



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

MARINA FERRARI KLEMM DE AQUINO

TERAPIA LARVAL: DIVULGAÇÃO, ABORDAGENS PARA CRIAÇÃO DE LARVAS
DE CALLIPHORIDAE (INSECTA: DIPTERA) E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA AÇÃO DE
SUAS EXOSECREÇÕES SOB *LEISHMANIA AMAZONENSIS*

MAGGOT THERAPY: DISCLOSURE, APPROACHES TO THE REARING OF
CALLIPHORIDAE LARVAE (INSECTA: DIPTERA) AND *IN VITRO* EVALUATION OF
THE ACTION OF THEIR EXOSECRETIONS OVER *LEISHMANIA AMAZONENSIS*

CAMPINAS

2017

MARINA FERRARI KLEMM DE AQUINO

TERAPIA LARVAL: DIVULGAÇÃO, ABORDAGENS PARA CRIAÇÃO DE LARVAS DE CALLIPHORIDAE (INSECTA: DIPTERA) E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA AÇÃO DE SUAS EXOSECREÇÕES SOB *LEISHMANIA AMAZONENSIS*

MAGGOT THERAPY: DISCLOSURE, APPROACHES TO THE REARING OF CALLIPHORIDAE LARVAE (INSECTA: DIPTERA) AND *IN VITRO* EVALUATION OF THE ACTION OF THEIR EXOSECRETIONS OVER *LEISHMANIA AMAZONENSIS*

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Biologia Animal na área de Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia

Dissertation presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Animal Biology in the field of Anthropic Relations, Environment and Parasitology

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Jacqueline Thyssen
Coorientadora: Profa. Dra. Selma Giorgio

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA MARINA FERRARI KLEMM DE AQUINO E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. PATRICIA JACQUELINE THYSSEN

CAMPINAS
2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

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

Aq56t Aquino, Marina Ferrari Klemm de, 1993-
Terapia larval : divulgação, abordagens para criação de larvas de Calliphoridae (Insecta: Diptera) e avaliação *in vitro* da ação de suas exosecreções sob *Leishmania amazonensis* / Marina Ferrari Klemm de Aquino. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Patricia Jacqueline Thyssen.

Coorientador: Selma Giorgio.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Inseto como transmissor de doenças. 2. Terapias complementares. 3. Leishmaniose. 4. Diptero - Larva. 5. Drogas - Resistência em microorganismos. I. Thyssen, Patricia Jacqueline, 1973-. II. Giorgio, Selma, 1962-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Maggot therapy : disclosure, approaches to the rearing of Calliphoridae larvae (Insecta: Diptera) and *in vitro* evaluation of the action of their exosecretions over *Leishmania amazonensis*

Palavras-chave em inglês:

Insects as carriers of disease.

Complementary therapies.

Leishmaniasis

Diptera - Larvae

Drug resistance in microorganisms.

Área de concentração: Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia

Titulação: Mestra em Biologia Animal

Banca examinadora:

Patricia Jacqueline Thyssen [Orientador]

Adriano Cappellazzo Coelho

Carolina Reigada Montoya

Data de defesa: 31-08-2017

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Campinas, 31 de Agosto de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Patricia Jacqueline Thyssen

Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho

Profª Drª Carolina Reigada Montoya

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

Para Gis,
que tão cedo precisou partir.

Agradecimentos

Aos meus pais, Edison e Silvana, e à irmãzinha Raquel, que tornaram tudo possível. Por terem ouvido pacientemente (quase sempre!) sobre meus projetos com moscas, assistido e palpitado em meus ensaios de apresentações e até divulgado meu trabalho entre seus amigos. Por todo o apoio emocional, financeiro e por esperarem ansiosamente minha volta pra casa mesmo com o cheirinho de larva nos meus cabelos e roupas por todos esses anos. Ao Caio, por tanto amor e incentivo em (ainda) tão pouco tempo de convivência.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Patricia Thyssen, pelos cinco anos de orientação, pela companhia nas viagens (pelos congressos pelo mundo) e viagens (ideias mirabolantes que guiaram meus projetos ou que pelo menos renderam risadas) e pelos inúmeros conselhos, correções, puxadas de orelha que vieram e ainda virão. À minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Selma Giorgio, pelos ensinamentos sobre *Leishmania* e por possibilitar minha pequena contribuição nesse universo de tratamentos alternativos. Ao Prof Dr Arício Linhares, por permitir minha estadia no laboratório e pelos ensinamentos nas suas mais diversas áreas de conhecimento.

Pelos professores e colegas do Departamento de Parasito, em especial ao Prof Dr Danilo Ciccone Miguel pelos conselhos e auxílios nas partes burocráticas e à Prof^a Dr^a Eliana Maria Zanotti-Magalhães, por possibilitar minhas monitorias na disciplina de Parasitologia. Agradeço também às Dr^{as} Solange Costa e Nahiara Zorgi, por todo o ensinamento e auxílio com a criação de promastigotas de *Leishmania*.

Aos professores membros das bancas de qualificação e exame prévio, pelas considerações pertinentes e que agregaram muito ao trabalho. A todos os participantes do questionário, que possibilitaram um capítulo todo devido a suas contribuições (pisa menos, LDRV).

Aos meus amigos de profissão e laboratório, Maicon, Natane, Vinícius, Cauê, Dori, Carina, Thamiris, Aline, Marcela, Letícia, Frango e Maria, pelos anos de amizade, apoio, companhia nos congressos e viagens, cafés com asinhas de mosca e por me incentivarem sempre a crescer. À Dona Tacilda, pelo indispensável auxílio na manutenção das moscas, pelas risadas compartilhadas e pelas histórias que me faziam rir nos dias em que fazer ciência parecia mais difícil.

Ao André, à Camila, ao Gustavo, ao João, à Ana Beatriz e à Gislaine, pela amizade em todos esses anos de UNICAMP, enquanto descobríamos juntos nossa carreira acadêmica. Pelas dicas de design, batatas fritas na química, truço no CAB e pelo ombro amigo que sempre se estendeu, independentemente do tipo de dificuldade que apareceu no caminho. À Gis, que não pôde terminar a própria dissertação, mas que encheu o céu de ciência, tenho certeza.

À Nicoller, Analu, Carly, Lígia e Gabi, pela paciência nas minhas longas explicações biológicas (nem sempre requisitadas) sobre coisas da vida. Por serem minha casa fora da minha casa. Por não matarem bichinhos (na minha frente). Por apoiarem também meu lado artístico.

À Sassá e ao Luís, por ouvirem e darem sugestões sobre meu trabalho mesmo tendo pavor de larvas. Por quase uma década de amizade.

À UNICAMP, por possibilitar minha pesquisa e toda minha formação acadêmica na graduação e pós-graduação, e à CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

A terapia larval consiste na aplicação de larvas vivas e desinfectadas de moscas necrófagas (Diptera), obtidas a partir de criação em laboratório, sobre lesões e feridas crônicas ou infectadas. No Brasil, a aplicação da técnica para o tratamento de feridas em humanos tem sido feita apenas em caráter experimental, mas a extensão do uso é uma realidade cada vez mais próxima, a partir da divulgação e aplicação entre e pelos profissionais da saúde. Na literatura encontram-se disponíveis diversas dietas visando à criação de insetos, entretanto, nenhuma apropriada para o transporte de larvas para a aplicação terapêutica, que pelo menos assegure a sobrevivência e esterilidade, da origem até o destino no decorrer do trajeto. A leishmaniose, causada por um tipo particular de protozoário parasita de fagócitos mononucleares, é uma doença endêmica em 98 países. Dentre muitas espécies, *Leishmania amazonensis*, de ocorrência principalmente na região amazônica, tem sido associada a lesões cutâneas localizadas e difusas. Apesar da alta endemicidade, a doença ainda é negligenciada e a falta de agentes adequados e definitivos para seu tratamento tem levado à pesquisa de numerosos compostos. Dessa forma, o presente estudo objetivou: (i) investigar a aceitação da terapia larval em diversos extratos da sociedade, de todas as regiões brasileiras, com a posterior elaboração de um panfleto educativo para divulgação desta terapia; (ii) avaliar o desenvolvimento de *Chrysomya megacephala* (F.) e *Cochliomyia macellaria* (F.) (Insecta, Diptera, Calliphoridae) em três dietas – a base de (I) gérmen de trigo, (II) levedo de cerveja e (III) ovo –, que pudessem assegurar a sobrevivência e esterilidade das larvas no decorrer do transporte; e (iii) avaliar *in vitro* o potencial anti-leishmania em diferentes concentrações das excreções e secreções larvais de *C. megacephala* e *C. macellaria* contra a forma promastigota de *Leishmania amazonensis*. A pesquisa sobre a aceitação, usando redes sociais, obteve 1.226 respostas provenientes de ambos os sexos e atingindo todas as regiões geográficas do Brasil, distintas religiões, níveis educacionais e econômicos, áreas de atividade e grupos etários. Houve aceitação entre aproximadamente 78% contra 22% que se recusariam a aplicar tal terapia, não sendo observada significativa diferença entre os grupos. Entre as dietas avaliadas, as dietas II e III preencheram todos os pré-requisitos e critérios de boa qualidade em relação à textura. Concluiu-se, desta maneira, que a dieta II é a que garante maior custo-benefício para a criação e transporte de larvas desinfectadas de *C. macellaria* e *C. megacephala* para fins terapêuticos. Testes analisando o efeito das ES de *C. macellaria* e *C. megacephala* sobre promastigotas de *L. amazonensis in vitro*, em comparação ao grupo controle (cont -), mostraram que os tratamentos (1) para *C. macellaria*, e (1) e (2) para *C. megacephala*, inibiram significativamente o número médio de promastigotas do meio ($p < 0,05$). O tratamento (3), com a menor quantidade de ES, não apresentou diferença estatística em relação ao controle (-), para ambas as espécies avaliadas. Sendo a redução do número de parasitos inversamente proporcional à concentração de ES, conclui-se que o efeito leishmaniostático obtido é dose-dependente das ES larvais.

Palavras-chaves: entomologia médica; bioterapia; leishmaniose; dieta artificial; díptero; feridas crônicas; bactérias multirresistentes; tratamento alternativo.

ABSTRACT

Larval therapy consists of the application of live and disinfected larvae of necrophagous flies (Diptera), obtained from laboratory breeding, on lesions and chronic or infected wounds. In Brazil, the application of the technique for the treatment of wounds in humans has been done only experimentally, but the extension of the use is an increasingly close reality, from the dissemination of the subject among health professionals. In the literature, several diets aiming at insect breeding are available, however, none suitable for the transport of larvae for the therapeutic application, which at least ensures the survival and sterility of the maggots, from origin to destination. Leishmaniasis, caused by a particular parasitic protozoan type of mononuclear phagocytes, is an endemic disease in 98 countries. Among many species, *Leishmania amazonensis*, mainly occurring in the Amazon region, has been associated with localized and diffuse skin lesions. Despite the high endemicity, the disease is still neglected and the lack of adequate and definitive agents for its treatment has led to the research of numerous compounds. Thus, the present study aimed to: (i) investigate the acceptance of larval therapy in various extracts of society, from all Brazilian regions, with the subsequent elaboration of an educational leaflet for the dissemination of this therapy; (ii) to evaluate the development of *Chrysomya megacephala* (F.) and *Cochliomyia macellaria* (F.) (Insecta, Diptera, Calliphoridae) in three diets - (I) wheat germ, (II) brewer's yeast and (III) powder egg, which could ensure the survival and sterility of the larvae during transport; and (iii) to evaluate the anti-leishmania potential in different concentrations of the excretions and larval secretions of *C. megacephala* and *C. macellaria* against the promastigote form of *Leishmania amazonensis*. The survey on acceptance, using social networks, obtained 1,226 responses coming from both sexes and reaching all geographic regions of Brazil, different religions, educational and economic levels, areas of activity and age groups. There was approximately 78% acceptance and 22% rejection of the use of this therapy, with no significant difference observed between the groups. Among diets evaluated, diets II and III fulfilled all prerequisites and criteria of good quality in relation to texture. It was concluded that diet II is the one that guarantees the most cost-benefit for the creation and transport of disinfected larvae of *C. macellaria* and *C. megacephala* for therapeutic purposes. In order to evaluate the effect of *C. macellaria* and *C. megacephala* ES on *L. amazonensis* promastigotes in vitro, in comparison to the control group (cont -), the treatments (1) for *C. macellaria*, and (1) and (2) for *C. megacephala*, significantly inhibited the mean number of promastigotes in the medium ($p < 0.05$). The treatment (3), with the lowest ES, did not present statistical difference in relation to the control (-), for both evaluated species. Since the reduction in the number of parasites is inversely proportional to the ES concentration, it is concluded that the leishmaniostatic effect is dose-dependent on ES larvae.

Keywords: Medical entomology; Biotherapy; Leishmaniasis; Artificial diet; Diptera; Chronic wounds; Multiresistant bacteria; Alternative treatment

Lista de Ilustrações

Figura 1: Morfologia de dípteros dos gêneros <i>Chrysomya</i> e <i>Cochliomyia</i> . A. Vista dorsal do mesonoto de <i>Chrysomya megacephala</i> ; B. Vista dorsal do mesonoto de <i>Cochliomyia macellaria</i> . C. Diferença de pigmentação das traqueias larvais de <i>C. macellaria</i> e <i>C. hominivorax</i> (adaptado de Guimarães & Papavero 1999).....	20
Figura 2: Infográfico sobre a terapia larval	40
Figura 3: Primeira etapa do questionário online.....	41
Figura 4: Segunda etapa do questionário online.....	42
Figura 5: Percentual de aceitação da TL em relação aos gêneros	43
Figura 6: Percentual de aceitação da TL em relação à região geográfica	43
Figura 7: Percentual de aceitação da TL em relação à religiosidade.....	44
Figura 8: Percentual de aceitação da TL em relação à faixa etária	44
Figura 9: Percentual de aceitação da TL em relação ao nível de escolaridade	45
Figura 10: Percentual de aceitação da TL em relação à área de atuação.....	45
Figura 11: Percentual de aceitação da TL em relação ao nível socioeconômico	46
Figura 12: Intensidade da interferência dos fatores na resposta "aceitação" da TL	46
Figura 13: Intensidade da interferência dos fatores na resposta "recusa" da TL.....	47
Figura 14: Protocolo de desinfecção do tegumento externo de ovos de moscas varejeiras indicadas para terapia larval	54
Figura 15: Viabilidade de <i>C. megacephala</i> e <i>C. macellaria</i> em três diferentes dietas artificiais sob temperatura controlada de $25 \pm 1^\circ\text{C}$	59
Figura 16: Curva de crescimento (g) de <i>C. megacephala</i> e <i>C. macellaria</i> , respectivamente, em três diferentes dietas artificiais sob temperatura controlada de $25 \pm 1^\circ\text{C}$	59
Figura 17: Curva de crescimento (mm) de <i>C. megacephala</i> e <i>C. macellaria</i> , respectivamente em três diferentes dietas artificiais sob temperatura controlada de $25 \pm 1^\circ\text{C}$	59
Figura 18: Quantificação de proteínas totais presentes nas exosecreções de <i>Cochliomyia macellaria</i> e <i>Chrysomya megacephala</i> em relação ao tipo de dieta e ínstar larval.....	68
Figura 19: Curva de crescimento de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> com adição de ES de <i>C. megacephala</i>	69
Figura 20: Curva de crescimento de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> com adição de ES de <i>C. megacephala</i>	69
Figura 21: Contagem média de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> após 48h contra diferentes concentrações de exosecreções de <i>C. megacephala</i> e <i>C. macellaria</i>	70

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição das três dietas artificiais avaliadas quanto ao sucesso para o desenvolvimento larval.	55
Tabela 2: Comparação da massa, comprimento e viabilidade de imaturos de <i>Chrysomya megacephala</i> e <i>Cochliomyia macellaria</i> após 72h de criação em três diferentes dietas (I, II e III). Os valores marcados com a mesma letra (A, B,C, D) são estatisticamente iguais....	57
Tabela 3: Cronograma de manutenção de colônias de <i>C. megacephala</i> e <i>C. macellaria</i> e cultura de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	66

Sumário

1	Introdução e revisão bibliográfica.....	13
1.1	A vivência de um portador de ferida crônica.....	13
1.2	Desbridamento	14
1.3	Terapia larval	16
1.3.1	Definição.....	16
1.3.2	Histórico.....	16
1.3.3	Mecanismos de ação	18
1.3.4	Espécies utilizadas em terapia larval	18
1.3.5	Perspectivas sobre a terapia larval no Brasil	20
1.4	Dietas artificiais para criação de insetos em laboratório	21
1.4.1	Componentes de dietas artificiais para criação de insetos em laboratório	21
1.4.2	A importância de dietas estéreis	22
1.4.3	Dietas artificiais para criação de moscas de interesse médico e veterinário	23
1.5	Leishmaniose	24
1.5.1	Biologia do parasito	24
1.5.2	Ciclo do parasito em seus hospedeiros	25
1.5.3	Manifestações clínicas	26
1.5.4	Tratamento	27
1.5.5	Potencial anti-leishmania das larvas de mosca.....	27
2	Objetivos	30
3	Inquérito sobre a aceitação de Terapia Larval no Brasil e divulgação por meio de infográfico.....	31
3.1	Introdução	32
3.2	Material e Métodos	33
3.3	Resultados e Discussão.....	36
3.3.1	Caracterização dos participantes da pesquisa	36
3.3.2	Avaliação sobre a aceitação ou recusa da TL na cicatrização de feridas ..	37
3.3.3	Avaliação dos motivos de aceitação e recusa do uso da TL na cicatrização de feridas.....	38
3.4	Referências.....	48
4	Avaliação do desenvolvimento de <i>Cochliomyia macellaria</i> e <i>Chrysomya megacephala</i> (Insecta, Diptera, Calliphoridae), espécies para uso terapêutico, em três dietas artificiais	50
4.1	Introdução	51

4.2	Material e Métodos	52
4.3	Resultados e Discussão	56
4.4	Referências.....	60
5	Avaliação do efeito das exosecreções larvais de <i>Chrysomya megacephala</i> e <i>Cochliomyia macellaria</i> (Insecta, Diptera, Calliphoridae) sobre a forma promastigota de <i>Leishmania amazonensis</i>	62
5.1	Introdução	63
5.2	Material e Métodos	64
5.3	Resultados e Discussão	67
5.4	Referências.....	71
6	Considerações Finais	74
7	Referências Bibliográficas	75
8	Anexos.....	84

1 Introdução e revisão bibliográfica

1.1 A VIVÊNCIA DE UM PORTADOR DE FERIDA CRÔNICA

Uma ferida é classificada como crônica quando não cicatriza em um período de quatro a oito semanas, causando perda significativa das camadas mais externas da pele, a epiderme e a derme (Jones et al 2006). No Brasil, cinco milhões de pessoas são afetadas por feridas crônicas, sendo que destas, 200.000 estiveram afastadas de maneira temporária ou permanente, constituindo a 14ª maior causa de afastamento do trabalho no país (Lei de Acesso à Informação, INSS, 2014). Entre os diversos tipos de lesões, as mais frequentemente encontradas em hospitais no Brasil são úlceras arteriais, venosas, de pressão e neurotróficas, comuns em patologias que acometem o sistema nervoso periférico, como hanseníase, alcoolismo e diabetes mellitus, doenças endêmicas no Brasil (Salomé 2010).

Diversas características de um paciente fazem com que sua ferida não se cure, entre elas, seu envelhecimento, a presença de doença cardiovascular, diabetes mellitus e obesidade (van Rijswijk & Polansky 1994). Feridas crônicas não avançam pelos estágios de cura de uma ferida aguda (homeostase, inflamação, proliferação e maturação); ao invés disso, essas feridas ficam estagnadas na fase de inflamação (Kirshen et al 2006). A presença de tecidos não viáveis no leito da ferida prejudica o desenvolvimento de tecido saudável de granulação e a migração de queratinócitos necessários para a reepitelização local (Stechmiller & Schultz 2007). Sendo assim, é importante que seja feito o desbridamento no leito da ferida, para que sejam removidos o tecido necrótico e os exsudatos nocivos à sua cura (Kirshen et al 2006).

Dependendo do método utilizado, o desbridamento pode causar dor, sendo necessária, além de anestesia, a explicação cuidadosa do procedimento ao paciente, minimizando sua ansiedade e desconforto. Os desbridamentos cirúrgico e mecânico são os métodos que mais comumente causam dor ao paciente. Um estudo feito por Krasner (1998) com quatorze pacientes com úlceras venosas evidenciou a angústia sentida ao terem que passar por um desbridamento, já que a dor da úlcera começa de novo após esse tratamento. Uma paciente do estudo relata “Quão ruim pode ser, é só um pequeno buraco aqui, apenas fique calma, ele vai terminar em dois minutos. Mas isso estraga seu dia todo. Porque você está com o dobro de dor do que estava quando chegou aqui e você ainda precisa voltar ao seu trabalho. O médico desbridava um pouco a ferida, então ela se agravava mais ainda, e a dor começava de novo.

Então parecia que, quando ela estava só um pouco mais manejável, já era a hora de voltar ao médico, e ele faria isso de novo. Começar tudo de novo. Esse ciclo vicioso”.

Krasner (1998) também pontua que o cuidado especial para evitar a dor dos pacientes é deixado de lado pelos profissionais de saúde, seguindo duas expressões do conhecimento geral, “é preciso doer para curar” e “sem dor, sem ganho”. No estudo fenomenológico de Beitz & Goldberg (2005), dezesseis idosos com úlceras foram entrevistados, levantando os seguintes sintomas, relacionados à dor da ferida crônica: perda de mobilidade, oposição à troca de curativos, perda de vitalidade, tentativa de conseguir uma boa noite de sono, diminuição de apetite. Como Steptoe (2006) sugere, a depressão e a doença crônica estão relacionadas de diversas formas, sendo que o principal fator de risco para depressão na segunda metade da vida é a saúde precária. Ainda assim, o cuidado com feridas tende a focar apenas em aspectos físicos da doença (Hopkins 2001), e consequências, como dor e outros assuntos relacionados à qualidade de vida, ainda são marginalizados (Jones et al 2006).

No estudo conduzido por Salomé (2010), 22 pacientes de um ambulatório aceitaram participar de uma pesquisa acerca de suas vivências com feridas crônicas. Foi levantado por eles a dificuldade em conviver com um tratamento longo, com diversas internações hospitalares, levando-os à marginalização por conta de parentes e outros pacientes que dividem o quarto, devido à presença de secreção com odor fétido. Por essa razão, houve a diminuição de suas atividades recreacionais, como dança de salão e prática de esportes, devido aos sentimentos de “passar por discriminação” (36.4%), “medo de exalar odor” (31.5%), “medo de acidente com o curativo” (22.5%) e “desmotivação” (10%).

Segundo Machado (2004), é importante ao portador de ferida pertencer à sociedade, de forma a desenvolver seu lado social, alcançando o equilíbrio e convivendo harmonicamente com sua condição. Um indivíduo que carrega os sentimentos de incapacidade, autopiedade e discriminação, devido à sua condição física, acaba tornando mais difícil seu tratamento e reabilitação.

1.2 DESBRIDAMENTO

O desbridamento oferece diversos mecanismos com potencial de facilitar a cura de uma ferida; primeiramente, ele aumenta a habilidade de acessar a ferida com mais precisão, revelando seu tamanho e profundidade reais, bem como a presença de sinais de infecção.

Além disso, a eliminação de tecido necrótico diminui a quantidade de bactérias presentes no leito da ferida, além de mediadores pró-inflamatórios (Beitz 2005). Em uma ferida crônica, é necessário que sejam feitos desbridamentos rotineiros para repetidamente remover o acúmulo de tecido necrótico e bactérias patogênicas, visando a promover a cicatrização (Calianno & Jakubek, 2006).

O tratamento de uma ferida é complicado, mas a esfera psicológica de um paciente também afeta sua cura; assim, é importante que profissionais de saúde explorem a ferida em si, mas também a experiência dos pacientes com a doença e o contexto deles com o seu ambiente, suas crenças e experiências de vida (Kunimoto et al 2001). Desta forma, ao se fazer a escolha pelo método mais adequado de desbridamento, é importante que se leve em consideração o conhecimento de técnicas pelo cirurgião, as características da ferida, como seu tamanho, profundidade e quantidade de exsudatos, bem como os desejos e preocupações do paciente em questão, além da redução da dor do paciente (Smith 2002). Os métodos de desbridamento disponíveis incluem: desbridamento autolítico, enzimático, cirúrgico, mecânico e com uso de larvas (Kirshen et al 2006).

No desbridamento autolítico, a ferida é coberta com curativo apropriado e as próprias enzimas proteolíticas corporais, liberadas por macrófagos, efetuam a liquefação do tecido desvitalizado e promovem a formação do tecido de granulação (Konig et al 2005). Para promover a cura mais rápida da ferida, o enfermeiro responsável deve selecionar o curativo que mais se adeque às suas características, optando por um que remova o excesso de umidade (algínatos, espumas), para evitar maceração da pele ao redor, ou que mantenha a ferida úmida (hidrogel, hidrocolóides), caso ela esteja seca (Anderson 2006). No desbridamento enzimático, por sua vez, a ferida é tratada com enzimas proteolíticas, diferindo do desbridamento autolítico por serem estas exógenas ao corpo humano. Entre as enzimas mais comumente utilizadas estão a papaína, extraída do mamão (Hebda & Lo 2001), e a colagenase, derivada de *Clostridium histolyticum* (Hebda et al 1998). A primeira atua degradando a fibrina presente no leito da ferida, agindo da superfície para o interior desta (Hebda & Lo 2001); a colagenase, por sua vez, é mais seletiva, degradando colágeno e elastina, do interior da ferida para sua superfície (Hebda et al 1998). O desbridamento autolítico, quando composto pelos curativos adequados, apresenta a mesma eficácia que o desbridamento enzimático que utiliza colagenase (Konig et al 2005).

É reportado que os tipos de desbridamentos mecânico e cirúrgico comumente causam muita dor, ainda que seja utilizado anestésico local (Holm et al 1990; Vowden & Vowden

1999). A técnica do desbridamento cirúrgico envolve a remoção agressiva de grandes quantidades de tecido necrótico com o uso de bisturi, tesoura e fórceps. O procedimento é feito em uma sala de cirurgia e o paciente deve estar sob anestesia; neste método, a ferida crônica retorna à fase de ferida aguda (Vowden & Vowden 1999). No desbridamento mecânico, os métodos utilizados envolvem força externa, como jatos de salina aplicados com pressão sobre a ferida e curativos do tipo “wet-do-dry”, que consistem em envolver a ferida com gaze umedecida com salina e esperar secar completamente, e então remover (Kammerlander et al 2005). Esses métodos são extremamente dolorosos e só podem ser aplicados com anestesia, mas são controversos por não serem seletivos e acabarem removendo também tecido sadio do leito da ferida (Kirshen et al 2006).

Uma alternativa a estes métodos de desbridamento agressivos é a aplicação de larvas vivas e esterilizadas de moscas varejeiras sobre o tecido necrótico, que se alimentarão deste, fazendo sua remoção sem causar dor ao paciente e diminuindo o trabalho dos profissionais de saúde (Mumcuoglu 2001). Este procedimento é chamado de terapia larval, e esta apresenta diversas vantagens quando comparada aos tipos clássicos de desbridamento.

1.3 TERAPIA LARVAL

1.3.1 Definição

Terapia larval (TL) é a aplicação de larvas vivas em feridas necróticas para auxiliar em seu desbridamento (limpeza), desinfecção e/ou cicatrização (Chambers et al 2003). Uma infestação de larvas em um vertebrado vivo é chamada de miíase (Zumpt 1965). Assim, terapia larval pode ser definida como uma miíase terapêutica, cuja “otimização” garante a eficácia e segurança no tratamento de uma ferida. A miíase é controlada através da escolha cuidadosa da espécie de mosca, além da desinfecção da larva e do uso de curativos especiais que mantenham as larvas na ferida, usando medidas de controle de qualidade durante todo o processo (Sherman 2014).

1.3.2 Histórico

A terapia larval foi descoberta acidentalmente nos campos de batalha, especialmente nas guerras napoleônicas e da Secessão, e foi implantada e aperfeiçoada durante a Primeira Guerra Mundial, tendo seu auge nas décadas de 1930 e 1940 (Baer 1931; Sherman et al

2000). É indicada nos casos de feridas infectadas ou não, mas de difícil cicatrização, como osteomielite, abscessos, queimaduras, feridas de pacientes diabéticos, úlceras de pressão, lesões traumáticas, tumores, gangrenas intratáveis e mais recentemente em pacientes com câncer e leishmaniose; é importante ressaltar que a TL não cura a causa da doença, somente os sintomas clínicos exacerbados (Martini & Sherman 2003).

Os primeiros registros escritos sobre terapia larval são de autoria de Dominic Jean Larrey, cirurgião do exército de Napoleão, que, em 1829, relatou que as feridas de soldados em batalha que abrigavam larvas tinham uma cicatrização mais rápida, além de menor aparecimento de infecção, embora nenhum tipo de pesquisa tenha evoluído a partir de tais observações (Tanyuksel et al 2005). Em 1860, J. F. Zacharias, um cirurgião confederado da Guerra Civil americana, pode ter sido o primeiro médico ocidental a utilizar larvas de moscas varejeiras no tratamento de feridas com o propósito de limpar e cicatrizar as lesões, mas suas experiências também não foram bem documentadas (Sherman et al 2000). No século passado, durante a Primeira Guerra Mundial, o médico americano William Baer retomou os registros sobre terapia larval durante sua atuação na expedição das forças americanas na França. Ao cuidar de dois soldados que haviam passado uma semana em campo com feridas graves cobertas de larvas de varejeiras, mas que, no entanto, não apresentavam infecção, febre ou purulência, Baer percebeu a potencial importância do uso de larvas no tratamento de feridas (Manring & Calhoun, 2011).

Para realizar seus estudos em terapia larval, Baer criou moscas no peitoril da janela de um hospital (Lenhard, 1973), conduzindo experimentos com pacientes com osteomielite, em que era verificada a cura de infecções dentro de seis semanas. Ainda que a maioria dos resultados tenha sido positiva, dois pacientes tratados com larvas morreram de tétano, sendo evidenciada a necessidade da esterilização prévia dos insetos a serem usados no tratamento (Baer 1931). Ele então desenvolveu um método de criação de moscas em ambiente estéril, que, no entanto, acabou aumentando os custos da terapia (Manring & Calhoun, 2011). Na década seguinte, o mundo acompanhou uma expansão do uso de antibióticos, e terapias alternativas para infecções foram abandonadas por algumas décadas, até a descoberta de resistência bacteriana e a retomada da terapia larval por médicos americanos (Sherman et al 2000).

1.3.3 Mecanismos de ação

A cura de uma ferida passa pelas etapas de homeostase, inflamação, proliferação, remodelamento e maturação (Stechmiller & Schultz 2007). Uma ferida necrótica normalmente se encontra estagnada na fase de inflamação. A terapia larval faz com que a ferida avance para a fase de proliferação. Isso se dá pela mudança mais notável em feridas tratadas com larvas: o desbridamento. O tecido morto, quer seja necrosado ou gangrenoso e infectado, é removido, permanecendo o local onde estava a ferida com aparência saudável e limpa. Além disso, desde que a terapia larval se tornou uma prática comum, outros efeitos nas feridas, tais como químicos (ação das secreções e excreções larvais) ou os físicos (contato físico da larva com a lesão), também foram notados (Sherman 2014).

Entre os efeitos químicos, podem ser destacadas a ação de proteases (Hobson 1931) e DNAses que auxiliam no desbridamento da ferida (Brown et al 2012); liberação de peptídeos antimicrobianos e dissolução de biofilme, que atuam na desinfecção (Thomas et al 1999; Bexfield et al 2004); produção de alantóides e ureia, aumentando o pH da ferida e minimizando o estabelecimento de bactérias (Robinson & Baker, 1939); proliferação e migração de fibroblastos, angiogênese e redução da resposta inflamatória pela redução do complemento, que estimulam o crescimento e a cicatrização da ferida (Chambers et al 2003). Como efeitos físicos, o movimento natural das larvas na ferida durante o processo de alimentação auxilia no desbridamento, e a massa larval causa aumento local na temperatura do tecido, gerando um maior estímulo ao seu crescimento e cicatrização (Sherman 2014).

1.3.4 Espécies utilizadas em terapia larval

Para a terapia larval, devem ser utilizadas as espécies que se alimentam unicamente de tecido necrosado (Marcondes 2006). As que mais têm sido reconhecidas para este fim são as larvas pertencentes à família Calliphoridae (Diptera), especialmente *Lucilia sericata* (Meigen) e *Phormia regina* (Meigen) (Stewart 1934; Fletcher & Haub 1933; Mumcuoglu et al 2001), tendo como vantagem um rápido desenvolvimento, facilidade de criação *in vitro* e de desinfecção, uma vez que ovos são mais facilmente manipulados e ambas ovipositam. Contudo, a primeira espécie tem distribuição geográfica restrita aos locais de alta altitude e baixas temperaturas, e a segunda não é encontrada no Brasil (Nitsche 2010). Isto explica por

que pesquisas conduzidas em nosso país têm sido feitas visando a identificar novas espécies candidatas (Nassu & Thyssen 2015).

Dentro dos gêneros de Calliphoridae encontrados no Brasil, *Chrysomya* Robineau-Desvoidy, 1830 é um dos mais abundantes e de ampla distribuição (Guimarães et al 1979). Das doze espécies pertencentes ao gênero, várias são causadoras de miíases primárias e secundárias em animais domésticos (Maheshwari & Naidu 2010). Deste modo, apenas algumas espécies podem ser consideradas candidatas para a terapia larval, justificando porque *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794), de coloração verde e faixas horizontais escuras no abdômen (Figura 1), foi uma das espécies escolhidas para realizar o presente estudo.

No gênero *Cochliomyia* Townsend, 1915, duas espécies são conhecidas: *C. hominivorax* (Cocquerel, 1858) e *C. macellaria* (Fabricius, 1775). Ambas possuem cor verde, com reflexos azul-metálicos em todo o tórax e abdome e faixas verticais escuras que cruzam o mesonoto (Figura 1). A primeira é encontrada desde os Estados Unidos até o sul do Brasil, e coloca seus ovos nas superfícies de feridas e cavidades do corpo, atraída por fortes odores e excreções. *Cochliomyia macellaria* também tem ampla distribuição geográfica, desde o sul do Canadá até a Argentina, contudo ovipõe em tecidos necrosados ou corpos em decomposição (Thyssen et al 2012). A principal diferença entre larvas de *C. hominivorax* e *C. macellaria*, além do comprimento e da pigmentação dos troncos traqueais, é que a primeira é encontrada somente em tecidos vivos enquanto a segunda em necrosados (Linhares & Thyssen 2007). Levando-se em conta o hábito necrófago e abundância de *C. macellaria* no Brasil esta espécie foi considerada uma excelente candidata à TL (Nassu 2014).

Essas espécies foram selecionadas tendo em vista a facilidade de obtenção de exemplares devido à ampla distribuição geográfica destes dípteros em todo o território brasileiro, pela fácil manutenção em laboratório e pelo comportamento necrofágico registrado em literatura (Estrada et al 2009). Masiero *et al* (2016) comprovaram, pela primeira vez, o efeito bacteriostático de exosecreções de *Cochliomyia macellaria in vitro*, levantando a necessidade de avaliar outros aspectos no desenvolvimento de suas larvas e efetividade de suas exosecreções sobre protozoários. Da mesma forma, objetivou-se verificar esses parâmetros nas larvas de *Crysomya megacephala*.

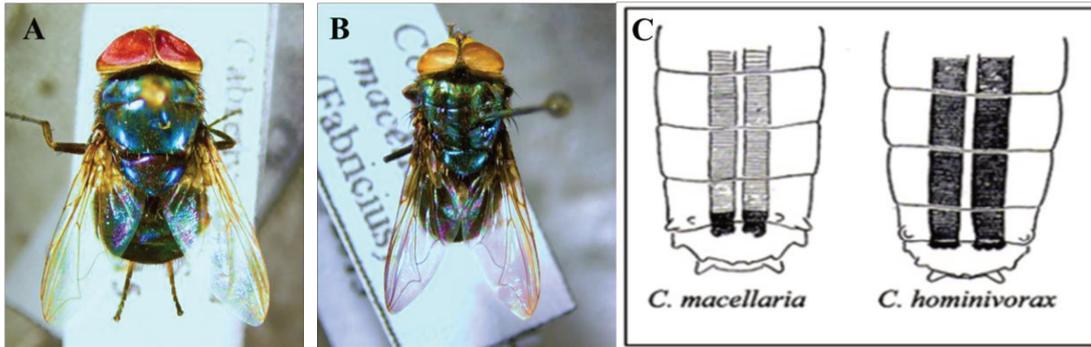


Figura 1: Morfologia de dípteros dos gêneros *Chrysomya* e *Cochliomyia*. **A.** Vista dorsal do mesonoto de *Chrysomya megacephala*; **B.** Vista dorsal do mesonoto de *Cochliomyia macellaria*. **C.** Diferença de pigmentação das traqueias larvais de *C. macellaria* e *C. hominivorax* (adaptado de Guimarães & Papavero, 1999)

1.3.5 Perspectivas sobre a terapia larval no Brasil

No Brasil, a terapia larval tem sido aplicada apenas em um hospital universitário no Rio Grande do Norte, vinculado à Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Pinheiro et al 2015). No estudo publicado por esse grupo de pesquisa, larvas de *C. megacephala* foram aplicadas numa ferida infectada por bactérias multirresistentes de uma paciente idosa e diabética; após 43 dias de tratamento, a superfície da úlcera estava coberta por tecido de granulação e as bactérias multirresistentes (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) foram eliminadas da ferida.

As pesquisas em andamento no país inicialmente caminharam para estabelecer um protocolo de aplicação da terapia larval, focando na escolha das espécies candidatas (Nitsche 2010), do método de esterilização (Thyssen et al 2013) e da densidade larval apropriada (Nassu & Thyssen 2015). Após o estabelecimento desses parâmetros, a pesquisa brasileira pôde prosseguir com os estudos aplicados em terapia larval.

Recentemente, Masiero et al (2015) fizeram a comparação do padrão histológico de lesões obtidas com ácido em camundongos, posteriormente tratadas com desbridamento mecânico clássico, aplicação de larvas de *C. macellaria* e aplicação de larvas associado a um curativo com liberação de prata. Os resultados mostraram que as lesões tratadas com larvas apresentaram uma resposta inflamatória abundante no terceiro dia após a aplicação, fator importante para a regeneração tecidual; nas feridas tratadas com larvas e com larvas associadas a um curativo com liberação de prata, não houve formação de crosta ou proliferação de bactérias, e foram encontrados macrófagos e promotores de angiogênese em grande número. Estudos testando a eficácia das exo-secreções larvais de *C. macellaria* frente

a bactérias também estão tomando forma, e Masiero et al (2016) demonstraram pela primeira vez a eficácia das exo-secreções desta espécie sobre colônias de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, bactérias comuns no ambiente hospitalar.

1.4 DIETAS ARTIFICIAIS PARA CRIAÇÃO DE INSETOS EM LABORATÓRIO

Dietas artificiais têm sido estudadas há mais de um século (McCollum & Davis 1915). Na entomologia, são usadas para estudar a nutrição dos insetos, testar componentes para observar seus efeitos fisiológicos, e para realizar a manutenção de colônias e produção em massa para vários propósitos (Singh 1983; Waldbauer 1968). Em geral, as dietas elaboradas para criação em massa de insetos são feitas com componentes crus, sendo desenhadas para imitar seu alimento natural, simplesmente combinando substâncias com valor nutricional conhecido e suplementando-as com extratos de levedura e grãos que fazem parte da dieta natural dos insetos de interesse (Vanderzant 1974).

1.4.1 Componentes de dietas artificiais para criação de insetos em laboratório

Segundo Singh (1983), a dieta ideal para criação em massa de insetos deve preencher alguns pré-requisitos; primeiramente, deve suprir todos os nutrientes necessários para a produção de insetos viáveis. Além disso, não pode ser cara, e deve ser fácil de usar e preparar, utilizando ingredientes locais e prontamente disponíveis. A vida útil de armazenamento deve ser longa, e a viabilidade de adultos produzidos na dieta deve ser de pelo menos 75% do número total de larvas viáveis. Além disso, é essencial que o entomologista possa adaptá-la de acordo com os ingredientes encontrados em seu país, tornando-a mais acessível economicamente (Shorey & Hale 1965).

O principal constituinte natural da alimentação de insetos necrófagos de importância médica e veterinária é a carne; no entanto, seus derivados são caros e modificam o odor da dieta, e há décadas vêm sendo desenvolvidas dietas artificiais que utilizam de outras fontes proteicas, como ovo de galinha integral em pó (Gingrich, 1964; Gingrich et al 1971), gérmen de trigo (Adkisson et al 1960), levedo de cerveja (Vanderzant 1974), derivados de soja (Vanderzant 1974), leite de vaca em pó (Leal et al 1982).

A introdução de germen de trigo às dietas acelerou a criação de insetos em laboratório, por ser este um fornecedor de carboidratos e proteínas, além de minerais e vitaminas B, não possuindo toxinas ou impedimentos alimentares a estes animais (Adkisson et al 1960). Este ingrediente passou a ser usado na criação de mais de 100 espécies diferentes de insetos, desde sua adoção em dietas artificiais (Vanderzant 1963). Extratos de várias espécies de levedura também são usados em dietas para suplementá-las com suas vitaminas e nutrientes. Além disso, levedos têm um fator protetor a vitaminas quando a mistura destes é aquecida (Vanderzant 1974).

A soja, comumente usada na alimentação do homem e na criação de animais de abate, tem uma grande quantidade de proteínas (Wolf & Cowan 1971). No entanto, grãos crus de soja contêm substâncias tóxicas a insetos, e sua proteína fica pouco disponível desta forma. A autoclavagem da soja aumenta sua qualidade nutricional e destrói seus fatores tóxicos (Mickelsen & Yang 1966). Assim, ela também pode ser um componente importante na dieta de insetos.

Sabe-se que os insetos são incapazes de sintetizar o anel esteroide necessário para atingir seu crescimento, desenvolvimento e reprodução normais, e é preciso que este seja obtido de forma exógena, através de sua alimentação (Svoboda et al 1975). Em 1935, Hobson evidenciou que a adição de colesterol em uma dieta com peptona e extrato de levedura foi capaz de auxiliar na promoção do crescimento de uma larva varejeira. Desta forma, lipídios solúveis também devem ser adicionados a uma dieta artificial, de forma purificada ou como constituintes de alimentos mais complexos.

Finalmente, para a elaboração de uma dieta sólida, é necessário manter uma grande quantidade de água; o ágar tem sido usado para este fim, devido ao seu aspecto gelatinoso e por ser nutricionalmente inerte (Vanderzant 1974).

1.4.2 A importância de dietas estéreis

Na criação de dietas artificiais para insetos, é requerida uma sanitização estrita para controlar microrganismos presentes no alimento e prevenir doenças (Vanderzant 1963). Os métodos utilizados devem matar todos os microrganismos ou suprimir seu crescimento. A esterilização dos ingredientes da dieta é efetuada pelo calor, filtragem, tratamento químico, radiação ou por uma combinação de vários destes. A autoclavagem seca ou molhada é a que

menos causa danos aos nutrientes; filtração, por outro lado, só pode ser utilizada para pequenas moléculas. Uma crença comum entre entomologistas que desenvolvem dietas para insetos é que seu aquecimento destrói suas vitaminas e outros nutrientes; ainda assim, é sabido que é possível aquecer dietas em certas condições em que nenhuma ou quase nenhuma decomposição de nutrientes aconteça. Em misturas completas contendo diversos tipos de moléculas grandes, estas podem agir de forma protetora sobre moléculas pequenas que seriam sensíveis ao calor (Vanderzant 1963). Após a autoclavagem, algumas dietas se mostram até mesmo mais nutritivas do que se disponibilizadas cruas aos insetos (Creek et al 1961).

A introdução de culturas assépticas permite que os requisitos nutricionais de insetos sejam determinados sem a interferência do metabolismo de microrganismos (Vanderzant 1974). Além disso, para o uso em terapia larval, é necessário que as larvas não carreguem microrganismos patogênicos ao leito da ferida, e é indispensável, para tal, o uso de dietas esterilizadas para seu desenvolvimento e transporte do laboratório até o paciente (Sherman & Tran 1995).

1.4.3 Dietas artificiais para criação de moscas de interesse médico e veterinário

Na literatura, são encontrados vários registros de dietas para criação de moscas com interesse médico e veterinário que substituem o uso de tecido animal por outros componentes, visando à sua fácil criação em massa e à alta viabilidade de adultos. As dietas disponíveis na literatura apresentam composições similares. Em 1974, Stoffolano desenvolveu uma dieta utilizando leite em pó, levedo de cerveja e água, sendo verificado o desenvolvimento satisfatório das glândulas sexuais de adultos de *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae). Em 1977, Singh complementou a dieta com caseína, melhorando o crescimento de larvas de *Mystacinobia zelandica* (Diptera: Oestridae). Em 1982, Leal et al (1982) testaram três dietas diferentes para o desenvolvimento de *Chrysomya chloropyga* (Diptera: Calliphoridae), utilizando-se de leite em pó e ovo integral em pó; leite em pó e caseína e apenas leite em pó, obtendo crescimento semelhante das larvas criadas nas três dietas. Mais recentemente, Mendonça et al (2009) determinaram a melhor concentração de albumina nas dietas artificiais para criação de *Chrysomya megacephala*, usando como outros ingredientes óleo vegetal, vitaminas e sal mineral.

Embora sejam diversos os tipos de dietas artificiais para criação destes insetos na literatura, ainda faltam dietas pensadas para o transporte de larvas visando à sua aplicação em

terapia larval. Algumas dietas estéreis foram desenvolvidas com o principal objetivo de poderem ser estocadas sem criar fortes odores e serem fisiologicamente uniformes, sem influência do metabolismo de bactérias (Michelbacher et al 1932; Sherman & Tran 1995), sendo que são encontrados na literatura apenas três registros de dietas para criação de larvas com uso em terapia larval (Sherman & Tran 1995; Zhang et al 2009; Rueda et al 2010).

Sherman & Tran (1995) propuseram uma dieta utilizando fígado bovino em putrefação com ágar, seguido de autoclavagem e adição de diferentes concentrações de tripsina, sem que estas influenciassem o desenvolvimento final das larvas. A tripsina atua sobre a proteína coagulada, fazendo com que ela esteja mais disponível para as larvas recém-eclodidas. Zhang et al (2009) desenvolveram uma dieta para adultos de *Lucilia sericata*, com a intenção de substituir a adição de carne para estimular a maturação ovariana e oviposição pelas fêmeas. Em sua dieta, testaram diferentes concentrações de leite de vaca integral em pó, levedo de cerveja, gérmen de trigo e ágar, sendo que uma das concentrações de ingredientes se mostrou mais efetiva para os dois critérios avaliados.

Rueda et al (2010) testaram dois tipos de dieta, ambas previamente autoclavadas, para a criação de *Lucilia sericata*. A primeira consistia de ágar, sangue de carneiro, fígado em pó, caldo BHI (brain heart infusion), fosfato ácido de sódio, fosfato ácido de potássio, glicose e água destilada; a segunda consistia de farinha de sangue, farinha de ovo, leite em pó, ágar e água. A sobrevivência da fase de ovo a adulto foi de 91,2% para a primeira dieta, e de 40,5% para a segunda. As moscas continuaram sendo criadas nesta dieta por dois anos, e seu ciclo de vida não se alterou, evidenciando o sucesso desta dieta.

Todos os registros encontrados em literatura de dietas próprias para terapia larval visam apenas à criação destas larvas, sendo que ainda não registro de dieta própria para seu transporte visando à aplicação terapêutica, que possa assegurar sua sobrevivência da origem ao destino no decorrer do transporte.

1.5 LEISHMANIOSE

1.5.1 Biologia do parasito

O gênero *Leishmania* está inserido na família Trypanosomatidae, dentro da ordem Kinetoplastida, que reúne protozoários flagelados com DNA mitocondrial condensado na região próxima aos corpúsculos basais do flagelo, chamada de cinetoplasto (Neves et al 2011). Os tripanossomatídeos possuem formas celulares distintas ao longo do seu ciclo

biológico, sendo esta mais evidente na transição entre seus hospedeiros vertebrados e invertebrados. A nomenclatura usada para descrever essas formas celulares leva em conta a exteriorização do flagelo no corpo celular, a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e a presença de membrana ondulante. A forma promastigota, encontrada no interior do trato digestório do hospedeiro invertebrado e na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado nas primeiras horas após o repasto sanguíneo, é caracterizada pelo formato alongado, com cinetoplasto anterior ao núcleo; o flagelo é livre na porção anterior da célula. A forma amastigota, encontrada no interior de macrófagos do hospedeiro vertebrado, é arredondada e seu flagelo curto não se exterioriza (Neves et al 2011).

1.5.2 Ciclo do parasito em seus hospedeiros

O hospedeiro invertebrado da *Leishmania* é a fêmea do mosquito-palha, do gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psicodidae: Phlebotominae). A *Leishmania* é encontrada parasitando uma grande quantidade de hospedeiros vertebrados, sendo que os mais comumente encontrados, além do ser humano, são canídeos e roedores, que podem atuar como reservatório natural em áreas rurais e urbanas (Neves et al 2011). O ciclo se inicia quando a fêmea do mosquito se alimenta do sangue de um hospedeiro vertebrado que apresente amastigotas de *Leishmania* em seus macrófagos. A saliva do mosquito inoculada na corrente sanguínea possui, além de ação vasodilatadora e anticoagulante, ação quimiotática importante na atração de macrófagos à região da picada, aumentando as chances de ingestão de amastigotas pelo inseto. No intestino do inseto, os amastigotas ingeridos se transformam em promastigotas em cerca de três a quatro dias do repasto sanguíneo, migrando para a porção anterior do trato digestório, causando comprometimento da válvula estomoedal, com posterior invasão da faringe, cibário e probóscide, propiciando a sua transmissão no próximo repasto sanguíneo. No momento do repasto, são inoculadas formas promastigotas metacíclicas, que aderem à membrana do macrófago e são endocitadas, transformando-se em amastigotas dentro do vacúolo parasitóforo. A partir deste momento, são feitas sucessivas multiplicações, até o rompimento da célula hospedeira e a liberação de amastigotas, que, da mesma forma, são internalizados por outros macrófagos, gerando uma reação sistêmica no hospedeiro e mantendo a continuidade do ciclo (Neves et al 2011).

1.5.3 Manifestações clínicas

As mais de 20 espécies conhecidas para o gênero se diferem quanto a suas manifestações clínicas no organismo do hospedeiro vertebrado, sendo que o destino final do parasito no corpo do hospedeiro determina sua gravidade. A leishmaniose pode se apresentar no ser humano nas formas cutânea, cutaneomucosa, cutânea difusa e visceral. Dentre as doenças mais infecciosas, ela ocupa o nono lugar do *ranking* mundial (Hotez et al 2004), sendo endêmica em mais de 90 países, com mais de 350 milhões de pessoas vivendo sob risco (Desjeux 2001). A incidência estimada é de dois milhões de casos novos por ano, sendo meio milhão de casos de leishmaniose visceral e 1,5 milhões de leishmaniose cutânea (Desjeux 2004). Em 2014, 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorreram majoritariamente em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (OMS 2014). Na mesma análise, a maior parte dos casos de leishmaniose cutânea ocorreram no Afeganistão, Algéria, Brasil, Colômbia, Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e Síria.

A leishmaniose visceral é uma doença crônica e de alta letalidade caso o paciente não seja submetido ao tratamento específico, devido ao seu emagrecimento, hepato e esplenomegalia e edemas típicos dessa condição. Os fatores de risco para seu desenvolvimento incluem a co-infecção com HIV, uso de drogas imunossupressoras, e, justificando sua prevalência em países subdesenvolvidos, a desnutrição. Seus agentes etiológicos são a *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* (Neves et al 2011).

A leishmaniose tegumentar pode se manifestar nas formas cutânea, mucocutânea e cutânea difusa, de acordo com a localização e a dispersão das feridas pelo tegumento. Após a inoculação de promastigotas na corrente sanguínea pela picada do mosquito, o curso da infecção varia, dependendo da espécie de *Leishmania* e das características genéticas e da resposta imune do hospedeiro, podendo gerar os distintos casos clínicos supracitados. São várias as espécies responsáveis por essas manifestações clínicas, sendo que as que causam a condição no ser humano e são mais comuns no território brasileiro são: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania guyanensis*. As lesões iniciais se manifestam por infiltrados inflamatórios compostos de linfócitos e macrófagos na derme, repletos de parasitos; elas podem ter regressão espontânea, permanecer estacionárias ou evoluir em diferentes ritmos, dependendo da virulência do parasito envolvido (Neves et al 2011).

As lesões típicas da leishmaniose cutânea são caracterizadas por uma pápula no local da picada do mosquito, que progride lentamente para um nódulo, ainda com a epiderme intacta, e com presença de muitos parasitos e macrófagos. Com a evolução do quadro, há o aparecimento de úlceras na epiderme com borda elevada e granuloma composto por macrófagos, linfócitos e parasitos. Caso o quadro prossiga, a ulceração pode se estabilizar, apresentando uma lesão satélite e menor quantidade de parasitos e linfócitos e macrófagos no infiltrado inflamatório. Caso haja regressão, a lesão cicatriza e fica caracterizada pela epiderme fina, com uma leve depressão e fibrose dérmica (Neves et al 2011).

1.5.4 Tratamento

Antimônios pentavalentes foram, por seis décadas, o único agente anti-leishmania disponível (Polonio & Efferth 2008), sendo disponibilizados nas formas comerciais Pentostam® e Glucantime®. Além dos efeitos colaterais, que incluem pancreatite e anormalidades no eletro-cardiograma, estes remédios estão sendo questionados por apresentarem redução da eficácia ao longo do tempo, sendo necessário o aumento gradual de sua concentração até que se atinja o limiar máximo de toxicidade, inviabilizando a continuação de muitos tratamentos (Vanaerschot et al 2014). Ainda com o aumento da concentração, foi reportada a taxa de 60% de falha nas áreas de alta endemicidade no final dos anos 90 (Haldar et al 2011). Concomitantemente, a anfotericina B, com os nomes comerciais Fungizone® e AmBiosome®, foi introduzida no tratamento, sendo que a maior segurança na sua formulação e maiores taxas de cura propiciaram sua adoção nos centros de saúde (Burza et al 2014). Ainda assim, o alto custo do tratamento e seus efeitos colaterais, que incluem falência renal, ainda são fatores suficientes para incentivar o descobrimento de novas drogas mais acessíveis e menos tóxicas ao organismo (Polonio & Efferth 2008). A miltefosina, com o nome comercial Impavido®, foi a primeira droga de uso oral usada no tratamento, mas já é identificada resistência entre os parasitos, e foi observado efeito teratogênico, não podendo ser empregada no tratamento de mulheres grávidas. O aumento na prevalência de HIV e a sua co-infecção com *Leishmania* é um fator que também deve ser levado em conta quando analisada a eficácia dos tratamentos, já que a efetividade dos remédios é diferenciada em pessoas com e sem a co-infecção (Ritmeijer et al 2006).

1.5.5 Potencial anti-leishmania das larvas de mosca

No cenário atual, o tratamento da leishmaniose através dos medicamentos tradicionalmente usados apresenta alto custo, sendo que estes nem sempre são efetivos devido ao surgimento de resistência e à sua alta toxicidade, além da ineficácia em indivíduos imunossuprimidos ou que apresentem infecções secundárias nas feridas. Dessa forma, é necessária a busca por tratamentos que sejam eficientes, menos tóxicos e que não induzam resistência nos pacientes (Cruz-Saavedra et al 2016). Na literatura, são encontrados diversos tipos de tratamento de leishmaniose utilizando fitoterápicos e outros (Phillipson & Wrigth 1991) e outros produtos de origem natural, como própolis (Ayres et al 2007).

O potencial bactericida das secreções larvais de dípteros já está bem estabelecido em literatura há mais de uma década (Thomas et al 1999; Sherman et al 2000; Mumcuoglu et al 2001; Bexfield et al 2004), e estudos avaliando seu potencial contra protozoários causadores de doença, em especial *Leishmania*, estão em fase investigativa inicial na literatura (Arrivillaga et al 2008; Polat et al 2012; Cruz-Saavedra et al 2016; Sanei-Dehkordi et al 2016), sendo focados em padronizar os métodos para extração das exosecreções larvais e sua aplicação *in vivo* e *in vitro*.

Arrivillaga et al (2008) fizeram uma avaliação preliminar aplicando larvas de *L. sericata* diretamente sobre feridas cutâneas causadas por *L. amazonensis* em hamsters. As larvas foram previamente esterilizadas e aplicadas na proporção de 1 larva a cada 10cm² de lesão. Foi observado que as lesões apresentaram tecido de granulação sadio e taxa de cicatrização total variando entre 80 a 100% em um período de 24 à 48h, após a aplicação de larvas por 12h. Após três meses de constante avaliação dos hamsters, não houve reincidência de ferida causada por *Leishmania*, evidenciando a relevância de larvas medicinais no tratamento de leishmaniose cutânea. Polat et al (2012) analisaram o efeito das exosecreções de *L. sericata* sob as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania tropica*, *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. O estudo mostrou que as secreções foram efetivas *in vitro* e, principalmente, nas lesões *in vivo*.

Mais recentemente, Cruz-Saavedra et al (2016) usaram larvas e produtos de *L. sericata* e *Sarconesiopsis magellanica* *in vivo*, previamente à infecção e também como tratamento às feridas causadas por *Leishmania panamensis* em hamsters. Seu estudo evidenciou a melhora nas úlceras causadas pelo parasita em todos os tratamentos, sem apresentar diferença estatística quanto à espécie usada. Sanei-Dehkordi et al (2016) usaram as exosecreções larvais de *L. sericata* e *Calliphora vicina* *in vitro*, sob formas amastigotas de *Leishmania major*, e *in vivo*, em feridas de camundongos BALB/c. O estudo verificou que as secreções de *L. sericata*

são estatisticamente mais efetivas contra *L. major* do que as de *C. vicina*, apresentando também um efeito protetor ao desenvolvimento de feridas causadas pelo parasito.

2 Objetivos

O presente estudo objetivou:

- (i) Investigar a aceitação da terapia larval em diversos extratos da sociedade, de todas as regiões brasileiras, níveis econômicos e de escolaridade, religiões, gêneros, faixas etárias;
- (ii) Avaliar o desenvolvimento de *Chrysomya megacephala* (F.) e *Cochliomyia macellaria* (F.) (Insecta, Diptera, Calliphoridae) em três dietas – a base de (I) germen de trigo, (II) levedo de cerveja e (III) ovo –, que pudessem assegurar a sobrevivência e esterilidade das larvas no decorrer do transporte;
- (iii) Avaliar *in vitro* o potencial anti-leishmania em diferentes concentrações das excreções e secreções larvais de *C. megacephala* e *C. macellaria* contra a forma promastigota de *Leishmania amazonensis*.

3 Inquérito sobre a aceitação de Terapia Larval no Brasil e divulgação por meio de infográfico

Survey on the acceptance of Larval Therapy in Brazil and its dissemination through an infographic

M. F. K. Aquino, P. J. Thyssen

University of Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo State, Brazil

ABSTRACT

Larval Therapy (LT) consists on the application of live and sterile larvae of necrophagous flies (Diptera), obtained in laboratory, on lesions and chronic or infected wounds. This therapy aims to promote healing of the wound, from the removal of purulent secretion and necrosed tissue by insects. Currently, several countries use LT to treat wounds. Application in humans in Brazil in a still experimental manner, but the extension of use for patients from other regions of the country is a closer reality with the success that was reported in the literature. Thus, to measure the degree of knowledge of the population on this subject and to identify at which points there is a greater need for clarification and dissemination work, an online survey was done through Google Forms. The survey was divided into three parts. The first part consisted on a brief presentation of larval therapy through a hand drawing infographic. In the second part, there were questions about the possible acceptance of this therapy in a wound in their own bodies. And, in the third part, there was a survey on socioeconomic conditions of the sampled public, their age, gender, religion, and level of schooling. The survey was shared in social networks and had 1226 responses, coming from both genders, all geographic regions of Brazil, various religions, educational and economic levels, areas of activity and age groups. Statistical analysis was performed with ANOVA, and it was verified that there was no statistically significant difference within the groups ($p > 0,05$), and the mean acceptance was 78%, against only 22% of the sampled people refusing to apply the therapy. Thus, we can conclude that, although its high acceptance, it is still necessary to keep publicizing this therapy among different groups, so that it is possible to try to decimate the existing prejudice and phobia regarding insects in general. In this way, it is expected that this therapy will be more accepted in the country, and that people with TL candidate wounds will be able to choose it when seeking a treatment that guarantees them greater well-being and effective healing.

KEYWORDS: Inquire, Diptera, Insecta, alternative therapy, wounds

3.1 INTRODUÇÃO

Uma ferida é classificada como crônica quando não cicatriza em um período de quatro a oito semanas, causando perda significativa das camadas mais externas da pele, a epiderme e a derme (Jones et al 2006). No Brasil, cinco milhões de pessoas são afetadas por feridas crônicas, sendo que, destas, 200.000 estiveram afastadas de maneira temporária ou permanente, constituindo a 14ª maior causa de afastamento do trabalho no país (Brasil 2015). Feridas crônicas não avançam pelos estágios de cura de uma ferida aguda (Kirshen et al 2006), sendo que a presença de tecidos não viáveis no leito da ferida prejudica o desenvolvimento de tecido saudável de granulação e a migração de queratinócitos necessários para a reepitelização local (Stechmiller & Schultz 2007). Assim, é importante que seja feito o desbridamento no leito da ferida para que sejam removidos o tecido necrótico e bactérias patogênicas, visando assim à cicatrização (Calianno & Jakubek 2006; Kirshen et al 2006).

O tratamento de uma ferida é complicado, mas a esfera psicológica de um paciente também afeta sua cura; assim, é importante que profissionais de saúde explorem a ferida em si, mas também a experiência dos pacientes com a doença e o contexto deles com o seu ambiente, suas crenças e experiências de vida (Kunimoto et al 2001). Os métodos de desbridamento disponíveis incluem: desbridamento autolítico, enzimático, cirúrgico, mecânico e com uso de larvas (Kirshen et al 2006).

No desbridamento autolítico, a ferida é coberta com curativo apropriado e as próprias enzimas proteolíticas corporais, liberadas por macrófagos, efetuam a liquefação do tecido desvitalizado e promovem a formação do tecido de granulação (Konig et al 2005). No desbridamento enzimático, por sua vez, a ferida é tratada com enzimas proteolíticas, diferindo do desbridamento autolítico por serem estas exógenas ao corpo humano. Entre as enzimas mais comumente utilizadas estão a papaína, extraída do mamão (Hebda & Lo 2001), e a colagenase, derivada de *Clostridium histolyticum* (Hebda et al 1998). É reportado que os tipos de desbridamentos mecânico e cirúrgico comumente causam muita dor, ainda que seja utilizado anestésico local (Holm et al 1990; Vowden & Vowden 1999). A técnica do desbridamento cirúrgico envolve a remoção agressiva de grandes quantidades de tecido necrótico com o uso de bisturi, tesoura e pinça. O procedimento é feito em uma sala de cirurgia e o paciente deve estar sob anestesia; neste método, a ferida crônica retorna à fase de ferida aguda (Vowden & Vowden 1999). No desbridamento mecânico, os métodos utilizados envolvem força externa, como jatos de salina aplicados com pressão sobre a ferida e curativos

do tipo “wet-do-dry” (Kammerlander et al 2005). Esses métodos são extremamente dolorosos e só podem ser aplicados com anestesia, mas são controversos por não serem seletivos e acabarem removendo também tecido sadio do leito da ferida (Kirshen et al 2006).

Uma alternativa a estes métodos de desbridamento agressivos e não seletivos é a Terapia Larval, que consiste na aplicação de larvas vivas e esterilizadas de moscas varejeiras sobre o tecido necrótico, que se alimentarão deste, fazendo sua remoção sem causar dor ao paciente e diminuindo o trabalho dos profissionais de saúde (Mumcuoglu 2001). Este procedimento apresenta diversas vantagens quando comparado aos tipos clássicos de desbridamento, mas sua aplicabilidade no Brasil ainda é reduzida, possivelmente devido à baixa divulgação e ao preconceito por parte dos profissionais de saúde e de pacientes com feridas candidatas. Petherick et al (2006) conduziram um questionário com pacientes com úlceras nas pernas para investigar a aceitação da TL, com larvas soltas e contidas em envelopes de gaze, quando confrontadas com o tratamento convencional (hidrogel), para descobrir se a aversão às larvas seria um fator limitante à aplicabilidade destas. A conclusão do estudo foi de que, com a explicação das vantagens por parte da equipe de saúde, não há diferença significativa na aceitação de ambos os métodos de TL quando comparado ao método convencional, evidenciando a necessidade de estudos que visem uma maior divulgação desta.

Dessa forma, o presente estudo buscou avaliar na população brasileira, com acesso à internet, a aceitação desta terapia e os principais motivos para sua recusa, abrindo caminhos para um trabalho futuro mais extenso de divulgação da TL como via alternativa de tratamento no âmbito da saúde.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Local de estudo

A elaboração do questionário para inquérito e produção do infográfico foram realizados no Laboratório de Entomologia Integrativa (LEI) do Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

População amostrada

Para caracterizar a população participante da pesquisa, foram investigadas as variáveis de gênero, faixa etária, escolaridade ou grau de instrução escolar, situação sócio-econômica e informação de origem geográfica da seguinte forma:

- gênero (feminino e masculino);
- região geográfica;
- religiosidade (católica, agnóstica, atéia, evangélica, espírita, outras);
- faixa etária (18-24 anos, 25-30 anos e >31 anos);
- escolaridade/grau de instrução (até ensino médio, ensino superior completo, pós-graduação completa);
- área de atuação (profissional da área da saúde ou de outras áreas);
- classe sócio-econômica (classes A, B, C–E) de acordo com o Critério de Classificação Econômica da Associação Brasileira de Empresas e Pesquisas (ABEP, 2012). Este critério define as classes econômicas a partir da pontuação sobre a quantidade de itens duráveis no domicílio (aparelho de DVD, banheiro, automóvel, geladeira, máquina de lavar, entre outros), bem como número de empregados que trabalham na casa e o nível de instrução do participante da pesquisa. A soma total das pontuações classifica o sujeito em uma das classes econômicas propostas, sendo que estas foram agrupadas da forma classe A (A1 e A2), classe B (B1 e B2) e C–E (C1, C2, D e E) para auxiliar na inferência desta pesquisa.

Aspectos éticos legais

Atendendo à Resolução Nº 466/12 (Conselho Nacional de Saúde) sobre pesquisa envolvendo seres humanos, o projeto de pesquisa desta dissertação de mestrado foi submetido à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual de Campinas. Os dados foram coletados após parecer ético favorável do CEP/UNICAMP, com CAAE nº66030416.0.0000.5404, e aquiescência dos sujeitos, aos quais foram garantidos sigilo e anonimato. Estes foram informados de que a participação no estudo seria livre, e que não acarretaria dano algum ou ônus, podendo desistir em qualquer momento que achassem conveniente, sem nenhum constrangimento. A todos foi apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (em Anexo) e fornecidas informações quanto aos objetivos e justificativa desta pesquisa.

Elaboração do questionário

Inicialmente, para auxiliar na veiculação do questionário em redes sociais e na apreensão rápida de informações sobre a Terapia Larval, foi elaborado um infográfico à mão livre, após revisão da literatura (Figura 2).

O questionário online foi feito na plataforma *Google Docs*, composto pelas etapas:

- Breve apresentação da Terapia Larval com texto explicativo e infográfico (Figura 2);
- Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo);
 - Em caso de recusa a participar da pesquisa após a leitura do TCLE, a pesquisa se encerraria;
 - Em caso de aceitação, a pessoa seria levada à próxima etapa do questionário;
- Questionário Socioeconômico (gênero, faixa etária, estado, grau de escolaridade, nível sócioeconômico, religião, área de atuação);
- Questionário de aceitação da TL, com avaliação de 0 a 4 sobre como cada fator influenciou na aceitação ou recusa da terapia, baseado em Franco (2010) (Figura 3).

Ao se declarar favorável à aceitação da terapia, o participante então julgaria quais os motivos que mais influenciaram em sua decisão. Cada vantagem desta terapia foi listada e deveria ser avaliada de 0 a 4, “0” indicando que a vantagem enunciada não exerceu influência na escolha e “4” que exerceu grande influência. As vantagens listadas foram: desbridamento rápido e seletivo, redução no tempo de cicatrização, eficácia contra microrganismos multirresistentes, baixo custo, redução da dor ao desbridamento da ferida, ferida que não responde a outras terapias (Franco 2010). Caso o participante tivesse resposta contrária, seria levado a uma página semelhante, em que julgaria os motivos pelos quais respondeu “não” para a aceitação da terapia. Cada motivo pela não aceitação foi listado e deveria ser avaliado com notas de 0 a 4, em que a nota “0” indicaria que o motivo listado não exerceu influência, e a nota “4” indicaria que exerceu grande influência. Os motivos listados foram: conhecimento insuficiente sobre a utilização de larvas na cicatrização de feridas, tratamento sujo, dificuldade/nojo em manipular as larvas.

Coleta de Dados

A coleta de dados foi realizada pela pesquisadora, através de um endereço eletrônico divulgado em uma rede social, em grupos específicos de entomologia, pós-graduação e universidades. O endereço ficou disponível por 30 dias, do período de 13 de Abril a 13 de Maio de 2017.

Análise dos Dados

Análise de variância (ANOVA) de um fator, seguida por teste-t, foi feita para medir possíveis diferenças na aceitação dos diversos grupos a que pertenciam os participantes do questionário, sendo possível fazer inferências sobre o tipo de público avaliado e suas objeções quanto ao uso da terapia larval. Um nível global de significância de 5% foi considerado em todas as análises. Todas as análises foram feitas usando o pacote estatístico SAS System para Windows versão 6.12 (SAS Inc., 2006).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Caracterização dos participantes da pesquisa

Das 1.235 pessoas que tiveram acesso ao questionário, 1.226 concordaram com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, compondo, a partir disso, a amostra/população desta pesquisa. A população foi composta por todos os níveis de escolaridade, faixas etárias, religiões, níveis socioeconômicos e oriundos de todos os estados da federação do Brasil, exceto Roraima.

Entre os entrevistados, 70% se identificavam com o gênero feminino e 30% com o masculino, tendo morado a maior parte da vida nas regiões sudeste (67%), sul (14%), nordeste (11%), centro-oeste (5%) e norte (3%). Quanto ao nível de escolaridade, 35% apresentavam até ensino médio completo, 41% pós-graduação e 24% ensino superior completo. A faixa etária mais abundante foi de 18 a 24 anos, correspondendo a 50% dos entrevistados, seguida por 25-30 anos (33%) e >31 anos (17%). Apenas 33% dos entrevistados pertenciam à área da saúde. Avaliando as religiões, a mais abundante era a agnóstica (31%), seguida da católica (27%) e espírita (12%). A classe sócio-econômica mais representada foi a A (61,3%), seguida pela B (30,6%) e C-E (7,9%).

3.3.2 Avaliação sobre a aceitação ou recusa da TL na cicatrização de feridas

A aceitação ou recusa da terapia larval foi avaliada separadamente em cada grupo participante da pesquisa:

Gênero

A análise de variância (ANOVA) apontou que não houve diferença significativa na aceitação entre os dois gêneros ($F=0,96$; $p=0,429$), de 85% de respostas favoráveis ao uso da terapia larval do gênero masculino, contra 75% de respostas favoráveis do gênero feminino (Figura 5).

Região geográfica

A análise de variância (ANOVA) apontou que não houve diferença significativa na aceitação entre as regiões geográficas brasileiras ($F=2,18$; $p=0,2064$), entre as regiões Sul (80%), Sudeste (79%), Nordeste (75%), Norte (72%) e Centro-Oeste (71%) (Figura 6).

Religiosidade

A análise de variância (ANOVA) apontou que não houve diferença significativa na aceitação entre as diferentes religiosidades (ou ausência destas) ($F=0,87$; $p=0,55$), sendo elas ateus (87%), agnósticos (81%), evangélicos (81%), católicos (75%), outras religiões (75%) e espíritas (70%) (Figura 7).

Faixa etária

A análise de variância (ANOVA) apontou que não houve diferença significativa na aceitação entre as faixas etárias ($F=0,68$; $p=0,56$), sendo a aceitação de 85% para os maiores de 31 anos, de 78% para os participantes entre 25-30 anos e de 76% para os participantes com 18-24 anos (Figura 8).

Grau de instrução/escolaridade

A análise de variância (ANOVA) apontou que não houve diferença significativa na aceitação entre os níveis de escolaridade ($F=0,68$; $p=0,56$), sendo esta de participantes com ensino médio completo (79%), pós-graduação (78%) e ensino superior (75%) (Figura 9).

Área de atuação

A análise de variância (ANOVA) apontou que não houve diferença significativa na aceitação entre as áreas de atuação ($F=0,67$; $p=0,49$), sendo profissionais da área da saúde (79%) e de outras áreas (77%) (Figura 10).

Nível sócioeconômico

A análise de variância (ANOVA) apontou que não houve diferença significativa na aceitação entre os níveis econômicos ($F=1,14$; $p = 0,42$), sendo esta de 78,5% para a classe B, 78% para a classe A e 76,5% para as classes C-E (Figura 11).

Assim, não houve diferença estatisticamente significativa na aceitação ou recusa desta terapia em nenhum dos grupos apresentados, seja por gênero, idade, localização, religião, área de atuação ou níveis de escolaridade e socioeconômico. A porcentagem geral de aceitação, independentemente do grupo, foi de 78% (957 respostas), contra 22% (269 respostas) de rejeição à terapia. Entre os 1226 participantes, 1154 (94%) responderam que o infográfico aumentou seus conhecimentos em terapia larval, contra apenas 72 (6%) cujo conhecimento não se alterou.

3.3.3 Avaliação dos motivos de aceitação e recusa do uso da TL na cicatrização de feridas

Os fatores escolhidos com maior intensidade entre os participantes da pesquisa com resposta “aceitação” à terapia com larvas foram: ferida que não responde a outras terapias (74%), eficácia contra microrganismos multirresistentes (63%), redução da dor (61%), redução no tempo de cicatrização (59%), desbridamento rápido e seletivo (58%) e baixo custo (47%) (Figura 12). Entre as respostas “recusa”, os fatores escolhidos com maior intensidade foram asco/dificuldade em lidar com as larvas (57%), conhecimento insuficiente (28%) e tratamento sujo (15%) (Figura 13).

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram que, ainda que em estágio inicial de pesquisa e aplicação no país, a terapia larval já é bem recebida entre os diversos grupos de pessoas que compõem a população amostrada, sem distinção entre gênero, classe social, escolaridade, religião, região geográfica, idade ou área de atuação. A média geral de aceitação, correspondendo a 78% de respostas “sim” para o tratamento, é próxima ao encontrado na literatura em um estudo feito por Petherick et al (2006), com 30 pacientes

adultos e com úlceras nas pernas, os quais consideraram a terapia como viável em 75% dos casos.

Quando analisados os motivos de aceitação, fica claro que a maior parte das pessoas optaria por esta terapia quando as outras opções de tratamento convencionais não surtiram efeito ou não estivessem disponíveis, sendo que a eficácia contra microrganismos multirresistentes, a redução da dor e do período de tratamento e a seletividade das larvas no desbridamento são motivos secundários à escolha; por fim, o baixo custo da terapia é o motivo que menos influencia na escolha por este tratamento.

Quando analisados os motivos de recusa da terapia, é marcante a intensidade com que o asco ou dificuldade em lidar com as larvas influencia nesta resposta, ainda que não seja tão forte a classificação deste tratamento como “sujo”. O conhecimento insuficiente sobre a terapia aparece como segundo motivo mais importante em sua recusa, e é sobre este ponto que o presente trabalho pretende atuar, atuando na divulgação desta entre todos os grupos amostrados no estudo, na forma de infográfico ilustrativo em forma física e digital, a ser entregue em centros de saúde, congressos, salas de aula e divulgado também em redes sociais. Com isso, espera-se que esta terapia passe a ser mais aceita no país, e que pessoas com feridas candidatas à TL possam optar pela mesma quando buscarem um tratamento que lhes garanta maior bem estar e possibilidade de cura.



Figura 2: Infográfico sobre a terapia larval

Aceitação da Terapia Larval no Brasil

-O tempo de leitura e preenchimento do questionário é de aproximadamente 3 minutos-

O questionário a seguir busca entender qual a aceitação da Terapia Larval no Brasil. Para isso, por favor, leia atentamente os dados apresentados na figura a seguir:



Embasamento Teórico Complementar (Leitura opcional)

• Métodos já conhecidos de tratamento de feridas:

> Ao se fazer a escolha pelo método mais adequado de desbridamento, é importante que se leve em consideração o conhecimento de técnicas pelo cirurgião, as características da ferida, como seu tamanho, profundidade e quantidade de exsudatos, bem como os desejos e preocupações do paciente em questão, além da redução da dor do paciente (Smith, 2002). Os métodos de desbridamento disponíveis incluem: desbridamento autolítico, enzimático, cirúrgico, mecânico e com uso de larvas (Kirshen et al, 2006). No desbridamento autolítico, a ferida é coberta com curativo apropriado e as próprias enzimas proteolíticas corporais, liberadas por macrófagos, efetuam a liquefação do tecido desvitalizado e promovem a formação do tecido de granulação (Konig et al, 2005). No desbridamento enzimático, a ferida é tratada com enzimas proteolíticas, diferindo do desbridamento autolítico por serem estas externas ao corpo humano. É reportado que os tipos de desbridamentos mecânico e cirúrgico comumente causam muita dor, ainda que seja utilizado anestésico local (Holm et al, 1990; Vowden & Vowden, 1999). A técnica do desbridamento cirúrgico envolve a remoção agressiva de grandes quantidades de tecido necrótico com o uso de bisturi, tesoura e pinça. No desbridamento mecânico, os métodos utilizados envolvem força externa, como jatos de salina aplicados com pressão sobre a ferida e curativos do tipo "wet-do-dry", que consistem em envolver a ferida com gaze umedecida com salina e esperar secar completamente, e então remover (Kammerlander et al, 2005). Esses métodos são extremamente dolorosos e só podem ser aplicados com anestesia, mas são controversos por não serem seletivos e acabarem removendo também tecido sadio do leito da ferida (Kirshen et al, 2006). Uma alternativa a estes métodos de desbridamento agressivos é a aplicação de larvas vivas e esterilizadas de moscas varejeiras sobre o tecido necrótico, que se alimentam deste, fazendo sua remoção sem causar dor ao paciente e diminuindo o trabalho dos profissionais de saúde (Mumcuoglu, 2001). Este procedimento é chamado de Terapia Larval, e esta apresenta diversas vantagens quando comparada aos tipos clássicos de desbridamento.

• Como funciona a morte de bactérias pelas larvas?

> Fazemos a esterilização dos ovos com água sanitária a 0,5%, conforme descrito na literatura, por 3min. Ao nascer, as larvas já estão estérteis. A ferida então é coberta com gaze e outros tipos de bandagem que não sufocam as larvas, e elas ficam contidas no local por até 72h. Após esse período, elas são removidas com jatos leves de soro fisiológico estéril.

Referências:

- Jourdan M. Larval therapy. Int. j clin pract. 2007; 61(3):359-360.
- Parnés A, Lagan KM. Larval Therapy in wound management: a review. Int. j clin pract. 2007; 61(3): 488-493.
- Chan DCW, Fong DHF, Leung JY, Patil NG, Leung GKK. Maggot debridement therapy in chronic wound care. Hon Kong Med J. 2007; 13(5): 382-386.
- Steenvoerde P, Budding T, Oskam J. Determining pain levels in patients treated with maggot debridement therapy. J. wound Care. 2006; 15 (2):71.
- Tanyuksel M, Araz E, Dundar K, Uzun G, Gumus T, Alten B, Saylam F et al. Maggot debridement therapy in the treatment of chronic wounds in a military hospital setup in Turkey. Division of Medical Parasitology, Gulhane Military Medical Academy, Ankara, Turkey. Dermatology. 2005; 210 (2): 115-8.
- Tantawi TI, Gohar YM, Kotb MM, Beshara FM, El-Naggar MM. Clinical and microbiological efficacy of MDT in the treatment of diabetic foot ulcers. J. wound Care. 2007; 16(9):379-83.

NEXT

Page 1 of 10

Never submit passwords through Google Forms.

Aceitação da Terapia Larval no Brasil

* Required

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Estou sendo convidado a participar de um estudo* denominado "Terapia larval: divulgação, abordagens para criação de larvas de Calliphoridae (Insecta: Diptera) e avaliação in vitro da ação de suas exscreções sob as formas amastigota e promastigota de Leishmania amazonensis", cujos objetivos e justificativas são: medir o grau de conhecimento da população sobre terapia larval e identificar em quais pontos existe uma maior necessidade de trabalho de esclarecimento e divulgação, elaborando um panfleto educativo sobre o tema.

A minha participação no referido estudo será no sentido de responder um questionário online com informações acerca do meu nível socioeconômico e grau de escolaridade, bem como meu conhecimento sobre a Terapia Larval e aceitação desse método caso tivesse uma ferida crônica em meu corpo.

Fui alertado de que, da pesquisa a se realizar, posso esperar alguns benefícios, tais como: a melhoria desta técnica no Brasil, devido à maior divulgação gerada após a análise dos resultados do questionário.

Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do estudo, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização. Assim, posso sentir algum desconforto após visualizar as imagens de feridas crônicas dispostas ao longo do questionário, bem como as imagens de larvas de moscas.

Para participar deste estudo não terei nenhum custo, nem receberei qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, tenho assegurado o direito a indenização. Terei o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estarei livre para participar ou recusar-me a participar. Poderei retirar meu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. Minha participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que sou atendido(a). O pesquisador tratará minha identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados da pesquisa estarão à minha disposição quando finalizada. Meu nome ou o material que indique minha participação não será liberado sem a minha permissão, e não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar.

Os pesquisadores tratarão minha identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

A pesquisadora envolvida com o referido projeto é a aluna de mestrado Marina Ferrari Klemm de Aquino, e com ela poderei manter contato pelo telefone (19) 3521-6299. Seu endereço para contato é Rua Monteiro Lobato, 255 - Departamento de Biologia Animal (Antiga Parasitologia), Cidade Universitária - Campinas/SP, CEP: 13083-862. Para contato virtual, o e-mail da pesquisadora é marinaklemm@gmail.com.

É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação. Ao passar para a próxima página do questionário, aceito minha participação no mesmo.

*Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), na Plataforma Brasil, em 13/04/2017, com o nº CAEE 66030416.0.0000.5404.

Após ler o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, eu: *

- Aceito participar do referido estudo
- Não aceito participar do referido estudo

BACK

NEXT

Page 2 of 10

Aceitação da Terapia Larval no Brasil

ATENÇÃO!

As imagens a seguir podem causar desconforto.

Conteúdo: tecido necrosado e feridas com larvas de mosca; imagem com saturação reduzida para minimizar o desconforto visual.

BACK

NEXT

Page 4 of 10

Never submit passwords through Google Forms.

Figura 3: Primeira etapa do questionário online

Aceitação da Terapia Larval no Brasil

Imagem extraída do artigo: Amputation-sparing treatment by nature: "surgical" maggots revisited.

Jukema GN, Menon AG, Bernarda AT, Steenvoorde P, Taheri Rastegar A, van Dissel JT. 2002. Amputation-sparing treatment by nature: "surgical" maggots revisited. Clin Infect Dis. 35(12):1566-71.

A imagem abaixo mostra um caso em que a aplicação de larvas sobre a ferida de um membro já amputado preveniu uma maior amputação do mesmo. A primeira imagem exhibe o membro com gangrena; a segunda imagem mostra cerca de 200 larvas esterilizadas aplicadas sobre a ferida; a terceira figura mostra a ferida já curada, um ano após a aplicação de larvas.



BACK

NEXT

Page 5 of 10

Never submit passwords through Google Forms.

Aceitação da Terapia Larval no Brasil

* Required

Após a leitura da introdução sobre "Terapia Larval":

Se você tivesse uma ferida de difícil cicatrização em seu corpo, você aceitaria a aplicação de larvas nela? *

SIM

NÃO

BACK

NEXT

Page 7 of 10

Never submit passwords through Google Forms.

Quadro 1

Selecione no Quadro 1, na escala de 0 (zero) a 4 (quatro), desenhada ao lado de cada fator, a intensidade com que este influencia sua ACEITAÇÃO, tanto na prescrição desta terapia quanto na possível utilização em seu próprio corpo, caso tivesse uma ferida.

Lembramos que 0 (zero) indica nenhuma influência, ou seja este fator não seria escolhido por você.

- 1 (um) significa influência pequena,
- 2 (dois) significa influência moderada,
- 3 (três) significa influência grande
- 4 (quatro) significa influência total.

Quadro 1 *

Aceitação da terapia larval numa ferida em seu próprio corpo ou recomendação da terapia larval para pacientes/amigos/familiares

	0	1	2	3	4
Redução da dor e do desbridamento da ferida	<input type="radio"/>				
Ferida que não responde a outras terapias	<input type="radio"/>				
Eficácia contra bactérias resistentes a antibióticos	<input type="radio"/>				
Baixo custo	<input type="radio"/>				
Desbridamento (remoção do tecido necrosado) rápido e seletivo	<input type="radio"/>				
Redução no tempo de cicatrização	<input type="radio"/>				

BACK

NEXT

Page 8 of 10

Figura 4: Segunda etapa do questionário online

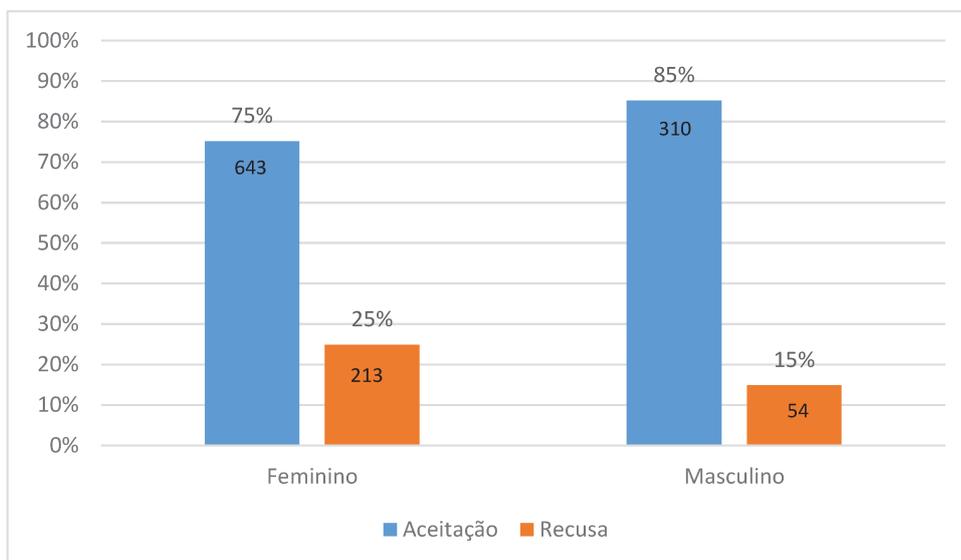


Figura 5: Percentual de aceitação da TL em relação aos gêneros.

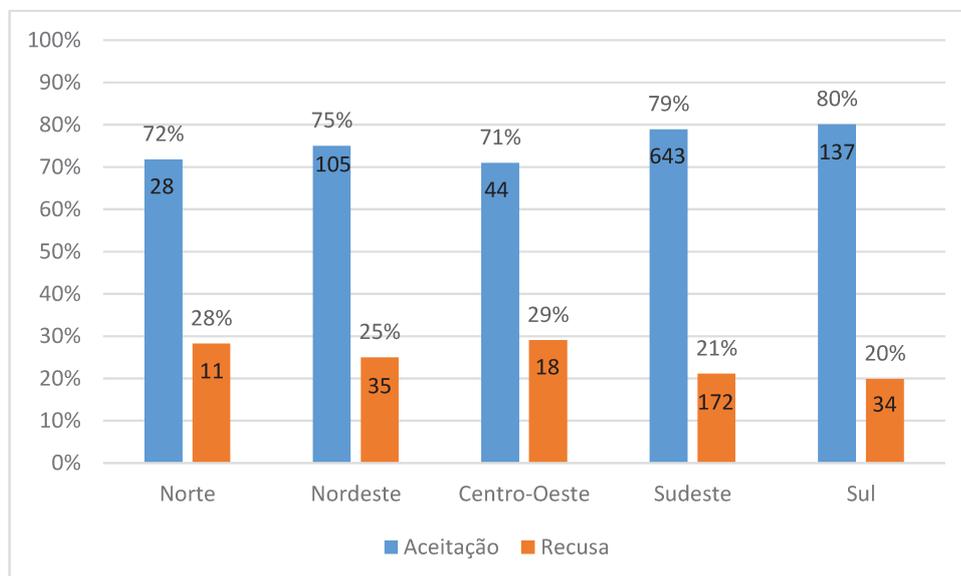


Figura 6: Percentual de aceitação da TL em relação à região geográfica.

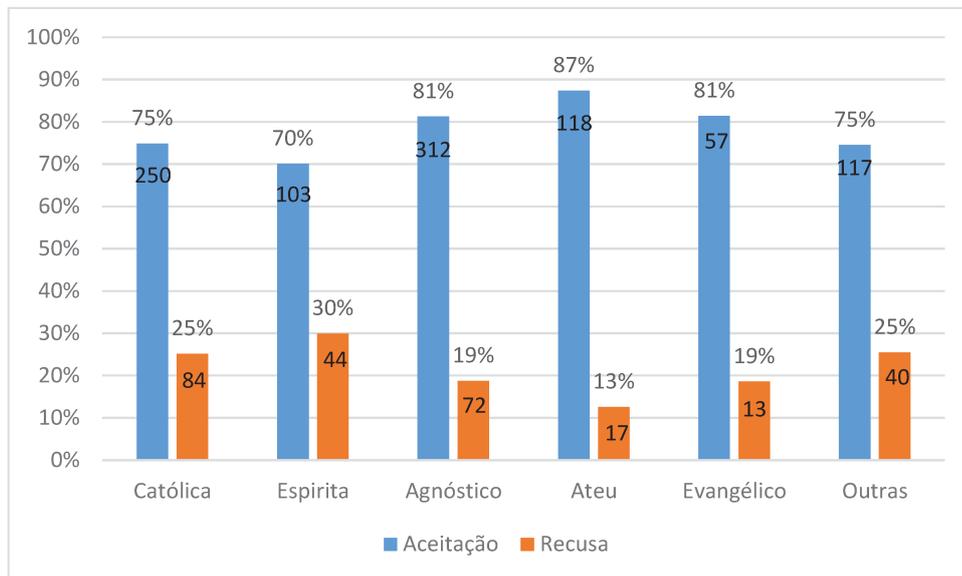


Figura 7: Percentual de aceitação da TL em relação à religião.

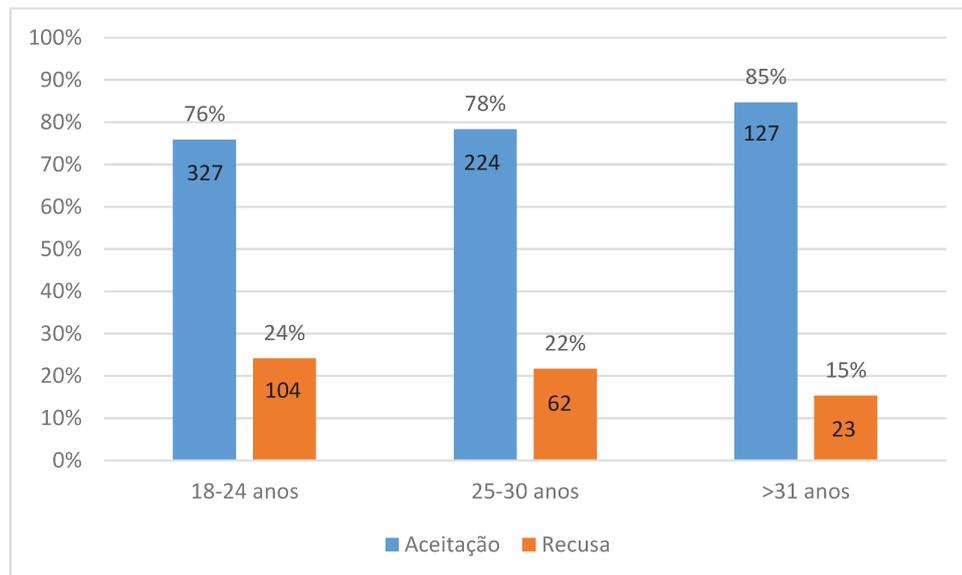


Figura 8: Percentual de aceitação da TL em relação à faixa etária.

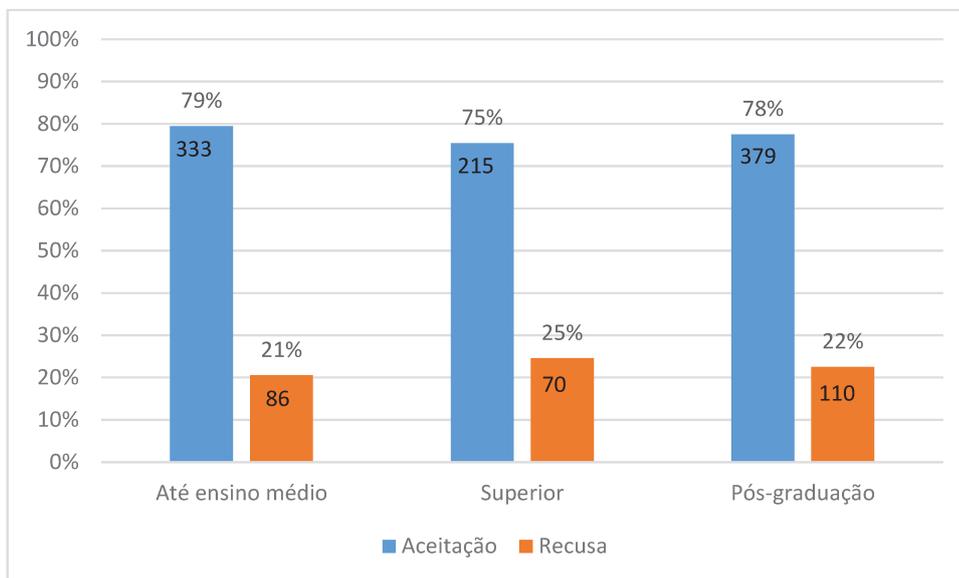


Figura 9: Percentual de aceitação da TL em relação ao nível de escolaridade.

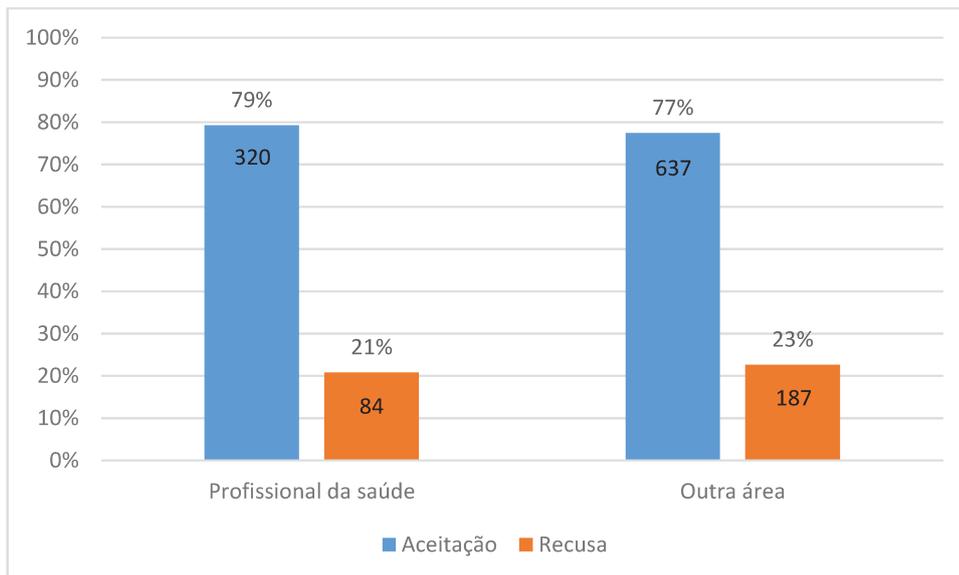


Figura 10: Percentual de aceitação da TL em relação à área de atuação.

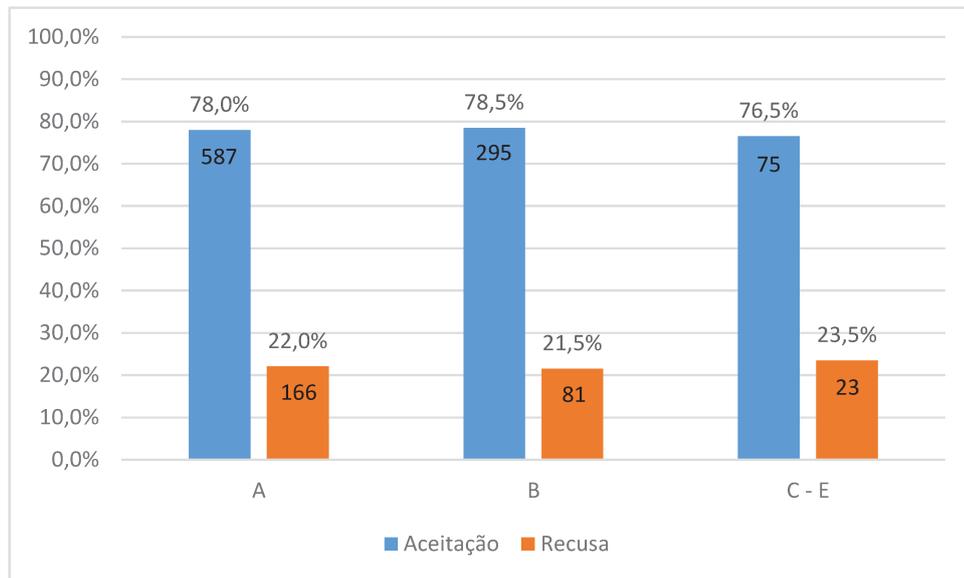


Figura 11: Percentual de aceitação da TL em relação ao nível socioeconômico.

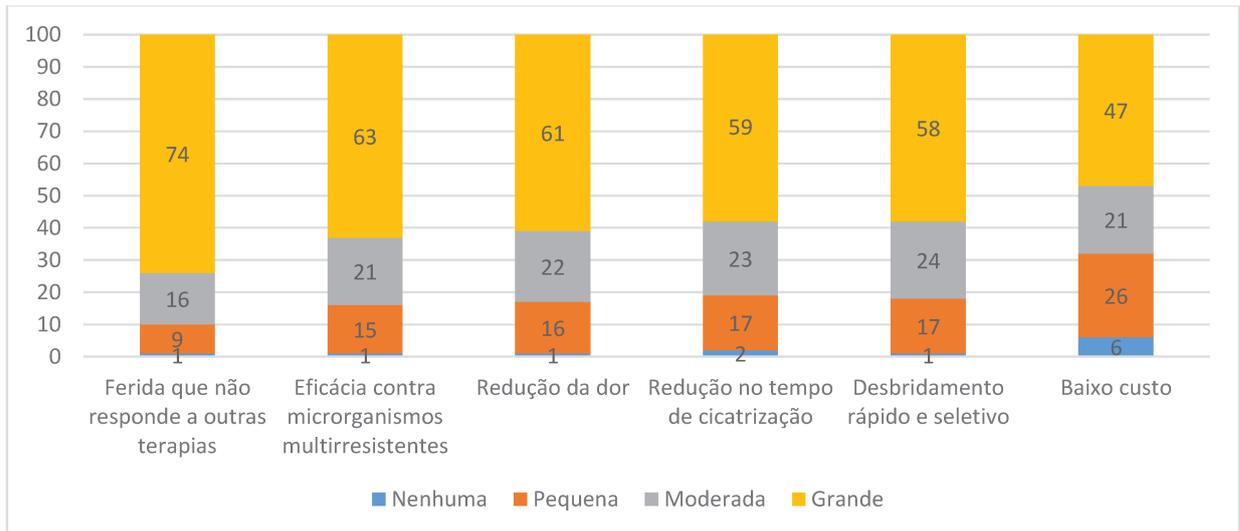


Figura 12: Intensidade da interferência dos fatores na resposta "aceitação" da TL.

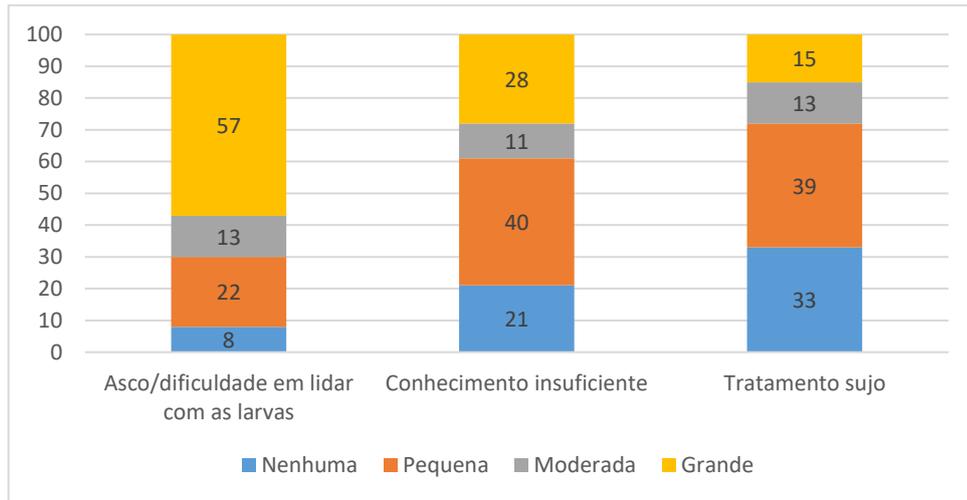


Figura 13: Intensidade da interferência dos fatores na resposta "recusa" da TL.

3.4 REFERÊNCIAS

Brasil. Lei nº 12.527/11, de 31 de Dezembro de 2015

Calianno C & Jakubek P (2006) Wound bed preparation: laying the foundation for treating chronic wounds part 1. *Nursing*, 36(2): 70–71

Franco LC (2010) Avaliação da aceitabilidade da terapia larval no tratamento de feridas. Dissertação de mestrado, UFG, Goiânia, 112pp

Hebda PA & Lo C (2001) Biochemistry of wound healing: the effects of active ingredients of standard debriding agents – papain and collagenase – on digestion of native and denatured collagenous substrates, fibrin and elastin. *Wounds*, 13(5):190–194

Holm J, Andren B, Grafford K (1990) Pain control in the surgical debridement of leg ulcers by the use of a topical lidocaine–prilocaine cream, EMLA. *Acta Dermato-Venereologica*, 70:132–136

Jones J, Barr W, Robinson J, Carlisle C (2006) Depression in patients with chronic venous ulceration. *British Journal of Nursing*, 11: 8–15

Kammerlander G, Andriessen A, Asmussen P, Brunner U, Eberlein T (2005) Role of the wet-to-dry phase of cleansing in preparing the chronic wound bed for dressing application. *Journal of Wound Care*, 14: 349–352

Kirshen C, Woo K, Ayello EA, Sibbald RG (2006) Debridement: a vital component of wound bed preparation. *Advances in Skin & Wound Care*, 19(9): 506–517

Konig M, Vanscheidt W, Augustin M, Kapp H (2005) Enzymatic versus autolytic debridement of chronic leg ulcers: a prospective randomised trial. *Journal of Wound Care*, 14: 320–3

Kunimoto B, Cooling M, Gulliver W, Houghton P, Orsted H, Sibbald RG (2001) Best practices for the prevention and treatment of venous leg ulcers. *Ost/Wound Management*, 47 (2): 34–51

Petherick ES, O'Meara S, Spilsbury K, Iglesias CP, Nelson EA, Torgerson DJ. Patient (2006) Patient acceptability of larval therapy for leg ulcer treatment: a randomised survey to inform the sample size calculation of a randomised trial. *BMC Medical Research Methodology*, 6(1): 43

- Mumcuoglu KY (2001) Clinical applications for maggots in wound care. *American Journal of Clinical Dermatology*, 2: 219–227
- Stechmiller J & Schultz G (2007) Bench science advances for chronic wound care. In: *Chronic Wound Care: A Clinical Source Book for Healthcare Professionals*. HMP Communications, Malvern, Pa, USA, 4th edition, pp 67–73
- Vowden KR & Vowden P (1999) Wound debridement, Part 1: Non-sharp techniques. *Journal of Wound Care*, 8: 237–240

4 Avaliação do desenvolvimento de *Cochliomyia macellaria* e *Chrysomya megacephala* (Insecta, Diptera, Calliphoridae), espécies para uso terapêutico, em três dietas artificiais

Evaluation of the development of *Cochliomyia macellaria* and *Chrysomya megacephala* in three artificial diets for therapeutic use

M. F. K. Aquino*, P. J. Thyssen*

*University of Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo State, Brazil

ABSTRACT

Larval therapy (TL) is the name given to the technique of application of live larvae in chronic necrotic wounds for its debridement and disinfection. For LT, species that feed exclusively on necrotic tissue, such as *Cochliomyia macellaria* and *Chrysomya megacephala* (Diptera), selected from previous laboratory studies that certify their safety for therapeutic application, may be used. Artificial diets are useful for rearing flies in laboratory by ensuring standardization, obtainment of a large number of individuals in a short time and greater ease in handling immature. In literature several diets are available, but none is sterilized and suitable for the transport of larvae for therapeutic purposes. The objective of this study was to evaluate the development of *C. macellaria* and *C. megacephala* in three different diets after their autoclaving, - based on lyophilized egg (I), wheat germ (II) and Brewer's yeast (III) -, which could ensure the satisfactory development of larvae for up to 72h, maximum age of larvae rearing before its therapeutic application. Six replicates were made for each experimental group. Raw ground beef was used as a control. 100 larvae were prepared per flask containing 1g / larvae, kept under controlled conditions (25 ± 1 ° C, $70 \pm 10\%$ RH, 12 / 12h photoperiod). Ten larvae from each experimental group were randomly collected and weighed individually every 12 hours until the age of 72 hours. Statistical analyzes were performed using Tukey test with SAS® software. There were no significant differences in viability between meat (control) and diet II ($p > 0.05$) for both species, while the other diets presented low viability. Thus, also considering the physical-chemical properties (consistency, odor and stability) and weight gain, it was concluded that diet II is the most adequate to guarantee the immature survival of these species during transportation for therapeutic application.

KEYWORDS: Larval Therapy, Diptera, Calliphoridae

4.1 INTRODUÇÃO

A infestação de larvas de dípteros em um vertebrado vivo é chamada de miíase (Zumpt 1965). Terapia larval (TL) é a aplicação de larvas vivas em feridas necróticas para auxiliar em seu desbridamento (limpeza), desinfecção e/ou cicatrização (Chambers et al 2003), sendo considerada uma miíase terapêutica, cuja “otimização” garante a eficácia e segurança no tratamento de uma ferida. A miíase é controlada através da escolha cuidadosa da espécie de mosca, além da desinfecção da larva e do uso de curativos especiais que mantenham as larvas na ferida, usando medidas de controle de qualidade durante todo o processo (Sherman 2014).

Para esta terapia, devem ser utilizadas as espécies que se alimentem unicamente de tecido necrosado (Marcondes 2006). As que mais têm sido reconhecidas para este fim são as larvas pertencentes à família Calliphoridae (Diptera), tendo como vantagem um rápido desenvolvimento, facilidade de criação *in vitro* e de esterilização, uma vez que põem ovos, que podem ser mais facilmente manipulados do que larvas. Dentro as espécies de Calliphoridae encontradas no Brasil, *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) e *Cochliomyia macellaria* foram avaliadas e consideradas seguras para a aplicação em TL (Nitsche 2010).

O principal constituinte natural da alimentação de insetos necrófagos de importância médica e veterinária é a carne; no entanto, seus derivados são caros e modificam o odor da dieta, e há décadas vêm sendo desenvolvidas dietas artificiais que utilizam de outras fontes proteicas, como ovo de galinha integral em pó (Gingrich 1964; Gingrich et al 1971), gérmen de trigo (Adkisson et al 1960), levedo de cerveja (Vanderzant 1974), derivados de soja (Vanderzant 1974) e leite de vaca em pó (Leal et al 1982).

Na literatura, são encontrados vários registros de dietas para criação de moscas com interesse médico e veterinário que substituem o uso de tecido animal por outros componentes, visando à sua fácil criação em massa e à alta viabilidade de adultos. Embora sejam diversos os tipos de dietas artificiais para criação destes insetos na literatura, ainda faltam dietas elaboradas para o transporte de larvas visando à sua aplicação em terapia larval. Algumas dietas estéreis foram desenvolvidas com o principal objetivo de poderem ser estocadas sem criar fortes odores e serem fisiologicamente uniformes, sem influência do metabolismo de bactérias (Michelbacher et al 1932; Sherman & Tran 1995), sendo que são encontrados na

literatura apenas três registros de dietas para criação de larvas com uso em terapia larval (Sherman & Tran 1995; Zhang et al 2009; Rueda et al 2010).

Sherman & Tran (1995) propuseram uma dieta utilizando fígado bovino em putrefação com ágar, seguido de autoclavagem e adição de diferentes concentrações de tripsina, sem que estas influenciassem o desenvolvimento final das larvas. Zhang et al (2009) desenvolveram uma dieta para adultos de *Lucilia sericata*, com a intenção de substituir a adição de carne para estimular a maturação ovariana e oviposição pelas fêmeas. Em sua dieta, testaram diferentes concentrações de leite de vaca integral em pó, levedo de cerveja, gérmen de trigo e ágar, sendo que uma das concentrações de ingredientes se mostrou efetiva para os dois critérios avaliados.

Rueda et al (2010) testaram dois tipos de dieta, ambas previamente autoclavadas, para a criação de *Lucilia sericata*. A primeira consistia de ágar, sangue de carneiro, fígado em pó, caldo BHI (Brain Heart Infusion), fosfato ácido de sódio, fosfato ácido de potássio, glicose e água destilada; a segunda consistia de farinha de sangue, farinha de ovo, leite em pó, ágar e água. A sobrevivência da fase de ovo a adulto foi de 91,2% para a primeira dieta, e de 40,5% para a segunda. As moscas continuaram sendo criadas nesta dieta por dois anos, e seu ciclo de vida não se alterou, evidenciando seu sucesso.

O objetivo deste estudo foi avaliar o desenvolvimento de *C. macellaria* e *C. megacephala* criadas por 72h, tempo máximo de transporte até a aplicação terapêutica, em três diferentes dietas artificiais: dieta (I), à base de ovo integral liofilizado; dieta (II), à base de gérmen de trigo conforme Tachibana & Numata (2001); e dieta (III), à base de levedo de cerveja conforme Leal et al (1982).

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de exemplares para estudo

Moscas adultas foram coletadas em ambiente natural e levadas para o laboratório para triagem e identificação (Grella & Thyssen 2011). Os espécimes selecionados para este estudo foram depositados, separados por espécie, em gaiolas plásticas transparentes (30 x 30 x 50 cm), com aberturas laterais revestidas por telas de nylon e alimentadas com dietas à base de açúcar e proteína, constituídas de solução açucarada e fígado bovino cru, mantidas sob

condições controladas ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$, $70\pm 10\%$ e 12:12h). Aproximadamente 50g de carne bovina moída crua fresca foram usados para estimular a oviposição.

Esterilização do tegumento externo dos ovos

Após a postura, os ovos colocados sobre a carne foram retirados com auxílio de um pincel fino e transferidos para uma placa de Petri para início do processo de desinfecção. Todas as etapas desse processo foram feitas utilizando técnicas assépticas em capela de fluxo laminar seguindo a metodologia proposta por Thyssen et al (2013), para que a superfície externa do tegumento, considerada a mais contaminada, ficasse isenta de bactérias.

A desinfecção dos ovos se deu da forma indicada na (Figura 14). Os ovos, após postura em carne moída bovina crua, foram transferidos a envoltórios de organza e imersos em hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,5%, por 3 minutos. Após, foram lavados em água miliq estéril, para remover os resíduos do desinfetante. Os ovos desinfetados foram então transferidos para recipientes contendo dieta estéril, as quais foram mantidas previamente em câmara climática sob condições controladas ($25^{\circ}\text{C}\pm 1$, $70\pm 10\%$ UR, 12:12h).

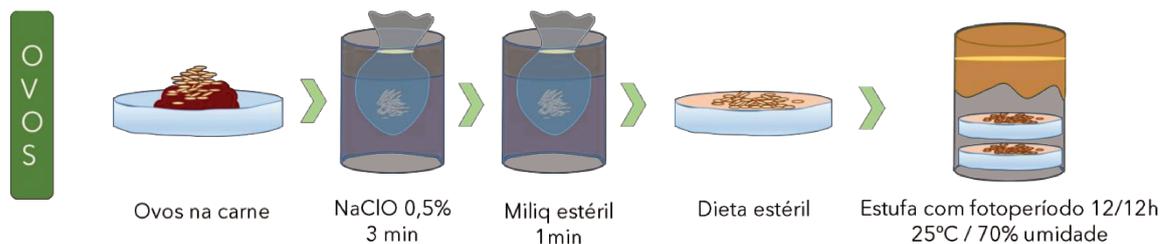


Figura 14: Protocolo de desinfecção do tegumento externo de ovos de moscas varejeiras indicadas para terapia larval

Elaboração e padronização de dietas

Foram testadas as seguintes dietas, as quais constituíram o único substrato para o desenvolvimento larval, a base de: (I) ovo integral liofilizado; (II) gérmen de trigo conforme Tachibana & Numata (2001); e (III) levedo de cerveja conforme Leal et al (1982). Para a elaboração de cada dieta, os ingredientes foram pesados, homogeneizados com ajuda de um liquidificador e autoclavados a 1atm em 121°C por 20min. Após a esterilização, 100g de dieta foram colocados em cada recipiente. As quantidades de ingredientes utilizados estão discriminadas na *Tabela 1*.

Para cada grupo experimental foram feitas seis réplicas três das quais denominadas manipuláveis (de onde foram retirados os espécimes para mensurações do peso e comprimento corporal) e três não manipuláveis (de onde foram observados parâmetros tais como o aspecto físico e odor das dietas e taxa de sobrevivência larval). Após a eclosão, foram

dispostas 100 larvas por frasco, na proporção de 1g dieta/larva, para cada espécie testada. Os frascos foram mantidos sob condições controladas (25 ± 1 °C, 70 ± 10 % UR, 12:12 h). O mesmo número de larvas e réplicas, mantidos sob as mesmas condições controladas, foram usados no grupo controle, sendo o substrato alimentar composto por carne moída bovina crua fresca.

Tabela 1: Composição das três dietas artificiais avaliadas quanto ao sucesso para o desenvolvimento larval.

Ingredientes	Dietas		
	I	II	III
Gérmen de trigo		5g	
Levedo de cerveja		5g	10g
Leite em pó		5g	10g
Ovo integral em pó	10g		
BHI (Brain Heart Infusion)	3,7g		
Nipagin	0,3g	0,3g	0,3g
Ágar	2g	2g	2g
Água destilada	100mL	100mL	100mL
	Carboidratos	Lipídios	Proteínas
Dieta I	5%	34%	59,70%
Dieta II	43%	13%	31%
Dieta III	47,60%	19%	25%

Parâmetros biológicos

O desenvolvimento das larvas em cada dieta foi avaliado levando-se em conta seu ganho de massa (mg), seu comprimento corporal (mm) e a viabilidade larval.

A cada 12 h de desenvolvimento, 10 larvas foram retiradas aleatoriamente de cada recipiente manipulável para pesagem e mensuração do comprimento corporal individual. Antes das pesagens, os espécimes foram limpos com água destilada e secos em papel filtro, a fim de remover resíduos do substrato aderidos ao tegumento larval. As pesagens foram feitas com auxílio de uma balança analítica modelo Scientech® SA 210.

Após a pesagem, os espécimes foram mortos em água destilada aquecida a 60-70°C por 3 s e transferidos para frascos contendo solução de AFA (50mL de álcool etílico 95%, 10mL de formalina, 2mL de ácido acético glacial e 40mL de água destilada) para preservação do material a ser mensurado. As medidas foram feitas usando um estereomicroscópio Zeiss®

modelo Discovery V.12® com sistema de captura de imagens AxioCam® versão 5.0 e software ZEN® versão 2.0. Nenhuma medição foi feita após 72h, uma vez que este é o tempo máximo de desenvolvimento que uma larva pode atingir antes de sua aplicação, de modo a garantir que ela permaneça igual tempo na lesão para tratamento, anterior à fase de pré-pupa.

Após 72 h, as larvas vivas contidas nos recipientes não manipuláveis foram contadas para verificar a viabilidade em cada uma das dietas.

Análise Estatística

Análise de variância (ANOVA) de um fator foi feita para medir possíveis diferenças entre larvas das duas espécies criadas em cada tipo de dieta usando como variável resposta peso (em g) ou comprimento (em mm) ou viabilidade, todos após 72h de experimento. O teste de Tukey para comparações múltiplas foi feito para avaliar possíveis diferenças entre as médias. Um nível global de significância de 5% foi considerado em todas as análises. Todas as análises foram feitas usando o pacote estatístico SAS System para Windows statistical software version 6.12 (SAS Inc., 2006).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com exceção da dieta I, que ao final de seu preparo apresentou consistência pastosa-liquefeita, condição física imprópria para a criação de larvas de califorídeos, as dietas II e III preencheram todos os pré-requisitos e critérios de boa qualidade. De acordo com Parra (1990), é essencial que as dietas apresentem textura, dureza e quantidade de água ideais para a sobrevivência de imaturos alvos para a criação. Além disso, as dietas II e III testadas neste estudo apresentaram aspecto físico, olfativo e visual classificado como aceitável, após esterilização por autoclave. O sucesso na desinfecção das dietas é condição essencial para garantir a segurança no uso de larvas com fins terapêuticos.

A viabilidade, ao lado do aspecto físico, foi considerada um dos parâmetros mais relevantes neste estudo para eleger ou rejeitar a dieta como apropriada para transporte das larvas. Segundo Singh (1983), a viabilidade de adultos produzidos na dieta deve ser de pelo menos 75% do número total de larvas viáveis. Para a espécie *C. megacephala*, a viabilidade das larvas às 72h de experimento foi de 12,6% para a dieta I, 77% para a dieta II, 68% para a dieta III e 76,3% para o controle (Figura 15). Para a espécie *C. macellaria*, a viabilidade das larvas às 72h de experimento foi de 32,6% para a dieta I, 88,3% para a dieta II, 45,6% para a

dieta III e 92% para o controle (Figura 15). Para ambas as espécies, não houve diferença estatística quando comparada a viabilidade da dieta II com o controle, sendo esta também a única dieta com a viabilidade maior que 75% para ambas as espécies, atendendo ao requisito proposto por Singh (1983) (Tabela 2). Sendo assim, conclui-se que as mesmas suprem todos os nutrientes necessários para a produção de insetos viáveis.

As larvas foram avaliadas qualitativamente a partir da massa e do comprimento (Figuras 16 e 17). As larvas de *C. megacephala* criadas na dieta I apresentaram massa de 34,73mg e comprimento de 11,63mm; na dieta II, a massa foi de 45,07mg e o comprimento, 13,63mm. Para a dieta III, a massa foi de 43,25mg e o comprimento, 12,64mm. No grupo controle, a massa final foi de 67,22mg, com comprimento de 14,96mm. Para a espécie *C. macellaria*, as larvas criadas na dieta I apresentaram massa de 25,29mg, com comprimento de 12,32mm. Na dieta II, a massa foi de 11,04mg, com comprimento de 8,99mm. Na dieta III, a massa foi de 39,34mg e comprimento de 13,08mm. E, no controle, as larvas apresentaram 62,44mg de massa e 14,79mm de comprimento. A análise estatística evidenciou que a massa final para *C. megacephala* foi significativamente equivalente entre todos os grupos, diferindo do controle, enquanto que a dieta III foi a única equivalente ao controle quando analisado o comprimento (Tabela 2). Para a espécie *C. macellaria*, todas as medidas de massa e de comprimento foram distintas entre os grupos, não apresentando nenhuma equivalência estatística (Tabela 2).

Tabela 2: Comparação da massa, comprimento e viabilidade de imaturos de *Chrysomya megacephala* e *Cochliomyia macellaria* após 72h de criação em três diferentes dietas (I, II e III). Os valores marcados com a mesma letra (A, B,C, D) são estatisticamente iguais.

	<i>Chrysomya megacephala</i>			<i>Cochliomyia macellaria</i>		
	Massa (mg)	Comprimento (mm)	Viabilidade (%)	Massa (mg)	Comprimento (mm)	Viabilidade (%)
Dieta I	34,73(±9,96) ^A	11,63(±1,81) ^A	12,6(±7,57) ^A	25,59(±1,25) ^A	12,32(±1,18) ^A	32,6(±3,21) ^A
Dieta II	45,07(±1,00) ^A	13,63(±0,70) ^{A,B}	77,0(±10,81) ^B	11,04(±0,18) ^B	8,99(±0,97) ^B	88,3(±7,23) ^B
Dieta III	43,25(±2,87) ^A	12,64(±1,53) ^{B,C}	68,0(±3,60) ^C	39,34(±0,78) ^C	13,08(±1,19) ^C	45,6(±6,11) ^C
Controle	67,22(±3,96) ^B	14,96(±0,75) ^C	76,0(±11,93) ^B	62,44(±0,41) ^D	14,79(±0,98) ^D	92,0(±7,00) ^B

Todas as dietas foram de fácil preparo e uso, e continham em sua composição ingredientes locais e prontamente disponíveis. A vida útil de armazenamento em geladeira (7-10°C) foi semelhante entre todas as dietas, mantendo sua textura e odor característicos por até um mês de preparo. O custo final de cada larva usando as dietas I, II e III foi de R\$ 0,19, R\$ 0,18 e R\$ 0,20, respectivamente.

Na entomologia, as dietas artificiais são usadas para estudar a nutrição dos insetos, testar componentes para observar seus efeitos fisiológicos e para realizar a manutenção de colônias e produção em massa para vários propósitos (Singh 1983; Waldbauer 1968). Quando comparadas ao controle, não garantem o desenvolvimento eficiente dos imaturos, resultado já esperado devido à menor aproximação com as condições encontradas por esses insetos na natureza. Para a terapia larval, não é possível utilizar carne em putrefação como substrato de desenvolvimento e, analisando as dietas testadas, podemos concluir que a que garante maior custo-benefício para a criação de *C. macellaria* e *C. megacephala* é a dieta II, extraída de Tachibana & Numata (2001). Além disso, os imaturos, mesmo com uma massa menor quando criados na dieta II comparando ao controle, não perdem a eficácia para o tratamento de lesões, tanto no que diz respeito ao seu comportamento de alimentação quanto à produção de exosecreções.

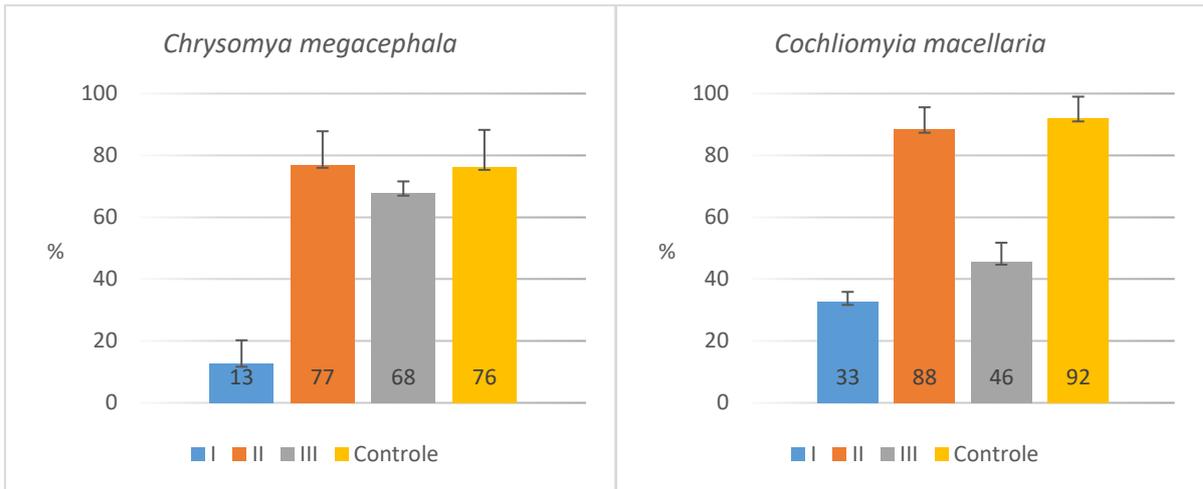


Figura 15: Viabilidade de *C. megacephala* e *C. macellaria* em três diferentes dietas artificiais sob temperatura controlada de $25 \pm 1^\circ\text{C}$

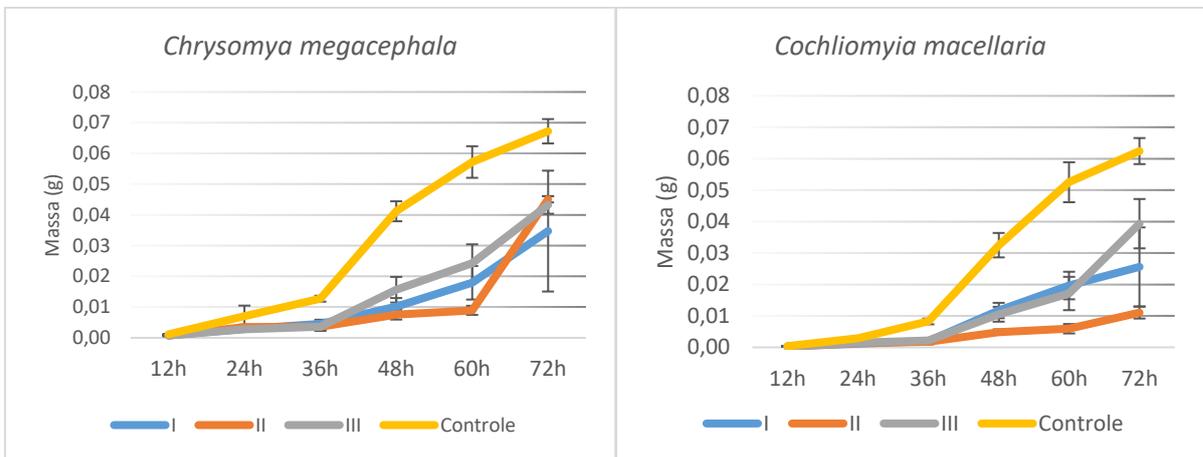


Figura 16: Curva de crescimento (g) de *C. megacephala* e *C. macellaria*, respectivamente, em três diferentes dietas artificiais sob temperatura controlada de $25 \pm 1^\circ\text{C}$

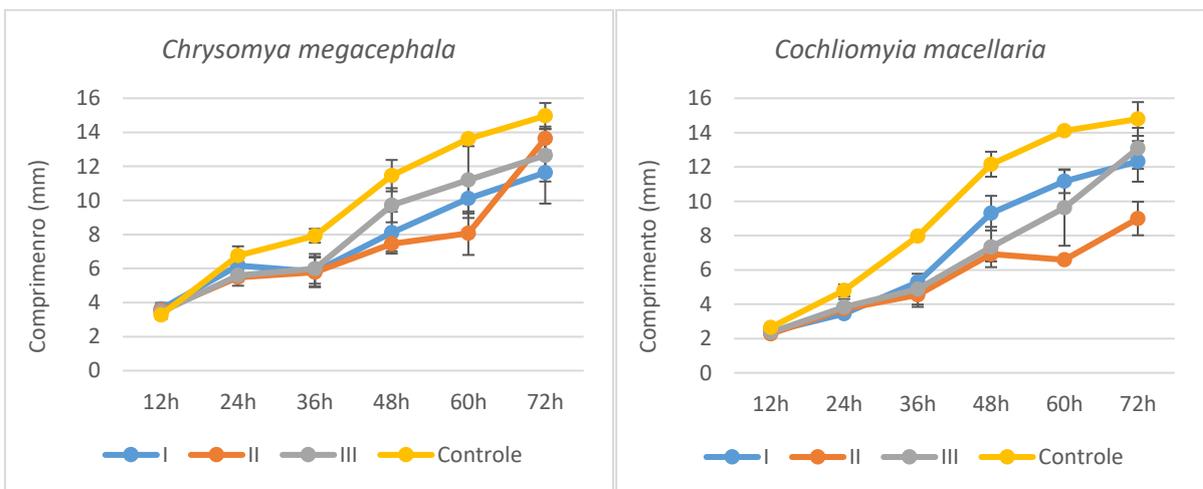


Figura 17: Curva de crescimento (mm) de *C. megacephala* e *C. macellaria*, respectivamente, em três diferentes dietas artificiais sob temperatura controlada de $25 \pm 1^\circ\text{C}$

4.4 REFERÊNCIAS

- Adkisson PL, Vanderzant ES, Bull DL, Allison WE (1960) A wheat germ medium for rearing the pink bollworm. *Journal of Economic Entomology*, 53: 759–62
- Chambers L, Woodrow S, Brown AP, Harris PD, Phillips D, Hall M, Church JC, Pritchard DI (2003) Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds. *British Journal of Dermatology*, 148: 14–23
- Gingrich RE (1964) Nutritional studies on screw-worm larvae with chemically defined media. *Annals of the Entomological Society of America*, 57: 351–60
- Gingrich RE, Graham AJ, Hightower BG (1971) Media containing liquified nutrients for mass-rearing larvae of the screw-worm. *Journal of Economic Entomology*, 64: 678–83
- Grella MD & Thyssen PJ (2011) Chave taxonômica interativa para espécies de dípteros califorídeos (Infraordem: Muscomorpha) do Brasil.
<http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/calliphoridae_brazil>
- Leal TTS, Prado AP, Antunes AJ (1982) Rearing the larvae of the blowfly *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae) on oligidic diets. *Revista Brasileira de Zoologia*, 1: 41–44
- Marcondes CB (2006) Terapia larval: de lesões de pele causadas por diabetes e outras doenças. Editora da UFSC, Santa Catarina, 89p
- Michelbacher AE, Hoskins WM, Herms WB (1932) Nutrition of flesh fly larvae, *Lucilia sericata*. *Journal of Experimental Zoology*, 64: 109–128
- 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). *Entomologia Generalis*, 31: 349–353
- Nitsche MJT (2010) Avaliação da recuperação de lesões cutâneas por meio de terapia larval utilizando como modelos ratos *Wistar*. UNESP: Tese de Doutorado. 53p
- Parra J R (1990) Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. Piracicaba, ESALQ, 125p

- Rueda LC, Ortega LG, Segura NA, Acero VM, Bello F (2010) *Lucilia sericata* strain from Colombia: Experimental colonization, life tables and evaluation of two artificial diets of the blowfly *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae), Bogotá, Colombia Strain. *Biological research*, 43(2):197–203
- Sherman R, Tran JMT (1995) A simple, sterile food source for rearing the larvae of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Medical and Veterinary Entomology*, 9(4): 393–398
- Sherman RA (2014) Mechanisms of maggot-induced wound healing: what do we know, and where do we go from here?. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 43p
- Singh P (1983) A general purpose diet mixture for rearing insects. *Insect Science and its Application*, 4: 357–362
- Tachibana SI & Numata H (2001) An artificial diet for blow fly larvae, *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae). *Applied Entomology and Zoology*, 36: 521–523
- Vanderzant ES (1963) Nutrition of the boll weevil larva. *Journal of Economic Entomology*, 56: 357–62
- Waldbauer G (1968) The consumption and utilization of food by insects. *Advances in Insect Physiology*, 5: 229–288
- Zhang B, Numata H, Mitsui H, Goto SG (2009) A simple, heat sterilizable artificial diet excluding animal derived ingredients for adult blowfly, *Lucilia sericata*. *Medical and Veterinary Entomology*, 23(4): 443–447
- Zumft F (1965) *Myiasis in man and animals in the Old World*. London, Butterworth, 267p

5 Avaliação do efeito das exosecreções larvais de *Chrysomya megacephala* e *Cochliomyia macellaria* (Insecta, Diptera, Calliphoridae) sobre a forma promastigota de *Leishmania amazonensis*

M. F. K. Aquino*, S. Giorgio*, P. J. Thyssen*

*University of Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo State, Brazil

ABSTRACT

Leishmaniasis can cause different forms of the disease in humans (cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis), occupying the 9th place in the ranking of the most infectious diseases in the world. The treatment of leishmaniasis through the traditionally used drugs presents high cost, and these are not always effective due to the emergence of resistance and its high toxicity, as well as the inefficacy in immunosuppressed individuals or that present secondary infections in the wounds. Recently, larval therapy, application of live larvae of dipterans on necrotic wounds to aid in their debridement, disinfection and / or healing, has been raised as a possible instrument for the treatment of wounds caused by *Leishmania*. For the present study, the *Chrysomya megacephala* and *Cochliomyia macellaria* dipteran species were selected, considering the ease of obtaining specimens throughout the Brazilian territory, its easy maintenance in the laboratory and its necrophagic behavior. Likewise, the protozoan species *Leishmania amazonensis* was selected due to its importance among the main causes of cutaneous leishmaniasis in Brazil. The *in vitro* effect of different concentrations of larval excretions of *C. megacephala* and *C. macellaria* was observed in the promastigote form of *Leishmania amazonensis*. The study was done in triplicate, with 96 wells plates containing 170µL of promastigotes in RPMI 1640, with three different treatments (1) 30µL of ES, (2) 15µL of ES + 15µL de sterile saline, (3) 7,5µL of ES + 22,5 µL of sterile saline and control groups (Ctrl -) 30µL of sterile saline and (Ctrl +) 10µL of Glucantime® (300µg/µL) + 20µL of sterile saline. Countings were made in Neubauer chamber at times 4h, 24h and 48h after ES were added to the medium. In contrast to the control group (cont -), it was proved that the treatments (1) for *C. macellaria*, and (1) and (2) for *C. megacephala* significantly inhibited the mean number of promastigotes in the medium ($p < 0.05$), also presenting statistically equivalent results to Glucantime® treatment (Ctrl+). There was no statistical difference between the species in any of the treatments. Finally, we observed a dose-dependent effect of ES larvae against promastigote form of the parasite.

KEYWORDS: Leishmaniasis; alternative treatment; maggot therapy; larval therapy; blowfly.

5.1 INTRODUÇÃO

As mais de 20 espécies conhecidas para o gênero *Leishmania* diferem entre si quanto às suas manifestações clínicas no organismo do hospedeiro vertebrado, sendo que o destino final do parasito no corpo do hospedeiro determina sua gravidade. A leishmaniose pode se apresentar no ser humano nas formas cutânea, mucocutânea e visceral, ocupando o 9º lugar do *ranking* de doenças mais infecciosas do mundo (Hotez et al 2004), sendo endêmica em mais de 90 países, com mais de 350 milhões de pessoas vivendo sob risco (Desjeux 2004). A incidência estimada é de dois milhões de casos novos por ano, sendo meio milhão de casos de leishmaniose visceral e 1,5 milhões de leishmaniose cutânea (Desjeux 2004). Em 2014, 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorreram no Afeganistão, Algéria, Brasil, Colômbia, Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e Síria (OMS 2014). São várias as espécies responsáveis por essas manifestações clínicas, sendo que as mais comuns no território brasileiro são: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania guyanensis* (Neves et al 2011).

O tratamento da leishmaniose através dos medicamentos tradicionalmente usados apresenta alto custo, sendo que estes nem sempre são efetivos devido ao surgimento de resistência e à sua alta toxicidade, além da ineficácia em indivíduos imunossuprimidos ou que apresentem infecções secundárias nas feridas (Ritmeijer et al 2006). Dessa forma, é necessária a busca por tratamentos que sejam eficientes, menos tóxicos e que não induzam resistência nos pacientes (Cruz-Saavedra et al 2016).

A terapia larval, aplicação de larvas de dípteros vivas em feridas necróticas para auxiliar em seu desbridamento (limpeza), desinfecção e/ou cicatrização (Chambers et al 2003), é indicada para o tratamento de feridas infectadas ou não, mas de difícil cicatrização, como osteomielite, abscessos, queimaduras, feridas de pacientes diabéticos, úlceras de pressão, lesões traumáticas, tumores e gangrenas até então intratáveis (Martini & Sherman 2003). As larvas atuam na cicatrização da ferida removendo o tecido morto através da secreção de suas proteases e DNAses (Hobson 1931; Brown et al 2012), além da atividade bactericida com a liberação de peptídeos antimicrobianos, dissolução de biofilme bacteriano (Thomas et al 1999; Bexfield et al 2004) e produção de alantóides e ureia, aumentando o pH da ferida e minimizando o estabelecimento de bactérias (Robinson & Baker 1939).

Recentemente, a terapia larval tem sido levantada como uma possível alternativa contra a leishmaniose, isto é, com alguns relatos na literatura do uso de diferentes espécies de larvas de dípteros, e de seus produtos, para o tratamento de lesões cutâneas causadas pelos parasitos (Arrivillaga et al 2008; Polat et al 2012; Cruz-Saavedra et al 2016; Sanei-Dehkordi et al 2016). As espécies que mais têm sido reconhecidas para este fim são as pertencentes à família Calliphoridae (Diptera), sendo que *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) e *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) foram selecionadas para o presente estudo tendo em vista a facilidade de obtenção de exemplares. Ambas têm ampla distribuição pelo território brasileiro, são de fácil manutenção em laboratório e apresentam comportamento necrofágico (Estrada et al 2009).

Desse modo, no presente estudo, foi avaliado o efeito *in vitro* das exosecreções larvais de *C. megacephala* e *C. macellaria* contra a forma promastigota de *Leishmania amazonensis*.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Criação das moscas

Foram mantidas no laboratório de entomologia colônias de espécies de moscas varejeiras (Diptera: Calliphoridae). Tais colônias foram estabelecidas a partir de coletas em ambiente natural utilizando-se armadilhas apropriadas (Moretti et al 2009), contendo como isca fígado bovino cru e víscera de frango, expostas por 24 horas, sendo posteriormente removidas e levadas para o laboratório para triagem e identificação do material. Os indivíduos coletados foram anestesiados por aproximadamente 90 segundos, por meio de baixas temperaturas (-20°C) para proceder às identificações com o uso de chave taxonômica (Grella & Thyssen 2011).

Os espécimes selecionados para este estudo foram depositados, separados por espécie, em gaiolas plásticas transparentes (30 x 30 x 50 cm), com aberturas laterais revestidas por telas de nylon e alimentadas com dietas à base de açúcar e proteína, constituídas de solução açucarada e fígado bovino cru, mantidas sob condições controladas de temperatura (27±1°C), fotoperíodo (12:12h) e umidade relativa (70±10%). Para a obtenção de ovos, foram colocados no interior da gaiola 15 gramas de carne bovina moída crua sobre uma placa de Petri e, com auxílio de um pincel fino, a postura retirada do substrato foi dividida em dois grupos, sendo um deles depositado em dieta estéril (Tachibana & Numata 2001) e outro em ágar sangue, para dar início ao processo de preparo para uso terapêutico.

Coleta das exosecreções larvais

As larvas alimentadas em dieta estéril e ágar sangue passaram por lavagens sequenciais em água miliq estéril, e então foram dispostas em microtubos de 1,5mL, na proporção de 25 larvas para 400 μ L de soro fisiológico estéril. Os microtubos foram transferidos para banho-maria a 37°C por 1h no escuro para que o estresse estimulasse a maior liberação de exosecreções. O líquido restante nos frascos foi centrifugado a 8000 xg por 15min a 4°C, para que possíveis resíduos corporais precipitassem e as proteínas continuassem dissolvidas na solução aquosa. Após a centrifugação, o conteúdo dos tubos foi esterilizado usando filtros bacterianos (0,22 μ m) e usados imediatamente. Antes da avaliação da ação das ES sobre as formas promastigotas, 2 μ L de cada microtubo foram transferidos ao NanoDrop™ (2000- Thermo Fisher Scientific) para quantificação de proteínas totais, de forma a definir e padronizar qual a melhor dieta para criação e o estágio larval a serem utilizados para a obtenção de exosecreções funcionais.

Obtenção dos parasitos

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP (Protocolo nº 4290-1, constante no ANEXO). Os animais, fornecidos pelo Centro Multi-Disciplinar de Bioterismo (CEMIB/UNICAMP) sob condição SFP (Specific Patogen Free), foram mantidos sob as mesmas condições no Biotério do Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia (UNICAMP).

Amastigotas de *Leishmania amazonensis* foram obtidos de lesões cutâneas de camundongos isogênicos Balb/C (linhagem susceptível à infecção), onde são mantidos, tendo sido infectados anterior e subcutaneamente no coxim plantar de uma das patas traseiras com 2×10^7 formas promastigotas (Giorgio et al 1998). Após serem retirados das lesões dos camundongos, através de raspagem com bisturi estéril em solução salina, os amastigotas foram contados em câmara de Neubauer e transferidos para meio RPMI 1640 a 26°C, evoluindo para promastigotas dentro de poucos dias.

Cronograma de criação das moscas para desafio contra as formas promastigotas

A obtenção de ES larvais foi organizada de acordo com a disponibilidade de formas promastigotas para os distintos testes experimentais (Tabela 3).

Tabela 3: Cronograma de manutenção de colônias de *C. megacephala* e *C. macellaria* e cultura de promastigotas de *L. amazonensis*.

	Segunda	Terça	Quarta	Quinta	Sexta
Semana 1	Obtenção de ovos	Larvas em L1	Larvas em L2		Larvas em L3
Semana 2	Pupa				Emergência de moscas adultas
Semana 3	Manutenção das gaiolas de mosca			Manutenção das gaiolas de mosca	
Semana 4	Obtenção de promastigotas	Autoclavagem de material para desinfecção	Estímulo de postura às moscas	Elaboração de placas para controle de desinfecção	Adição de RPMI aos promastigotas
	Manutenção das gaiolas de mosca			Manutenção das gaiolas de mosca	Elaboração e refrigeração de dieta estéril
Semana 5	Adição de RPMI aos promastigotas	Estímulo de postura às moscas		Coleta e desinfecção de ovos	Análise do controle de desinfecção
	Manutenção das gaiolas de mosca			Coleta de ovos para criação	Adição de RPMI aos promastigotas
				Controle da desinfecção	
				Disposição de ovos em dieta estéril	
				Manutenção das gaiolas de mosca	
Semana 6	Obtenção de larvas em L3 e suas ES	Contagem 24h de experimento		Contagem 48h de experimento	Análise dos resultados
	Início do experimento			Manutenção das gaiolas de mosca	
	Refrigeração a -80°C de ES excedentes				
	Manutenção das gaiolas de mosca				

Elaboração de curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis* em RPMI com adição de exosecreções larvais

A contagem de promastigotas nos poços da placa de Elisa foi determinada com a avaliação, em triplicata, de seu crescimento nas concentrações de 1×10^5 , $2,5 \times 10^5$ e 5×10^5 de parasitos/mL, através da contagem em câmara de Neubauer a cada 24h, por três dias. A concentração de parasitos escolhida foi de 1×10^5 parasitos/mL.

A avaliação do efeito de diferentes concentrações de ES larvais de *C. megacephala* e *C. macellaria* foi feita em triplicata, em poços contendo 170µL de promastigotas em RPMI 1640, com três diferentes tratamentos (1) 30µL de ES, (2) 15µL de ES + 15µL de salina estéril, (3) 7,5µL de ES + 22,5 µL de salina estéril e os grupos controle (Ctrl -) 30µL de salina estéril e (Ctrl +) 10µL de Glucantime® (300µg/µL) + 20µL de salina estéril. As contagens foram feitas em câmara de Neubauer nos tempos 4h, 24h e 48h, a contar a partir do momento em que as ES foram adicionadas ao meio.

Análise dos dados

Análise de variância (ANOVA) de um fator, seguida por teste-t, foi feita para medir possíveis diferenças entre diferentes concentrações de ES das duas espécies de larvas. Um nível global de significância de 5% foi considerado em todas as análises. Todas as análises foram feitas usando o pacote estatístico SAS System para Windows statistical software version 6.12 (SAS Inc., 2006).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação de proteínas totais nas exosecreções larvais extraídas de *Cochliomyia macellaria* e *Chrysomya megacephala* foi feita com comparação das exosecreções de larvas de três estádios criadas em dieta (Tachibana & Numata 2001) e ágar sangue (Figura 18). Não houve diferença estatística intraespecífica entre larvas de segundo e terceiro estádios e entre dietas, para ambas as espécies ($p > 0,05$). Desta forma, para o presente estudo, devido à maior facilidade de manipulação e garantia de homogeneidade, foram utilizadas exosecreções extraídas de larvas de terceiro estágio criadas em dieta artificial para ambas as espécies de mosca.

O efeito das ES de *C. macellaria* e *C. megacephala* sobre promastigotas de *L. amazonensis in vitro* estão representados nas figuras 19 e 20. Em comparação ao grupo controle (Ctrl -), foi provado que os tratamentos (1), para *C. macellaria*, e (1) e (2), para *C. megacephala*, inibiram significativamente o desenvolvimento de promastigotas após 48h de observação ($p < 0,05$) (Figura 21). Os mesmos tratamentos, (1) para *C. macellaria*, e (1) e (2) para *C. megacephala*, apresentaram resultados estatisticamente equivalentes ao tratamento com Glucantime® (Ctrl +). Não houve diferença estatística entre as espécies, em nenhum dos tratamentos.

O tratamento (3), com a menor quantidade de ES, não apresentou diferença estatística em relação ao (Ctrl -), para ambas as espécies avaliadas. Da mesma forma, a redução do número de parasitos foi maior quanto maior a concentração de ES, sugerindo um efeito leishmaniostático dose-dependente das ES larvais.

A análise do efeito das exosecreções de *C. macellaria* e *C. megacephala* sobre promastigotas de *L. amazonensis* é ainda inédita na literatura. Polat et al (2012) analisaram o efeito das exosecreções de *L. sericata* sob as formas promastigotas e amastigotas de

Leishmania tropica, *in vitro* e *in vivo*, provando que estas foram efetivas em ambos os tratamentos. Sanei-Dehkordi et al (2016) usaram as exosecreções larvais de *L. sericata* e *Calliphora vicina in vitro*, sob formas amastigotas de *Leishmania major*, verificando que as secreções de *L. sericata* são estatisticamente mais efetivas do que as de *C. vicina* contra *L. major*.

Os resultados do presente estudo confirmam a ação das exosecreções larvais de ambas as espécies testadas em promastigotas *in vitro*, possibilitando sua análise em trabalhos futuros também *in vivo* e sobre a forma amastigota do parasito, que já se mostraram eficazes na literatura quando utilizadas outras espécies de larvas. Arrivillaga et al (2008) encontraram uma maior taxa de cicatrização em feridas em hamsters causadas por *L. amazonensis* após 12h de aplicação de larvas de *L. sericata*, sem reincidência de ferida após três meses de constante avaliação das cobaias.

Embora seja recente a utilização de exosecreções larvais de dípteros sobre as distintas formas evolutivas de diferentes espécies de *Leishmania*, tem se mostrado bastante promissora nos estudos já conduzidos neste campo. A análise dos componentes destas exosecreções pode ser um caminho a ser tomado para a descoberta de novos medicamentos para o tratamento da leishmaniose cutânea, quando a aplicação de larvas sobre as feridas não for possível.

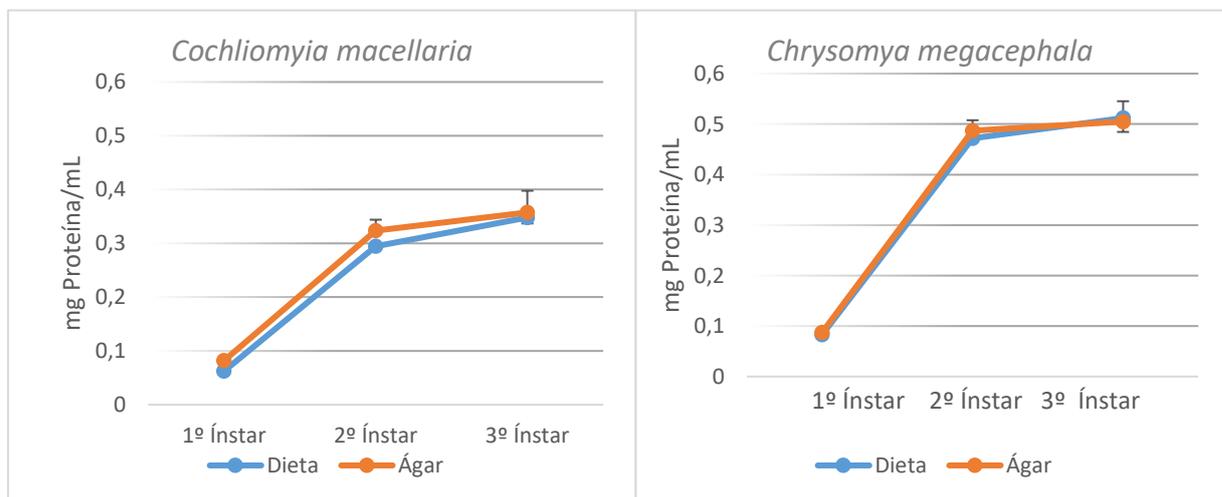


Figura 18: Quantificação de proteínas totais presentes nas exosecreções de *Cochliomyia macellaria* e *Chrysomya megacephala* em relação ao tipo de dieta e instar larval

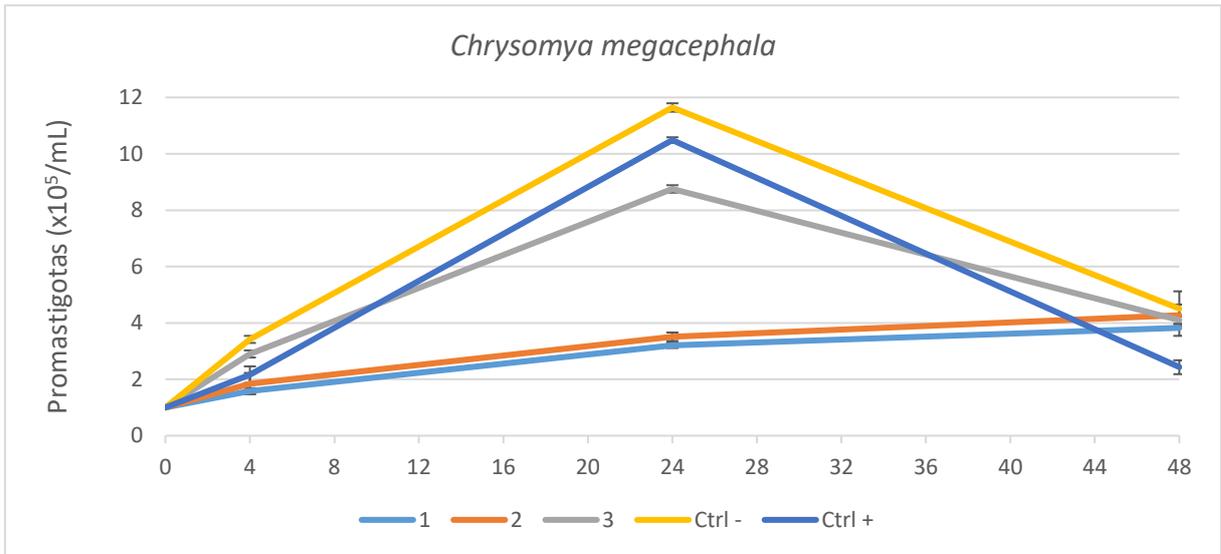


Figura 19: Curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis* com adição de ES de *C. megacephala*

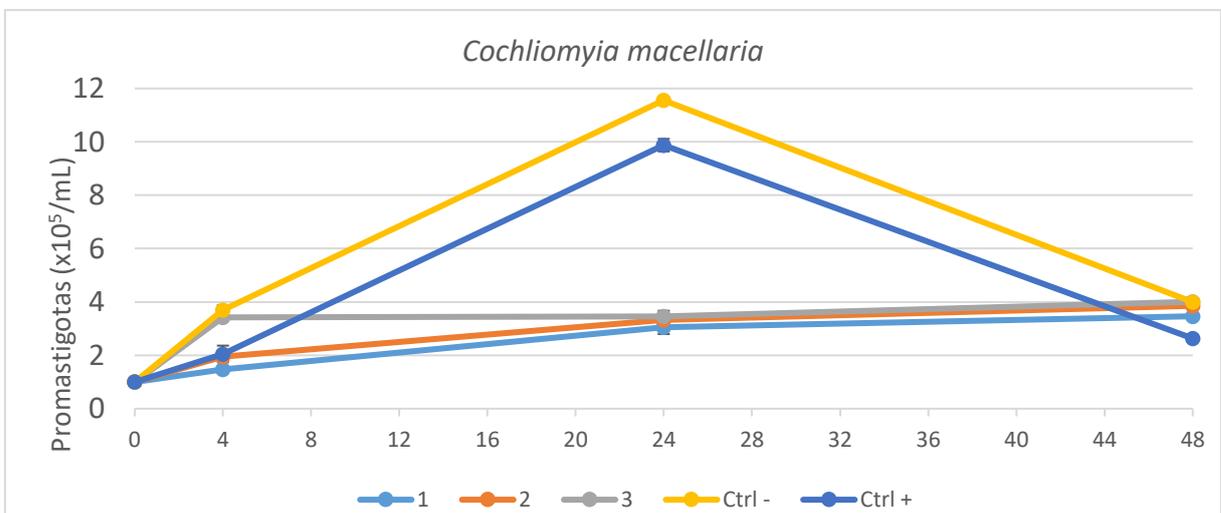


Figura 20: Curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis* com adição de ES de *C. megacephala*

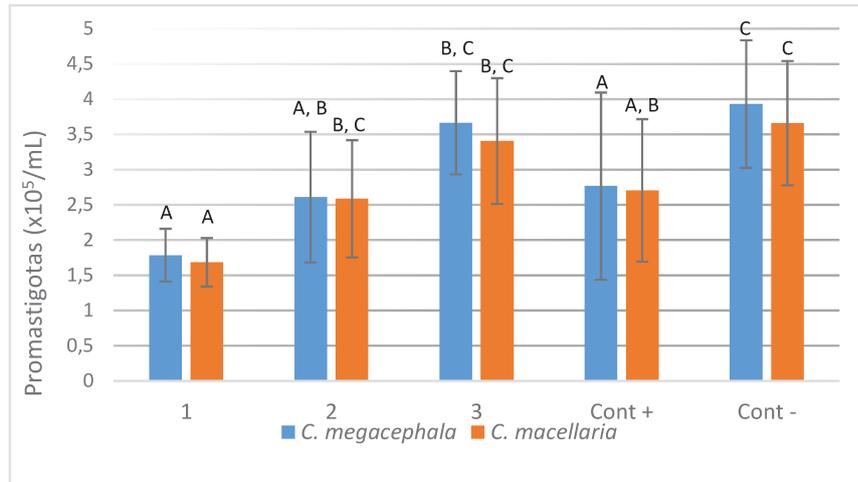


Figura 21: Contagem média de promastigotas de *Leishmania amazonensis* após 48h contra diferentes concentrações de exosecreções de *C. megacephala* e *C. macellaria*

5.4 REFERÊNCIAS

- Arrivillaga J, Rodríguez J, Oviedo M (2008) Evaluación preliminar en un modelo animal de la terapia con larvas de *Lucilia sericata* para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea. *Biomédica*, 28(2): 305–310
- Bexfield A, Nigam Y, Thomas S, Ratcliffe NA (2004) Detection and partial characterisation of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbes and Infection*, 6(14): 1297–1304
- Brown A, Horobin A, Blount DG, Hill PJ, English J, Rich A, Williams PM, Pritchard DI (2012) Blow fly *Lucilia sericata* nuclease digests DNA associated with wound slough/escharand with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Medical and Veterinary Entomology*, 26(4): 432–439
- Chambers L, Woodrow S, Brown AP, Harris PD, Phillips D, Hall M, Church JC, Pritchard DI (2003) Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds. *British Journal of Dermatology*, 148: 14–23
- Cruz-Saavedra A, Lissa F et al (2016) The effect of *Lucilia sericata* and *Sarconesiopsis magellanica*-derived larval therapy on *Leishmania panamensis*. *Acta tropica*, 164: 280–289
- Desjeux P. (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*,. 27: 305–318
- 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 Entomology*, 38: 203–207
- Giorgio S, Linares E, Ischiropoulos H, Von Zuben, FJ, Yamada A, Augusto O (1998) In vivo formation of electron paramagnetic resonance-detectable nitric oxide and nitrotyrosine is not impaired during murine leishmaniasis. *Infection and Immunity*, 66: 807–814

- Grella MD & Thyssen PJ (2011) Chave taxonômica interativa para espécies de dípteros califorídeos (Infraordem: Muscomorpha) do Brasil. <http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/calliphoridae_brazil>
- Hobson RP (1931) On an enzyme from blow-fly larvae (*Lucilia sericata*) which digests collagen in alkaline solution. *Biochemical Journal*, 25: 1458–1463
- Hotez PJ, Remme JH, Buss P, George G, Morel C, Breman JG (2004) Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. *Clinical Infectious Diseases*, 38: 871–878
- Martini RK & Sherman RA (2003) Terapia de Desbridamento com Larvas. *Jornal brasileiro de medicina*, 85(4): 82–85
- Moretti TC, Thyssen PJ, Solis DR (2009). Breeding of the Scuttle Fly *Megaselia scalaris* in a fish Carcass and Implications for the use in Forensic Entomology (Diptera: Phoridae). *Entomologia Generalis*, 31: 349–353
- Neves DP, Melo AL, Linardi PM (2011) *Parasitologia humana*. 12. ed. Rio de Janeiro: Atheneu
- Status of endemicity and disease burden worldwide (2014) Organização Mundial da Saúde.
- Polat E, Cakan H, Aslan M, Sirekbasan S, Kutlubay Z, Ipek T, Ozbilgin A (2012) Detection of anti-leishmanial effect of the *Lucilia sericata* larval secretions *in vitro* and *in vivo* on *Leishmania tropica*: first work. *Experimental parasitology*, 132(2): 129–134
- Ritmeijer K, Dejenie A, Assefa Y, Hundie TB, Mesure J, Boots G, den Boer M, Davidson RN (2006) A comparison of miltefosine and sodium stibogluconate for treatment of visceral leishmaniasis in an Ethiopian population with high prevalence of HIV infection. *Clinical Infectious Diseases*, 43(3):357–64
- Robinson W & Baker FL (1939) The enzyme urease and occurrence of ammonia in maggot infected wounds. *Journal of Parasitology*, 25(2): 149–155
- Sanei-Dehkordi A, Khamesipour A, Akbarzadeh K, Akhavan AA, Mohammadi AM, Mohammadi Y, Rassi Y, Oshaghi MA, Alebrahim Z, Eskandari SE, Rafinejad J (2016) Anti *Leishmania* activity of *Lucilia sericata* and *Calliphora vicina* maggots in laboratory models. *Experimental parasitology*, 170: 59–65

Tachibana SI & Numata H (2001) An artificial diet for blow fly larvae, *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae). *Applied Entomology and Zoology*, 36: 521–523

Thomas S, Andrews AM, Hay NP, Bourgoise S (1999) The anti-microbial activity of maggot secretions: results of a preliminary study. *Journal of Tissue Viability*, 9(4): 127–132

6 Considerações Finais

1. Aproximadamente 78%, dentre os 1.226 participantes que responderam ao questionário *online*, tem boa aceitação em relação à terapia larval, sem distinção entre gêneros, de distintos grupos religiosos, faixas etárias, em todos os níveis de escolaridade e socioeconômicos, independente da área em que atuam e provenientes de todas as regiões geopolíticas brasileiras. Destes, ainda, 94% manifestaram que o infográfico contribuiu para aumentar seus conhecimentos em terapia larval, contra apenas 6% cujo conhecimento não se alterou. Apesar da grande aceitabilidade da terapia, ainda se faz necessária sua publicização, de modo que seja possível dizimar o preconceito e a fobia existentes em relação aos insetos em geral, para que pessoas com feridas candidatas à TL possam optar pela mesma, quando buscarem um tratamento que possa lhes garantir maior bem estar e/ou possibilidade de cura.
2. A dieta II, à base de gérmen de trigo, é a que garante maior custo-benefício para a criação visando o transporte de larvas desinfetadas de *C. macellaria* e *C. megacephala* para fins terapêuticos. Os imaturos, mesmo com uma massa menor quando comparados ao controle, não perdem a eficácia para o tratamento de lesões, tanto no que diz respeito ao seu comportamento de alimentação quanto à produção de exosecreções.
3. O efeito leishmanioestático das exosecreções de *C. macellaria* e *C. megacephala in vitro* contra promastigotas de *L. amazonensis* provou-se dose-dependente, sendo que a concentração de 30 μ L de exosecreções larvais em 170 μ L de parasitos em meio RPMI mostrou-se efetiva para ambas as espécies, equivalendo-se ao grupo controle (Ctrl +) com Glucantime®. A análise dos componentes destas exosecreções pode ser um caminho a ser tomado para a descoberta de novos medicamentos para o tratamento da leishmaniose cutânea, quando a aplicação de larvas sobre as feridas não for possível.

7 Referências Bibliográficas

- Adkisson PL, Vanderzant ES, Bull DL, Allison WE (1960) A wheat germ medium for rearing the pink bollworm. *Journal of Economic Entomology*, 53: 759–62
- Anderson I (2006) Debridement methods in wound care. *Nursing Standard*, 20(24): 65–66
- Arrivillaga J, Rodríguez J, Oviedo M (2008) Evaluación preliminar en un modelo animal de la terapia con larvas de *Lucilia sericata* para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea. *Biomédica*, 28(2): 305–310
- Ayres DC, Marcucci MC, Giorgio S (2007) Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(2): 215–220
- Baer WS (1931) The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larva of the blow fly). *Journal of Bone and Joint Surgery American*, 13: 438–475
- Beitz JM (2005) Wound debridement: therapeutic options and care considerations. *Nursing Clinics of North America*, 40(2): 233–249
- Beitz JM & Goldberg E (2005) The lived experience of having a chronic wound: a phenomenologic study. *Medsurg Nursing*, 14(1): 51–62
- Bexfield A, Nigam Y, Thomas S, Ratcliffe NA (2004) Detection and partial characterisation of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbes and Infection*, 6(14): 1297–1304
- Brasil. Lei nº 12.527/11, 31 de Dezembro de 2015.
- Brown A, Horobin A, Blount DG, Hill PJ, English J, Rich A, Williams PM, Pritchard DI (2012) Blow fly *Lucilia sericata* nuclease digests DNA associated with wound slough/eschar and with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Medical and Veterinary Entomology*, 26(4): 432–439
- Burza S, Sinha PK, Mahajan R, Lima MA, Mitra G, Verma N, Balasegarem M, Das P (2014) Five-year field results and long-term effectiveness of 20 mg/kg liposomal amphotericin B (Ambisome) for visceral leishmaniasis in Bihar, India. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(1): e2603

- Chambers L, Woodrow S, Brown AP, Harris PD, Phillips D, Hall M, Church JC, Pritchard DI (2003) Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds. *British Journal of Dermatology*, 148: 14–23
- Creek RD, Vasaitis V, Schumaier G (1961) The improvement of the nutritive value of raw wheat germ meal by autoclaving. *Poultry Science*, 40: 822–824
- Cruz-Saavedra L, Díaz-Roa A, Gaona MA, Cruz ML, Ayala M, Cortés-Vecino JA, Patarroyo MA, Bello FJ (2016) The effect of *Lucilia sericata*-and *Sarconesiopsis magellanica*-derived larval therapy on *Leishmania panamensis*. *Acta Tropica*, 164: 280–289
- Desjeux P (2001) The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95: 239–243
- Desjeux P (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 27: 305–318
- 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 Entomology*, 38: 203–207
- Fletcher F & Haub JG (1933) Digestion in blowfly larvae, *Phormia regina* Meigen, used in the treatment of osteomyelitis. *Ohio Journal of Science*, 33(2): 101–109
- Franco LC (2010) Avaliação da aceitabilidade da terapia larval no tratamento de feridas. Dissertação de mestrado, UFG, Goiânia, 112pp
- Gingrich RE (1964) Nutritional studies on screw-worm larvae with chemically defined media. *Annals of the Entomological Society of America*, 57: 351–360
- Gingrich RE, Graham AJ, Hightower BG (1971) Media containing liquified nutrients for mass-rearing larvae of the screw-worm. *Journal of Economic Entomology*, 64: 678–683
- Giorgio S, Linares E, Ischiropoulos H, Von Zuben, FJ, Yamada A, Augusto O (1998) In vivo formation of electron paramagnetic resonance-detectable nitric oxide and nitrotyrosine is not impaired during murine leishmaniasis. *Infection and Immunity*, 66: 807–814

- Grella MD & Thyssen PJ (2011) Chave taxonômica interativa para espécies de dípteros califorídeos (Infraordem: Muscomorpha) do Brasil. <http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/calliphoridae_brazil>
- Guimarães JH, Prado AP, Buralli GM (1979) Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera, Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 23(4): 245–255
- Haldar AK, Sen P, Roy S (2011) Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. *Molecular biology international*
- Hebda PA & Lo C (2001) Biochemistry of wound healing: the effects of active ingredients of standard debriding agents – papain and collagenase – on digestion of native and denatured collagenous substrates, fibrin and elastin. *Wounds*, 13(5): 190–194
- Hebda PA, Flynn KJ, Dohar JE (1998) Evaluation of efficacy of enzymatic debriding agents for removal of necrotic tissue and promotion of healing in porcine skin wounds. *Wounds*, 10(3): 83–96
- Hobson RP (1931) On an enzyme from blow-fly larvae (*Lucilia sericata*) which digests collagen in alkaline solution. *Biochemical Journal*, 25: 1458–1463
- Hobson RP (1935) On a fat-soluble growth factor required by blowfly larvae. II. Identity of the growth factor with cholesterol. *Biochemical Journal*, 2(9): 2023–2026
- Holm J, Andren B, Grafford K (1990) Pain control in the surgical debridement of leg ulcers by the use of a topical lidocaine–prilocaine cream, EMLA. *Acta Dermato-Venereologica*, 70:132–136
- Hopkins S (2001) Psychological aspects of wound healing. *Nursing Times*, 97 (48): 57–60
- Hotez PJ, Remme JH, Buss P, George G, Morel C, Breman JG (2004) Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. *Clinical infectious diseases*, 38(6): 871–878
- Jones J, Barr W, Robinson J, Carlisle C (2006) Depression in patients with chronic venous ulceration. *Tissue viability supplement*, 15(11): 17–22

- Kammerlander G, Andriessen A, Asmussen P, Brunner U, Eberlein T (2005) Role of the wet-to-dry phase of cleansing in preparing the chronic wound bed for dressing application. *Journal of Wound Care*, 14: 349–352
- Kirshen C, Woo K, Ayello EA, Sibbald RG (2006) Debridement: a vital component of wound bed preparation. *Advances of skin & wound care*, 19(9): 506–517
- Krasner D (1998) Painful venous ulcers: themes and stories about living with the pain and suffering. *Journal of Wound Ostomy & Continence Nursing*, 25(3): 158–168
- Konig M, Vanscheidt W, Augustin M, Kapp H (2005) Enzymatic versus autolytic debridement of chronic leg ulcers: a prospective randomised trial. *Journal of Wound Care*, 14: 320–323
- Kunimoto B, Cooling M, Gulliver W, Houghton P, Orsted H, Sibbald RG (2001) Best practices for the prevention and treatment of venous leg ulcers. *Ostomy Wound Management*, 47 (2): 34–51
- Leal TTS, Prado AP, Antunes AJ (1982) Rearing the larvae of the blowfly *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae) on oligidic diets. *Revista Brasileira de Zoologia* 1: 41–44
- Lei de Acesso à Informação, INSS (Instituto Nacional do Seguro Social) e Ministério da Previdência Social
- Lenhard RE (1973) William Stevenson Baer. Baltimore, MD: Schneidereith & Sons
- Linhares AX & Thyssen PJ (2007) Mííases de importância médica: moscas e entomologia forense. In: DE CARLI, G.A. (Org) *Parasitologia clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas*. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 709–730
- Machado KC (2004) O lazer e a recreação do ostomizado jovem: estudo exploratório em um ambulatório da cidade de São Paulo (Monografia). Taubaté. Universidade Taubaté
- Maheshwari VJ & Naidu SG (2010) Oral myiasis caused by *chrysomya bezziana*: A case report. *People's Journal of Scientific Research*, 3(2): 25–26
- Manring MM & Calhoun JH (2011) Biographical Sketch: William S. Baer (1872–1931). *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 469(4): 917–919

- Marcondes CB (2006) Terapia larval: de lesões de pele causadas por diabetes e outras doenças. Editora da UFSC, Santa Catarina, 89p
- Martini RK & Sherman RA (2003) Terapia de Desbridamento com Larvas. *Jornal Brasileiro de Medicina*, 85(4): 82–85
- McCollum EV & Davis M (1915) The influence of certain vegetable fats on growth. *Journal of Biological Chemistry*, 21(1): 179–182
- Mendonça PM, Queiroz MM, D’Almeida JM (2009) Rearing *Chrysomya megacephala* on artificial diets composed of varying concentrations of albumin. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52: 421–426
- Michelbacher AE, Hoskins WM, Herms WB (1932) Nutrition of flesh fly larvae, *Lucilia sericata*. *Journal of Experimental Zoology*, 64: 109–128
- Mickelsen O & Yang MG (1966) Naturally occurring toxicants in foods. *Nutrition reviews*, 37(10): 305–312
- 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). *Entomology Generalis*, 31: 349–353
- Mumcuoglu KY (2001) Clinical applications for maggots in wound care. *American Journal of Clinical Dermatology*, 2: 219–227
- Mumcuoglu KY, Miller J, Mumcuoglu M, Friger M, Tarshis M (2001) Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology*, 38(2): 161–166
- Nassu MP (2014) Utilização de *Cochliomyia macellaria* F. (Diptera: Calliphoridae) e avaliação de sua densidade larval para uso terapêutico na recuperação de lesões tegumentares. UNICAMP: Dissertação de mestrado. 69p
- Nassu MP & Thyssen PJ (2015) Evaluation of larval density *Cochliomyia macellaria* F. (Diptera: Calliphoridae) for therapeutic use in the recovery of tegumentar injuries. *Parasitology Research*, 114: 3255–3260
- Neves DP, Melo AL, Linardi PM (2011) *Parasitologia humana*. 12. ed. Rio de Janeiro: Atheneu

- Nitsche MJT (2010) Avaliação da recuperação de lesões cutâneas por meio de terapia larval utilizando como modelos ratos *Wistar*. UNESP: Tese de Doutorado. 53p
- Organização Mundial da Saúde (2014) Status of endemicity and disease burden worldwide
- Parra JR (1990) Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. Piracicaba, ESALQ, 125p
- Petherick ES, O'Meara S, Spilsbury K, Iglesias CP, Nelson EA, Torgerson DJ (2006) Patient acceptability of larval therapy for leg ulcer treatment: a randomised survey to inform the sample size calculation of a randomised trial. *BMC medical research methodology*, 6(1): 43–47
- Phillipson JD & Wright CW (1991) Medicinal plants in tropical medicine: medicinal plants against protozoal diseases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and hygiene*, 85: 18–21
- Pinheiro MARQ, Ferraz JB, Junior MAA, Moura AD, Costa MESM, Costa FJMD, Neto VFA, Neto RM, Gama RA (2013) Use of maggot therapy for treating a diabetic foot ulcer colonized by multidrug resistant bacteria in Brazil. *Indian Journal of Medical Research*, 141: 340–342
- Polat E, Cakan H, Aslan M, Sirekbasan S, Kutlubay Z, Ipek T, Ozbilgin A (2012) Detection of anti-leishmanial effect of the *Lucilia sericata* larval secretions *in vitro* and *in vivo* on *Leishmania tropica*: first work. *Experimental parasitology*, 132(2): 129–134
- Polonio T & Efferth T (2008) Leishmaniasis: drug resistance and natural products. *International Journal of Molecular Medicine*, 22(3): 277–286
- Ritmeijer K, Dejenie A, Assefa Y, Hundie TB, Mesure J, Boots G, den Boer M, Davidson RN (2006) A comparison of miltefosine and sodium stibogluconate for treatment of visceral leishmaniasis in an Ethiopian population with high prevalence of HIV infection. *Clinical Infectious Diseases*, 43(3): 357–364
- Rueda LC, Ortega LG, Segura NA, Acero VM, Bello F (2010) *Lucilia sericata* strain from Colombia: Experimental colonization, life tables and evaluation of two artificial diets of the blowfly *Lucilia sericata* (Meigen)(Diptera: Calliphoridae). *Biological research*, 43(2): 197–203

- Robinson W & Baker FL (1939) The enzyme urease and occurrence of ammonia in maggot infected wounds. *Journal of Parasitology*, 25(2): 149–155
- Salomé GM (2010) Processo de viver do portador com ferida crônica: atividades recreativas, sexuais, vida social e familiar. *Saúde Coletiva*, 7(46): 300–304
- Sanei-Dehkordi A, Khamesipour A, Akbarzadeh K, Akhavan AA, Mohammadi AM, Mohammadi Y, Rassi Y, Oshaghi MA, Alebrahim Z, Eskandari SE, Rafinejad J (2016) Anti Leishmania activity of *Lucilia sericata* and *Calliphora vicina* maggots in laboratory models. *Experimental parasitology*, 170: 59–65
- Sherman R, Hall MJ, Thomas S (2000) Medicinal maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions. *Annual Review of Entomology*, 45: 55–81
- Sherman RA (2014) Mechanisms of maggot-induced wound healing: what do we know, and where do we go from here?. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014: 592419
- Sherman R & Tran, JMT (1995) A simple, sterile food source for rearing the larvae of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Medical and Veterinary Entomology*, 9(4): 393–398
- Shorey HH & Hale RL (1965) Mass rearing of the larvae of nine noctuid species on a simple artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, 58: 522–524
- Singh P (1977) Artificial foods for the batfly *Mystacionobia zelandica* Holloway (Diptera, Calliphoridae). *New Zealand Journal of Zoology*, 4(3): 331–331
- Singh P (1983) A general purpose diet mixture for rearing insects. *Insect Sci Applic*, 4: 357–362
- Smith J (2002) Debridement of diabetic foot ulcers. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 4: CD003556
- Stechmiller J & Schultz G (2007) Bench science advances for chronic wound care. In: *Chronic Wound Care: A Clinical Source Book for Healthcare Professionals*. HMP Communications, Malvern, Pa, USA, 4th edition, pp. 67–73
- Stephoe A (2006) *Depression and physical illness*. Cambridge University Press
- Stewart MA (1934) The role of *Lucilia sericata* Meig. larvae in osteomyelitis wounds. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 28: 445–60

- Stoffolano JG (1974) Influence of diapause and diet on the development of the gonads and accessory reproductive glands of the black blowfly *Phormia regina* (Meigen). *Canadian Journal of Zoology*, 52: 981–988
- Svoboda JA, Kaplanis JN, Robbins WE, Thompson MJ (1975) Recent developments in insect steroid metabolism. *Annual review of entomology*, 20(1): 205–220
- Tachibana SI & Numata H (2001) An artificial diet for blow fly larvae, *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae). *Applied Entomology and Zoology*, 36: 521–523
- Tanyuksel M, Araz E, Dundar K, Uzun G, Gumus T, Alten B, Saylam F, Taylan-Ozkan A, Mumcuoglu KY (2005) Maggot debridement therapy in the treatment of chronic wounds in a military hospital setup in Turkey. *Dermatology*, 210(2): 115–118
- Thomas S, Andrews AM, Hay NP, Bourgoise S (1999) The anti-microbial activity of maggot secretions: results of a preliminary study. *Journal of Tissue Viability*, 9(4): 127–132
- Thyssen PJ, Nassu MP, Nitsche MJT, Leite DDS (2013) Sterilization of immature blowflies (Calliphoridae) for use in larval therapy. *Journal of Medicine and Medical Sciences*, 405–409
- Thyssen PJ, Nassu MP, Costella AM, Costella ML (2012) Record of oral myiasis by *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae): case evidencing negligence in the treatment of incapable. *Parasitology Research*, 111: 957–959
- Van Rijswijk L & Polansky M (1994) Predictors of time to healing deep pressure ulcers. *Ostomy/wound management*, 40(8): 40–42
- Vanaerschot M, Dumetz F, Roy S, Ponte-Sucre A, Arevalo J, Dujardin JC (2014) Treatment failure in leishmaniasis: drug-resistance or another (epi-) phenotype?. *Expert review of anti-infective therapy*, 12(8): 937–946
- Vanderzant ES (1963) Nutrition of the boll weevil larva. *Journal of Economic Entomology*, 56: 357–362
- Vanderzant ES (1974) Development, significance, and application of artificial diets for insects. *Annual Review of Entomology*, 19(1): 139–160
- Vowden KR & Vowden P (1999) Wound debridement, Part 1: Non-sharp techniques. *Journal of Wound Care*, 8: 237–240

- Waldbauer G (1968) The consumption and utilization of food by insects. *Advances in Insect Physiology*, 5: 229–288
- Wolf WJ & Cowan JC (1971) Soybeans as a food source. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2: 81–158
- Zhang B, Numata H, Mitsui H, Goto SG (2009) A simple, heat-sterilizable artificial diet excluding animal-derived ingredients for adult blowfly, *Lucilia sericata*. *Medical and Veterinary Entomology*, 23(4): 443–447
- Zumpt F (1965) *Myiasis in man and animals in the Old World*. London, Butterworth, 267p

8 Anexos

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estou sendo convidado a participar de um estudo* denominado “Terapia larval: divulgação, abordagens para criação de larvas de Calliphoridae (Insecta: Diptera) e avaliação *in vitro* da ação de suas exosecreções sob a forma promastigota de *Leishmania amazonensis*”, cujos objetivos e justificativas são: medir o grau de conhecimento da população sobre terapia larval e identificar em quais pontos existe uma maior necessidade de trabalho de esclarecimento e divulgação, elaborando um panfleto educativo sobre o tema.

A minha participação no referido estudo será no sentido de responder um questionário online com informações acerca do meu nível socioeconômico e grau de escolaridade, bem como meu conhecimento sobre a Terapia Larval e aceitação desse método caso tivesse uma ferida crônica em meu corpo.

Fui alertado de que, da pesquisa a se realizar, posso esperar alguns benefícios, tais como: a melhoria desta técnica no Brasil, devido à maior divulgação gerada após a análise dos resultados do questionário.

Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do estudo, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização. Assim, posso sentir algum desconforto após visualizar as imagens de feridas crônicas dispostas ao longo do questionário, bem como as imagens de larvas de moscas.

Para participar deste estudo não terei nenhum custo, nem receberei qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, tenho assegurado o direito a indenização. Terei o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estarei livre para participar ou recusar-me a participar. Poderei retirar meu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. Minha participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará em qualquer penalidade ou modificação na forma em que sou atendido (a). O pesquisador tratará minha identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados da pesquisa estarão à minha disposição quando finalizada. Meu nome ou o material que indique minha participação não será liberado sem a minha permissão, e não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar.

Os pesquisadores tratarão minha identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

A pesquisadora envolvida com o referido projeto é a aluna de mestrado Marina Ferrari Klemm de Aquino, e com ela poderei manter contato pelo telefone (19) 3521-6299. Seu endereço para contato é Rua Monteiro Lobato, 255 - Departamento de Biologia Animal (Antiga Parasitologia), Cidade Universitária - Campinas/SP, CEP: 13083-862. Para contato virtual, o e-mail da pesquisadora é marinaklemm@gmail.com.

É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas conseqüências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação. Ao passar para a próxima página do questionário, aceito minha participação no mesmo.

*Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), na Plataforma Brasil, em 13/04/2017, com o nº CAAE 66030416.0.0000.5404.

Comitê de Ética em Pesquisa

Título da Pesquisa: Terapia larval: divulgação, abordagens para criação de larvas de Calliphoridae (Insecta: Diptera) e avaliação *in vitro* da ação de suas exosecreções sob *Leishmania amazonenses*

Pesquisador Responsável: Marina Ferrari Klemm de Aquino

Área Temática: Equipamentos e dispositivos terapêuticos, novos ou não registrados no País;

Versão: 1

CAAE: 66030416.0.0000.5404

Submetido em: 14/03/2017

Instituição Proponente: Instituto de Biologia – UNICAMP

Situação da Versão do Projeto: APROVADO

Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável

Patrocinador Principal: Fund Coord de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Sup



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Terapia larval: divulgação, abordagens para criação de larvas de Galliphoridae (Insecta: Diptera) e avaliação in vitro da ação de suas exosecreções sob as formas amastigota e promastigota de Leishmania amazonensis, registrada com o nº 4290-1, sob a responsabilidade de Profa. Dra. Patrícia Jacqueline Thyssen e Marina Ferrari Klemm De Aquino, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em reunião de **1º de agosto de 2016**.

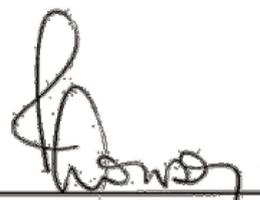
Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/08/2016-10/06/2017
Vigência da autorização para manipulação animal:	01/08/2016-10/06/2017
Espécie / linhagem / raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	18
Peso / Idade:	04 semanas / 20g
Sexo:	fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

Campinas, 1º de agosto de 2016.



Prof. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **TERAPIA LARVAL: DIVULGAÇÃO, ABORDAGENS PARA CRIAÇÃO DE LARVAS DE CALLIPHORIDAE (INSECTA: DIPTERA) E AVALIAÇÃO IN VITRO DA AÇÃO DE SUAS EXOSECREÇÕES SOB LEISHMANIA AMAZONENSIS**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 30 de Outubro de 2017

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Marina Ferrari Klemm de Aquino**
RG n.º 496850611

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Patricia Jacqueline Thyssen**
RG n.º 227710915