

MARIANA PRADO NASSU

UTILIZAÇÃO DE *COCHLIOMYIA MACELLARIA* F. (DIPTERA:
CALLIPHORIDAE) E AVALIAÇÃO DE SUA DENSIDADE LARVAL PARA USO
TERAPÊUTICO NA RECUPERAÇÃO DE LESÕES TEGUMENTARES

CAMPINAS
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

MARIANA PRADO NASSU

“Utilização de *Cochliomyia macellaria* F. (Diptera: Calliphoridae) e avaliação de sua densidade larval para uso terapêutico na recuperação de lesões tegumentares”

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação defendida pela candidata
Mariana Prado Nassu
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de MESTRA em Biologia Animal, na área de Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Jacqueline Thyssen

CAMPINAS
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

N188u Nassu, Mariana Prado, 1988-
Utilização de *Cochliomyia macellaria* F. (Diptera: Calliphoridae) e avaliação de sua densidade larval para uso terapêutico na recuperação de lesões tegumentares / Mariana Prado Nassu. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Patrícia Jacqueline Thyssen.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Mosca-varejeira. 2. Insetos. 3. Cicatrização de feridas. 4. Terapia larval. I. Thyssen, Patrícia Jacqueline. II. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Use of *Cochliomyia macellaria* F. (Diptera: Calliphoridae) and evaluation of its larval density for therapeutic use in the recovery of tegumentar lesions

Palavras-chave em inglês:

Blowflies

Insects

Wound healing

Larval therapy

Área de concentração: Relações Antrópicas, Meio ambiente e Parasitologia

Titulação: Mestra em Biologia Animal

Banca examinadora:

Patrícia Jacqueline Thyssen [Orientador]

Arício Xavier Linhares

Carolina Reigada

Data de defesa: 25-07-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Campinas, 25 de julho de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Patricia Jacqueline Thyssen (orientadora)



Assinatura

Prof. Dr. Aricio Xavier Linhares



Assinatura

Profa. Dra. Carolina Reigada



Assinatura

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

Assinatura

Profa. Dra. Daniela Brayer Pereira

Assinatura

RESUMO

A terapia larval (TL) consiste na aplicação de larvas estéreis de moscas necrófagas (Diptera) sobre lesões crônicas ou infectadas visando promover ou acelerar o processo de cicatrização. Para garantir segurança e sucesso, dois fatores tem de ser alcançados: a esterilidade das larvas que serão utilizadas e a confirmação de que a espécie, durante o seu processo de alimentação, consumirá apenas tecido necrosado. No presente estudo, pretendeu-se avaliar se a espécie *Cochliomyia macellaria* F. (Calliphoridae), de ampla distribuição em território brasileiro, pode ser uma excelente candidata para aplicação da TL, levando em conta seu comportamento e biologia. Foi avaliada a esterilização e a viabilidade pós-esterilização de larvas de *C. macellaria* em hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,5% por um e por três minutos. Adicionalmente, lesões foram induzidas em ratos *Wistar*, para avaliar a qualidade e o tempo de cicatrização frente a diferentes tipos de tratamento. Para tanto, foram montados cinco grupos experimentais, sendo que em um deles os animais não foram submetidos a qualquer tipo de tratamento, e em outro foi feito desbridamento mecânico. Também foi avaliada qual a densidade larval (5, 15 ou 25 larvas/cm²) mais apropriada para obter melhor qualidade de cicatrização e, ao mesmo tempo, menor período de aplicação, visando adequar a TL a um atendimento do tipo ambulatorial, isto é, sem internação. O processo de cicatrização foi avaliado qualitativamente (a partir da mensuração de certos parâmetros associados às lesões) e quantitativamente (tempo). Fragmentos de pele foram coletados antes do tratamento e 12 h, 7 dias e 14 dias pós-tratamento, e processados para análise histológica. Em relação ao comportamento, foi observado que os imaturos de *C. macellaria* se alimentaram apenas de tecido necrosado. O uso de solução de NaClO a 0,5% por três minutos é o mais recomendado para obtenção de larvas estéreis com alta taxa de viabilidade. Não houve diferença significativa nos tempos de cicatrização entre os grupos experimentais. Contudo, foi observado que na relação de 25 larvas/cm² houve um maior grau de vascularização nos tecidos, quando comparado aos demais tratamentos. Os mecanismos envolvidos nesse processo ainda são desconhecidos, mas concluiu-se que as larvas tem um importante papel na modulação da resposta imunológica do hospedeiro, sendo promissor o seu uso, provavelmente, em maiores densidades do que o preconizado na literatura.

Palavras-chave: Mosca varejeira, Insetos, Cicatrização de feridas, Terapia larval.

ABSTRACT

Larval therapy (LT) is the application of sterile larvae of carrion flies (Diptera) on chronic or infected wounds to promote or accelerate the healing process. To ensure safety and success two aspects must be met: the sterility of the larvae and confirmation that the species consume only necrotic tissue during the feeding process. The present study intended to evaluate whether the species *Cochliomyia macellaria* F. (Calliphoridae), widely distributed in Brazil, could be a viable candidate for application of LT, taking into account their behavior and biology. Sterilization and post-sterilization viability of larvae of *C. macellaria* were evaluated after being treated with sodium hypochlorite (NaClO) at 0.5% during one and three minutes. Additionally, lesions were induced in *Wistar* rats to evaluate the healing quality and healing time against different types of treatment. For that, the rats were divided in five experimental groups, in one of them the animals were not subjected to any treatment and in another only mechanical debridement was performed. It was also evaluated which larval density (5, 15 or 25 maggots/cm²) is the most suitable for better quality of healing and at the same time, shorter period of application, in order to improve the LT to an outpatient care type, that is, without hospitalization. The healing process was assessed qualitatively (from the measurement of certain parameters associated with injuries) and quantitatively (time). Skin fragments were collected before treatment and 12 h, 7 days and 14 days post-treatment, and processed for histological analysis. Regarding the behavior, it was observed that immature *C. macellaria* fed only of necrotic tissue. The use of NaClO 0.5% solution for three minutes is the most recommended to obtain sterile larvae with high viability rate. There was no significant difference in healing times between the experimental groups. However, it was observed that in the group of 25 maggots/cm² there was a higher degree of vascularization in tissues, as compared to other treatments. The mechanisms involved in this process are unknown, but it appears that the larvae have an important role in modulating the host immune response, and their use in higher density than that recommended in the literature is probably promising.

Key-words: Blowfly, Insects, Wound healing, Larval therapy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1.1. TRATAMENTO DE FERIDAS	2
2.1.2. TERAPIA LARVAL.....	6
2.1.3. MIÍASE.....	6
2.1.4. HISTÓRICO DA TERAPIA LARVAL	8
2.1.5. USO CLÍNICO DE LARVAS DE DÍPTEROS	9
2.1.6. ESPÉCIES PARA USO EM TL.....	11
2.1.7. PERSPECTIVAS NO BRASIL SOBRE O USO DE TL	13
3. OBJETIVOS	14
4. CAPÍTULO I – STERILIZATION AND SURVIVAL OF <i>Cochliomyia macellaria</i> (CALLIPHORIDAE) FOR USE IN LARVAL THERAPY	15
4.1. INTRODUCTION.....	17
4.2. MATERIAL AND METHODS	18
4.2.1. OBTAINING SPECIMENS	18
4.2.2. STERILIZATION TESTS	19
4.2.3. MICROBIOLOGICAL ANALYSIS	20
4.2.4. MICROBIOTA WITHIN LARVAE.....	20
4.3. RESULTS AND DISCUSSION	20
4.4. CONCLUSION	22
4.5. REFERENCES.....	22
5. CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO DA DENSIDADE LARVAL DE <i>Cochliomyia macellaria</i> F. (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) PARA USO TERAPÊUTICO NA RECUPERAÇÃO DE LESÕES TEGUMENTARES	29
5.1. INTRODUÇÃO.....	30
5.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.4. REFERÊNCIAS	36
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
8. ANEXO	51

AGRADECIMENTO

Agradeço à energia que paira acima de nós, por alguns chamada de “Deus”, por ter me dado saúde, força de vontade, esperança e paciência para enfrentar as dificuldades ao longo da pós-graduação e na execução deste trabalho. Agradeço aos meus pais, Mara e Thomaz, e à minha irmã, Inah, que sempre torceram por mim.

Aos amigos de todas as partes e cores.

Agradeço aos colegas de laboratório (L2B - Unicamp), que também se incluem no “táxon” dos amigos; aos colegas, funcionários e professores do Departamento de Parasitologia, com especial carinho pelos técnicos João Batista, Leticia Duart e Dona Tacilda.

Agradeço ao auxílio constante dos professores Arício Xavier Linhares e Domingos da Silva Leite, pelas perguntas, respostas e sugestões sempre pertinentes ao trabalho, e ao médico veterinário Mauro Pereira Soares, da Universidade Federal de Pelotas, pelo auxílio na análise histológica.

Agradeço aos professores que participaram das bancas de qualificação, exame prévio e banca de defesa.

Agradeço à Profa. Patricia Jacqueline Thyssen pela orientação e disponibilidade em ensinar desde 2009.

Por fim, agradeço ao programa de pós-graduação em Biologia Animal e FAPESP pelo apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1 - Anatomia da Pele (Fonte: <http://www.auladeanatomia.com/tegumentar/tegumentar.htm>)..... 3
- Figura 2 - Morfologia geral de dípteros do gênero *Cochliomyia*. Em A: vista dorsal do mesonoto de *Cochliomyia macellaria*; em B: vista abdominal mostrando detalhes da polinosidade prateada de *C. macellaria* (Fonte: GRELLA; THYSSEN, 2011); em C: detalhe das traqueias de larvas de *C. macellaria* e *C. hominivorax* (adaptado de GUIMARÃES; PAPAVERO, 1999). 12

CAPÍTULO I

- Figure 1 - Petri dishes containing Sabouraud culture media (left), blood agar (center) and PCA (right), after an incubation period of 96 hours of homogenized liquid larvae, showing colony forming units (CFU) in the control group (top row) and absence of CFU to certify sterilization in the group that received treatment with 0.5% NaClO for one minute (bottom row). 26
- Figure 2 - Petri dishes containing Sabouraud culture media (left), blood agar (center) and PCA (right), after an incubation period of 96 hours of homogenized liquid larvae, showing colony forming units (CFU) in the control group (top row) and absence of CFU to certify sterilization in the group that received treatment with 0.5% NaClO for three minutes (bottom row). 27
- Figure 3 - Petri dishes containing Sabouraud culture media (left), blood agar (center) and PCA (right), after an incubation period of 96 hours of homogenized liquid with macerated larvae showing CFU in the control group (top row) and absence of CFU in the group that received treatment with 0.5% NaClO for one minute (bottom row) for certifying the absence of pathogenic microorganisms within the larvae. 28

CAPÍTULO II

- Figura 1 - Curativo utilizado nos grupos experimentais de terapia larval. Em A: tela de poliuretano e esparadrapo; B: “camisa” de pano para evitar a fuga dos imaturos..... 40

Figura 2 - Características das lesões por tipo e intervalo de tratamento. Onde: NUL: sem tratamento; DEB: desbridamento mecânico; TL-5: uso de 5 larvas/cm²; TL-15: uso de 15 larvas/cm²; TL-25: uso de 25 larvas/cm²; 0: lesão inicial; 12: após 12 h; 7: após sete dias; 14: após 14 dias..... 41

Figura 3 - Cortes histológicos relativos às áreas de ulceração (aumento 100x). Em A: grupo I, 24h pós-tratamento, visualização de processo hemorrágico (seta); em B: grupo II, 7 dias pós-tratamento, macrófagos, neutrófilos, restos celulares e pontos hemorrágicos isolados; em C: grupo III, 14 dias pós-tratamento, reorganização celular e cicatrização; em D: formação de numerosos vasos sanguíneos após 7 dias de tratamento em uma densidade de 25 larvas/cm². 42

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table 1 - Outline of the experimental groups to determine the survival of immature for use in larval therapy. 25

Table 2 - Survival rate (%) of *Cochliomyia macellaria* immatures under different treatments (time of immersion and concentration of NaClO). 25

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Características das lesões em cada modelo animal frente ao tempo de lesão e sob diferentes circunstâncias (grupos experimentais). A pontuação indica o estado dos parâmetros: quanto menor o valor, menos aguda é a lesão. 38

Tabela 2 - Tempo médio, em dias, de cicatrização das lesões tegumentares em relação aos diferentes grupos experimentais e número médio de larvas recuperadas após o tratamento por TL..... 39

1. INTRODUÇÃO

O Filo Arthropoda engloba a maioria das espécies animais conhecidas, reunindo cerca de 1.302.809 de invertebrados (ZHANG, 2013). Dentro desse táxon, com aproximadamente um milhão de espécies descritas, os insetos constituem o maior grupo de metazoários existente e podem ser encontrados em quase todos os ambientes (PRICE, 1997). Em geral, estão associados à transmissão ou causa de doenças, parasitismo e, além disso, tem chamado a atenção pela contribuição na resolução de casos dentro da área forense (AMENDT *et al.*, 2004).

A maioria das pessoas considera as moscas como seres nocivos, ou, no mínimo, repulsivos. Este grupo realmente inclui espécies prejudiciais à saúde de humanos e animais, como *Musca domestica* (Linnaeus, 1758), vetor de agentes patogênicos, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) (mosca da bicheira) e *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (mosca do berne) (MARCONDES, 2006).

Algumas moscas podem destruir material necrosado ao se alimentar de tecidos animais em decomposição e, por uma série de mecanismos, auxiliar na cura de lesões cutâneas de difícil cicatrização. Fazem parte do que foi chamado de “grande farmácia da natureza”, *Die Große Apotheke der Natur* (FLEISCHMANN *et al.*, 2004), assim como outros animais vivos ou seus produtos (sanguessugas, veneno de abelhas, cães guia), que utilizados no diagnóstico ou tratamento de enfermidades são conhecidos como “bioterapias” (BTER Foundation, 2003).

O conhecimento de que a infestação de feridas por certas larvas de moscas ajuda na cicatrização, porém, é antigo e levou vários povos ao uso proposital de larvas para tratar certas feridas, em geral, com bons resultados (MARCONDES, 2010). Conhecida como “terapia larval”, essa técnica pode ser muito útil, especialmente em regiões de nível socioeconômico precário, por seu baixo custo e grande eficiência.

Tendo em vista que no Brasil esta é uma área ainda incipiente e que atualmente, frente aos problemas relacionados à resistência aos antibióticos e ao aumento da proporção de idosos e diabéticos na população, grupo este cujo risco de lesões com dificuldade de cicatrização é bastante elevado, o uso da terapia larval há de ser reconsiderado, e não só como terapia alternativa, mas primária.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os seres humanos têm revelado preocupação com o tratamento das feridas há muito tempo. Na Pré-história, preparavam cataplasma de folhas e ervas para tratar casos de hemorragias ou para facilitar a cicatrização. Com o passar do tempo, vários métodos foram sendo aperfeiçoados.

Há centenas de anos já era observado que o desbridamento de tecidos necrosados de feridas infectadas melhorava em muito a sua cicatrização. Na civilização grega e posteriormente na romana, o tratamento de feridas assumiu papel de destaque, pois já aconselhavam desbridamentos e cauterizações para preconizar a manutenção da ferida limpa e seca (Andrade *et al.*, 1992 *apud* BLANES, 2004).

2.1.1. TRATAMENTO DE FERIDAS

PELE: ANATOMIA E FISIOLOGIA

A pele é composta por três camadas: epiderme, derme e tecido subcutâneo (Figura 1). A epiderme é a camada mais externa, composta por três tipos celulares básicos: os queratinócitos, os melanócitos e as células de Langerhans. A derme é a camada mais profunda e é formada por tecido conjuntivo.

A epiderme organiza-se em camadas e, à medida que as mais superficiais são eliminadas, as camadas mais profundas são restauradas por divisão celular. A epiderme é constituída por cinco camadas, começando pela camada mais interna: germinativa, espinhosa, granulosa, lúcida (encontrada somente nas palmas das mãos e plantas dos pés) e córnea. A camada córnea, constituída por células escamosas, cheias de queratina, proporciona proteção contra traumas físicos e químicos (ARNOLD *et al.*, 2007).

A derme é uma espessa camada de tecido conjuntivo, tendo como principal componente o colágeno, que se estende da epiderme até o tecido subcutâneo. Nesta camada situam-se os anexos da pele, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, músculo eretor de pelos e nervos. Pode ser dividida em camada papilar, mais externa, e camada reticular, mais interna. A derme contém tipos diferentes de células, incluindo fibroblastos, mastócitos e leucócitos sanguíneos, como os neutrófilos e os eosinófilos (SANTOS, 2000; ARNOLD *et al.*, 2007).

Abaixo da derme está o tecido subcutâneo, também conhecido por hipoderme, composto por células adiposas separadas por septos fibrosos compostos de colágeno e vasos sanguíneos. Essa camada oferece proteção contra lesão traumática, promove o isolamento térmico e proporciona reserva calórica (ARNOLD *et al.*, 2007).

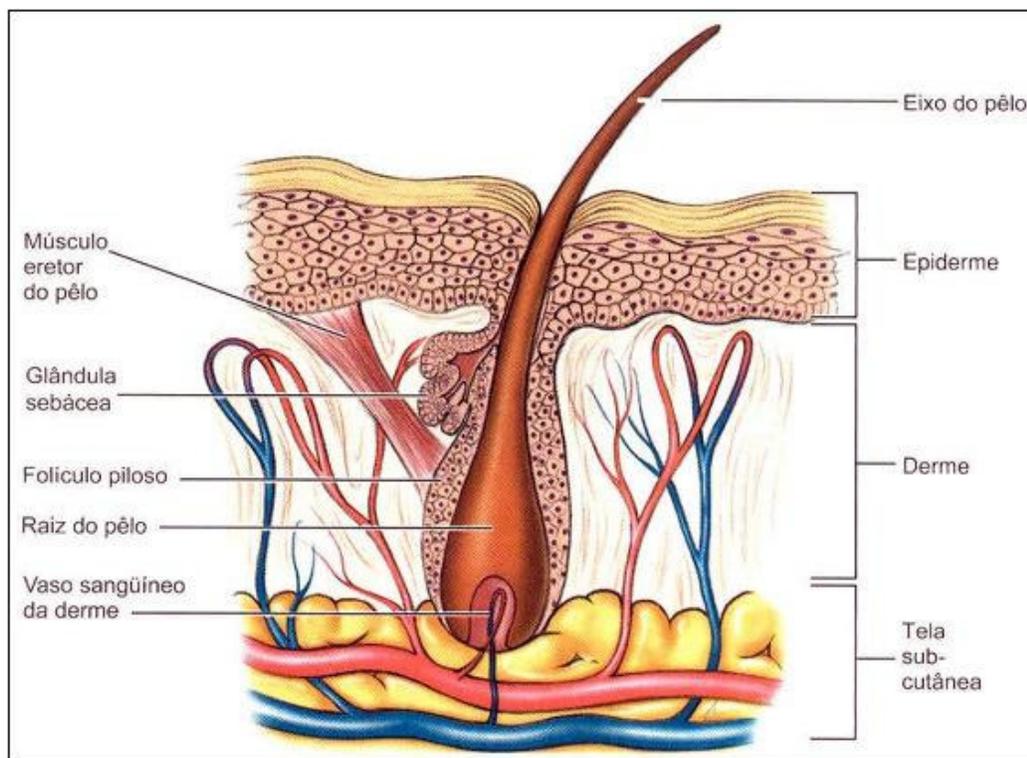


Figura 1 - Anatomia da Pele (Fonte: <http://www.auladeanatomia.com/tegumentar/tegumentar.htm>).

CLASSIFICAÇÃO DAS FERIDAS E PROCESSOS DE CICATRIZAÇÃO

Uma ferida é representada pela interrupção da continuidade de um tecido corpóreo, em maior ou em menor extensão, causada por qualquer tipo de trauma físico, químico, mecânico ou desencadeada por uma afecção clínica, que aciona as frentes de defesa orgânica (CESARETTI, 1998).

As feridas podem ser classificadas, de acordo com o tempo de reparação tissular, em agudas e crônicas. As feridas agudas são originadas de cirurgias ou traumas e a reparação ocorre em tempo adequado, sem complicações. As feridas crônicas são aquelas que não são reparadas

em tempo esperado e apresentam complicações. Outra classificação, baseada na descrição anatômica da profundidade da ferida, usada para alguns tipos de feridas crônicas como as úlceras de pressão e as queimaduras, engloba a ferida superficial (limitada à epiderme), a ferida com perda parcial (limitada à epiderme e porção superior da derme) e a perda total (existe destruição da epiderme, derme e tecido subcutâneo, podendo invadir músculos, tendões e ossos). Esse sistema de classificação por extensão do dano tissular pode ser complementar ao anterior (SANTOS, 2000).

O processo de reparação tissular compreende dois mecanismos de restauração dos tecidos: a regeneração e a cicatrização. A regeneração ocorre com reposição tissular original e a cicatrização consiste em uma série de eventos complexos que são descritos em fases. *Fase inflamatória*: dominada pelos processos de hemostasia e resposta inflamatória aguda. O extravasamento de elementos sanguíneos na ferida forma o exsudato e constituem um importante mecanismo de defesa. *Fase proliferativa*: nesta fase ocorre reparação do tecido conjuntivo e do epitélio. Na reparação do tecido conjuntivo ocorre a formação do tecido de granulação, com proliferação endotelial e fibroblastos. Este tecido formado por fibroblastos, substâncias produzidas por eles e vasos sanguíneos é denominado tecido de granulação, clinicamente apresentando-se com aspecto granuloso e avermelhado. *Fase de maturação*: formação de tecido cicatricial propriamente dito com deposição, agrupamento e remodelação do colágeno e regressão endotelial (SANTOS, 2000).

A cicatrização de feridas pode ocorrer por “primeira intenção”, quando não há perda de tecido e as extremidades da pele ficam justapostas uma à outra; por “segunda intenção”, quando as bordas da ferida não estão aproximadas, ou seja, não estão apostas, tais como em queimaduras ou em ferimentos profundos que são deixados abertos para formação de tecido de granulação; e por “terceira intenção” (ou primária tardia), quando a ferida aberta é fechada secundariamente, dias após a lesão, cicatrizando assim por primeira intenção tardia. Geralmente essas feridas são mantidas abertas para a resolução de edema e infecção (DEALEY, 2008).

FATORES QUE ATUAM NA CICATRIZAÇÃO

Fatores sistêmicos e locais podem afetar o processo de reparação tissular. Entre os fatores sistêmicos destacam-se: idade, estado nutricional, vascularização e condições sistêmicas, que incluem doenças associadas (como *diabetes mellitus* e obesidade, por exemplo) e alguns

tratamentos sistêmicos que podem comprometer o processo de reparação tissular, tais como a radioterapia, quimioterapia e drogas imunossupressoras. Esses fatores muitas vezes não podem ser eliminados, mas devem ser controlados. Os principais fatores locais são: localização anatômica da ferida e presenças de infecção e de tecido desvitalizado, sendo todos esses fatores fundamentais na escolha do tratamento local (SANTOS, 2000).

TERAPIAS UTILIZADAS

A presença de tecido desvitalizado em feridas constitui-se em fator de influência negativa na evolução da cicatrização. A necrose é um tipo de morte celular, que ocorre quando uma agressão interfere na estrutura ou função vital de uma célula. Neste caso, não há desencadeamento da apoptose, que é a morte celular fisiológica (RUBIN, 2006).

Sua etiologia envolve fatores relacionados às agressões por agentes físicos, químicos e biológicos: agentes físicos (ação mecânica, temperatura, radiação); agentes químicos (substâncias tóxicas e não-tóxicas como álcool, ácidos, medicamentos, detergentes e fenóis); e agentes biológicos (infecções viróticas, bacterianas ou micóticas e parasitoses).

A retirada de tecido necrótico de uma lesão, ou desbridamento, que é parte da terapia tópica, tem como finalidade remover exsudato, eliminar microrganismos e resíduos metabólicos nocivos que retardam a cicatrização e exacerbam a dor, mantendo o meio ideal para que a cicatrização ocorra em menor tempo e com o menor custo (KIRSHEN *et al.*, 2006; CHAN *et al.*, 2007).

O desbridamento pode ser feito de diversas formas: mecânico por meio cirúrgico, neste caso a remoção do tecido necrótico é realizada em ambiente cirúrgico, sendo eficaz e seguro, principalmente em casos onde há necessidade de remoção de maior extensão de tecido; mecânico por meio de fricção com gaze, irrigação da lesão com jato de solução fisiológica ou uso de instrumento cortante; autolítico, onde o próprio organismo remove de maneira natural o tecido desvitalizado; químico ou enzimático, pela aplicação de enzimas que facilitam a degradação do tecido necrótico (SANTOS, 2000); e biológico, que consiste na aplicação de larvas vivas e previamente descontaminadas, de algumas espécies de moscas (BOWLER *et al.*, 2001; KIRSHEN *et al.*, 2006).

2.1.2. TERAPIA LARVAL

A terapia larval (TL) ou larvoterapia consiste na aplicação de larvas estéreis vivas de moscas obtidas em laboratório sobre lesões, feridas crônicas ou infectadas, tendo como finalidade sua cicatrização a partir da remoção de secreção e tecido necrosado pelo inseto, facilitando o processo de cicatrização (MARTINI; SHERMAN, 2003).

A eficácia da TL é atribuída à combinação de diferentes fatores que atuam em sinergia, sendo que as larvas utilizadas são reconhecidas por três efeitos benéficos: (i) desbridamento, ou eliminação de tecido necrosado; (ii) desinfecção da ferida, através da morte microbiana; e (iii) promoção da cicatrização de feridas. Todos foram observados clinicamente e demonstrados em laboratório (SHERMAN *et al.*, 2000).

O desbridamento (i) é feito pela ingestão de crostas e exsudatos pelas larvas, processo facilitado pela secreção de enzimas digestivas na ferida, as quais liquefazem o tecido necrosado antes de sua ingestão por sucção. Conforme as larvas se movimentam, os ganchos orais e espículas dos segmentos larvais facilitam a entrada das enzimas digestivas no tecido e estimulam a liberação de substâncias cicatrizantes pelo hospedeiro.

Os imaturos desinfetam a ferida (ii) pela remoção mecânica das bactérias e liberação de proteínas bactericidas. Provavelmente devido à adaptação evolutiva aos ambientes pútridos (cadáveres, feridas e fezes) de criação, as larvas das espécies usadas em TL desenvolveram mecanismos de ação antimicrobianos. As estratégias de controle de patógenos envolvem a ação de enzimas bactericidas digestivas, produzidas pelo próprio organismo e outras produzidas pela bactéria simbiote *Proteus mirabilis* (Hauser, 1885), e secreção de substâncias alcalinas, como alantoína, bicarbonato de amônia e ureia, as quais deixam as condições do ambiente inadequadas para muitas espécies de microrganismos. Além de aumentar o pH, tais substâncias, assim como citocinas e hormônios liberados no meio, também atuam estimulando o crescimento celular e oxigenação do tecido de cicatrização (iii) (FLEISCHMANN *et al.*, 2004).

2.1.3. MIÍASE

Segundo ZUMPT (1965), miíase pode ser definida como a infestação por larvas de moscas em vertebrados vivos que, ao menos por certo período, alimentam-se de tecido morto ou vivo do hospedeiro, de suas substâncias corpóreas ou da comida ingerida pelo mesmo. Dessa

forma, larvas de moscas que completam seu ciclo, ou pelo menos parte do seu desenvolvimento normal dentro ou sobre o corpo de um hospedeiro vertebrado, são classificadas como causadoras de miíases (LINHARES; THYSSEN, 2007).

Os agentes causadores de miíases pertencem a Classe Insecta e Ordem Diptera, que por sua vez é subdividida nas Subordens Nematocera e Brachycera (WOODLEY, 1989). A última subordem abriga os dípteros da Infraordem Muscomorpha (YEATES *et al.*, 2007), grupo que concentra as espécies mais frequentes e relevantes do ponto de vista médico e econômico, em especial as famílias Oestridae, Sarcophagidae e Calliphoridae (HALL; SMITH, 1993).

As miíases normalmente são classificadas sob os pontos de vista entomológico ou clínico. Clinicamente, elas são classificadas baseando-se na localização da infestação dos parasitas no corpo do hospedeiro, podendo ser cutâneas, subcutâneas, cavitárias, oculares, anais e vaginais.

De acordo com a classificação proposta por PATTON (1921), que leva em conta o ciclo biológico das moscas e a relação parasita-hospedeiro, as miíases podem ser classificadas em primárias, secundárias e acidentais. Nas do tipo primárias, as larvas são parasitas obrigatórios, pois se desenvolvem exclusivamente dentro ou sobre o corpo de um hospedeiro, muitas vezes específico e alimentando-se de tecido vivo. Imaturos responsáveis por miíases secundárias normalmente se desenvolvem em substratos orgânicos de origem animal em decomposição, mas eventualmente podem atacar e se alimentar de tecidos necrosados em hospedeiros vivos oriundos de feridas pré-existentes ou úlceras, por isso também são chamados de parasitas facultativos. Nas miíases acidentais, ovos ou larvas alcançam o corpo oportunamente, podendo atingir orifícios naturais, feridas traumáticas ou mesmo o tubo digestório, quando ingeridos, e causar distúrbios de alguma gravidade se houver possibilidade de sobrevivência.

Atualmente, a classificação entomológica é a mais utilizada na pesquisa por permitir o melhor entendimento da biologia destas moscas e relacionar tais conhecimentos às medidas de controle e prevenção.

A TL trata-se de uma mífase secundária induzida de modo artificial e controlada, onde são previamente avaliados os possíveis efeitos negativos sobre os tecidos saudáveis. Os efeitos negativos estão relacionados ao uso de espécies inapropriadas, que se alimentam também de tecidos vivos ou, em alguns casos, de efeitos colaterais como dor, sangramento, pirexia e sintomas semelhantes à influenza (COURTNAY *et al.*, 2000; WOLLINA *et al.*, 2002).

Várias espécies de moscas são relatadas como causadoras de mifase humana, mas um reduzido número é conhecido para aplicação medicinal, podendo ocasionar complicações ou até a morte do paciente, caso não seja investigado adequadamente o comportamento do inseto e o mesmo tenha tendência em se alimentar de tecidos saudáveis.

2.1.4. HISTÓRICO DA TERAPIA LARVAL

A terapia larval foi descoberta acidentalmente nos campos de batalha, especialmente nas guerras napoleônicas e da Secessão Americana, e foi implantada e aperfeiçoada durante a Primeira Guerra Mundial, tendo seu auge nas décadas de 1930 e 1940.

Os primeiros relatos sobre TL são de 1557, de autoria de Ambroise Paré, cirurgião militar francês. Outros relatos de 1829, feitos por Dominic-Jean Larrey, cirurgião do exército de Napoleão, descrevem que quando as larvas se desenvolviam nas feridas dos soldados em batalha, o processo de cicatrização acelerava, prevenindo o aparecimento de infecção, embora nenhum tipo de pesquisa tenha evoluído a partir de tais observações.

Em 1860, John Forney Zacharias, um cirurgião confederado da Guerra Civil Americana, pode ter sido o primeiro médico ocidental a utilizar larvas de moscas varejeiras no tratamento de feridas com o propósito de limpar e cicatrizar as lesões, mas suas experiências também não foram bem documentadas (GREENBERG; KUNICH, 2002). Observações feitas por William W. Keen e Joseph Jones, cirurgiões do fim do século 19, acerca da presença não prejudicial de larvas sobre ferimentos também foram registradas (FLEISCHMANN *et al.*, 2004).

Apenas mais recentemente, em 1927, William Baer, professor clínico de cirurgia ortopédica da Faculdade de Medicina Johns Hopkins em Baltimore, realizou o primeiro estudo científico com TL para o tratamento de mais de 100 casos de osteomielite crônica (BAER, 1931). Durante a Primeira Guerra Mundial, Baer observou que dois soldados feridos que tinham ficado perdidos no campo de batalha por uma semana com fraturas e feridas abdominais cheias de larvas apresentaram granulação sem evidências de febre ou septicemia (HINSHAW, 2000; SHERMAN *et al.*, 2000). Porém, ao continuar utilizando essa terapêutica observou que muitos pacientes desenvolveram infecções secundárias, e então concluiu que era necessário esterilizar as larvas antes de realizar o tratamento.

Os resultados de Baer popularizaram a TL nos Estados Unidos e Europa na década de 1930, com aplicação regulamentada, nessa época, em mais de 300 hospitais apenas nos Estados Unidos, e produção de larvas pela companhia farmacêutica Lederle Co. Na década de 1940, com o advento dos antibióticos e desenvolvimento das técnicas cirúrgicas na Segunda Guerra Mundial, a TL praticamente deixou de ser utilizada (MARCONDES, 2006).

Na década de 1980 e 1990, comparando com outros tratamentos, diversos estudos relacionados à terapia larval e sua eficácia no tratamento de feridas de difícil cicatrização, devido, por exemplo, ao alto custo e desenvolvimento de resistência aos antibióticos por certos grupos de bactérias patogênicas, voltaram a ser feitos, liderados pelo norte-americano Ronald A. Sherman. Em 1996, foi fundada a Sociedade Internacional de Bioterapia, organização com a finalidade de investigar e desenvolver o uso de organismos vivos ou de seus produtos no diagnóstico e tratamento de enfermidades.

Em 2002 a TL estava sendo usada em mais de 2000 centros de saúde em cerca de 20 países, tais como Inglaterra, Estados Unidos, México, Alemanha, Bélgica e Israel. Os resultados tem sido satisfatórios e faz-se necessário registrar o índice de cura da ferida, em torno de 80 a 90%, independentemente da etiologia da lesão (MARCONDES, 2006).

No Brasil, ainda são escassos os relatos, centrados mais especificamente nos processos de esterilização de larvas (VARZIM, 2005; TORRES, 2005; THYSSEN *et al.*, 2013), ou sobre o tratamento de feridas induzidas em ratos *Wistar*, tendo sido obtido, neste último caso, 100% de eficácia na cura das lesões e mostrando assim que o potencial para uso em humanos é uma realidade cada vez mais próxima (NITSCHKE, 2010).

2.1.5. USO CLÍNICO DE LARVAS DE DÍPTEROS

O uso de larvas de dípteros é indicado nos casos de feridas infectadas ou não, mas de difícil cicatrização, como osteomielite, abscessos, queimaduras, feridas de pacientes diabéticos, úlceras de pressão, lesões traumáticas, tumores, gangrenas intratáveis e mais recentemente em pacientes com câncer e leishmaniose (MARTINI; SHERMAN, 2003). É importante ressaltar que a TL não cura a causa da doença, somente os sintomas clínicos exacerbados.

A terapia larval pode ser utilizada em qualquer tipo de ferida purulenta de pele já que uma das vantagens desse tratamento é a destruição do tecido necrosado pelas larvas e a preservação do tecido vivo em cerca de 80 a 95% dos casos, segundo MUMCUOGLU (2001).

SHERMAN (2002) avaliou a aplicação desta terapia em 103 pacientes e concluiu que o tratamento proposto foi mais efetivo que os convencionais anteriormente prescritos. WOLFF e HANSSON (2003) observaram os efeitos da mesma terapia em 74 pacientes com feridas necrosadas crônicas de várias etiologias, tendo efetividade em 86% dos casos em uma única aplicação de larvas. Nos demais pacientes, a resposta negativa foi devido à morte das larvas.

COURTNAY *et al.* (2000) descreveram que a TL poderia evitar a hospitalização e cirurgia de pacientes com feridas crônicas, além de reduzir o uso de antibioticoterapia. Além disso, vários autores relatam a diminuição do odor desagradável do tecido necrótico, da intensidade da dor, prevenção ao risco de septicemia, chegando a alguns casos a evitar amputação de membro ou, se houver tal ocorrência, com menor perda tecidual (MUMCUOGLU, 2001; COURTENAY *et al.*, 2000; WOLFF; HANSSON, 2003).

De qualquer forma é importante assinalar que a aplicação da TL não é indicada para lesões que apresentam sangramento com facilidade, que tenham comunicação com uma cavidade ou órgão interno, ou ainda quando se localizam próximas a grandes vasos (THOMAS *et al.*, 1999; THORNTON *et al.*, 2002; WOLFF; HANSSON, 2003). Alguns autores relatam a possibilidade de sensação de prurido ou cócegas durante a aplicação, sendo possível a administração de analgésicos para alívio dessa sensação (MUMCUOGLU, 2001).

A terapia larval tem sido usada para tratar feridas em humanos, mas é usada raramente em outros animais, devido, principalmente aos problemas conhecidos de miíases em animais (HALL; WALL, 1995) e receio que as larvas intencionalmente aplicadas invadam tecidos saudáveis, e pela falta de pesquisas acerca dessa bioterapia na veterinária. Contudo, trabalhos estão sendo feitos nessa área e resultados promissores estão surgindo (SHERMAN *et al.*, 2007a; SHERMAN *et al.*, 2007b; JONES; WALL, 2008).

O número de larvas a serem aplicadas depende de vários fatores, tais como idade do paciente, quantidade de tecido necrosado, extensão da ferida e, de forma extrínseca, do tamanho e da velocidade de alimentação das larvas. Em média são utilizadas de 5–10 larvas por cm² de área lesada, por um período de 48-72 horas, mas estes dados são relativos a estudos feitos com *Lucilia*

sericata (Meigen, 1826) e *Phormia regina* (Meigen, 1826) (HINSHAW, 2000; SHERMAN *et al.*, 2000; PARNES; LAGAN, 2007).

2.1.6. ESPÉCIES PARA USO EM TL

Os fatores favoráveis que devem ser levados em conta na escolha das espécies mais adequadas para uso medicinal são: não invasão de órgãos internos, larvas agregadas aos ferimentos, rápido desenvolvimento, baixa especificidade de hospedeiros, facilidade de criação *in vitro*, postura de ovos e alimentação somente em tecidos necrosados (SHERMAN *et al.*, 2000). Oestridae não apresenta nenhum desses fatores favoráveis e Sarcophagidae também por ser vivípara, ou seja, fazer postura de larvas e não de ovos, mais difíceis de serem esterilizados. A família Calliphoridae é a única que reúne espécies com todos os fatores anteriormente listados sendo, portanto, a mais estudada para utilização em terapia larval (SHERMAN *et al.*, 2000).

Dentro de Calliphoridae, as espécies mais reconhecidas na literatura para o uso em TL são *Phormia regina* e *Lucilia sericata*. Contudo, a primeira espécie não é encontrada no Brasil, enquanto que a segunda tem distribuição geográfica restrita a altas altitudes e baixas temperaturas, além de não ser de fácil manutenção em laboratório, o que justificaria a pesquisa por novas espécies candidatas.

De ampla distribuição geográfica em nosso território, *Lucilia eximia* (Wiedemann, 1819) poderia ser uma excelente candidata aos estudos com TL, porém sua difícil criação em laboratório e relato de caso de miíase primária em coelho doméstico causado por larvas desta espécie (THYSSEN; MORETTI, 2006) a desqualificam como potencial candidata.

Testes com aplicação em ratos das larvas dos califorídeos *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) e *C. putoria* (Wiedemann, 1830), também de fácil coleta na região de estudo, apresentaram bons resultados e confirmaram o potencial uso dessas espécies para TL (NITSCHKE, 2010).

No gênero *Cochliomyia* duas espécies são registradas em nosso país, *C. hominivorax* (Cocquerel, 1858) e *C. macellaria* (Fabricius, 1775). Ambas possuem cor verde, com reflexos azul-metálicos em todo o tórax e abdome e faixas verticais escuras que cruzam o mesonoto e somente *C. hominivorax* apresenta polinosidade prateada no fim do abdômen (Figura 2). A primeira é encontrada desde os Estados Unidos até o sul do Brasil. *Cochliomyia macellaria* também tem ampla distribuição, do sul do Canadá ao Chile e Argentina e de tamanho um pouco

menor. *Cochliomyia hominivorax* coloca seus ovos nas superfícies de feridas e cavidades do corpo, atraídas por odores fortes e excreções, enquanto *C. macellaria* ovipõe em tecidos necrosados ou corpos em decomposição. A principal diferença entre larvas dessas duas espécies, além do comprimento e da pigmentação dos troncos traqueais, é que a primeira é encontrada somente em tecidos vivos enquanto a segunda em tecidos necrosados (LINHARES; THYSSEN, 2007). Levando em conta o hábito necrófago e abundância de *C. macellaria* (Figura 2) há de se considerar essa espécie uma candidata à TL.

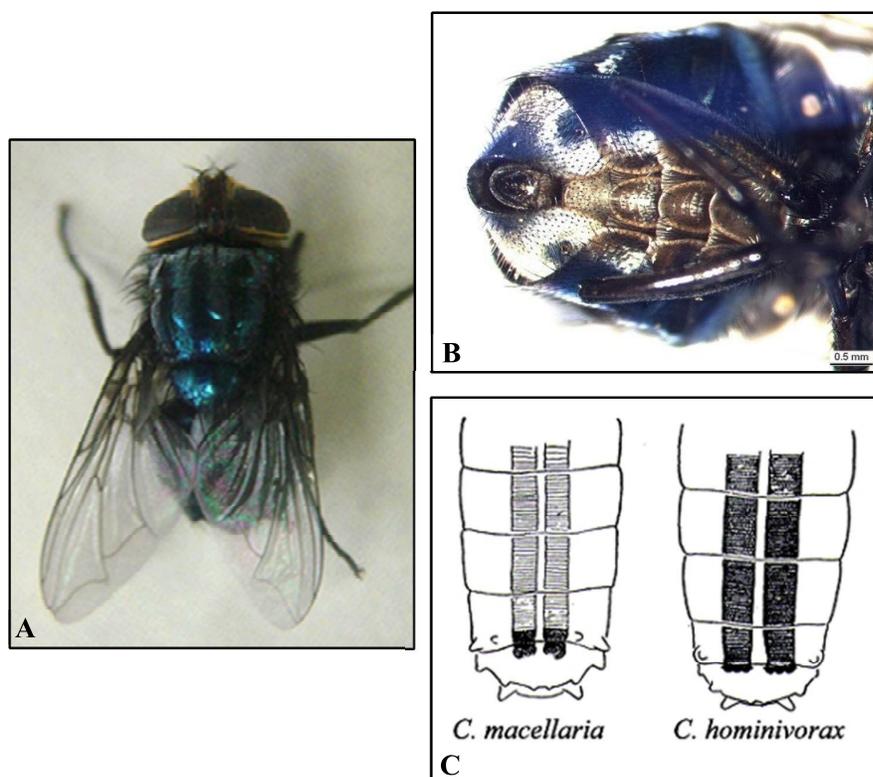


Figura 2 - Morfologia geral de dípteros do gênero *Cochliomyia*. Em **A**: vista dorsal do mesonoto de *Cochliomyia macellaria*; em **B**: vista abdominal mostrando detalhes da polinosidade prateada de *C. macellaria* (Fonte: GRELLA; THYSSEN, 2011); em **C**: detalhe das traqueias de larvas de *C. macellaria* e *C. hominivorax* (adaptado de GUIMARÃES; PAPAVERO, 1999).

2.1.7. PERSPECTIVAS NO BRASIL SOBRE O USO DE TL

Segundo dados recentes da WHO (World Health Organization, 2014), cerca de 150 milhões de pessoas tem *Diabetes mellitus* em todo o mundo, e este número pode dobrar até o ano de 2025. Grande parte desse aumento ocorrerá nos países em desenvolvimento e será devido ao crescimento populacional, ao envelhecimento, às dietas não saudáveis, à obesidade e ao estilo de vida sedentário. Em 2025, enquanto a maioria das pessoas com diabetes nos países desenvolvidos terá 65 anos ou mais, nos países em desenvolvimento a maioria estará na faixa etária de 45-64 anos, ou seja, em idade produtiva.

Tendo em vista que em nosso país o estudo da terapia larval é uma área ainda incipiente e que atualmente, frente aos problemas relacionados à resistência aos antibióticos e uma população crescente de idosos e de diabéticos, grupos cujo risco de lesões com dificuldade de cicatrização é bastante elevado, o uso desta bioterapia há de ser reconsiderado.

3. OBJETIVOS

1. Avaliar a eficácia do processo de esterilização e a taxa de sobrevivência de imaturos de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) frente ao tratamento com solução de hipoclorito de sódio em diferentes intervalos de tempo;
2. Avaliar se *C. macellaria*, espécie endêmica em nosso país, pode ser usada de forma segura para o tratamento de lesões tegumentares, isto é, se as larvas se alimentam apenas de tecido necrosado, e qual a densidade larval mais apropriada (5, 15 ou 25 larvas/cm²) para o tratamento de lesões tegumentares, tendo em vista a busca de parâmetros como qualidade e tempo de tratamento, visando adequar o período de aplicação para 12 horas, o que propiciaria um atendimento sem necessidade de internação ou ambulatorial.

4. CAPÍTULO I

STERILIZATION AND SURVIVAL OF *Cochliomyia macellaria* (CALLIPHORIDAE) FOR USE IN LARVAL THERAPY¹

ESTERILIZAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE LARVAS DE *Cochliomyia macellaria* (CALLIPHORIDAE) PARA USO EM TERAPIA LARVAL

ABSTRACT

Larval therapy involves the intentional application of sterile larvae of Diptera in poorly healing wounds in order to clear the necrotic tissue to facilitate the healing process. This study aimed to evaluate the sterilization process and survival of *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) after treatment with a solution of sodium hypochlorite (NaClO). The experimental groups were: control group (CG) in which was used distilled water and sodium hypochlorite group at 0.5% (0.5% SHG). To test the time for each treatment, the eggs were washed for one or three minutes in the described solution and then rinsed twice in distilled water. After hatching, a portion of larvae was rinsed and aliquots of the "rinsed water" were inoculated on Plate Count Agar (PCA), Blood Agar (BA) and Sabouraud, with incubation at 37 °C and readings were taken after 24 and 48 hours. Furthermore, to analyze the presence of general bacteria, fungi and hemolytic bacteria within the first instar larvae, a portion of these was macerated and inoculated into culture media, following the same procedure described above. There was no microbiological growth in PCA, BA and Sabouraud regarding to the treatment groups in both immersion times. The survival rate and hatching intervals were similar between CG and SHG. In conclusion, no pathogens were identified within the larvae and the sterilization of *Cochliomyia macellaria* eggs made by NaClO solution is an efficient method to obtain sterile larvae for use in larval therapy.

KEYWORDS: Diptera, wounds, treatment, immatures, biotherapy.

¹ A publicação de Thyssen PJ, Nassu MP, Nitsche MJT, Leite DS (2013), Sterilization of immature blowflies (Calliphoridae) for use in larval therapy. J. Med. Med. Sci. 4(10): 405-409 incorpora os resultados aqui obtidos, assim como os de outros estudos conduzidos pelos demais autores.

RESUMO

A terapia larval envolve a aplicação intencional de larvas estéreis de dípteros em feridas de difícil cicatrização com o objetivo de limpar o tecido necrosado para facilitar o processo de cura. Este estudo teve como objetivo avaliar o processo de esterilização e sobrevivência de larvas de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae), após tratamento com solução de hipoclorito de sódio (NaClO). Os grupos experimentais foram: grupo controle (GC), em que foi utilizada água destilada e grupo de hipoclorito de sódio a 0,5% (0,5% GHS). Para testar o tempo em cada tratamento, os ovos foram lavados por um ou três minutos na solução descrita e, em seguida, enxaguados duas vezes em água destilada. Após eclosão, uma porção de larvas foi enxaguada e alíquotas da "água de enxágue" foram inoculadas em Plate Count Agar (PCA), Ágar Sangue (AS) e Sabouraud, com incubação a 37°C e leituras realizadas após 24 e 48 horas. Além disso, para analisar a presença de bactérias gerais, hemolíticas e fungos no interior das larvas de 1º ínstar, uma porção destas foi macerada e inoculada nos meios de cultura, seguindo o mesmo procedimento descrito acima. Não houve crescimento microbiológico em PCA, AS e Sabouraud em relação ao tratamento em ambos os tempos de imersão. A taxa de sobrevivência e intervalos de eclosão foram semelhantes entre o GC e o GHS. Em conclusão, patógenos não foram identificados no interior das larvas de 1º ínstar e a esterilização de ovos de *Cochliomyia macellaria* feita por solução de NaClO é um método eficiente para obtenção de larvas estéreis para uso na terapia larval.

PALAVRAS-CHAVE: Diptera, feridas, tratamento, imaturos, bioterapia.

4.1. INTRODUCTION

Larval therapy (LT) consists in the application of sterile and live fly larvae on necrotic skin lesions, and aims to assist wound healing. It is indicated in cases of poorly healing wounds, infected or not, as leg ulcers arising from atherosclerosis, vasculitis, diabetes and intractable gangrene (MEKKES *et al.*, 2003). The procedure is an alternative for wound debridement, employing larvae for removal of exudates and cleansing of necrotic tissue (SHERMAN *et al.*, 2000). Studies have shown that in addition to the low cost and easy applicability, this method may be more effective for cleaning wounds and prevention of amputation than conventional methods, since in many cases the LT was more effective than the traditional methods previously prescribed (SHERMAN *et al.*, 1995; JUKEMA *et al.*, 2002; SCAVEE *et al.*, 2003; FIGUEROA *et al.*, 2006).

To ensure the safety and success in the treatment, two aspects have to be considered. First, efficient cleaning of eggs techniques that allow hatching of sterile larvae (BAER, 1931; SHERMAN; WYLE, 1996) and prevent the appearance of new infections in the injured tissue. The second aspect is to ensure that the selected species for this purpose use during their feeding process in the wound, only necrotic tissue (MARCONDES, 2006).

The surface of the eggs of flies (Diptera) is generally contaminated with pathogens due to coprophagous and scavenger feeding behavior of many species. These pathogens must be removed prior to use of immature for therapeutic purposes. Some of the techniques proposed for the sterilization of eggs and, consequently, the hatched immature, include, for example, solutions of hydrochloric acid (BAER, 1931), mercuric chloride (MACKERRAS; FRENEY, 1932), sodium hypochlorite (IVERSEN, 1996; FIGUEROA *et al.*, 2006; ECHEVERRI *et al.*, 2010), formalin and sodium chloride (FINE; ALEXANDER, 1934). The variation of these substances is associated mainly to the cost and the mechanisms by which they act to kill or inhibit the growth of microorganisms. Thus, the choice should be guided taking into account the cost and benefit and the larval survival, being necessary to determine the degree of sensitivity of the larvae against an exogenous substance, which may vary in different species.

Sodium hypochlorite (NaClO) has as main mechanisms of action the oxidant effect, the change in bacterial cell metabolism and irreversible enzyme inhibition in these cells (ESTRELA *et al.*, 2002). Among its advantages are fast-acting, efficiency against a wide variety of

microorganisms even at low concentrations, ease in preparation, dilution and application, low toxicity and low cost. The disadvantages are related to the corrosive property of metals and partial inactivation in the presence of residual organic matter attached to the surface to be treated (PAULINO, 1999). Thus, sodium hypochlorite, commonly found in the Brazilian market with the generic name of bleach, becomes a candidate for disinfection and sterilization processes.

There are relatively few species that are admittedly promising for use in LT (SHERMAN *et al.*, 2000), and *Lucilia sericata* (Meigen) and *Phormia regina* (Meigen) are the most used species (BAER, 1931). As there is little study and application of larval therapy in the tropics, there is little information concerning the candidate species at these sites. Thus, in this study, procedures to ensure the sterilization of eggs of *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) for therapeutic purposes were evaluated. Survival of immature post-treatment was also measured. This species was selected in view of the ease of obtaining specimens due to the wide geographical distribution in Brazil, for easy maintenance in the laboratory and the scavenger behavior reported in the literature (ZUMPT, 1965; MENDES; LINHARES, 1993; SOUZA; LINHARES, 1997; CARVALHO *et al.*, 2000; CARVALHO *et al.*, 2004).

These tests were conducted to ascertain the reason of time versus concentration of the disinfectant agent would fulfill the effective role in sterilizing eggs without, however, be detrimental to the survival of immature. Furthermore, an additional analysis of the presence of general bacteria, fungi and hemolytic bacteria within the immature was made.

4.2. MATERIAL AND METHODS

4.2.1. OBTAINING SPECIMENS

Colonies of adult *Cochliomyia macellaria* were established from collections made in natural environment using traps made from plastic bottle (MORETTI *et al.*, 2009), which contained bovine liver as bait or chicken entrails, exposed for 24 hours in the Serra do Lopo region, municipality of Extrema, MG (22° 89'S: 46 33'O). The captured specimens were anesthetized for about 90 seconds, at low temperatures (-20 °C) to make the identifications through taxonomic key (MELLO, 2003; GRELLA; THYSSEN, 2011).

After identification, the adults were placed in transparent plastic cages (30x30x50 cm) with side vents coated with nylon fabrics. They were fed with sugar and water *ad libitum*, staying in

air-conditioned room under conditions of temperature (26 ± 1 °C), photoperiod (12:12 hours) and relative humidity ($70 \pm 10\%$) controlled.

4.2.2. STERILIZATION TESTS

As oviposition substrate was offered raw ground beef. Due to the fragility of the wall of the egg in the early hours in the environment, the tests were done after about eight hours of lay. The eggs were removed from the meat with the aid of a fine brush and deposited on filter paper moistened with distilled water in sterile Petri dishes for separation and counting.

All stages of this process were performed using aseptic techniques in a laminar flow. To maintain the external surface of the eggs, considered the most contaminated, free of bacteria and to ensure the safety of the biotherapeutic method, three replicates of 60 eggs were immersed in a solution of sodium hypochlorite (NaClO) at a concentration of 0.5% during one or three minutes, and then washed twice in sterile distilled water (Table 1). The concentration was chosen based on studies conducted by IVERSEN (1996), who made use of sodium hypochlorite 0.5% - also called Dakin's solution (PAULINO, 1999) -, and GREENBERG (1970), which indicated that any concentration of 0.01 to 2% could be suitable for the disinfection of the eggs of insects.

As control group, three replicas of 60 eggs were immersed in sterile distilled water (0% of NaClO), following the same procedure in the treated group. After two washes, the eggs were placed in Petri dishes lined with sterile filter paper, moistened with saline solution 0.9% and maintained for 15 hours in a climatic chamber at controlled temperature of 25 ± 1 °C, time required for hatching.

After hatching, the immature were counted to determine the effect of treatment on survival of specimens. For this investigation the larvae were kept under the same conditions and without offering food, counted and discarded 1, 12, 24, 36, 48 and 60 hours after hatching. Analysis of variance of one factor (ANOVA) was performed to identify possible differences in hatching rate and larval survival compared to each treatment. Duncan's multiple comparison test was performed to compare survival rates in different time points. For all analyzes it was considered an overall significance level of 5% and it was used the statistical SAS ® (SAS Inst 2006) package.

4.2.3. MICROBIOLOGICAL ANALYSIS

To prove the effectiveness of the sterilization process 20 newly hatched larvae from each replicate were immersed in 4 ml of sterile distilled water and homogenized by vortexing for 1 minute, the liquid being stored for microbiological analysis.

Aliquots of 0.1 ml of the stored liquid were serially diluted to 10^{-3} and inoculated in Petri dishes containing culture media "Plate Count Agar" (PCA), Blood Agar (both maintained at 35 °C) and Sabouraud (maintained at 25 °C), the first two selective for bacteria, among which haemolytic and the last selective for fungi. The readings of the plates were done 24, 48, 72 and 96 hours post-inoculation to determine the growth of microorganisms.

4.2.4. MICROBIOTA WITHIN LARVAE

After the investigation of the sterilization of the outside of the larvae, microbiological analysis of the internal part of the larval was taken. Using the sterilization method similar to that described above, two replicas of the control group and two replicas of the treatment group with NaClO at 0.5% for 1 minute were treated, so that after hatching, 20 newly hatched larvae from each replicate were immersed in 4 ml of sterile distilled water and macerated with a sterile glass piston. Aliquots of 0.1 ml of this liquid were inoculated in Petri dishes containing the same culture media used in the sterilization tests (PCA, Blood Agar and Sabouraud). The readings of the plates were done 24, 48, 72 and 96 hours post-inoculation to determine the growth of microorganisms.

4.3. RESULTS AND DISCUSSION

Regarding the hatching rate and survival, there was no significant variation between control and treated groups ($F = 0.05$, $p = 0.9491$) in the two immersion times ($F = 0.10$, $p = 0.7542$) (Table 2). This indicates that *C. macellaria* showed good tolerance and resistance to sodium hypochlorite 0.5% in both immersion times.

The only comparison showing significant difference on the tests is the one related to the moments of observation. The longer they stay without food, the lower is the survival of larvae ($F = 109.66$; $p < 0.0001$), pointing that the cause of larval death is starvation and not the sterilization procedure.

From the inoculation of homogenized liquid larvae it was observed the absence of microbiological growth after 96 hours of incubation, on the plates which had been inoculated material from the treated groups, different from the plates inoculated with material from the control group (Figures 1 and 2). Identification of the material from the colony forming units of the control group showed signs of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and other Gram-negative coliform bacteria, and Gram-positive cocci of *Staphylococcus*, commonly found in infected skin lesions (BOWLER et al., 2001; BEXFIELD et al., 2008; CAZANDER et al., 2009). Additionally, the absence of bacterial growth on a rich and non-selective medium, such as blood agar, confirms that the use of this disinfectant agent makes safe the application of the larvae, after sterilization, on the lesions in view of biotherapeutic treatment.

The culture media also showed the absence of bacteria and fungi within the first instar larvae, since the material seeded with macerated larvae from the treated group showed no growth of colonies (Figure 3). Thus, the present microorganisms in the control group probably come from the contact of the outer layer of the egg with the parent, naturally contaminated in the environment. Once more, these data confirm the importance of the previous sterilization of eggs and security of using the treated larvae, since they have no internal pathogenic microbiota.

Among some advantages of making use of sodium hypochlorite is its fast action, an observation confirmed by the results obtained here as the time required for washing eggs was of only one and three minutes, besides being a broad-spectrum bactericidal and virucidal (PAULINO, 1999). It is a product with a low cost and because it is not a substance that needs control over its sale, it is also easy to purchase.

The procedure used was previously tested and resulted in achieving the best rate of egg hatching and viability of larvae of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) and *C. putoria* (Wiedemann) (NITSCHKE, 2010), as well as the results obtained in this study, confirming that *C. macellaria* eggs sterilization made by sodium hypochlorite is an efficient technique to be used to obtain larvae free of pathogens for use in the larval therapy. We caution though that microbiological testing should be part of routine investigation of sterilization so the larval therapy can be used safely and successfully for therapeutic purposes.

4.4. CONCLUSION

The results obtained in this study shows that disinfection of the eggs of *C. macellaria* made with NaClO is effective for obtaining sterile larvae for use in larval therapy. We suggest the treatment with NaClO at 0.5% for three minutes, because it uses enough chemicals and amount of time for the safe cleaning of the larvae.

4.5. REFERENCES

- BAER, W.S. The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larva of the blowfly). **Journal of Bone and Joint Surgery**, 13:438-474, 1931.
- BEXFIELD A.; BOND A.E.; ROBERTS E.C.; 2008; DUDLEY E.; NIGAM Y.; THOMAS S.; NEWTON R.P.; RATCLIFFE N.A. The antibacterial activity against MRSA strains and other bacteria of a <500 Da fraction from maggot excretions/secretions of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). **Microbes and Infection**, 10:325-333, 2008.
- BOWLER P.G.; DUERDEN B.I.; ARMSTRONG D.G. Wound Microbiology and Associated Approaches to Wound Management. **Clinical Microbiological Reviews**, 14(2):244-269, 2001.
- CARVALHO, L.M.L.; THYSSEN, P.J.; LINHARES, A.X.; PALHARES, F.B. A checklist of arthropods associated with carrion and human corpses in southeastern Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 95:135-138, 2000.
- CARVALHO, L.M.L.; THYSSEN, P.J.; GOFF, M.L.; LINHARES, A.X. Observations on the succession pattern of necrophagous insects on a pig carcass in an urban area of southeastern Brazil. **Aggrawal's International Journal For Medical Toxicology**, 5:33-39, 2004.
- CAZANDER G.; VAN VEEN K.E.B.; BERNARDS A.T.; JUKEMA G.N. Do maggots have an influence on bacterial growth? A study on the susceptibility of strains of six different bacterial species to maggots of *Lucilia sericata* and their excretions/secretions. **Journal of Tissue Viability**, 18:80-87, 2009.
- ECHEVERRI, M.I.W. *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae), uma nueva alternativa para La terapia larval y reporte de casos en Colombia. **Iatreia**, 23:107-116, 2010.
- ESTRELA, C.; ESTRELA, C.R.A.; BARBIN, E.L.; SPANÓ, J.C.E.; MARCHESAN, M.A.; PÉCORÁ, J.D. Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Brazilian Dental Journal**, 13:113-117, 2002.

- FIGUEROA, L.; UHEREK, F.; YUSEF, P.; LÓPEZ, L.; FLORES, J. Maggot therapy in patients with chronic skin ulcers. **Parasitología Latinoamericana**, 61:160-164, 2006.
- FINE, A.; ALEXANDER, H. Maggot Therapy Technique and Clinical Application. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, 16:572-582, 1934.
- GREENBERG, B. Sterilizing procedures and agents, antibiotics and inhibitors in mass rearing of insects. **Bulletin of Entomological Society of America**, 16:31-36, 1970.
- GRELLA, M.D.; THYSSEN, P.J. Chave taxonômica interativa para espécies de dípteros califorídeos (Infraordem: Muscomorpha) do Brasil. 2011. Disponível em <http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/calliphoridae_brazil/>. Acesso em: 03 mar. 2012.
- IVERSEN, E. Methods of Treating Injuries of Work Animals. **Buffalo Bulletin**, 15:34-37, 1996.
- JUKEMA, G.N.; MENON, A.G.; BERNARDS, A.T.; STEENVOORDE, P.; RASTEGAR, A.T.; VAN DISSEL, A.T. Amputation-Sparing Treatment by Nature: “Surgical” Maggots Revisited. **Clinical Infectious Diseases**, 35:1566-1571, 2002.
- MACKERRAS, M.J.; FRENEY, M.R. Observations on the nutrition of maggots of Australian blow-flies. **The Journal of Experimental Biology**, 10:239-246, 1932.
- MARCONDES, C.B. **Terapia Larval: de lesões de pele causadas por diabetes e outras doenças**. Santa Catarina: Editora da UFSC. 89p, 2006.
- MEKKES, J.R.; LOOTS, M.A.M.; VAN DER WAL, A.C.; BOS, J.D. Causes, investigation and treatment of leg ulceration. **British Journal of Dermatology**, 148(3):388-401, 2003.
- MELLO, R.P. Chave para identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorrhapha) encontradas no Brasil. **Entomologia y Vectores**, 10:255-268, 2003.
- MENDES, J.; LINHARES, A.X. Atratividade por iscas e estágios de desenvolvimento ovariano em fêmeas de várias espécies sinantrópicas de Calliphoridae (Diptera). **Revista Brasileira de Entomologia**, 37:157-166, 1993.
- MORETTI, T.C.; THYSSEN, P.J.; SOLIS, D.R. Breeding of the Scuttle Fly *Megaselia scalaris* in a fish carcass and implications for the use in Forensic Entomology (Diptera: Phoridae). **Entomologia Generalis**, 31:349-353, 2009.
- NITSCHKE, M.J.T. **Avaliação da recuperação de lesões cutâneas por meio de terapia larval utilizando como modelos ratos Wistar**. 2010. 53 f. Tese (Doutorado em Biologia Geral e Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.
- PAULINO, C.A. Anti-sépticos e desinfetantes. In SPINOSA, H.S. et al. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**, 2nd ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1999. p. 440-452.
- SAS Institute Incorporation. **S.A.S. user’s guide: Statistics**, Version 6.12. Cary: S.A.S Institute Inc., 2006.

- SCAVÉE, V.; POLIS, F.X.; SCHOEVAERDTS, J.C. Maggot Therapy: Many hands make light work. **Acta Chirurgica Belgica**, 103:405-407, 2003.
- SHERMAN, R.A.; WYLE, F.A.; VULPE, M. Maggot therapy for treating pressure ulcers in spinal cord injury patients. **Journal of Spinal Cord Medicine**, 18:71-74, 1995.
- SHERMAN, R.A.; WYLE, F.A. Low-cost, low-maintenance rearing of maggots in hospitals, clinics and schools. **American Journal of Tropical Medicine**, 54:38-41, 1996.
- SHERMAN, R.A.; HALL, M.J.R.; THOMAS, S. Medical Maggots: an Ancient Remedy for some Contemporary Afflictions. **Annual Reviews Entomology**, 45:55-81, 2000.
- SOUZA, A.M.; LINHARES, A.X. Diptera and Coleoptera of potential forensic importance in Southeastern Brazil: relative abundance and seasonality. **Medical Veterinary Entomology**, 11:8-12, 1997.
- ZUMPT, F. **Myiasis in man and animals in the old World**. London: Butterworths. 267p, 1965.

Table 1 - Outline of the experimental groups to determine the survival of immature for use in larval therapy.

Treatments	Experimental groups	Control group I	Experimental groups	Control group II
	I		II	
Concentrations/type of substance	NaClO 0.5%	Sterile distilled water	NaClO 0.5%	Sterile distilled water
Treatment time	One minute		Three minutes	
Rinses	Two and three minutes in sterile distilled water			

Table 2 - Survival rate (%) of *Cochliomyia macellaria* immatures under different treatments (time of immersion and concentration of NaClO).

		Survival rate (%) hours post-hatching				
Treatment time	Concentrations/type of substance	12h	24h	36h	48h	60h
One minute	Sterile distilled water	97.5 (A)	92.5 (A)	87.5 (A)	37.5 (B)	0 (C)
	NaClO 0.5%	95.0 (A)	80.0 (A)	77.5 (A)	65.0 (B)	0 (C)
Three minutes	Sterile distilled water	95.0 (A)	87.5 (A)	70.0 (A)	52.5 (B)	0 (C)
	NaClO 0.5%	85.0 (A)	92.5 (A)	82.5 (A)	50.0 (B)	0 (C)

*Means with the same letter in the same line are not significantly different according Duncan test

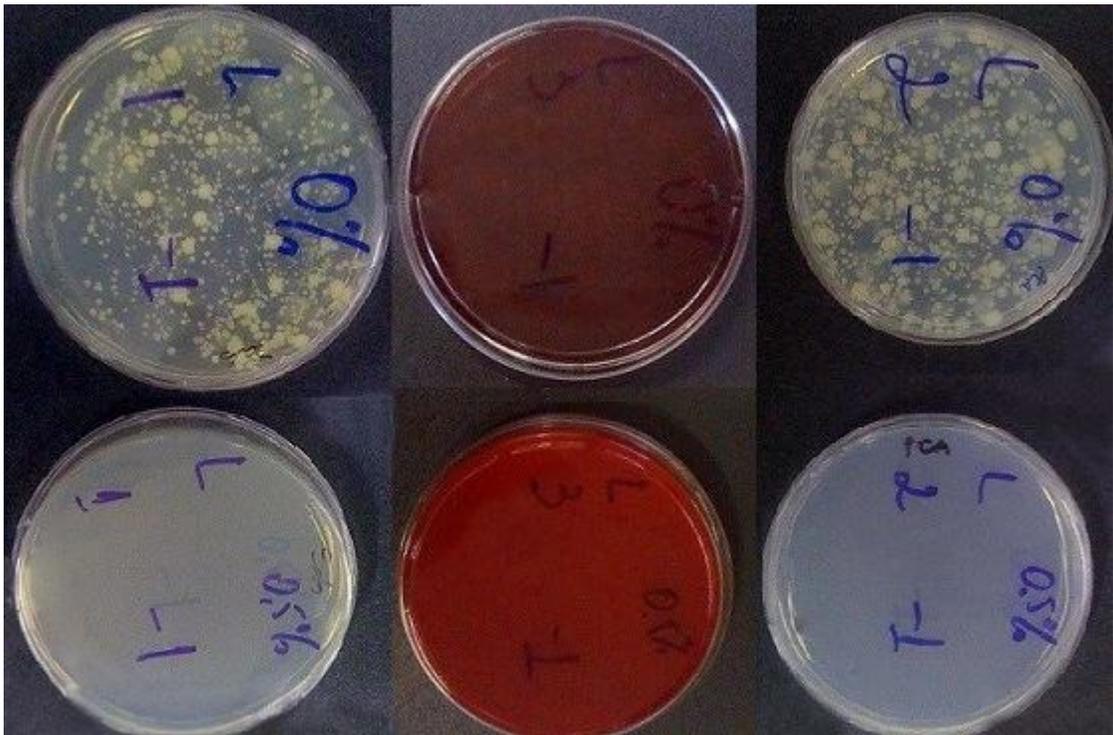


Figure 1 - Petri dishes containing Sabouraud culture media (left), blood agar (center) and PCA (right), after an incubation period of 96 hours of homogenized liquid larvae, showing colony forming units (CFU) in the control group (top row) and absence of CFU to certify sterilization in the group that received treatment with 0.5% NaClO for one minute (bottom row).

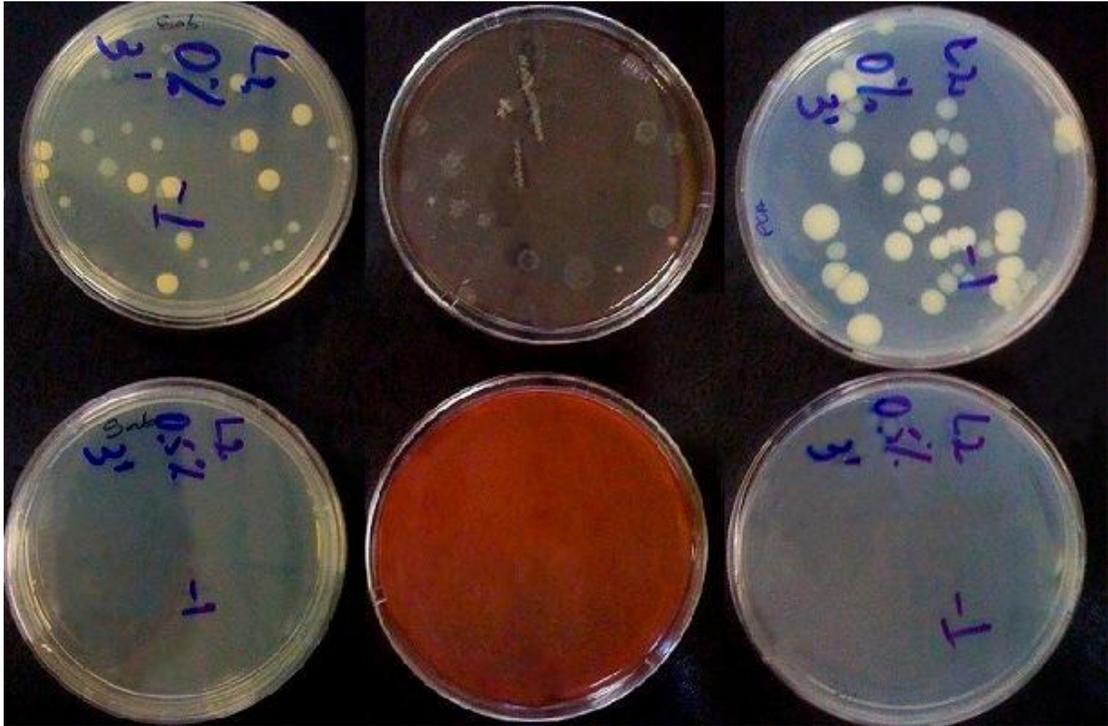


Figure 2 - Petri dishes containing Sabouraud culture media (left), blood agar (center) and PCA (right), after an incubation period of 96 hours of homogenized liquid larvae, showing colony forming units (CFU) in the control group (top row) and absence of CFU to certify sterilization in the group that received treatment with 0.5% NaClO for three minutes (bottom row).

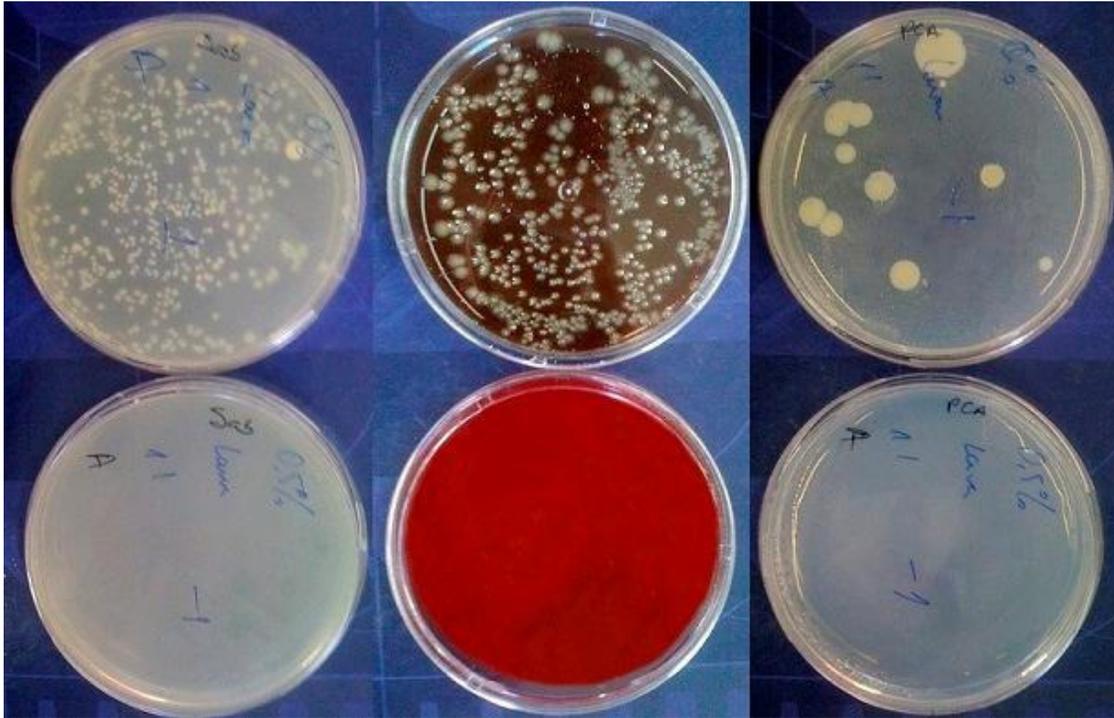


Figure 3 - Petri dishes containing Sabouraud culture media (left), blood agar (center) and PCA (right), after an incubation period of 96 hours of homogenized liquid with macerated larvae showing CFU in the control group (top row) and absence of CFU in the group that received treatment with 0.5% NaClO for one minute (bottom row) for certifying the absence of pathogenic microorganisms within the larvae.

5. CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DA DENSIDADE LARVAL DE *Cochliomyia macellaria* F. (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) PARA USO TERAPÊUTICO NA RECUPERAÇÃO DE LESÕES TEGUMENTARES²

RESUMO

A terapia larval (TL) consiste na aplicação de larvas estéreis de moscas necrófagas (Diptera) sobre lesões crônicas ou infectadas visando promover ou acelerar o processo de cicatrização. Assim, neste estudo objetivou-se avaliar o comportamento e a densidade larval de *Cochliomyia macellaria* F. (Calliphoridae) mais apropriada para o desbridamento de lesões com tecido desvitalizado. Lesões tegumentares foram induzidas em ratos *Wistar* machos a partir da aplicação, subcutânea na região dorsal, de 0,2 ml de solução 1:4 de ácido clorídrico e água destilada estéril. Ao todo foram montados cinco grupos experimentais: (I) tratamento com 5 larvas/cm²; (II) 15 larvas/cm²; (III) 25 larvas/cm²; (IV) desbridamento mecânico; e animais (V) que não receberam qualquer tipo de tratamento. Para os grupos que envolveram TL foram usadas larvas com 12 h pós-eclosão, cujos ovos foram esterilizados com NaClO 0,5% por três minutos, tendo sido mantidas nas lesões por 12 h. O processo de cicatrização foi avaliado qualitativamente (a partir da mensuração de certos parâmetros associados a lesão) e quantitativamente (tempo). Fragmentos de pele foram coletados antes do tratamento e 12 h, 7 dias e 14 dias pós-tratamento, e processados para análise histológica. Em relação ao comportamento, foi observado que os imaturos se alimentaram apenas de tecido necrosado, portanto, *C. macellaria* é uma excelente candidata para o uso em TL. Não houve diferença significativa nos tempos de cicatrização entre os grupos experimentais. Contudo, foi observado que na relação de 25 larvas/cm² houve um maior grau de vascularização nos tecidos, quando comparado aos demais tratamentos, incluindo os de menores densidades larvais. Os mecanismos envolvidos nesse processo ainda são desconhecidos, mas conclui-se que as larvas tem um importante papel na modulação da resposta imunológica do hospedeiro, sendo promissor o seu uso, provavelmente, em maiores densidades do que o preconizado na literatura.

PALAVRAS-CHAVE: terapia larval, cicatrização, moscas, Brasil.

² As normas de citação bibliográfica estão de acordo com o recomendado nas instruções para os autores para submissão de manuscritos disponíveis em <http://link.springer.com/journal/436>.

5.1. INTRODUÇÃO

A terapia larval (TL) envolve a aplicação intencional de larvas vivas e estéreis de moscas (Diptera) em locais onde haja lesões tanto no homem quanto em animais, a fim de desbridar a lesão, removendo o tecido necrótico de modo a facilitar o crescimento do tecido de granulação e, conseqüentemente, promover a cicatrização (MARTINI; SHERMAN, 2003). O efeito terapêutico desse tipo de procedimento sobre feridas agudas ou crônicas, com ou sem infecções, deve-se à sinergia de múltiplas substâncias com três principais modos de ação: desbridamento, desinfecção e estimulação da cicatrização (FLEISCHMANN *et al.*, 2004). Nas décadas de 1970 e 1980, a terapia larval era empregada como último recurso nos casos de infecções resistentes (HORN *et al.*, 1976; TEICH; MYERS, 1986). A partir de 1990, houve novo interesse por essa bioterapia devido, sobretudo, ao aparecimento de bactérias resistentes a antibióticos. O sucesso de ensaios clínicos em feridas não cicatrizadas por tratamentos convencionais, alcançados por SHERMAN e PETCHER (1988), SHERMAN *et al.* (1995), SHERMAN (2003) e TURKMEN *et al.* (2010), atraiu a atenção internacional e a aceitação da TL em vários países (MARCONDES, 2006).

O desbridamento trata-se de uma intervenção que consiste em eliminar o tecido necrótico de uma ferida, o qual se acredita que pode interferir diretamente no processo de recuperação e cicatrização (SOARES *et al.*, 2009). As larvas realizam essa tarefa de forma eficiente por terem digestão do tipo externa, ou seja, secretam seu suco digestivo rico em enzimas proteolíticas sobre o substrato alimentar, que será então absorvido (VISTNES *et al.*, 1981). A existência de pequenas placas e ganchos que compõe o aparelho bucal dos imaturos facilita a penetração de tais enzimas, o que provavelmente estimula a secreção de citocinas pelo paciente, ajudando na recuperação do trauma (FLEISCHMANN *et al.*, 2004).

Apesar da fácil aplicabilidade, para garantir maior segurança e sucesso no tratamento, dois aspectos devem ser fortemente considerados: (1) o uso de larvas estéreis visando não introduzir outros patógenos no tecido injuriado (SIMMONS, 1935), e (2) assegurar que a espécie selecionada se alimente exclusivamente de tecido necrótico, secreções e/ou fibrina, e não sobre tecidos humanos saudáveis (SHERMAN *et al.*, 2000).

Grande parte dos relatos feitos em literatura recomenda a aplicação de larvas de *Phormia regina* (Meigen) ou então de *Lucilia sericata* (Meigen), sendo que a primeira não foi registrada em território brasileiro e a segunda tem distribuição geográfica restrita a locais de clima mais

ameno ou grandes altitudes. O uso de insetos mais abundantes, que não apresentem sazonalidade marcante e de ampla distribuição geográfica parece ser mais pertinente em termos práticos para alavancar a aplicabilidade dessa terapêutica.

No Brasil a TL ainda é incipiente. Não há relato de espécies reconhecidamente promissoras para esse fim, isto é, que assegure que venham a se alimentar apenas de tecido necrosado e não sadio dos vertebrados, nem mesmo clarificando a densidade de imaturos que mais convém aplicar no que diz respeito ao número de espécimes por área de lesão. Sendo assim, neste estudo objetivou-se avaliar o desempenho de larvas estéreis de *Cochliomyia macellaria* no desbridamento de lesões com tecido desvitalizado e secreção, usando como modelo animal ratos da linhagem *Wistar*, e também avaliar qual é a densidade larval mais apropriada (5, 15 ou 25 larvas/cm²), tendo em vista a busca de parâmetros como qualidade e tempo de tratamento, visando adequar o período de aplicação para 12 horas, o que propiciaria um atendimento sem necessidade de internação ou ambulatorial.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. OBTENÇÃO DOS IMATUROS E ESTERILIZAÇÃO

Colônias de adultos de *C. macellaria* foram estabelecidas a partir de coletas realizadas em ambiente natural utilizando-se armadilhas confeccionadas com garrafa plástica (MORETTI *et al.*, 2009), as quais continham como isca fígado bovino cru e víscera de frango, expostas por 24 h na região da Serra do Lopo, município de Extrema, MG (22°89'S: 46°33'W).

Como substrato para oviposição foi oferecida carne bovina moída crua. Com aproximadamente 8 h de postura, os ovos foram retirados da carne e esterilizados em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,5% (solução de Dakin) por três minutos, seguido de duplo enxágue em água destilada estéril. Todas as manipulações foram realizadas dentro de fluxo laminar.

Em seguida, os ovos foram colocados sobre placas de Petri forradas com papel filtro estéril e umedecido com soro fisiológico a 0,9%. Foram então mantidos em câmara climática sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), fotoperíodo (12: 12 horas) e umidade relativa do ar ($70 \pm 10\%$), até eclosão das larvas. Esses procedimentos seguem descritos detalhadamente em THYSSEN *et al.* (2013).

5.2.2. MODELOS ANIMAIS E INDUÇÃO DAS LESÕES

Foram utilizados como modelos animais ratos *Wistar* machos Specific Pathogen Free (SPF), com massa corporal aproximada de 350 gramas, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da UNICAMP. Dentro dos isoladores os animais foram mantidos individualmente em gaiolas de plástico forradas com maravalha. Ração e água foram fornecidas *ad libitum*.

Para indução das lesões, de acordo com os padrões aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP (protocolo nº 2689-1 A constante no Anexo), os animais foram anestesiados anteriormente com solução de ketamina/xilazina (0,2 ml/100 g), via intraperitoneal, e em seguida tricotomizados na região dorsal, com uso de aparelho elétrico. As lesões foram produzidas a partir da administração de 0,2 ml de solução 1:4 de ácido clorídrico e água destilada, por via subcutânea e não transfixante, e os diferentes tratamentos (larval e mecânico) efetuados após 96 h.

5.2.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para avaliar o efeito da densidade larval sobre o processo de cicatrização de lesões tegumentares foram montados três grupos experimentais: (I) tratamento com 5 larvas/cm² denominado TL-5; (II) tratamento com 15 larvas/cm² denominado TL-15; (III) tratamento com 25 larvas/cm² denominado TL-25. Todas as larvas estéreis utilizadas tinham aproximadamente 12 h pós-eclosão e foram mantidas nas lesões por 12 h. Durante o tratamento, as lesões foram cobertas com curativo de poliuretano, gaze estéril, esparadrapo e uma “camisa” de pano (Figura 1).

Dois outros grupos foram mantidos como controle: (IV) tratamento mecânico, isto é, apenas desbridamento (DEB), utilizando gaze e soro fisiológico a 0,9% estéreis; e (V) cujos animais não receberam qualquer tipo de tratamento (NUL).

Foram feitas três réplicas para cada grupo experimental, totalizando o uso de 15 animais.

Para se avaliar qualitativamente as lesões e o processo de cicatrização, foram observados e mensurados os seguintes aspectos: profundidade, cor, presença de exsudato, umidade e presença de tecido desvitalizado (Tabela 1). Além disso, registros fotográficos antes, durante e após cada tratamento foram efetuados para documentar os resultados.

5.2.4. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Fragmentos de pele da borda até o centro da lesão, tanto dos animais que não receberam tratamento quanto daqueles que receberam foram coletados (antes do tratamento e 12 h, 7 dias e 14 dias pós-tratamento) e fixados em solução de formalina 10% tamponada. Posteriormente, fragmentos menores foram processados rotineiramente, inclusos em parafina, desidratados, diafanizados, cortados em secções de 3-4 µm e corados com hematoxilina-eosina (HE).

A observação foi feita em microscópio óptico comum e a caracterização da evolução do processo de cicatrização seguiu o proposto por Halloran e Slavin (2002).

5.2.5. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para avaliar se diferentes densidades larvais (variável independente) tem influência sobre o tempo de tratamento de lesão (variável dependente) foi feita uma Análise de Variância (ANOVA) de um fator. Teste “a posteriori” de comparações múltiplas de Duncan foi feito para detectar possíveis diferenças entre as médias observadas. Todas as análises foram feitas utilizando o procedimento PROC GLM (Modelos Lineares Gerais) do programa estatístico S.A.S. System for Windows versão 6.12 (S.A.S. INST. INC., 2006).

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comportamento alimentar

Em todos os grupos experimentais com TL, as larvas de *Cochliomyia macellaria* se alimentaram exclusivamente do tecido desvitalizado presente nas lesões tegumentares dos animais. O tecido sadio permaneceu intacto. Portanto, não representariam qualquer risco para futuros testes em seres humanos.

Resposta aos tratamentos

As avaliações das lesões, suas características e aspectos quando submetidas e não submetidas aos diferentes tipos de tratamentos são apresentados na Tabela 1 e Figura 2.

A baixa pontuação associada aos grupos TL após 12 h, conforme observado na Tabela 1 e quando comparados aos demais grupos, mostra a contribuição das larvas na melhoria do aspecto da lesão, sobretudo ligado ao fato de removerem o tecido necrosado. O tecido desvitalizado pode

ser constituído de material proteico, como colágeno, fibrina e elastina, caracterizando a crosta, de coloração amarelada, ou mais grossa, endurecida e de cor preta, cinza ou marrom, constituída propriamente de tecido necrótico. A restauração tissular não ocorre em presença desse material, que não só prolonga a inflamação como favorece a infecção e, por isso, a necrose deve ser removida (Kennedy; Tritch, 1997, *apud* SANTOS, 2000).

Entre alguns dos animais tratados por TL entre 12 h e 7 dias, os valores, relativos à pontuação indicativa do estado dos parâmetros, tiveram uma alteração menor do que em relação aos demais grupos experimentais. Esse fato pode indicar a necessidade de aumentar o tempo de aplicação, ou seja, permanência das larvas nas feridas ou então a avaliação no sentido de se efetuar duas aplicações. Entre sete e 14 dias, os valores diminuíram em todos os grupos decorrente do processo de cicatrização.

Em relação ao tempo total de cicatrização, não houve diferença significativa levando-se em conta os diferentes grupos experimentais ($F = 2,18$; $p = 0,1526$). Já o teste de comparações múltiplas de Duncan, mostrou que as médias de intervalo de tempo observadas foram diferentes em especial entre os grupos TL-5 e TL-25 (Tabela 2). Isso significa que a intervenção com maior número de larvas (25 larvas/cm²) acelerou o processo de cicatrização em comparação com a de menor densidade (5 larvas/cm²). Além disso, o tratamento usando um menor número de larvas não difere, no que diz respeito à cicatrização, ao método de desbridamento ou ausência de tratamento.

Considerando que, após a limpeza pelos métodos testados, não houve mais nenhuma manipulação das feridas com curativos e/ou coberturas, e que, mesmo assim, todas as lesões cicatrizaram totalmente, foi observado que depois de certo tempo o tecido morto não estava mais presente em todas as lesões (Figura 2). Durante os tratamentos, as lesões dos grupos TL foram desbridadas pela ação das larvas e as do grupo desbridamento por ação mecânica. As lesões do controle negativo, que em nenhum momento passou por tratamento, provavelmente foram desbridadas por processo autolítico.

Apesar da semelhança na fisiologia de ratos e seres humanos, existem diferenças anatômicas que devem ser consideradas na comparação da cicatrização, como por exemplo, as formas de contração e aderência da pele (frouxa/estreita) e presença/ausência de músculo no tecido subcutâneo (*panniculus carnosus*) (DORSETT-MARTIN, 2004). O modelo animal possui aderência de pele do tipo frouxa e *panniculus carnosus* presente, o que facilita a regeneração

tissular, enquanto o homem tem aderência do tipo estreita e não possui esse músculo subcutâneo. Além disso, a situação clínica de um paciente, especialmente em condição patológica crônica, envolve muitos fatores complexos e difíceis de simular em um modelo animal (variáveis ambientais, fatores sistêmicos e genéticos) (DORSETT-MARTIN, 2004).

Nesse sentido, as características das feridas alcançadas nessa pesquisa foram de lesões agudas com baixa infecção bacteriana, originadas de um dano externo (substância química tóxica) e com reparação em tempo adequado, sem complicações. Apesar das boas condições de saúde dos animais terem facilitado a cicatrização de todas as lesões, os resultados mostraram que, aplicadas sobre as lesões, o uso de larvas de *C. macellaria* representam uma alternativa viável para tratamento de feridas de quaisquer etiologias.

Histopatologia

Ao exame das lâminas (Figura 3) foram observados três grupos patológicos, assim caracterizados:

Grupo I (12 h pós-tratamento). Presença de área de ulceração com infiltração de células inflamatórias constituídas por neutrófilos e macrófagos, raros eosinófilos que se estenderam através das camadas dérmica e subcutânea. Na camada dérmica foi encontrada grande quantidade de restos celulares e hemorragia.

Grupo II (7 dias pós-tratamento). Presença de área ulcerada com infiltração de neutrófilos e macrófagos, somente na camada dérmica. Hemorragia e restos celulares foram observados somente na camada superficial da derme. Presença de vasos linfáticos dilatados na camada profunda da derme.

Grupo III (14 dias pós-tratamento). Presença de pequena área de ulceração com restos celulares, hemorragia discreta e infiltrado inflamatório de neutrófilos e macrófagos. Em alguns animais ocorreu o fechamento da úlcera, restando ainda na derme pequena quantidade de macrófagos.

Especificamente em relação ao grupo TL-25, foi observado um maior grau de vascularização, quando comparado aos demais tratamentos, com a formação de numerosos vasos sanguíneos e visualização de hemácias em seu interior.

Neste estudo não foram observados os mecanismos envolvidos com a resposta imune de ambos, inseto e hospedeiro, contudo, em estudo realizado por Zhang *et al.* (2010), foi observado

o efeito promissor de larvas de moscas em feridas, pela constatação de que extrato de ácidos graxos das larvas secas de *L. sericata* regula a imunohistoquímica e aumenta o número de novos capilares durante a fase inflamatória, bem como auxilia na contração da ferida na fase de formação de tecido de granulação e durante a remodelação tecidual, estimulando a angiogênese e a cicatrização da ferida, eventos não concomitantes.

Outros fatores envolvidos na promoção do processo de cicatrização em casos que envolvam feridas crônicas devem ser pesquisados, ainda mais levando-se em conta que alternativas podem ser uma importante via para aqueles pacientes cujos tratamentos anteriores não resultaram em sucesso, quer seja por infecções bacterianas concomitantes ou por apresentarem certa deficiência da resposta imune, como ocorre, por exemplo, em pacientes diabéticos.

Agradecimentos. Ao Dr. Mauro P. Soares, médico veterinário (UFPel, Pelotas, Brasil) pelo auxílio na histopatologia. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo (Processo nº 2012/06033-5).

5.4. REFERÊNCIAS

- Dorsett-martin WA (2004) Rat models of skin wound healing: A review. *Wound Repair and Regen* 12:591-599
- Fleischmann W, Grassberger M, Sherman R (2004) *Maggot Therapy: a handbook of maggot-assisted wound healing*. New York, Thieme, 84p
- Halloran CM, Slavin JP (2002) Pathophysiology of wound healing. *Surgery* 20:i-v
- Horn KL, Cobb JRAH, Gates GA (1976) Maggot therapy for subacute mastoiditis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 102:377-379
- Marcondes CB (2006) *Terapia Larval: de lesões de pele causadas por diabetes e outras doenças*. Santa Catarina, Editora da UFSC, 89p
- Martini RK, Sherman RA (2003) Terapia de Desbridamento com Larvas. *JBM* 85:82-85
- Moretti TC, Thyssen PJ, Solis DR (2009) Breeding of the scuttle fly *Megaselia scalaris* in a fish carcass and implications for the use in Forensic Entomology (Diptera: Phoridae). *Entomol Gen* 31:349-353

- SAS Institute Incorporation (2006) S.A.S. user's guide: Statistics, Version 6.12. Cary: S.A.S Institute Inc.
- Santos VLCG (2000) Avanços tecnológicos no tratamento de feridas e algumas aplicações em domicílio. In: Duarte YAO, Diogo MJD (ed) Atendimento domiciliar: um enfoque gerontológico. Atheneu, São Paulo, pp 265-306
- Sherman RA, Pechter EA (1988) Maggot therapy a review of therapeutic applications of fly larvae in human medicine, especially for treating osteomyelitis. *Med Vet Entomol* 2:225-230
- Sherman RA, Wyle FA, Vulpe M (1995) Maggot therapy for treating pressure ulcers in spinal cord injury patients. *J Spinal Cord Med* 18:71-74
- Sherman RA, Hall MJR, Thomas S (2000) Medical Maggots: an Ancient Remedy for some Contemporary Afflictions. *Annu Rev Entomol* 45:55-81
- Sherman RA (2003) Maggot therapy for treating diabetic foot ulcers unresponsive to conventional therapy. *Diabetes Care* 26:446-451
- Simmons SW (1935) A bactericidal principle in excretions of surgical maggots which destroys important etiological agents of pyogenic infections. *J Bacteriol* 30:253-267
- Soares MO, Iglesias CP, Bland JM, Cullum N, Dumville JC, Nelson EA, Torgerson DJ, Worthy G (2009) Cost effectiveness analysis of larval therapy for leg ulcers. *BMJ* 338:1-8
- Teich S, Myers RA (1986) Maggot therapy for severe skin infection. *South Med J* 79:1153-1155
- Thyssen PJ, Nassu MP, Nitsche MJT, Leite DS (2013) Sterilization of immature blowflies (Calliphoridae) for use in larval therapy. *J Med Med Sci* 4:405-409
- Turkmen A, Graham K, Mcgrouther DA (2010) Therapeutic applications of the larvae for wound debridement. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 63:184-188
- Vistnes LM, Lee R, Ksander GA (1981) Proteolytic activity of blowfly larvae secretions in experimental burns. *Surgery* 90:835-841
- Zhang Z, Wang S, Diao Y, Zhang J, Lv D (2010) Fatty acid extracts from *Lucilia sericata* larvae promote murine cutaneous wound healing by angiogenic activity. *Lipids in Health and Disease* 9:24

Tabela 1 - Características das lesões em cada modelo animal frente ao tempo de lesão e sob diferentes circunstâncias (grupos experimentais). A pontuação indica o estado dos parâmetros: quanto menor o valor, menos aguda é a lesão.

Grupos experimentais	Profundidade				Cor				Exsudato				Umidade				Tecido desvitalizado (fibrina/crosta/pus)				TOTAL			
	0: Pele íntegra 1: Epiderme/derme 2: Subcutâneo 3: Fáscia muscular				0: Vermelho 1: Rosa 2: Amarelo 3: Marrom				0: Ausente 1: Aquoso 2: Sanguinolento 3: Seroso				0: Presente 1: Ausente 2: Exsudato				0: Ausente 1: Presente							
	0h	12h	7d	14d	0h	12h	7d	14d	0h	12h	7d	14d	0h	12h	7d	14d	0h	12h	7d	14d	0h	12h	7d	14d
NUL	2	2	1	1	1	3	1;2	0	0	0	2	0	1	1	2	1	0	1	1	0	4	7	7,5	2
	2	2	1	1	1	1	1;2	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	4	5	3,5	2
	2	2	1	1	1	1	1;3	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	4	5	5	2
DEB	2	2	- ^c	-	1	1	-	-	0	0	-	-	1	2	-	-	1	1	-	-	5	6	-	-
	2	2	1	1	1	0	0	0	0	2	0	0	1	2	1	0	1	1	1	0	5	7	3	1
	2	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	5	5	3	2
TL-5	2	2	1	1	1	0	2;3	0	1	0	0	0	2	1	0;1	0	1	1	1	0	7	4	5	1
	2	2	1	1	1;2 ^a	0	1;2	0	1	0	0	0	2	1	0	1	1	1	1	0	7,5 ^b	4	3,5	2
	2	2	1	1	1;2	1	1;3	0	1	1	0	0	2	2	0;1	1	1	1	1	0	7,5	7	4,5	2
TL-15	2	2	2	1	2	0;2	3	0;2	1	1	0	0	2	2	1	0	1	1	1	1	8	7	7	3
	2	2	1	1	1;2	0	1	1	1	0	0	0	2	1	0	1	1	0	1	0	7,5	3	3	3
	2	2	1	1	1	0	3	0	1	0	0	0	2	1	1	1	1	1	1	0	7	4	6	2
TL-25	2	2	1	1	2	0	1	0	1	0	0	0	2	1	0	0	1	0	1	0	8	3	3	1
	2	2	1	1	1	1	3	0	1	0	0	0	2	1	1	1	1	1	1	0	7	5	6	2
	2	2	2	1	2	0	3	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	7	4	7	2

^a Mais de um estado foi assinalado dentro de cada parâmetro nos casos onde as lesões apresentaram estados distintos simultaneamente.
^b Na pontuação total, nos casos que envolveram parâmetros com mais de um estado foi considerada a média dos valores. ^c Animal não sobreviveu.

Tabela 2 - Tempo médio, em dias, de cicatrização das lesões tegumentares em relação aos diferentes grupos experimentais.

Grupos experimentais	Tempo médio de cicatrização (dias)
NUL	24,6 (A,B*)
DEB	22,0 (A,B)
TL -5	27,0 (A)
TL -15	23,0 (A,B)
TL -25	21,0 (B)

* Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Duncan.



Figura 1 - Curativo utilizado nos grupos experimentais de terapia larval. Em **A**: tela de poliuretano e esparadrapo; **B**: “camisa” de pano para evitar a fuga dos imaturos.



Figura 2 - Características das lesões por tipo e intervalo de tratamento. Onde: NUL: sem tratamento; DEB: desbridamento mecânico; TL-5: uso de 5 larvas/cm²; TL-15: uso de 15 larvas/cm²; TL-25: uso de 25 larvas/cm²; 0: lesão inicial; 12: após 12 h; 7: após sete dias; 14: após 14 dias.

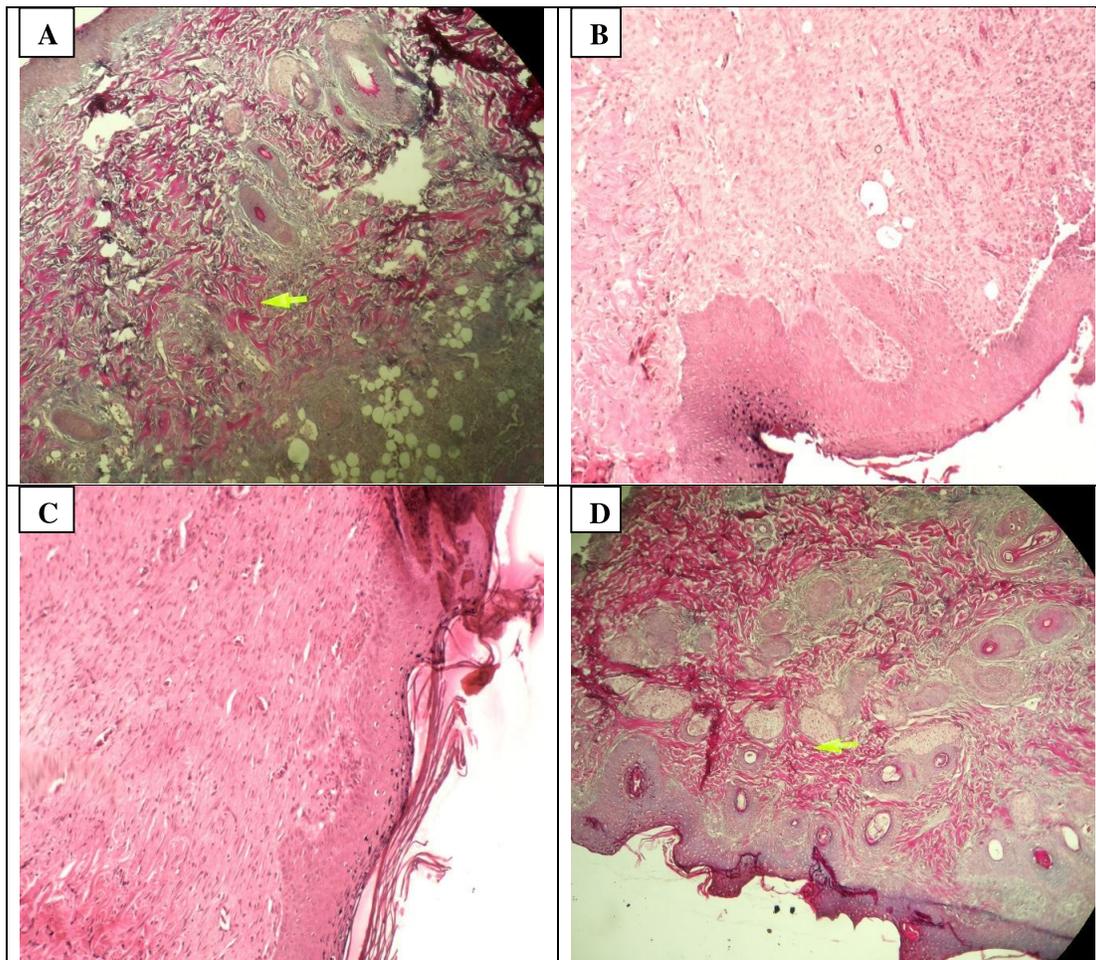


Figura 3 - Cortes histológicos relativos às áreas de ulceração (aumento 100x). Em A: grupo I, 12 h pós-tratamento, visualização de processo hemorrágico (seta); em B: grupo II, 7 dias pós-tratamento, macrófagos, neutrófilos, restos celulares e pontos hemorrágicos isolados; em C: grupo III, 14 dias pós-tratamento, reorganização celular e cicatrização; em D: formação de numerosos vasos sanguíneos após 7 dias de tratamento em uma densidade de 25 larvas/cm².

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. A desinfecção dos ovos de *Cochliomyia macellaria* feita com hipoclorito de sódio (NaClO) é eficaz para a obtenção de larvas estéreis para utilização em terapia larval. Sugere-se o tratamento com NaClO a 0,5% (solução de Dakin) durante três minutos, concentração química suficiente para a limpeza segura da superfície dos ovos e tempo de contato que não inviabiliza o desenvolvimento embrionário;

2. Larvas de *Cochliomyia macellaria* podem ser usadas de forma segura em testes de tratamento de lesões tegumentares, tendo em vista que no modelo animal utilizado, ratos *Wistar*, elas se alimentaram apenas de tecido necrosado;

3. A densidade larval mais apropriada foi a de 25 larvas/cm², em virtude do menor tempo de cicatrização quando comparado ao tratamento de 5 larvas/cm². Além do fato de que em relação ao tratamento TL-25, observou-se um maior grau de vascularização nos cortes histológicos, demonstrando que provavelmente as larvas estimulem a neoformação de vasos sanguíneos. O mesmo tipo de reação não ocorreu frente aos demais tratamentos e em menores densidades larvais, embora os mecanismos efetores da resposta imune não tenham sido pesquisados no presente estudo. Desse modo, seria imprescindível que os próximos testes de terapia larval considerassem a aplicação de um maior número de larvas/cm² do que o recomendado na literatura corrente (5-10 larvas/cm²), e também abordasse os mecanismos de interações químicas e celulares entre larva e hospedeiro, que parecem relevantes no processo de cicatrização.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMENDT, J.; KRETTEK, R.; ZEHNER, R. Forensic Entomology. **Naturwissenschaften**, 91:51-65, 2004.
- ARNOLD, H.L.J.; ODOM, R.B.; JAMES, W.D. A pele: estrutura básica e função. In: JAMES, W.D.; BERGER, T.G.; ELSTON, D.M. **Andrews Doenças da pele: Dermatologia clínica**, p.1-14. 2007.
- BAER, W.S. The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larva of the blowfly). **Journal of Bone and Joint Surgery**, 13:438-474, 1931.
- BEXFIELD A.; BOND A.E.; ROBERTS E.C.; 2008; DUDLEY E.; NIGAM Y.; THOMAS S.; NEWTON R.P.; RATCLIFFE N.A. The antibacterial activity against MRSA strains and other bacteria of a <500 Da fraction from maggot excretions/secretions of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). **Microbes and Infection**, 10:325-333, 2008.
- BLANES, L. Tratamento de feridas. Baptista-Silva JCC, editor. **Cirurgia vascular: guia ilustrado**. São Paulo: 2004. Disponível em <URL: <http://www.bapbaptista.com>>. Acesso em: 19 maio. 2014.
- BOWLER P.G.; DUERDEN B.I.; ARMSTRONG D.G. Wound Microbiology and Associated Approaches to Wound Management. **Clinical Microbiological Reviews**, 14(2):244-269, 2001.
- CARVALHO, L.M.L.; THYSSEN, P.J.; LINHARES, A.X.; PALHARES, F.B. A checklist of arthropods associated with carrion and human corpses in southeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 95:135-138, 2000.
- CARVALHO, L.M.L.; THYSSEN, P.J.; GOFF, M.L.; LINHARES, A.X. Observations on the succession pattern of necrophagous insects on a pig carcass in an urban area of southeastern Brazil. **Aggrawal's International Journal For Medical Toxicology**, 5:33-39, 2004.
- CAZANDER G.; VAN VEEN K.E.B.; BERNARDS A.T.; JUKEMA G.N. Do maggots have an influence on bacterial growth? A study on the susceptibility of strains of six different bacterial species to maggots of *Lucilia sericata* and their excretions/secretions. **Journal of Tissue Viability**, 18:80-87, 2009.
- CESARETTI, I.U.R. Processo fisiológico de cicatrização da ferida. **Pelle Sana**, 2:10-2, 1998.
- CHAN, D.C.; FONG, D.H.; LEUNG, J.Y.; PATIL, N.G.; LEUNG, G.K. Maggot debridement therapy in chronic wound care. **Hong Kong Medicine Journal**, 13(5):382-386, 2007.

- COURTENAY, M.; CHURCH, J.C.; RYAN, T.J. Larva therapy in wound management. **Journal of Royal Society of Medicine**, 93(2):72-74, 2000.
- DEALEY, C. **Cuidando de feridas: um guia para enfermeiras**. São Paulo: Atheneu:1-21, 2008.
- DORSETT-MARTIN, W.A. Rat models of skin wound healing: a review. **Wound Repair and Regeneration**, 12(6):591-599, 2004.
- ECHEVERRI, M.I.W. *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae), uma nova alternativa para La terapia larval y reporte de casos en Colombia. **Iatreia**, 23:107-116, 2010.
- ESTRELA, C.; ESTRELA, C.R.A.; BARBIN, E.L.; SPANÓ, J.C.E.; MARCHESAN, M.A.; PÉCORÁ, J.D. Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Brazilian Dental Journal**, 13:113-117, 2002.
- FIGUEROA, L.; UHEREK, F.; YUSEF, P.; LÓPEZ, L.; FLORES, J. Maggot therapy in patients with chronic skin ulcers. **Parasitología Latinoamericana**, 61:160-164, 2006.
- FINE, A.; ALEXANDER, H. Maggot Therapy Technique and Clinical Application. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, 16:572-582, 1934.
- FLEISCHMANN, W.; GRASSBERGER, M.; SHERMAN, R. **Maggot Therapy: a handbook of maggot-assisted wound healing**. New York: Thieme, 84p. 2004.
- GUIMARÃES, J.H.; PAPAVERO, N. **Myiasis in man and animals in the Neotropical region**. Bibliographic database. São Paulo, FAPESP/Editora Plêiade, 308p. 1999.
- GREENBERG, B. Sterilizing procedures and agents, antibiotics and inhibitors in mass rearing of insects. **Bulletin of Entomological Society of America**, 16:31-36, 1970.
- GREENBERG, B.; KUNICH, J.C. **Entomology and the law: Flies as forensic indicators**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 306p. 2002.
- GRELLA, M.D.; THYSSEN, P.J. **Chave taxonômica interativa para espécies de dípteros califorídeos (Infraordem: Muscomorpha) do Brasil**. 2011. Disponível em <http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/calliphoridae_brazil/>. Acesso em: 03 mar. 2012.
- HALL, M.J.R.; SMITH, K.G.V. Diptera causing myiasis in man. *In*: LANE, R.P.; CROSSKEY, R.W. **Medical Insects and Arachnids**, London: Chapman & Hall. 1993. pp. 429-69.
- HALL, M.J.R.; WALL, R. Myiasis of humans and domestic animals. **Advances in Parasitology**, 35:257-334, 1995.

- HALLORAN, C.M.; SLAVIN, J.P. Pathophysiology of wound healing. **Surgery**, 20:i-v, 2002.
- HINSHAW, J. Larval Therapy. A Review of Clinical Human and Veterinary Studies. **World Wide Wounds**, Oct. 2000. Disponível em: <<http://www.smtl.co.uk/worldwide/2000/oct/janet-html>> Acesso em 15 de maio de 2014.
- HORN, K.L.; COBB, J.R.A.H.; GATES, G.A. Maggot therapy for subacute mastoiditis. **Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, 102:377-379, 1976.
- BIOTHERAPEUTICS, EDUCATION AND RESEARCH FOUNDATION, 2003. Disponível em <www.bterfoundation.org>. Acesso em 20 de maio de 2014.
- IVERSEN, E. Methods of Treating Injuries of Work Animals. **Buffalo Bulletin**, 15:34-37, 1996.
- JONES, G.; WALL, R. Maggot-therapy in veterinary medicine. **Research in Veterinary Science**, 85:394-398, 2008.
- JUKEMA, G.N.; MENON, A.G.; BERNARDS, A.T.; STEENVOORDE, P.; RASTEGAR, A.T.; VAN DISSEL, A.T. Amputation-Sparing Treatment by Nature: “Surgical” Maggots Revisited. **Clinical Infectious Diseases**, 35:1566-1571, 2002.
- KIRSHEN, C.; WOO, K.; AYELLA, E.A.; SIBBALD, R.G. Debridement: a vital component of wound bed preparation. **International Journal of Clinical Practice**, 19(9):506-517, 2006.
- LINHARES, A.X.; THYSSEN, P.J. Mííases de importância médica: moscas e entomologia forense. In: DE CARLI, G.A. (Org.). **Parasitologia clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas**. 2.ed. São Paulo: Atheneu:709-730, 2007.
- MACKERRAS, M.J.; FRENEY, M.R. Observations on the nutrition of maggots of Australian blow-flies. **The Journal of Experimental Biology**, 10:239-246, 1932.
- MARCONDES, C.B. **Terapia Larval: de lesões de pele causadas por diabetes e outras doenças**. Santa Catarina: Editora da UFSC. 89p, 2006.
- MARCONDES, C.B. Infestação curativa. **Pesquisa médica**, 15, 2010.
- MARTINI, R.K.; SHERMAN, R.A. Terapia de Desbridamento com Larvas. **Jornal Brasileiro de Medicina**, 85(4):82-85, 2003.
- MEKKES, J.R.; LOOTS, M.A.M.; VAN DER WAL, A.C.; BOS, J.D. Causes, investigation and treatment of leg ulceration. **British Journal of Dermatology**, 148(3):388-401, 2003.

- MELLO, R.P. Chave para identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorrhapha) encontradas no Brasil. **Entomologia y Vectores**, 10:255-268, 2003.
- MENDES, J.; LINHARES, A.X. Atratividade por iscas e estágios de desenvolvimento ovariano em fêmeas de várias espécies sinantrópicas de Calliphoridae (Diptera). **Revista Brasileira de Entomologia**, 37:157-166, 1993.
- MORETTI, T.C.; THYSSEN, P.J.; SOLIS, D.R. Breeding of the scuttle fly *Megaselia scalaris* in a fish carcass and implications for the use in Forensic Entomology (Diptera: Phoridae). **Entomologia Generalis**, 31:349-353, 2009.
- MUMCUOGLU, K.Y. Clinical applications for maggots in wound care. **American Journal of Clinical Dermatology**, 2(4):219-227, 2001
- NITSCHKE, M.J.T. **Avaliação da recuperação de lesões cutâneas por meio de terapia larval utilizando como modelos ratos Wistar**. 2010. 53 f. Tese (Doutorado em Biologia Geral e Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.
- PARNES, A.; LAGAN, K. M. Larval therapy in wound management: a review. **International Journal of Clinical Practice**, 61(3):488–493, 2007.
- PATTON, W.S. Notes on the myiasis-producing diptera of man and animals. **Bulletin of Entomological Research**, 12:239-261, 1921.
- PAULINO, C.A. Anti-sépticos e desinfetantes. In SPINOSA, H.S. et al. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**, 2nd ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1999. p. 440-452.
- PRICE, P.W. **Insect ecology**. Wiley, New York, 1997.
- RUBIN, E. **Patologia: bases clinicopatológicas da medicina**. 4st ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.
- SANTOS, V.L.C.G. Avanços tecnológicos no tratamento de feridas e algumas aplicações em domicílio. In: DUARTE, Y.A.O.; DIOGO, M.J.D. **Atendimento domiciliar: um enfoque gerontológico**. São Paulo: Atheneu; 2000. p.265-306.
- SAS Institute Incorporation. **S.A.S. user's guide: Statistics**, Version 6.12. Cary: S.A.S Institute Inc., 2006.
- SCAVÉE, V.; POLIS, F.X.; SCHOEVAERDTS, J.C. Maggot Therapy: Many hands make light work. **Acta Chirurgica Belgica**, 103:405-407, 2003.

- SHERMAN, R.A.; PECHTER, E.A. Maggot therapy a review of therapeutic applications of fly larvae in human medicine, especially for treating osteomyelitis. **Medical and Veterinary Entomology**, 2:225-230, 1988.
- SHERMAN, R.A.; WYLE, F.A.; VULPE, M. Maggot therapy for treating pressure ulcers in spinal cord injury patients. **Journal of Spinal Cord Medicine**, 18:71-74, 1995.
- SHERMAN, R.A.; WYLE, F.A. Low-cost, low-maintenance rearing of maggots in hospitals, clinics and schools. **American Journal of Tropical Medicine**, 54:38-41, 1996.
- SHERMAN, R.A.; HALL, M.J.R.; THOMAS, S. Medical Maggots: an Ancient Remedy for some Contemporary Afflictions. **Annual Review Entomology**, 45:55-81, 2000.
- SHERMAN, R.A. Maggot versus conservative debridement therapy for the treatment of pressure ulcers. **Wound Repair Regenerative**, 10(4):208-214, 2002.
- SHERMAN, R.A. Maggot therapy for treating diabetic foot ulcers unresponsive to conventional therapy. **Diabetes Care**, 26:446-451, 2003.
- SHERMAN R.A.; MORRISON, S.; NG, D.; Maggot debridement therapy for serious horse wounds – A survey of practitioners. **The Veterinary Journal**, 174:86–91, 2007a.
- SHERMAN R.A.; STEVENS H.; NG, D.; IVERSEN, E. Treating wounds in small animals with maggot debridement therapy: A survey of practitioners. **The Veterinary Journal**, 173:138–143, 2007b.
- SIMMONS, S.W. A bactericidal principle in excretions of surgical maggots which destroys important etiological agents of pyogenic infections. **Journal of Bacteriology**, 30:253-267, 1935.
- SOARES, M.O.; IGLESIAS, C.P.; BLAND, J.M.; CULLUM, N.; DUMVILLE, J.C.; NELSON, E.A.; TORGERSON, D.J.; WORTHY, G. Cost effectiveness analysis of larval therapy for leg ulcers. **British Medical Journal**, 338:1-8, 2009.
- SOUZA, A.M.; LINHARES, A.X. Diptera and Coleoptera of potential forensic importance in Southeastern Brazil: relative abundance and seasonality. **Medical Veterinary Entomology**, 11:8-12, 1997.
- TEICH, S.; MYERS, R.A. Maggot therapy for severe skin infection. **Southern Medical Journal**, 79:1153-1155, 1986.
- THOMAS, S.; JONES, M.; SHUTLER, S.; JONES, S. Maggots in Wound Debridement – an Introduction. **Surgical Material Testing laboratory**, 1999. Disponível em:

<<http://medidex.com/archive/95-maggots-in-wound-debridement-an-introduction.html>>
Acesso em 15 de maio de 2014.

THORNTON, D.; BERRY, M. & RALSTON, D. 2002. Case report: maggot therapy in an acute burn. **World Wide Wounds**. Disponível em: <<http://www.worldwidewounds.com/2002/august/Thornton/Larval-Therapy-Acute-Burn.html>>. Acesso em 15 de maio de 2014.

MORETTI, T.C.; THYSSEN, P.J. Miíase primária em coelho doméstico causada por *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 58 (1):28-30, 2006.

THYSSEN, P.J.; NASSU, M.P.; NITSCHKE, M.J.T.; LEITE, D.S. Sterilization of immature blowflies (Calliphoridae) for use in larval therapy. **Journal of Medicine and Medical Science**, 4(10):405-409, 2013.

TORRES, M.L.M. **Efeito de quatro antibióticos sobre larvas de *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) para utilização em Bioterapia**. 2005. 79 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

TURKMEN, A.; GRAHAM, K.; MCGROUTHER, D.A. Therapeutic applications of the larvae for wound debridement. **Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery**, 63:184-188, 2010.

VARZIM, F.L.S.B. **Esterilização de ovos de moscas varejeiras *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae) para utilização em Bioterapia**. 2005. 72 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, 2005.

VISTNES, L.M.; LEE, R.; KSANDER, G.A. Proteolytic activity of blowfly larvae secretions in experimental burns. **Surgery**, 90:835–841, 1981.

WHO - World Health Organization, **Diabetes mellitus, Fact Sheet nº 138**, 2014. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs138/en/>>. Acesso em 21 de maio 2014.

WOLFF, H.; HANSSON, C. Larval therapy – an effective method of ulcer debridement. **Clinical Experimental Dermatology**, 28(2):134-137, 2003.

WOLLINA, U.; LIEBOLD, K.; SCHMIDT, W.D.; HARTMAN, M.; FASSLER, D. Biosurgery supports granulation and debridement in chronic wounds-clinical data and remittance spectroscopy measurement. **International Journal of Dermatology**, 41(10):635-639, 2002.

- WOODLEY, N.E.; Phylogeny and classification of the Orthorrhaphous Brachycera. In: MCALPINE, J.F.; WOOD, D.M. **Manual of Nearctic Diptera**, Vol. 3, 1989. p. 1371-1396.
- YEATES, D.K.; WIEGMANN, B.M.; COURTNEY, G.W.; MEIER, R.; LAMBKIN, C.; PAPE, T. Phylogeny and systematics of Diptera: Two decades of progress and prospects. **Zootaxa**, 1668:565–590, 2007.
- ZHANG, Z-Q. Animal biodiversity: An update of classification and diversity in 2013. In: Zhang, Z.-Q. (Ed.) Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. **Zootaxa**, 3148, 237p., 2011.
- ZHANG, Z; WANG, S; DIAO, Y; ZHANG, J; LV, D. Fatty acid extracts from *Lucilia sericata* larvae promote murine cutaneous wound healing by angiogenic activity. **Lipids in Health and Disease**, 9:24, 2010.
- ZUMPT, F. **Myiasis in man and animals in the old World**. London: Butterworths. 267p, 1965.

8. ANEXO

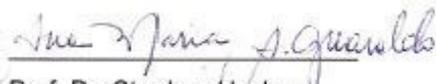
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO,

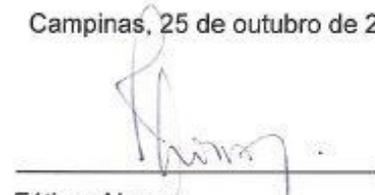
Certificamos que o projeto "Seleção e avaliação da densidade larval de espécie de Diptera candidata para uso de terapia larval na recuperação de lesões tegumentares em ratos Wistar" (protocolo nº 2689-1(A)), sob a responsabilidade de Dra. Patricia Jacqueline Thyssen / Mariana Prado Nassu, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 25 de outubro de 2013.

Campinas, 25 de outubro de 2013.



Prof. Dr. Stephen Hyslop
Vice-Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva