predadora de carroñeros. El primero fue expuesto al sol y el segundo expuesto a la sombra. La temperatura y la humedad fueron registradas por un termómetro y un higrómetro respectivamente para ambas jaulas. Las muestras fúngicas fueron colectadas en intervalos de 5, 10, 15, 20 y 30 días después de la exposición de los cerdos al ambiente. Los hongos aislados e identificados fueron para el día 5 *Candida albicans* y *Penicillium sp;* para el día 10

Candida sp; para el día 15 *Candida albicans, Candida sp y Aspergillus flavus,* para el día 20 *Candida sp* y para el día 30 *Candida sp.*

Tranchida *et al.* (2014) en Argentina realizaron una investigación interesante, en donde se logró obtener flora fúngica del suelo en donde se dio la descomposición de un cuerpo. Esta investigación se realizó con el objetivo de relacionar la co-presencia de los restos humanos y las diferentes especies de hongos. Lográndose obtener diferencias significativas entre la microbiota del suelo del cadáver y la muestra control. Las especies identificadas fueron *Dichotomomyces sejpii, Talaromyces sp, T. trachyspermus y T. flavus.*

Burkhardt (2014) realizó una investigación en Florianópolis, Santa Catalina, Brasil, en la que se dejó descomponer un cerdo (*Sus scrofa L*.) de 20kg. Logrando aislar e identificar 13 hongos, de los cuales 6 eran filamentosos (*Acremonium sp. Aspergillus sp. Cladosporium sp. Curvularia sp. Mucor sp. Scedosporium aurantiacum)* y los 7 restantes levaduras (*Arthrographis sp., Candida guilliermondii, Candida krusei, Candida lipolytica, Candida tropicalis, Candida zeylanoides, Rhodotorula sp.)*. Las muestras fueron colectadas mediante hisopos estériles en tres zonas del cadáver principalmente: piel, mucosa y ano. Por tener estas zonas mayor probabilidad de encontrar especies de hongos.

2.2 Base teórica

La muerte se define de manera tradicional como el cese total y permanente de las funciones vitales. Actualmente se define no como un momento, sino más bien como una serie de procesos que se desencadenan y recorren un periodo de tiempo (Santos, 2003). Este periodo de tiempo y los cambios que se suceden en todo organismo biológico desde la muerte y el descubrimiento es estudiado y analizado por la tafonomia (Krenzer, 2006). Carter y Tibbett (2003) relacionan este término dentro del campo forense, manifestando que: “la tafonomia forense estudia los procesos por los que pasa el cadáver desde la muerte del individuo hasta la llegada del investigador”.

La muerte de un ser vivo lleva consigo una serie de cambios y transformaciones físico-químicas que hacen de este cuerpo sin vida un ecosistema dinámico y único al que van asociados una serie de organismos necrófagos, necrófilos, omnívoros y oportunistas que se van sucediendo en el tiempo dependiendo del estado de descomposición del cadáver (Smith, 1986; Magaña, 2001). Los investigadores criminalisticos son los encargados de evaluar y visualizar la escena del crimen antes de recolectar indicios de tipo biológico y no biológico. La interpretación correcta de estos indicios es fundamental para establecer con mayor precisión un índice criminalístico que estime el tiempo transcurrido desde que ocurre la muerte al momento del hallazgo, denominado Intervalo *Post mortem* (IPM) el cual involucra todos los factores que rodean el fenómeno de la degradación cadavérica (Molina, 2009).

2.2.1 Intervalo *post mortem* (IPM)

El IPM o diagnóstico cronológico de la muerte, también conocido como cronotanatodiagnóstico, busca estimar el espacio de tiempo recorrido desde la muerte hasta el hallazgo pericial. Para tal fin, incorpora técnicas y análisis provenientes de otras ramas de la investigación, tales como la arqueología, química, botánica, ecología, entomología y microbiología de suelos, con el fin de analizar con mayor precisión los procesos de degradación cadavérica (Carter y Tibbett, 2003). Este intervalo puede ser usado para confirmar o refutar la coartada de un sospechoso y para ubicar en un plano cronológico los acontecimientos; enfocando la investigación dentro de un marco correcto de tiempo. Esta determinación puede llegar a ser vital en la investigación de un homicidio (Magaña, 2001).

2.2.2 Micología forense

La micología es la rama de la biología, que tiene por objetivo el estudio de los hongos. Los hongos son organismos eucariontes, aerobios, macro o microscópicos, heterótrofos, la nutrición la efectúan mediante la secreción de enzimas (exoenzimas) que digieren la materia orgánica antes de ingerirla

(absorción) y es almacenada en forma de glucógeno, poseen crestas mitocondriales en placa, membrana celular constituida por ergosterol, quitina como principal componente de la pared celular, se reproducen por propágulos denominados esporas (Bonifaz, 2012). Gracias a estas últimas, se distribuyen por toda la naturaleza.

Cuando los hongos contribuyen en la justicia, se habla de micología forense; el cual es un término relativamente nuevo, utilizado para la descripción de especies de hongos presentes en el entorno de cadáveres humanos, así como aquellos grupos de hongos potencialmente útiles en el esclarecimiento del tiempo de muerte (Carter y Tibbett, 2003). Anteriormente, los datos que proporcionaba la micología estaban restringidos a casos de especies venenosas y psicotrópicas. Sin embargo en estos últimos años, la micología ha tomado notoriedad, encontrándose diversas situaciones en las que los datos fúngicos pueden proporcionar importante evidencia en múltiples casos, siendo algunos de estos: investigar las causas de muerte ya sea por envenenamiento o alucinógenos, estimar el tiempo de muerte, localizar los cuerpos enterrados y las guerras biológicas (Hawksworth y Wiltshire, 2011).

2.2.3 Consideraciones bioéticas

El uso del animal como fuente del conocimiento experimental tiene una larga tradición. Toda la moderna farmacología, la fisiología, la toxicología, la algologia, la psicología, la etología, por solo mencionar disciplinas de evidente aplicación a los asuntos humanos, se han basado en someter animales a experimentos o en observar la ocurrencia espontanea de fenómenos en ellos. Cuando la sacralidad del cuerpo humano era norma y prohibición para la disección, eran los animales quienes brindaban, por analogía, el conocimiento de sus entrañas al servicio de la medicina. La estructura de las ciencias médicas sería inconcebible sin el empleo de animales y sin su sometimiento a condiciones que la conciencia moral prohíbe imponer a seres humanos (Cardozo *et al*., 2007).

2.2.4 La eutanasia en los animales

La palabra eutanasia significa etimológicamente "muerte sin dolor", y en sentido aplicativo, "arte de sacrificar o matar animales de forma piadosa, evitando el sufrimiento físico y psíquico”. Obviamente esto no se logra si el animal lucha o presenta síntomas de miedo durante la maniobra empleada o, si recupera el conocimiento después del proceso (Centro de investigación, hospital general universitario de valencia, 1990).

Según considera Cardozo *et al.* (2007), puede requerirse el sacrificio de animales cuando:

a) Finaliza su periodo económico o reproductivo
b) Tienen algún daño severo
c) Están enfermos
d) Tienen dolor intolerable como resultado del experimento
e) Se requiere su muerte como parte del protocolo experimental.

La eutanasia en general puede ser provocada de dos modos:

-Por métodos físicos: disparo, aturdimiento, desnucado y otros.

-Por sustancias químicas: utilizando anestésicos sobre dosificados.

- **Eutanasia mediante método físico: pistola.**

Para obtener buenos resultados, la pistola o arma de fuego debe dispararse con el cañón situado firmemente hacia la cabeza del animal destruyendo el cerebro con lo que el estado de inconsciencia se alcanza inmediatamente. El personal participante debe mantenerse tranquilo, evitando así estresar al animal y posibles arranques de violencia por parte de este. Se le debe de sujetar de manera suave pero firme, para evitar que el proyectil se desvié y no llegue al cerebro.

Según el tipo de pistola a utilizar, se puede dividir de 2 maneras: pistola de bala cautiva y pistola de bala libre.

- **Pistola de bala cautiva:** Las pistolas de bala cautiva tienen un pistón, perno o émbolo en el interior el que sale del arma a gran velocidad ya sea por la detonación de un cartucho de explosivos o por aire comprimido golpeando fuertemente la parte frontal del cráneo para luego retornar a su sitio inicial gracias a un resorte integrado. Este golpe produce concusión e inconsciencia. Inmediatamente el animal debe ser exanguinado, evitando así que se pueda recuperar *Humane Slaughter Association* (HSA, 2006).

  Según la HSA (2006) las pistolas de bala cautiva o perno cautivo se pueden clasificar de dos maneras: penetrantes y no penetrantes. Los penetrantes causan insensibilidad, debido al fuerte golpe y al daño físico que se produce al penetrar el perno al cerebro. En cambio los no penetrantes tienen un perno de cabeza redonda que golpea fuertemente el cráneo pero no ingresa al cerebro, causando también insensibilidad debido a la conmoción que ocasiona.
- **Pistola de bala libre:** Las pistolas de bala libre son aquellas que utilizan diversas personas para uso personal y de protección. La experiencia del operador es fundamental para evitar accidentes, es por ello que no se debe de maniobrar dentro de edificios, ya que la bala tiende a rebotar y pueden causar daño a las personas, pero se puede usar de modo eficaz en el campo. Cuando el animal se puede sujetar convenientemente es preferible el método de la bala cautiva.

2.2.5 Fases de descomposición cadavérica

- **La Putrefacción**

Es el proceso por el cual se da la descomposición de la materia orgánica por acción bacteriana (Calabuig y Villanueva, 2004), que en su mayoría provienen del intestino y se van diseminando por medio de los vasos sanguíneos y linfáticos a

todo el cuerpo. Lo que se conoce como “Red vascular de la putrefacción”. Es así como animales carroñeros, insectos y microrganismos descomponedores participan activamente de la desintegración del cadáver, volviéndolo disponible para el ciclo de nutrientes y regresando los restos al sustrato (Centeno, 2002).

- **Fenómenos cadavéricos**

Desde el inicio del deceso hasta la descomposición total, el cadáver sufre una serie de cambios y transformaciones mediante procesos físico-químicos y biológicos, llamados en su conjunto fenómenos cadavéricos. Estos fenómenos modifican de manera irreversible la materia orgánica y pueden estar influenciados por factores extrínsecos e intrínsecos (Burkhardt, 2014), Los factores extrínsecos están relacionados con el medio externo que envuelve al cadáver, tales como la humedad, la temperatura, el PH del suelo, etc. En tanto que los factores intrínsecos están relacionados con el cadáver tales como la edad, la causa de muerte, la contextura del cadáver, etc.

En 1957 Bornemissza dio la posibilidad de dividir esta descomposición en 5 estadios o fases para una manera más didáctica. Aunque la literatura informa que este criterio varía de autor a autor ya que muchas veces estos periodos o fases se funden entre sí, tornándose difícil su individualización (Gunn, 2006). Tal es así, que diferentes investigadores la clasifican en 4, 5 y hasta 6 fases o periodos. Como por ejemplo: Paine (1965) trabajando con cadáveres de cerdo en Estados Unidos, reconoce 6 etapas de descomposición: fresco, hinchado, activo, avanzado, seco y remanente. Rodríguez y Bass (1983) realizaron estudios experimentales con cadáveres humanos, dividiéndolo en 4 fases: cromática, enfisematosa, colicuativa y de reducción esquelética. Peceros (2011) en su estudio realizado con dos cerdos en la provincia peruana de Huarochirí, consideró las 5 fases de descomposición propuestas por Bornemissza. En el presente trabajo seguiremos la clasificación propuesta por Rodríguez y Bass (1983).

Es así como comprobamos que muchos son los investigadores que presentan su propio criterio al momento de dividir en fases o periodos esta

descomposición cadavérica. Schoenly y Reid (1987), señalan que esta división se da para aportar puntos de referencia que permitan explicar los hechos que acontecen en la descomposición y sobre todo poderlo explicar ante un tribunal.

Según lo descrito por Early y Goff (1986), la ciencia forense reconoce y acepta cinco fases o estados de descomposición: Estado fresco o cromático, hinchado o enfisematoso, descomposición activa o colicuativa, descomposición avanzada y restos secos o esqueletización (Magaña, 2001; Calabuig y Villanueva, 2004). Estas fases o periodos de descomposición cadavérica se pueden generalizar tanto para los cadáveres humanos como para los animales descritas en los tratados de patología forense (Calabuig y Villanueva, 2004).

- **Fase inicial o fresca:**

  Externamente no hay ningún cambio pero internamente se da inicio a la descomposición, por actividad de las bacterias intestinales.

- **Fase cromática, meta cromática o de coloración:**

  Se inicia con la aparición de la mancha verde, que generalmente se presenta en la región cecoapendicular (fosa iliaca) derecha; donde los coliformes y clostridios descomponen la hemoglobina formándose un compuesto denominado sulfoxihemoglobina originado por la combinación del hidrógeno sulfurado con la hemoglobina. Suele desarrollarse a partir de las 24-36 horas después del deceso. En los fetos la mancha verde aparece a la altura del cuello y tórax.

- **Fase enfisematosa, gaseosa o de hinchazón:**

  Comienza a partir del tercer día del deceso pudiendo extenderse por varios días, lo cual es dependiente del medio ambiente y de la fuerte actividad microbiana. La actividad microbiana está dado por bacterias anaeróbicas que hacen que el cadáver pierda su apariencia original, comenzando a hincharse en sus diferentes partes, tales como cara, cuello, labios, escroto,

vulva. Apareciendo en la parte superficial de la piel vesículas gaseosas, que al romperse produce desprendimiento de la epidermis.

La presión de los gases produce que las venas salgan a la parte superficial y sean visibles como una especie de entramado venoso llamado “circulación póstuma” (*Brouardel*). Esta misma presión rompe las barreras epiteliales, haciendo que el contenido abdominal se exponga al exterior.

- **Fase colicuativa, licuefacción o putrefacción negra:**

  Los tejidos y órganos internos se van descomponiendo como consecuencia de la actividad bacteriana, convirtiéndose en una masa putrilaginosa de olor fuerte y muy desagradable, para luego tornarse negruzco o pardo azulado. Las uñas y pelos se van desprendiendo. Este periodo puede durar días dependiendo del medio ambiente en el que se encuentra el cadáver y de la actividad de los insectos.

- **Fase Reductiva o de Esqueletización:**

  En esta fase la velocidad de la descomposición se hace más lenta. Las partes blandas con el tiempo van desapareciendo, quedando solo algunos ligamentos y cartílagos. Esta fase puede durar mucho tiempo, dado que la actividad de los insectos, hongos y bacterias disminuyen, como producto de la escasa materia orgánica existente.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico

Para la investigación se adquirió 2 especímenes de *Sus scrofa L.* (Cerdo doméstico), de 12 kg y 80 cm. aproximadamente cada uno. Los cuáles fueron adquiridos vivos en el mercado mayorista de Moshoqueque, ubicado en el distrito de José Leonardo Ortiz – provincia de Chiclayo.

3.1.2 Población y muestra de estudio

En la investigación descriptiva, la población estuvo constituida por todos los hongos presentes durante la descomposición cadavérica de *Sus scrofa L.* (cerdo), y la muestra por los hongos presentes en dos especímenes de *Sus scrofa L.* (cerdo), durante la descomposición cadavérica hasta los 40 días.

3.2 Métodos

3.2.1 Variables en estudio

Las variables cualitativas fueron todos los hongos, tanto filamentosos como levaduriformes aislados e identificados del cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo).

3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

El trabajo de investigación fue descriptivo y para contrastar la hipótesis se utilizó el diseño de una sola casilla (Goode y Hatt, 1986).

3.2.3 Zona de estudio:

El estudio se realizó en el ex-fundo local que pertenece a la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Situado al Noreste del departamento de Lambayeque, Perú. A una distancia 1.72 Km. aproximadamente a la universidad. En donde también queda la estación meteorológica perteneciente a dicha universidad. (Figura 1),

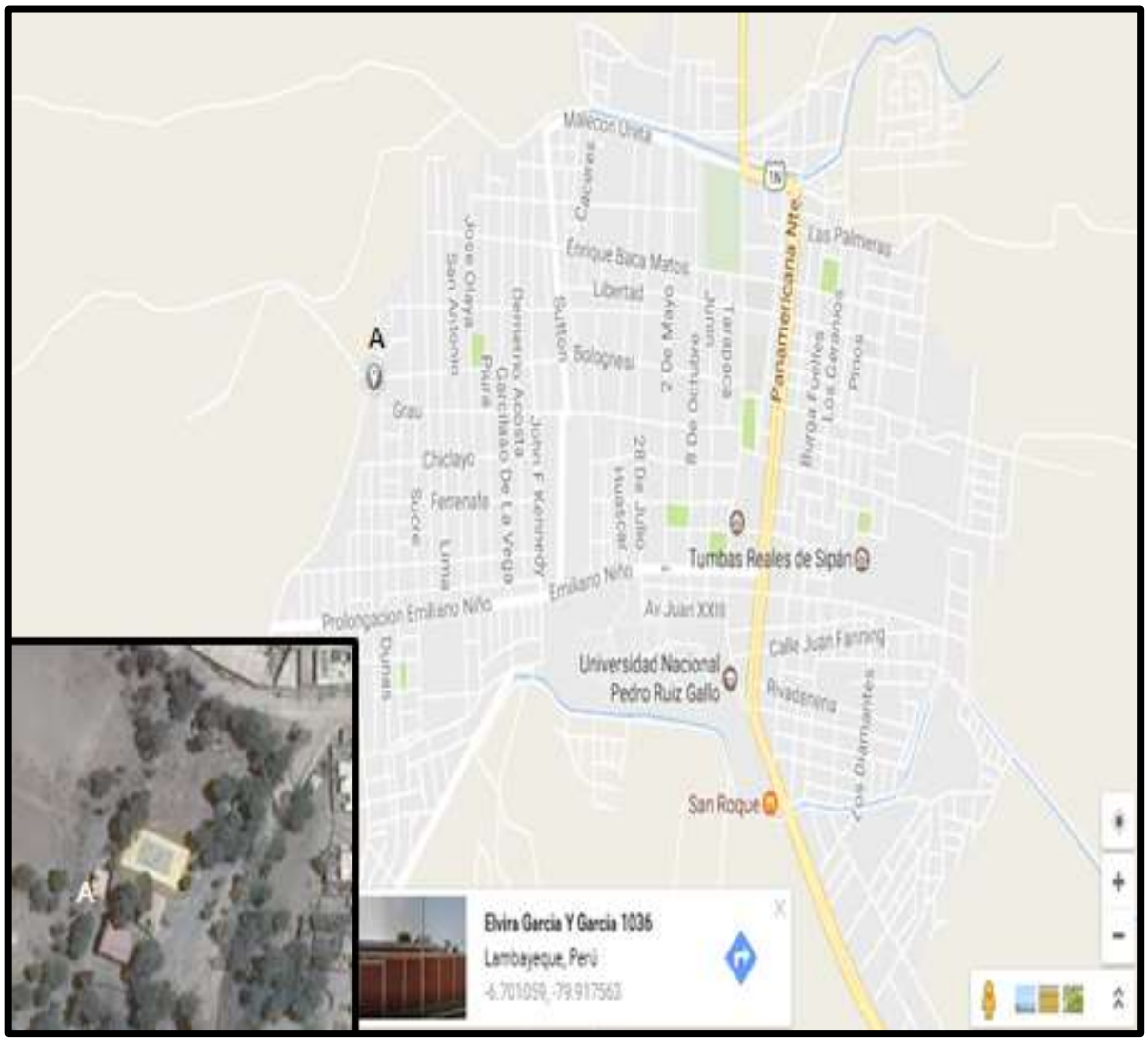


Figura 1.- Zona de estudio. A: Ex fundo, perteneciente a la UNPRG-Lambayeque. (Google earth, 2017).

- **Área de estudio**

Las áreas escogidas fueron dos espacios ubicados en el ex-fundo, a campo abierto. Con una distancia de 5 m. entre si y a una altura de 30 m.s.n.m. La ubicación, altura y distancia entre las áreas se obtuvo mediante la utilización de GPS (Global Positioning System).

- ✓ **Área 01:** Coordenadas (06° 42' 06.8'' L.S. - 79° 55' 08.7'' L.O.) (Figura 2A)
- ✓ **Área 02:** Coordenadas (06° 42' 07.2'' L.S. - 79° 55' 09.1'' L.O.) (Figura 2B)

Figura 2.- A) Área 01: Coordenadas (06° 42' 06.8'' L.S. - 79° 55' 08.7'' L.O.)

B) Área 02: Coordenadas (06° 42' 07.2'' L.S. - 79° 55' 09.1'' L.O.)

3.2.4 Diseño de la jaula

Se construyeron jaulas de madera de dimensiones de 60x40x40 cm, (Figura 3) las cuales se revistieron con mallas metálicas para permitir el paso de la entomofauna cadavérica e impedir el acceso de animales necrófagos de gran porte que pudiesen comprometer el experimento" (Burkhardt, 2014). Finalmente la jaula se fijó al suelo mediante unas estacas de fierro de 40 cm, evitando así que perros u otros tipos de animales puedan desplazarla.

3.2.5 Sacrificio y distribución al lugar de estudio

Los especímenes biológicos fueron abatidos (Figura 4) mediante disparo en la región occipital con arma de fuego tipo pistola calibre 9mm marca Glock, tratando de esta manera simular asesinatos y, principalmente, evitar el sufrimiento del animal (Centro de investigación, Hospital general universitario de Valencia, 1990). En las jaulas de madera se depositaron los cadáveres (Figura 5).

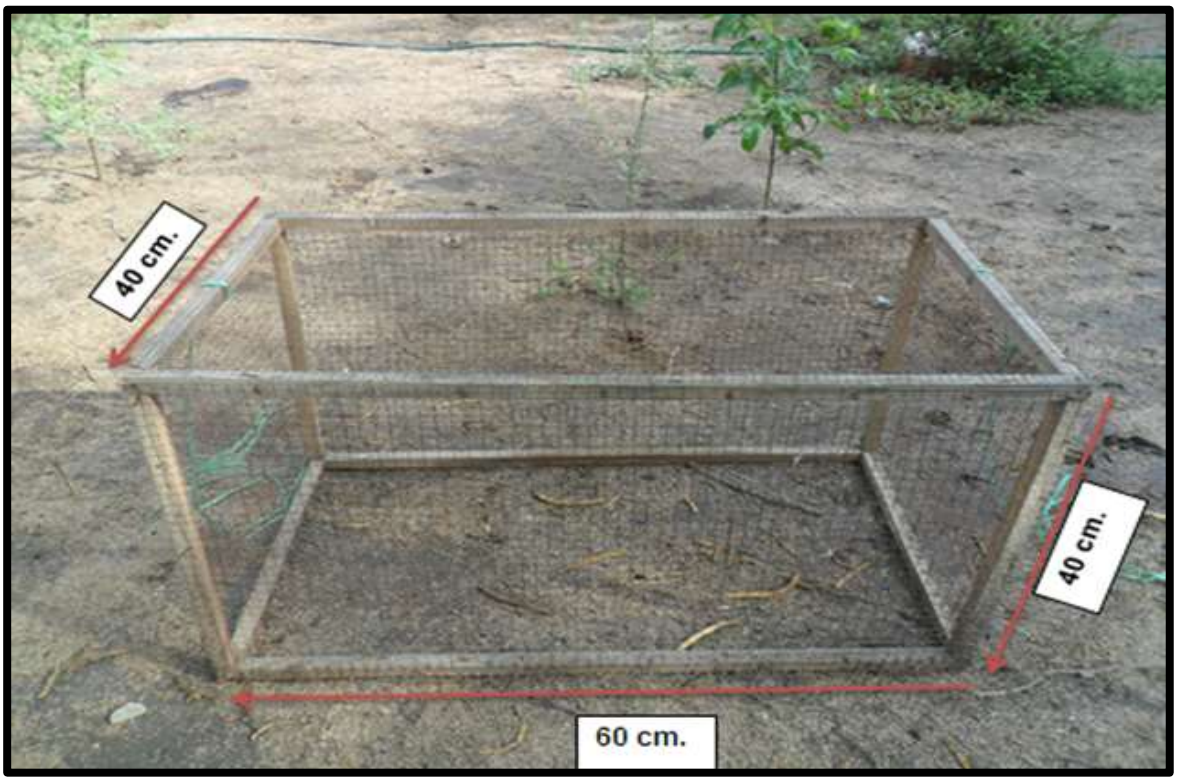


Figura 3.- Diseño de la jaula

Figura 4.- Sacrificio del espécimen bilógico, A) Primer cerdo; B) Segundo cerdo

Figura 5.- Distribución del espécimen biológico al lugar de estudio, A) Primer cerdo; B) Segundo cerdo.

3.3 Procedimiento

La toma de muestras se realizó de 9 am a 10 am de manera pre-establecida los días 1, 5, 10, 15, 20, 30 y 40 desde la puesta de los cadáveres en la zona de estudio hasta su esqueletización final. Para el primer cerdo el sacrificio se dio el 19 de octubre del 2016 y prolongándose la investigación hasta el día 27 de noviembre de 2016. En tanto que para el segundo cerdo el sacrificio se dio el 12 de enero del 2017 y prolongándose la investigación hasta el día 20 de febrero de 2017. Siendo el día del sacrificio y el último día de la investigación, considerados como día 1 y 40 respectivamente.

Siguiendo las técnicas de Moreira (2008) y Burkhardt (2014), las muestras se tomaron con hisopos esterilizados realizando movimientos de fricción y rotación en las mucosas oral y anal y en el lomo (Figura 6) después de lo cual se colocaron en tubos de ensayo conteniendo 5ml de solución salida fisiológica (SSF). Luego se transportaron en un cooler al laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Con la intención de protegerse al momento de manipular los cadáveres y las muestras biológicas, se ha utilizado implementos de bioseguridad (Figura 7).

Los datos meteorológicos como la temperatura y la humedad relativa, fueron registrados por la estación meteorológica de la Universidad Nacional “Pedro Ruiz Gallo” - Lambayeque (Anexo 1).

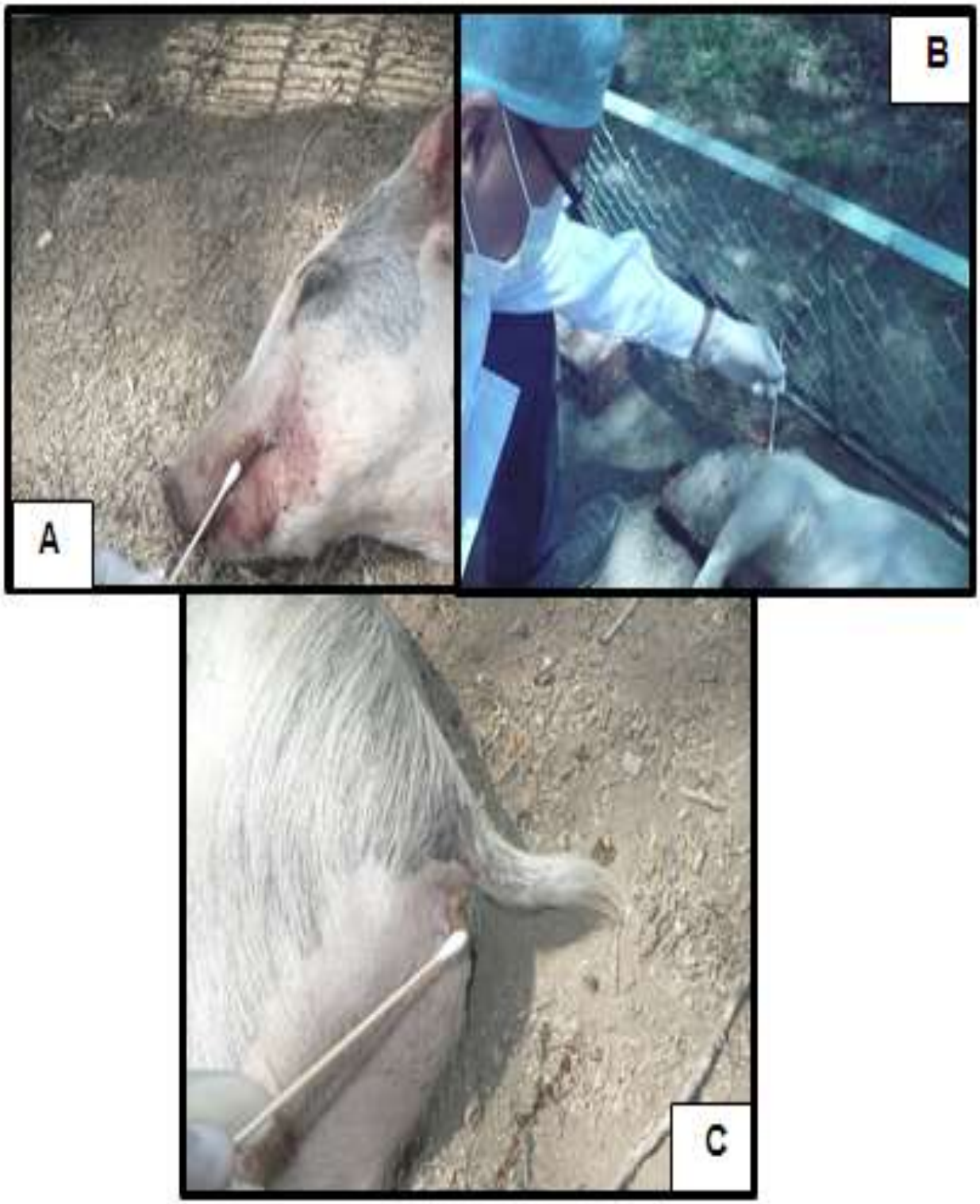


Figura 6.- Colecta y Toma de muestras. A) Boca; B) Lomo; C) Ano.

Figura 7.- Implementos de bioseguridad. A) En área de estudio; B) En laboratorio.

3.3.1 Aislamiento e identificación de los hongos

Para el aislamiento de los hongos las muestras obtenidas con hisopos esterilizados fueron sembradas mediante la técnica por agotamiento sobre medios de cultivo (Anexo 2). Siendo el primer medio el Agar Sabouraud Glucosado (ASG), con cloranfenicol contenidos en placas de Petri, las cuales fueron incubadas a 26-28 °C durante 5 días. Al cabo del tiempo de incubación se observó el desarrollo de colonias tanto de aspecto micelial como levaduriformes (Figura 8a) cada una de estas colonias fueron luego resembradas en Agar papa dextrosa (PDA). Obteniéndose de esta manera los cultivos puros (Figura 8b).

Figura 8.- Hongos desarrollados: A) agar Sabouraud más cloranfenicol. B) PDA más cloranfenicol.

3.3.1.1 Identificación de hongos de aspecto micelial (Bonifaz, 2012; Pitt y Hocking, 2009)

Para la identificación de los hongos de aspecto micelial, se tuvo en cuenta las características macroscópicas y microscópicas.

a) Características macroscópicas

La observación macroscópica se basó en el aspecto, color, difusión de pigmento y diámetro de las colonias.

b) Características microscópicas

Para la observación de las características microscópicas se realizaron las técnicas siguientes:

- **Técnica de montaje por disección (Divo, 1990)**

  Para la realización de esta técnica se utilizó una ansa micológica debidamente esterilizada, con la cual se tomó una pequeña porción de la colonia elegida y se colocó en un portaobjeto, que contenía una gota de azul de algodón o una gota de hidróxido de potasio al 40 % según presente pigmentación o no la colonia, luego con el ansa micológica se extendió de tal manera que no quedó un acumulado de hifas, luego se procedió a cubrirlo con una laminilla para ser observado al microscopio con objetivo de 40x.

- **Técnica de cinta pegante (Koneman, 1987).**

  Para el desarrollo de esta técnica se cortó 4cm de cinta adhesiva con la parte pegajosa dirigida hacia la colonia (Figura 9), luego se colocó en una lámina portaobjetos que contenía una gota de azul de algodón (para hongos hialinos) o una gota de hidróxido de potasio al 40 % (para hongos pigmentados) según fue el caso. Luego se observó al microscopio con objetivo de 40x.

  Esta técnica permitió observar la morfología tanto en su fase de reproducción como en su fase vegetativa y estructuralmente unidas de algunos hongos que con la técnica de montaje por disección no se logró observar.

- **Técnica de Microcultivo (Arenas, 1983).**

  Esta técnica permitió observar las estructuras fúngicas *in situ* y a la vez obtener montajes semipermanentes (Anexo 3; Figura 10).

  La identificación de los hongos micelíales se realizó teniendo en cuenta las claves de identificación de Bonifaz (2012); Pitt y Hocking (2009).

Figura 9.- Técnica de cinta pegante.

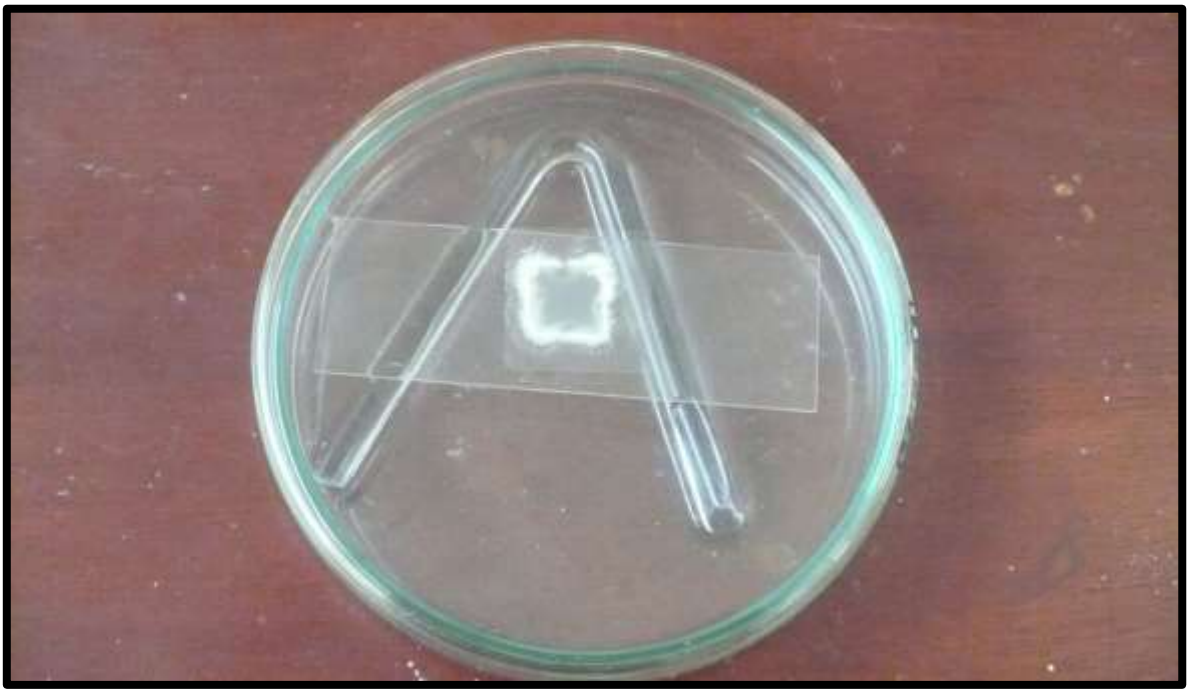


Figura 10.- Técnica de microcultivo.

3.3.1.2 Identificación de hongos de aspecto levaduriforme (Bonifaz, 2012; Pitt y Hocking, 2009)

Para la identificación de hongos de aspecto levaduriforme, también se tuvo en cuenta las características macroscópicas y microscópicas.

a) Características macroscópicas

La observación macroscópica se basó en el aspecto, color, presencia de pigmentación de las colonias.

b) Características microscópicas

Para la observación de las características microscópicas se realizaron las técnicas siguientes:

- **Tinción de Gram (Bonifaz, 2012)**

  Se realizó una coloración Gram con la cual se determinó la morfología característica de una levadura (Anexo 4; Figura 11).

- **Observación de tubo germinal (Ministerio de salud, 1997).**

  Esta prueba se realizó básicamente para la identificación *de Candida albicans.* El tubo germinal o filamento precoz (Anexo 5), es una prolongación filamentosa de la levadura, no presentando estrechamiento en su origen, en donde el ancho suele ser la mitad de la célula progenitora y su longitud tres o cuatro veces mayor que la célula madre (Ministerio de salud, 1997).

- **Formación de clamidosporas (Ministerio de salud, 1997).**

  Las cepas que producían tubo germinal, se les sembró en agar harina de maíz, llevándose a incubar a 26-28°C durante un periodo de 24 horas, luego se realizó la observación de clamidosporas, lo que constituye una prueba diferencial para *Candida albicans.*

- **Fermentación de carbohidratos (Ministerio de salud, 1997).**

  Los cultivos se sembraron en tubos de ensayo (Figura 12), los cuales contenían glucosa, lactosa, sacarosa, maltosa, galactosa y rafinosa. Y llevados a incubar a 37 °C por un lapso de 24 a 48 horas. La identificación de las levaduras se realizó teniendo en cuenta las claves de identificación del Ministerio de salud, 1997 (Anexo 6).

3.3.2 Relación de los hongos identificados durante las fases de descomposición cadavérica de *Sus scrofa L*. (cerdo) expuestos en condiciones de campo con el establecimiento del intervalo *post mortem.*

Para establecer la relación de los hongos identificados con las fases de descomposición cadavérica, se construyó tablas de ausencia y presencia. Luego en base a estos datos se empleó el índice de Similaridad de Jaccard, para de esta manera determinar semejanzas entre las especies fúngicas y su relación existente entre las fases de descomposición.

$$IS_J = a / a + b + c$$

Dónde:

ISJ: Índice de Similaridad de Jaccard.

a: Número de veces en que ambas especies son 1 (presencia).

b: Número de veces en que una especie es 1 y la otra es 0 (presencia y ausencia).

c: Número de veces en que una especie es 0 y la otra es 1 (ausencia y presencia).

En base a los valores obtenidos del Índice de Similaridad de Jaccard se elaboró Dendrogramas. El análisis estadístico se realizó mediante la utilización del programa estadístico STATISTIXL.

Figura 11.- Tinción de Gram.

Figura 12.- Fermentación de carbohidratos.

3.4 Organización y análisis de datos

Los datos obtenidos en la investigación, fueron ordenados y expresados en tablas y figuras que permitieron visualizar y analizar los hongos presentes durante la descomposición cadavérica de *Sus scrofa L.* (cerdo). Los datos fueron procesados utilizando los programas Microsoft Office Word y Microsoft Office Excel 2013.

IV. RESULTADOS:

4.1 Identificación de los hongos presentes durante las fases de descomposición cadavérica de *Sus scrofa L.* (cerdo), expuestos en condiciones de campo.

Se logró identificar 10 tipos de hongos, de los cuales 6 eran filamentosos y 4 levaduriformes. (Tabla 1).

Tabla 1.- Hongos presentes durante la descomposición cadavérica de *Sus scrofa L.* (cerdo), expuestos en condiciones de campo.

Hongos	Orden	Familia	Género/especie
Filamentosos	Eurotiales	Trichocomaceae	*Penicillium sp* *Aspergillus sp*
	Pleosporales	Pleosporaceae	*Bipolaris sp*
	Hypocreales	Nectriaceae	*Fusarium sp*
	Mucorales	Mucoraceae	*Mucor sp* *Rhizopus sp*
Levaduriformes	Saccharomycetales	Saccharomycetes	*Candida sp.* *C. albicans* *C. tropicalis.*
	Sporodiales	Sporidiobolaceae	*Rhodotorula sp*
Total	**6**	**6**	**10**

4.1.1 Hongos filamentosos aislados e identificados durante las fases de descomposición cadavérica de *Sus scrofa L.* (cerdo), expuestos en condiciones de campo.

REINO: Fungi

PHYLUM: Ascomycota

CLASE: Euascomycetes

ORDEN: Eurotiales

FAMILIA: Trichocomaceae

GÉNERO: *Penicillium*

ESPECIE: *Penicillium sp.*

El género *Penicillium* es inicialmente de color blanco, para luego tornarse según la especie de color verdoso, amarillenta o rosada. El crecimiento fue rápido e ilimitado ocupando todo el medio de cultivo. Son filamentosas, lanosas y de textura algodonosa. El reverso no presentó pigmentación, aunque algunas especies como *P. notatum* dan color café-ocre (Bonifaz, 2012).

Presentan micelio macrosifonado (2- 4µm), con hifas hialinas y septadas, con conidióforos simples o ramificados de 5 a 10 µm de largo y esterigmas (fiálides), que dependiendo de la especie miden entre 3 a 6 µm. La organización de estas fiálides en la punta de los conidióforos es típica (forma de pincel), en donde se encuentran los microconidios (Bonifaz, 2012).

Penicillium sp. Se encontró en ambos cadáveres de *Sus scrofa L*. (cerdo), en las fases de descomposición enfisematoso, colicuativo y esquelético. Con mayor porcentaje de permanecía en el lomo del segundo cerdo (85.7 %).

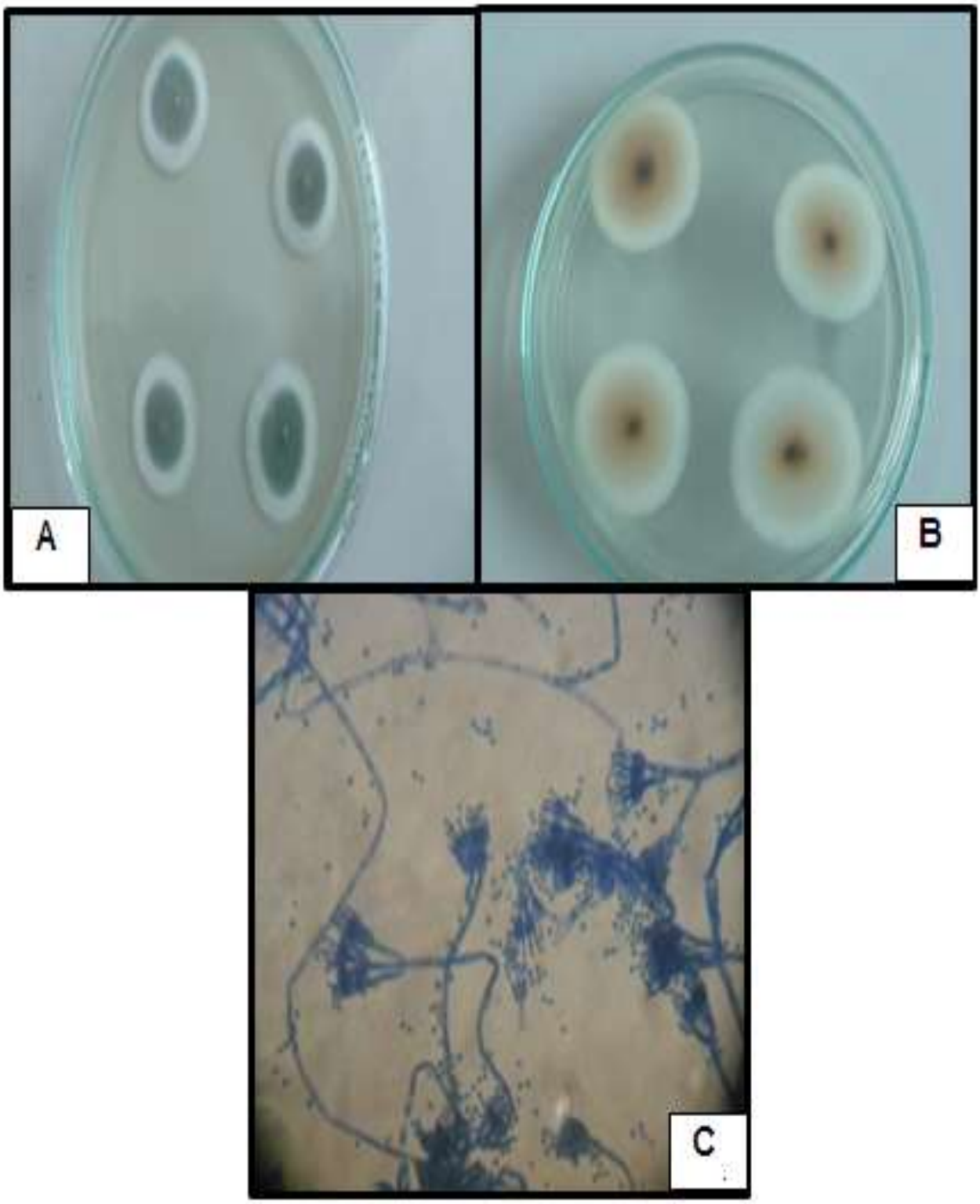


Figura 13- *Penicillium sp.* A) Anverso de la placa de Petri; B) Reverso de la placa de Petri; C) Tinción con azul de algodón (400x).

REINO: Fungi

PHYLUM: Ascomycota

CLASE: Eurotiomycetes

ORDEN: Eurotiales

FAMILIA: Trichocomaceae

GENERO: *Aspergillus*

ESPECIE: *Aspergillus sp.*

El género *Aspergillus* presentó un crecimiento rápido e ilimitado ocupando todo el medio de cultivo. Son filamentosas hialinas, lanosas y de textura algodonosa. Al inicio del crecimiento fue de color blanco para luego tornarse verdusco. Existiendo de diversos colores dependiendo de la especie, como por ejemplo: verde-amarillenta *(A. flavus),* negro *(A. niger),* verde con un ligero halo blanco micelial *(A. clavatus)* (Bonifaz, 2012).

Al observar al microscopio, presentan micelio hialino septado, macrosifonado y ramificado. Presentan Conidióforos cenocíticos largos y cortos de paredes gruesas, el conidióforo se prolonga en forma bulosa o de burbuja denominado vesícula, la cual se encuentra abarrotada de fiálides y en algunas especies de fiálides y métulas (Pitt y Hocking, 2009).

Aspergillus sp. Se encontró en ambos cadáveres de *Sus scrofa L*. (cerdo), en ls fases de descomposición fresco, enfisematoso, colicuativo y esquelético. Con mayor porcentaje de permanecía en el lomo del primer cerdo (100 %).

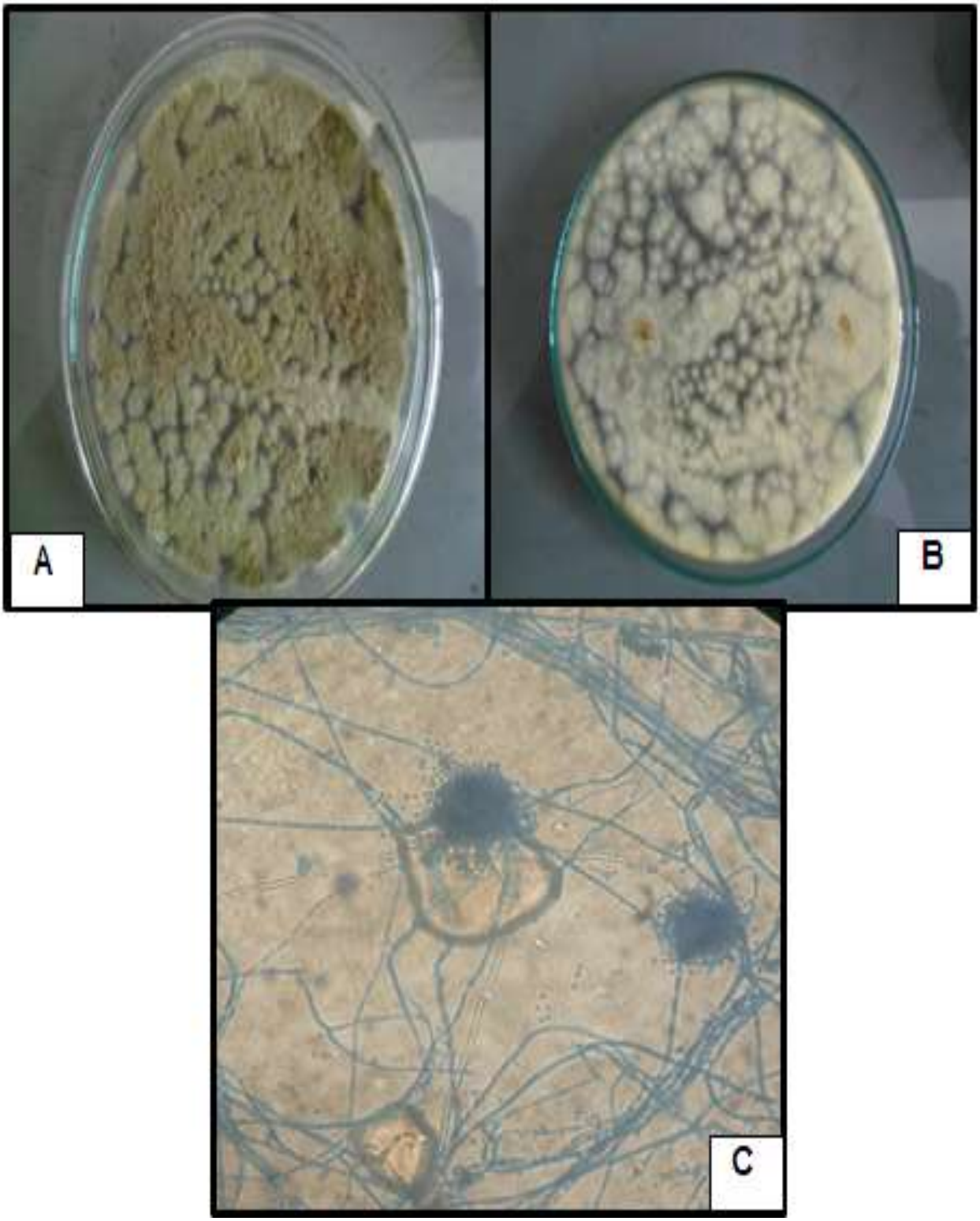


Figura 14.- *Aspergillus sp.* A) Anverso de la placa de Petri; B) Reverso de la placa de Petri; C) Tinción con azul de algodón (400x).

REINO: Fungi

PHYLUM: Zygomycota

CLASE: Zygomycetes

ORDEN: Mucorales

FAMILIA: Mucoraceae

GÉNERO: *Mucor*

ESPECIE: *Mucor sp.*

Son colonias filamentosas, algodonosas, secas de crecimiento muy rápido, llegando a ocupar toda la placa de Petri. Al inicio presentaron un color blanco, para luego tornarse de color blanco-grisáceo. Al reverso de la placa de Petri no presentó pigmentación (Bonifaz, 2012).

Presentan micelio macrosifonado (4-8 µm) con hifas cenocíticas hialinas. Las esporangiosporas (endosporas) son múltiples y redondas de entre 3 a 5 µm de diámetro; los cuales se encuentran dentro de un esporangio (20-80 µm). Una de las características que se observó al microscopio es que las hifas de este género pueden ramificarse a diferencia de *Rhizopus*, ya que en este último todas parten de la base (rizoide). Presentan columnela pequeña y ovoide (Bonifaz, 2012).

Mucor sp. Se encontró en ambos cadáveres de *Sus scrofa L*. (cerdo), en las fasess de descomposición enfisematoso, colicuativo y esquelético. Con mayor porcentaje de permanecía en el lomo del segundo cerdo (71.4 %).

REINO: Fungi

PHYLUM: Zygomycota

CLASE: Zygomycetes

ORDEN: Mucorales

FAMILIA: Mucoraceae

GÉNERO: *Rhizopus*

ESPECIE: *Rhizopus sp.*

Presentan tamaño ilimitado, de crecimiento rápido logrando ocupar toda la placa de Petri. Son colonias filamentosas, algodonosas y secas. Al inicio del crecimiento fueron de color blanco para luego tornarse de color café oscuro o grisáceo. Al reverso de la placa de Petri no presentó pigmentación (Bonifaz, 2012).

Presenta micelio macrosifonado (5-10 µm) grueso, cenocítico, con abundante rizoides de los que se forma directamente el esporangio, que es grande (100-200 µm de diámetro), con endosporas o esporangiosporas múltiples de 6 a 8 µm de diámetro. Una característica importante es que todas las ramificaciones del micelio parten del rizoide y las hifas prácticamente no se ramifican. Presentan hifas a manera de estolón, que conecta a dos rizoides (Bonifaz, 2012).

Rhizopus sp. Se encontró solo en el segundo cadáver de *Sus scrofa L*. (cerdo), en las fases de descomposición enfisematoso y colicuativo. Con mayor porcentaje de permanecía en el lomo (71.4 %).

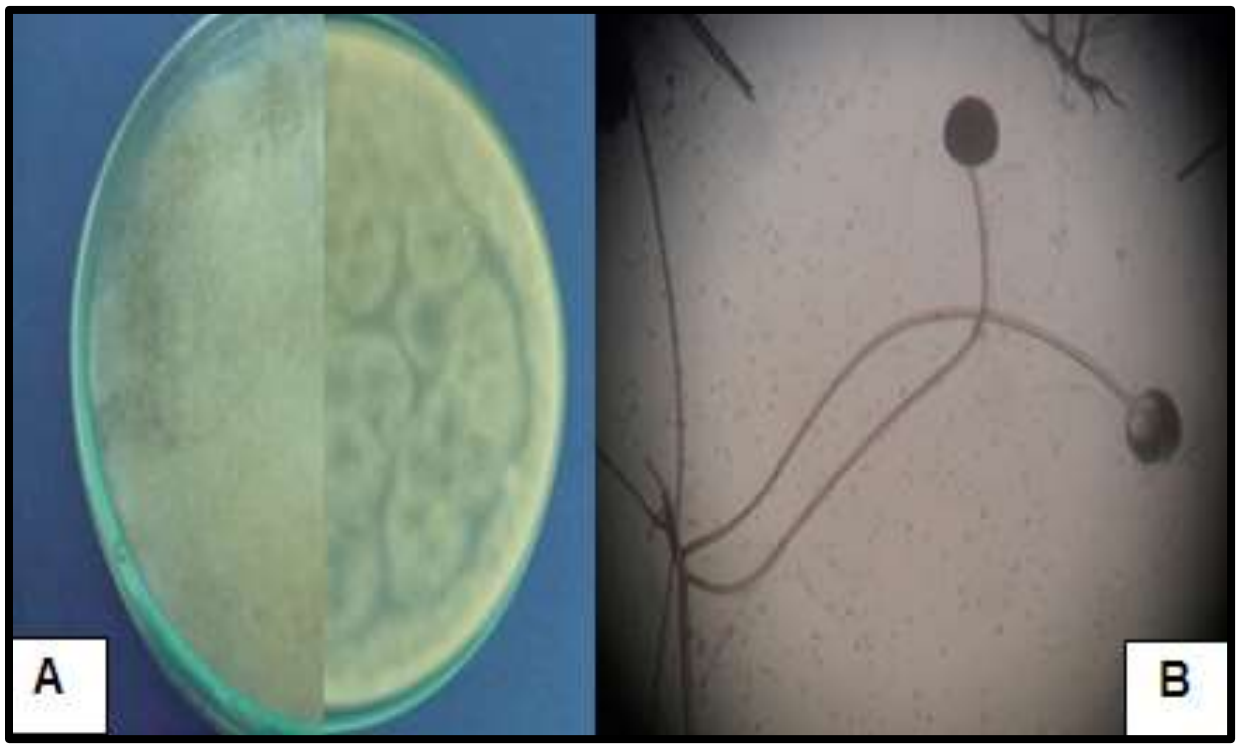


Figura 15.- *Mucor sp.* A) Anverso y Reverso de la placa de Petri; B) Tinción con azul de algodón (400x).

Figura 16.- *Rhizopus sp.* A) Anverso y reverso de la placa de Petri; B) Tinción con KOH.

REINO: Fungi

PHYLUM: Ascomycota

CLASE: Dothideomycetes

ORDEN: Pleosporales

FAMILIA: Pleosporaceae

GÉNERO: *Bipolaris*

ESPECIE: *Bipolaris sp.*

El género *Bipolaris* presenta tamaño ilimitado, cubriendo todo el medio de cultivo. Al inicio presentó un color blanco a manera de velo con tonalidades oscuras, para luego cambiar a un color gris-negro. Son planas y aterciopeladas. En el reverso de la placa de Petri, se observó pigmentación oscura que se difundía en el medio de cultivo (Bonifaz, 2012).

En la observación al microscopio se visualizó conidios largos y grandes a manera de fusoides, es decir, se estrechan gradualmente. Los conidios germinan sólo a partir de las células finales (germinación bipolar). Los tubos germinales se desarrollan aproximadamente a lo largo de la línea del eje del conidio (Pitt y Hocking, 2009).

Bipolaris sp. Se encontró solo en el primer cadáver de *Sus scrofa L*. (cerdo), en las fases de descomposición colicuativo y esquelético. Con mayor porcentaje de permanecía en el lomo (42.9 %).

REINO: Fungi

PHYLUM: Ascomycota

CLASE: Sordariomycetes

ORDEN: Hypocreales

FAMILIA: Nectriaceae

GÉNERO: *Fusarium*

ESPECIE: *Fusarium sp.*

El género *Fusarium* presenta un crecimiento ilimitado, cuyo micelio es filamentoso-hialino. En la placa de Petri se observó colonias de aspecto velloso, seco, planas, de color blanco o blanco amarillento. Existiendo especies que generan pigmentación violeta o naranja, los cuales se difunden en el medio (Bonifaz, 2012).

Un carácter importante observado al microscopio son los conidios fusiformes a manera de media luna y la producción de septos (Pitt y Hocking, 2009). Presentan macroconidios (8-10 µm de largo por 2-4 µm de ancho) y microconidios (2-5 µm). Ambos nacen directamente de los conidióforos (Bonifaz, 2012).

Fusarium sp. Se encontró solo en el primer cadáver de *Sus scrofa L*. (cerdo), en las fases de descomposición enfisematoso y colicuativo. Con mayor porcentaje de permanecía en el lomo (28.6 %) y ano (28.6 %).

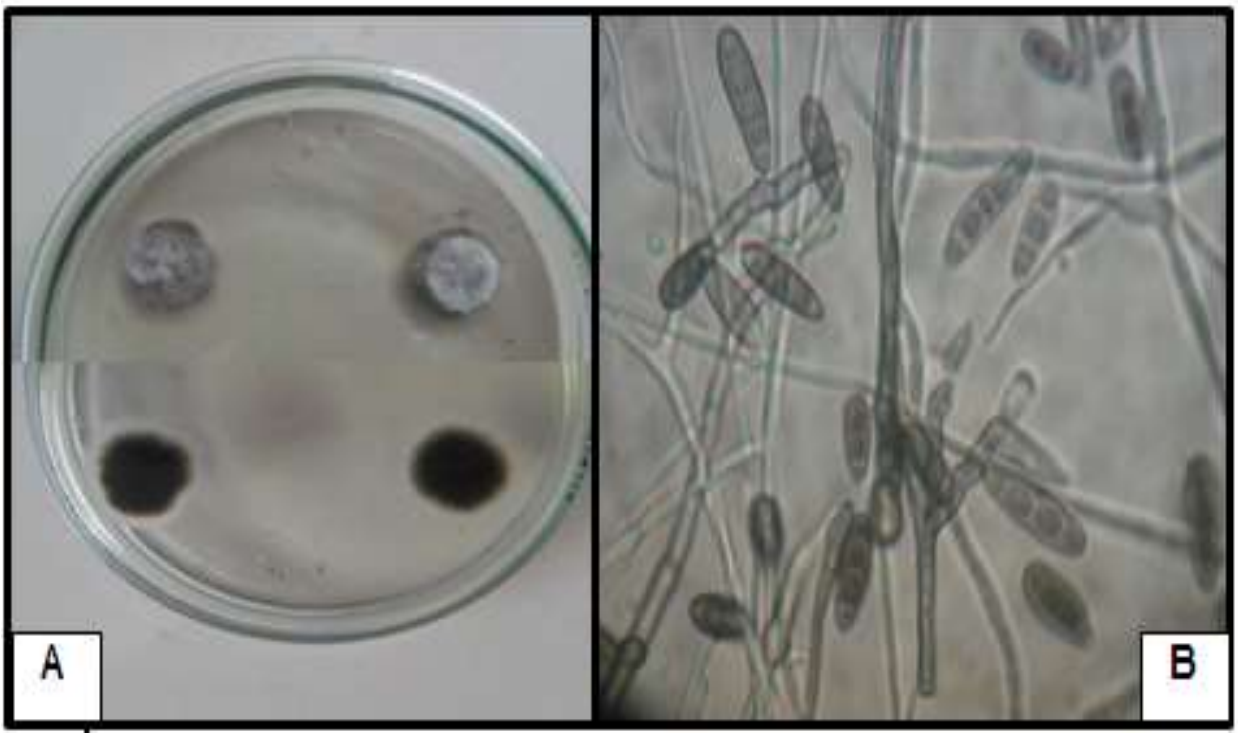


Figura 17.- *Bipolaris sp.* A) Anverso y reverso de la placa de Petri; B) Tinción con KOH (400x).

Figura 18.- *Fusarium sp.* A) Anverso y Reverso de la placa de Petri; B) Tinción con azul de algodón (400x).

4.1.2 Hongos levaduriformes aislados e identificados de la descomposición cadavérica de *Sus scrofa L.* (cerdo), expuestos en condiciones de campo.

REINO: Fungi

CLASE: Ascomycetes

ORDEN: Saccharomycetales

FAMILIA: Saccharomycetes

GÉNERO: *Candida*

ESPECIES: *Candida sp, C. albicans, C. tropicalis*

Las colonias de *Candida* presentaron color blanco amarillentas, cremoso, pastoso y viscosas; de superficie y de bordes lisos, no produjeron pigmentos melánicos. Presentaron forma ovoide, aunque esta puede variar según la especie: Globosa, elíptica, cilíndricas y triangulares (Bonifaz, 2012). Crecieron rápidamente en los medios empleados en un lapso de 24 – 48 horas.

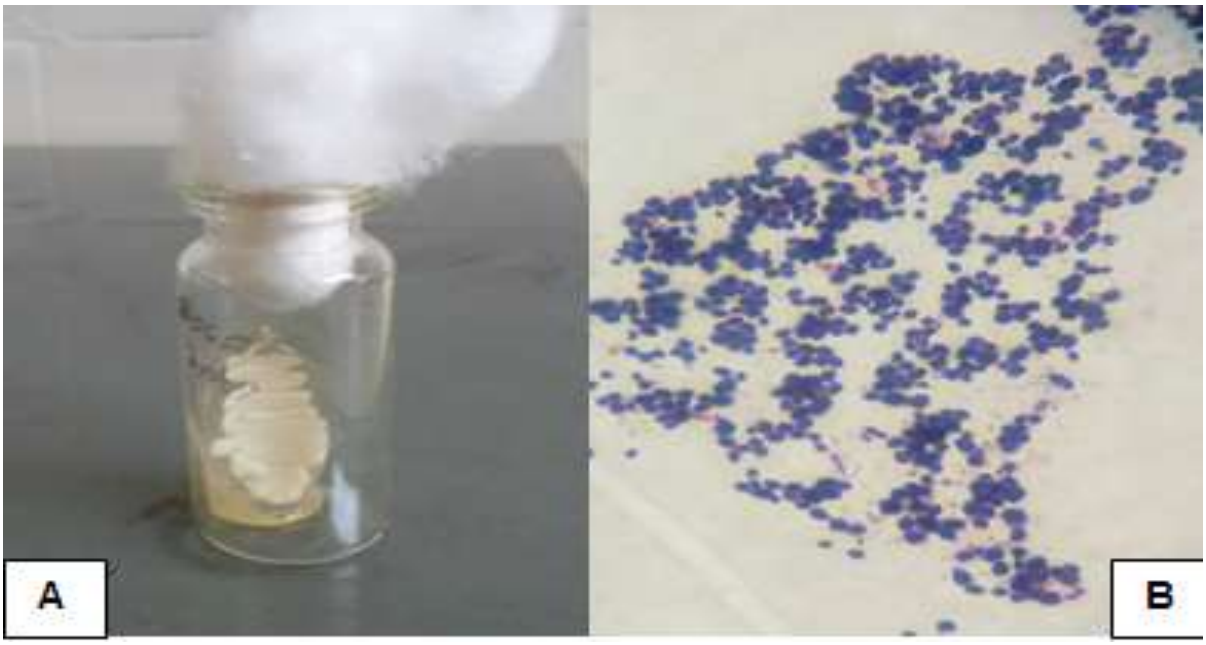


Figura 19.- *Candida sp.* A) Cultivo puro de Candida sp; B) Tinción de Gram (400x).

La especie *C. albicans* es un hongo dimórfico, es decir se desarrolla de forma distinta dependiendo de la temperatura, como levadura a 37 °C y como hongo filamentoso a temperatura ambiente. Esta levadura está formada por células redondas u ovales de 3.8 x 2.7 µm de diámetro. En medios específicos pueden generar a partir del pseudomicelio clamidosporas con estructuras terminales o intercalares de 10 y 12 µm de diámetro. En suero humano o de conejo, se estimulan formando un filamento largo (Bonifaz, 2012).

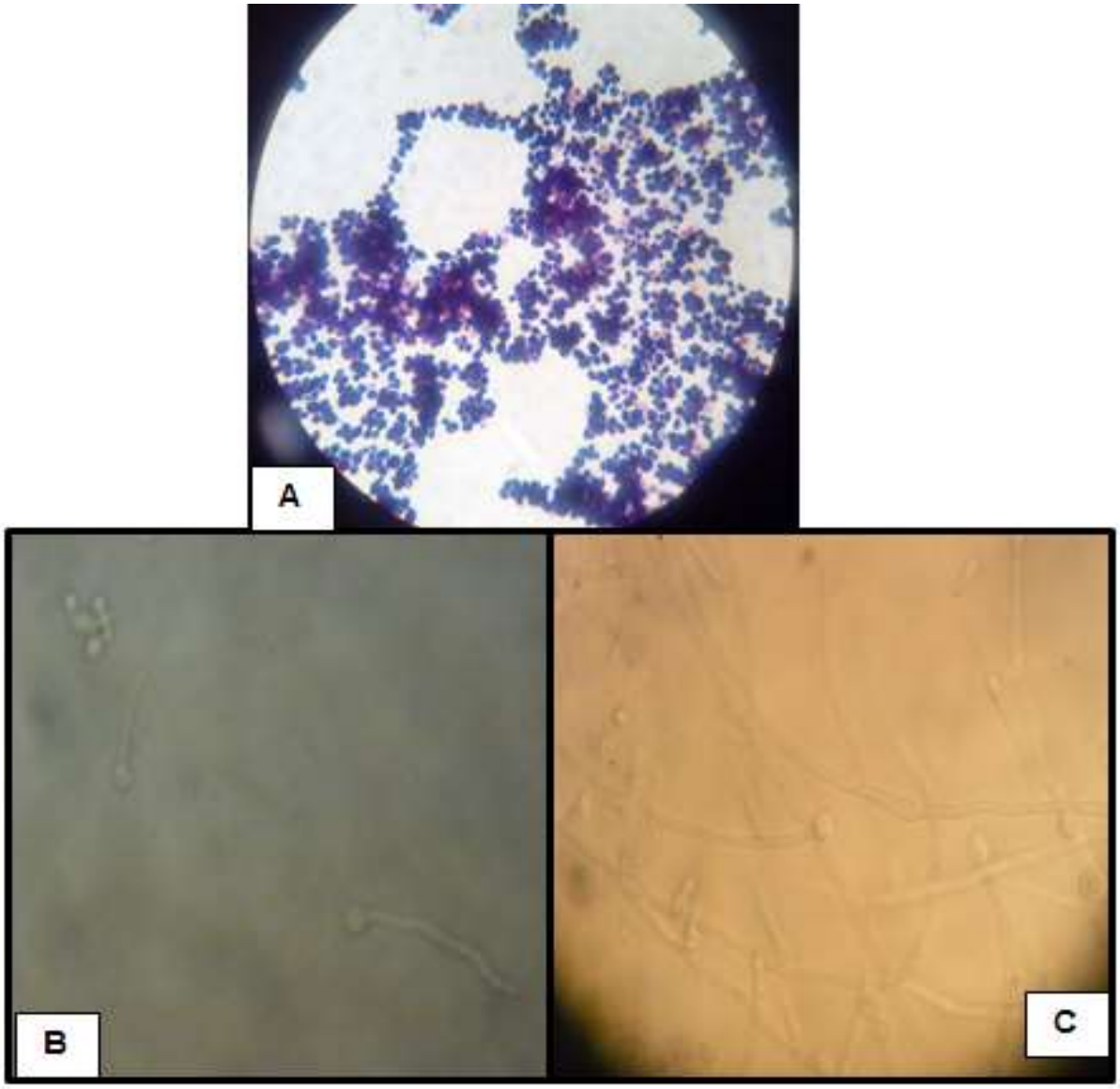


Figura 20.- *Candida albicans.* A) Tinción de Gram (400x); B) Tubo germinal (400x); C) Formación de clamidosporas (400x).

C. tropicalis se encontró solo en el primer cadáver de *Sus scrofa L*. (cerdo), en los estados de descomposición fresco, enfisematoso, colicuativo y esquelético. Con mayor porcentaje de permanencia en el lomo (71.4%).

Tanto *C. albicans* como *C. tropicalis,* presentaron reacción positiva a glucosa, sacarosa, maltosa y galactosa y reaccionando negativamente frente a lactosa y rafinosa.

Figura 21.- *C. tropicalis.* A) Tinción de Gram (400x); B) Fermentación de carbohidratos.

REINO: Fungi

PHYLUM: Basidiomycota

CLASE: Urediniomycetes

ORDEN: Sporodiales

FAMILIA: Sporidiobolaceae

GÉNERO: *Rhodotorula*

ESPECIE: *Rhodotorula sp*

Las colonias del género *Rhodotorula* presentaron un tamaño limitado, en un tiempo de 4 días el tamaño alcanzado fue de 2 a 3 cm. Sus colonias tienen aspecto cremoso o rugoso, brillante y de superficie lisa, presentando en ocasiones surcos o pliegues. El color característico fue rojo-anaranjado muy intenso que no difunde el medio (Bonifaz, 2012).

Micelio pigmentado con células redondas u ovales, presentan en excepcionales ocasiones pseudohifas (Bonifaz, 2012).

Rhodotorula sp. Se encontró en ambos cadáveres de *Sus scrofa L*. (cerdo), en las fases de descomposición enfisematoso y colicuativo. Con mayor porcentaje de permanecía en el lomo del segundo cerdo (42.9 %) y en el ano del primer cerdo (42.9 %).

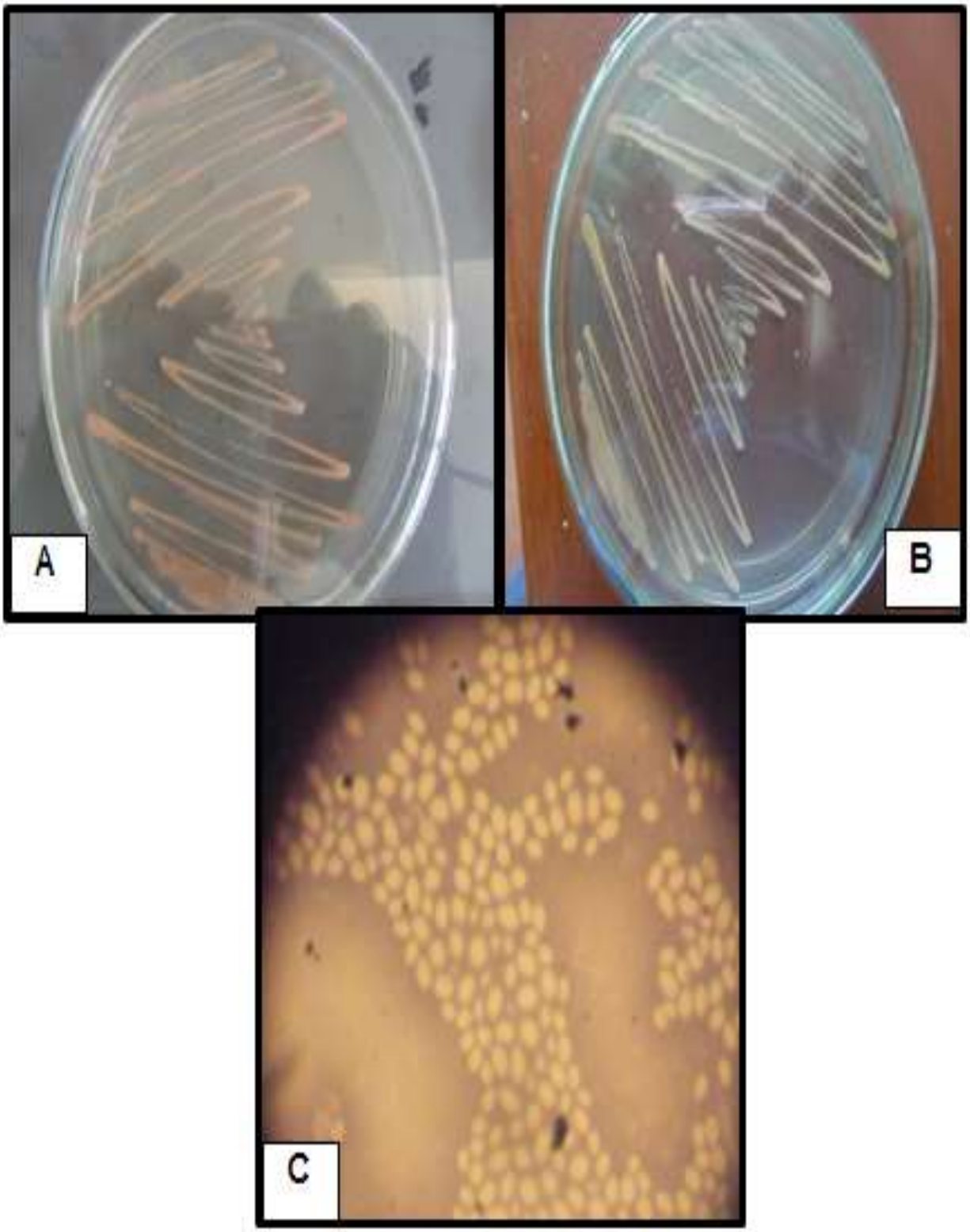


Figura 22.- *Rhodotorula sp.* A) Anverso de la placa de Petri; B) Reverso de la placa de Petri; C) Tinción con nigrosina (400x).

4.2 Relación de hongos identificados durante las fases de descomposición cadavérica de *Sus scrofa L.* (cerdo), expuestos en condiciones de campo, con el establecimiento del intervalo *post mortem.*

Los hongos identificados según lugar de aislamiento y día de muestreo se observan en las tablas siguientes, considerándose como presente en el lugar, el número 1 y como ausente en el lugar, 0. Así en el caso de la **boca** para el primer cerdo (Tabla 2) el mayor porcentaje de presencia lo obtuvieron *Candida albicans y C. tropicalis* con un 57.1%, seguido de *Candida sp, Penicillium sp y Aspergillus sp* con un 42.9%. *Rhodotorula sp, Mucor sp y Fusarium sp* no estuvieron presentes durante el periodo de estudio. Con respecto al segundo cerdo (Tabla 3) el mayor porcentaje de presencia lo obtuvieron *Candida sp, C. albicans, Penicillium sp y Aspergillus sp* con un 42.9%, seguido de *Rhodotorula sp y Mucor sp* con un 28.6%.

Tabla 2.- Ausencia y presencia de hongos en la boca del primer cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo), durante el periodo de estudio.

	Días							
Especies	1	5	10	15	20	30	40	% ocurrencia
Candida sp	0	0	1	1	0	1	0	42.9
C. albicans	0	1	1	0	1	1	0	57.1
C. tropicalis	0	1	0	1	1	1	0	57.1
Rhodotorula sp	0	0	0	0	0	0	0	0
Penicillium sp	0	1	1	1	0	0	0	42.9
Aspergillus sp	0	0	1	1	1	0	0	42.9
Bipolaris sp	0	0	0	0	0	0	1	14.2
Mucor sp	0	0	0	0	0	0	0	0
Fusarium	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 3.- Ausencia y presencia de hongos en la boca del segundo cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo), durante el periodo de estudio.

	Días							
Especies	1	5	10	15	20	30	40	% ocurrencia
Candida sp	0	1	0	1	1	0	0	42.9
C. albicans	0	0	1	1	0	1	0	42.9
Rhodotorula sp	0	0	1	0	1	0	0	28.6
Penicillium sp	0	1	0	1	1	0	0	42.9
Aspergillus sp	0	0	1	1	0	1	0	42.9
Mucor sp	0	0	0	1	0	0	1	28.6
Rhizopus sp.	0	1	0	0	0	0	0	14.2

Para el **lomo** del primer cerdo (Tabla 4) el mayor porcentaje de presencia lo obtuvo *Aspergillus sp* con un 100%, seguido de *Candida sp* con un 85.7%. Con respecto al segundo cerdo (Tabla 5) el mayor porcentaje de presencia lo obtuvieron *Candida sp, Penicillium sp* y *Aspergillus sp* con un 85.7%, seguido de *Mucor sp y Rhodotorula sp* con un 71.4%.

Tabla 4.- Ausencia y presencia de hongos en el lomo del primer cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo), durante el periodo de estudio.

	Días							
Especies	1	5	10	15	20	30	40	% ocurrencia
Candida sp	1	1	1	0	1	1	1	85.7
C. albicans	0	1	1	1	1	0	0	57.1
C. tropicalis	0	0	1	1	1	1	1	71.4
Rhodotorula sp	0	1	0	1	0	0	0	5
Penicillium sp	0	0	1	1	0	1	1	57.1
Aspergillus sp	1	1	1	1	1	1	1	100
Bipolaris sp	0	0	0	1	0	1	1	42.9
Mucor sp	0	1	1	1	1	0	0	57.1
Fusarium	0	1	1	0	0	0	0	28.6

Tabla 5.- Ausencia y presencia de hongos en el lomo del segundo cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo), durante el periodo de estudio.

	Días							
Especies	1	5	10	15	20	30	40	% ocurrencia
Candida sp	0	1	1	1	1	1	1	85.7
C. albicans	0	0	1	1	1	1	0	57.1
Rhodotorula sp	0	0	1	1	1	0	0	42.9
Penicillium sp	0	1	1	1	1	1	1	85.7
Aspergillus sp	0	1	1	1	1	1	1	85.7
Mucor sp	0	0	1	1	1	1	1	71.4
Rhizopus sp.	0	1	1	1	1	1	0	71.4

Para el **ano** del primer cerdo (Tabla 6) el mayor porcentaje de presencia lo obtuvo *Candida sp* con un 100%, seguido de *Candida tropicalis y Aspergillus sp* con un 57.1%. Con respecto al segundo cerdo (Tabla 7) el mayor porcentaje de presencia lo obtuvieron *Candida sp y Aspergillus sp* con un 57.1%, seguido de *C. albicans, Penicillium sp, Mucor sp y Rhizopus sp* con un 28.6%.

Tabla 6.- Ausencia y presencia de hongos en el ano del primer cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo), durante el periodo de estudio.

	Días							
Especies	1	5	10	15	20	30	40	% ocurrencia
Candida sp	1	1	1	1	1	1	1	100
C. albicans	0	0	0	1	0	1	0	28.6
C. tropicalis	1	1	1	1	0	0	0	57.1
Rhodotorula sp	0	1	1	1	0	0	0	42.9
Penicillium sp	0	1	0	1	1	0	0	42.9
Aspergillus sp	0	1	1	1	0	1	0	57.1
Bipolaris sp	0	0	0	1	0	0	0	14.2
Mucor sp	0	0	1	0	1	0	0	28.6
Fusarium	0	1	1	0	0	0	0	28.6

Tabla 7.- Ausencia y presencia de hongos en el ano del segundo cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo), durante el periodo de estudio.

	Días							
Especies	1	5	10	15	20	30	40	% ocurrencia
Candida sp	1	1	1	0	1	0	0	57.1
C. albicans	0	0	0	1	1	0	0	28.6
Rhodotorula sp	0	0	0	1	0	0	0	14.2
Penicillium sp	0	0	1	0	0	1	0	28.6
Aspergillus sp	0	1	1	1	1	0	0	57.1
Mucor sp	0	0	1	0	1	0	0	28.6
Rhizopus sp.	0	0	1	0	1	0	0	28.6

En base a las tablas anteriores se logró determinar que el mayor porcentaje de presencia fúngica para ambos cadáveres de *Sus scrofa L*. (cerdo), fue *Candida sp* con 76.2% para el primer cerdo y 61.9% para el segundo cerdo, *Penicillium sp* con 47.6% para el primer cerdo y 52.4% para el segundo cerdo y por último *Aspergillus sp* con 66.7% para el primer cerdo y 61.9% para el segundo cerdo (Figura 23). Así mismo, se logró establecer que de la parte del cuerpo con mayor porcentaje de presencia fúngica para ambos cadáveres fue el lomo con 52.9% para el primer cerdo y 50% para el segundo cerdo (Figura 24).

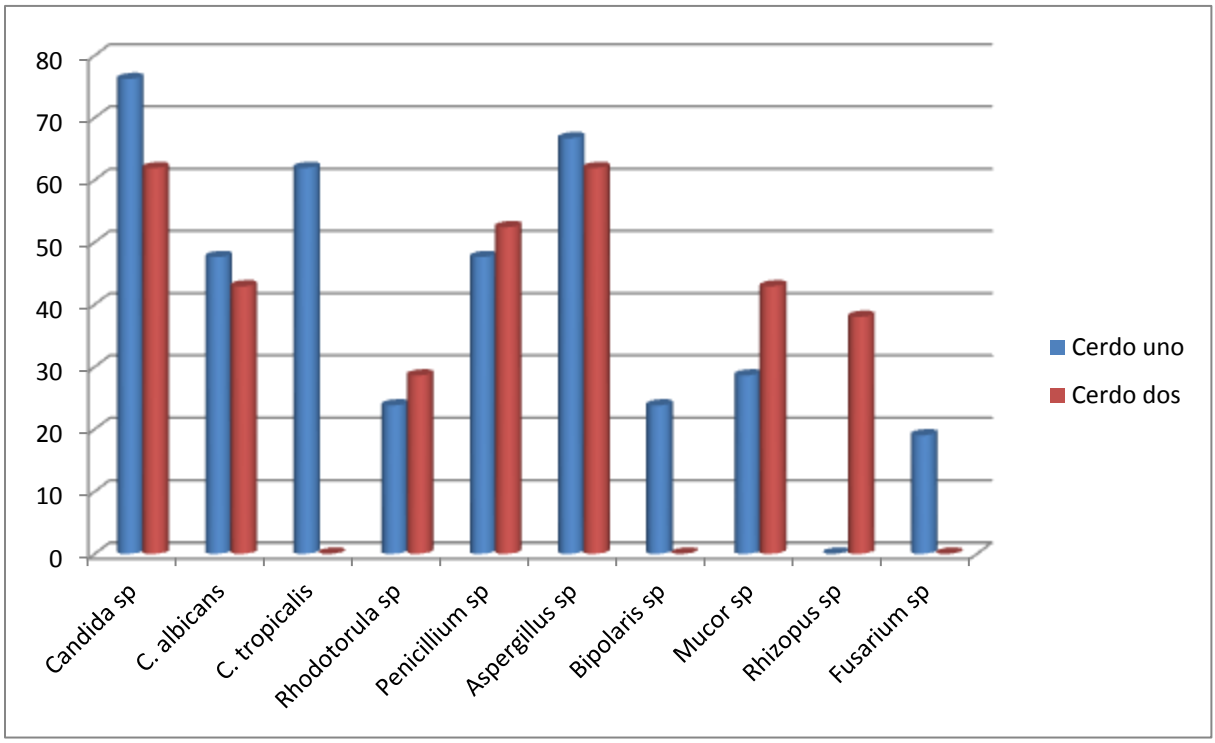


Figura 23.- Presencia de especies fúngicas en *Sus scrofa L.* (cerdo), durante el periodo de estudio.

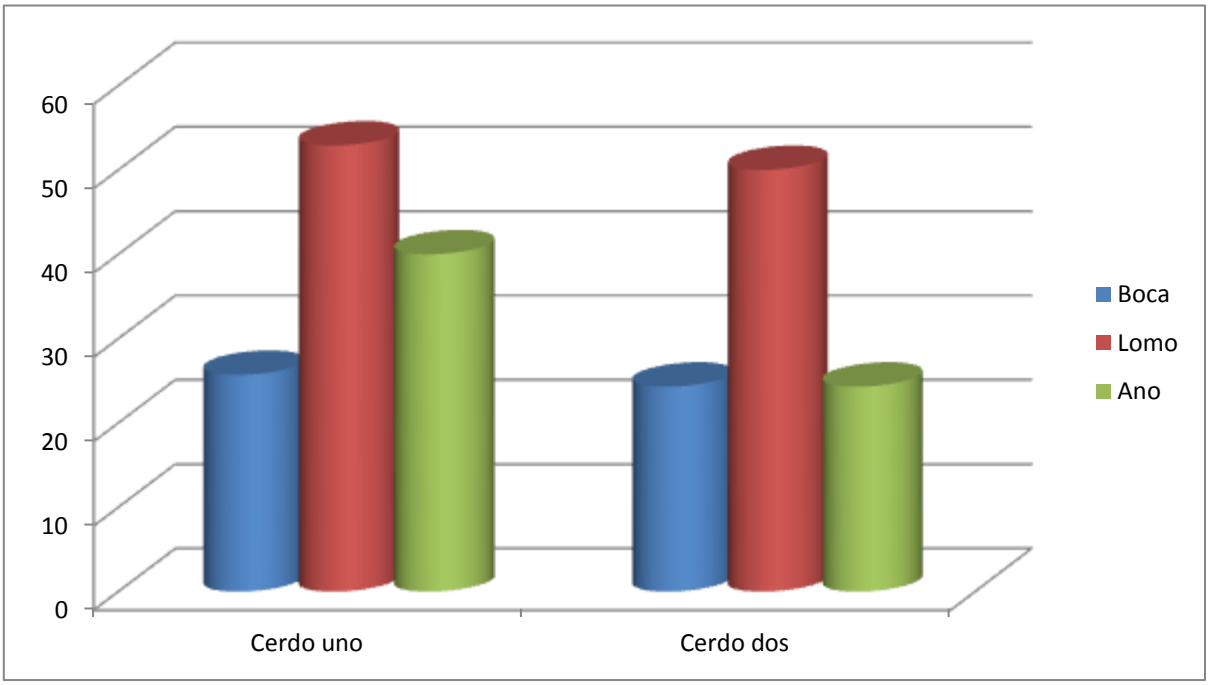


Figura 24.- Presencia de especies fúngicas según lugar de aislamiento en *Sus scrofa L*. (cerdo) durante el periodo de estudio.

El índice de Similaridad de Jaccard (IS_J) evidencia el grado de similitud entre las especies identificadas en cada parte del cadáver (boca, lomo y ano), (Anexo 7). Lográndose registrar para la **boca** del primer cerdo el valor más alto de 0.600, se alcanzó *entre C. tropicalis y C. albicans*. Siendo para el segundo cerdo los valores más altos de 1.000, se alcanzaron entre *Penicillium sp – Candida sp* y *Aspergillus sp – C. albicans*. Para el **lomo** del primer cerdo el valor más alto de 1.000, se alcanzó entre *Mucor sp y C. albicans*. Siendo para el segundo cerdo los valores más altos de 1.000, se alcanzaron entre *Candida sp - Penicillium sp, Candida sp - Aspergillus sp y Penicillium sp - Aspergillus sp*. Para el **ano** del primer cerdo el valor más alto de 0.750, se alcanzó entre *Rhodotorula sp – C. tropicalis y Rhodotorula sp – Aspergillus sp*. En tanto que para el segundo cerdo los valores más altos de 1.000, se alcanzó entre *Rhizopus sp y Mucor sp.*

El Dendrograma de Similaridad entre especies mostró una alta Similaridad para la boca del segundo cerdo (Figura 25), entre las especies *Penicillium sp – Candida sp* y *Aspergillus sp – C. albicans* con valor que da exactamente igual a uno, es decir 100%. Para el lomo del primer cerdo (Figura 26), mostró una Similaridad de 100% entre las especies *Mucor sp y C. albicans*. Para el lomo del segundo cerdo (Figura 27), mostró una Similaridad de100% entre las especies *Candida sp – Penicillium sp, Candida sp - Aspergillus sp y Penicillium sp - Aspergillus sp*. Para el ano del segundo cerdo (Figura 28), mostró una Similaridad de 100% para las especies *Rhizopus sp y Mucor sp.* En cambio todas las demás presentaron valores menores de Similaridad (Anexo 8).

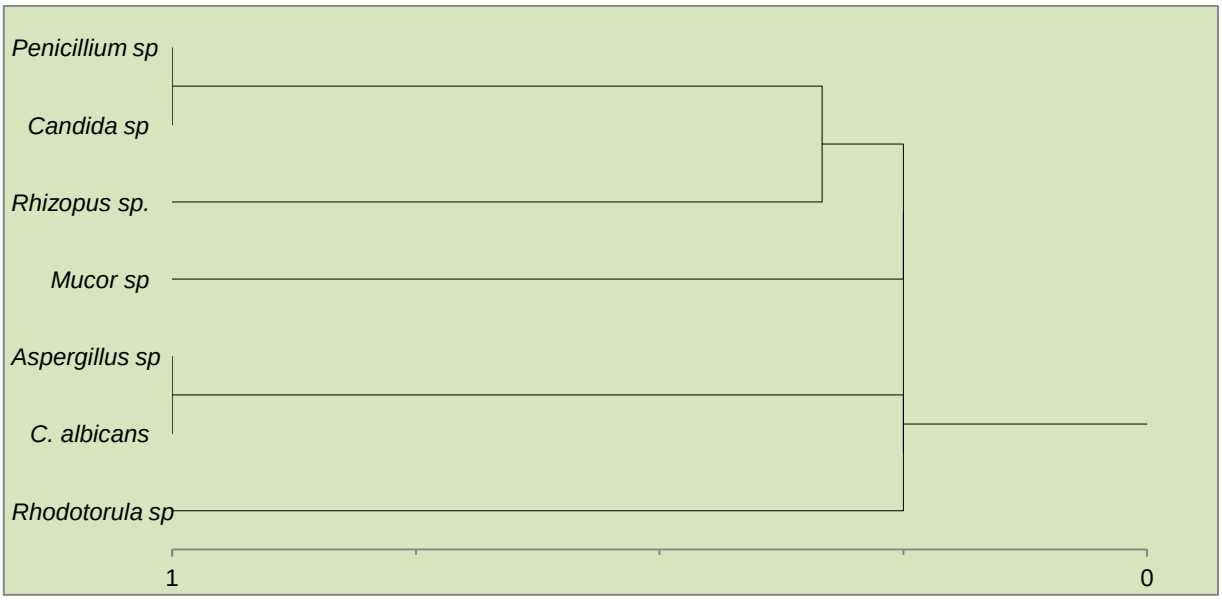


Figura 25.- Dendrograma de Similaridad en base al Índice de Jaccard entre las especies fúngicas asociadas a la boca del segundo cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo), durante el periodo de estudio.

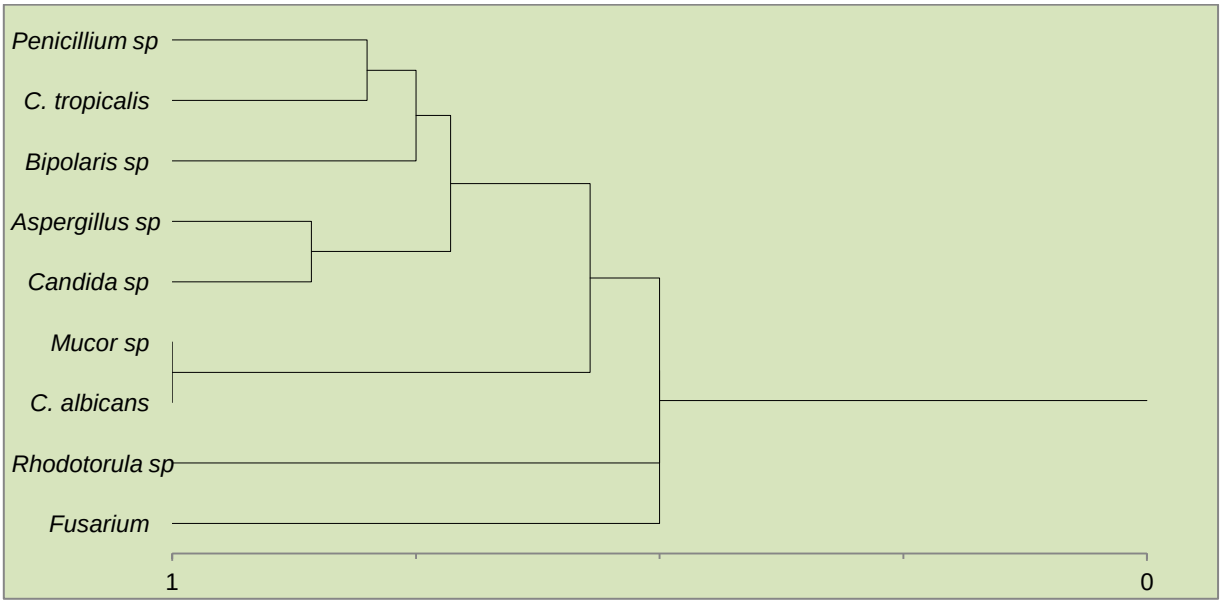


Figura 26.- Dendrograma de Similaridad en base al Índice de Jaccard entre las especies fúngicas asociadas al lomo del primer cadáver de *Sus scrofa L*. (cerdo), durante el periodo de estudio.

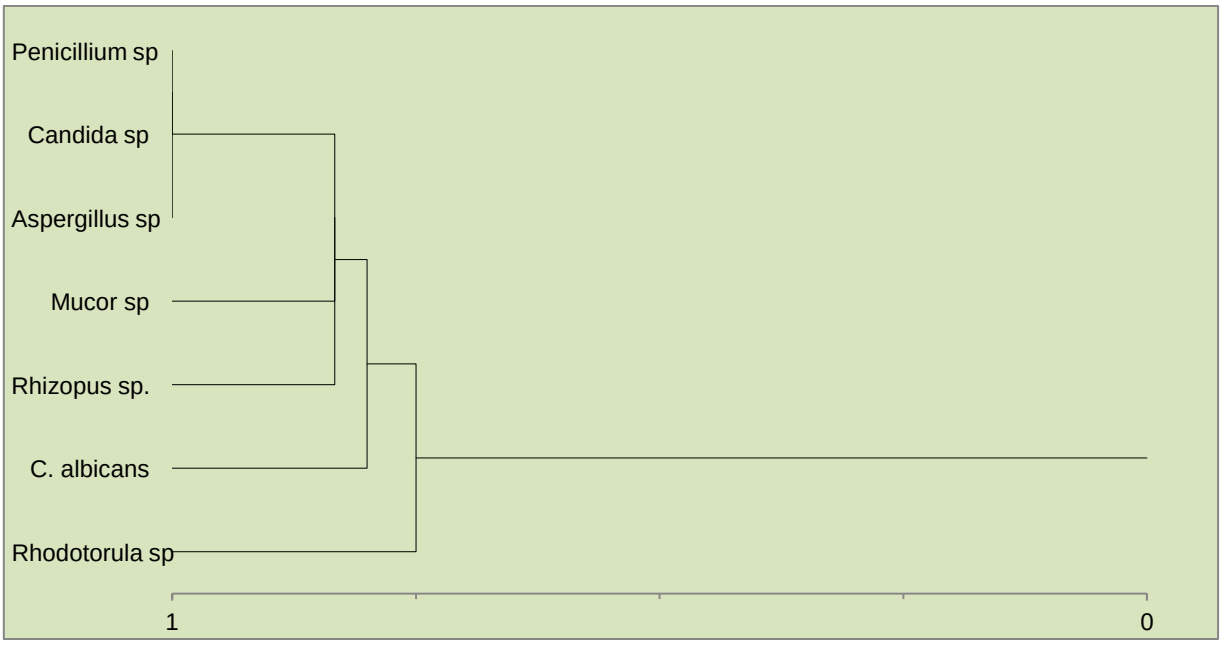


Figura 27.- Dendrograma de Similaridad en base al Índice de Jaccard entre las especies fúngicas asociadas al lomo del segundo cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo), durante el periodo de estudio.

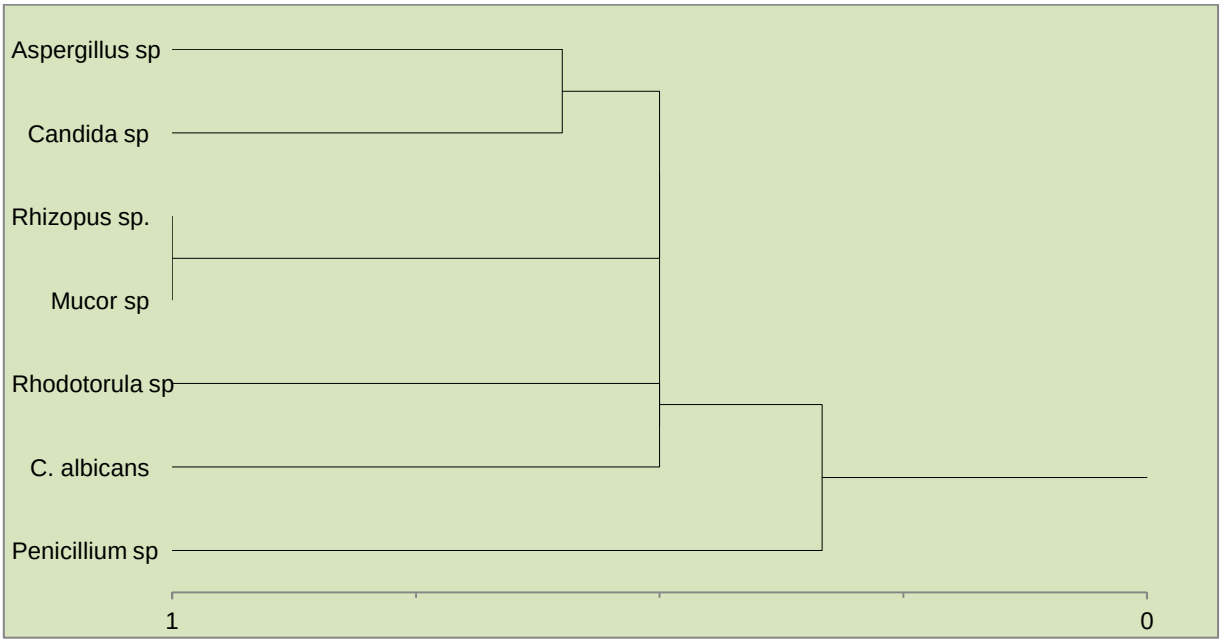


Figura 28.- Dendrograma de Similaridad en base al Índice de Jaccard entre las especies fúngicas asociadas al ano del segundo cadáver de *Sus scrofa L. (*cerdo), durante el periodo de estudio.

4.2.1 Hongos identificados de la descomposición cadavérica de *Sus scrofa L.* (cerdo), y su relación con las fases de descomposición.

Además de identificar los hongos presentes en cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo), se realizó la caracterización de las diferentes fases de la descomposición cadavérica (Figura 29), y su relación existente entre los hongos encontrados (Tabla 8), siendo las siguientes:

a) Fase inicial o fresca:

Comenzó desde el momento de la muerte del animal y finalizó hasta la aparición de la mancha verde en el abdomen y los primeros inicios de la hinchazón. No se percibió olores desagradables, la piel que estaba en contacto con el suelo se volvió rojiza como producto de la lividez, en el segundo cerdo esta lividez no fue muy marcada. La fase inicial para ambos cadáveres duró aproximadamente 12 horas.

b) Fase cromática, meta cromática o de coloración:

Se inició después de las 12 horas del sacrificio, con la aparición de la mancha verde abdominal y tuvo una duración de aproximadamente 1 día. En el primer cerdo la mancha verde se observó en la región cecoapendicular (fosa iliaca) izquierda (Anexo 9), en tanto que en el segundo cerdo esta mancha se evidenció en toda la parte abdominal.

Se observó Rigor mortis en las extremidades y presencia de algunas especies de insectos que merodeaban al cadáver especialmente en la parte anal y bucal.

c) Fase enfisematosa, gaseosa o de hinchazón:

La fase enfisematosa para el primer cerdo se evidenció a partir del 3er día hasta el 8vo día, lo que trajo como consecuencia protrusión anal y expulsión de excremento. En tanto que para el segundo cerdo se superpone al anterior, dado que pasadas las 24 horas ya se observaba hinchazón en el cadáver, con su consecuente rompimiento abdominal a partir del 5to día.

El rompimiento abdominal se dio básicamente por el gran acúmulo de gases como producto de la fermentación anaeróbica de los diversos microorganismos digestivos.

d) Fase colicuativa, licuefacción o putrefacción negra:

Esta fase se caracteriza por la gran pérdida de masa corporal, La piel se va desprendiendo, los tejidos y órganos internos se van descomponiendo como producto de la actividad bacteriana, la piel de la cara se desprendió rápidamente y fue consumida por los insectos y sus larvas. Como consecuencia de la hinchazón las asas intestinales se rompieron, emanando al exterior su contenido, produciendo un olor nauseabundo.

En el primer cerdo se evidencio al 8vo día, en tanto que para el segundo cerdo tuvo lugar al 5to día. Teniendo una duración de aproximadamente 22 días.

e) Fase Reductiva o de Esqueletización:

Las partes blandas con el tiempo fueron desapareciendo, quedando solo algunos ligamentos y cartílagos que sostenían los huesos y articulaciones. En el primer cerdo esta fase se evidenció aproximadamente al día 35, en donde solo se veía algunos ligamentos y tejidos fibrosos disecados. Los huesos se separaron de sus articulaciones. En el segundo cerdo esta fase tuvo su inicio a partir del día 28 aproximadamente, en donde solo se visualizaba la piel muy seca y dura de color negruzco con presencia de pelos. Ya no se observó dípteros merodeando los cadáveres, pero si existían algunas larvas y coleópteros en el interior de los cuerpos.

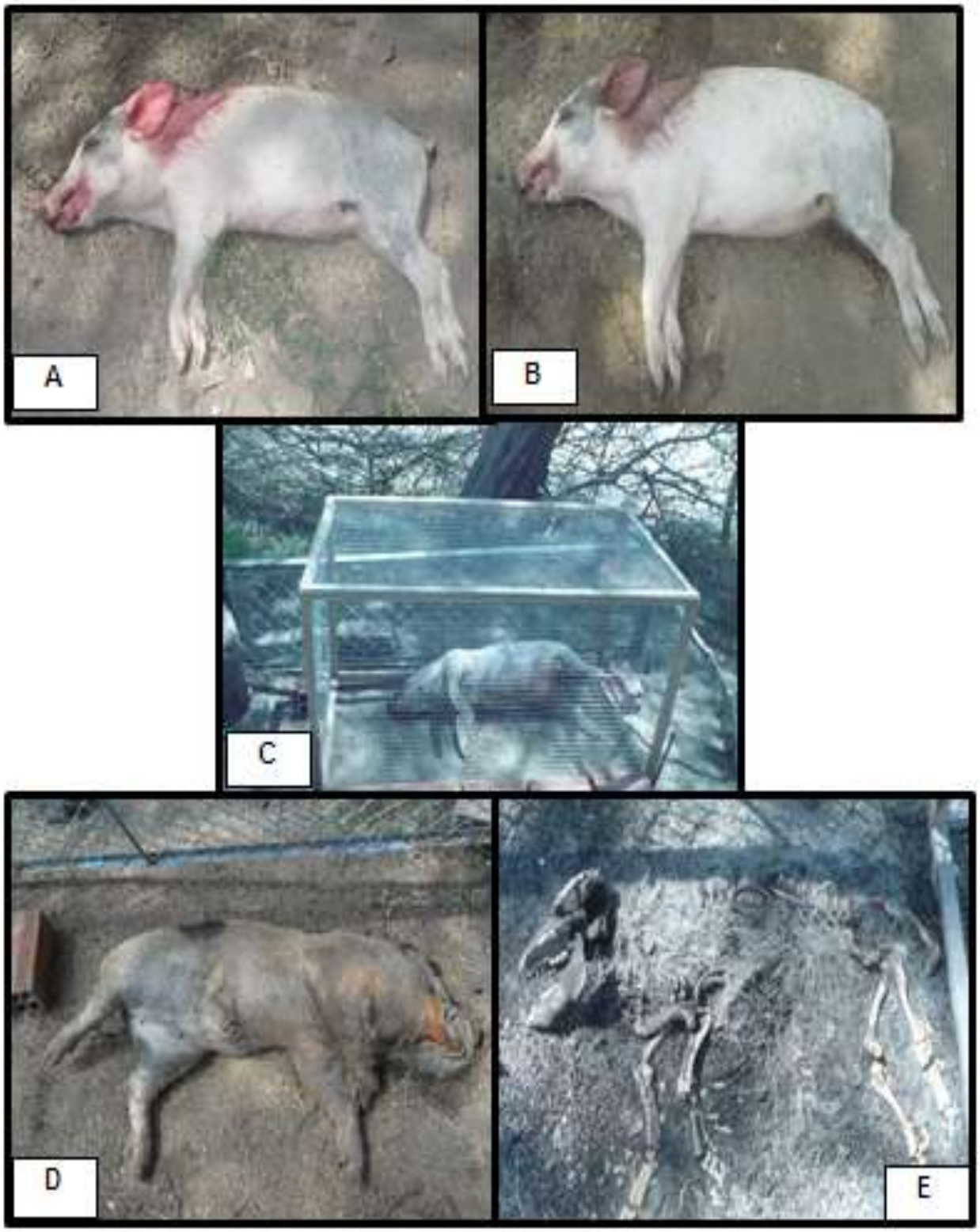


Figura 29.- Fases de descomposición cadavérica: A) Fase fresca; B) Fase cromática; C) Fase enfisematosa; D) Fase colicuativa; E) Fase de esqueletización.

La sucesión fúngica en las diferentes fases de descomposición y la relación existente entre las especies y el tiempo aproximado de duración de cada fase (Tabla 8), han permitido establecer que la fase de descomposición más prolongada ha sido el Colicuativo. Es importante señalar que en la fase de descomposición cromática no se realizó muestreo, esto por los días pre establecidos, siendo la fase cromática el segundo día de descomposición.

Tabla 8.- Sucesión de especies fúngicas en relación a las fases de descomposición cadavérica de *Sus scrofa L*. (cerdo), expuestos en condiciones de campo.

GENERO/ESPECIE	FASE DE DESCOMPOSICION	TIEMPO DE LA FASE
Aspergillus sp *Candida sp* *C. tropicalis*	FRESCO	12 horas
No muestreado	CROMÁTICO	1 día
Candida sp *C. tropicalis* *C. albicans* *Rhodotorula sp* *Penicillium sp* *Aspergillus sp* *Mucor sp* *Rhizopus sp* *Fusarium sp*	ENFISEMATOSO	6 días
Candida sp *C. tropicalis* *C. albicans* *Rhodotorula sp* *Penicillium sp* *Aspergillus sp* *Bipolaris sp* *Mucor sp* *Rhizopus sp* *Fusarium sp*	COLICUATIVO	22 días
Candida sp *C. tropicalis* *Penicillium sp* *Aspergillus sp* *Mucor sp* *Bipolaris sp*	ESQUELETIZACION	10 días

Establecida la sucesión fúngica, se procedió a la elaboración de un registro de ausencia y presencia entre las especies identificadas en las diferentes fases de la descomposición cadavérica (Tabla 9). Para luego en base a estos datos obtener el índice de Similaridad de Jaccard (IS_J) (Tabla 10), donde se apreció que el índice más alto fue de 0.900 entre las fases enfisematoso y colicuativo; mientras que el índice más bajo fue de 0.300 y se dio entre las fases fresco y colicuativo. Caso semejante ocurre con el Dendrograma de Similaridad de especies entre las fases de descomposición (Figura 30), donde se observa una alta Similaridad entre las fases enfisematosa y colicuativa, con un valor igual a 0.900 (90%); en cambio, todas las demás fases presentaron menores valores de Similaridad.

Tabla 9.- Ausencia y presencia de hongos en las fases de descomposición cadavérica de *Sus scrofa L.* (cerdo) durante el periodo estudiado.

Especies/Fases	Fresco	Cromático	Enfisematoso	Colicuativo	Esquelético
Candida sp	1	No muestreado	1	1	1
C. albicans	0		1	1	0
C. tropicalis	1		1	1	1
Rhodotorula sp	0		1	1	0
Penicillium sp	0		1	1	1
Aspergillus sp	1		1	1	1
Bipolaris sp	0		0	1	1
Mucor sp	0		1	1	1
Rhizopus sp	0		1	1	0
Fusarium sp	0		1	1	0

Tabla 10.- Índice de Similaridad de Jaccard (IS_J) entre las especies fúngicas asociadas a las fases de descomposición cadavérica de *Sus scrofa L.* (cerdo), durante el periodo de estudio.

Similarity Matrix (Jaccard)

	Fresco	Enfisematoso	Colicuativo	Esquelético
Fresco		0.333	0.300	0.500
Enfisematoso	0.333		0.900	0.500
Colicuativo	0.300	0.900		0.600
Esquelético	0.500	0.500	0.600	

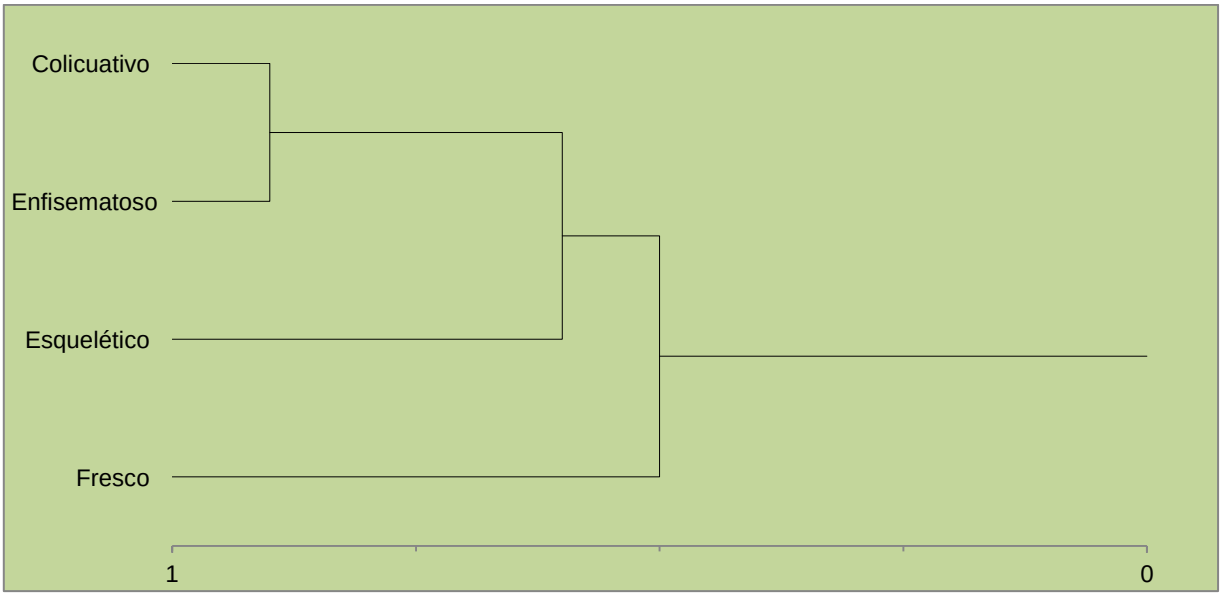


Figura 30.- Dendrograma de Similaridad en base al Índice de Jaccard entre las especies fúngicas asociadas a las fases de descomposición cadavérica de *Sus scrofa L.* (cerdo), durante el periodo de estudio.

Al relacionar los diferentes tipos de hongos identificados con las temperaturas registradas durante los días muestreados la Figura 31 no demuestra seguir una correlación exacta o un patrón constante en relación a la temperatura. No obstante en la figura 32 se puede observar que al aumentar la temperatura, aumenta también la presencia fúngica. No obstante para obtener resultados más exactos, se requiere más investigaciones en distintos lugares del mundo, con diferentes condiciones ambientales.

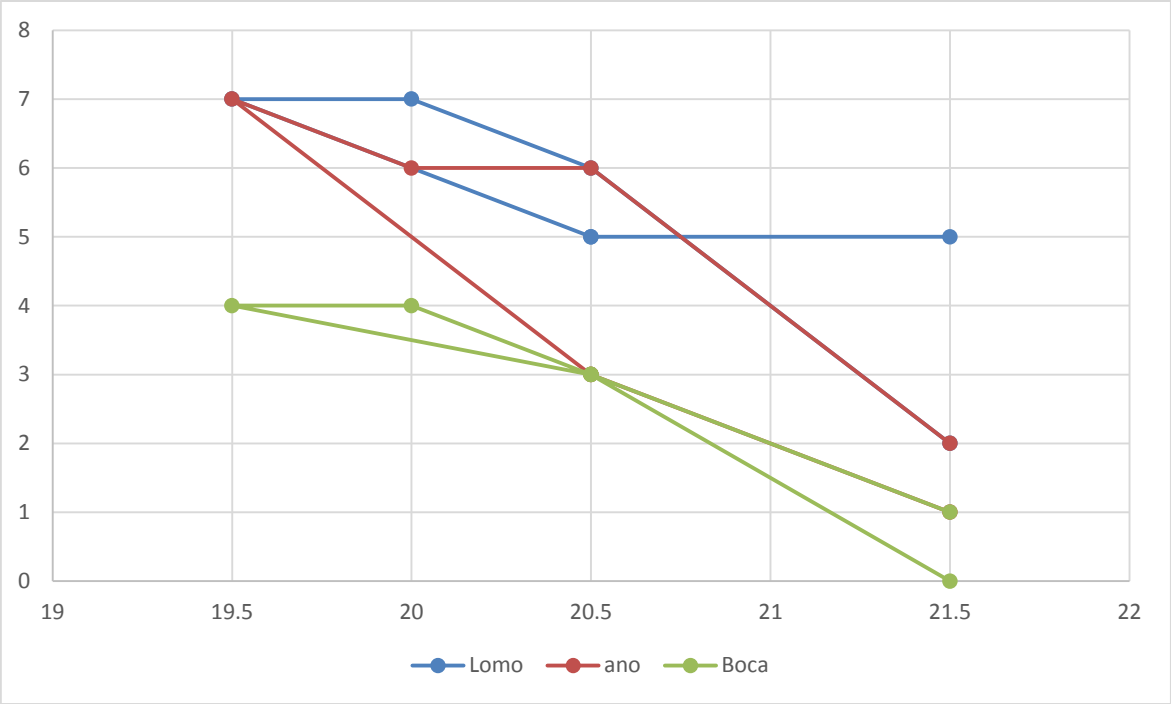


Figura 31.- Temperatura registrada durante la descomposición del primer cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo), durante el periodo de estudio.

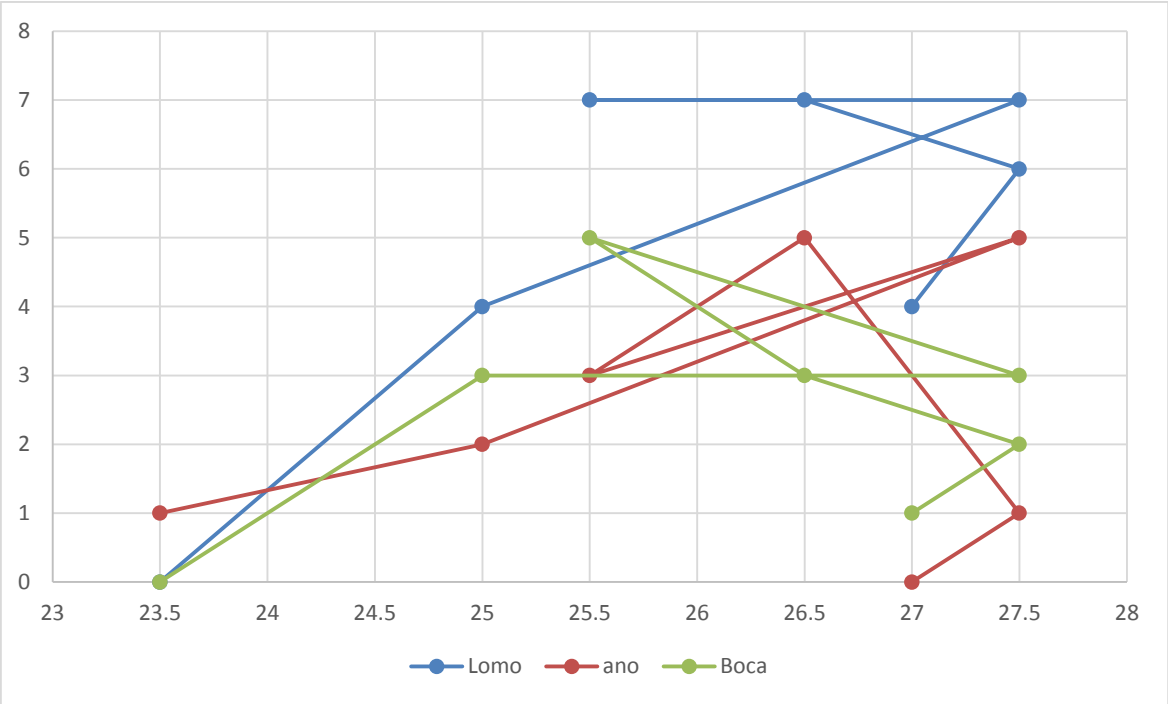


Figura 32.- Temperatura registrada durante la descomposición del segundo cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo), durante el periodo de estudio.

V. DISCUSIÓN

En la presente investigación sobre hongos en cadáveres de *Sus scrofa L.* (cerdo) se logró identificar 10 tipos de hongos, de los cuales cuatro se encuentran registradas por Burkhardt (2014), *Candida tropicalis, Rhodotorula sp, Aspergillus sp y Mucor sp*. En lo que respecta al trabajo realizado por Sousa *et al*. (2013), solo registró 2 especies para hongos filamentosos, *Penicillium sp y Aspergillus flavus*, y 3 especies de levaduras, *Candida sp, C. albicans y Trichosporon.* Siendo *Penicillium sp, Candida sp y C. albicans* mencionadas también en esta investigación.

Debido a la escasa literatura existente sobre hongos en cadáveres humanos, resulta un tanto difícil su comparación y análisis, no obstante existen estudios en donde se ha evaluado la presencia de estos hongos. Van de Voorde y Van Dijck (1982), en base al estudio de los hongos *Fusarium y Penicillium* entre otros, encontrados en la superficie corporal de un cadáver femenino, se logró estimar que el tiempo de muerte se produjo 18 días antes de que el cadáver sea encontrado. En Japón Ishii *et al*. (2006) identificó especies del género *Aspergillus* e Hitosugi *et al*. (2006), logró identificar tanto *Aspergillus* como *Penicillium*, siendo este último caso más relevante, dado las circunstancias en las que se encontraba el cadáver y por qué mediante el estudio de los hongos se logró establecer el tiempo de muerte.

En otro estudio realizado por Sidrim *et al*. (2009), en varios cadáveres humanos con diferentes estados de descomposición, lograron identificar especies fúngicas, siendo las más abundantes: *Aspergillus*, *Penicillium y Candida.* Coincidiendo con la presente investigación, en donde dichas especies fúngicas también son las más abundantes.

Los hongos filamentosos identificados en este trabajo puede ser considerados cosmopolitas, debido a que pululan en el aire y de esta manera pueden distribuirse a diferentes lugares y colonizar diversos sustratos como cadáveres en descomposición. Además, otra causa que facilita el hallazgo de estos hongos en

cadáveres en descomposición, es que algunos de ellos son encontrados en materia orgánica descompuesta como por ejemplo el género *Mucor* (Sidrim *et al*. 2009). Tal es así que Marchiafava, 1974, citado por Illana, (2013) le considera como el hongo responsable de la resorción ósea de huesos enterrados.

Se logró identificar al género Bipolaris en las fases de descomposición colicuativo y esquelético. Resaltando que este hongo no es nombrado por otros autores en investigaciones semejantes. No obstante es sabido que es un hongo ubicuo en el suelo y materia vegetal, tiene distribución cosmopolita. En el ser humano puede colonizar heridas, piel o mucosas, se le ha descrito como agente causal de sinusitis alérgicas, infección ocular, peritonitis en enfermos con diálisis peritoneal ambulatoria, meningoencefalitis, endocarditis valvular y osteomielitis (Del Palacio y Cuétara, 2008).

Hongos del género *Fusarium* son considerados oportunistas, causando muchas infecciones al ser humano como la queratitis, onicomicosis, etc. Es ubicuo, creciendo en un gran número de sustratos y transportados fácilmente por el aire y la lluvia. Monzón y Rodríguez, (s.f), reportan que el aire logra diseminar sus esporas hasta una distancia de 400 Km. Razón por la cual resulta fácil su presencia en la superficie corporal de cadáver de cerdo expuesto en condiciones de campo.

En lo que respecta a las levaduras el género *Candida* comprende más de 200 especies, existiendo en la naturaleza, en los vegetales, en el agua, en el suelo y en todas partes en dónde el sustrato sea propicio. Además la mayoría viven como comensales en el tracto gastrointestinal, aparato reproductor y/o en la piel (Ciudad, 2007).

El género *Rhodotorula* es considerado una levadura ambiental común que se encuentra en el aire, suelo, lagos, agua de los océanos y fitoplancton. Colonizan las plantas, seres humanos y a los animales (Liu, 2011), como se cita en Burkhardt, (2014).

Respecto a las fases de descomposición cadavérica las que presentaron mayor Similaridad fueron el enfisematoso y el colicuativo coincidiendo con Sidrim *et al*. (2009), quien manifiesta que la fase gaseosa (enfisematosa) presenta mayor cantidad de sustrato, por lo que la elevada presencia fúngica resulta justificable en esta fase debido al material orgánico disponible

En lo concerniente a los tres sitios de colecta, el lomo es el que ha presentado mayor número de especies fúngicas seguido del ano y por el último la boca. Coincidiendo con lo reportado por Burkhardt (2014), quien manifiesta que al ser el lomo(piel), un área relativamente extensa, resulta lógico que exista mayor presencia fúngica, en tanto que para la boca y tal como se ha manifestado en esta investigación, se descompone rápidamente por lo que la cantidad fúngica existente es relativamente poca. La zona del ano es abundante en material orgánico y su tiempo de descomposición no es rápido por lo que resulta también razonable la mayor presencia de hongos.

Cada fase de la descomposición cadavérica presentó características propias, en ese sentido, es importante señalar que dichas fases fueron difíciles de establecer de manera exacta. Al respecto autores como Gunn (2006) señalan que muchas veces estas fases se funden entre si tornándose difícil su individualización. Las 5 fases identificadas en la presente investigación, sigue la clasificación propuesta por Rodríguez y Bass (1983), con la variante de la fase inicial o fresca, ya que considero que aunque no existe aparentemente algún cambio visual en el cadáver, los microorganismos descomponedores ya están actuando en su interior a pocas horas de producido el deceso.

El tiempo final de descomposición para este estudio trabajando con un cerdo de 13 Kg fue pre establecido hasta el día 40, llegando hasta la fase esquelética, por lo que es posible su comparación con otras investigaciones. Burkhardt (2014), en su estudio realizado con un cerdo de 20 Kg, registró una descomposición de 57 días. En este caso, la diferencia de 7 Kg de peso entre los especímenes estudiados pudo influir en el lento proceso de descomposición y más aún las diferentes condiciones climáticas que envuelven a la ciudad de Lambayeque y

Florianópolis. A nivel nacional Iannacone (2000), realizó una investigación en Ventanilla-Callao, sobre entomofauna forense con un cerdo de 3 648g de peso, reportando un tiempo de descomposición de 87 días. Siendo el espécimen en estudio tan pequeño logro un tiempo de descomposición tan amplio, esto quizás como bien ha señalado el autor, el tiempo final considerado fue hasta que la carcasa entera sea consumida. Gines y Alcántara (2013), reportaron un tiempo de duración de 60 días, trabajando con 3 especímenes de cerdo de 12 Kg de peso en la ciudad de Lambayeque; esta diferencia de 20 días podría deberse básicamente al criterio pre-establecido como tiempo final en esta investigación.

La fase inicial o fresca duro aproximadamente 12 horas, contrario a lo manifestado por Burkhardt (2014) e Infante (2003), quienes establecen una duración de un día (24 horas). Referente a los demás estados de descomposición, lo más resaltante es que para el segundo cerdo estas fases tuvieron ligeros adelantos en comparación con el primer cerdo. Esto quizás por el aumento de la temperatura que por esas fechas se presentaron, corroborando con lo manifestado por Rodríguez y Bass (1983), quien dice que la temperatura es un factor importante en la aceleración de la descomposición.

Los hongos al ser organismos vivos se ven influenciados por las condiciones ambientales, siendo la humedad y la temperatura además de las condiciones de PH y luminosidad las que contribuyen a su dinámica de división y población (Murray *et al*., 1990). No obstante, al analizar los datos de temperatura y la presencia de especies fúngicas para ambos cerdos, no se muestra una correlación exacta entre aumento o disminución de temperatura y aumento o disminución de especies fúngicas. Esto quizás porque además de ser influenciados por las condiciones ambientales, la cantidad de sustrato es un componente importante; dado que no solo compiten entre ellos por el alimento sino que también con la entomofauna existente. Otro factor interesante a tener en cuenta es el criterio dado por el investigador ya que puede considerar como tiempo final la presencia de esqueleto. Siendo este último punto importante, ya que dicho esqueleto puede perdurar mucho más tiempo hasta su pulverización total.

VI. CONCLUSIONES

1. Los hongos presentes en cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo), expuestos en condiciones de campo; estuvo constituido por 6 hongos filamentosos (*Penicillium sp, Aspergillus sp, Bipolaris sp, Mucor sp, Rhizopus sp y Fusarium sp*) y 4 levaduriformes (*Candida sp, C. albicans, C. tropicalis y Rhodotorula sp*).

2. Los hongos que presentaron mayor porcentaje de presencia fueron *Candida sp, Penicillium sp y Aspergillus sp.* Con valores de 76.2%, 47.6% y 66.7% respectivamente para el primer cerdo y valores de 61.9%, 52.4% y 61.9% respectivamente para el segundo cerdo.

3. Se estableció una alta Similaridad de presencia fúngica entre las fases de descomposición enfisematoso y colicuativo, Siendo este último el que presentó una mayor duración (22 días).

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar la toma de muestras en días consecutivos y en diferentes partes del cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo) con la finalidad de poder encontrar un mayor número de especies fúngicas.

2. Investigar la presencia de hongos en muestras cadavéricas en las diferentes estaciones del año y en diversos lugares del Perú.

3. Realizar investigaciones usando métodos moleculares para la identificación de hongos en muestras cadavéricas.

4. Los resultados presentados resultan un importante aporte, pero se requiere más investigaciones para poder contar con base de datos de comparación de la sucesión micológica que puedan servir de referencia y facilitar investigaciones futuras en el campo de la micología forense.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alves, M., Lucena, M.J., Da Rocha, E.R., Cardoso, E. y Severo, B. (2012). Aplicações de fungos en estudos forenses no processo de degradação cadavérica. Saúde & Amb. Rev., Duque de Caxias, 7(1), 10-18.

Arenas, R. (1993). Micología Médica Ilustrada. Clínica, laboratorio y terapéutica. Primera Edición. McGraw Hill. México D.F. p. 397.

Bornemissza, G.F. (1957). An analysis of arthropod succession in carrion and the effect of its decomposition on the soil fauna. Aust J Zool; 5: 1-12.

Bonifaz, A. (2012). MICOLOGÍA MÉDICA BÁSICA, Capitulo 5 Hongos Contaminantes, McGrawHill: México, DF. pag 62 – 63, 600p.

Bravo, L. & Tranchida, M. C. (2014). Micología Forense: Nueva línea de investigación en la Argentina. Revista Skopein, III, pp. 42 - 45. Recuperado el 20 de agosto del 2016 de: www.skopein.org

Burkhardt, T. (2014). Avaliação da sucessão fúngica em carcaça de suíno (*Sus Scrofa* L) para a determinação de intervalo post mortem. p.57 (Trabalho para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Byrd, J. H. y Castner, J. L (2010). Forensic Entomology: The utility of arthropods in legal investigations. 2th. Florida: CRC Press.

Calabuig, J. y Villanueva, C. (2004). Medicina Legal y Toxicología. 6ta edición. Barcelona, España.

Campobasso, C. P., Di Vella, G., Introna, F. (2001). Factors affecting decomposition and Diptera colonization. Forensic Science International. v. 120, p. 18–27.

Cardozo, C.A., Mrad, A., Martínez, C., Rodríguez, E. y Lolas, F. (2007). El animal como sujeto experimental. Aspectos técnicos y éticos. (CIEB), Universidad De Chile. p, 228.

Carter, D.O. y Tibbett, M. (2003). Taphonomic mycota: fungi with forensic potential. J. Forensic Sci. Soc., London, 49(1), 168-171

Catts, E.P. y Goff, M. L. (1992). Forensic entomology in criminal investigations. Annual Review of Entomology. 37: 253-272.

Centeno, N.D. (2002). Experimentos de campo sobre sucesión de Fauna cadavérica. En: Actas y Trabajos del V Congreso Argentino de Entomología, Buenos Aires. pp: 67-69.

Centro de investigation. Hospital general universitario de Valencia, (1990). La eutanasia en los animales de laboratorio.

Ciudad, A. (2007). Infecciones vaginales por Cándida: Diagnostico y Tratamiento.Rev Per Ginecol Obstret. 53: 159-166.

Del Palacio, A y Cuétara, M.S. (2008). Infecciones por hongos invasores en imagenes. Recuperado el 9 de marzo del 2017 de http://seq.es/seq/pdf/libros/imageneshongos.pdf.

Divo, A. (1990). Microbiología Médica. Editorial Interamericana. Mexico D.F. pg. 446.

Early, M. y Goff, L. (1986). Arthropod succession patterns in exposed carrion on the island of O'Ahu, Hawaiian Islands, USA. Journal of Medical Entomology 23 (5): 520-531.

Gabilondo, E. (2003). Lesiones por armas de fuego, problemas Médico – Forense. Universidad del país vasco. 4: 37. Recuperado de http://www.sc.ehu.es/scrwwwsr/kirurgia/Kirurgia2003e/Armasfuego.htm.

Gines, E. y Alcántara, M. (2013). Entomofauna de interés Forense Asociada a Restos Cadavéricos de Cerdos *(Sus scrofa L.),* Expuestos en Condiciones de Campo y su Utilidad en la Estimación del Intervalo *Postmortem.* Lambayeque – Perú, Noviembre 2012 – Abril 2013. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional “Pedro Ruiz Gallo” de Lambayeque, Perú.

Goode, W.J. Y Hatt, P.K. (1986). Métodos de Investigación Social. Decima cuarta edic. Ed. Trilla, México. 236 p.

Gunn, A. (2006). Essential Forensic Biology. Chichester: John Wiley & Sons,

Hawksworth, D.L. y Wiltshire, P.E. (2011). Forensic mycology: the use of fungi in criminal investigations. *Forensic Sci. Intern.* 206: 1-11

Hitosugi, M., Ishii, K., Yaguchi, T., Chigusa, Y., Kurosu, A., Kido, M., Nagai, T. y Tokudome S. (2006). Fungi can be a useful forensic tool. Legal Medicine. 8: 240-242.

Humane Slaughter Association (HSA). (2006). Insensibilización de Ganado con Pistola Neumática de Perno Cautivo. 4ta edición. Pp. 3-13.

Iannacone, J. (2000). Antropofauna de importancia forense asociada a un cadáver de cerdo en Ventanilla - Callao, Perú. Rev. Brasileña de zoología 20(1): 85-90.

Illana, C (2013), Micología Forense. Bol. Soc. Micol. Madrid 37:229-244 Recuperado el 13 de julio del 2016 de: http://dspace.uah.es/dspace/bitstream/handle/10017/19776/21.Micolog%C3%ADa%20forense.pdf?sequence=1

Infante, C. (2003). Entomofauna asociada a restos cadavéricos de cerdo y su utilidad en la Cronotanatognosis en la provincia de Ica. Universidad Nacional San Luis Gonzales de Ica, Perú.

Ishii, K., Hitosugi, M., Kido, M., Yaguchi, T., Nishimura, K., Hosoya, T. y Tokudome, S. (2006). Analysis of fungi detected in human cadavers. Legal Medicine. 8: 188-190.

Koneman, E. (1987). Micología, Tercera edición. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 70-73.

Krenzer, U. (2006), Compendio de métodos antropológico forenses para la reconstrucción del perfil osteo-biológico. Tomo VII Cambios posmortem. p.36. Recuperado el 3 de agosto del 2016 de: https://www.ziviler-friedensdienst.org/sites/ziviler-friedensdienst.org/files/anhang/publikation/zfd-compendio-de-metodos-antropologico-forenses-para-la-reconstruccion-del-perfil-osteo-biologico_5.pdf

Luy, J. y Ramírez, M. (1997). Cuerpo y mente ante la muerte violenta. En: El cuerpo humano y su tratamiento mortuorio (Eds.) Malvido E., Gregory-Pereyra y Tiesler V. Instituto Nacional de Antropología e Historia/Centro Francés de Estudios Mexicanos y Centroamericanos. Pp.67-76.

Magaña, C. (2001). La entomología forense y su aplicación a la medicina legal. Data de muerte. Bol Soc. Entomol Aragonesa. 28: 49-57.

Mego, G. (2016a).Micología Forense. Nueva Alternativa para la Determinación del Intervalo Post Mortem. Revista Skopein, XIII, pp. 70 - 75. Recuperado el 19 de setiembre del 2016 de: www.skopein.org.

Mego, G. (2016b).Descomposición Cadavérica y Determinación del Intervalo Post-Mortem. Revista Skopein, XII, pp. 55 - 63. Recuperado el 12 de julio del 2016 de: www.skopein.org.

Ministerio de salud, (1997). Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de micosis oportunistas y profundas. Lima-Perú. P 60.

Monzón, A. y Rodríguez, J.L. (s.f.). Infecciones causadas por el género *Fusarium.* Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda. Recuperado el 14 de marzo del 2017 de: https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/fusarium.pdf

Molina, H (2009). Conformación del laboratorio de entomología forense en la procuraduría general de justicia del distrito federal (PJGDF). p. 62 (trabajo para

obtener el título de biólogo, universidad nacional autónoma de México). Recuperado el 7 de agosto del 2016 de: http://repositorio.fciencias.unam.mx:8080/jspui/bitstream/11154/139719/1/PDFunificado.pdf

Moreira, R. E. (2008). Micologia Forense: A dinâmica da microbiota fúngica na investigação do período *post mortem.* p. 133. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

Murray, P.R., Drew, W.L., Kobayashi, G.S. y Thompson, J.H. (1990). Medical Microbiology. St Louis, MO: The C. V. Mosby Company.

Payne, J.A. (1965). A summer carrion study of the baby pig Sus scrofa Linnaeus. Ecology 46:592-602.

Peceros, F. (2011). Sucesión entomológica asociada a procesos de descomposición de carcasas de cerdo (Sus scrofa L., 1758) en la provincia de Huarochirí, Lima. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Pitt, J. I., y Hocking, A. D. (2009). Fungi and Food Spoilage. 3th. New York: Springer Science.

Rodríguez, W.C. y Bass, W.M. (1983). Insect activity and its relationship to decay rates of human cadavers in East Tennessee. Journal Forensic Science 28: 423-432.

Santos, A. (2003-2004). Tanatología Forense. Medicina Legal. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. p.49. Recuperado el 23 de junio del 2016 de: http://medicina.med.up.pt/legal/TanatologiaF.pdf

Schoenly, K. y Reid, W. (1987). Dynamics of heterotrophic succession in carrion arthropod assemblages: discrete series or a continuum of change? Oecologia (Berlin), 73, 192-202. Doi: 10.1007/BF00377507

Schoenly, K. *et. al.* (2006).Using Pig Carcasses as Model Corpses. The American BiologyTeacher. 68: 402-409.

Sidrim, J. *et al*. (2009). Fungal microbiota dynamics as a postmortem investigation tool: focus on Aspergillus, Penicillium and Candida species. Journal of Applied Microbiology (108) p. 1751–1756. DOI:10.1111/j.1365-2672.2009.04573.x

Silva, M. y Minter, D. W. (1995). Fungi from Brazil recorded by Batista and co-workers. Mycol. Papers, n.169, p.1-585.

Sousa, C., De Mattos, F., Carlos, L., Bentes, J. & Sampaio, C. (2013). Análise micológica durante a decomposição cadavérica. Rev. Ciênc. Méd. Biol, Salvador, 12(1), 28-32.

Smith, K. (1986). A manual of forensic entomology. The trustees of the British Museum(Natural history) and Cornell University Press. First Published. New York. 205p.

Tranchida, M.C., Centeno, N.D., y Cabello, M.N. (2014). Soil Fungi: Their Potential Use as a Forensic. Journal of Forensic Sciences, 59(3). DOI: 10.1111/1556-4029.12391

Van de Voorde, H. y Van Dijck, P.J. (1982). Determination of the time of death by fungal growth. *Z. Rechtsmed* 89: 75-80. Recuperado el 7 de julio del 2016 de: http://link.springer.com/article/10.1007/BF02092372

Vásquez, L.J. (2007). Pautas básicas para el manejo de animales de experimentación en investigación biomédica. Departamento de Morfología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Cauca.

IX. ANEXOS

ANEXO 1.

REGISTRO DE TEMPERATURA Y HUMEDAD RELATIVA

DATOS METEOROLOGICOS								
DIAS DE MUESTREO		TEMPERATURA °C			HUMEDAD %			
Primer cerdo		Max.	Min.	x̄	7 am	13 pm	19 pm	x̄
1	19/10/2016	24.0	18.0	21.0	88	50	83	73.7
5	23/10/2016	24.0	17.0	20.5	83	48	70	67
10	28/10/2016	24.0	16.0	20.0	89	49	74	70.7
15	2/11/2016	24.0	15.0	19.5	90	49	73	70.7
20	7/11/2016	25.0	16.0	20.5	78	48	78	68
30	17/11/2016	24.0	17.0	20.5	85	52	75	70.7
40	27/11/2016	25.0	18.0	21.5	80	48	85	71

DATOS METEOROLOGICOS								
DIAS DE MUESTREO		TEMPERATURA °C			HUMEDAD %			
Segundo cerdo		Max.	Min.	x̄	7 am	13 pm	19 pm	x̄
1	12/1/2017	28.0	19.0	23.5	88	52	62	67.3
5	16/1/2017	30.0	20.0	25.0	81	45	75	67
10	21/1/2017	30.0	22.0	27.5	90	55	83	76
15	26/1/2017	29.0	22.0	25.5	84	48	65	65.7
20	31/1/2017	30.0	23.0	26.5	79	53	76	69.3
30	10/2/2017	31.0	24.0	27.5	77	51	62	63.3
40	20/2/2017	31.0	23.0	27.0	79	40	70	63

FUENTE: Estación Meteorológica de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo-Lambayeque.

ANEXO 2.

MEDIOS DE CULTIVO

a) **Agar Sabouraud con adición de cloranfenicol.**

Composición	g/ml
Peptona bacteriológica	10 g
Dextrosa	20 g
Agar bacteriológico	20 g
Solución de cloranfenicol	10 ml
Agua destilada q. s. p	1000 ml

Se disuelve 0.05 g de cloranfenicol en 10 ml de alcohol etílico. Se pesa el resto de componentes y se disuelve en agua destilada. Luego se adiciona la solución de cloranfenicol. Llevar a autoclavar a 121 °C por un lapso de 15 min.

b) **Agar papa dextrosa (PDA) con adición de cloranfenicol.**

Composición	g/ml
Infusión de papas	500 ml
Dextrosa	10 g
Agar bacteriológico	15 g
Agua destilada q. s. p	1000 ml

Se disuelve 0.05 g de cloranfenicol en 10 ml de alcohol etílico. Se hierve 250 g de papa previamente peladas y picadas en 500 ml de agua destilada por el lapso de 20 min. Luego se filtra a través de una gasa en un vaso de precipitación, restituir el volumen inicial de agua (500 ml). Aumentar los 500ml restantes para el litro deseado, luego adicionar la dextrosa, el agar bacteriológico y finalmente la solución de cloranfenicol. Se lleva a autoclavar el medio por 15 min a 121 °C.

c) Agar harina de maíz

Composición	
Harina de maíz	20 g
Agar	10 g
Tween 80	5ml
Agua destilada	500 ml

Procedimiento: se disuelve la harina de maíz en el agua destilada, se deja reposar a temperatura ambiente por un tiempo de 15min, luego se filtra a través de papel filtro y se restablece en volumen anterior, se añade el agar y el tween 80. Para finalizar se lleva al autoclave a 121 °C durante 20 min.

Una vez obtenido el agar, este se siembra en placas, para luego realizar tres cortes paralelos, se coloca una laminilla sobre el agar, cubriendo parte de las estrías de siembra. Se lleva a incubar a 37° C por un periodo de 24 a 48 horas y luego, después de transcurrido el tiempo se observa al microscopio con objetivo de 10x luego de 40x.

ANEXO 3.

TINCIONES

Se utilizan colorantes para teñir las células y aumentar su contraste, de modo que se puedan observar con facilidad en el microscopio de campo claro. Para poder observar la estructura de los hongos filamentosos se utilizó la tinción con azul de lactofenol e KOH. En tanto que para la tinción de levaduras se utilizó la técnica de Gram.

- **Tinción con azul de algodón:**
  Cada componente del azul de algodón tiene una función específica: el fenol mata al hongo y flora acompañante, el ácido láctico aclara y preserva las estructuras fúngicas, la glicerina ayuda a que no se seque y por último el azul colorea la queratina del hongo.

Composición	g/ml
Cristales de fenol	20
Azul de algodón	0,05
Ácido láctico	20
Glicerol	40
Agua destilada	20

Procedimiento: Agregue el ácido láctico y el glicerol al agua, mezcle fuertemente. Adicione los cristales de fenol y agite. Caliente suavemente con agitación constante. Finalmente, agregue azul de algodón y mezcle fuertemente.

- **Tinción con KOH**

Esta tinción nos permite aclarar los pigmentos del hongo, disolver la queratina y separar las células fúngicas sin alterar su morfología.

Composición	g/ml
Hidróxido de potasio	10
Agua destilada	100

Procedimiento: se mezcla los componentes hasta disolver el KOH. Luego se guarda a temperatura ambiente, preferentemente en frasco color ámbar.

- **Tinción de Gram**

Procedimiento:

- En una lámina portaobjeto colocar una porción de la muestra y realizar el frotis.
- Cubrir el frotis con violeta de genciana, dejar actuar por 3 minutos.
- Lavar a chorro de agua y luego cubrir con lugol dejando actuar por un minuto.
- Lavar a chorro de agua y decolorar con alcohol acetona.
- Lavar y agregar la safranina dejando actuar por un lapso de 30 a 60 segundos.
- Lavar a chorro de agua y dejar secar.
- Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

- **Tinción con nigrosina**

La tinción con nigrosina, permite observar células levaduriformes capsuladas. Los polisacáridos capsulares rechazan la nigrosina y la capsula aparece como una especie de halo claro alrededor de los microorganismos.

ANEXO 4.

MICROCULTIVO

Procedimiento:

- ✓ Se cortó con una hoja de bisturí estéril y caliente la placa con medio de Sabouraud, cuadraditos de 1 cm de lado y 3 mm de espesor.
- ✓ Con la hoja de bisturí se colocó el cuadradito en un portaobjeto, el cual se pondrá sobre una varilla de vidrio doblada en forma de "V" en una caja de Petri (previamente esterilizada).
- ✓ Se tomó con el asa micológica el hongo seleccionado y se inoculó mediante picadura en las cuatro esquinas y en el centro del bloque de agar.
- ✓ Se colocó el cubreobjetos sobre el bloque de agar Sabouraud y se aplicó una ligera presión para que se adhiera al medio.
- ✓ A la placa de Petri se vertió 2ml de agua estéril para proporcionar una adecuada humedad evitando que se deseque el medio de cultivo. Luego se llevó a incubar a 28° C durante 48 h.
- ✓ Cuando el crecimiento fúngico sobre el bloque fue evidente, se recogió el cubreobjetos con una pinza estéril y se colocó sobre un portaobjetos donde previamente se ha colocado una gota de azul de lactofenol y se observó al microscopio.

ANEXO 5.

TUBO GERMINAL O FILAMENTO PRECOZ.

Procedimiento:

- ✓ Se emulsionó una porción de la colonia aislada en 0,5 ml de suero humano.
- ✓ Se llevó a Incubar a 37 °C durante 3 h.
- ✓ Luego de trascurrido el tiempo se depositó una gota de la emulsión sobre un portaobjeto limpio y desengrasado, se cubrió con laminilla y se observó al microscopio con objetivo de 40x.

ANEXO 6.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA IDENTIFICAR ESPECIES DE *Candida* DE IMPORTANCIA CLÍNICA

ESPECIES	TG	CHL	HF	PH	FP	LEV	GLU	LAC	SAC	MAL	GAL	RAF
C.albicans	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
C.krusei	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
C.tropicalis	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
C.glabrata	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
C.parapsilosis	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
C.kefyr	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+

ABREVIATURAS

TG: TUBO GERMINATIVO
HF: HIFA
FP: FORMACION DE PELICULA
GLU: GLUCOSA
SAC: SACAROSA
GAL: GALACTOSA

CHL: CLAMIDOSPORA
PH: PSEUDOHIFA
LEV: LEVADURA
LAC: LACTOSA
MAL: MALTOSA
RAF: RAFINOSA

FUENTE: Ministerio de salud, 1997.

ANEXO 7.

Valores del índice de Similaridad de Jaccard (IS_J) entre especies fúngicas asociadas a la boca del primer y segundo cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo), expuestos en condiciones de campo.

Primer cerdo.

Similarity Matrix (Jaccard)

	Candida sp	*C. albicans*	*C. tropicalis*	*Rhodotorula sp*	*Penicillium sp*	*Aspergillus sp*
Candida sp		0.400	0.400	0.000	0.500	0.500
C. albicans	0.400		0.600	0.000	0.400	0.400
C. tropicalis	0.400	0.600		0.000	0.400	0.400
Rhodotorula sp	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000
Penicillium sp	0.500	0.400	0.400	0.000		0.500
Aspergillus sp	0.500	0.400	0.400	0.000	0.500	

Segundo cerdo.

Similarity Matrix (Jaccard)

	Candida sp	*C. albicans*	*Rhodotorula sp*	*Penicillium sp*	*Aspergillus sp*	*Mucor sp*	*Rhizopus sp.*
Candida sp		0.200	0.250	1.000	0.200	0.250	0.333
C. albicans	0.200		0.250	0.200	1.000	0.250	0.000
Rhodotorula sp	0.250	0.250		0.250	0.250	0.000	0.000
Penicillium sp	1.000	0.200	0.250		0.200	0.250	0.333
Aspergillus sp	0.200	1.000	0.250	0.200		0.250	0.000
Mucor sp	0.250	0.250	0.000	0.250	0.250		0.000
Rhizopus sp.	0.333	0.000	0.000	0.333	0.000	0.000	

Valores del índice de Similaridad de Jaccard (IS_J) entre especies fúngicas asociadas al lomo del primer y segundo cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo), expuestos en condiciones de campo.

Primer cerdo.

Similarity Matrix (Jaccard)									
	Candida sp	*C. albicans*	*C. tropicalis*	*Rhodotorula sp*	*Penicillium sp*	*Aspergillus sp*	*Bipolaris sp*	*Mucor sp*	*Fusarium*
Candida sp		0.429	0.571	0.143	0.429	0.857	0.286	0.429	0.333
C. albicans	0.429		0.500	0.500	0.333	0.571	0.167	1.000	0.500
C. tropicalis	0.571	0.500		0.167	0.800	0.714	0.600	0.500	0.167
Rhodotorula sp	0.143	0.500	0.167		0.200	0.286	0.250	0.500	0.333
Penicillium sp	0.429	0.333	0.800	0.200		0.571	0.750	0.333	0.200
Aspergillus sp	0.857	0.571	0.714	0.286	0.571		0.429	0.571	0.286
Bipolaris sp	0.286	0.167	0.600	0.250	0.750	0.429		0.167	0.000
Mucor sp	0.429	1.000	0.500	0.500	0.333	0.571	0.167		0.500
Fusarium	0.333	0.500	0.167	0.333	0.200	0.286	0.000	0.500	

Segundo cerdo.

Similarity Matrix (Jaccard)							
	Candida sp	*C. albicans*	*Rhodotorula sp*	*Penicillium sp*	*Aspergillus sp*	*Mucor sp*	*Rhizopus sp.*
Candida sp		0.667	0.500	1.000	1.000	0.833	0.833
C. albicans	0.667		0.750	0.667	0.667	0.800	0.800
Rhodotorula sp	0.500	0.750		0.500	0.500	0.600	0.600
Penicillium sp	1.000	0.667	0.500		1.000	0.833	0.833
Aspergillus sp	1.000	0.667	0.500	1.000		0.833	0.833
Mucor sp	0.833	0.800	0.600	0.833	0.833		0.667
Rhizopus sp.	0.833	0.800	0.600	0.833	0.833	0.667	

Valores del índice de Similaridad de Jaccard (IS_J) entre especies fúngicas asociadas al ano del primer y segundo cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo), expuestos en condiciones de campo.

Primer cerdo

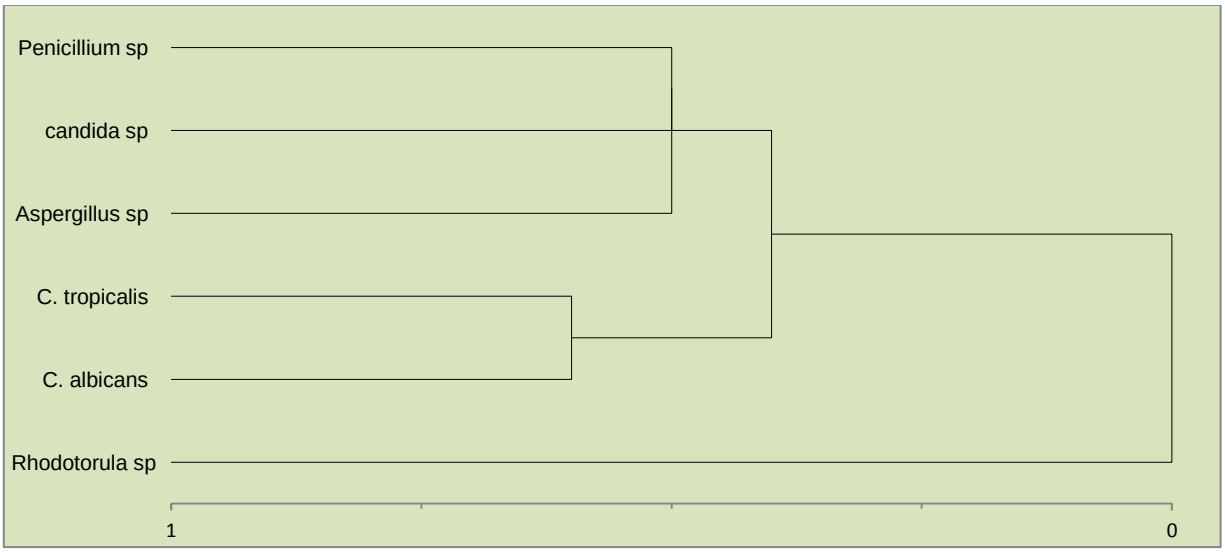
Similarity Matrix (Jaccard)									
	Candida sp	*C. albicans*	*C. tropicalis*	*Rhodotorula sp*	*Penicillium sp*	*Aspergillus sp*	*Bipolaris sp*	*Mucor sp*	*Fusarium*
Candida sp		0.286	0.571	0.429	0.429	0.571	0.143	0.286	0.286
C. albicans	0.286		0.200	0.250	0.250	0.500	0.500	0.000	0.000
C. tropicalis	0.571	0.200		0.750	0.400	0.600	0.250	0.200	0.500
Rhodotorula sp	0.429	0.250	0.750		0.500	0.750	0.333	0.250	0.667
Penicillium sp	0.429	0.250	0.400	0.500		0.400	0.333	0.250	0.250
Aspergillus sp	0.571	0.500	0.600	0.750	0.400		0.250	0.200	0.500
Bipolaris sp	0.143	0.500	0.250	0.333	0.333	0.250		0.000	0.000
Mucor sp	0.286	0.000	0.200	0.250	0.250	0.200	0.000		0.333
Fusarium	0.286	0.000	0.500	0.667	0.250	0.500	0.000	0.333	

Segundo cerdo.

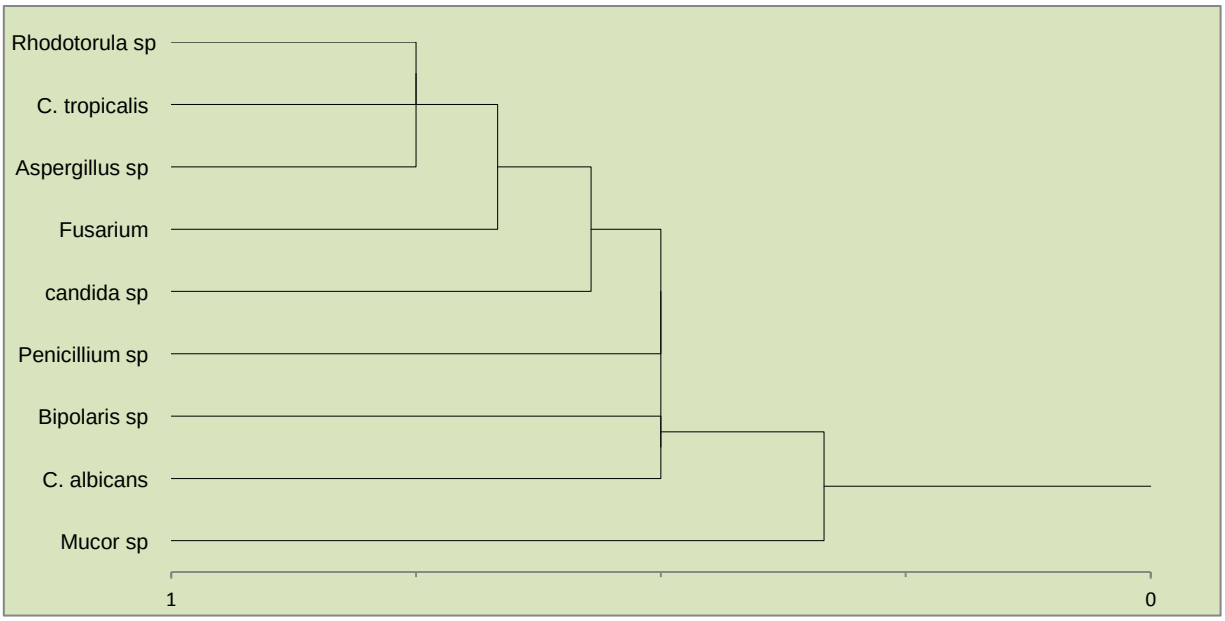
Similarity Matrix (Jaccard)							
	Candida sp	*C. albicans*	*Rhodotorula sp*	*Penicillium sp*	*Aspergillus sp*	*Mucor sp*	*Rhizopus sp.*
Candida sp		0.200	0.000	0.200	0.600	0.500	0.500
C. albicans	0.200		0.500	0.000	0.500	0.333	0.333
Rhodotorula sp	0.000	0.500		0.000	0.250	0.000	0.000
Penicillium sp	0.200	0.000	0.000		0.200	0.333	0.333
Aspergillus sp	0.600	0.500	0.250	0.200		0.500	0.500
Mucor sp	0.500	0.333	0.000	0.333	0.500		1.000
Rhizopus sp.	0.500	0.333	0.000	0.333	0.500	1.000	

ANEXO 8.

Dendrograma de Similaridad entre las especies fúngicas asociadas a la boca para el primer cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo), expuestos en condiciones de campo.



Dendrograma de Similaridad entre las especies fúngicas asociadas al lomo para el segundo cadáver de *Sus scrofa L.* (cerdo), expuestos en condiciones de campo.



ANEXO 9.

Mancha verde abdominal en el primer cerdo, presentándose en la parte cecoapendicular izquierda. Día 2.