

Morfometria geométrica alar como ferramenta para a identificação de *Lucilia sericata* e *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae)

M.P. Macedo *

Doutorando em Ecologia, Laboratório de Biologia Evolutiva, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília (UnB), Brasília (DF), Brasil

*Endereço de e-mail para correspondência: marcos.patricio@gmail.com. Tel.: +55-61-99228-8088.

Recebido em 07/09/2016; Revisado em 09/11/2016; Aceito em 10/11/2016

Resumo

Lucilia sericata (Meigen) e *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy) (Diptera, Calliphoridae) estão entre as espécies de dípteros de interesse forense. A correta identificação do espécime, ou fragmento deste, coletado em um local de crime é etapa fundamental para o emprego da entomologia forense em investigações criminais. Nesse estudo, avaliou-se a possibilidade de discriminação entre duas espécies de califorídeos pela morfologia alar, por meio de análises de morfometria geométrica. Foram analisadas as asas esquerdas de 253 espécimes, sendo 119 indivíduos de *C. vicina* e 134 de *L. sericata*, por meio de análises de variáveis canônicas e análises discriminantes. Das 253 comparações par a par, 2 erros de identificação (0,7%) foram registrados para análise discriminante, enquanto 3 erros de classificação (2,3%) foram registrados para o teste de validação cruzada. Esse resultado sugere um alto índice de confiabilidade da técnica. Mais estudos são necessários para a validação dessa técnica para seu uso na prática forense.

Palavras-Chave: Entomologia Forense; Identificação; Análise Discriminante.

Abstract

Lucilia sericata (Meigen) and *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy) (Diptera, Calliphoridae) are among the fly species of forensic interest. The correct identification of the specimen, or fragment of a specimen, collected at a crime scene is a crucial step for the use of forensic entomology as a tool in criminal investigations. In this study, the discrimination of these two species of Calliphoridae based on wing morphology, by means of geometric morphometric analysis was investigated. Left wings of 253 specimens were analyzed, 119 individuals of *C. vicina* and 134 of *L. sericata*, through Canonical Variate Analysis, Discriminant Analysis and Cross Validation tests. Of the 253 pair wise comparison, 2 misidentifications were recorded for discriminant analysis (0.7%), while 3 (2.3%) misclassification for cross-validation tests, which points to a high technical reliability index. More studies are needed to validate this technique for use in forensic practice.

Keywords: Forensic Entomology; Fly Identification; Discriminant Analysis.

1. INTRODUÇÃO

Entomologia forense é a análise de vestígios entomológicos em situações que demandem a atenção dos órgãos estatais de aplicação da lei [1]. A tarefa mais frequente para os profissionais dessa área é o cálculo do intervalo pós morte mínimo (IPM_{min}), o tempo mínimo transcorrido entre uma morte e a descoberta de um corpo [2].

Existem diversas formas de se estimar o IPM_{min}, geralmente associadas aos eventos e processos naturais

que se desenrolam ao longo do processo de decomposição, tais como *rigor mortis* e formação dos livores cadavéricos. Contudo, esses métodos podem se tornar imprecisos após as primeiras 72 horas. Nessas situações, a interpretação de vestígios entomológicos pode ser a melhor ferramenta para a determinação do IPM_{min} [3].

Os métodos de estimativa de IPM_{min} mais comumente utilizados se baseiam no tempo de desenvolvimento pós embrionário de espécies de insetos necrófagos, geralmente dípteros e coleópteros, que usam

carcaças animais como sítio de alimentação e/ou reprodução.

Os califorídeos (Diptera: Calliphoridae) estão entre os primeiros insetos a acessar uma carcaça após a sua exposição, atraídos pelos odores produzidos nos estágios iniciais do processo de decomposição. Isso faz com que esse grupo de moscas seja importante evidência em investigações de homicídios [4,5]. Ainda, além da estimativa do IPM_{min} , insetos já foram tomados como indícios de movimentação de cadáveres e de localização de regiões produtoras de drogas [6,7].

A correta identificação no nível de espécie dos espécimes em análise é uma etapa essencial para a realização de uma análise forense de vestígios entomológicos. Em alguns casos, o investigador tem acesso apenas a espécimes mal preservadas, ou mesmo a fragmentos entomológicos, e, portanto, caracteres importantes de chaves de identificação não estão presentes. Isso pode impossibilitar a identificação ou levar a uma identificação equivocada do espécime. Nesses casos, a identificação da espécie pode ser feito por métodos baseados em sequências de DNA [8]. Contudo, não há informações sobre sequências específicas para todas as espécies de interesse forense e a estrutura laboratorial necessária para esse tipo de análise de forma rotineira a torna inviável para alguns laboratórios forenses e de entomologia.

Um método de baixo custo e capaz de identificar espécies a partir da análise de estruturas específicas apenas é a caracterização morfológica por meio da morfometria geométrica. A morfologia alar de califorídeos tem valor taxonômico e por meio dela é possível distinguir entre espécies do mesmo gênero de califorídeos de interesse forense [9], contudo, existem poucos estudos sobre a aplicação dessas ferramentas para os dípteros necrófagos de forma geral.

Assim, o objetivo deste estudo é verificar a possibilidade de se discriminar duas das principais espécies de califorídeos de interesse forense, *Lucilia sericata* (Meigen) e *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy) (Diptera, Calliphoridae) por meio da morfologia alar dessas espécies.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram examinadas 253 asas esquerdas das duas espécies de califorídeos, 119 indivíduos de *C. vicina* e 134 de *L. sericata*. O material é proveniente de criações em laboratório e faz parte da coleção-testemunho de projeto de pesquisa executado na região central de Londres, Reino Unido, nas dependências do King's College. Este material foi selecionado para o presente trabalho por se tratar de um estudo exploratório.

As asas foram destacadas dos espécimes adultos identificados e criados em laboratório. As asas foram

então arquivadas em um suporte de papel, fixado com fita adesiva transparente, separadas por espécie e gênero.

Apenas os indivíduos adultos fêmeas foram selecionados, a fim de se evitar efeitos de dimorfismo sexual.

Subsequentemente, as asas foram fotografadas com uso de um microscópio estereoscópico Leica M205C, software LAS 9.1 e as imagens foram armazenadas em um único diretório para análises.

Foi construída uma biblioteca das imagens das asas com auxílio do software TPSUtil; 11 marcos anatômicos foram selecionados, adaptados do estudo prévio de Vasquez e Liria [9], com auxílio do software TPSDig2 [10]. As análises morfométricas foram realizadas pelo software Morpho J [11], maiores detalhes a seguir (Fig. 1).

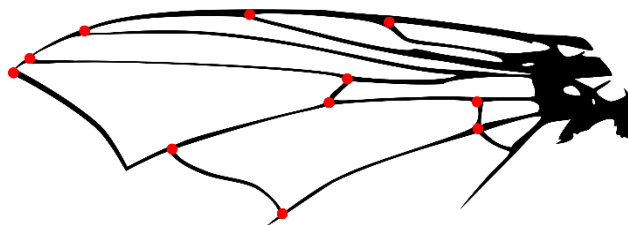


Figura 1. Imagem esquemática da estrutura de venação da asa dos espécimes examinados com os marcos anatômicos utilizados para análise.

Os dados dos marcos anatômicos foram examinados com a realização de uma superimposição procrustes, seguido pela geração de uma matriz de covariância.

A correção para efeitos de alometria foi feita por meio de uma regressão em que se utilizou a configuração anatômica de cada asa como variável dependente e o tamanho do centróide dessa asa, indicando o tamanho da asa, como variável preditora.

As análises seguintes consistiram em uma análise de componentes principais, e as configurações anatômicas das asas individuais foram examinadas por meio de uma análise de variáveis canônicas (CVA) e de uma análise discriminante (DA) com análise de validação cruzada. As análises de comparação (CVA, DA e validação cruzada) foram efetuadas com os resíduos da regressão para correção de efeitos de alometria.

3. RESULTADOS

Foram analisadas 253 asas de fêmeas das espécies alvo, a fim de se evitar efeitos de dimorfismo sexual, sendo 119 indivíduos de *C. vicina* e 134 de *L. sericata*.

Após a superimposição Procrustes, uma PCA baseada na matriz de covariância apresentou uma variância de 52,35% para o primeiro componente (PC1)

e 12,25% para o segundo (PC2). Noventa e um por cento da variação acumulada concentravam-se nos seis primeiros componentes.

A regressão para estimar os efeitos de alometria retornou um índice de Soma de Quadrados (*Sum of Squares*) de 0,229. Desse total, 0,022 (9,47%) eram atribuídos à variação no tamanho do centróide e 0,207 (90,53%) eram resíduos da regressão, variando independentemente do tamanho do centróide.

Testes de permutação contra hipótese nula de independência com 10.000 rodadas apontaram $p < 0,0001$.

A CVA (Fig. 2) indicou distâncias de Mahalanobis entre espécies de 4,605 para *C. vicina* – *L. sericata*, ($p < 0,0001$). Todos os valores de p para 10.000 rodadas de permutação.

As análises discriminantes e os testes de validação cruzada realizados par a par retornaram os resultados expostos na Tab. 1.

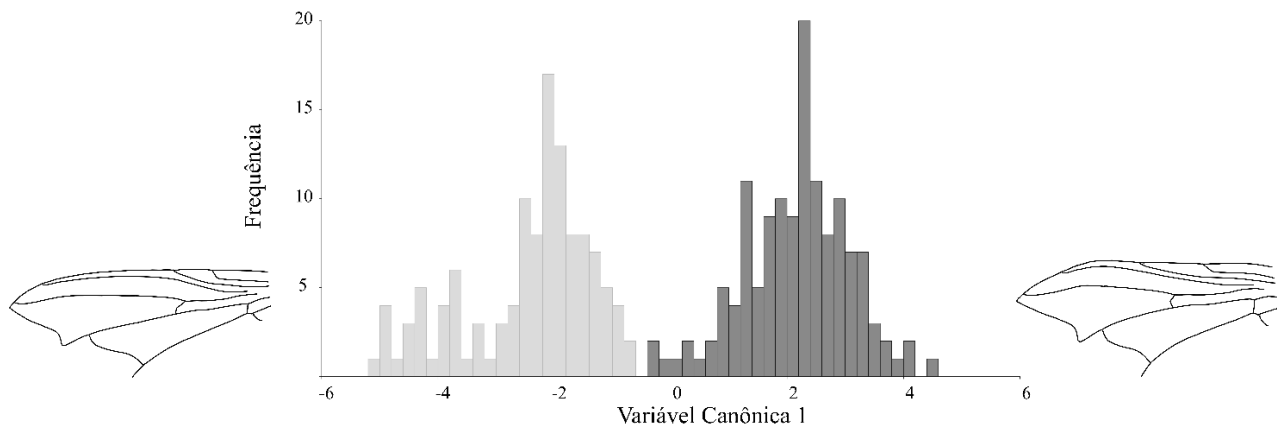


Figura 2. Resultado da CVA realizada com todos os espécimes do estudo após correção para efeitos de alometria. *C. vicina* (cinza claro, esquerda), *L. sericata* (cinza escuro, direita). As representações gráficas das formas das asas estão às extremidades do eixo representado.

Tabela 1. Resultados das Análises Discriminantes (DA) e de Validação Cruzada (VC). As linhas indicam a espécie à qual pertenciam os espécimes analisados e as colunas indicam os grupos aos quais os espécimes foram atribuídos.

	DA		VC	
	<i>C. vicina</i>	<i>L. sericata</i>	<i>C. vicina</i>	<i>L. sericata</i>
<i>C. vicina</i>	119 (100%)	0 (0%)	119 (100%)	0 (0%)
<i>L. sericata</i>	2 (1,5%)	132 (98,5%)	3 (2,2%)	131 (97,2%)

4. DISCUSSÃO

Foram examinadas duas das espécies de califorídeos necrófagos comumente associadas a cenas de crimes. A análise de morfometria alar com 11 marcos foi suficiente para evidenciar a ocorrência de grupos distintos.

Após as correções para alometria, a análise de variáveis canônicas permitiu diferenciar os espécimes em razão de sua espécie (Fig. 2). As análises discriminantes par a par tiveram altos índices de resolução (99,3%), o que demonstra a viabilidade dessa ferramenta para a distinção entre espécies. No total, das 253 comparações, 251 retornaram a espécie correta, o

que é um significativo resultado para a padronização da técnica de morfometria geométrica como uma das possibilidades de identificação confiável de espécimes coletados em locais de crime.

Todos os eventos de discriminação incorreta foram registrados para a espécie *L. sericata*, tanto para a DA quando para o teste de validação cruzada. Todos os testes estatísticos empregados retornaram valores de p abaixo de 0.01 e os tamanhos amostrais de cada uma das espécies estavam adequados ao número de marcos anatômicos examinados. Dessa forma, sugere-se o aumento o número de marcos examinados em estudos futuros, para uma maior resolução nos testes discriminantes.

Em diversas chaves de identificação para Calliphoridae, a análise de cerdas torácicas é um passo importante para o diagnóstico da espécie [12-14]. Esses caracteres demandam um conhecimento aprofundado de anatomia e ainda são consideravelmente frágeis e podem ser danificados facilmente durante a coleta e manipulação dos espécimes [9]. Assim, a identificação de espécimes por morfologia alar é uma ferramenta rápida e de baixo custo disponível aos profissionais da área forense.

O uso da morfometria geométrica superou algumas deficiências analíticas da morfometria tradicional. A análise da configuração espacial de marcos anatômicos possibilita o uso de métodos estatísticos mais robustos e confere maior poder discriminante no estudo de populações [15]. Ainda assim, os estudos dessa natureza são escassos na área forense.

Estudos adicionais, com a análise de outras espécies desses gêneros, bem como de outros gêneros de ocorrência registrada para as diversas regiões zoogeográficas, e também a análise de espécimes adicionais para uma maior robustez estatística desses resultados, são necessários para uma validação da técnica para fins forenses.

Os espécimes utilizados para o presente estudo provêm de criações laboratoriais. Desta forma, a coleta de espécimes de regiões variadas para a composição do conjunto de dados é desejável para se obter uma melhor estimativa da variação morfológica nas estruturas alares das espécies examinadas.

Ainda assim, os resultados aqui expostos apresentam uma promissora alternativa para a identificação taxonômica de dípteros de interesse forense, com menor custo financeiro e demanda de tempo quando comparados aos métodos de identificação molecular.

5. CONCLUSÕES FINAIS

A morfologia alar de califorídeos, analisada com o auxílio das ferramentas de morfometria geométrica, apresenta bom potencial de uso na identificação de vestígios de natureza entomológica, mesmo quando caracteres importantes para a identificação tradicional estiverem ausentes.

Esta técnica apresenta ainda a característica de ser mais rápida e de menor custo, quando comparada aos métodos de identificação genética.

Estudos futuros com espécies presentes na região Neotropical devem ser realizados a fim de se adequar o emprego da técnica às peculiaridades de cada região, contudo, o foco do presente trabalho é a técnica utilizada, se prestando a avaliar sua aplicabilidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Perito Criminal Luciano Chaves Arantes pelo auxílio prestado na revisão do presente trabalho e pela gentileza na cessão de parte da sua coleção testemunho, que compõe as amostras examinadas no presente estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] J. Amendt, C.P. Campobasso, E. Gaudry, C. Reiter, H.N. LeBlanc, M.J.R. Hall. Best practice in forensic entomology - standards and guidelines. *Int. J. Legal Med.* **121**, 90-104, 2007.
- [2] E.P. Catts. Problems in estimating the post-mortem interval in death investigations. *J. Agr. Entomol.* **9**, 245-255, 1992.
- [3] J. Amendt, C.S. Richards, C.P. Campobasso, R. Zehner, M.J.R. Hall. Forensic entomology: applications and limitations. *Forensic Sci. Med, Pathol.* **7(4)**, 379-392, 2011.
- [4] K.G.V. Smith. A manual of Forensic Entomology. Ithaca, Cornell University Press, 205 p., 1986.
- [5] R. Wall, M.L. Warnes. Responses of the sheep blowfly *Lucilia sericata* to carrion odour and carbon dioxide. *Entomol. Exp. Appl.* **73** 239-246, 1994.
- [6] J.R. Pujol-Luz, L.C. Arantes, R. Constantino. One hundred years of forensic entomology in Brazil (1908-2008). *Rev. Bras. Entomol.* **52(4)**, 485-492, 2008.
- [7] M.P. Macedo, C. Kosmann, J.R. Pujol-luz. Origin of samples of *Cannabis sativa* through insect fragments associated with compacted hemp drug in South America. *Rev. Bras. Entomol.* **57**, 197-201, 2013.
- [8] J.D. Wells, D.W. Williams. Validation of a DNA-based method for identifying Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae) used in a death investigation. *Int. J. Legal Med.* **121(1)**, 1-8, 2007.
- [9] M. Vásquez, J. Liria. Morfometría geométrica alar para la identificación de *Chrysomya albiceps* y *C. megacephala* (Diptera: Calliphoridae) de Venezuela. *Rev. Biol. Trop.* **60**, 1249-1258, 2012.
- [10] F.J. Rohlf. Tps Dig, program for Digitizing landmarks and outline for geometric morphometric analyses, Version 2.04. *Dpto Ecol. and Evol, Stony Brook, New York*, 2006.
- [11] C.P. Klingenberg. Morpho J: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol. Ecol. Resour.* **11**, 353-357, 2011.
- [12] S.A. Marshall, T. Whitworth, L. Roscoe. Blow flies (Diptera: Calliphoridae) of eastern Canada with a key to Calliphoridae subfamilies and genera of eastern North America, and a key to the eastern Canadian species of Calliphorinae, Luciliinae and Chrysomyiinae. *Can. J. Arthropod. Identif.* **11**, 2011.
- [13] T. Whitworth. Keys to the genera and species of blow flies (Diptera: Calliphoridae) of America North of Mexico. *Proc. Entomo. Soc. Wash.* **108**, 689-725, 2006.
- [14] K. Akbarzadeh, J.F. Wallman, H. Sulakova, K. Szpila. Species identification of Middle Eastern blowflies (Diptera: Calliphoridae) of forensic importance. *Parasitol. Res.* **114(4)**, 1463-1472, 2015.
- [15] F.J. Rohlf, L. Marcus. A revolution in morphometrics. *Trends Ecol. Evol.* **8**, 129-132, 1993.