



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Avaliação da recuperação das lesões cutâneas por meio da terapia larval utilizando como modelos ratos *Wistar*

MARIA JOSÉ TREVIZANI NITSCHÉ

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Biologia Geral e Aplicada e
Área de concentração em *Biologia de
parasitas e microorganismos*.

BOTUCATU – SP.

2010

Avaliação da recuperação das lesões cutâneas por meio da terapia
larval utilizando como modelos ratos *Wistar*

MARIA JOSÉ TREVIZANI NITSCHÉ

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Biologia Geral e Aplicada e
Área de concentração em *Biologia de
parasitas e microorganismos*.

Dra. Patrícia Jacqueline Thyssen (orientadora)
Dr. Wesley Augusto Conde de Godoy (co-orientador)

BOTUCATU – SP.

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Nitsche, Maria José Trevizani

Avaliação da recuperação das lesões cutâneas por meio da terapia larval utilizando como modelos ratos *Wistar* / Maria José Trevizani Nitsche - Botucatu, 2010.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2010

Orientadora: Patrícia Jacqueline Thyssen
Capes: 21201005

1. Ferimentos e lesões – Tratamento. 2. Pele – Doenças – Tratamento. 3. Mosca – Larva – Uso terapêutico.

Palavras chave: Cicatrização; *Chrysomya megacephala*; *Chrysomya putoria*; Estudo experimental; Ferida; Terapia larval.

Dedico a você Fátima, esta pesquisa, minha grande amiga, companheira, que sempre acreditou em mim, no meu profissionalismo, e tenho certeza que me acompanha em todos os momentos, com sua marcante presença, alegria de viver, amor pela família, prazer pelo trabalho, por ser tão especial, intensa e importante!

*“Quando penso em você, fecho os olhos de saudade...”
Cecília Meireles*

Fá, sinto muito sua ausência, da sua voz, das nossas risadas, das festas, das viagens, dos bons momentos e dos difíceis também. Sinto saudade da sua amizade, que ficará para sempre em meu coração, nas minhas lembranças, na minha vida, e em muitas fotos...

*“Há momentos na vida em que sentimos tanto a falta de alguém que o que mais queremos é tirar essa pessoa de nossos sonhos e abraçá-la.”
Clarice Lispector*

A Deus, pela vida!!!

A minha mãe, maior incentivadora dos estudos. Obrigada pelas oportunidades para chegar até aqui. Divido com a Senhora minha conquista!

A o meu pai Zelão, que onde estiver, tenho certeza, estará orgulhoso!

Ao Milton, pelo carinho, paciência, por encorajar e compartilhar em todos os momentos.

Ao Vitor, amor e paixão da minha vida!

“Você, é algo assim, é tudo pra mim...

É como eu sonhava, Vitor

Sou feliz!!!!”

Tim Maia

As minhas irmãs, Angela e Cristina, e toda família, valeu o carinho, a amizade, o apoio e o amor incondicional que temos.

Vocês vibram com minhas conquistas, me dão forças para alcançar meus objetivos, e entre sorrisos e lágrimas, sempre estão presentes, auxiliando-me nas horas críticas, partilhando os momentos difíceis e comemorando nas

vitórias!

Obrigada!

Ao Prof. Wesley por acreditar em alguém que nunca antes havia trabalhado com moscas, pelos primeiros ensinamentos nessa área, por iniciar e incentivar a realização desta pesquisa e estimular sempre, com sua brilhante orientação, experiência e amizade.

*“O Valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”
Fernando Pessoa*

A Profa. Patrícia, que se dispôs a dividir comigo sua sabedoria, mostrando-me que as respostas científicas devem ser norteadas pela atenção. Obrigada pela orientação, apoio, oportunidade e possibilidade, de realizar este trabalho. Obrigada pela amizade!

*“Quando se admira um Mestre, o coração dá ordens à inteligência para aprender o que o mestre sabe”.
Rubem Alves*

A você Sandra, obrigada pela amizade incondicional, incentivo, companheirismo e por partilhar muitos momentos importantes em minha vida e também o dia a dia! Quando me refiro a você, tenho certeza da sabedoria de William Shakespeare..." Eu aprendi que para crescer como pessoa é preciso me cercar de gente mais inteligente do que eu."

Aos meus amigos, sempre presentes na minha vida, que cooperaram, torceram e acreditaram na realização desta pesquisa!

*"Fácil é ser colega, fazer companhia a alguém, dizer o que ele
deseja ouvir.
Difícil é ser amigo para todas as horas e dizer sempre a verdade
quando for preciso.
E com confiança no que diz!"
Carlos Drummond de Andrade*

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração de muitas pessoas. Manifesto minha gratidão a todas elas, e de forma particular:

Ao Georgette, pela oportunidade de realizar meu trabalho no Laboratório Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

Ao Mário, pelos ensinamentos, paciência, total apoio, e por acreditar em meu trabalho e na minha vontade em aprender a fazer pesquisa experimental.

Ao Departamento de Parasitologia do IBB, e aos colegas do laboratório de Ecologia Populacional, pelo apoio no dia-a-dia, repassarem suas experiências com a criação de larvas e moscas, convivência e amizade, discussões informais e momentos de descontração. Em especial, a Juliana Neves, pela colaboração na captura e identificação das moscas, objeto fundamental na minha pesquisa.

A Nilza, pela atenção dispensada em todos os momentos que frequentei o Departamento de Parasitologia do IBB-UNESP.

A Ariane, pela competência, disponibilidade e cooperação na realização dos exames microbiológicos.

Ao Jaime pela execução dos exames anatomo-histológicos, realizando coleta e processamento dos materiais.

Ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências da UNESP, particularmente à Seção de Pós Graduação.

Ao Departamento de Enfermagem, em especial a Andréia, Fernando e Agnaldo, pela colaboração em todos os momentos.

E a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

“No fim tudo dá certo, se não deu é porque ainda não chegou ao fim”

Fernando Sabino

Sumário

	Resumo	01
	Abstract	02
1	- Introdução e Revisão Bibliográfica	03
1.1	- Anatomia e fisiologia da pele	04
1.2	- Classificação das feridas e processo de cicatrização	06
1.3	- Terapia larval	08
1.4	- Espécies candidatas ao uso em terapia larval	11
2	- Objetivos Gerais	16
3	- Testes de esterilização e avaliação da viabilidade de larvas de dípteros (Calliphoridae) para uso em terapia larval	17
	<i>Abstract</i>	17
3.1	- Introdução	18
3.2	- Material e métodos	19
3.3	- Resultados e discussão	21
3.4	- Referências	24
4	- Uso de terapia larval na recuperação de lesões utilizando como modelo ratos <i>Wistar</i>	28
	<i>Abstract</i>	28
4.1	- Introdução	29
4.2	- Materiais e métodos	31
4.3	- Resultados e discussão	33
4.4	- Referências citadas	36
5	- Conclusões Gerais	44
6	- Referências Bibliográficas	45
7	- Anexos	54

Relação das Figuras

Figura 1.	Representação das camadas que compõem a pele	05
Figura 2.	Dois representantes de dípteros da família Calliphoridae: <i>Chrysomya putoria</i> (Wiedemann) (A) e <i>Chrysomya megacephala</i> (Fabricius) (B)	13
Figura 3.	Distribuição de dípteros do gênero <i>Chrysomya</i> nas Américas ...	14
Figura 4.	Gaiolas plásticas transparentes e sala climatizada utilizada para criação de insetos	51
Figura 5.	Material usado durante o processo de esterilização dos ovos em capela de fluxo laminar	51
Figura 6.	Homogeneização em Vórtex	52
Figura 7.	Inoculação das “soluções de enxágüe” em placas de Petri contendo meio de cultivo “plate count agar (PCA) e agar sangue	52
Figura 8.	Placas de Petri contendo os meios de cultivo “plate count agar” (PCA) e agar sangue após inoculação e período de incubação de 48 horas, mostrando o crescimento bacteriano para o grupo experimental GC (grupo controle) e o sucesso na esterilização do grupo GHS 0,5% (hipoclorito de sódio 0,5%)	26
Figura 9.	Gaiolas usadas para acondicionamento dos roedores	52
Figura 10.	Vista dorsal do animal anestesiado e preparado para aplicação da solução de ácido clorídrico e água bidestilada estéril 1:9 para indução de ferida	38
Figura 11.	Aplicação das larvas estéreis sobre as lesões e o curativo usado para cobertura	38
Figura 12.	Lesão induzida no animal devido à ação do ácido clorídrico com perda tecidual (dérmica, epidérmica e subcutânea), muscular e presença de secreções purulentas, fibrina e tecido necrótico	39
Figura 13.	Retirada do curativo após 16 horas e aparência inicial da lesão tratada por larvas	39
Figura 14.	Aparência das lesões nos animais tratados após o período de 7 (A) e 12 (B) dias depois da retirada das larvas	40
Figura 15.	Aparência das lesões nos animais do grupo controle após o período de sete dias recebendo tratamento por debridamento mecânico com SF 0,9%	40
Figura 16.	Aspecto histológico das lesões antes do tratamento larval	41
Figura 17.	Aspecto histológico das lesões após o tratamento larval	42

Resumo

A terapia larval consiste na aplicação de larvas vivas estéreis de dípteros obtidas em laboratório sobre lesões, feridas crônicas ou infectadas tendo como finalidade a cicatrização a partir da remoção de secreção e tecido necrosado pelo inseto facilitando, assim, o processo de cicatrização. Apesar da fácil aplicabilidade e do baixo custo, para garantir maior segurança e sucesso em relação a este procedimento dois fatores têm de ser alcançados: a esterilidade das larvas a serem aplicadas e a garantia de que a espécie selecionada para este fim fará uso, durante o seu processo de alimentação na ferida, somente de tecido necrosado. No presente estudo foi avaliada a esterilização e a viabilidade pós-esterilização de larvas de *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) em hipoclorito de sódio a 0,5% e 1,0%. Adicionalmente, foi avaliado o desempenho (qualidade e tempo de tratamento) dos imaturos dessas mesmas espécies no desbridamento de feridas cutâneas induzidas, usando como modelo animal ratos Wistar. A escolha das espécies foi motivada pela facilidade de obtenção em todo território brasileiro, levando em conta ainda seu comportamento e biologia já descritos em literatura. Os melhores resultados em relação à sobrevida e viabilidade das larvas foram obtidos com o uso do hipoclorito de sódio a 0,5% como agente esterilizante. Após o processo de esterilização, 5-10 larvas/cm² com 24 horas de vida pós-eclosão, foram aplicadas sobre as lesões induzidas, as quais por sua vez foram cobertas com gaze estéril e esparadrapo. Após 16 horas o curativo foi removido, constatando que as larvas ainda se encontravam vivas e permaneciam apenas no local da lesão, sem invadir tecidos saudáveis, havendo desaparecido o tecido necrótico e as secreções. No grupo controle, sem aplicação de larvas, o tecido necrosado e a secreção aumentaram em quantidade, considerando o mesmo intervalo de tempo do tratamento bioterápico. Fragmentos de pele com a dimensão de 1 cm² desde a borda até o centro da lesão foram retirados tanto dos grupos tratado quanto do controle para análise histopatológica. Microscópica e histologicamente, os resultados mostraram crescimento de tecido de granulação, após a retirada das larvas. Os resultados obtidos mostram que a terapia larval pode ser aplicada satisfatoriamente para facilitar o processo de cicatrização.

Palavras-chave: Calliphoridae; Diptera; lesões superficiais; tratamento; terapia larval.

Abstract

The larval therapy involves the application of sterile larvae of flies obtained in the laboratory on injuries, chronic wounds or infected with the purpose to heal from the removal of necrotic tissue and secretion by the insect, thus facilitating the cicatrization process. Despite the easy applicability and low cost, to ensure greater safety and success in relation to this procedure two factors must be achieved: the sterility of the larvae to be applied and ensure that the species selected for this purpose will use during their feeding process in the wound, only necrotic tissue. In this study we evaluated the sterilization and viability post-sterilization of the larvae of *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) in sodium hypochlorite 0.5% and 1.0%. Additionally, we evaluated the performance (quality and length of treatment) of immatures of these same species in the debridement of wounds induced, using rats as animal model. The choice of species was motivated by the ease of collecting around Brazil, taking into account their behavior and biology has already been described in literature. The best results regarding the viability and survival of larvae were obtained from the use of sodium hypochlorite at 0.5% as a sterilizing agent. After the sterilization process, 5-10 larvae/cm² with 24 hours of post-hatching, were applied over the induced lesions, which it were covered with gauze and adhesive tape. After 16 hours the bandage was removed, noting that the larvae were still alive and remained only at the injury site, without invading healthy tissue, having gone necrotic tissue and secretions. In the control group without the application of maggots, the necrotic tissue and secretion increased in quantity, considering the same interval of treatment biotherapeutic. Skin fragments with a size of 1 cm² from the margin to the center of the lesion were removed from both treated and control groups for histopathological analysis. Microscopically and histologically, the results showed growth of granulation tissue after the removal of the larvae. The results show that larval therapy can be applied successfully to facilitate the cicatrization process.

Key words: Calliphoridae; Diptera; superficial lesions; treatment, larval therapy.

1 – Introdução e Revisão Bibliográfica

Desde o surgimento de civilizações remotas, a história universal revela preocupação com o tratamento das feridas. Na pré-história, preparavam cataplasma de folhas e ervas para tratar casos de hemorragias e há centenas de anos tem sido observado que o desbridamento de tecidos necrosados em feridas infectadas e cauterizações contribuía, e muito, para a manutenção da ferida limpa e seca (SHERMAN et al., 2000). Com o passar do tempo, vários outros métodos também foram sendo adicionados e aperfeiçoados (BAER, 1931; CHERNIN, 1986).

Após 1945, com a descoberta e o advento da antibioticoterapia, muitas técnicas foram deixadas de lado. Passado certo tempo, percebeu-se que os antibióticos levavam as bactérias a desenvolver resistência, pela seleção de cepas ou linhagens menos suscetíveis (NAYLOR et al., 2001), e que os tratamentos, além de se serem mais caros, quando comparados a outros, muitas vezes, não conseguiam impedir que as complicações graves dessem origem às amputações (SHERMAN, WYLE, 1996). Tais dificuldades proporcionaram, a partir de 1980, o ressurgimento do interesse pela terapia larval com base em trabalhos realizados nos Estados Unidos por Sherman e no Reino Unido por Thomas e Church (SHERMAN et al., 2000). Atualmente, dezenas de milhares de pacientes com feridas de várias origens (diabetes e/ou úlceras de pressão, queimaduras ou fascíte necrotizante,) já foram tratados nos Estados Unidos e em vários países da Europa, principalmente no Reino Unido, Alemanha, Holanda e Suécia, com excelentes resultados (THOMAS et al., 1996; 1999a; 1999c; SHERMAN et al., 2001).

As amputações de extremidades inferiores, decorrentes de lesões crônicas de difícil cicatrização, têm sido cada vez mais frequentes em pessoas com *Diabetes mellitus* (DM), tornando-se um importante problema de saúde pública não só no Brasil com em todo o mundo (GAMBA et al., 2004). O impacto epidemiológico que o DM produz, é expresso nas

crecentes taxas de morbidade e mortalidade, e nas conseqüentes seqüelas de incapacidade, como cegueira, retinopatia diabética e insuficiência renal terminal, entre outras (ADA, 1999). Em 1995, nos Estados Unidos, a prevalência de amputações foi estimada em 10% entre pessoas com DM (NIH, 1995).

Desse modo, muitas pesquisas para tratamento de feridas estão em andamento objetivando acelerar o processo de cicatrização e reduzir possíveis complicações secundárias.

1.1 – Anatomia e fisiologia da pele

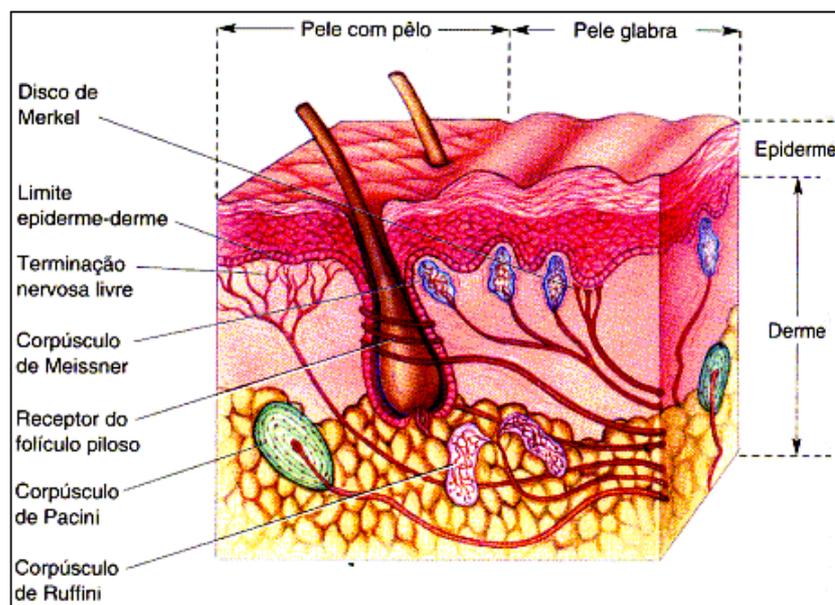
A pele divide-se em três camadas específicas: epiderme, derme e hipoderme (Figura 1) (BLANES, 2004; CANDIDO, 2006).

A epiderme é a camada externa de revestimento da pele. Sua permeabilidade é moderada à água e pouca em relação aos lipídeos. É composta por três diferentes tipos de linhagens celulares: os queratinócitos, os melanócitos e as células de Langerhans e de Merkel. É subdividida em camadas tais como a germinativa, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea. A camada germinativa, também conhecida como basal, é a mais profunda e faz limite com a derme. O pigmento melanina, presente na epiderme, protege os tecidos subjacentes contra os efeitos nocivos da luz ultravioleta. A epiderme possui poros invaginantes de folículos pilossebáceos e de glândulas sudoríparas, os quais penetram na derme, contendo também anexos cutâneos como o pêlo e a unha. O processo de renovação celular epitelial acontece de forma permanente, o que proporciona gradativa substituição da superfície externa. A vitalidade destes tecidos é mantida por difusão de oxigênio e nutrientes provenientes de vasos sanguíneos dérmicos.

A derme é a camada intermediária da pele, responsável pela vascularização cutânea, manutenção do potencial hidrogeniônico, proteção antimicrobiana e antifúngica e pela

resistência e elasticidade da cutis. Apresenta em sua constituição tecido conjuntivo, fibras colágenas e elásticas, terminações nervosas, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e músculo eretor de pêlo. Pode ser dividida em camada papilar (mais externa) e reticular (mais interna). A derme contém diferentes tipos de células, dentre elas fibroblastos, fibrócitos, mastócitos e leucócitos sanguíneos, especialmente neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos. É uma camada que fornece base firme para a epiderme e para os outros anexos cutâneos. As fibras colágenas proporcionam força de tensão e as elásticas dão flexibilidade à pele. Plexos vasculares fornecem sangue para a epiderme, sem penetrá-la, no entanto. O mecanismo de termorregulação é proporcionado pelo controle realizado pelo hipotálamo e pelas fibras nervosas simpáticas sobre o fluxo sanguíneo da derme.

A estrutura da hipoderme, também denominada de tecido subcutâneo, oferece proteção contra lesão traumática, promove o isolamento térmico e proporciona reserva calórica. Têm em sua estrutura os adipócitos, que são envolvidos em feixes de tecido conjuntivo e agrupados em lobos gordurosos.



(Fonte: BEAR et al., 2002)

Figura 1. Representação das camadas que compõem a pele.

Vários fatores interferem no processo de cicatrização, como desnutrição, infecção, diabetes, obesidade, uso de corticóides, quimioterápicos e radioterapia.

Assim, neste estudo, as lesões foram causadas em ratos saudáveis, com peso e idades bastante aproximados (GUIMARÃES, 2002; TOWNSEND, 2005).

1.2 – Classificação das feridas e processo de cicatrização

Guimarães (2002) e Townsend (2005) definiram como ferida toda lesão que leve à interrupção da continuidade de um tecido corpóreo, podendo ser causada por qualquer tipo de trauma físico, químico, mecânico ou desencadeada por uma afecção clínica, que aciona as frentes de defesa orgânica (CESARETTI, 1998).

A grande maioria das lesões no organismo é reparada pela regeneração das células parenquimais, seguidas de uma regeneração acentuada do tecido conjuntivo. Na ocorrência de perdas parciais de espessura da pele forma-se um coágulo, que seca em seguida para promover certa proteção à lesão. A partir disso inicia-se então um processo de migração celular, sendo este o primeiro evento responsável pelo reparo tecidual. É possível dizer, portanto, que perdas parciais de tecido cicatrizam-se por epitelização. Em escoriações superficiais, mas que não comprometem a membrana basal ocorre uma regeneração tecidual, mas quando a membrana basal é atingida, este resultado é insatisfatório (FERREIRA, 2003; CANDIDO, 2001).

De acordo com a literatura, a cicatrização é classificada como primeira, segunda ou terceira intenção (AMORIN, 2005; DANTAS, JORGE, 2005).

a) Cicatrização de primeira intenção: ocorre em ferimentos com perdas mínimas de tecidos e cujas bordas são aproximadas ou fechadas por sutura.

b) Cicatrização de segunda intenção: ocorre quando as bordas da ferida não estão aproximadas, ou seja, não estão apostas, por perda tecidual, como em queimaduras ou em ferimentos profundos que são deixados abertos para formação de tecido de granulação. Nesse caso, o tecido de granulação preenche a ferida e esta se contrai e “reepiteliza-se”.

c) Cicatrização de terceira intenção (ou primária tardia): ocorre 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.

No processo de cicatrização que, segundo Guimarães (2002) e Townsend (2005), o definem como complexo, especialmente nos casos que envolvam feridas consideradas crônicas, é composto por três etapas denominadas fase inflamatória, proliferativa e de maturação (BLANES, 2004).

a) Fase inflamatória: ocorrem os processos de hemostasia, onde o endotélio estimula a ação plaquetária liberando citocinas e ativando a formação de fibrina. Com a formação do trombo, há migração de polimorfonucleares, com posterior liberação de citocinas e outros potentes mediadores inflamatórios. Nessa fase a ferida é caracterizada por grande quantidade de tecido desvitalizado, em virtude da possibilidade de contaminação bacteriana.

b) Fase proliferativa: onde a proliferação de fibroblastos dá origem a uma fibroplasia e formação de tecido de granulação, com proliferação de células endoteliais e angiogênese, com a ativação de queratinócitos iniciando a “epitelização” do tecido.

c) Fase de maturação: no qual é iniciado o processo de “remodelação” da ferida, com equilíbrio entre síntese e degradação de colágeno.

1.3 – Terapia Larval

A terapia larval consiste na aplicação de larvas vivas estéreis de dípteros obtidas em laboratório, sobre lesões, feridas crônicas ou infectadas, tendo como finalidade a cicatrização, a partir da remoção de secreção e tecido necrosado pelo inseto, facilitando assim, o processo de cicatrização (MARTINI, SHERMAN, 2003). Esse procedimento é um modo alternativo para promover o desbridamento de feridas, e resultados de pesquisas publicadas e acessíveis na literatura, têm revelado que a terapia larval é muito mais eficaz para este fim quando comparada a outros tratamentos convencionais (SHERMAN et al., 1995; 2000; DOROTHY, 2000).

A terapia larval foi descoberta acidentalmente nos campos de batalha, durante a primeira guerra mundial e, consideravelmente utilizada durante as décadas de 30 e 40, indicada em casos de feridas infectadas de difícil cicatrização como osteomielite, abscessos, queimaduras, feridas de pacientes diabéticos, úlceras de pressão, lesões traumáticas, tumores e gangrenas intratáveis (MARTINI, SHERMAN, 2003).

Os primeiros relatos sobre terapia larval são de autoria de Ambróise Pare, cirurgião militar francês, de 1557 (MILLINGEN, 1848). Outros relatos datam de 1829, feitos por Dominic J. Larrey cirurgião do exército de Napoleão, observando que quando larvas se desenvolviam nas feridas dos soldados em batalha, o processo de cicatrização acelerava, prevenindo assim o aparecimento de infecção, embora nenhum tipo de pesquisa tenha evoluído a partir de tais observações. Em 1860, J. F. Zacarias, cirurgião confederado da guerra civil americana, também utilizou larvas de moscas varejeiras no tratamento de feridas com o propósito de limpar e cicatrizar as lesões, contudo suas experiências não foram bem documentadas (SHERMAN, PECHTER, 1988). Apenas em 1917, William Baer, professor e clínico de cirurgia ortopédica da Faculdade de Medicina Johns Hopkins em Maryland, EUA,

realizou o primeiro estudo científico com terapia larval. Durante a primeira guerra mundial, o clínico 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 (ERDMAN, 1987; HINSHAW, 2000). Adicionalmente, em 1927, Baer também introduziu a terapia larval para o tratamento de mais de 100 casos de osteomielite crônica. Porém, ao continuar utilizando essa técnica, observou que muitos pacientes desenvolveram o tétano e então concluiu que era necessário esterilizar as larvas, antes de iniciar o tratamento (MARTINI, SHERMAN, 2003).

No momento, países como Inglaterra, Estados Unidos, México, Alemanha, Bélgica e Israel vem estudando a utilização de terapia larval para tratamento de feridas e, embora seja um tratamento que tenha mais de um século, continua sendo uma alternativa eficaz e atual (COURTENAY, 1999). Wolf e Hanson (2003) observaram os efeitos da terapia larval em 74 pacientes com feridas crônicas de várias etiologias, tendo registrado resultados eficazes em 86% dos casos, com uma única aplicação de larvas; nos demais, a resposta negativa foi devido à morte das larvas. Adicionalmente, Sherman (2003) avaliou a aplicação de terapia larval em 103 pacientes e concluiu que o tratamento proposto foi mais efetivo que os convencionais anteriormente prescritos.

Macdougall e Rodgers (2004) reafirmaram que a terapia larval pode ser recomendada para qualquer tipo de ferida, Horn et al (1976) para mastoidite, TEICH, MYERS (1986) para outras mais severas na pele, já que, uma das maiores vantagens deste tratamento, é a destruição do tecido necrosado promovido pelas larvas, e a preservação do tecido vivo em cerca de 80 a 95% dos casos. Concomitante ao desbridamento, promover boa cicatrização da ferida, é outro fator também importante na recuperação das lesões. Pavillard (1957) assinalou que nas secreções das larvas, registrado pela primeira vez na década de 1930 por Simmons (1935), há potentes substâncias antimicrobianas, que incluem alantoína,

uréia, fenilacetaldéido, carbonato de cálcio e enzimas proteolíticas. Thomas et al. (1999b), Mumcuoglu et al. (2001) e Klotzbach et al. (2002) observaram ainda que as bactérias que a princípio não morrem por essas secreções, posteriormente, ao serem ingeridas, eram eliminadas no interior das larvas. Isto explica, por exemplo, porque feridas contaminadas por *Staphylococcus aureus* metilcilina-resistente cicatrizam-se bem após o tratamento com terapia larval.

Vários autores também relataram a diminuição do odor desagradável, oriundo do tecido necrótico, da intensidade da dor, prevenção ao risco de septicemia, chegando até, em alguns casos, a evitar amputação de membro ou, se houver tal ocorrência, com menor perda tecidual (MUMCUOGLU et al., 1997; 1998; MUMCUOGLU, 2001; WOLFF, HANSON, 2003). Courtenay et al. (2000) mencionaram ainda que a terapia larval poderia evitar a hospitalização e a cirurgia de pacientes com feridas crônicas, assim como reduzir o uso de antibioticoterapia.

Um contraponto observado e relatado por Mumcuoglu (2001) é a ocorrência de sensação de prurido durante o processo terapêutico que pode ocorrer em aproximadamente 25% dos pacientes em tratamento, os quais acabam por fazer uso de algum tipo de analgésico para aliviar este sintoma. Ao que parece reações como prurido local são comumente relatadas por pacientes na literatura (MARCONDES, 2006), podendo ocorrer desde o início, logo após a aplicação das larvas, e persistir por várias horas.

Outro ponto importante a ser assinalado é que a aplicação não é indicada para lesões que apresentem sangramento, tenham comunicação com uma cavidade ou órgão interno ou quando estão localizadas próximas a grandes vasos (CHILD et al., 1931; THORNTON et al., 2002).

Em suma, a terapia larval trata-se de uma mífase secundária, induzida de modo artificial e controlada, onde são avaliados quais poderiam ser os efeitos negativos sobre os

tecidos saudáveis. Os efeitos negativos estão relacionados ao uso de espécies inapropriadas que se alimentam preferencialmente de tecidos vivos, ou da introdução de um número excessivo de larvas na ferida, podendo ocorrer dor, sangramento, febre e mal estar geral, ou outras complicações não previstas (COURTENAY et al., 2000; SHERMAN et al., 2001; WOLLINA et al., 2002).

Segundo Zumpt (1965), miíase pode ser definida como uma infestação por larvas de moscas em vertebrados vivos que, ao menos por certo período, se alimentam de tecido morto ou vivo do hospedeiro, de suas substâncias corpóreas ou da comida ingerida pelo mesmo. As miíases são classificadas em três tipos: obrigatória, na qual o inseto se alimenta apenas de tecidos vivos; facultativa, na qual as larvas se desenvolvem em tecido morto de animais vivos, mas também são capazes de se desenvolverem em matéria orgânica em decomposição; e acidental, onde só há a procura de um hospedeiro na falta de outro recurso alimentar (LINHARES, THYSEN, 2007).

Quanto ao número de larvas a serem aplicadas, isto pode depender de vários fatores tais como: idade do paciente, tamanho das larvas, quantidade de tecido necrosado, extensão da ferida e que tipo de processo de cicatrização é objetivado. Em média são utilizadas de cinco a dez larvas por centímetro quadrado de área lesada, por um período de no máximo três dias. Caso se faça necessário, nova aplicação de larvas poderá ser indicado ou recomendado, sendo a remoção das larvas um procedimento simples, efetuado com o uso de pinça e solução salina estéril (SHERMAN, PECHTER, 1988; THOMAS et al., 1996; HINSHAW, 2000; SHERMAN et al., 2000).

1.4 – Espécies candidatas ao uso em terapia larval

Segundo Mulder (1989) é muito importante conhecer a biologia das moscas das quais serão selecionadas as larvas para procedimentos bioterápicos, de modo a obter as mais

adequadas em termos de idade e tamanho, durante o ciclo de vida do inseto que será mantido em laboratório para esta finalidade. Um dos aspectos cruciais para a seleção da espécie de inseto para ser usada nesse tipo de tratamento, está o conhecimento aprofundado de sua história natural e comportamento, para assegurar que os imaturos se alimentarão apenas e unicamente de tecido necrosado, sendo então chamados de necrobiontófagos (MARCONDES, 2006; ECHEVERRI et al., 2010).

Nos Estados Unidos e na Europa as espécies de dípteros mais reconhecidas para esse fim são as pertencentes à família Calliphoridae, especialmente *Lucilia sericata* (Meigen) e *Phormia regina* (Meigen), classificadas como parasitas facultativos e que têm, entre outras vantagens, um rápido desenvolvimento, facilitando a criação *in vitro* (GREENBERG, GEORGE, 1985; HINSHAW, 2000; MARTINI, SHERMAN, 2003). Na Colômbia, Echeverri et al. (2010) reportaram um caso de utilização de larvas de *Lucilia eximia* (Wiedemann) para terapia larval, no entanto, com o registro de um caso de miíase obrigatória que fora ocasionado por esta espécie no território brasileiro (MORETTI, THYSSEN, 2006), a recomendação para seu uso deve ser cautelosa ou simplesmente não viabilizada.

A maioria das espécies pertencentes à Calliphoridae (Figura 2), exceto as da subfamília Mesembrenellinae, são moscas de coloração escura com reflexos metálicos azulados, esverdeados, violáceos ou cúpricos, principalmente no abdômen, sendo conhecidas popularmente no Brasil por moscas varejeiras (BUZZI, 1994; LENKO, PAPAVERO, 1996). Podem apresentar desde hábitos biontófagos até necrófagos, portanto causando miíases desde obrigatórias como facultativas, respectivamente, assumindo assim, grande importância nas áreas da saúde humana e animal (BAUMHOVER, 1966).

No Brasil e na América Latina por ser essa uma área ainda incipiente (FIGUEROA et al., 2006; ECHEVERRI et al., 2010), os relatos feitos em literatura (MARCONDES, 2006) baseiam-se na aplicação de larvas de moscas não endêmicas, como por exemplo,

Phormia Regina (Meigen) (Calliphoridae) ou de distribuição geográfica restrita, como por exemplo, *Lucilia sericata* Meigen (Calliphoridae). Avaliar de maneira prática o uso de dípteros mais abundantes e de ampla distribuição geográfica como os do gênero *Chrysomya* (Calliphoridae) (Figura 3) (DEAR, 1985), parece ser mais viável dentro da nossa realidade de trabalho.

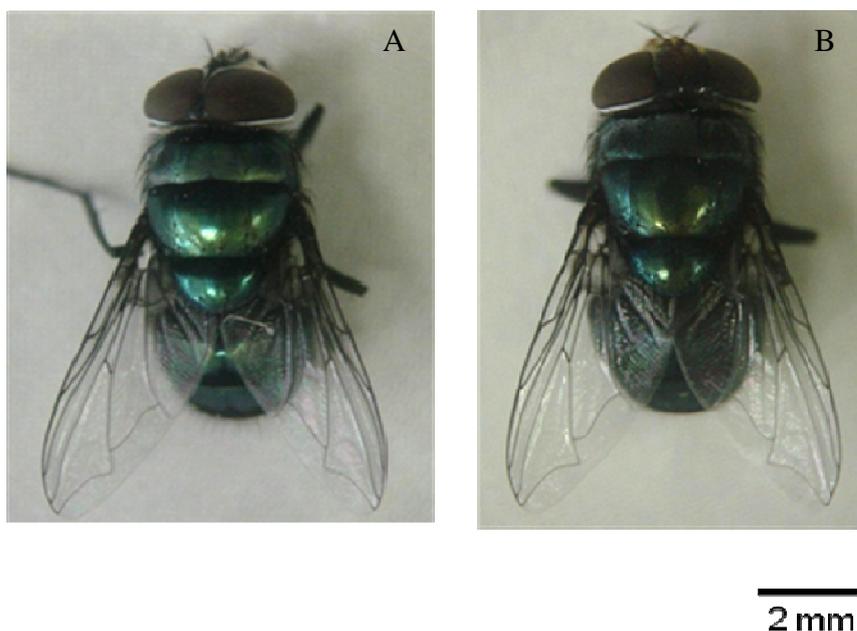
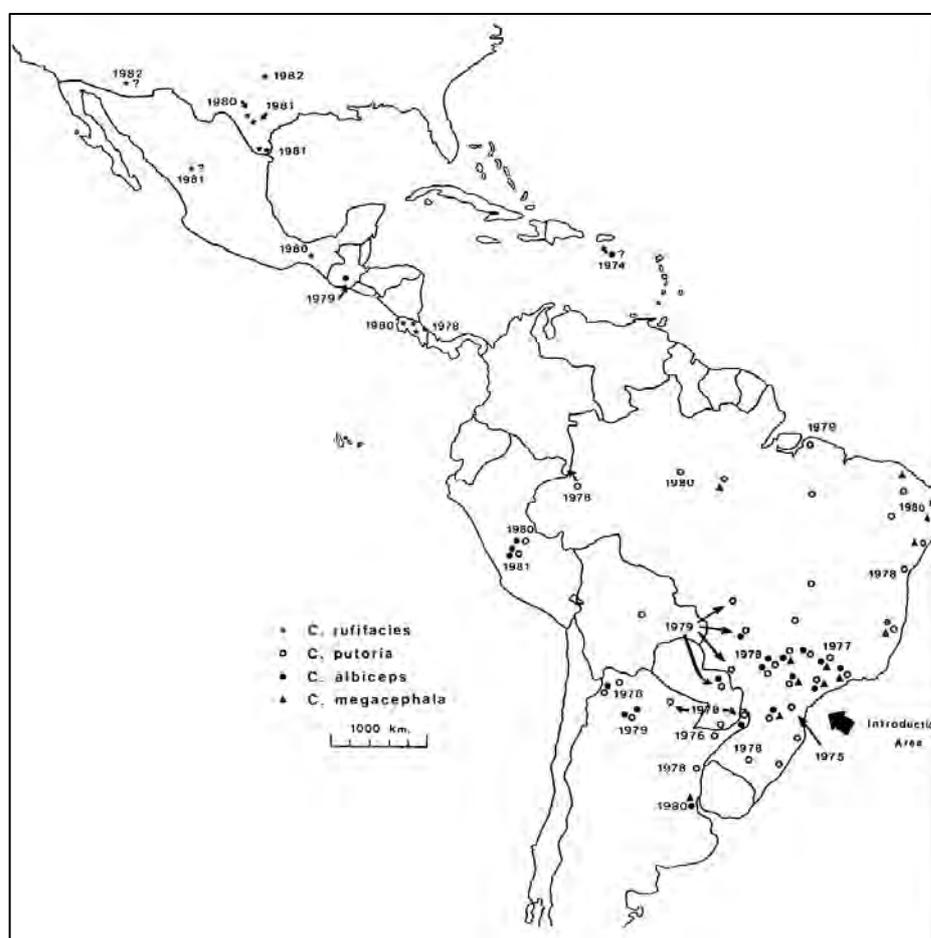


Figura 2. Dois representantes de dípteros da família Calliphoridae: *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (A) e *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (B).

Nos Estados Unidos percebe-se que o avanço é considerável, inclusive pelo fato de que em 1930 larvas de *L. sericata* tinham aprovação da “Food and Drug Administration” (FDA) para serem produzidas comercialmente pela indústria farmacêutica, embora tenha a técnica de desbridamento larval sido substituída pelas cirúrgicas, anos mais tarde, em especial a partir do desenvolvimento dos antibióticos que prometiam a princípio serem superiores.

Com o aumento da proporção de idosos na população e da incidência de *Diabetes mellitus*, com população estimada em 10 milhões apenas no Brasil, e de internações por várias

patologias, tem aumentado a quantidade de casos de lesões de difícil cura ou cicatrização, como as escaras de leito e as feridas ligadas a diabetes (CBD, 2002). A resistência a vários antibióticos, mesmo aos mais modernos, também torna crescente o interesse por novas técnicas, procedimentos e materiais para tratamento de feridas, sendo a terapia larval uma das opções aparentemente mais importantes neste caminho, tendo em vista que as larvas não promovem a seleção de bactérias por resistência, ao contrário, seria uma das formas de tratamento mais eficiente considerando a ação antibacteriana das secreções larvais.



(Fonte: BAUMGARTNER, GREENBERG, 1984).

Figura 3. Distribuição de dípteros do gênero *Chrysomya* nas Américas.

Adicionalmente, a terapia larval pode ser muito útil, especialmente em regiões de nível socioeconômico precário, não só por sua fácil aplicabilidade e grande eficiência, mas

pelo baixo custo envolvido (Tab. 1), uma vez que envolve tecnologia simples sem depender de material sofisticado e/ou importado para sua realização, e que pode ser desenvolvida, sobretudo em pequenos laboratórios, com uma reduzida equipe de trabalho a qual pode ser facilmente capacitada.

Tabela 1. Comparação do custo efetivo para o tratamento de lesões tomando como base cinco formas distintas de terapêutica.

Tipo de terapêutica	Lesão de 2,5 cm ²		Lesão de 10 cm ²
	Custo semanal (em reais – R\$)	Custo mensal (em reais – R\$)	
Sulfadiazina	80,00	320,00	
Colagenases	83,00	332,00	
Alginato de cálcio e bota de uma	57,00	280,00	custo mensal anteriormente citado passa a ser semanal
Hidrocolóide (placa 10x10 cm)	40,00	200,00	
Gaze e soro fisiológico 0,9% estéreis	15,00	60,00	

(Fonte: CARMO et al., 2007)

2 - Objetivos Gerais

Nesta pesquisa foram investigados aspectos sobre a bionomia de imaturos de insetos de interesse médico, tendo como foco:

1. Avaliar o uso de hipoclorito de sódio em duas concentrações (0,5 e 1%) como agente esterilizante e a viabilidade das larvas pós-esterilização de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) para uso em terapia larval;
 2. Avaliar se as espécies *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria* são candidatas favoráveis ao uso em terapia larval para tratamento de feridas cutâneas, usando como modelo animal ratos *Wistar* e abordando entre outros, a qualidade e o tempo de tratamento, o comportamento dos imaturos (durante a aplicação terapêutica) e a quantidade necessária de larvas a serem utilizadas, considerando o tamanho da lesão, para viabilizar o uso prático desta terapêutica.
-

3 - Testes de esterilização e avaliação da viabilidade das larvas de dípteros (Calliphoridae) pós-esterilização para uso em terapia larval *

Sterilization of larvae for larval therapy

Sterilization tests and evaluation of viability of blowflies larvae (Diptera: Calliphoridae) post-sterilization for use in larval therapy

Maria José Trevizani Nitsche ¹⁺, Wesley Augusto Conde de Godoy ² & Patrícia Jacqueline Thyssen ¹

¹ Departamento de Parasitologia, UNESP, Botucatu, SP, Brazil. ² Departamento de Entomologia e Acarologia, ESALQ, Piracicaba, SP, Brazil.

+ Corresponding author: zecatre@fmb.unesp.br

Abstract

The larval therapy involves the intentional application of live dipterans larvae on non-healing skin, chronic or infected wounds of human or animal for the purpose of selectively cleaning out the necrotic tissue from a wound, disinfection, thus facilitating the healing process. Despite the easy applicability, to ensure greater safety and success in this procedure is crucial to certify the sterility of the larvae to be used. The main objective of this study was to evaluate the sterilization process and the viability post-sterilization of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) and *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) larvae treated in sodium hypochlorite. The choice of species was motivated by the ease of collecting them in all Brazilian territory, taking into account their behavior and biology already described in literature. For tests of sterilization were used 3 groups containing 20 eggs of each species where: CG (control group), in which the eggs were immersed in bi-distilled water for 1 and 3 minutes and then washed again for 5 min; 0.5% SHG (5% sodium hypochlorite group) and 1% SHG (1.0% sodium hypochlorite group), whose the eggs were washed for 1 and 3 min in each solution. Each test was replicated 3 times. After, the eggs were placed in 4 ml of sterile peptone water, vortexed and aliquots of 0.1 and 1 ml from serial dilution to 10⁻⁶ inoculated in plate count agar (PCA) and blood agar; incubation (at 37°C) and readings were performed at every 24 and 48 h. The eggs were transferred to a plate on sterile filter paper and remained in a climatic chamber for 18 h until hatching. In both groups, 0.5% SHG and 1% SHG, bacterial growth was not observed on cultured media, contrasting with the CG. However, 0.5% SHG showed the best results related to survival and viability of larvae.

Key words: larval therapy, Diptera, sterilization, wounds, treatment.

* A redação deste capítulo segue as normas recomendadas, de estruturação e citações bibliográficas, para publicação no periódico científico Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

3.1 – Introdução

A terapia larval consiste na aplicação de larvas de moscas (Diptera: Calliphoridae) vivas, estéreis e criadas em laboratório, sobre lesões, feridas crônicas e/ou infectadas, tendo como finalidade a cicatrização tecidual (Martin e Sherman 2003). O procedimento é uma alternativa para o desbridamento de feridas, empregando as larvas para remoção de secreções e limpeza do tecido necrosado (Sherman et al. 2000). Além disso, pesquisas prévias têm revelado que a terapia larval é muito mais eficaz para o desbridamento das feridas do que outros tratamentos convencionais (Sherman et al. 1995).

Levantamento realizado no final da década de 90 no Reino Unido registrou que a terapia larval estava sendo utilizada em cerca de 350 hospitais e clínicas, e que muitos dos pacientes que foram acompanhados durante e após seu tratamento obtiveram grande sucesso no processo de cicatrização por meio dos insetos (Courtenay 1999). Na Universidade da Califórnia, Sherman (2003) que talvez seja o maior entusiasta dessa técnica, acompanhou 18 diabéticos com feridas que não cicatrizavam: alguns receberam tratamento convencional com antibióticos tópicos, hidrogel e desbridamento cirúrgicos, e outros foram submetidos à terapia larval, que se mostrou mais seletiva e eficiente em desbridar as feridas em 80% a 95% dos casos.

Apesar da fácil aplicabilidade, para garantir maior segurança e sucesso no tratamento, dois aspectos devem ser considerados: técnicas eficientes para esterilização dos ovos, que permite a eclosão de larvas assépticas as quais, por sua vez, serão aplicados nas lesões, visando não desencadear outras infecções além das já existentes em um tecido injuriado (Simmons 1935), além da garantia de que a espécie selecionada para tal fim terapêutico utilizará, durante o seu processo de alimentação na ferida, somente tecido necrosado (Marcondes 2006).

A superfície dos ovos de moscas é, em geral, contaminada por inúmeros patógenos,

que necessitam ser removidos para a utilização adequada da terapia larval (Iversen 1996). As técnicas propostas para esterilização de ovos de moscas incluem desde o uso de soluções que contêm cloreto de sódio, álcool, ácido hipoclorídrico, formalina, hidróxido de sódio, hipoclorito de sódio, agar do bacto, cloroexidina, antibióticos, até luz ultravioleta (Baer 1931; Simmons 1935; Greenberg & George 1985; Iversen 1996; Sherman & Wyle 1996; Mumcuoglu 2001; Varzim 2005; Torres 2005; Figueroa et al. 2006; Echeverri et al. 2010).

Há relativamente poucas espécies que são reconhecidamente promissoras para o uso em terapia larval em todo o mundo, em especial, nas regiões tropicais, esta informação é ainda mais escassa. Sendo assim, neste estudo foram avaliados procedimentos para esterilização de ovos de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) obtidos em laboratório para fins terapêuticos, mensurando também a viabilidade e a sobrevivência dos imaturos pós-processo de esterilização. Essas espécies foram selecionadas tendo em vista a facilidade de obtenção de exemplares devido à ampla e notável distribuição geográfica destes dípteros em todo o território brasileiro, pela fácil manutenção em laboratório (Estrada et al. 2009) e pelo comportamento necrofágico registrado em literatura.

3.2 – Material e Métodos

Obtenção dos exemplares para estudo - Colônias de espécimes adultos das duas espécies alvo do presente estudo, foram estabelecidas a partir de coletas realizadas em ambiente natural utilizando-se armadilhas apropriadas (Moretti et al., 2009) para este fim, as quais continham como isca fígado bovino cru e víscera de frango, expostas por 24 horas no Campus de Rubião Junior e na Fazenda Lageado/Edgárdia da UNESP, município de Botucatu, SP (22°53'09"S: 48°26'42"O). Os espécimes capturados foram anestesiados por

aproximadamente 60 segundos, por meio de baixas temperaturas (-20°C), para proceder às identificações com o uso de chave taxonômica (Mello 2003).

Após a identificação, adultos de cada espécie eram depositados separadamente em gaiolas plásticas transparentes (30x30x50 cm) com aberturas laterais revestidas por telas de náilon (Figura 4 – anexo), alimentados com dietas à base de açúcar e proteína constituídas por solução açucarada e fígado bovino cru, permanecendo em sala climatizada sob condições de temperatura (26±1°C), fotoperíodo (12 horas) e umidade relativa do ar (70±10%) controladas.

Como substrato para oviposição, foi oferecido carne bovina moída crua. Após a postura, grupos de 60 ovos foram retirados da carne com o auxílio de um pincel fino, e depositados sobre papel filtro umedecido em água bidestilada, presente no interior de uma placa de Petri estéril.

Grupos experimentais – Para os testes de esterilização foram montados três grupos experimentais contendo 20 ovos de cada espécie onde: GC (grupo controle), no qual os ovos foram imersos apenas em água bi-destilada estéril por 1 e 3 minutos, respectivamente, em seguida lavados novamente em água bi-destilada estéril por cinco minutos; GHS 0,5% (grupo hipoclorito de sódio 5%) e GHS 1% (grupo hipoclorito de sódio 1%), cujos ovos foram lavados por 1 e 3 minutos, respectivamente, cada porção de 20 unidades sendo tratada em um único tipo de solução, sendo em seguida lavados em água bidestilada estéril por cinco minutos. Foram feitas três réplicas para cada teste proposto, manipulando todo o material biológico e não-biológico dentro de capela de fluxo laminar (Figura 5 – anexo).

Confirmação da esterilização e verificação da viabilidade larval – Para averiguar qual concentração efetivamente cumpriria seu papel de esterilizaria das amostras sem, no entanto, prejudicar a viabilidade e sobrevivência dos imaturos pós-processo de esterilização para uso em terapia larval, os ovos pós-tratamento foram transferidos para tubos contendo 4 ml de solução peptonada estéril, homogeneizados em “Vórtex” por 5 minutos (Figura 6 –

anexo) e alíquotas de 0,1 e 1 ml desta “solução de enxágüe” oriundas de cada grupo (GC, GHS 0,5% e GHS 1%) foram retiradas para inoculação, após diluição seriada até 10^{-6} , em meios de cultivo seletivos de uso exclusivo para crescimento de microorganismos.

Os meios aqui utilizados foram o “plate count agar” (PCA), apropriado para o crescimento de bactérias, e o Agar sangue, apropriado para o crescimento de bactérias com propriedades hemolíticas, tendo sido feitos dois tipos de sementeiras: espalhamento por superfície e estriamento por esgotamento (Figura 7 – anexo). Após inoculação as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C para proceder a leitura dos resultados após 24 e 48 horas.

Depois de todo o processo acima descrito ter sido cumprido, os ovos finalmente foram colocados em placas de Petri estéreis, forradas com papel filtro também estéril e umedecido com solução bidestilada de soro fisiológico a 0,9%, tendo sido então mantidos por 18 horas em câmara climática com temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), para aguardar a eclosão das larvas. Após esse período, foi contado o número de imaturos e uma análise de variância de um fator (ANOVA) feita para medir possíveis diferenças quanto à taxa de eclosão e a viabilidade de larvas com 24 horas pós-eclosão frente cada tipo de tratamento proposto. Teste de comparações múltiplas de Tukey foi realizado para comparar as médias. Para todas as análises foi considerado um nível de significância global de 5% e usado o pacote estatístico SAS® (SAS Inst. 2006).

3.3 – Resultados e Discussão

O hipoclorito de sódio, independente da concentração testada, mostrou ser um eficiente agente desinfetante para a limpeza de ovos de moscas a serem aplicadas em terapia larval. O cultivo da “solução de enxágüe” usada no processo final de desinfecção dos ovos em dois meios distintos seletivos para o crescimento de bactérias corrobora este fato. Tendo em

vista que não foi observado o crescimento de quaisquer colônias de bactérias após o período de incubação do material, ao contrário do que ocorreu com o grupo controle, no qual fora utilizada somente água bidestilada estéril, que a princípio não atua nem como inibidor e não tem atividade bactericida (Figura 8). Adicionalmente, a ausência de crescimento bacteriano nos meios referentes aos dois grupos de tratamento (GHS 0,5% e GHS 1%), denota que o uso deste agente desinfetante torna seguro, a *posteriori*, à aplicação das larvas que eclodirão pós-esterilização sobre lesões visando a terapia larval.

Uma elevada gama de agentes desinfetantes para aplicação sobre ovos ou larvas de dípteros são relatados na literatura corrente e a variação entre um produto ou uma substância está associada, sobretudo, aos mecanismos pelos quais atuam para eliminar ou diminuir o número de microorganismos, tais como aqueles que agem sobre a membrana citoplasmática (por exemplo, clorexidina), fixam a membrana citoplasmática (como por exemplo, formaldeído e glutaraldeído) ou que oxidam os constituintes celulares (como por exemplo, cloro ou hipocloritos e iodo ou iodóforos), além da questão do custo. Desse modo, a escolha deve ser norteadada tendo como partida a eficiência da esterilização, relação custo/benefício e, obviamente, respeito à manutenção da sobrevivência ou viabilidade do inseto, sendo necessário averiguar o grau de sensibilidade frente a uma substância que lhe é exógena, condição esta que pode variar entre diferentes espécies a serem consideradas.

Entre algumas vantagens de se fazer uso do hipoclorito de sódio, está sua ação rápida, observação confirmada pelos resultados aqui obtidos quanto ao tempo requerido para lavagem dos ovos de apenas 1 e 3 minutos, além de ser um bactericida de amplo espectro, esporicida, desinfetante e virucida. É um produto que apresenta um baixo custo e por não se tratar de substância que necessite controle sobre sua venda, também é de fácil aquisição.

Quanto à taxa de eclosão, considerando os grupos GHS 0,5% e GHS 1%, esta foi significativamente menor quando comparada aos resultados obtidos para o grupo que não teve

contato com hipoclorito para ambas as espécies ($F= 27,88$; $p< 0,0001$), mas a diferença não foi significativa entre tratados e não-tratados em relação a viabilidade ($F= 1,8106$; $p= 0,19$) (Tabela). Isto indica que tanto *C. putoria* quanto *C. megacephala* apresentam boa tolerância e resistência a esse agente desinfetante.

Varzim (2005) testou a ação de oito substâncias químicas esterilizantes em diferentes concentrações e por tempos variados sobre ovos de *C. putoria* e somente para três (formaldeído, permanganato de potássio e hipoclorito de sódio) foram obtidas taxas de eclosão superiores a 60%. Porém, a autora não incluiu a utilização do meio de cultivo Agar sangue em seus testes microbiológicos para certificar-se de que bactérias hemolíticas não se desenvolveriam quando usados exclusivamente formaldeído e hipoclorito de sódio. Outro agravante é que o permanganato de sódio não inibiu de forma eficiente o crescimento bacteriano, tendo sido registradas mais de 300 unidades formadoras de colônias em meio PCA.

Figuerola et al. (2006) registraram um trabalho no qual aplicaram larvas estéreis de *Lucilia sericata* Meigen (Diptera: Calliphoridae) em pacientes com úlceras crônicas, obtidas a partir de ovos que tinham sido tratados com hipoclorito de sódio 0,5%, seguido de formol 10%, com esterilidade comprovada por resultados negativos em inoculações feitas em Agar sangue e em caldo triptosado.

Os resultados alcançados neste estudo mostram que a desinfecção de ovos de dípteros feita por meio de hipoclorito de sódio, é uma técnica eficaz a ser empregada para as espécies *C. megacephala* e *C. putoria* visando à obtenção de larvas estéreis para uso em terapia larval. O mais recomendável seria o uso de hipoclorito de sódio na concentração de 0,5%, por termos observado melhores resultados relacionados à eclosão e viabilidade larval neste grupo, em vista daqueles pertencentes ao GHS 1%, além do fato das médias de exemplares obtidos no grupo GHS 0,5% não terem diferido significativamente em relação ao controle (Tabela). Advertimos ainda que os testes microbiológicos devam fazer parte da rotina

de averiguação da desinfecção efetuada para que a terapia larval possa ser utilizada com segurança e sucesso para fins terapêuticos.

3.4 – Referências

Baer WS 1931. The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larva of the blowfly).

J. Bone Joint Surg. 13: 438-474.

Courtenay M 1999. The use of larval therapy in wound management in the UK. *J. Wound*

Care 8: 177-179.

Echeverri MIW, Álvarez CR, Higueta SHE, Idárraga JCW, Franco MME 2010. *Lucilia eximia*

(Diptera: Calliphoridae), uma nueva alternativa para La terapia larval y reporte de casos en Colombia. *Iatreia 23*: 107-116.

Estrada DA, Grella MD, Thyssen PJ, Linhares AX 2009. Taxa de Desenvolvimento de

Chrysomya albiceps (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em dieta artificial acrescida de tecido animal para uso forense. *Neotropical Entomol. 38*: 203-207.

Figuroa L, Uherek F, Yusef P, López L, Flores J 2006. Maggot therapy in patients with

chronic skin ulcers. *Parasitol. Latinoam. 61*: 160-164.

Greenberg B, George J 1985. *Caliphora vicina, Phormia regina and Phaenicia cuprina*. In:

Handbook of Insect Rearing. vol II. Elsevier, New York, 25-33.

Iversen E 1996. Methods of Treating Injuries of Work Animals. *Buffalo Bull. 15*: 34-37.

Marcondes CB 2006. *Terapia Larval: de lesões de pele causadas por diabetes e outras*

doenças. Editora da UFSC, Santa Catarina, 89 pp.

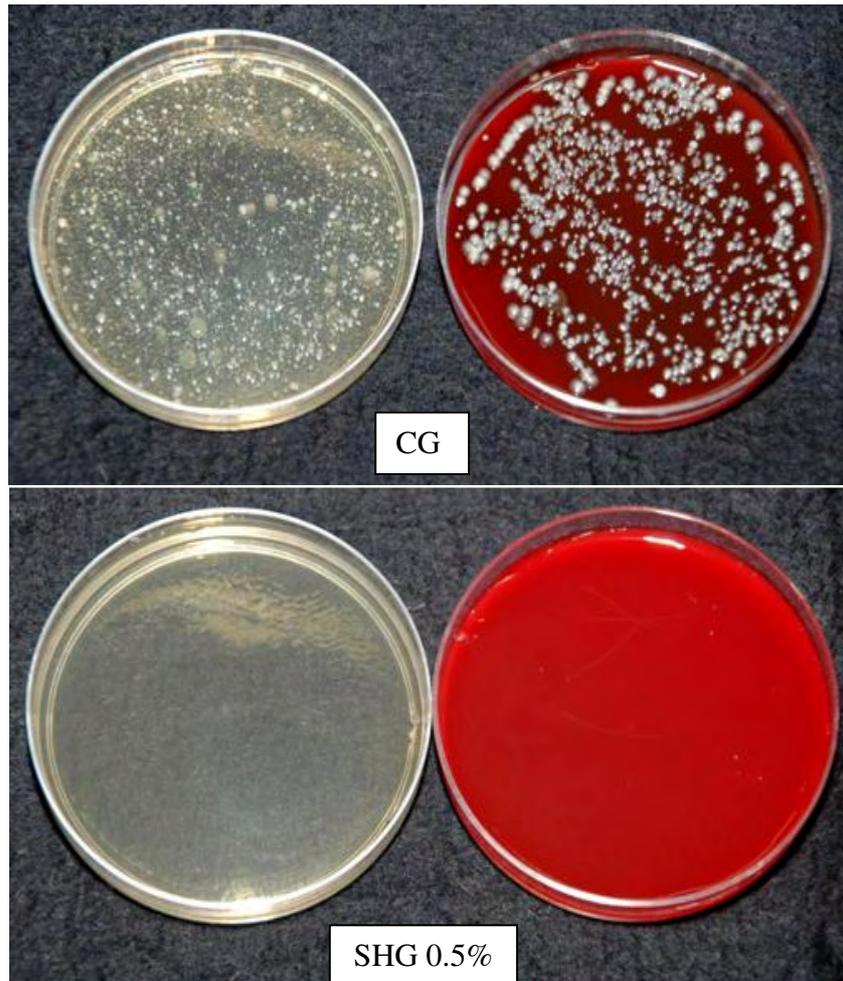
Martini RK, Sherman RA 2003. Terapia de Desbridamento com Larvas. *J. Bras. Med. 85*: 82-

85.

Mello RP 2003. Chave para identificação das formas adultas das espécies da família

- Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorrhapha) encontradas no Brasil. *Entomol. y Vect. 10*: 255-268.
- 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.
- Mumcuoglu KY 2001. Clinical applications for maggots in wound care. *Am. J. Clin. Dermatol. 2*: 219-227.
- SAS – Statistical Analysis System Institute Inc. 2006. *SAS user's guide: statistics*. 6th ed. Cary, USA.
- Sherman RA 2003. Maggot therapy for treating diabetic foot ulcers unresponsive to conventional therapy. *Diabetes Care 26*: 446-451.
- Sherman RA, WYLE FA 1996. Low-cost, low-maintenance rearing of maggots in hospitals, clinics and schools. *Am. J. Trop. Med. 54*: 38-41.
- Sherman RA, Wyle F, 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. *Ann. Rev. Entomol. 45*: 55-81.
- Simmons SW 1935. A bactericidal principle in excretions of surgical maggots which destroys important etiological agents of pyogenic infections. *J. Bacteriol. 30*: 253-267.
- Torres MLM 2005. Efeito de quatro antibióticos sobre larvas de *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) para utilização em Bioterapia. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 79 pp.
- Varzim FLSB 2005. Esterilização de ovos de moscas varejeiras *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae) para utilização em Bioterapia, Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, 72 pp.
-

Fig 8: Placas de Petri contendo os meios de cultivo “plate count agar” (PCA) e agar sangue após inoculação e período de incubação de 48 horas, mostrando o crescimento bacteriano para o grupo experimental GC (grupo controle) e o sucesso na esterilização do grupo SHG 0,5% (hipoclorito de sódio 0,5%).



TABELA

Média e desvio-padrão ($x \pm SD$) referente à taxa de eclosão e viabilidade (%) de larvas com 24 horas pós-eclosão de *Chrysomya megacephala* (CMEG) e *Chrysomya putoria* (CPUT) (Diptera: Calliphoridae) frente a diferentes tratamentos de desinfecção para uso em terapia larval.

Grupos experimentais	Taxa de eclosão (%)		Viabilidade (%)	
	CMEG	CPUT	CMEG	CPUT
Controle	92,0 \pm 4,6 * (n = 60)	93,0 \pm 3,9 * (n = 60)	97,7 \pm 1,5 * (n = 54)	99,0 \pm 1,0 * (n = 56)
GHS 0,5%	80,0 \pm 5,0 * (n = 60)	82,2 \pm 4,0 * (n = 60)	97,0 \pm 1,9 * (n = 48)	98,0 \pm 0,9 * (n = 49)
GHS 1%	72,0 \pm 6,9 ** (n = 60)	75,3 \pm 2,5 ** (n = 60)	95,3 \pm 3,1 * (n = 43)	97,3 \pm 1,5 * (n = 45)

* não há diferença significativa entre as médias de acordo com o teste de Tukey ($p > 0,05$)

** há diferença significativa entre as médias de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$)

4 - Uso da terapia larval na recuperação de lesões utilizando como modelo ratos *Wistar* [♦]

Nitsche et al: Recovery from injuries by larval therapy	M. J. T. Nitsche Universidade Estadual Paulista, UNESP, 18610-000. Botucatu, São Paulo State, Brazil. E-mail: zecatre@fmb.unesp.br
Journal of Medical Entomology Direct injury, myiasis, forensics	

Use of larval therapy to recover from injuries using *Wistar* rats as model

M. J. T. Nitsche ¹, J. A. Perez ³, W. A. C. Godoy ², P. J. Thyssen ¹

¹ Dep. Parasitology, UNESP, Botucatu, SP, Brazil. ² Dep. Entomology and Acarology, ESALQ, Piracicaba, SP, Brazil. ³ Center of Agricultural Science and Environmental, UNICENTRO, Guarapuava, PR, Brazil.

ABSTRACT The larval therapy involves the application of sterile live flies maggots laboratory-reared on chronic or infected wounds in order to heal and remove necrotic tissues and secretions. This study aimed to evaluate the performance of larvae of *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) in the debridement of wounds with necrotic tissue and secretion. It were used as animal models 20 male *Wistar* rats with an average of 15 weeks of life and weighing 350 g. All animals were placed individually in plastic cages where water was offered *ad libitum*. The animals were anesthetized with pentobarbital 0.1 ml/100 g for induction of skin wounds. Then, in the lumbar region, were applied subcutaneously 0.1 ml of 1:9 hydrochloric acid (using sterile distilled water as diluent). Larvae from each dipteran species were sterilized with 0.5% NaCl and kept in a climatic chamber at 25°C until they reached 24 hours post-hatching. On each lesion produced were applied from 5 to 10 larvae/cm², which were covered with gauze and adhesive tape. After 16 h the bandage was removed and observed that the larvae were still alive, staying only at the injury site, without invasion of healthy tissues, and the disappearance of the necrotic tissue and pus. In the control group, without the application of maggots, the necrotic tissue and secretion increased, when considered the same interval time. Skin fragments of 1 cm² from the lesion were removed from both groups of treated and control, and placed in formaldehyde solution for histopathological analysis. This material was embedded in paraffin and 5 µm cuts produced were stained by HE for further observation. Microscopically and histologically, the results showed growth of granulation tissue after removal of the larvae. The results show that larval therapy can be applied successfully to facilitate the healing process.

KEYWORDS blow flies, biotherapy, cicatrization, Brazil.

[♦] A redação deste capítulo segue as normas recomendadas, de estruturação e citações bibliográficas, para publicação no periódico científico Journal of Medical Entomology.

4.1 – Introdução

1
2
3 Terapia larval envolve a introdução intencional de larvas de moscas (Diptera) vivas
4 e estéreis em locais onde haja lesões tanto no homem quanto em animais domésticos, a fim de
5 desbridar a lesão, removendo o tecido necrótico fibrinoso, de modo a prover e/ou facilitar o
6 crescimento do tecido de granulação e, conseqüentemente promover a cicatrização (Martin e
7 Sherman 2003). O efeito terapêutico desse tipo de terapia sobre feridas agudas ou crônicas,
8 com ou sem infecções, deve-se à sinergia de múltiplas substâncias com três principais modos
9 de ação: desbridamento, desinfecção e estimulação da cicatrização (Fleischmann et al 2004).
10 Além disso, pesquisas prévias têm revelado que a terapia larval é muito mais eficaz para o
11 desbridamento de feridas quando comparada a outros tratamentos convencionais que fizeram
12 uso de antibióticos tópicos, hidrogel e procedimentos cirúrgicos (Sherman et al. 1995,
13 Sherman 2003).

14 O desbridamento trata-se de uma intervenção que consiste em eliminar o tecido
15 necrótico de uma ferida, o qual pode interferir diretamente no processo de recuperação e
16 cicatrização (Soares et al. 2009). As larvas realizam essa tarefa de forma eficiente por conta
17 de ter uma digestão do tipo externa, ou seja, por secretarem seu suco digestivo que contém
18 enzimas proteolíticas sobre o substrato alimentar que será explorado em busca de energia para
19 manutenção da vida, absorvendo posteriormente o produto final. A existência de pequenas
20 placas e ganchos que compõem o aparelho bucal rudimentar dos imaturos (Thyssen 2010)
21 facilita ainda mais a penetração de tais enzimas, o que provavelmente estimula a secreção de
22 citocinas pelo hospedeiro ajudando na recuperação do trauma (Fleischmann et al. 2004).

23 Apesar da fácil aplicabilidade, para garantir maior segurança e sucesso no
24 tratamento, dois aspectos devem ser fortemente considerados: (1) o uso de larvas
25 esterilizadas, visando não introduzir outros patógenos e desencadear mais infecções, além das
26 já existentes, em um tecido injuriado (Simmons 1935), e (2) assegurar-se que a digestão dos

27 tecidos pela espécie selecionada para fins terapêuticos não seja indiscriminada, e sim a faça
28 exclusivamente sobre tecidos necróticos, secreções e/ou fibrina, não sobre tecidos humanos
29 saudáveis (Marcondes 2006 Sherman et al 2007).

30 Nas décadas de 1970 e 1980, a este tipo de tratamento usando larvas era empregado
31 como último recurso nos casos de infecções mais resistentes (Horn et al. 1976, Teich e Myers
32 1986). A partir de 1990, há um ressurgimento e uma nova luz é lançada em relação a essa
33 medida terapêutica devido, sobretudo, ao aparecimento de bactérias resistentes aos
34 antibióticos, promovendo-a então para o status de assistência médica moderna. O sucesso de
35 ensaios clínicos alcançados por Sherman e Petcher (1988) na Califórnia no tratamento de
36 feridas em pacientes que tinham histórico de fracasso a partir de dois ou mais tratamentos
37 convencionais atraiu a atenção internacional e a aceitação imediata da terapia larval.
38 Recentemente, Echeverri et al. (2010) registraram que a terapia larval produziu resultados
39 significativos no desbridamento de úlceras crônicas causadas por insuficiência venosa e/ou
40 arterial, erisipelas, vasculites e demais condições.

41 Grande parte dos relatos feitos em literatura indica a aplicação de larvas de dípteros
42 não endêmicos em nosso país como, por exemplo, *Phormia regina* Meigen (Calliphoridae),
43 ou de distribuição geográfica restrita como, por exemplo, *Lucilia sericata* (Meigen)
44 (Calliphoridae). Avaliar de maneira prática o uso de insetos mais abundantes, que não
45 apresentem sazonalidade marcante e de ampla distribuição geográfica em locais com
46 temperaturas médias acima de 20°C como os do gênero *Chrysomya* Robineau-Desvoidy
47 1830 (Diptera: Calliphoridae) (Correa et al. 2010), parece ser mais viável dentro de nossa
48 realidade de trabalho.

49 Por ser essa uma área ainda incipiente em nossa região de estudo, há relativamente
50 poucas espécies que são reconhecidamente promissoras para o uso em terapia larval. Sendo
51 assim, este estudo teve como objetivou avaliar o desempenho de larvas estéreis de *Chrysomya*

52 *megacephala* (Fabricius) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann) no desbridamento de feridas
53 com tecido necrótico e secreção usando como modelo animal ratos da linhagem *Wistar*. Essas
54 espécies foram selecionadas tendo em vista a facilidade de obtenção de exemplares devido à
55 ampla e notável distribuição geográfica destes dípteros em todo o território brasileiro, pela
56 fácil manutenção em laboratório e pelo comportamento necrofágico registrado em literatura
57 (Estrada et al. 2009).

58

59 4.2 – Materiais e Métodos

60

61 **Obtenção, preparação e confirmação do processo de esterilização dos exemplares**
62 **para uso terapêutico.** Todos esses procedimentos e metodologias seguem descritos em
63 Nitsche et al (2010).

64

Modelo experimental. Foram utilizados como modelos animais ratos machos da
65 linhagem *Wistar* tendo em média 15 semanas de vida e com massa corporal aproximada de
66 350 gramas, provenientes do Laboratório Experimental da Clínica Médica da Faculdade de
67 Medicina de Botucatu, UNESP, SP, Brasil, classificados como “germs free”. Esses
68 permaneceram acondicionados, individualmente, em gaiolas plásticas forradas com maravalha
69 esterilizada em autoclave, com oferecimento de água e ração *ad libitum* (Fig. 9 – anexo).

70

Indução das lesões nos animais. Inicialmente os animais foram anestesiados com
71 pentobarbital (0,1 ml/100 mg) para retirada dos pêlos da região lombar, com uso de aparelho
72 elétrico, para aplicação de 0,1 ml de solução 1:9 de ácido clorídrico e água bidestilada estéril
73 na mesma região, por via subcutânea e não transfixante (Fig. 10).

74

Grupos experimentais. Para avaliar o desempenho das larvas das duas espécies,
75 *Chrysomya megacephala* e *C. putoria*, no processo de cicatrização das lesões induzidas foram
76 montados dois grupos experimentais: (1) denominado controle, cujo tratamento preconizado
77 foi o desbridamento mecânico, sem aplicação de larvas, utilizando técnicas assépticas, isto é,

78 limpeza da ferida e remoção das secreções e de tecido necrótico utilizando gaze e soro
79 fisiológico a 0,9% estéreis; e (2) denominado terapêutico larval, cujo tratamento, sobre as
80 lesões induzidas após 48 horas, foi feito com aplicação de 5-10 larvas estéreis/cm² de ambas
81 espécies de *Chrysomya*, após assepsia local com soro fisiológico a 0,9% estéril. Em todos os
82 casos, sem (grupo controle) e após a colocação das larvas, as lesões foram cobertas por gaze
83 estéril e esparadrapo (Fig. 11) para não permitir a invasão de outros insetos e nem o abandono
84 dos imaturos aplicados.

85 Em seqüências pré-estabelecidas de 1, 2, 14, 21 e 28 dias, após 48 horas da aplicação
86 do ácido via subcutânea, foram realizadas as eutanásias dos animais provenientes dos grupos
87 controle e tratados por desbridamento larval, com dose inalatória de gás de forma a abreviar a
88 dor ou sofrimento. Foram respeitados todos os critérios de metodologia para evitar a dor, onde os
89 animais atingiram o estado de inconsciência e morte o mais breve possível, com um mínimo de
90 contenção e evitando excitabilidade. Em seguida foram fixados à mesa cirúrgica para a coleta
91 de fragmentos das lesões para análise histopatológica.

92 **Análise histopatológica.** Foram retirados fragmentos de tecido com 1 cm² de
93 dimensão, tomando como ponto de partida a borda até o centro da lesão, tanto dos animais
94 controle quanto dos tratados (que passaram por desbridamento larval), os quais foram
95 acondicionados em solução de formalina tamponada 10% por 48 horas e posteriormente
96 armazenados em metanol. Para inclusão em parafina com cera de abelha, as amostras foram
97 lavadas em água, desidratadas e diafanizadas. Os blocos de parafina foram então submetidos a
98 cortes histológicos de 4-6 µm, os quais foram desparafinizados, reidratados, montados sobre
99 lâminas e corados por hematoxilina eosina (HE), para posterior observação e análise em
100 microscópio óptico comum.

101

4.3 – Resultados e Discussão

102

103

104 **Lesões nos animais.** A partir de 24 horas, devido à ação do ácido clorídrico,
105 formaram-se lesões com um tamanho médio de 2 cm² com perda tecidual (dérmica,
106 epidérmica e subcutânea) evidente. Após 48 horas, as lesões tornaram-se mais profundas, com
107 perda adicional de tecido muscular e presença de secreções purulentas, fibrina e tecido
108 necrótico (Fig. 12).

109 **Tratamento larval.** O número de larvas aplicadas variou de acordo com a
110 profundidade/característica de cada lesão (Tabela 1). Após 16 horas, o curativo foi removido
111 de todos os animais e pudemos constatar que houve desaparecimento do tecido necrótico e da
112 secreção purulenta nos grupos tratados (Fig. 13), tanto com a utilização de larvas da espécie
113 *C. megacephala* quanto de *C. putoria*, ou seja, não foram observadas diferenças quanto ao
114 processo de desbridamento quando consideramos os dois insetos em questão, sendo
115 indiferente o uso de uma ou de outra. Outro fator positivo observado foi de que as larvas se
116 encontravam vivas, permanecendo apenas no local da lesão, sem invasão de tecidos
117 saudáveis.

118 Echeverri et al. (2010) relataram o uso de *Lucilia eximia* (Wiedemann)
119 (Calliphoridae) pela primeira vez como uma espécie alternativa no desbridamento de úlceras,
120 sendo observada uma maior eficiência quando comparada ao uso de *L. sericata*, dada a sua
121 ação mais rápida de desbridamento, o que reflete na possibilidade das larvas permanecerem
122 um menor tempo nas lesões e conseqüentemente nos pacientes que recebem o tratamento. No
123 entanto, em nossa região de estudo, existe um relato de miíase primária ocasionada por essa
124 espécie (Moretti e Thyssen 2006), fazendo nos pensar que seria importante investigar este
125 comportamento mais aprofundadamente antes de recomendar seu uso terapêutico.

126 A partir da observação do aspecto das lesões induzidas que produzimos em laboratório
127 devemos assinalar também que há a necessidade das mesmas estarem úmidas, para permitir a
128 sobrevivência das larvas que serão ali depositadas e facilitar o desbridamento. Figueroa
129 (2006) ao usar a técnica do curativo oclusivo associada à aplicação de larvas com a missão
130 final de limpar as feridas ressaltou o mesmo problema.

131 Após a retirada das larvas, foi realizado um acompanhamento diário dos animais dos
132 grupos tratados e controle para observar o andamento do processo cicatricial tendo sido
133 registrado que, após o período de sete dias, as lesões apresentavam reduzidas e com um
134 tamanho em média de 1 cm² já em fase de maturação (Fig. 14). Além disso, os animais
135 haviam recuperado o peso inicialmente perdido, que fora de 30% após 48 horas da instalação
136 da lesão induzida. Depois de 12 dias, as lesões eram mínimas, sem sinais visíveis de infecção
137 (Fig. 14).

138 No grupo controle, o tecido necrosado e a secreção aumentaram significativamente
139 (Fig. 15) considerando o mesmo período de observação efetuado para os animais que
140 receberam o tratamento com larvas. Nas lesões mais profundas, houve formação de crostas
141 que necessitavam ser removidas para propor possibilidade de crescimento tecidual. A perda
142 de peso persistiu e passou a ser mais acentuada a partir do sétimo dia. Para evitar maior
143 sofrimento ao animal foi realizada a eutanásia.

144 Com relação às principais dificuldades encontradas, evitar o escape das larvas foi um
145 fator importante para o alcance do desbridamento tecidual efetivo e, adicionalmente, a perda
146 de vida das larvas pela falta de oxigênio devido ao excesso de secreções. Essas desvantagens
147 foram contornadas através da colocação de curativos com gaze estéril, tendo um pequeno
148 orifício central para entrada de oxigênio e um reforço da fixação por esparadrapo, dificultando
149 a retirada do curativo pela possível causa de quaisquer incômodos. A existência de tais

150 incômodos foi observada através da tentativa de retirada dos curativos pelos animais e
151 agitação dos mesmos.

152 **Análise histopatológica.** A partir da análise dos cortes histológicos processados foi
153 possível observar um aumento na espessura da epiderme, infiltrado inflamatório e uma
154 proliferação das fibras colágenas, que se apresentam menores e adelgadas, diferente do que
155 fora registrado antes do tratamento (Fig. 16). Os achados histopatológicos mostraram
156 organização tecidual e crescimento de tecido de granulação depois da retirada das larvas (Fig.
157 17), vindo de encontro com o esperado, a partir da observação macroscópica da lesão, que é
158 positivo o sucesso da terapia larval como método de desbridamento de lesões.

159 As lesões que receberam o tratamento larval melhoraram rapidamente muito
160 provavelmente pelo pronto aparecimento do tecido de granulação, que preenche a lesão e
161 simultaneamente o epitélio que a recobre, ocorrendo a diminuição de seu tamanho e
162 cicatrização total local. Esse mecanismo deve ser creditado à estimulação mecânica
163 (promovida pelas peças bucais do inseto durante sua alimentação) e às substâncias
164 antisépticas (de acordo com Fleischmann et al. 2004, fruto de sua adaptação à flora simbiótica
165 encontrada no tubo digestório) e hormônios, produzidos pelo inseto, que atuam como fatores
166 de crescimento, estimulam o fornecimento de oxigênio à zona afetada e, conseqüentemente, a
167 reorganização tecidual.

168 Um dos fatos mais importantes observados nesta pesquisa foi o desaparecimento de
169 toda secreção e tecido necrótico em um período de apenas 16 horas em 100% dos animais
170 tratados, com o fechamento da lesão de 10 a 12 dias depois de iniciado o tratamento, uma
171 eficácia que pode ser comprovada macroscopicamente e pela análise histopatológica,
172 utilizando dípteros das espécies *Chrysomya megacephala* e *C. putoria*.

173 Em 2002, registros indicavam que a terapêutica larval já estava sendo empregada em
174 mais de 2000 centros de saúde (Fleischmann et al. 2004). No ano seguinte, um órgão

175 governamental dos Estados Unidos, a FDA (Food and Drug Administration) determinou que a
176 regulação desse tratamento devesse se ajustar ao de quaisquer outros de recomendação
177 médica. Atualmente, estima-se que o número de centros que devam aplicar essa terapia no
178 mundo inteiro provavelmente exceda os 10.000, no entanto, no Brasil a terapia larval ainda
179 não se encontra regularizada por falta de estudos em humanos.

180 O baixo custo, fácil aplicabilidade e grande eficiência aqui demonstrada, mostram que
181 o uso de larvas para tratamento de pacientes portadores de lesões crônicas pode ser uma
182 alternativa terapêutica viável e por que não dizer de recomendação compulsória no que tange
183 a populações que vivem em regiões de nível socioeconômico precário.

184

185 **Agradecimentos**

186

187 Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Experimentação Animal sob
188 protocolo nº 624 de 27 de setembro de 2007 (anexo).

189

190 **4.4 – Referências citadas**

191

192 Corrêa E.C., W.W. Koller e A.T.M. Barros. 2010. Abundância relativa e sazonalidade de
193 espécies de *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Pantanal Sul-Mato-Grossense, Brasil.
194 Rev. Bras. Parasitol. Vet. 19: 85-88.

195 Estrada D.A., M.D. Grella, P.J. Thyssen e A.X. Linhares. 2009. Taxa de Desenvolvimento de
196 *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em dieta artificial acrescida
197 de tecido animal para uso forense. Neotropical Entomol. 38: 203-207.

198 Fleischmann W., M. Grassberger e R. Sherman. 2004. Maggot Therapy: A Handbook of
199 Maggot-assisted Wound Healing. New York: Thieme.

- 200 Horn K.L., J.R.A.H. Cobb e G.A. Gates. 1976. Maggot therapy for subacute mastoiditis.
201 Arch. Otolaryngol. 102: 377-379.
- 202 Marcondes C.B. 2006. Terapia larval: de lesões de pele causadas por diabetes e outras
203 doenças. Santa Catarina: Ed. UFSC, 88p.
- 204 Martini R.K. e R.A. Sherman. 2003. Terapia de desbridamento com larvas. J. Bras. Med. 85:
205 82-85.
- 206 Moretti T.C. e P.J. Thyssen. 2006. Miíase primária em coelho doméstico causada por *Lucilia*
207 *eximia* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil: relato de caso. Arq. Bras. Med. Vet. Zoot 58:
208 28-30.
- 209 Sherman R.A. 2003. Maggot therapy for treating diabetic foot ulcers unresponsive to
210 conventional therapy. Diabetes Care 26: 446-451.
- 211 Sherman R.A., F. Wyle e M. Vulpe. 1995. Maggot therapy for treating pressure ulcers in
212 spinal cord injury patients. J. Spinal Cord Med. 18: 71-74.
- 213 Sherman R.A. , Morrisson S., Ng D. 2007. Maggot debridement therapy for serious horse
214 wounds – A survey of practitioners. The Veterinary Journal. 174:89-91.
- 215 Simmons S.W. 1935. A bactericidal principle in excretions of surgical maggots which
216 destroys important etiological agents of pyogenic infections. J. Bacteriol. 30: 253-267.
- 217 Soares M.O., C.P. Iglesias, J.M. Bland, N. Cullum, J.C. Dumville, E.A. Nelson, D.J.
218 Torgerson e G. Worthy. 2009. Cost effectiveness analysis of larval therapy for leg ulcers.
219 BMJ 338: 1-8.
- 220 Teich S. e R.A. Myers. 1986. Maggot therapy for severe skin infection. South Med. J. 79:
221 1153-1155.
- 222 Thyssen P.J. 2010. Keys for identification of immature insects. pp. 43-56. In: Amendt J., M.L.
223 Goff, C.P. Campobasso e M. Grassberger (eds). Current Concepts in Forensic
224 Entomology. Springer. Dordrecht, Heidelberg, London, New York.
-



Fig. 10. Vista dorsal do animal anestesiado e preparado para aplicação da solução de ácido clorídrico e água bidestilada estéril 1:9 para indução de ferida.



Fig. 11. Aplicação das larvas estéreis sobre as lesões e o curativo usado para cobertura.



Fig. 12. Lesão induzida no animal devido à ação do ácido clorídrico com perda tecidual (dérmica, epidérmica e subcutânea), muscular e presença de secreções purulentas, fibrina e tecido necrótico.

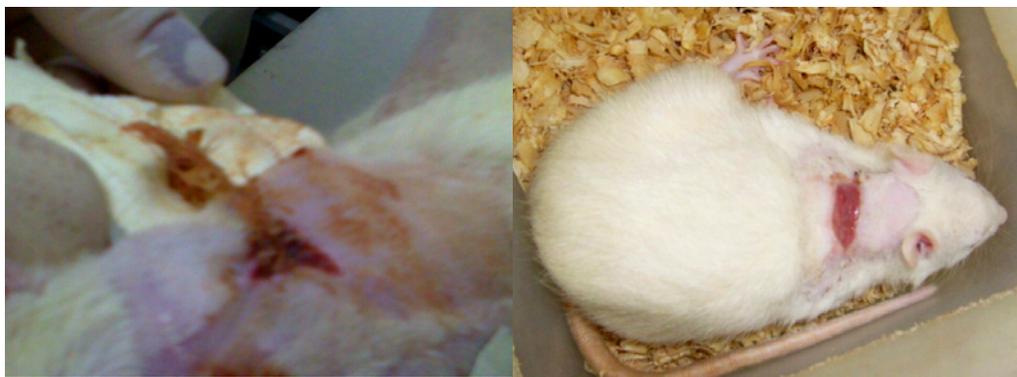


Fig. 13. Retirada do curativo após 16 horas e aparência inicial da lesão tratada por larvas.

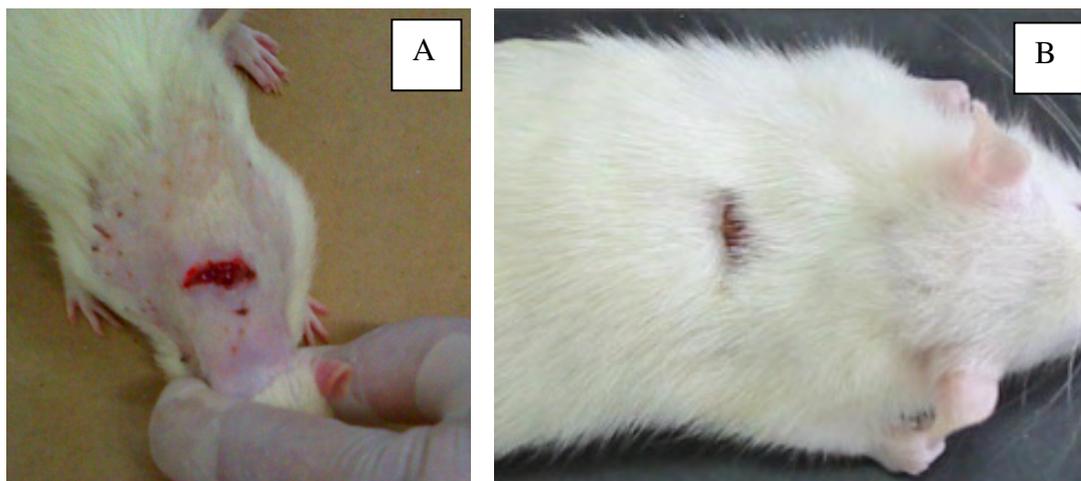
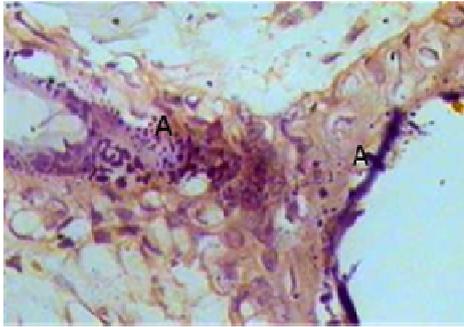


Fig. 14. Aparência das lesões nos animais tratados após o período de 7 (A) e 12 (B) dias depois da retirada das larvas.

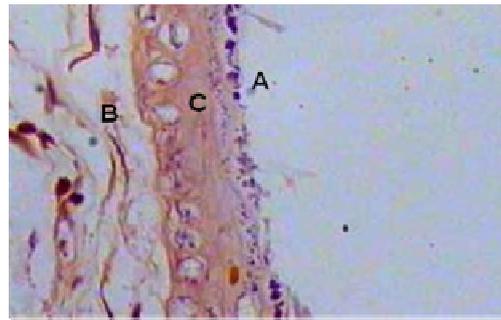


Fig. 15. Aparência das lesões nos animais do grupo controle após o período de sete dias recebendo tratamento por debridamento mecânico com SF 0,9%.

Lesão superficial



Acido: Incontiguidade epitelial com hiperpigmentacao e necrose multifocal dermica (A) (H&E – 40x)

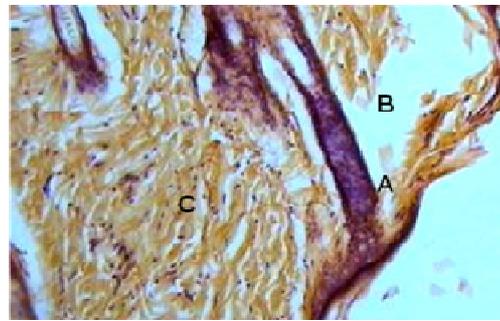


Acido: Atrofia epitelial com hiperpigmentacao (A) e collagenose difusa (B) associada a celulas germinativas epiteliais pletomicas (C) (H&E – 40x)

Lesão média

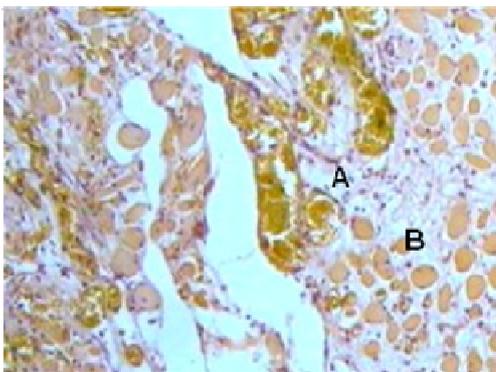


Acido: Discreta hiperqueratose (A), atrofia epitelial e folicular (B), hemorragia difusa (C) e reacao inflamatoria mononuclear difusa em derme (D) (H&E – 40x)

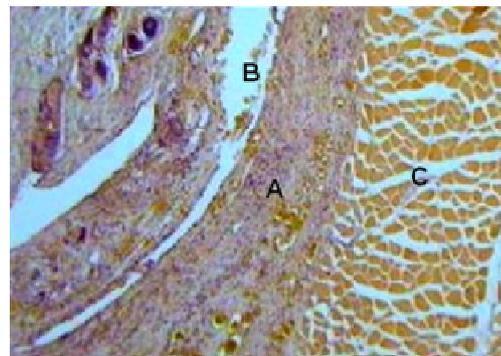


Acido: Atrofia epitelial e de foliculo piloso com incontinuidade epitelial (A) e degeneracao e necrose dermica (B) e reacao inflamatoria mononuclear difusa (C) (H&E – 40x)

Lesão Profunda

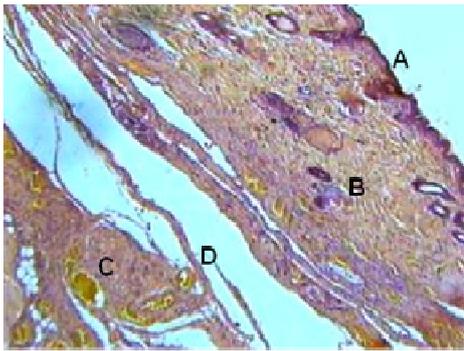


Acido: Hemorragia (A) e necrose (B) muscular difusa (H&E – 10x)

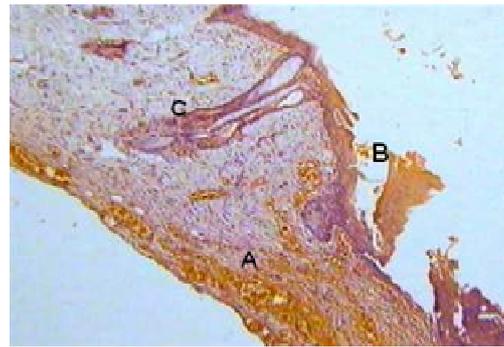


Acido: Hemorragia difusa (A) com necrose multifocal (B) e exsudacao proteica muscular (C) (H&E – 10x)

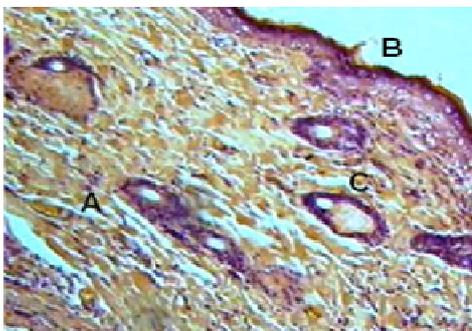
Fig. 16. Aspecto histológico das lesões antes do tratamento larval.



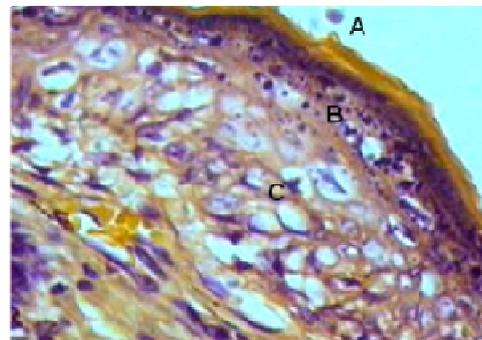
Larvas: Atrofia epitelial com contiguidade deste (A), organizacao tecidual e celular dermica (B), hiperemia multifocal (C) e necrose parcial dermica (D) (H&E - 4x)



Larvas: Hemorragia focal (A), intensa hiperqueratose (B) e proporcionalidade de celulas epiteliais de foliculo piloso (C) (H&E - 10x)



Larvas: Hemorragia difusa (A), intensa hiperqueratose (B), celulas epiteliais foliculares em desenvolvimento associada e celulas epiteliais glandulares sebaceas degeneradas (C) (H&E - 10x)



Larvas: Intensa hiperqueratose (A), hiperplgmentacao (B) e grande quantidade de celulas epiteliais picnoticas (C) (H&E - 40x)

Fig. 17. Aspecto histológico das lesões após o tratamento larval.

Tabela 1. Número de larvas (n) aplicadas por cm² de acordo com a profundidade/característica das lesões.

Número de larvas (cm ²)	Profundidade/característica da lesão	Animais tratados (n)		animais (n) controle
		<i>Chrysomya megacephala</i>	<i>Chrysomya putoria</i>	
05	superficial	4	4	3
08	mediana	6	6	3
10	profunda	5	5	3
Total de animais analisados		15	15	09

5 – Conclusões Gerais

Levando em consideração os resultados obtidos no presente estudo, relativos à terapia larval, podemos concluir que:

- As duas espécies estudadas para terapia larval, *C. megacephala* e *C. putoria*, se comportaram de maneira semelhante quando expostas a mesma situação, e ambas suportaram bem a esterilização, fator esse, fundamental para aplicação das larvas em lesões.
 - Não houve diferença no desbridamento em relação às duas espécies envolvidas no estudo, assim, dependendo da sazonalidade, a terapia larval estaria relacionada ao fator de maior facilidade de obtenção de uma determinada espécie na região geográfica.
 - Os resultados obtidos comprovam que a terapia larval pode ser aplicada satisfatoriamente facilitando e acelerando o processo de cicatrização.
-

6 – Referências Bibliográficas

- ADA – American Diabetes Association. **Clinical practice recommendations**. Diabetes Care, 22: 66P. 1999.
- BAER, W.S. The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larva of the blowfly). **J. Bone Joint Surg.** 13: p.438-474, 1931.
- BAUMGARTNER, D.L.; GREENBERG, B. The genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in the world. **J Med Entomol.** 21: p.105-113, 1984.
- BAUMHOVER, A.H. Eradication of the screw worm fly. **J Am Vet Med Assoc.** v. 166, p.240-248. 1966.
- BEAR, M.F.; CONNORS, B.W. PARADISO, M.A. Neurociências – desvendando o sistema nervoso, 2a ed., Artmed, Porto Alegre. 2002.
- BLANES, L. 2004. Tratamento de feridas. Cirurgia Vascular: guia ilustrado. São Paulo: Baptista-Silva JCC, [acesso 21 maio 2010]. Disponível em: www.bapbaptista.com.
- BUZZI, J.Z. Coletânea de nomes populares de insetos do Brasil, edição do autor, Curitiba, 230 p. 1994.
- CANDIDO, L.C. Nova abordagem no tratamento de feridas. São Paulo: SENAC. 279p. 2001.
- CANDIDO, L.C. Livro do Feridólogo: tratamento clínico cirúrgico de feridas cutâneas agudas e crônicas. Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Tratamento de Feridas, Santos, 648pp. 2006.
- CARMO, S.S.; CASTRO, C.D.; RIOS, V.S.; SARQUIS, M.G.A. Atualidades na assistência de enfermagem a portadores de úlcera venosa. Revista Eletrônica de Enfermagem, v. 9, p. 506-517. 2007.
- CBD - Consenso Brasileiro sobre Diabetes - Sociedade Brasileira de Diabetes. Diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito tipo 2. Diagraphic, Rio de Janeiro, 72pp. 2002.
-

- CESARETTI, I.U.R. Processo fisiológico de cicatrização da ferida. **Rev Pelle Sana** 2: 10-2. 1998.
- CHERNIN, E. Surgical maggots. **South Med. J.** 79: 1143-1145. 1986.
- CHILD, F.S.; JEFERSON, P.; ROBERTS, E.S.F.; RIVER, P. The treatment of chronic osteomyelitis with live maggots. **New York State J Med.** 31: 937-943. 1931.
- COURTENAY, M. The use of larval therapy in wound management in the UK. **J Wound Care.** 8: 177-179. 1999.
- COURTENAY, M.; CHURCH, J.C.; RYAN, T.J. Larva therapy in wound management. **J Royal Soc Méd.** 93: 72-74. 2000.
- DANTAS, S.R.P.E.; JORGE, S.A. Feridas e Estomas. Edição do autor, São Paulo, 110pp. 2005.
- DEAR, J. P. A revision of the New World Chrysomyini (Diptera) (Calliphoridae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 3, p. 109-169. 1985.
- DOROTHY, B. Maggot therapy: an alternative for wound infection. **Lancet.** 356: 1174. 2000.
- ECHEVERRI, M.I.W.; ÁLVAREZ, C.R.; HIGUITA, S.E.H.; IDÁRRAGA, J.C.W.; FRANCO, M.M.E. *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae), uma nueva alternativa para La terapia larval y reporte de casos en Colombia. *Iatreia* 23: 107-116. 2010.
- ERDMANN, G. Antibacterial action of myiasis-causing flies. **Parasitol Today.** v.3, p.214-216. 1987.
- FERREIRA, S.R. O grande queimado: uma abordagem fisioterapêutica. Trabalho de conclusão de curso, apresentado ao Curso de Fisioterapia de Faculdade de Goiás, Goiânia, 2003, pp.148. 2003.
- FIGUEROA, L.; UHEREK, F.; YUSEF, P.; LÓPEZ, L.; FLORES, J. Maggot therapy in patients with chronic skin ulcers. **Parasitol Latinoam.** v.61: p.160-164. 2006.
-

- GAMBA, M.A.; GOTLIEB, S.L.D.; BERGAMASCHI ,D.P.; VIANNA, L.A.C. Amputações de extremidades inferiores por diabetes mellitus: estudo de caso-controle. **Rev Saúde Pública**. v.38,p. 399-404. 2004.
- GREENBERG, B.; GEORGE, J. Calliphora vicina, Phormia regina and Phaenicia cuprina. In: Handbook of insect rearing, vol. 2, Elsevier, New York, p. 25-33, 1985.
- GUIMARÃES, G.C. Nutrição e Câncer. **Acta Oncol Bras**. v.22, p. 227-232. 2002.
- HINSHAW, J. 2000.Larval therapy: a review of clinical human and veterinary studies. World Wide Wounds [cited October 2000]. Available from: <http://www.worldwidewounds.com/2000/oct/Janet-Hinshaw/Larval-Therapy-Human-and-Veterinary.html>.
- HORN, K.L.; COBB, J.R.A.H.; GATES, G.A. Maggot therapy for subacute mastoiditis. **Arch Otolaryngol**. v.102, p. 377-379. 1976.
- KLOTZBACH, H.; SCHROEDER, H.; PUSCHEL, K. Three case examples of intravital maggot instations. **Arch Kriminol**. v.210, p. 1-9. 2002.
- LENKO, K.; PAPAVERO, N. Insetos no Folclore, 2a ed., Plêiade/FAPESP, São Paulo, p. 468. 1996.
- LINHARES, THYSSEN, P.J. 2007. Mííases de Importância Médica – Moscas e Entomologia Forense. pp. 709-730. In: De Carli, G. A. (org.) Parasitologia Clínica – Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas. 2º ed. São Paulo: Ed. Atheneu.
- MACDOUGALL, K,M.; RODGERS, F.R. A case study using larval therapy in the community setting. **Braz J Nurs**. v.13, p. 255-260. 2004.
- MARCONDES, C.B. 2006. Terapia larval: de lesões de pele causadas por diabetes e outras doenças. 88 pp. Santa Catarina: Ed. UFSC.
- MARTINI, R.K.; SHERMAN, R.A. Terapia de desbridamento com larvas. **J Bras Med**. v.85, p. 82-85. 2003.
-

- MORETTI, T.C. & P.J. THYSSEN. Miíase primária em coelho doméstico causada por *Lucilia eximia* (Díptera: Calliphoridae) no Brasil: relato de caso. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.58, s. 1, p. 28-30. 2006.
- 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**, v. 31, p. 349-353. 2009.
- MELLO, R. P. Chave para identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorrhapha) encontradas no Brasil. **Entomologia y Vectores**, v. 10, p. 255-268. 2003.
- MILLINGEN, J.G. Curiosities of Medical Experience, Richard Bentley, 572pp. 2a ed. London. 1848.
- MULDER, J.B. The medical marvels of maggots. **J Am Vet Med Assoc**. v.195, p. 1497-1499. 1989.
- MUMCUOGLU, K.Y. Clinical applications for maggots in wound care. **Am J Clin Dermatol**. v.2, p. 219-227. 2001.
- MUMCUOGLU, K.Y.; LIPO, M.; LOFFE-USPENSKY, I.; MILLER, J.; GALUN, R. Maggot therapy for gangrene and osteomyelitis. **Harefuah**. v.132, p.323-325. 1997.
- MUMCUOGLU, K.Y.; INGBER, A.; GILEAD, L.; STESSMAN, J.; FRIEDMANN, R.; SCHULMAN, H. Maggot therapy for the treatment of diabetic foot ulcers. **Diabetes Care**. v.21, p. 2030-2031. 1998.
- MUMCUOGLU, K.Y.; MILLER, J.; MUMERROGHU, M.; FRIGER, M.; TARSHIS, M. Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). **J Med Entomol**. v.38, p. 161-166. 2001.
- NAYLOR, W.; LAVERTY, D.; MALLETT, J. **The Royal Marsden Hospital handbook of wound management in cancer care**. Blackweel Science. London. p.224. 2001.
-

- NIH – National Institutes of Health. 2010. Diabetes in America. Available from http://www.healthaffairs.uci.edu/som/pathology/sherman/home_pg.htm, Acesso em 20 de agosto de 2010.
- PAVILLARD, E.R.; WRIGHT, E.A. An antibiotic from maggots. **Nature**. v.180, p.916-917.74. 1957.
- SHERMAN, R. A. Maggot therapy for treating diabetic foot ulcers unresponsive to conventional therapy. **Diabetes Care** v. 26, p. 446-451. 2003.
- SHERMAN, R.A.; PECHTER, E.A. Maggot therapy a review of therapeutic applications of fly larvae in human medicine, especially for treating osteomyelitis. **Med Vet Entomol**. v.2, p. 225-230. 1988.
- SHERMAN, R.A.; WYLE, F.A. Low-cost, low-maintenance rearing of maggots in hospitals, clinics and schools. **Am J Trop Med**. v.54, p. 38-41. 1996.
- SHERMAN, R. A.; WYLE, F.; VULPE, M. Maggot therapy for treating pressure ulcers in spinal cord injury patients. **Journal Spinal Cord Med**. v. 18, p. 71-74. 1995.
- SHERMAN, R. A.; HALL, M. J. R.; THOMAS, S. Medical Maggots: an Ancient Remedy for Some Contemporary Afflictions. **Annual Reviews Entomology**. v. 45, p. 55-81. 2000.
- SHERMAN, R. A.; SHERMAN, J.; Gilead L, Lipo M, Muncuoglu KY Maggot debridement therapy in outpatients. **Arch Phys Med Rehabil**. v.82, p. 1226-1229. 2001.
- SHERMAN, R.A., MORRISSON S., NG D. Maggot debridement therapy for serious horse wounds – A survey of practitioners. **The Veterinary Journal**.v.174, p.89-91. 2007.
- SIMMONS, S.W.; A bactericidal principle in excretions of surgical maggots which destroys important etiological agents of pyogenic infections. **J Bacteriol**. v.30, p.253-267, 1935.
- TEICH, S.; MYERS, R.A. Maggot therapy for severe skin infection. **South Med J**. v.79, p. 1153-1155. 1986.
- THOMAS, S.; JONES, M.; SHUTLER, S.; ANDREWS, A. All you need to know about maggots. **Nurs Time**. v.92, p. 63-76. 1996.
-

- THOMAS, S.; ANDREWS, A.; JONES, M. Maggots are useful in treating infected or necrotic wounds. **Br Med J.** v.318, p. 807. 1999a.
- THOMAS, S.; ANDREWS, A.; HAY, H.P.; BOURGOISE, S. The anti-microbial activity of maggots: results of preliminary study. **J Tissue Viabil.** v.9, p. 127-132. 1999b.
- THORNTON, D.; BERRY, M.M. & RALSTON, D. Case report: maggot therapy in an acute burn. *World Wide Wounds*. Disponível em 30 de março de 2007 em <http://www.worldwidewounds.com>. 2002.
- TOWNSEND, M.C. Sabiston Tratado de Cirurgia: As Bases Biológicas da Prática Cirúrgica Moderna. 17 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2005.
- WOLFF, H. & HANSON, C. Larval therapy – an effective method of ulcer debridement. **Clin. Exp. Dermatol.** v.28, p. 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. **Int. J. Dermatol.** v.41, p. 635-639. 2002.
- ZUMPT, F. (ed). **Myiasis in man and animals in the Old World**. London: Butterworths, p. 267. 1965.
-

7 – ANEXOS



Figura 4. Gaiolas plásticas transparentes e sala climatizada utilizada para criação de insetos.

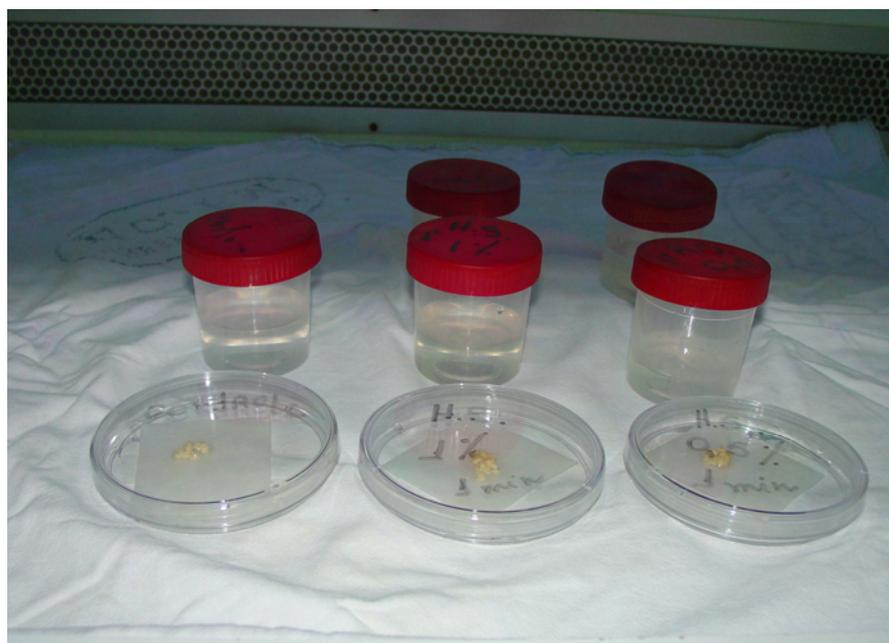


Figura 5. Material usado durante o processo de esterilização dos ovos em capela de fluxo laminar.



Figura 6. Homogeneização em Vórtex.

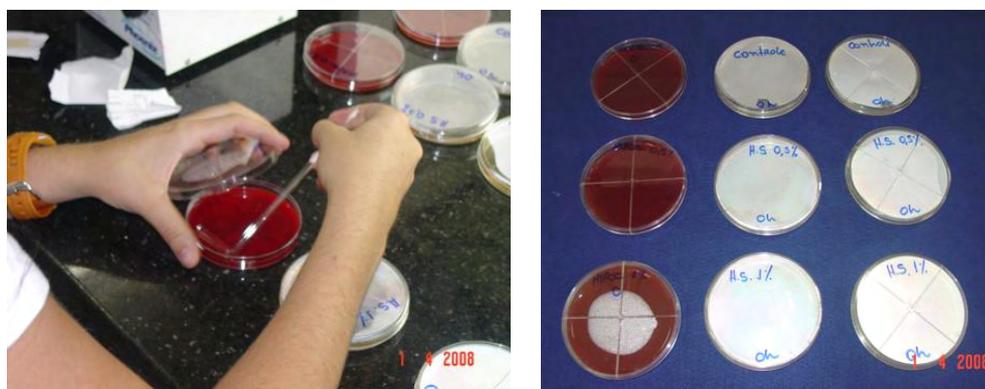


Figura 7. Inoculação das “soluções de enxágüe” em placas de Petri contendo meio de cultivo Plate Count Agar (PCA) e Agar Sangue.



Figura 9. Gaiolas usadas para acondicionamento dos ratos.

Cópia do certificado de autorização para uso de animais em experimentação para fins terapêuticos



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 6802-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99



Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 624 sobre o Projeto de Pesquisa “Avaliação da recuperação de lesões superficiais por meio de terapia larval utilizando como modelos camundongos” a ser conduzido por Maria José Trevizani Nitsche, orientada pela Profª Drª Patrícia Jacqueline Thyssen, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva que os “camundongos” são provenientes de Biotério convencional, sem condições de certificar a sanidade dos mesmos.

Projeto de Pesquisa Aprovado em 27 de setembro de 2.007


Prof. Drª Regina Helena G. Martins
Presidente da CEEA


Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA