**Efeito do tratamento por quimioterápicos na estimativa do intervalo pós-morte através da entomologia forense**

Os insetos necrófagos presentes em cadáveres humanos podem fornecer numerosas informações em uma investigação criminal, como causa da morte, identificação do cadáver, local da morte e, em especial, o tempo de morte, o qual utiliza dados da ecologia e biologia destes artrópodes para fornecer uma estimativa do intervalo pós-morte (IPM) em um possível laudo.

O cálculo do IPM é baseado principalmente na determinação da idade do inseto mais velho presente em um cadáver. Entretanto, diversos fatores podem influenciar a duração do ciclo de vida destes artrópodes, como temperatura, umidade, precipitação e presença de substâncias químicas nos tecidos do cadáver. Se estes fatores não forem levados em consideração, é possível que haja uma determinação errônea da estimativa do IPM.

Entomotoxicologia é um ramo da entomologia forense que estuda a utilização dos insetos necrófagos como amostra biológica alternativa na detecção e análise de xenobióticos em tecidos em decomposição, além de investigar os possíveis efeitos destas substâncias no desenvolvimento destes artrópodes e o seu impacto na estimativa do IPM.

Os quimioterápicos são drogas antineoplásicas que atuam principalmente na inibição do crescimento celular, síntese de DNA e morte celular. A ciclofosfamida (CF) é um agente alquilante do grupo das oxazoforinas, sendo muito utilizada no tratamento de vários tipos de câncer e doenças autoimunes por sua atividade citotóxica e imunossupressora. Outro medicamento bastante utilizado no tratamento quimioterápico e imunossupressor é o metotrexato (MTX), composto análogo ao ácido fólico que, por competição com este, inibe a produção de cofatores de folato imprescindíveis para a biossíntese de aminoácidos, interrompendo a síntese de DNA. A alta incidência de câncer faz dessa doença um problema de saúde pública mundial, não sendo incomum o contato de insetos com cadáveres de pessoas que fizeram tratamento com estes medicamentos quimioterápicos.

Os experimentos foram realizados com a segunda geração de uma população selvagem de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) coletada em Florianópolis-SC e mantida em gaiolas de acrílico, com temperatura controlada a 26°C e fotoperíodo de 12h. Para oviposição foi fornecida uma placa contendo 50 g de carne bovina moída.

Após incubação dos ovos, 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. 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). Para o experimento com MTX as concentrações foram determinadas a partir da dose inicial intraperitoneal (DIIp) que é de 10 mg/kg. As doses 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). Cada tratamento teve três réplicas, sendo assim, 300 larvas foram testadas para cada tratamento, totalizando 1500 larvas analisadas no experimento com CF e 1500 larvas analisadas no experimento com MTX.

A cada 12 horas, três larvas eram retiradas de cada réplica, mortas em água quente e medidas com um paquímetro digital. 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. Estes foram mortos e a asa esquerda foi medida com um paquímetro digital.

Para as análises de taxas de sobrevivência e proporção sexual foi realizado um experimento à parte com CF e MTX, conforme descrito anteriormente, porém sem a retirada de larvas, para evitar que a manipulação interferisse na análise de sobrevivência de *C. megacephala*.

Os resultados indicaram que os imaturos que foram expostos às diferentes concentrações de CF não apresentaram diferenças estatisticamente significativas no tamanho larval nem adulto, em relação ao controle. Entretanto, aquelas que foram expostas ao MTX foram significativamente menores do que aquelas do grupo controle, tanto na sua fase larval quanto adulta. 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. Além disso, espécies diferentes de dípteros podem sofrer influência de uma mesma droga de maneiras distintas.

Em relação à duração do ciclo de vida de *C megacephala*, os resultados mostraram que as larvas expostas à dosagem mais alta de CF levaram uma média de 24 horas a mais para empupar do que aquelas do grupo controle, e 28 horas a mais para emergir. Isso significa que, em ocorrências de morte de pessoas que faziam tratamento com este quimioterápico, se este atraso no desenvolvimento não for levado em consideração, poderia ocasionar o erro na estimativa do IPM no caso de um possível laudo.

No experimento com MTX, não foram encontradas diferenças significativas entre o tratamento controle e aquelas expostas ao medicamento na duração do ciclo de vida de *C. megacephala*. Entretanto, as taxas de sobrevivência total e larval foram significativamente menores quando expostas ao MTX, e isso pode interferir 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.

Foi observado um desvio da proporção esperada entre machos e fêmeas expostas à 1 DIIp MTX e 2 DIIp MTX, favorecendo a emergência de fêmeas. Estudos prévios já demonstraram que o stress causado pelas condições ambientais desfavoráveis pode contribuir em uma maior emergência de fêmeas, e essa pode ser uma das razões desta mesma tendência ter sido observada no presente estudo com larvas expostas ao MTX, já que o medicamento pode ter afetado as características organolépticas da carne, diminuindo a ingestão alimentar das larvas.

Concluindo, este estudo demonstrou pela primeira vez o impacto que medicamentos quimioterápicos causam no desenvolvimento de *C. megacephala*, e como isso poderia acarretar em um erro na estimativa do IPM caso sua influência não fosse levada em consideração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

2. 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.

3. 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..

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

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

6. 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.

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

8. 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.

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

10. 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.