

Ana Letícia Trivia

ANÁLISE DO EFEITO DE QUIMIOTERÁPICOS EM *Chrysomya megacephala* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências

Orientador: Prof. Dr. Carlos José de Carvalho Pinto

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Trivia, Ana Leticia
ANÁLISE DO EFEITO DE QUIMIOTERÁPICOS EM
Chrysomya megacephala (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)
/ Ana Leticia Trivia ; orientador, Carlos José
de Carvalho Pinto - SC, 2017.
70 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biociências, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2.
Ciclofosfamida. 3. Entomotoxicologia. 4. Intervalo
Pós-morte. 5. Metotrexato. I. Carvalho Pinto,
Carlos José de. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências. III. Título.

“Análise do efeito de quimioterápicos em *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae)”

Por

Ana Leticia Trivia

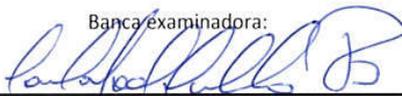
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (10/PPGBTC/2017) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



Prof(a). Dr(a) Mario Steindel

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Banca examinadora:



Dr(a) Carlos José de Carvalho Pinto (Universidade Federal de Santa Catarina)

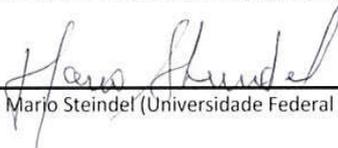
Orientador(a)



Dr(a) Luis Eduardo Maestrelli Bizzo (Universidade do Vale do Itajaí)



Dr(a) Luiz Carlos de Pinho (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Mario Steindel (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 19 de abril de 2017.

Dedico este trabalho à Alexandra Elbakyan, conhecida como a Robin Hood da Ciência, por quebrar as barreiras econômicas do conhecimento científico, disponibilizando milhões de artigos científicos de forma gratuita através do Sci-Hub, sem o qual minha pesquisa se tornaria inviável.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho, contribuindo não somente com a minha dissertação, mas também na minha evolução pessoal ao longo do mestrado.

À minha família pelos sacrifícios, apoio, dedicação e amor incondicional;

À família Aureliano, por me receber com tanto carinho e pelo suporte emocional em todos os momentos;

Ao meu super orientador por me acalmar nos momentos de crise, pelas piadas, mas também pelos ensinamentos e por acreditar e apoiar todo o desenvolvimento do trabalho;

Ao pessoal do lab que tanto me ajudou com os experimentos, muito obrigada!

A todos os meus amigos, os velhos, os novos e os que ainda virão.

À galera do corredor do MIP, obrigada pelos cafés, gulodices e conversas, além de terem aguentado o cheirinho dos meus experimentos (desculpa);

A todos os professores e servidores que colaboraram para o sucesso do programa de pós-graduação;

Obrigada também ao CNPq e ao PPGBTC pela bolsa de mestrado.

Prezo insetos, mais que aviões.
Prezo a velocidade das tartarugas mais que a dos
mísseis.
Tenho em mim esse atraso de nascença.
Eu fui aparelhado para gostar de passarinhos.
Tenho abundância de ser feliz por isso.
Meu quintal é maior do que o mundo.
Sou um apanhador de desperdícios:
Amo os restos como as boas moscas.

(Manoel de Barros)

RESUMO

Uma das principais aplicações da entomologia forense médico-legal é a estimativa do intervalo pós-morte (IPM). Entretanto, certas substâncias químicas presentes em um cadáver podem interferir no desenvolvimento dos insetos que se alimentam dele, sendo importante conhecer estes efeitos para uma estimativa mais precisa do IPM. Entomotoxicologia é o ramo da entomologia forense que estuda o uso de insetos necrófagos na detecção e análise de drogas e outras substâncias em tecidos em decomposição, além de investigar seus possíveis efeitos no desenvolvimento destes artrópodes. Sendo assim, o objetivo principal deste trabalho foi investigar o impacto dos quimioterápicos ciclofosfamida (CF) e metotrexato (MTX) no desenvolvimento pós-embriônico de *Chrysomya megacephala*. Para isso, foram feitos experimentos *in vitro* com diferentes concentrações destas drogas incorporadas em carne bovina moída, simulando as dosagens injetadas em humanos que passam por quimioterapia. Foram feitos cinco tratamentos para a alimentação das larvas em cada experimento, sendo um controle negativo (água destilada). Para a CF foram utilizadas ½ Dose inicial intravenosa - DIIv (25 mg/kg), 1 DIIv (50 mg/kg), 2 DIIv (100 mg/kg) e 4 DIIv (200 mg/kg); e para o MTX foram utilizadas ½ Dose Inicial Intraperitoneal - DIIp (5 mg/kg), 1 DIIp (10 mg/kg), 2 DIIp (20 mg/kg) e 4 DIIp (40 mg/kg). Todos os tratamentos foram realizados em triplicata e mantidos a 25°C em estufa BOD. A cada 12 horas eram retiradas três larvas de cada tratamento, sacrificadas e o comprimento total de cada uma era medido com auxílio de um paquímetro digital, até o abandono da dieta para pupariação. Foi também realizado um experimento a parte sem manipulação das larvas para calcular as taxas de sobrevivência larval e total para cada tratamento, além da proporção sexual das moscas emergidas. ANOVA e teste Tukey foram realizados para comparar o efeito das drogas sobre o desenvolvimento de *C. megacephala*. Os resultados indicaram claramente que ambos os medicamentos afetaram o desenvolvimento e sobrevivência de *C. megacephala*, porém de forma heterogênea. Além disso, houve um desvio da razão sexual esperada nas larvas expostas ao MTX, emergindo uma quantidade significativamente maior de fêmeas do que machos. Estes fatores de interferência negativa devem ser considerados em casos de morte suspeita de pessoas que faziam uso destes medicamentos para que não haja uma subestimativa de IPM.

Palavras-chave: Ciclofosfamida. Entomotoxicologia. Intervalo Pós-morte. Metotrexato.

ABSTRACT

One of the main applications of medico-legal forensic entomology is the estimation of the postmortem interval (PMI). However, certain chemical substances present in a cadaver can interfere in the development of the insects that feed on it, thus it is important to know these effects for a more accurate estimation of PMI. Entomotoxicology is the branch of forensic entomology that studies the use of scavenger insects in the detection and analysis of drugs and other substances in decomposing tissues, in addition to investigating their possible effects on the development of these arthropods. Therefore, the main purpose of this work was to investigate the impact of the chemotherapeutic drugs cyclophosphamide (CF) and methotrexate (MTX) on the post-embryonic development of *Chrysomya megacephala*. For this, *in vitro* experiments were performed with different concentrations of these drugs incorporated in minced beef, simulating the dosages injected in humans that undergo chemotherapy. Five treatments were done to feed the larvae in each experiment, with one as a negative control (distilled water). For CF, ½ initial intravenous dose - DIIv (25 mg/kg), 1 DIIv (50 mg/kg), 2 DIIv (100 mg/kg) and 4 DIIv (200 mg/kg) were used; and for MTX ½ Initial Intraperitoneal Dose - DIIp (5 mg/kg), 1 DIIp (10 mg/kg), 2 DIIp (20 mg/kg) and 4 DIIp (40 mg/kg) were used. All treatments were performed in triplicate and maintained at 25°C in a BOD chamber. At every 12 hours three larvae of each treatment were removed, sacrificed and the total length of each one was measured with the aid of a digital caliper until the abandonment of the diet for pupariation. A separate experiment without manipulation of the larvae was also performed to calculate the larval and total survival rates for each treatment, in addition to the sex ratio of the emerged flies. ANOVA and Tukey test were performed to compare the effect of drugs on the development of *C. megacephala*. The results clearly indicated that both drugs affected the development and survival of *C. megacephala*, but in a heterogeneous manner. In addition, there was a deviation in the expected sex ratio in MTX-exposed larvae, with significantly more females than males emerging. These negative interference factors should be considered in cases of suspected death of people using these drugs so that there is no underestimation of PMI.

Keywords: Cyclophosphamide. Entomotoxicology. Methotrexate. Postmortem Interval.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representando o ciclo de vida de <i>C. megacephala</i> e tempo médio de desenvolvimento a 25°C. A) Ovos; B) Primeiro ínstar larval; C) Segundo ínstar larval; D) Terceiro ínstar larval; E) Pupa; F) Adulto; L1) Espiráculos posteriores de primeiro ínstar larval; L2) Espiráculos posteriores de segundo ínstar larval; L3) Espiráculos posteriores de terceiro ínstar larval.	28
Figura 2 – Detalhe do dimorfismo sexual em <i>C. megacephala</i> , evidenciando olhos dicópticos de fêmea (A) e holópticos de macho (B).....	30
Figura 3 – Estrutura química da ciclofosfamida (A) e sua versão comercial injetável (B).	32
Figura 4 – Mecanismo de degradação oxidativa de ciclofosfamida no DNA para formação de metabólitos reativos ciclofosfamida e sua forma ativa.	33
Figura 5 – Estrutura química do metotrexato (A) e sua versão comercial injetável (B).	34
Figura 6 – Diagrama esquemático do mecanismo de ação do metotrexato (MTX). A ação antiproliferativa do MTX é mediada pela inibição das vias folato-dependentes pela competição com o ácido fólico pelos sítios de ligação, devido à sua maior afinidade com a enzima diidrofolato redutase.	35
Figura 7 – Armadilha usada para captura de moscas. A) Esquema representando a armadilha. B) Armadilha em campo.	37
Figura 8 – Gaiola de triagem/criação dos indivíduos adultos.	38
Figura 9 – Carne bovina moída para oviposição, com a massa de ovos de <i>C. megacephala</i> em destaque.	39
Figura 10 – Recipiente onde eram mantidos os espécimes de <i>C. megacephala</i> até a emergência dos adultos.	40
Figura 11 – Asa esquerda de <i>C. megacephala</i> . A barra em vermelho mostra o segmento da asa medido com paquímetro digital.	41
Figura 12 – Curvas de desenvolvimento larval de <i>C. megacephala</i> criada sob diferentes concentrações de ciclofosfamida. DIIV: Dose Inicial Intravenosa. ...	44
Figura 13 – Comprimento médio e desvio padrão* das asas de <i>C. megacephala</i> criada sob diferentes concentrações de ciclofosfamida. DIIV: Dose Inicial Intravenosa.....	45
Figura 14 – Tempo de desenvolvimento e desvio padrão, em horas, de cada estágio de <i>C. megacephala</i> criada sob diferentes concentrações de ciclofosfamida. DIIV: Dose Inicial Intravenosa.	45
Figura 15 – Curvas de desenvolvimento larval de <i>C. megacephala</i> criada sob diferentes concentrações de metotrexato. DIIP: Dose Inicial Intraperitoneal. ...	48
Figura 16 – Comprimento médio e desvio padrão* das asas de <i>C. megacephala</i> criada sob diferentes concentrações de metotrexato. DIIP – Dose inicial intraperitoneal.	48
Figura 17 – Tempo de desenvolvimento e desvio padrão, em horas, de cada estágio de <i>C. megacephala</i> criada sob diferentes concentrações de metotrexato.	

DIp – Dose inicial intraperitoneal49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média e desvio padrão do comprimento em milímetros* das larvas de <i>C. megacephala</i> registrado a cada 12h expostas a diferentes concentrações de ciclofosfamida (n=9). DIIv: Dose Inicial Intravenosa.	43
Tabela 2 – Média e desvio padrão das taxas de sobrevivência larval e total (%)* e proporção sexual de <i>C. megacephala</i> criada sob diferentes dosagens de ciclofosfamida em relação ao grupo controle (n=300). DIIv – Dose inicial intravenosa.	46
Tabela 3 – Média e desvio padrão do comprimento em milímetros* das larvas de <i>C. megacephala</i> registrado a cada 12 horas expostas a diferentes concentrações de metotrexato (n=9). DIIp – Dose inicial intraperitoneal.	47
Tabela 4 – Média e desvio padrão das taxas de sobrevivência larval e total (%)* e proporção sexual de <i>C. megacephala</i> criada sob diferentes dosagens de metotrexato em relação ao grupo controle (n=300). DIIp: Dose Inicial Intraperitoneal.	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância

BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio

CF – Ciclofosfamida

DIIp – Dose Inicial Intraperitoneal

DIIv – Dose Inicial Intravenosa

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

IPM – Intervalo Pós-morte

MTX – Metotrexato

MTX-PG – Poliglutamatos de metotrexato

OMS – Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	CLASSE INSECTA.....	23
1.2	ENTOMOLOGIA FORENSE	24
1.3	ENTOMOLOGIA FORENSE NO BRASIL.....	24
1.4	FAUNA CADAVERÍCA.....	25
1.5	DIPTERA.....	26
1.6	ENTOMOTOXICOLOGIA	30
1.7	QUIMIOTERÁPICOS E CÂNCER	31
1.8	JUSTIFICATIVA	36
1.9	OBJETIVOS	36
1.9.1	Objetivo Geral.....	36
1.9.2	Objetivos Específicos	36
2	MATERIAIS E MÉTODOS	37
2.1	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DOS ADULTOS	37
2.2	MANUTENÇÃO DAS COLÔNIAS	38
2.3	ESTABELECIMENTO DA GERAÇÃO F1	39
2.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	40
2.4.1	Ciclofosfamida.....	40
2.4.2	Metotrexato	41
2.4.3	Controle de sobrevivência	42
2.5	ANÁLISE DOS DADOS.....	42
3	RESULTADOS	43
3.1	CICLOFOSFAMIDA	43
3.2	METOTREXATO.....	46
4	DISCUSSÃO	51
5	CONCLUSÕES.....	55
6	PERSPECTIVAS.....	57
	REFERÊNCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 CLASSE INSECTA

Os insetos são classificados dentro da classe Insecta, filo Arthropoda, subfilo Hexapoda, com cerca de um milhão de espécies descritas sendo, portanto, o grupo mais diverso do planeta (GRIMALDI; ENGEL, 2005; GULLAN; CRANSTON, 2010). Esta vasta riqueza de espécies ocorre devido a diversas características, como o seu tamanho diminuto, que permite a exploração de diferentes microhabitats; tempo curto de geração; a grande capacidade de resposta às alterações no ambiente, principalmente devido à sua heterogeneidade genética e as interações coevolucionárias entre grupos de insetos e outros organismos favorecem a rápida diversificação das espécies (GULLAN; CRANSTON, 2010).

Estes animais podem estar presentes nos mais variados habitats de diversos ecossistemas, com exceção dos oceanos profundos (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2015). Entretanto, a riqueza de espécies de insetos nos trópicos é aparentemente muito maior do que nas regiões temperadas do planeta, mesmo que exista uma falta de inventários de fauna nas regiões tropicais para provar (GULLAN; CRANSTON, 2010).

O corpo dos insetos é segmentado em uma série de metâmeros, agrupados em três tagmas ou regiões distintas (cabeça, tórax e abdômen), possuem esqueleto externo articulado, formado por uma cutícula que reduz a perda de água para o meio, sendo esta uma das principais características responsáveis pelo sucesso evolutivo destes organismos, além da presença de asas em adultos do grupo Pterygota, o que possibilita uma maior dispersão e consequente exploração mais abrangente de recursos, assim como vantagens para fuga de predadores (GIANNOTTI; SOUZA; PREZOTO, 2010; GULLAN; CRANSTON, 2010; RUPPERT; BARNES, 1996).

Os insetos possuem grande importância ecológica, sendo considerados componentes-chave de quase qualquer teia alimentar, participando da ciclagem de nutrientes, polinizando plantas, mantendo a fertilidade e estrutura do solo, além de atuar no controle populacional de vários outros organismos (MAJER, 1987; SHURIN; GRUNER; HILLEBRAND, 2006).

Além da importância ecológica, estes artrópodes exercem grande influência na sociedade humana, tanto negativamente, atuando como vetores ou agentes causadores de doenças, além de provocarem grandes prejuízos econômicos como pragas agrícolas e urbanas (TRIPLEHORN;

JOHNSON, 2015), assim como de maneira benéfica, fornecendo mel, cera, seda, polinizando grandes plantações, como fonte alimentar em algumas culturas, controle de pragas, terapia larval e também auxiliar em investigações criminais (LINHARES; THYSEN, 2012; SCUDDER, 2009).

1.2 ENTOMOLOGIA FORENSE

Entomologia forense é a ciência que estuda os insetos e outros artrópodes relacionados ao sistema judicial, podendo ser dividida em três grandes áreas: entomologia urbana, relacionada às infestações de insetos em construções e jardins; entomologia de produtos armazenados e alimentos, relacionada às ações que envolvam a presença de insetos em produtos alimentícios e suas embalagens, assim como em armazéns ou depósitos; e entomologia médico-legal, médico-forense ou médico-criminal, sendo esta caracterizada principalmente pelo uso dos artrópodes na investigação de crimes envolvendo mortes violentas (LORD; STEVENSON, 1986; PUJOL-LUZ; ARANTES; CONSTANTINO, 2008).

O primeiro caso documentado do uso de insetos em uma investigação criminal foi relatado pelo advogado e investigador chinês Sung Tzu no século XIII, onde descreve a resolução de um caso de homicídio por golpes de foice em um campo de arroz, cujos investigadores encontraram a arma do crime através das moscas que a sobrevoavam, possivelmente atraídas por traços de sangue. Após ser interrogado, o dono do instrumento confessou o crime (BENECKE, 2001).

O primeiro trabalho científico na área da entomologia forense foi publicado em 1894 na França por Jean Pierre Mégnin, intitulado “La faune des cadavres” (A fauna dos cadáveres), sendo considerado o marco para a entomologia forense (OLIVEIRA-COSTA, 2011). Em seu livro, Mégnin descreve 19 relatos de casos, além de desenvolver sua teoria de que a colonização de cadáveres por insetos ocorre em oito ondas sucessionais, sendo apenas duas se o corpo estiver enterrado (BENECKE, 2001).

1.3 ENTOMOLOGIA FORENSE NO BRASIL

No Brasil, em 1908, após 14 anos do trabalho de Mégnin, foram publicados os trabalhos pioneiros de ROQUETTE-PINTO (1908) e Oscar Freire, que marcaram o início do desenvolvimento de estudos em

entomologia forense no país. Freire apresentou a primeira coleção de insetos necrófagos da Bahia, além dos resultados dos seus estudos com cadáveres humanos e de pequenos animais, enquanto que o trabalho de Roquette Pinto, publicado no mesmo ano, apresentou um estudo de caso com a fauna cadavérica em um humano no Rio de Janeiro (PUJOL-LUZ *et al.*, 2008).

Em 1911, após estudos em São Paulo, LÜDERWALDT (1911) publicou uma lista de insetos necrófagos, mas como seu foco eram os coleópteros, Freire criticou seu trabalho considerando-o deficiente em relação aos dípteros.

Em 1923, após a morte de Oscar Freire, foi publicado pela Revista de Medicina o conjunto de sua obra, intitulado “Fauna cadavérica brasileira”, considerado de extrema importância para os estudos sobre a entomologia forense no país ao destacar que as técnicas desenvolvidas em outros países, como a estimativa de tempo de morte através do padrão de sucessão da fauna cadavérica, não podem ser aplicadas diretamente no Brasil devido ao clima e biodiversidade brasileira. Durante cerca de 40 anos após o trabalho de Pessoa & Lane, foram raros os trabalhos na área da entomologia forense no Brasil, retornando apenas em 1987 com o trabalho sobre sucessão de fauna de insetos necrófagos realizado por Monteiro-Filho & Penereiro e a partir desta época, diversos pesquisadores desenvolveram estudos na área, mas somente em 2003, com a publicação do livro de Janyra Oliveira-Costa, a academia e a perícia criminal começaram a dialogar no país (PUJOL-LUZ *et al.*, 2008).

1.4 FAUNA CADAVERICA

A fauna cadavérica pode ser dividida em quatro grupos, de acordo com KEH (1985) e DALY e colaboradores (1998):

- Necrófagos: grupo de artrópodes que se alimentam de tecidos dos corpos em decomposição em algum momento do ciclo de vida.
- Onívoros: artrópodes com dieta variada, alimentando-se não somente dos restos orgânicos, mas também da fauna associada ao cadáver.
- Parasitas e predadores: parasitas utilizam as reservas dos artrópodes que colonizaram o cadáver para seu próprio desenvolvimento; predadores se alimentam dos outros artrópodes.
- Acidentais: grupo de artrópodes encontrados no cadáver por acaso, sendo este a extensão do seu habitat natural.

As moscas são, na maioria das vezes, as primeiras colonizadoras necrófagas de um organismo em decomposição e, portanto, estes insetos são os mais utilizados como ferramenta para estimar o intervalo pós-morte (IPM - período que corresponde ao intervalo de tempo entre a ocorrência da morte e a descoberta do cadáver) quando os métodos tradicionais, como a curva de decaimento da temperatura corporal e rigidez cadavérica, não são apropriados devido ao tempo de morte muito longo (AMENDT; KRETTEK; ZEHNER, 2004; GOFF; OMORI; GUNATILAKE, 1988).

O IPM pode ser estimado a partir de diferentes métodos entomológicos, sendo que alguns utilizam dados da sucessão faunística que coloniza o cadáver, outros a partir do desenvolvimento do inseto presente no cadáver, utilizando parâmetros como estágio do inseto mais velho, dimensões e peso das larvas e pupas, expressão gênica, hidrocarbonetos cuticulares, dispersão larval, além do método do grau-dia ou grau-hora acumulado, que associa o estágio de desenvolvimento com as temperaturas do ambiente e da massa larval (HIGLEY; HASKELL, 2001; SHARMA; GARG; GAUR, 2015; WELLS; LAMOTTE, 2001).

A atração das moscas pela carniça envolve a ativação inicial, orientação e comportamento de pouso, até a oviposição, que pode acontecer minutos após a ocorrência da morte e, sendo assim, a idade dos insetos mais velhos constitui o IPM mínimo estimado para um cadáver (ASHWORTH; WALL, 1994).

Para estimar um IPM com maior precisão, é fundamental um profundo conhecimento da biologia, ecologia e comportamento da espécie em questão, assim como a possível influência das variáveis no desenvolvimento das larvas, como a temperatura, umidade do ar, estação do ano e uso de substâncias químicas pelo cadáver (VERMA; PAUL, 2013).

1.5 DIPTERA

A ordem Diptera é uma das mais diversas dentre os insetos, não somente na riqueza de espécies, que já ultrapassa 152 mil espécies descritas (COURTNEY *et al.*, 2009), mas também nos seus hábitos alimentares, estrutura corporal, interação com os humanos e exploração de habitats, podendo ser encontrados em todos os continentes e ambientes, com exceção do alto mar e dentro de geleiras (COURTNEY *et al.*, 2009; SKEVINGTON; DANG, 2002).

Os dípteros passaram por complexas modificações morfológicas, possuindo apenas um par de asas funcional e desenvolvido, já que o par de asas posterior é reduzido em uma estrutura que confere estabilidade ao voo, conhecida como halter ou balancim (YEATES; WIEGMANN, 2005).

Estes insetos possuem desenvolvimento holometábolo, sendo que o ciclo de vida típico destes insetos passa por diferentes estágios, consistindo em geral pela fase de ovo, três ou quatro instares larvais, estágio de pupa e estágio adulto (COURTNEY *et al.*, 2009).

Os dípteros podem depositar seus ovos em diferentes ambientes, como vegetação aquática ou terrestre, rochas ou no substrato alimentar, entre outros locais próximos ou no próprio ambiente onde a larva se desenvolve (COURTNEY *et al.*, 2009). Entretanto, alguns grupos de dípteros são vivíparos, como Mesembrinellinae (Calliphoridae) e Hippoboscoidea, ou os ovos são incubados dentro da fêmea e eclodem durante ou imediatamente após a oviposição (Sarcophagidae e alguns Tachinidae, respectivamente) (MEIER; KOTRBA; FERRAR, 1999). A maioria dos dípteros possuem reprodução sexual, porém alguns grupos podem apresentar reprodução partenogenética e até mesmo pedogênese (reprodução em estágios imaturos) (COURTNEY *et al.*, 2009).

As famílias de dípteros mais utilizadas em estudos forenses são Calliphoridae, Sarcophagidae e Muscidae, pois têm destaque na invasão pós-morte e na decomposição do cadáver (WELLS; LAMOTTE, 2001). Dentre estas, a família Calliphoridae possui a maior importância, pois geralmente é a primeira a colonizar o cadáver, oferecendo uma maior precisão na estimativa do IPM, além de ser a mais conhecida e estudada (CARVALHO, LUCILIA MARIA LOPES *et al.*, 2004; OLIVEIRA-COSTA, 2011). Os representantes desta família são vulgarmente conhecidos no Brasil como mosca varejeira, sendo geralmente caracterizada por sua coloração metálica (OLIVEIRA-COSTA, 2011).

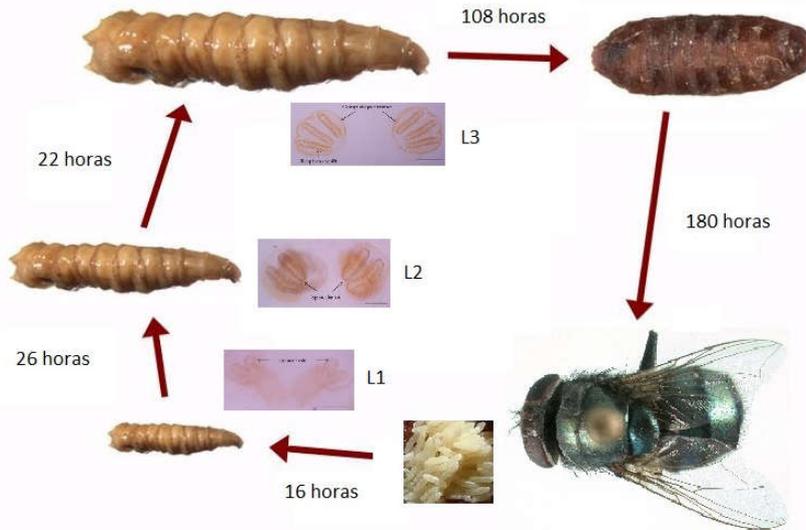
Uma das espécies de califorídeos mais estudadas dentro da entomologia forense é a *Chrysomya megacephala* (Fabricius), uma vez que estas moscas demonstram uma preferência pela oviposição em cadáveres recentes, sendo considerada uma excelente espécie indicadora da estimativa do IPM mínimo (BYRD; CASTNER, 2001). Além disso, está entre as espécies mais abundantes em levantamentos da entomofauna associada a carcaças de suínos (FERNANDES, 2014, JUK, 2013) e em cadáveres humanos (dados não publicados) na região de Florianópolis-SC.

Originária da Australásia e Pacífico, esta espécie foi encontrada no Brasil pela primeira vez em 1978 nos estados de São Paulo e Rio de

Janeiro (GUIMARÃES; DO PRADO; BURALLI, 1979). Ao se estabelecer em um ambiente urbano, torna-se a espécie dominante, podendo ser encontradas tanto em cadáveres humanos e de outros animais, assim como em fezes, urina e restos de alimentos, o que propicia a transmissão de diversos patógenos, além de poderem causar miíase secundária; embora também possam atuar como polinizadores (ANDERSON *et al.*, 1982; OLIVEIRA-COSTA, 2011; WELLS, 1991).

De acordo com BARCELOS (2014), a 25°C os ovos de *C. megacephala* eclodem após 16 horas de incubação, passando para o 2º estágio larval após uma média de 26 horas, para o 3º estágio após uma média de 22 horas, empupando após uma média de 108 horas, permanecendo nesse estágio por mais uma média de 180 horas até a emergência do adulto, totalizando uma média de cerca de 14 dias para o desenvolvimento completo até a emergência dos adultos (Figura 1), sendo que o tempo mínimo total foi de 258 horas (10,75 dias).

Figura 1 – Esquema representando o ciclo de vida de *C. megacephala* e tempo médio de desenvolvimento a 25°C. A) Ovos; B) Primeiro instar larval; C) Segundo instar larval; D) Terceiro instar larval; E) Pupa; F) Adulto; L1) Espiráculos posteriores de primeiro instar larval; L2) Espiráculos posteriores de segundo instar larval; L3) Espiráculos posteriores de terceiro instar larval.



Fonte: Adaptado de The Cleveland Natural History Museum (2011), com dados de BARCELOS (2014).

Os ovos dessa espécie são ovais, com cerca de 0,52 mm de comprimento e 0,12 mm de largura, coloração branca e possuem uma face plana, com projeções arredondadas grandes e pequenas, e a outra face convexa, apresentando marcações hexagonais correspondentes às células foliculares (DAVID; ROCHA; CAETANO, 2008).

As larvas de primeiro ínstar possuem comprimento médio de 3,22 mm, com corpo dividido em 12 segmentos com fileiras de micro-espinhos em torno de cada um destes segmentos. Na cavidade oral, apresentam um par de antenas, um par de palpos e a crista oral; maxila constituída por um par de peças simétricas com articulação na base; mandíbula formada também por um par de peças simétricas, com ápice pontiagudo, sendo menor e menos pigmentada que aquela. Possuem um par de espiráculos posteriores com apenas uma abertura espiracular em cada e peritrema incompleto (BARROS-CORDEIRO; PUJOL-LUZ, 2010).

As larvas de segundo ínstar são semelhantes às de primeiro ínstar, mas mais desenvolvidas, com comprimento médio de 7,97 mm. Apresentam um par de espiráculos anteriores com nove ou dez brânquias, maxila fortemente esclerotizada e pigmentada, curva e com ápice pontiagudo e mandíbula fusionada a maxila. O par de espiráculos posteriores apresentam, cada um, duas aberturas e peritrema incompleto (BARROS-CORDEIRO; PUJOL-LUZ, 2010).

As larvas de terceiro ínstar possuem comprimento médio de 15,51 mm (medidas até a 50ª hora), com esqueleto cefalofaríngeo completamente formado. Espiráculos anteriores mais robustos e com 10-12 brânquias e posteriores com três aberturas em cada espiráculo e peritrema incompleto (BARROS-CORDEIRO; PUJOL-LUZ, 2010).

As pupas ficam contidas dentro de um pupário de formato cilíndrico, marrom, com comprimento médio de 9,34 mm e diâmetro médio de 3,34 mm, onde permanecem até a emergência do adulto (SIRIWATTANARUNGSEE *et al.*, 2005).

Os adultos são em geral robustos, com olhos compostos com grande quantidade de omatídeos conferindo uma coloração vermelha, cabeça notavelmente grande, tórax e abdômen metálicos, de coloração variando entre azul e verde (CARVALHO; MELLO-PATIU, 2008). Estas moscas, diferentemente de outras espécies, são bastante ativas durante a tarde e períodos crepusculares (BYRD; CASTNER, 2001). Apresentam dimorfismo sexual, evidenciado na região da cabeça, sendo que os machos possuem olhos holópticos e as fêmeas dicópticos (CARVALHO; MELLO-PATIU, 2008) (Figura 2).

Figura 2 – Detalhe do dimorfismo sexual em *C. megacephala*, evidenciando olhos dicópticos de fêmea (A) e holópticos de macho (B).



Fonte: Arquivo pessoal.

1.6 ENTOMOTOXICOLOGIA

Um dos principais objetivos da entomologia forense é a elaboração de uma estimativa de IPM precisa para auxiliar em investigações criminais. Entretanto, algumas substâncias presentes na fonte de alimento dos insetos podem influenciar seu desenvolvimento, causando um cálculo errôneo do IPM que, dependendo do método, utiliza os dados do tempo de desenvolvimento do inseto para a estimativa (THYSSEN; GRELLA, 2011). Com isso, surgiu a entomotoxicologia, ramo da Entomologia Forense que estuda o uso de insetos necrófagos na detecção e análise de drogas e outras toxinas em tecidos em decomposição, além de investigar os possíveis efeitos destas substâncias no desenvolvimento destes artrópodes, possibilitando uma estimativa de IPM mais precisa (INTRONA; CAMPOBASSO; GOFF, 2001).

Corpos esqueletonizados ou em estágio de decomposição avançada não oferecem amostras de tecidos ou fluídos, como sangue e urina, que possibilitem análises toxicológicas tradicionais (INTRONA *et al.*, 2001). Sendo assim, os insetos podem funcionar como uma alternativa a estas análises, já que ao se alimentarem de tecidos em decomposição, ingerem, incorporam e acumulam as drogas e toxinas que estavam presentes no cadáver, ficando presas na cutícula das larvas ou nos pupários durante longos períodos de tempo (BOUREL *et al.*, 2001), os quais podem permanecer intactos por centenas de anos, podendo ser uma excelente amostra para análise toxicológica (NUORTEVA, 1987).

O primeiro estudo a detectar substâncias tóxicas em larvas de

insetos de interesse forense foi publicado por NUORTEVA (1977), ao descrever um caso em que as larvas encontradas em um cadáver continham mercúrio, indicando que a vítima morava em uma área com alta poluição por este metal. Entretanto, o primeiro trabalho a sugerir a utilização de insetos como amostra biológica alternativa para determinação qualitativa de substâncias tóxicas foi publicado em 1980 por Beyer e colaboradores, em um estudo de caso que relata a detecção de fenobarbital em larvas de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) coletadas de um cadáver em avançado estado de decomposição, sem nenhum tecido para análise (BYRD; PEACE, 2011).

Somente anos depois começou-se a estudar os efeitos de substâncias tóxicas no desenvolvimento dos insetos de importância forense, ficando evidente a importância destes estudos para se fornecer uma estimativa de IPM baseada em dados entomológicos com precisão (INTRONA *et al.*, 2001). Um exemplo é o caso de envenenamento por malathion relatado por GUNATILAKE e GOFF (1989), onde os estágios de desenvolvimento de *Chrysomya rufifacies* (Macquart) e *C. megacephala* indicaram um IPM mínimo de cinco dias, sendo que a vítima havia sido vista pela última vez com vida oito dias antes da descoberta do corpo. A presença de apenas duas espécies de larvas de moscas em um cadáver encontrado ao ar livre no Hawaii reforçou a hipótese dos autores de que o malathion contido nos tecidos teria atrasado a colonização do cadáver pelos artrópodes.

Os efeitos de diversas substâncias químicas em diferentes espécies de insetos de importância forense já foram estudados, como por exemplo cocaína (CARVALHO, L. M. L.; LINHARES; PALHARES, 2012; GOFF; OMORI; GOODBROD, 1989), heroína (GOFF *et al.*, 1991), anticoncepcional (SANTOS, 2013), escopolamina (OLIVEIRA *et al.*, 2009; THYSSEN; GRELLA, 2011), metanfetamina (GOFF; BROWN; OMORI, 1992; MULLANY *et al.*, 2014), ketamina (LÜ *et al.*, 2012; ZOU *et al.*, 2013), paracetamol (O'BRIEN; TURNER, 2004), nicotina (GUERRA *et al.*, 2016), antibióticos (FERRAZ *et al.*, 2014; SHERMAN; WYLE; THRUPP, 1995) entre outras.

1.7 QUIMIOTERÁPICOS E CÂNCER

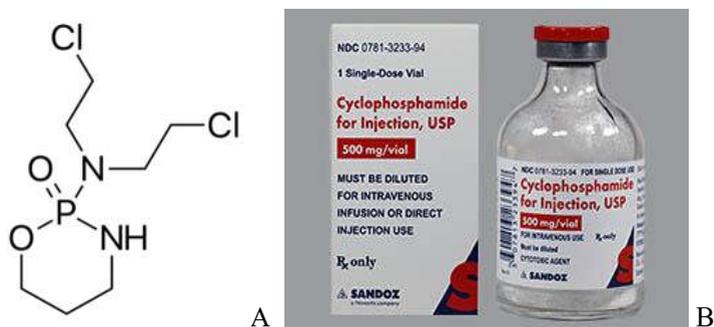
O câncer é um grupo de doenças que têm como características principais o crescimento e migração desregulados de células anormais, podendo causar a morte do indivíduo (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), apenas em 2012 o número de diagnósticos de câncer estimado

mundialmente foi de 14,1 milhões, com 8,2 milhões de óbitos pela doença, sendo que no Brasil, 223.700 pessoas morreram devido ao câncer no mesmo ano (FERLAY *et al.*, 2015). Em uma projeção recente, estima-se que em 2017 ocorram 1.688.780 novos casos de câncer e 600.920 mortes somente nos Estados Unidos (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017)

Atualmente, existe uma variada gama de tratamentos do câncer: cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e imunoterapia, que podem ser utilizados de forma isolada ou combinada (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

A ciclofosfamida (CF) ($C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$) (Figura 3) é um quimioterápico com atividade citotóxica e imunossupressora, utilizado no tratamento de alguns tipos de câncer e doenças autoimunes, sendo classificado como agente alquilante do grupo das oxazoforinas, geralmente utilizado em associação com outros quimioterápicos (GENUXAL® 2013). Seu uso clínico foi introduzido em 1958, sendo um dos agentes quimioterápicos e imunossupressores mais utilizados ainda hoje, estando presente na Lista de Medicamentos Essenciais da OMS (MOORE, 1991; WHO, 2015). A CF foi sintetizada acreditando-se que seria seletiva para células cancerígenas, já que a sua conversão em forma ativa somente ocorreria através da quebra de sua estrutura pela enzima fosforamidase, presente em altos níveis nessas células (MOORE, 1991).

Figura 3 – Estrutura química da ciclofosfamida (A) e sua versão comercial injetável (B).

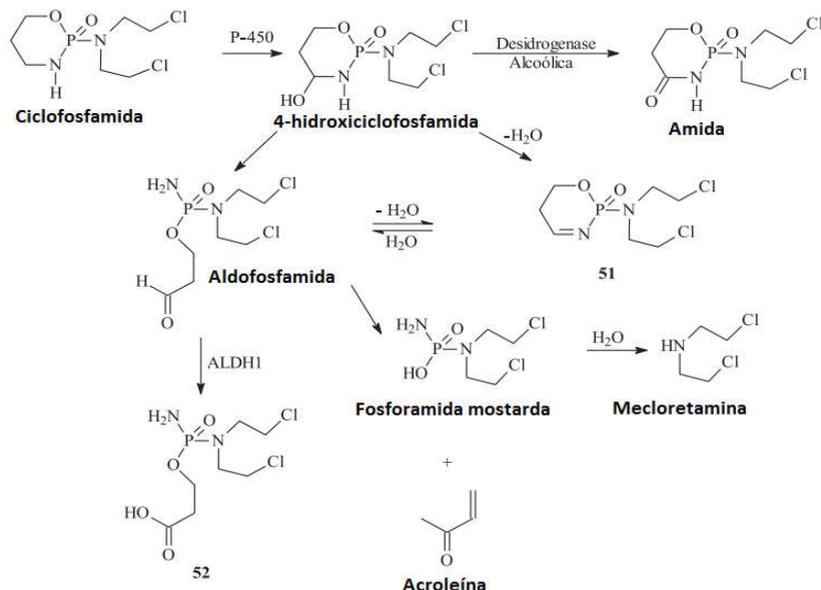


Fonte: <http://cyclophosphamide.org/wp-content/uploads/2013/08/Cyclophosphamide.png>,
<http://images.medscape.com/pi/features/drugdirectory/octupdate/SDZ32330.jpg>

A CF é biotransformada no fígado (mais do que no tumor) pelo sistema de oxidase de função mista microssomal em 4-

hidroxiciclofosfamida, ao sofrer oxidação no carbono de posição 4 e, com a abertura espontânea do anel, se converte em aldofosfamida, composto instável que sofre conversão em acroleína e fosforamida mostarda, seus metabólitos ativos (Figura 4) que interferem no crescimento celular, ao se ligar covalentemente ao DNA, levando à quebra de filamentos, interrupção da síntese de DNA e morte celular (SANTOS *et al.*, 2007). Esta droga não possui atividade citotóxica contra células de câncer *in vitro*, tornando-se ativa somente após ser oxidada por enzimas hepáticas, além de que a CF inalterada possui baixo poder de ligação com as proteínas do plasma, o que significa que a droga em si possui pouca ação sobre o crescimento celular (MOORE, 1991). Apesar de ser excretada na forma de metabólitos, cerca de 5-25% da dose é excretada na urina sem sofrer alteração (MOORE, 1991).

Figura 4 – Mecanismo de degradação oxidativa de ciclofosfamida no DNA para formação de metabólitos reativos ciclofosfamida e sua forma ativa.



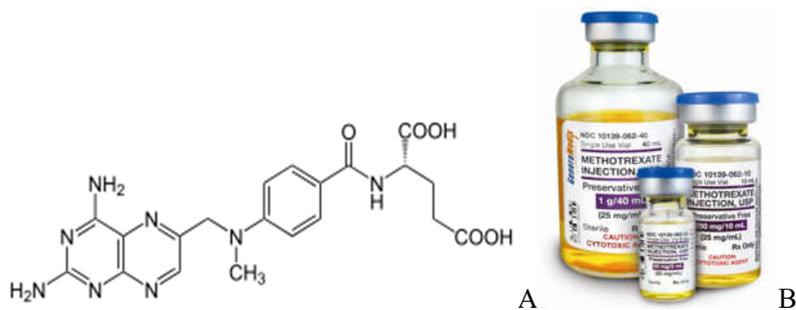
Fonte: Adaptado de SANTOS *et al.* (2007).

Duas vias de administração da droga podem ser utilizadas, dependendo do tipo de tratamento necessário: oral em doses que variam de 100 a 200 mg por dia para seu uso como imunossupressor ou em alguns

casos malignos, e intravenosa quando as doses devem ser maiores, sendo que para o tratamento de muitos tumores malignos, doses entre 600 e 1000 mg/m² são administradas a cada três ou quatro semanas e, no caso de transplantes de medula óssea, quando sua maior dosagem é recomendada, aplica-se até 240 mg/kg diariamente por quatro dias seguidos (MOORE, 1991).

Outro quimioterápico bastante utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer, doenças autoimunes e gravidez ectópica é o metotrexato (também conhecido como metotrexano ou MTX) (JOLIVET; CHABNER, 1983) (Figura 5). Esta substância é um dos antimetabólitos e antifolatos mais utilizados desde a introdução clínica deste grupo de quimioterápicos em 1948, atuando na inibição do metabolismo do ácido fólico por ser análogo a este (JOLIVET; CHABNER, 1983; MORRISON; DEDRICK; LUTZ, 1987). Sua ação terapêutica consiste na forte ligação entre o MTX e diidrofolato redutase, uma enzima necessária na produção dos cofatores de folato imprescindíveis para a biossíntese de purinas, timidilatos e outros aminoácidos, ocasionando então a interrupção da síntese de DNA e replicação celular, além de causar morte celular (JOLIVET; CHABNER, 1983) (Figura 6). Entretanto, para que ocorra a morte celular, é necessário que mais de 95% de ligação completa de MTX com a enzima ocorra, já que as células possuem uma quantidade de diidrofolato redutase maior que a necessária para a produção adequada de cofatores de folato (JACKSON; HARRAP, 1973;1979; MORRISON *et al.*, 1987).

Figura 5 – Estrutura química do metotrexato (A) e sua versão comercial injetável (B).

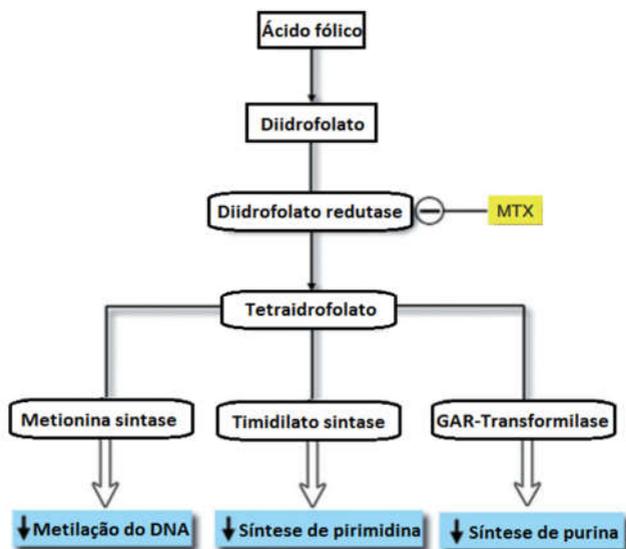


Fonte: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/formulas/metotrexato.jpg>, <https://br.pinterest.com/ALittleBitOfAA/methotrexate-articles/>

O MTX pode ser administrado por diferentes vias, como a oral, intravenosa, intramuscular, intratecal, subcutânea e intraóssea, dependendo da doença a ser tratada. Doses baixas por via oral apresentam rápida absorção gastrointestinal, enquanto altas doses são absorvidas de maneira irregular (PIOTO, 2007). Já quando administrado na circulação sistêmica, o MTX difunde-se e se acumula nos glóbulos vermelhos e soro (PIOTO, 2007).

Após a administração de altas doses ($\geq 500 \text{ mg/m}^2$), o MTX é convertido em poliglutamatos (MTX-PG) através da adição de resíduos de glutamyl pela ação enzimática de folilpoliglutamato sintetase (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). Os MTX-PG formados apresentam intensa carga, dificultando sua passagem para fora da membrana plasmática, aumentando assim seu efeito inibitório, ficando retido nos rins por várias semanas e no fígado por vários meses (BRUNTON *et al.*, 2012; LACASCE, 2011).

Figura 6 – Diagrama esquemático do mecanismo de ação do metotrexato (MTX). A ação antiproliferativa do MTX é mediada pela inibição das vias folato-dependentes pela competição com o ácido fólico pelos sítios de ligação, devido à sua maior afinidade com a enzima diidrofolato redutase.



Fonte: Adaptado de SHEN *et al.* (2012).

1.8 JUSTIFICATIVA

A alta incidência de câncer faz dessa doença um problema de saúde pública mundial (FERLAY *et al.*, 2015), não sendo, portanto, incomum o contato de insetos com cadáveres de pessoas que fizeram tratamento quimioterápico com substâncias citotóxicas, que poderiam interferir no metabolismo da fauna cadavérica ao se alimentarem de tecidos com a presença destas substâncias. Entretanto, não há registro de trabalhos que analisem a influência de quimioterápicos em insetos, evidenciando a importância do conhecimento do desenvolvimento de larvas de moscas na presença destas substâncias para evitar um cálculo da estimativa de IPM errôneo. Desta forma, nossa hipótese inicial foi de que ambos medicamentos, por serem citotóxicos, afetariam negativamente o desenvolvimento e a sobrevivência destes dípteros.

Estudos de entomologia forense, e principalmente a entomotoxicologia, em Santa Catarina são escassos, o que evidencia a necessidade de trabalhos como este, que auxiliam na investigação de crimes envolvendo mortes (MOURA; ALMEIDA; CARVALHO, 2013).

1.9 OBJETIVOS

1.9.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito de quimioterápicos no desenvolvimento pós-embrionário de moscas da espécie *C. megacephala*.

1.9.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito de ciclofosfamida *in vitro* no crescimento, tempo de desenvolvimento, razão sexual e taxas de sobrevivência em *C. megacephala*;

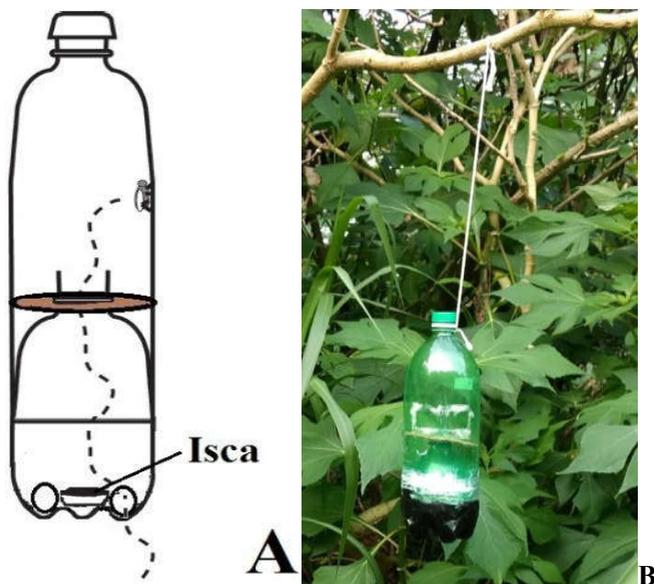
Avaliar o efeito de metotrexato *in vitro* no crescimento, tempo de desenvolvimento, razão sexual e taxas de sobrevivência em *C. megacephala*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DOS ADULTOS

As moscas foram coletadas nos arredores do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) do Centro de Ciências Biológicas (CCB), localizado no *campus* da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), no bairro Córrego Grande, município de Florianópolis, SC. Foram utilizadas armadilhas confeccionadas a partir de duas garrafas plásticas, uma cortada próximo ao fundo e outra próximo ao gargalo, sendo que a última se encaixa dentro da primeira, como um funil. A base menor da garrafa, com perfurações para entrada das moscas, é então acoplada ao conjunto com fita adesiva (Figura 7a). Nesta base é fixado um recipiente plástico coberto com voal, contendo isca de carne bovina. As armadilhas ficaram suspensas a aproximadamente 1,5 m do solo e foram revisadas diariamente (Figura 7b). Esta metodologia foi realizada como descrita por FERREIRA (1978).

Figura 7– Armadilha usada para captura de moscas. A) Esquema representando a armadilha. B) Armadilha em campo.



Fonte: A) WOLFF (2015). B) Arquivo pessoal.

As moscas coletadas foram transferidas para gaiolas de triagem, feitas de acrílico transparente e dimensões 39 x 39 x 39 cm com duas aberturas nas laterais vedadas com voal e duas circulares na frente, onde mangas de tecido foram acopladas para facilitar o acesso ao interior da gaiola (Figura 8). Estes insetos foram mantidos na gaiola por 48 horas para ambientação ao laboratório antes da identificação.

Para a identificação das espécies foram utilizadas as chaves dicotômicas de CARVALHO; MELLO-PATIU (2008) e KOSMANN *et al.* (2013). Os indivíduos da espécie de interesse foram transferidos para a gaiola de criação, confeccionada da mesma forma que a de triagem.

Figura 8 – Gaiola de triagem/criação dos indivíduos adultos.



2.2 MANUTENÇÃO DAS COLÔNIAS

As moscas foram alimentadas com dieta artificial composta por açúcar refinado, leite em pó e levedo de cerveja nas mesmas proporções, misturada com água destilada até obter uma consistência pastosa e homogênea, e água destilada *ad libitum* (MARCHIORI; PRADO, 1999).

A dieta e água eram trocadas em dias alternados, e a limpeza das

gaiolas era realizada semanalmente.

2.3 ESTABELECIMENTO DA GERAÇÃO F1

Após a separação das moscas selvagens, uma placa plástica contendo 50 g de carne bovina moída foi colocada na gaiola de criação para oviposição (Figura 9). Os ovos ou larvas recém eclodidas foram transferidos para um recipiente plástico contendo cerca de 100g de carne moída, que foi colocado dentro de outro recipiente plástico maior contendo vermiculita como substrato para pupariação (Figura 10), sendo mantido até a emergência dos adultos em incubadora BOD digital (CienLab) no escuro a 25°C.

Figura 9 – Carne bovina moída para oviposição, com a massa de ovos de *C. megacephala* em destaque.



Figura 10 – Recipiente onde eram mantidos os espécimes de *C. megacephala* até a emergência dos adultos.



Após a emergência, as moscas foram transferidas para uma nova gaiola de criação (geração F1) e alimentadas com a dieta artificial descrita anteriormente. Para o desenvolvimento dos ovários, foi disponibilizado por sete dias um recipiente contendo carne bovina moída (GRASSBERGER; REITER, 2001). Este recipiente era então retirado e após cerca de três a cinco dias, um novo recipiente contendo 50 g de carne bovina moída foi colocado na gaiola para oviposição.

2.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

2.4.1 Ciclofosfamida

Após incubação dos ovos (geração F2), 100 larvas em primeiro ínstar recém-emergidas foram colocadas em recipientes contendo 100 g de carne bovina moída misturadas com 5 ml de uma solução de CF em água destilada em diferentes concentrações, determinadas a partir da dose inicial intravenosa (DIIv) de CF que é de 50 mg/kg (GENUXAL®, 2013). As doses utilizadas foram: 0,5 mg/ml (1/2 DIIv), 1 mg/ml (1 DIIv), 2 mg/ml (2 DIIv) e 4 mg/mL (4 DIIv), além do controle negativo (água destilada). Cada recipiente foi colocado dentro de outro maior contendo vermiculita e tampado com tecido voal e elástico, sendo mantidos em incubadora BOD digital a 25°C. Cada tratamento teve três réplicas, incluindo o controle. Sendo assim, 300 larvas foram testadas para cada tratamento, totalizando 1500 larvas analisadas.

A cada 12 horas, três larvas eram retiradas de cada réplica, mortas em água quente (~80°C) e medidas com o auxílio de um

paquímetro digital, conforme BUGELLI *et al.* (2016). Este procedimento foi realizado até o período de abandono da dieta pelas larvas, sendo que a observação dos experimentos continuou a ser realizada a cada 12 horas para anotar o tempo de pupariação e emergência dos adultos.

As moscas foram mortas por congelamento, sexadas e a asa esquerda retirada e fixada em lâmina de vidro para medição do segmento da asa até a alula (HAYES; WALL; SMITH, 1998) (Figura 11), utilizando-se um paquímetro digital para determinação do tamanho do inseto adulto.

Figura 11 – Asa esquerda de *C. megacephala*. A barra em vermelho mostra o segmento da asa medido com paquímetro digital.



2.4.2 Metotrexato

Assim como no experimento com a ciclofosfamida, 100 larvas em primeiro ínstar recém-emergidas foram colocadas em recipientes contendo 100 g de carne bovina moída misturadas com 5 ml de solução de MTX em diferentes concentrações, determinadas a partir da dose inicial intraperitoneal (DIip) de MTX que é de 10 mg/kg (TURK, 1964). As doses utilizadas foram: 0,1 mg/ml (1/2 DIip) 0,2 mg/ml (1 DIip), 0,4 mg/ml (2 DIip) e 0,8 mg/ml (4 DIip), além do controle negativo (água destilada). Cada recipiente foi colocado dentro de outro maior contendo vermiculita e tampado com tecido voal e elástico, sendo mantidos em incubadora BOD digital a 25°C. Cada tratamento teve três réplicas,

incluindo o controle. Sendo assim, 300 larvas foram testadas para cada tratamento, totalizando 1500 larvas analisadas.

Os procedimentos de retirada, morte e medição de larvas, tempos de pupariação, contagem de pupas e tempo de emergência dos adultos foi realizado como descrito para CF.

2.4.3 Controle de sobrevivência

Um experimento controle de sobrevivência foi realizado para os tratamentos com CF e MTX, conforme descrito anteriormente, porém sem a retirada de larvas a cada 12 horas, para evitar que a manipulação da carne contendo as larvas interfira na análise de sobrevivência de *C. megacephala*. Com este experimento foram obtidos os dados para cálculo de taxas de sobrevivência larval e total, além da razão sexual.

2.5 ANÁLISE DOS DADOS

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism vers. 6.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). O teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov foi realizado para verificar a normalidade dos dados, assim como Kruskal-Wallis, ANOVA one-way e teste Tukey *post-hoc* para verificar as possíveis diferenças entre os tratamentos. Para o parâmetro de proporção entre machos e fêmeas que emergiram nos diferentes tratamentos, foi realizada análise de qui-quadrado. Em todas as análises foi considerada significativa a diferença quando $p \leq 0,05$ ($\alpha=5\%$). Os gráficos foram plotados com o auxílio do software Microsoft Excel® 2016.

3 RESULTADOS

3.1 CICLOFOSFAMIDA

A média do tamanho larval nos diferentes tratamentos com ciclofosfamida não diferiu significativamente do controle (Tabela 1). As curvas de desenvolvimento larval são mostradas na figura 12.

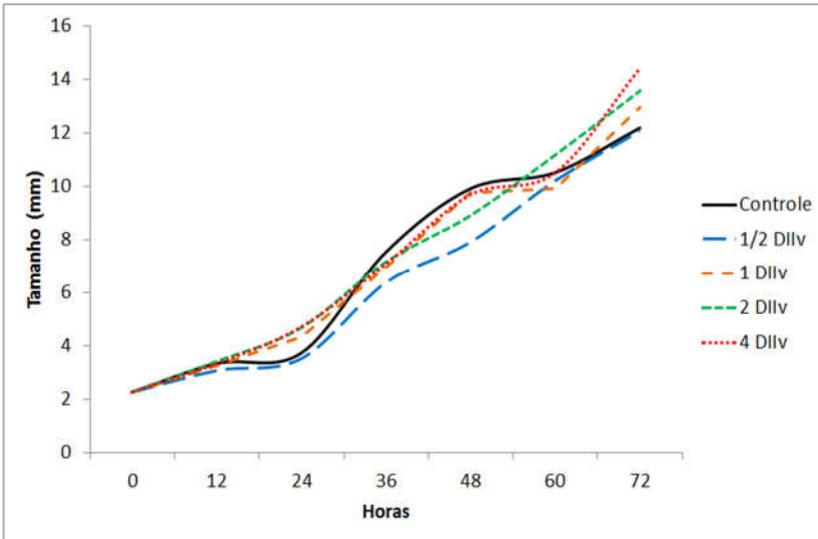
Tabela 1 – Média e desvio padrão do comprimento em milímetros* das larvas de *C. megacephala* registrado a cada 12h expostas a diferentes concentrações de ciclofosfamida (n=9). DIIv: Dose Inicial Intravenosa.

Idade (h)	Controle	½ DIIv	1 DIIv	2 DIIv	4 DIIv
12	3,35 ±0,30a	3,08 ±0,28a	3,26 ±0,41a	3,42 ±0,32a	3,34 ±0,29a
24	3,74 ±0,80a	3,53 ±0,98a	4,32 ±1,48a	4,68 ±0,88a	4,72 ±1,26a
36	7,55 ±0,54a	6,39 ±0,28a	6,94 ±1,40a	7,17 ±0,82a	7,1 ±0,54a
48	9,93 ±1,56a	7,93 ±1,98a	9,77 ±1,61a	8,91 ±1,46a	9,7 ±1,62a
60	10,53 ±2,66a	10,23 ±2,28a	9,9 ±2,38a	11,17 ±1,59a	10,52 ±2,33a
72	12,2 ±3,23a	12,09 ±3,75a	12,97 ±1,36a	13,56 ±1,05a	14,43 ±0,81a

ANOVA: 12h ($F=1,469$; $p=0,229$), 24h ($F=2,163$; $p=0,091$), 36h ($F=2,282$; $p=0,077$), 48h ($F=2,535$; $p=0,055$), 60h ($F=0,411$; $p=0,799$); 72h ($F=1,528$; $p=0,212$). ($\alpha=5\%$).

*Média e desvio padrão seguidos da mesma letra na mesma linha não diferiram significativamente através da análise ANOVA.

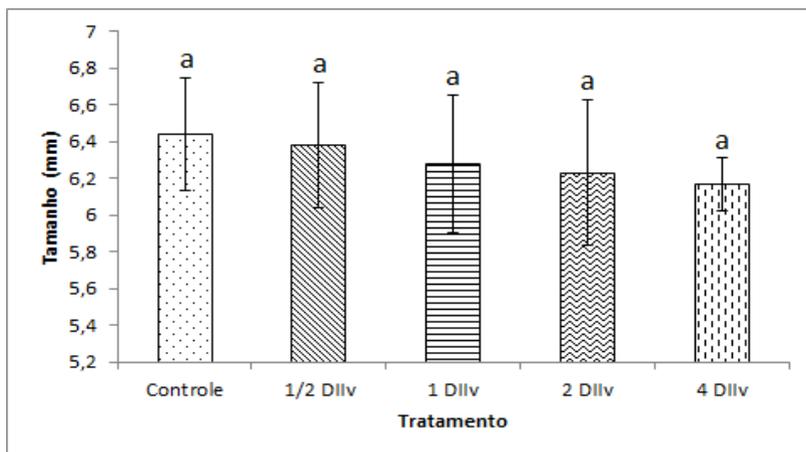
Figura 12 – Curvas de desenvolvimento larval de *C. megacephala* criada sob diferentes concentrações de ciclofosfamida. DIIv: Dose Inicial Intravenosa.



Seguindo o mesmo padrão observado nas larvas, no que se refere à média do comprimento das asas dos adultos, também não foi observada diferença significativa entre os tratamentos ($F=1,388$, $p = 0,244$) (Figura 13).

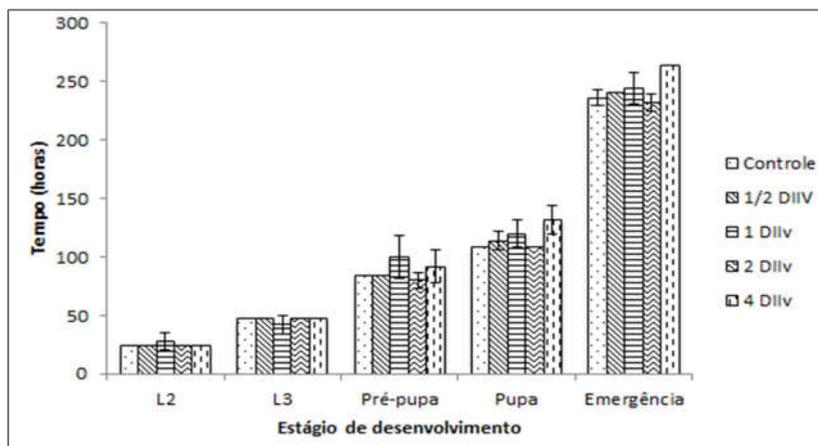
Em relação à duração de cada ínstar larval, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Entretanto, as larvas que foram mantidas em dieta acrescida de 4 DIIv de CF levaram um tempo significativamente maior para empupar ($F=4,179$; $p=0,035$) e emergir ($F=4,846$; $p=0,028$) em relação ao controle (Figura 14).

Figura 13 – Comprimento médio e desvio padrão* das asas de *C. megacephala* criada sob diferentes concentrações de ciclofosfamida. DIIv: Dose Inicial Intravenosa.



* As barras com letras iguais não diferiram significativamente através da análise ANOVA ($\alpha=5\%$).

Figura 14 – Tempo de desenvolvimento e desvio padrão, em horas, de cada estágio de *C. megacephala* criada sob diferentes concentrações de ciclofosfamida. DIIv: Dose Inicial Intravenosa.



Não foram observadas diferenças estatisticamente significativa entre as taxas de sobrevivência larval do grupo controle e dos grupos

tratados com CF ($p=0,391$), sendo que este mesmo resultado foi encontrado na análise de sobrevivência total ($p=0,176$) (Tabela 2). A partir da emergência dos adultos, foi realizado um teste de qui-quadrado para verificar se houve desvio da proporção sexual esperada de 1:1 entre os grupos de tratamento. Os resultados obtidos mostram que não houve desvio significativo da proporção esperada (Tabela 2).

Tabela 2 – Média e desvio padrão das taxas de sobrevivência larval e total (%)* e proporção sexual de *C. megacephala* criada sob diferentes dosagens de ciclofosfamida em relação ao grupo controle ($n=300$). DIIv – Dose inicial intravenosa.

Tratamento	Taxa de sobrevivência larval (%)	Taxa de sobrevivência total (%)	Proporção sexual	
			Machos	Fêmeas
Controle	98±2,38 a	93,5±2,12 a	49%	51%
½ DIIv	95±2,65 a	93,67±4,93 a	52%	48%
1 DIIv	84±19,97 a	76±21,66 a	54%	46%
2 DIIv	90,78±10,73 a	88,67±11,93 a	54%	46%
4 DIIv	86,67±5,77 a	81±6,24 a	55%	45%

*Média e desvio padrão seguidos da mesma letra em uma coluna não diferiram significativamente através da análise Kruskal-Wallis ($\alpha=5\%$).

3.2 METOTREXATO

Foram observadas diferenças significativas na média do tamanho larval a partir de 12h de exposição das larvas ao MTX (Tabela 3). Entretanto, essa diferença no tamanho foi heterogênea ao longo do tempo. Após 12 horas, observa-se uma diferença estatisticamente significativa entre o tamanho das larvas do grupo controle e do grupo exposto à maior dose de MTX ($p=0,0018$). Em 24h e 48h, fica evidente a tendência a uma resposta dose-dependente, com larvas menores conforme a dose de MTX aumenta. As curvas de desenvolvimento larval podem ser observadas na figura 15.

Seguindo o mesmo padrão observado nas larvas, no que se refere à média do comprimento das asas dos adultos, é possível observar que as

moscas emergidas do tratamento controle foram significativamente maiores que aquelas expostas ao MTX ($F=16,32$; $p < 0,0001$) (Figura 16).

Tabela 3 – Média e desvio padrão do comprimento em milímetros* das larvas de *C. megacephala* registrado a cada 12 horas expostas a diferentes concentrações de metotrexato ($n=9$). DIIP – Dose inicial intraperitoneal.

Idade (h)	Controle	½ DIIP	1 DIIP	2 DIIP	4 DIIP
12	3,24 ±0,07 a	3,01 ±0,19 a,b	3,36 ±0,34 a	3,11 ±0,20 a,b	2,78 ±0,07 b
24	6,12 ±0,58 a	5,92 ±1,12 a	5,04 ±0,28 a,b	4,67 ±0,41 b	4,03 ±0,46 b
36	8,10 ±0,30 a	7,73 ±0,34 a,b	8,05 ±0,70 a	7,16 ±0,16 a,b	7,07 ±0,46 b
48	12,47 ±0,76 a	11,33 ±1,73 a,b	9,22 ±1,61 b,c	8,96 ±0,88 b,c	7,66 ±1,52 c
60	15,85 ±0,52 a	14,45 ±0,14 a,b	14,62 ±0,51 a,b	12,41 ±0,26 c	12,72 ±1,73 c
72	16,66 ±0,19 a	16,52 ±0,57 a	15,42 ±1,37 a,b	14,27 ±1,35 b	14,90 ±2,15 a,b

ANOVA: 12h ($F=5,196$; $p=0,002$), 24h ($F=9,179$; $p<0,0001$), 36h ($F=3,166$; $p=0,024$), 48h ($F=8,941$; $p<0,0001$), 60h ($F=12,94$; $p<0,0001$); 72h ($F=3,818$; $p=0,010$). ($\alpha=5\%$).

*Média e desvio padrão seguidos da mesma letra na mesma linha não diferiram significativamente através da análise ANOVA.

Figura 15 – Curvas de desenvolvimento larval de *C. megacephala* criada sob diferentes concentrações de metotrexato. DIIp: Dose Inicial Intraperitoneal.

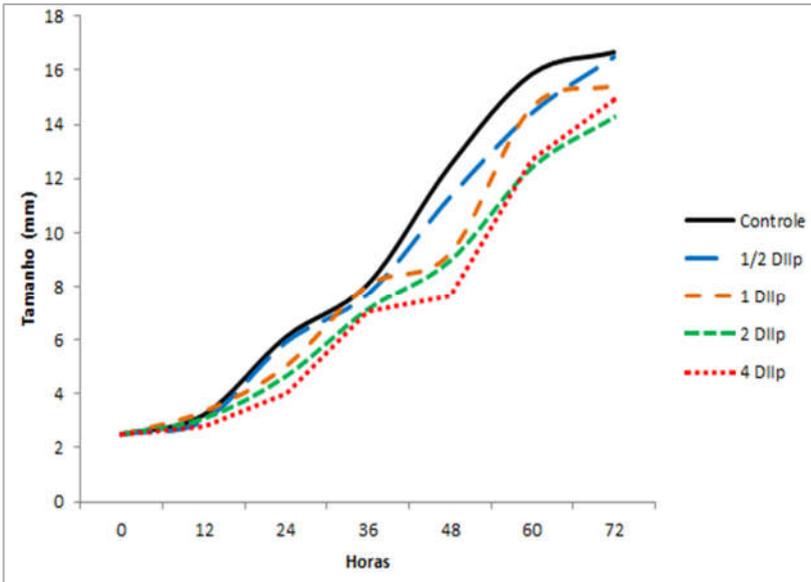
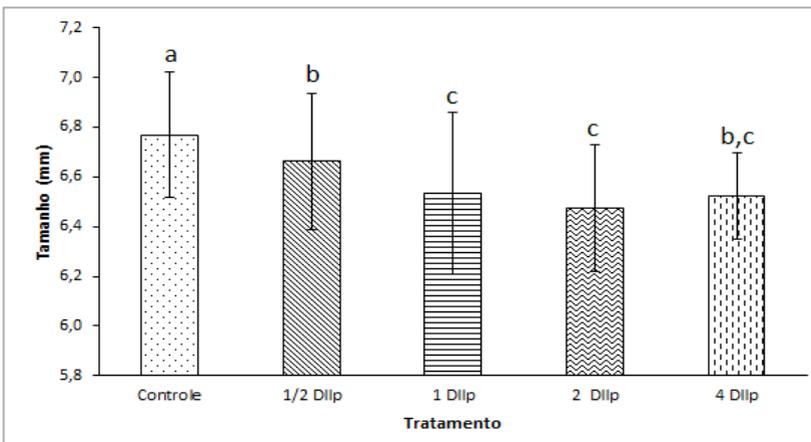


Figura 16 – Comprimento médio e desvio padrão* das asas de *C. megacephala* criada sob diferentes concentrações de metotrexato. DIIp – Dose inicial intraperitoneal.



* As barras com letras iguais não diferiram significativamente através da análise ANOVA ($\alpha=5\%$).

No que se refere à duração de cada ínstar larval e tempo de pupariação e emergência, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle (Figura 17). Entretanto, ao comparar o tempo de desenvolvimento até o estágio de pré-pupa, quando há o abandono da dieta pelas larvas, verificou-se uma diferença significativa entre os tratamentos com ½ DIIp e 4 DIIp de MTX ($p=0,0315$).

De acordo com os resultados das análises de sobrevivência, é possível observar que a taxa de sobrevivência larval foi menor nos grupos tratados com MTX a partir de 1 DIIp ($F=8,874$; $p=0,0035$). Já a taxa de sobrevivência total foi menor nos grupos tratados com MTX desde ½ DIIp, mostrando uma clara resposta dose-dependente (Tabela 4). A partir da emergência dos adultos, foi realizado um teste de qui-quadrado para verificar se houve desvio da proporção sexual esperada de 1:1 entre os grupos de tratamento. Os resultados obtidos mostram que houve desvio da proporção esperada nos tratamentos 1 DIIp de MTX ($dF=1$; $p=0,035$) e 2 DIIp de MTX ($dF=1$; $p=0,0003$), obtendo-se um número significativamente maior de moscas fêmeas que machos. Apesar desse desvio não ter sido estatisticamente significativo no tratamento com 4 DIIp MTX, observou-se também o mesmo padrão de proporção maior de fêmeas emergidas do que machos.

Figura 17 – Tempo de desenvolvimento e desvio padrão, em horas, de cada estágio de *C. megacephala* criada sob diferentes concentrações de metotrexato. DIIp – Dose inicial intraperitoneal.

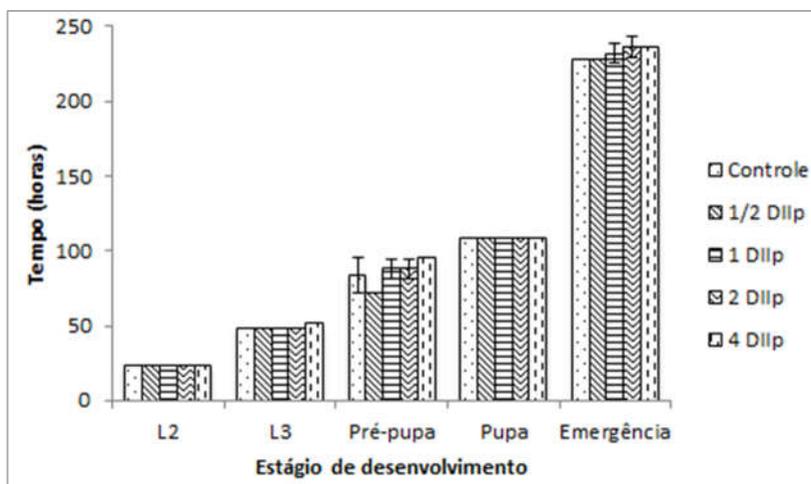


Tabela 4 – Média e desvio padrão das taxas de sobrevivência larval e total (%)* e proporção sexual de *C. megacephala* criada sob diferentes dosagens de metotrexato em relação ao grupo controle (n=300). DIIp: Dose Inicial Intraperitoneal.

Tratamento	Taxa de sobrevivência larval (%)	Taxa de sobrevivência total (%)	Proporção sexual	
			Machos	Fêmeas
Controle	98±2,38 a	93,5±2,12 a	49%	51%
½ DIIp	90±3,61 a	84,67±4,51 a	48%	52%
1 DIIp	68,67±10,69 a,b	50,67±8,5 b	42%	58%
2 DIIp	46,33±18,61 b	21±8 c	29%	71%
4 DIIp	52,33±14,29 b	24,33±10,12 c	40%	60%

*Média e desvio padrão seguidos da mesma letra em uma coluna não diferiram significativamente através da análise Kruskal-Wallis ($\alpha=5\%$).

4 DISCUSSÃO

A literatura relacionada à entomotoxicologia forense referente à quimioterápicos é quase inexistente, não sendo encontrado nenhum estudo controlado até o presente momento avaliando os efeitos deste grupo de medicamentos no desenvolvimento pós-embrionário de insetos de interesse forense. Entretanto, HAYMAN; OXENHAM (2015) compararam o processo de decomposição de um cadáver humano que era diabético, fazendo uso apenas de insulina, com outro que, devido a um câncer de pulmão, foi tratado com radioterapia, quimioterápicos não especificados e vários antibióticos (ceftriaxona, azitromicina, vancomicina, nistatina e piperacilina). Apesar de os dois cadáveres terem sido mantidos nas mesmas condições ambientais, inclusive ambos permanecendo no mesmo local, aquele que recebeu o tratamento para câncer se decompôs de maneira significativamente mais lenta, além de nenhuma mosca ter utilizado o corpo para oviposição, enquanto que o outro cadáver se decompôs normalmente, as moscas ovipuseram no corpo, as larvas se desenvolveram e migraram para o processo de pupariação. Os autores sugerem que a ausência de moscas no cadáver pode ter ocorrido devido não somente ao uso de antibióticos que causaram uma depleção na microbiota, mas por uma combinação dos efeitos causados por radioterapia, imunossupressão por uso de medicamentos citotóxicos e o tratamento com múltiplos antibióticos.

Estudos com outros fármacos e seus metabólitos indicaram que estes podem influenciar não somente na atração ou repelência das moscas necrófagas, mas também no tamanho destes insetos. OLIVEIRA *et al.* (2009) analisaram o efeito de brometo de butilescopolamina (Buscopan®) no desenvolvimento de *C. megacephala*, constatando que as larvas expostas ao medicamento apresentaram tamanho corporal menor que o grupo controle. O mesmo resultado foi observado no trabalho de (BOUREL *et al.*, 2001), que avaliou o efeito de diferentes concentrações de morfina no desenvolvimento de larvas de *Lucilia sericata* (Meigen). Já o estudo de GEORGE *et al.* (2009) sobre o efeito dessa mesma droga em larvas de *Calliphora stygia* (Fabricius) verificou que, independentemente da dosagem de morfina, o crescimento das larvas não diferiu significativamente em relação ao grupo controle. Isso significa que diferentes espécies de Diptera podem sofrer efeitos da mesma droga de maneiras diferentes. No presente estudo, verificou-se que a CF não exerceu nenhum impacto no tamanho destes insetos, enquanto que a exposição ao MTX teve uma influência negativa, tanto nas larvas quanto nos adultos.

Em relação ao tempo de desenvolvimento para cada estágio, os resultados do experimento com CF mostraram que houve um atraso de 24 horas no tempo de pupariação e 28 horas no tempo de emergência das larvas expostas à dose mais alta de CF em relação ao controle. Entretanto, quando comparado à tabela de vida de *C. megacephala* proposta por BARCELOS (2014), que é utilizada para a estimativa de IPM de casos de cadáveres encontrados na região de Florianópolis-SC, o atraso no tempo de desenvolvimento total em larvas expostas à dose mais elevada de CF foi de 22 horas. Isso significa que, em ocorrências de mortes de pessoas que faziam o uso de altas doses de CF, como no caso de transplante de medula óssea, em que o paciente recebe doses diárias de até 240 mg/kg durante um período de quatro dias (MOORE, 1991), este atraso deve ser levado em consideração na estimativa de IPM. Diversos estudos já relataram como as diferenças no tempo de desenvolvimento de insetos expostos a outros fármacos podem causar erros na estimativa do IPM. GOFF *et al.* (1993), em um estudo sobre a influência do antidepressivo amitriptilina em *Parasarcophaga ruficornis* (Fabricius), afirmaram que a estimativa do IPM poderia levar a um erro de até 77 horas, devido ao atraso na duração dos estágios larval e pupal, caso o uso do fármaco fosse negligenciado. Já no estudo de (CARVALHO, L. M.; LINHARES; TRIGO, 2001) com o medicamento diazepam, um benzodiazepínico utilizado como calmante e antiepiléptico, foi verificado que o tempo de desenvolvimento de larvas de *Chrysomya putoria* (Wiedemann) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) alimentadas com fígado de coelhos que receberam duas vezes a dose letal de diazepam se desenvolveram mais rapidamente que as larvas do grupo controle.

No experimento com MTX, não foram encontradas diferenças significativas entre o tempo de desenvolvimento de *C. megacephala* do tratamento controle e tratadas com o medicamento. Se utilizado o método de estimativa de IPM baseado apenas no estágio de desenvolvimento do inseto mais velho encontrado no cadáver, não haveria erro na estimativa de IPM causado pela droga. Entretanto, para uma maior exatidão na estimativa, alguns métodos utilizam as dimensões das larvas para especificar em que ponto do desenvolvimento ela se encontra, já que uma larva pode permanecer em terceiro ínstar, por exemplo, durante dias, e o seu tamanho indicará há quantas horas, aproximadamente, ela se encontra neste estágio (RICHARDS; PATERSON; VILLET, 2008; SHARMA *et al.*, 2015). Como o MTX influenciou negativamente o tamanho das larvas, mesmo que o tempo de desenvolvimento não tenha sido afetado, fica clara a necessidade em considerar um possível erro na estimativa do IPM, dependendo do método utilizado, em casos onde o cadáver fazia o

uso do medicamento quando em vida. Além disso, é possível que a alta mortalidade das larvas expostas ao MTX também interfira na emissão de um laudo com a estimativa do IPM, já que os insetos adultos são necessários para a identificação da espécie em questão e consequente utilização de sua tabela de vida para calcular a estimativa de IPM. RENNER; TREUDLER; SIMON (2008) apresentaram um estudo de caso com terapia larval utilizando *L. sericata*, em que a paciente, que tinha artrite reumatoide, fizera uso de imunossuppressores como MTX e ciclosporina por 37 anos. Todas as larvas colocadas nas ulcerações para a limpeza dos tecidos necrosados morreram dentro de 48-72 horas. Os autores citam apenas a ciclosporina como responsável pela morte das larvas, pois, além de ser o último medicamento que a paciente estava usando, há estudos relatando a toxicidade do composto para larvas de mosquito, afetando principalmente as mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de Golgi (BOLAS-FERNANDEZ; GRENCIS; WAKELIN, 1988; WEISER *et al.*, 1989). No entanto, conforme os resultados do presente estudo, a exposição das larvas ao MTX pode ter sido também um fator que contribuiu para a mortalidade.

Estudos prévios já demonstraram que o tamanho dos califórídeos adultos depende de diversos fatores como: latitude da população (ALVES; BELO, 2002; BRYANT, 1977), sazonalidade (BLACK; KRAFSUR, 1986), temperatura e densidade larval (REIGADA; GODOY, 2006), além da quantidade e qualidade da alimentação durante o estágio larval (GOODBROD; GOFF, 1990; REIS *et al.*, 1994). Como não houve diferença significativa entre o tamanho dos adultos que foram criados em CF comparado aos do controle, é possível inferir que não houve diminuição na alimentação com a presença do medicamento. Já no caso dos experimentos com MTX, onde tanto as larvas quanto os adultos do tratamento controle foram significativamente maiores do que as expostas ao medicamento, é possível que as alterações organolépticas da carne tratada com a droga tenham prejudicado a alimentação das larvas.

Em relação à proporção sexual esperada, já foram relatadas duas situações em que houve preponderância na emergência de fêmeas em estudos feitos com *L. sericata*: competição (FEINBERG; PIMENTEL, 1966) e superpopulação (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2007). Em ambos os casos, o *stress* causado pelas condições ambientais desfavoráveis pode ter contribuído no desvio desta proporção. Essa pode ser uma das razões desta mesma tendência ter sido observada no presente estudo com larvas expostas ao MTX, já que a alteração das características organolépticas da carne possivelmente afetou a ingestão alimentar, causando este *stress*.

Existem estudos de genotoxicidade de ciclofosfamida em insetos, tais como a mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster* (Meigen) (BATISTE-ALENTORN *et al.*, 1995) e o gafanhoto *Oxya chinensis* (Thunberg) (REN; MA; GUO, 2002), causando aberrações cromossômicas nessas espécies. De acordo com os resultados deste trabalho com gafanhotos, a indução de efeito clastogênico em células desta espécie indica a possibilidade de existir oxidases análogas às enzimas presentes no fígado capazes de promover a bioativação da ciclofosfamida. Contudo, não existem informações disponíveis para outras espécies de insetos, e mesmo assim, a metabolização nestes é diferente do que nos mamíferos, podendo acarretar efeitos distintos. Por essa razão, fica evidente a necessidade da execução deste estudo com a utilização de carcaças de modelos animais que receberam o tratamento para a dieta das larvas.

5 CONCLUSÕES

- A CF atrasou o tempo total de desenvolvimento de *C. megacephala*, o que deve ser levado em consideração quando da estimativa do IPM;
- Larvas e adultos de *C. megacephala* expostas ao MTX foram menores e apresentaram maior mortalidade.
- A exposição das larvas à CF não influenciou significativamente na mortalidade, razão sexual e tamanho das larvas e adultos.
- O MTX não influenciou no tempo de desenvolvimento de *C. megacephala*.
- A exposição de larvas de *C. megacephala* ao MTX ocasionou uma maior emergência de fêmeas.

6 PERSPECTIVAS

Fica evidente a necessidade de estudos utilizando modelos animais para uma maior confiabilidade dos dados, já que a metabolização dos medicamentos poderia influenciar nos resultados obtidos. Além disso, como diferentes espécies podem ser afetadas de maneiras distintas pelas mesmas drogas, a repetição deste estudo com outras espécies de interesse forense é importante para a perícia criminal envolvendo a entomologia forense.

Ademais, por existir diferentes classes de quimioterápicos utilizados no tratamento de vários tipos de câncer, a repetição deste estudo com outros quimioterápicos também é importante.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2015. **Atlanta: American Cancer Society**, 2015. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@editorial/documents/document/acspc-044552.pdf>>. Acesso em: 24 de mar. 2017.
- ALVES, S. M.; BELO, M. Morphometric variations in the housefly, *Musca domestica* (L.) with latitude. **Genetica**, v. 115, n. 3, p. 243-51, 2002.
- AMENDT, J.; KRETTEK, R.; ZEHNER, R. Forensic entomology. **Naturwissenschaften**, v. 91, n. 2, p. 51-65, 2004.
- ANDERSON, D. *et al.* Insect pollination of mango in northern Australia. **Crop and Pasture Science**, v. 33, n. 3, p. 541-548, 1982.
- ASHWORTH, J. R.; WALL, R. Responses of the sheep blowflies *Lucilia sericata* and *L. cuprina* to odour and the development of semiochemical baits. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 8, n. 4, p. 303-9, 1994.
- BARCELOS, P. S. **Desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) em temperatura ambiente e o efeito de baixas temperaturas sobre a eclosão dos ovos**. 2014. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- BARROS-CORDEIRO, K. B.; PUJOL-LUZ, J. R. Morfologia e duração do desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) em condições de laboratório. **Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)**, v. 50, n. 47, p. 709-717, 2010.
- BATISTE-ALENTORN, M. *et al.* Genotoxic evaluation of ten carcinogens in the *Drosophila melanogaster* wing spot test. **Experientia**, v. 51, n. 1, p. 73-6, 1995.
- BENECKE, M. A brief history of forensic entomology. **Forensic Science International**, v. 120, n. 1, p. 2-14, 2001.

BLACK, W. C.; KRAFSUR, E. S. Geographic variation in house fly size: adaptation or larval crowding. **Evolution**, v. 40, n. 1, p. 204-206, 1986.

BOLAS-FERNANDEZ, F.; GRENCIS, R. K.; WAKELIN, D. Cyclosporin A and *Trichinella spiralis*: anthelmintic effects in immunosuppressed mice. **Parasite Immunology**, v. 10, n. 1, p. 111-6, 1988.

BOUREL, B. *et al.* Morphine extraction in necrophagous insects remains for determining ante-mortem opiate intoxication. **Forensic Science International**, v. 120, n. 1-2, p. 127-31, 2001.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12^a Ed. Porto Alegre: AMGH Editora, 2012. 2112

BRYANT, E. H. Morphometric adaptation of the housefly, *Musca domestica* L., in the United States. **Evolution**, v. 31, n. 3, p. 580-596, 1977.

BUGELLI, V. *et al.* Effects of different storage and measuring methods on larval length values for the blow flies (Diptera: Calliphoridae) *Lucilia sericata* and *Calliphora vicina*. **Science & Justice**, in press 2016.

BYRD, J. H.; CASTNER, J. L. Insects of forensic importance. In: BYRD, J. H. e CASTNER, J. L. (Ed.). **Forensic entomology: The utility of arthropods in legal investigations**. Boca Raton: CRC Press, 2001. p.43-79.

BYRD, J. H.; PEACE, M. R. Entomotoxicology: Drugs, Toxins, and Insects. **Forensic Chemistry Handbook**, p. 483-99, 2011.

CARVALHO, C. J. B.; MELLO-PATIU, C. A. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52, n. 3, p. 390-406, 2008.

CARVALHO, L. M.; LINHARES, A. X.; TRIGO, J. R. Determination of drug levels and the effect of diazepam on the growth of necrophagous flies of forensic importance in southeastern Brazil. **Forensic Science**

International, v. 120, n. 1-2, p. 140-4, 2001.

CARVALHO, L. M. L.; LINHARES, A. X.; PALHARES, F. A. B. The effect of cocaine on the development rate of immatures and adults of *Chrysomya albiceps* and *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) and its importance to postmortem interval estimate. **Forensic Science International**, v. 220, n. 1, p. 27-32, 2012.

CARVALHO, L. M. L. *et al.* Observations on the succession patterns of necrophagous insects on a pig carcass in an urban area of Southeastern Brazil. **Forensic Medicine and Toxicology**, v. 5, p. 33-39, 2004.

COURTNEY, G. W. *et al.* Biodiversity of diptera. **Insect biodiversity: science and society**, p. 185-222, 2009.

DALY, H. V.; DOYEN, J. T.; PURCELL III, A. H. **Introduction to insect biology and diversity**. 2^a Ed. New York: Oxford University Press, 1998. 696 p.

DAVID, J. A.; ROCHA, T.; CAETANO, F. H. Ultramorphological characteristics of *Chrysomya megacephala* (Diptera, Calliphoridae) eggs and its eclosion. **Micron**, v. 39, n. 8, p. 1134-7, 2008.

FEINBERG, E. H.; PIMENTEL, D. Evolution of Increased "Female Sex Ratio" in the Blowfly (*Phaenicia sericata*) Under Laboratory Competition with the Housefly (*Musca domestica*). **The American Naturalist**, v. 100, n. 912, p. 235-244, 1966.

FERLAY, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, 2015.

FERNANDES, M. T. **Levantamento da fauna entomológica em carcaça de suíno em ambiente de restinga no Parque Estadual da Serra do Tabuleiro**. 2014. 101 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FERRAZ, A. C. *et al.* Evaluation of the influence of the antibiotic ciprofloxacin in the development of an Old World screwworm fly,

Chrysomya putoria. **Journal of Insect Science**, v. 14, p. 3, 2014.

FERREIRA, M. J. M. Sinantropia de dípteros muscoideos de Curitiba, Paraná. I. Calliphoridae. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 38, n. 2, p. 445-454, 1978.

GENUXAL: ciclofosfamida. Jônia Gurgel Moraes. Halle: Baxter Oncology GmbH, [2013]. Bula de remédio

GEORGE, K. A. *et al.* Effect of morphine on the growth rate of *Calliphora stygia* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) and possible implications for forensic entomology. **Forensic Science International**, v. 193, n. 1-3, p. 21-5, 2009.

GIANNOTTI, E.; SOUZA, A. R.; PREZOTO, F. Diversidade e ecologia comportamental de insetos. In: GOMES, L. (Ed.). **Entomologia Forense: novas tendências e tecnologias nas ciências criminais**. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Technical Books, 2010. p.122-132.

GOFF, M. L. *et al.* Effect of heroin in decomposing tissues on the development rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera, Sarcophagidae) and implications of this effect on estimation of postmortem intervals using arthropod development patterns. **Journal of Forensic Science**, v. 36, n. 2, p. 537-42, 1991.

GOFF, M. L.; BROWN, W. A.; OMORI, A. I. Preliminary observations of the effect of methamphetamine in decomposing tissues on the development rate of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect on the estimations of postmortem intervals. **Journal of Forensic Science**, v. 37, n. 3, p. 867-72, 1992.

GOFF, M. L. *et al.* Preliminary observations of the effects of amitriptyline in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect to estimation of postmortem interval. **Journal of Forensic Science**, v. 38, n. 2, p. 316-22, 1993.

GOFF, M. L.; OMORI, A. I.; GOODBROD, J. R. Effect of cocaine in tissues on the development rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 26, n. 2, p. 91-3,

1989.

GOFF, M. L.; OMORI, A. I.; GUNATILAKE, K. Estimation of postmortem interval by arthropod succession. Three case studies from the Hawaiian Islands. **The American Journal of Forensic Medicine and Pathology**, v. 9, n. 3, p. 220-5, 1988.

GOODBROD, J. R.; GOFF, M. L. Effects of larval population density on rates of development and interactions between two species of *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in laboratory culture. **Journal of Medical Entomology**, v. 27, n. 3, p. 338-43, 1990.

GRASSBERGER, M.; REITER, C. Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the isomegalen- and isomorphen-diagram. **Forensic Science International**, v. 120, n. 1-2, p. 32-6, 2001.

GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. Diversity and evolution. In: GRIMALDI, D. e ENGEL, M. S. (Ed.). **Evolution of the Insects**. New York: Cambridge University Press, 2005. p.1-36.

GUERRA, T. S. *et al.* Avaliação de possível interferência do tabagismo na ovoposição de larvas de Calliphoridae (Díptera) em carcaça de *Mus musculus* L.(Rodentia: Muriade) em São Paulo, SP. **Revista Brasileira de Criminalística**, v. 5, n. 1, p. 18-26, 2016.

GUIMARÃES, J. H.; DO PRADO, A. P.; BURALLI, G. M. Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera, Calliphoridae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 23, n. 4, p. 245-255, 1979.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. The importance, diversity, and conservation of insects. In: GULLAN, P. J. e CRANSTON, P. S. (Ed.). **The insects: an outline of entomology**. 4ª Ed. United Kingdom: Wiley-Blackwell, 2010. p.2-22.

GUNATILAKE, K.; GOFF, M. L. Detection of organophosphate poisoning in a putrefying body by analyzing arthropod larvae. **Journal of Forensic Science**, v. 34, n. 3, p. 714-6, 1989.

HAYES, E. J.; WALL, R.; SMITH, K. E. Measurement of age and

population age structure in the blowfly, *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Insect Physiology**, v. 44, n. 10, p. 895-901, 1998.

HAYMAN, J.; OXENHAM, M. Peri-mortem disease treatment: a little known cause of error in the estimation of the time since death in decomposing human remains. **Australian Journal of Forensic Sciences**, v. 48, n. 2, p. 171-185, 2015.

HIGLEY, L. G.; HASKELL, N. H. Insect development and forensic entomology. In: BYRD, J. H. e CASTNER, J. L. (Ed.). **Forensic entomology: The utility of arthropods in legal investigations**. Boca Raton: CRC Press, 2001. p.287-302.

INTRONA, F.; CAMPOBASSO, C. P.; GOFF, M. L. Entomotoxicology. **Forensic Science International**, v. 120, n. 1-2, p. 42-7, 2001.

JACKSON, R. C.; HARRAP, K. R. Studies with a mathematical model of folate metabolism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 158, n. 2, p. 827-41, 1973.

_____. Computer models of anticancer drug interaction. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 4, n. 2, p. 245-80, 1979.

JOLIVET, J.; CHABNER, B. A. Intracellular pharmacokinetics of methotrexate polyglutamates in human breast cancer cells. Selective retention and less dissociable binding of 4-NH₂-10-CH₃-pteroylglutamate⁴ and 4-NH₂-10-CH₃-pteroylglutamate⁵ to dihydrofolate reductase. **Journal of Clinical Investigation**, v. 72, n. 3, p. 773-8, 1983.

JUK, L. B. **Levantamento da fauna de artrópodes em carcaça de suíno em ambiente silvestre com vegetação de restinga na Ilha de Santa Catarina como subsídio para as ciências forenses**. 2013. 77 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

KEH, B. Scope and applications of forensic entomology. **Annual Review of Entomology**, v. 30, p. 137-54, 1985.

KOSMANN, C. *et al.* A list of current valid blow fly names (Diptera: Calliphoridae) in the Americas South of Mexico with key to the Brazilian species. **EntomoBrasilis**, v. 6, n. 1, p. 74-85, 2013.

LACASCE, A. S. Therapeutic use of high-dose methotrexate. 2011. Disponível em: < http://www.uptodate.com/contents/therapeutic-use-and-toxicity-of-high-dose-methotrexate?source=search_result&selectedTitle=5~150 >. Acesso em: 21 mar. 2017.

LINHARES, A. X.; THYSSEN, P. J. Entomologia Forense, míases e terapia larval. In: RAFAEL, J. A. *et al* (Ed.). **Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia**. Ribeirão Preto: Holos, 2012. p.151-163.

LORD, W. D.; STEVENSON, J. R. **Directory of forensic entomologists**. 2ª Ed. Washington: Walter Reed Army Medical Center, 1986. 42 p.

LÜ, Z. *et al.* Effect of ketamine on the development of *Chrysomya megacephala* (Diptera : Calliphoridae). **Chinese journal of parasitology & parasitic diseases**, v. 30, n. 5, p. 361-6, 2012.

MAJER, J. D. The conservation and study of invertebrates in remnants of native vegetation. In: SAUNDERS, D. *et al* (Ed.). **Nature Conservation: The Role of Remnants of Native Vegetation**. . Sydney: Surrey Beatty And Sons Pty Limited, 1987. p.333-335.

MARCHIORI, C. H.; PRADO, A. P. Tabelas de vida de *Fannia pusio* (Wiedmann) (Diptera: Fanniidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, p. 557-563, 1999.

MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, A. *et al.* Geographic origin affects larval competitive ability in European populations of the blow fly, *Lucilia sericata*. **Entomologia experimentalis et applicata**, v. 122, n. 2, p. 93-98, 2007.

MEIER, R.; KOTRBA, M.; FERRAR, P. Ovoviviparity and viviparity in the Diptera. **Biological Reviews**, v. 74, n. 3, p. 199-258, 1999.

MOORE, M. J. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 20, n. 3, p. 194-208, 1991.

MORRISON, P. F.; DEDRICK, R. L.; LUTZ, R. J. Methotrexate: Pharmacokinetics and assessment of toxicity. In: ASSESSMENT, S. O. P. I. R. (Ed.). **Drinking Water and Health: Pharmacokinetics in Risk Assessment**. Washington, D.C.: National Academy Press, v.8, 1987. p.410-27.

MOURA, M. O.; ALMEIDA, L. M.; CARVALHO, C. J. B. Avanços da entomologia forense na região sul. In: OLIVEIRA-COSTA, J. (Ed.). **Insetos “peritos”: a entomologia forense no Brasil**. Campinas: Millenium Editora, v.1, 2013. p.203-211.

MULLANY, C. *et al.* Effects of methamphetamine and its primary human metabolite, p-hydroxymethamphetamine, on the development of the Australian blowfly *Calliphora stygia*. **Forensic Science International**, v. 241, p. 102-11, 2014.

NUORTEVA, P. Sarcosaprophagous insects as forensic indicators. In: TEDESHI, G. C. *et al* (Ed.). **Forensic medicine: a study in trauma and environmental hazards**. Philadelphia: Saunders, v.2, 1977. p.1072-1095.

NUORTEVA, P. Empty puparia of *Phormia terraenovae* R.-D. (Diptera, Calliphoridae) as forensic indicators. **Annales Entomologici Fennici**, n. 33, p. 53–56, 1987.

O'BRIEN, C.; TURNER, B. Impact of paracetamol on *Calliphora vicina* larval development. **International Journal of Legal Medicine**, v. 118, n. 4, p. 188-9, 2004.

OLIVEIRA-COSTA, J. **Entomologia forense: quando os insetos são os vestígios**. 3ª Ed. Campinas: Millennium, 2011. 502 p.

OLIVEIRA, H. G. *et al.* The effect of Buscopan on the development of the blow fly *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Forensic Science**, v. 54, n. 1, p. 202-6, 2009.

PIOTO, L. R. **Estudo de biodisponibilidade relativa entre duas formulações de metotrexato em plasma humano utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em serie**. 2007. 94 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade

Estadual de Campinas, Campinas.

PUJOL-LUZ, J. R.; ARANTES, L. C.; CONSTANTINO, R. Cem anos da Entomologia Forense no Brasil (1908-2008). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52, p. 485-492, 2008.

REIGADA, C.; GODOY, W. A. C. Larval density, temperature and biological aspects of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 562-566, 2006.

REIS, S. F. *et al.* Variação em caracteres bionômicos em função de densidade larval em *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria* (Diptera, Calliphoridae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 38, n. 1, p. 33-34, 1994.

REN, Z.; MA, E.; GUO, Y. Chromosome aberration assays for the study of cyclophosphamide and *Bacillus thuringiensis* in *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acrididae). **Mutation Research**, v. 520, n. 1-2, p. 141-50, 2002.

RENNER, R.; TREUDLER, R.; SIMON, J. C. Maggots do not survive in pyoderma gangrenosum. **Dermatology**, v. 217, n. 3, p. 241-3, 2008.

RICHARDS, C. S.; PATERSON, I. D.; VILLET, M. H. Estimating the age of immature *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae), correcting for temperature and geographical latitude. **International Journal of Legal Medicine**, v. 122, n. 4, p. 271-9, 2008.

ROQUETTE-PINTO, E. Nota sobre a fauna cadavérica do Rio de Janeiro. **A Tribuna Médica**, v. 21, n. 1-11, p. 413-417, 1908.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6ª Ed. São Paulo: Roca, 1996. 1029 p.

SANTOS, F. V. **Efeito de anticoncepcional humano no desenvolvimento larval de *Chrysomya megacephala* (Fabricius)(Diptera: Calliphoridae) para uso forense**. 2013. 37 f. (Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

SANTOS, V. M. R. *et al.* Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, v. 30, p. 159-170, 2007.

SCUDDER, G. G. The importance of insects. In: FOOTIT, R. G. e ADLER, P. H. (Ed.). **Insect biodiversity: Science and society**. 1ª Ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2009. p.7-32.

SHARMA, R.; GARG, R. K.; GAUR, J. Various methods for the estimation of the post mortem interval from Calliphoridae: A review. **Egyptian Journal of Forensic Sciences**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2015.

SHEN, S. *et al.* The use of methotrexate in dermatology: a review. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 53, n. 1, p. 1-18, 2012.

SHERMAN, R. A.; WYLE, F. A.; THRUPP, L. Effects of seven antibiotics on the growth and development of *Phaenicia sericata* (Diptera: Calliphoridae) larvae. **Journal of Medical Entomology**, v. 32, n. 5, p. 646-9, 1995.

SHURIN, J. B.; GRUNER, D. S.; HILLEBRAND, H. All wet or dried up? Real differences between aquatic and terrestrial food webs. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 273, n. 1582, p. 1-9, 2006.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2017. **Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7-30, 2017.

SIRIWATTANARUNGSEE, S. *et al.* Morphology of the puparia of the housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) and blowfly, *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). **Parasitology Research**, v. 96, n. 3, p. 166-70, 2005.

SKEVINGTON, J. H.; DANG, P. T. Exploring the diversity of flies (Diptera). **Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 3-27, 2002.

THYSSEN, P. J.; GRELLA, M. D. Efeito da escopolamina sobre o desenvolvimento de *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) e sua importância para a estimativa do intervalo pós-morte. **Revista Brasileira de Criminalística**, v. 1, n. 1, p. 39-42, 2011.

TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. **Estudo dos insetos**. 2ª Ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015. 816 p.

TURK, J. L. Studies on the mechanism of action of methotrexate and cyclophosphamide on contact sensitivity in the guinea pig. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 24, n. 4, p. 191-200, 1964.

VERMA, K.; PAUL, R. Assessment of post mortem interval,(PMI) from forensic entomotoxicological studies of larvae and flies. **Entomology, Ornithology & Herpetology**, v. 2, n. 104, p. 2161-0983.1000104, 2013.

WEISER, J. *et al.* Pathology of cyclosporin A in mosquito larvae. **Cytobios**, v. 59, n. 238-239, p. 143-50, 1989.

WELLS, J. D. *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) has reached the continental United States: review of its biology, pest status, and spread around the world. **Journal of Medical Entomology**, v. 28, n. 3, p. 471-473, 1991.

WELLS, J. D.; LAMOTTE, L. R. Estimating the postmortem interval. In: BYRD, J. H. e CASTNER, J. L. (Ed.). **Forensic entomology: The utility of arthropods in legal investigations**. Boca Raton: CRC Press, 2001. p.263-85.

WHO. **19th WHO Model List of Essential Medicines**. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2015. Disponível em: <
http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML_2015_FINAL_amended_NOV2015.pdf?ua=1>. Acesso em: 09 mar. 2017.

WOLFF, J. **Sinanropia de Calliphoridae (Insecta: Diptera) no Município de São José, SC**. 2015. 58 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

YEATES, D. K.; WIEGMANN, B. M. **The evolutionary biology of flies**. New York: Columbia University Press, 2005. 440 p.

ZOU, Y. *et al.* Effect of ketamine on the development of *Lucilia*

sericata (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) and preliminary pathological observation of larvae. **Forensic Science International**, v. 226, n. 1-3, p. 273-81, 2013.