

EVALUACIÓN DE LA TERAPIA LARVAL DE *Sarconesiopsis magellanica*
(DIPTERA: CALLIPHORIDAE) EN UN BIOMODELO ANIMAL.

ANDREA DÍAZ ROA
BIÓLOGA

UNIVERSIDAD EL BOSQUE
BOGOTÁ DC, COLOMBIA
2013

EVALUACIÓN DE LA TERAPIA LARVAL DE *Sarconesiopsis magellanica*
(DIPTERA: CALLIPHORIDAE) EN UN BIOMODELO ANIMAL.

ANDREA DÍAZ ROA
BIÓLOGA

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
Magister en Ciencias Básicas Biomédicas

DIRECTOR:

Felio Jesús Bello García MSc., PhD.

CODIRECTOR:

Jesús Alfredo Cortés Vecino DMV., MSc., PhD.

GRUPO DE INVESTIGACIÓN:

Grupo de Investigación en Salud Pública

Universidad del Rosario

UNIVERSIDAD EL BOSQUE

BOGOTÁ DC, COLOMBIA

2013

NOTA DE SALVEDAD DE RESPONSABILIDAD INSTITUCIONAL

“La universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar estas líneas para dar mis más profundos agradecimientos a todos quienes colaboraron para que este trabajo fuera posible, en especial al Dr. Felio Bello, director de esta investigación quien al depositar su confianza en mí, me permitió hacer parte de su grupo de investigación para llevar a cabo esta tesis, gracias por su orientación, seguimiento, supervisión continua, por brindarme la oportunidad de poder trabajar con él y compartirme una parte de sus conocimientos y sobre todo por el apoyo a lo largo de estos años.

De igual forma, quiero agradecer a todos los que de alguna forma también hicieron parte de esta investigación con sus conocimientos, asesorías y apoyo incondicional, Alexandra Segura, María Antonia Gaona, Alejandro Ramírez, Jesús Cortes, Arturo Cortes, Milciades Ibañez.

Asimismo quiero darle las gracias a los docentes de la maestría por todo el conocimiento que compartieron, el tiempo que me dedicaron y sobre todo por la paciencia que me tuvieron para hacerme comprender el mundo de la biología molecular.

De igual a forma agradecer a la Universidad del Rosario a la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia y a la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) por el apoyo brindado para permitir la realización de esta investigación.

Esta investigación fue financiada por el “Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación ‘Francisco José de Caldas’ (COLCIENCIAS).

CONTENIDO

NOTA DE SALVEDAD DE RESPONSABILIDAD INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
RESUMEN.....	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN.....	15
2. MARCO TEÓRICO	17
2.1 Biocirugía	17
2.2 Mecanismo de acción de la Terapia larval	18
2.3 Estado del arte	22
2.4 Familia Calliphoridae	23
2.5 Aspectos taxonómicos de <i>S. magellanica</i>	26
2.6 <i>L. sericata</i> en terapia larval	26
2.7 Modelo de investigación Conejo - <i>Oryctolagus cuniculus</i>	27
2.8 Heridas.....	28
2.8.1 Tipos de Heridas.....	29
2.9 Cicatrización.....	30
2.10 Diabetes en heridas.....	32
2.11 Diabetes inducida por Alloxan®	33
3. OBJETIVOS.....	34
4. METODOLOGÍA.....	35
4.1 Captura de especímenes adultos y mantenimiento de colonias de <i>S. magellanica</i>	35
4.2 Colonia <i>L. sericata</i>	35
4.3 Animales de Experimentación.....	36

4.4 Inducción de Diabetes.	36
4.5 Elaboración de la herida.	37
4.6 Tratamientos en el modelo animal.....	37
4.7 Antibiograma.	38
4.8 Desinfección de huevos de las dos especies de moscas necrófagas.	38
4.9 Evaluación macroscópica de las lesiones.	39
4.10 Análisis dermohistopatológicos.....	40
4.11 Análisis microbiológico.....	40
4.12 Extracción de las ES de ambas especies de mosca.....	40
4.13 Cuantificación de las ES por BCA.	41
4.14 Estandarización de curvas de crecimiento.....	41
4.15 CMI por difusión en agar.....	41
4.16 Concentración mínima inhibitoria (CMI) por Turbidimetria.	42
4.17 Cinética bactericida de las ES.	42
4.18 Determinación de las UFC con la CMI.	43
4.19 Evaluación citotóxica de las ES en la línea celular de fibroblastos MRC5.....	43
4.20 Análisis estadístico.	44
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
5.1 Inducción de diabetes	45
5.2 Microbiológicos.....	46
5.3 Macroscópicos	48
5.4 Histopatológicos	52
5.5 Cuantificación de proteína por Acido bicinconinico (BCA).....	56
5.6 Estandarización de curvas de crecimiento.....	56
5.7 CMI por difusión en agar.....	56

5.8 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por Turbidimetría.	58
5.9 Cinética bactericida de las ES.	60
5.10 Determinación de las UFC con la CMI.	61
5.11 Determinación de la citotoxicidad en fibroblastos MRC5.	63
6. CONCLUSIONES	67
7. RECOMENDACIONES	69
BIBLIOGRAFÍA	70
ANEXOS	86
Participación en eventos	86
Publicaciones	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Bacterias presentes en heridas antes y después de aplicación de tratamiento larval (modificado de Jaklic <i>et al</i> 2008).	29
Figura 2. Fases de la cicatrización normal de heridas (modificado de Lobmann <i>et al.</i> , 2005).	31
Figura 3. Parámetros para medición de variables según las escala PUSH.	39
Figura 4. Hiperglicemia debida a la inducción de diabetes tipo I con Alloxan®. Los datos representan el valor promedio \pm desviación estándar (DS).	45
Figura 5. Histopatología del páncreas sano (A) y diabético (B), que presenta disminución de islotes de Langerhans y menor número de células beta al interior de los islotes.	46
Figura 6. Frotis microbiológico, se observan cocos Gram + y bacilos Gram -.	47
Figura 7. Superficie dorsal de las heridas de los conejos a los días 7, 9 y 23 antes y luego de la aplicación con los distintos tratamientos: S terapia larval con <i>Sarconesiopsis magellanica</i> , L terapia larval con <i>Lucilia sericata</i> , A antibiótico, N control negativo.	48
Figura 8. Porcentaje de contracción de las heridas por día. Los datos representan el valor promedio \pm DS.	49
Figura 9. Puntaje total de las escalas de evaluación de la cicatrización: A. PUSH, B. WOLLINA <i>ET AL.</i> 2002, C. DPI. Los datos representan el valor promedio \pm DS.	51

Figura 10. Número de células inflamatorias por tratamientos en diferentes tiempos de evaluación: A. heterófilo, B. histiocito, C. linfocito, D. células plasmáticas. Biopsia 1, 2 y 3 corresponden a los días 7, 9 y 23 respectivamente. Los datos representan el valor promedio \pm DS. 53

Figura 11. Etapa de cicatrización por biopsia, según el tratamiento aplicado. Antibiótico (A), Control negativo (C), *L. sericata* (L), *S. magellanica* (S). 54

Figura 12. Observación histológica de las biopsias en los diferentes tratamientos. A. Células inflamatorias al día 7 para todos los tratamientos. B. Proliferación al día 9 para los tratamientos larvales, aparición de fibroblastos. C. Etapa de remodelación al día 23 para todos los tratamientos, con formación de la lámina basal. 55

Figura 13. Unidades de actividad (UA) encontradas para *P. aeruginosa* (P) y *S. aureus* (Sa) incubadas con las ES de las especies de mosca *L. sericata* (L) y *S. magellanica* (S). No se dio inhibición en las concentraciones de 50, 25 ni 12,5 μ g/mL. Se encontraron diferencias significativas por moscas ($p=0,002$). Los datos representan el valor promedio \pm DS. 57

Figura 14. CMI por dilución en caldo. *P. aeruginosa* (P) y *S. aureus* (Sa) fueron incubadas con ES de las especies de mosca evaluadas *L. sericata* (L) y *S. magellanica* (S). Se encontraron diferencias significativas por ES de las moscas evaluadas ($p=0,000$). 59

Figura 15. Cinética de la actividad inhibitoria para las diferentes concentraciones de ES de *L. sericata* (L) y *S. magellanica* (S) encontradas como CMI frente a las dos cepas bacterianas *P. aeruginosa* (P) y *S. aureus* (Sa). 61

Figura 16. UFC de las dos cepas bacterianas *P. aeruginosa* (P) y *S. aureus* (Sa) incubadas con la CMI de las ES de *L. sericata* (L) o *S. magellanica* (S). No se encontraron diferencias

por cepas bacterianas, ni por mosca, pero si por concentración y tiempos de incubación respectivamente ($p=0.086$; $p=0.786$; $p=0.017$ y $p=0.000$). Los datos representan el valor promedio \pm DS. 62

Figura 17. Viabilidad celular en fibroblastos MRC5 con las diferentes concentraciones de ES de las especies de mosca evaluadas. No se encontraron diferencias significativas entre las moscas evaluadas ($p=1.000$). Los datos representan el valor promedio \pm DS. 63

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características fisiológicas del biomodelo Conejo - *O. cuniculus*. 28

Tabla 2. Sensibilidad obtenida frente a los antibióticos probados con las bacterias *S. aureus* y *P. aeruginosa*. 46

RESUMEN

Para los tratamientos alternativos de heridas crónicas, de difícil cicatrización, se emplean larvas de díptero *Lucilia sericata* (Meigen, 1826), las cuales son eficaces en procesos de terapia larval. La acción de las larvas se desarrolla con base en tres mecanismos fisiológicos diferentes: debridación, eliminación de bacterias y estimulación del tejido de granulación. Esta mosca es de distribución cosmopolita y es considerada la más eficaz. Sin embargo, en ocasiones resulta difícil conseguir muestras de la mosca, principalmente en épocas de lluvias. Se ha reportado el uso de otros insectos necrófagos pero no han igualado la eficacia de *L. sericata*. En razón a lo anterior, se requiere continuar estudiando nuevas especies que puedan ser similares y/o superiores en sus mecanismos de acción a la mosca señalada. Esta especie se ha registrado como primer colonizador de cuerpos en descomposición en la Sabana de Bogotá y no se ha reportado como potencial generador de miasis facultativa, entendiéndose como la contaminación ocasional con larvas en heridas preexistentes.

Para evaluar los efectos de *Sarconesiopsis magellanica* (Le Guillou, 1842) de manera integral se siguieron diferentes metodologías tanto *in vivo* como *in vitro*.

In vivo: Para evaluar cicatrización se indujo Diabetes y luego heridas en el dorso a 12 conejos, que fueron divididos en 4 grupos, los dos primeros se trataron con terapia larval derivada de *S. magellanica* y *L. sericata*, el tercero con antibiótico y el cuarto como control. Antes de los tratamientos, las heridas se infectaron con *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Además, antes y durante los tratamientos se tomaron biopsias de las heridas para análisis histopatológicos. La evaluación macroscópica de las heridas se valoró con la escala PUSH, Wollina y DPI.

In vitro: Se determinó la acción antibacterial de *S. magellanica*, mediante ensayos turbidométricos y de crecimiento en agar utilizando *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se comparó este efecto con las excreciones y secreciones (ES) obtenidas de *L. sericata*, y se evaluó su acción en diferentes concentraciones de ES.

En el modelo *in vivo*, se encontró disminución bacteriana luego de aplicar los tratamientos con terapia larval y antibiótico, de igual forma el debridamiento de la herida fue más ágil con los tratamientos larvales en comparación con los controles; sin embargo, el tiempo de cierre de la herida fue aproximadamente de 23 días en los tratamientos, con ligeras diferencias entre los grupos. Las heridas tratadas con larvas, avanzaron más rápido hacia la proliferación celular, observándose presencia de fibroblastos y células epiteliales, sin encontrar diferencias entre las especies de mosca evaluadas.

Los resultados de los métodos de turbidimetria y dilución en agar, mostraron que las ES tanto de *L. sericata* como de *S. magellanica* tienen actividad antimicrobiana frente a las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas encontrando diferencias entre las especies evaluadas, indicando que *S. magellanica* puede ser más eficiente en la inhibición de bacterias, tanto Gram-negativas como Gram-positivas, que *L. sericata*. Adicionalmente, estas ES no mostraron efectos citotóxicos en una línea celular de fibroblastos. Estos resultados tendrán implicaciones en estudios aplicados de terapia larval con *S. magellanica*, al establecerse que las interacciones entre ES larvales y las bacterias es el mecanismo más importante empleado en la desinfección.

Este estudio validó la larvaterapia con *S. magellanica* como alternativa para el tratamiento y cicatrización de heridas crónicas evidenciando resultados positivos tanto a nivel microbiológico como *in vivo*.

Palabras clave: *Sarconesiopsis magellanica*, terapia larval, actividad antibacterial, debridación, heridas crónicas.

ABSTRACT

Maggots from *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) are used as alternative treatment for chronic wounds from healing. Maggots from *L. sericata* are effective in maggot therapy processes. The maggot action is based on three different physiological mechanisms: debridement, removal of bacteria and stimulation of granulation tissue. This fly is cosmopolitan in distribution and is considered the most effective during maggot therapy. However, sometimes is difficult to get samples of the fly, especially during the rainy season. Although others necrophagous insects have been used for treating wounds, these species have not achieved the efficacy of *L. sericata*.

Taking into account the above mentioned, it is necessary to continue studying new species that may be similar and/or higher in their mechanisms of action at the appointed fly. Given the particular conditions of Colombia, regarding to its rich biodiversity, where the presence of several genera of Calliphoridae family have been registered, we are proposing the species *Sarconesiopsis magellanica*, to be fully evaluated for these purposes. This species has been recorded as the first colonizer of decomposing bodies in the Sabana de Bogotá, with high population densities throughout the year and potentially facultative myiasis generator, understood as the occasional contamination with larvae in preexisting wounds (Derraik *et al* 2010).

In order to assess the effects of *Sarconesiopsis magellanica* (Le Guillou, 1842) comprehensively different methodologies both *in vivo* and *in vitro* were followed.

In vivo: To evaluate wound healing, diabetes was induced, followed of back wounds in 12 rabbits, which were divided into 4 groups, the first two groups were treated with therapy using maggots from *S. magellanica* or *L. sericata*, the third group was treated with antibiotic and the fourth group was the control group. Before treatment, the wounds were infected with *P. aeruginosa* and *S. aureus*. In addition, before and during treatment biopsies of the wounds for histopathologic analysis were taken. PUSH, Wollina and DPI scale were used in order to assess macroscopic evaluation of the wounds.

In vitro: *S. magellanica* antibacterial action was established by turbidimetry and agar growth assays using *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. This effect was compared with the excretions and secretions (ES) obtained from *L. sericata*, and its action was evaluated at different concentrations of ES.

In the *in vivo* model, bacterial reduction after maggot therapy and antibiotic treatments was observed, in the same way, wound debridement was faster using maggot therapy compared with controls. The time of wound healing was 23 days approximately in the treatments, with slight differences between groups. Wounds treated with larvae moved faster towards cell proliferation, showing the presence of fibroblasts and epithelial cells, with out differences between the fly species evaluated.

The results from the turbidimetry assays and agar dilution showed that ES from *L. sericata* and *S. magellanica* have antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, However, our results suggest that *S. magellanica* may be more efficient in the inhibition of bacteria, Gram-negative and Gram-positive than *L. sericata*. Additionally, the ES did not show cytotoxic effects in a fibroblasts cell line. These results will have implications for applied studies of maggot therapy with *S. magellanica*, by providing that the interaction between ES larval and bacteria is the most important mechanisms used for the disinfection.

This study validated the maggot therapy with *S. magellanica* as an alternative for treatment and healing of chronic wounds, showing positive results *in vivo* and *in vitro*.

Keywords: *Sarconesiopsis magellanica*, maggot therapy, antibacterial activity, debridement, chronic wounds.

1. INTRODUCCIÓN

La mayor parte de las úlceras de “Pie Diabético” son desencadenadas por trauma, estas heridas se caracterizan porque fácilmente evolucionan a heridas crónicas, que presentan difícil curación debido a factores extrínsecos tales como: trauma repetitivo, isquemia e infección; así como a factores intrínsecos, tales como producción anormal de factores de crecimiento y matriz extracelular, de igual forma una reducida actividad de fibroblastos (Loots *et al* 1998). Otras heridas crónicas de difícil cicatrización corresponden a las úlceras varicosas y úlceras por presión. Usualmente, las heridas crónicas son tratadas mediante el desbridamiento mecánico mediante cirugía y tratamientos enzimáticos, sin embargo, estas técnicas presentan serias desventajas tales como dolor, necesidad de anestesia y daño mecánico del tejido sano (Zarchi & Jemec 2012). Estas heridas representan un problema de importancia en Salud Pública a nivel mundial. Por ejemplo, en Inglaterra se estima un gasto anual de 1 billón de libras esterlinas en gastos por parte del Servicio Nacional de Salud (NAO, 2004), y a nivel mundial los costos en los tratamientos anuales podrían estar en el orden de los 7000 millones de dólares. La prevalencia de úlceras de pie diabético se estima alrededor del 5-7% y de estas el 15% finalizan en amputación (Thomas, 2006).

La terapia larval es el uso de larvas de mosca para tratar heridas de difícil curación, es también conocida como larvaterapia, biocirugía o terapia de desbridamiento con larvas. Esta terapia es una opción natural, efectiva y económica. Un estudio realizada en el Reino Unido mostró ventajas económicas de los tratamientos con bioterapia, indicando que el costo promedio del tratamiento de úlceras necróticas por medio de terapias convencionales fue de 136,23 libras en comparación al tratamiento con terapia larval que fue de 78,64 libras (Wayman *et al* 2001). Esta reducción en costos ha sido atribuida a la menor necesidad de desbridamiento gracias a la acción efectiva de las larvas (Chan *et al* 2007).

De manera general, la especie de mosca *L. sericata* es la más ampliamente usada para este fin. La acción de las larvas se desarrolla con base en tres mecanismos fisiológicos: desbridación, eliminación de bacterias y estimulación del tejido de granulación. *L. sericata* tiene una distribución cosmopolita y es considerada la más eficaz, tanto por los mecanismos

de acción que efectúan sus larvas en las heridas como también por el fácil manejo en la cría y mantenimiento en condiciones de laboratorio. Pese a la amplia distribución de esta especie de mosca, en nuestro medio en muchas ocasiones resulta difícil conseguir muestras de la mosca en la naturaleza, principalmente en épocas de lluvias (Segura *et al* 2011). Se ha reportado el uso de otras especies necrófagas para los mismos propósitos, pero no han igualado la eficacia de *L. sericata*. En razón a lo anterior, se requiere continuar estudiando nuevas especies de dípteros que puedan ser similares o superiores en sus mecanismos de acción a *L. sericata*. Dada la alta biodiversidad colombiana, donde se registra la presencia de varios géneros de la familia Calliphoridae, se propuso, a través de la presente investigación, el uso de *Sarconesiopsis magellanica*, para ser integralmente evaluada como una especie alternativa para la terapia larval. Esta especie se ha registrado como primer colonizador de cuerpos en descomposición en la Sabana de Bogotá (Segura *et al* 2011), con altas densidades poblacionales durante todo el año y potencialmente generadores de miasis facultativa (Pinilla *et al* 2012). Las larvas de *S. magellanica* alcanzan un mayor tamaño que *L. sericata* y presentan una disposición de espículas similar a *L. sericata* (Florez y Wolff, 2009), dando cabida a una mayor secreción de ES potencialmente benéficas en actividad antimicrobiana, así como a una mayor estimulación mecánica, debido a la remoción de tejido necrótico en las heridas. Sin embargo, a pesar de estos posibles beneficios, aun no existen reportes a nivel mundial para esta especie. Este conocimiento podría ayudar a la comunidad médica y científica a solucionar en un menor tiempo, problemas de heridas crónicas de difícil curación.

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo del presente estudio, fue evaluar mediante observaciones macroscópicas, histopatología y el seguimiento de la evolución y curación de las heridas el efecto de larvas de *S. magellanica* en la curación de heridas inducidas quirúrgicamente en conejos diabéticos y comparar la efectividad de esta nueva especie con la especie *L. sericata*, así mismo, evaluar su acción antibacterial *in vitro* frente a bacterias comúnmente encontradas en heridas de este tipo.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Biocirugía

La utilización de las larvas de insectos, y en especial dípteros, en el manejo y curación de heridas ha sido una técnica practicada desde varios siglos atrás. Sus efectos benéficos han sido reportados en libros como la Biblia (Job 7:5) y el *Hortus sanitus*, manual médico publicado en Maguncia, Alemania, en 1491 (Dunbar, 1944). Otros datos encontrados sobre el uso de la biocirugía como técnica para el tratamiento de heridas datan de la Guerra Civil en Estados Unidos, donde se describen infestaciones oportunistas por larvas de moscas que ayudaban a limpiar las heridas e impedir su contaminación (Chernin, 1986).

Sin embargo, hace casi 70 años, el verdadero pionero de la biocirugía William Baer, cirujano y ortopedista Norteamericano observó los beneficios de las larvas en heridas traumáticas, durante la Primera Guerra Mundial cuando comenzó a utilizarlas durante su práctica. Baer estudió sus efectos en 89 pacientes con osteomielitis crónica reportando resultados positivos en un 90%, dado que las larvas utilizadas por Baer no estaban esterilizadas, algunos de sus pacientes llegaron a infectarse con *Clostridium tetani*. Por otro lado, este suceso hizo que en los siguientes años se dedicara a desarrollar un método eficaz para producir larvas estériles (Baer, 1931). Hacia los años cuarenta, la introducción de los antibióticos como las sulfonamidas y la penicilina en el manejo y cuidado de las heridas tuvo un efecto dramático en la terapia de debridamiento de heridas infectadas por medio de larvas de mosca, al desaparecer esta técnica casi por completo (Baer, 1931; Stewart 1934; Thomas *et al.*, 1996).

Durante los años ochenta, el uso de la terapia larval fue retomado por Ronald Sherman, médico y profesor de la Universidad de California, quien empezó a utilizar esta técnica en el tratamiento de úlceras generadas por presión y heridas crónicas, motivado por la escasa eficacia de los tratamientos convencionales sobre

este tipo de lesiones (Sherman *et al.*, 1993). En 1995 la Unidad de Investigación en Biocirugía del Sur de Gales comenzó a producir larvas estériles de la mosca *L. sericata*, escogiendo esta especie por varias razones entre las cuales encontramos su próspero uso en el cuidado de heridas, el cual ya había sido descrito y documentado, siendo su uso seguro en humanos, además de producir potentes enzimas proteolíticas, las cuales degradan el tejido muerto y son inofensivas en contacto con tejido sano, sin dejar a un lado su acción bactericida (Jones & Thomas, 2000).

En la actualidad se ha popularizado de tal manera la terapia de debridamiento larval que algunas compañías y laboratorios han dedicado un espacio a la producción de larvas estériles de la mosca *L. sericata*. Hoy en día, la biocirugía por medio de larvas es de uso habitual en países como Israel, Alemania, Suiza, Suecia, Australia, Ucrania, Tailandia, Canadá, México y Brasil (Mumcuoglu *et al.*, 1998; Sherman & Pechter, 1988).

2.2 Mecanismo de acción de la Terapia larval

La terapia larval es un método natural simple, seguro y altamente exitoso para la curación de úlceras o lesiones crónicas, se consideran como tal aquellas heridas que son producto de una enfermedad sistémica (diabetes, problemas de circulación sanguínea) o aquellas que se perpetúan por más de 8 semanas sin avanzar hacia el proceso de cicatrización (Cacicedo *et al.*, 2011); su acción está científicamente comprobada a través de tres funciones primordiales: limpieza del tejido necrótico, eliminación de bacterias y microorganismos, así como la estimulación en el crecimiento del tejido de granulación (Church, 1996; Thomas *et al.*, 1999; Sherman *et al.*, 2000; Mumcuoglu, 2001; Wolff & Hansson, 2005; Spilsbury *et al.*, 2008).

Se ha podido demostrar que cuando la larva se encuentra con su extremo cefálico en contacto con la herida, ésta puede disolver rápidamente el tejido necrótico como resultado de la secreción y excreción colectiva de enzimas proteolíticas. Estas enzimas incluyen colagenasa y otras enzimas que poseen la misma actividad de la

tripsina, leucinaminopeptidasa y carboxipeptidasas A y B. Las enzimas digieren la matriz extracelular e incrementan el grado de oxigenación tisular de manera que el tejido necrótico es eliminado. Las larvas son en efecto fábricas químicas vivientes. Ellas se mueven sobre la superficie de la lesión secretando una mezcla de enzimas proteolíticas que disuelven el tejido muerto para que posteriormente este líquido sea succionado e ingerido (Jones & Thomas, 2000). Los productos de las ES larvales incluyen entre el complejo de enzimas proteolíticas las proteasas (Young *et al.*, 1996). Se han identificado que alguna de estas proteasas son las serin-proteasas y se han encontrado en especies tales como *L. cuprina*, *Stomoxys calcitrans*, *Hypoderma lineatum* y *Haematobia irritans*. De igual forma se han identificado serin- proteasas que se han encontrado en los fluidos de las heridas que son tratadas con terapia larval, sugiriendo que estas son liberadas durante el debridamiento (Schmidtchen *et al.*, 2003).

Una vez el tejido necrótico ha sido enzimáticamente licuado, la larva ingiere y digiere la "sopa" resultante. Esta acción implica que cualquier bacteria y posiblemente otros microorganismos presentes sean subsecuentemente lisados cuando pasan por el tracto digestivo de la larva. La actividad antibacteriana parece estar mediada por varios componentes entre los cuales se encuentra un comensal del intestino de la larva *Proteus mirabilis* y el cual secreta dos agentes con actividad antibacterial, identificados como ácido fenilacético y fenilacetaldehído con particular acción en el pH bajo del intestino (Sherman & Wyle, 2000; Nigam *et al.*, 2006).

Otros mecanismos de acción antibacterial utilizados por las larvas, son la excreción de bicarbonato de amonio y sus derivados al ambiente (herida), neutralizando el exudado ácido producido por la inflamación de la herida o la lesión, elevando así el pH por encima de 7 y por ende reduciendo la colonización de bacterias (Mecer & McClellan, 1935). El carbonato de calcio también encontrado en las excreciones de la larva estimula la fagocitosis gracias a los iones de calcio facilitando el proceso de cicatrización en heridas infectadas. Las sustancias identificadas en la secreción

larval son: alantoína, urea, carbonato de calcio, amonio, enzimas (tripsina, quimiotripsinas, leuciaminopeptidasas, carboxipeptidasas A y B, proteasas séricas, colagenasa).

Las teorías iniciales, sobre el efecto de las larvas en las heridas, resaltaban la acción física de las larvas, a través de sus movimientos de rastreo en la lesión, estimulando la aparición del tejido de granulación y avanzando en el proceso de curación (Buchman & Blair, 1932). Este criterio fue también, más tarde, apoyado por la observación de que las larvas mejoraban la oxigenación del tejido en heridas crónicas (Wollina 2002). Además, desde hace mucho tiempo, científicos sugirieron que la acción de algunas sustancias excretadas por *L. sericata* como alantoína (2,5-Dioxo-4-imadazolidinil úrea) o bicarbonato de amonio (Robinson, 1935; 1940) podrían ser los responsables del crecimiento de tejido de granulación. En efecto, Robinson (1935), usando estas sustancias en las heridas demostró estimulación en el crecimiento local del tejido de granulación.

Relativamente en fecha más reciente, Prete (1997), encontró que las secreciones alimentarias y la hemolinfa de *L. sericata* al actuar sobre tejidos de fibroblastos humanos estimulaban la proliferación celular. Además, este autor pudo observar que en presencia del *epidermal growth factor*, los extractos de las larvas causaban un crecimiento significativo de los fibroblastos. Otros investigadores han señalado que la proliferación de los fibroblastos es sólo un aspecto de la formación del tejido de granulación, y al parecer mecanismos adicionales pueden estar involucrados. Así por ejemplo, Chambers *et al.* (2003), indicaron que cuando las larvas son introducidas en heridas necróticas, ellas potencialmente influyen en los eventos de la cicatrización de la herida con proteasas presentes en las excreciones y secreciones las cuales están involucradas en la remodelación de los componentes de la matriz extracelular. Estos autores sugieren que las proteinasas causan la lisis de fibrina de la matriz extracelular, liberando factores proliferativos, tales como fragmentos de fibronectina, que causan efectos favorables en la cicatrización de la herida. De igual forma las metaloproteiniasas presentes en las ES, están envueltas en la degradación

de colágeno para facilitar la remodelación y migración queratinocítica (Chambers *et al.*, 2003). Los anteriores investigadores creen que un particular tipo de enzimas con actividad similar a la tripsina puede jugar un rol importante en el receptor activador de la proteasa que media en la proliferación de citoquinas en la herida.

Otra de las acciones, no menos importante en el proceso curativo de las lesiones con terapia larval, es la acción quimiotóxica de varias sustancias que hacen parte de las excreciones y secreciones larvales, que potencian el sistema inmune del paciente mediante agentes proinflamatorios con la participación de citoquinas específicas e interferón gamma. Estas sustancias estimulan la vasodilatación e incrementan la permeabilidad capilar permitiendo la extravasación de leucocitos polimorfonucleares y macrófagos que se dirigen al sitio de la lesión (Mumcuoglu 2001, Horobin *et al.* 2003, Nigam *et al.* 2006), actuando contra los agentes microbianos, promoviendo el tejido de granulación y la cicatrización de las heridas.

Más recientemente se ha reportado la presencia de glicosilasas en las ES de *L. sericata* (Telford *et al.*, 2012; Dumville *et al.*, 2009), su efecto es conocido por liberar de las proteínas, fracciones de azúcar haciéndolas más sensibles a la acción de las proteasas (Grenier & Maryland 2001). En otros ensayos se han identificado posibles glicosilasas en ES de larvas de primer estadio (ES1) (Altincicek & Vilcinskas 2009, Andersen *et al.* 2010). Adicionalmente Telford y colaboradores (2012) han perfilado glicoproteínas presentes en heridas crónicas estableciendo el efecto de la terapia larval *ex vivo*, determinando la naturaleza de estas glicosilasas y sus efectos en escaras no tratadas con larvas y con glicosilasas purificadas de ES1, sugiriendo un papel en la esterilización de las heridas por interferencia con las paredes celulares de las bacterias y reduciendo la eficacia de algunos factores de virulencia.

2.3 Estado del arte

Actualmente, el uso de la terapia larval se ha venido incrementado en muchos países del mundo, incluida Colombia (Tellez *et al.*, 2012; Wolf *et al.*, 2010; Rey *et al.*, 2008), al establecerse como una tecnología sencilla, rápida y efectiva en el tratamiento de lesiones cutáneas (Stoddard *et al.*, 1995; Sherman, 1997; Thomas *et al.*, 1999; Kerridge *et al.*, 2005; Téllez *et al.*, 2012). Los efectos benéficos de las larvas sobre las heridas se producen debido a la acción de varias sustancias que ellas secretan y excretan, participando en tres mecanismos fisiológicos diferentes: debridamiento, actividad antimicrobiana y estimulación del tejido de granulación, la articulación de todo el proceso conduce finalmente a la cura y cicatrización de las lesiones cutáneas (Parnés & Lagan 2007). La aplicación de la terapia larval está indicada para heridas que contienen membranas adherentes o con tejido necrótico, que están clínicamente infectadas y no responden a los tratamientos antimicrobianos.

Se ha demostrado la efectividad antibacterial mediante evaluación *in vitro* de ciertas sustancias principalmente péptidos de bajo peso molecular, catiónicos, que cumplen esta función en las excreciones y secreciones larvales (Bexfield *et al.*, 2004; 2008; Kerridge *et al.*, 2005; Huberman *et al.*, 2007), contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, tales como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus luteus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Kerridge *et al.*, 2005; Huberman *et al.*, 2007). Nuestro grupo de investigación (Rey *et al.*, 2008), en un trabajo de evaluación de la terapia larval en el proceso de curación de heridas infectadas con *P. aeruginosa* en conejos, pudo también demostrar la acción bactericida de larvas de *L. sericata*, evidenciado en la reducción del crecimiento de colonias bacterianas observadas en pruebas microbiológicas, siendo controladas y erradicadas de las lesiones en un período menor de tiempo comparado con un tratamiento paralelo con antibiótico (gentamicina) en el modelo animal seleccionado. Además, en el trabajo señalado, se pudo también concluir que el proceso de curación fue de mejor calidad y menor duración, 10 días, para el grupo de tratamiento larval, comparado con el

tratamiento convencional con antibiótico que alcanzó en la curación el doble de tiempo.

La adecuada selección de especies de moscas para uso en terapia larval es de suma importancia, tanto en la determinación de la seguridad para el paciente como en el éxito del tratamiento. Es imperativo para seleccionar una especie que se alimente casi exclusivamente de tejido necrótico. William Baer escogió las larvas de *L. sericata* en razón a que es un parásito facultativo y no causa daños a los tejidos humanos sanos (Weil *et al.*, 1933). De acuerdo con la experiencia anterior, se seleccionó en el presente proyecto la especie *S. magellanica* debido a que pertenece a la familia Calliphoridae, no se ha registrado como generadora de miasis obligatoria y se asume que puede ejercer esta acción en forma facultativa, probablemente sus larvas se alimenten de tejido necrótico de forma similar a *L. sericata*. La abundancia poblacional de estas especies, principalmente demostrado en *S. magellanica* en la Sabana de Bogotá durante todo el año, es otro factor que la hace atractiva para su uso en terapia larval, en la perspectiva de que, además, pueda ser fácilmente colonizable en condiciones de laboratorio, lo cual indudablemente la convertiría en modelo ideal para los propósitos señalados. Sin embargo, son escasos, por no decir excepcionales, los trabajos adelantados con esta especie en términos de su biología, ecología poblacional y aplicaciones en terapia larval, por tales razones esta investigación será la pionera en la temática propuesta.

2.4 Familia Calliphoridae

Según datos morfológicos la familia Calliphoridae es un clado parafilético, o aun polifilético (Pape *et al.*, 2004) que pertenece a la superfamilia Oestroidea, contiene cerca de 1000 especies descritas y se representa bien en todas las regiones zoogeográficas (Smith, 1986; Byrd & Castner, 2001), de las cuales solo 126 se encuentran en el Neotrópico (Amorin *et al.*, 2002) de acuerdo con James (1970), Peris (1992) y Mello (2003) las subfamilias presentes en el Neotrópico son: Mesembrinellinae, Calliphorinae, Chrysomyinae, Toxotarsinae y Rhiniinae, esta

última ausente en Colombia (Amat *et al.* 2008). La familia Calliphoridae, junto con Sarcophagidae y Muscidae son empleadas comúnmente en investigaciones médico-legales, algunas especies de la familia Calliphoridae, tales como *L. caesar*, *Calliphora erythrocephala*, *C. vomitoria* y *L. sericata* se han usado en el tratamiento de heridas. Los factores biológicos que hacen que las larvas de la familia Calliphoridae sean las más convenientes incluyen: su rápido desarrollo larval, la facilidad para criar estos insectos *in vitro* y para esterilizar sus huevos permitiendo una eclosion viable (Sherman *et al.*, 2000), además del hecho que las larvas una vez presentes en las heridas, no invaden órganos internos. Dentro de esta familia la especie *L. sericata* ha mostrado los mejores resultados (Tarshis, 1938). Desde la Primera Guerra Mundial, larvas de *L. sericata* son empleadas en el tratamiento de heridas crónicas para la remoción del tejido necrótico (Byrd & Castner, 2001; Sherman *et al.*, 2000; Namias, 2000; Mumcuoglu *et al.*, 1998; Church, 1996; Livingston, 1936).

Los hábitos de los califóridos, pueden variar de una subfamilia a otra (Vargas & Wood, 1999), siendo individuos necrófagos en su mayoría, depredadores o parasitoides de caracoles y lombrices de tierra (Amat *et al.*, 2004), moscas saprófagas y necrobiontófagas, algunas de sus especies se vinculan a los hábitats humanos (eusinatóricas -endófilas y exófilas-). La estimación de la sinantropía establece qué especies pueden tener importancia sanitaria y además permite conocer aquellas que se vinculan más con ambientes naturales (asinatóricas) constituyendo su ausencia un indicador de perturbaciones anatóricas sobre aquellos (Centeno, 2002). Estas moscas al igual que muchos otros organismos, se ven particularmente influenciadas por la dinámica anatórica, algunas de ellas incluso coexisten y tienen cierto grado de dependencia con el ser humano y el ambiente generado por éste, por tal motivo, se les ha denominado de manera genérica como sinatóricas (Martínez, 2004), esto debido al alto grado de asociación con el hombre, al alimentarse y desarrollarse a partir de excretas, basura, materiales en descomposición y cadáveres de diversos tipos de animales (Roa & Linhares, 2002; Torruella, 1995; Daly *et al.*, 1998). Representan, además, de su relevante papel

ecológico como descomponedores, importancia en el campo médico, veterinario, económico y forense (Roa & Linhares, 2002). Su importancia médica y sanitaria radica básicamente por ser agentes de dispersión mecánica de patógenos procedentes de fuentes de infección hacia productos de consumo humano o animal, también las larvas de algunas especies pueden causar miasis en mamíferos principalmente en el ganado ovino causando apreciables daños económicos (Amat *et al.*, 2008; Stevens & Wall, 1996).

A la familia Calliphoridae se le reconoce morfológicamente, por ser moscas robustas de tamaño mediano, se encuentran entre un rango de 6 a 14 mm de longitud, generalmente presentan coloraciones metalizadas, verde, azul, cobrizo u oscuras con pruinosis en el tórax y/o abdomen (Byrd & Castner, 2001), aunque algunas especies pueden ser opacas (Amat *et al.*, 2008).

Las larvas de la familia Calliphoridae presentan tres estadios que difieren entre sí por el grado de desarrollo de los espiráculos posteriores y de su aparato bucal. A su vez, el tercer estadio se divide en dos. El primero de estos es el estado alimentario, en donde la larva se alimenta de forma voraz, alcanzando sus máximos tamaños. Después de esto, la larva deja de alimentarse alejándose del recurso y empieza a utilizar el contenido alimenticio que le resta en su intestino hasta que este deja de ser visible, esta etapa se conoce como la fase de prepupa. A partir de este instante el color de la larva cambia de translúcida a opaca, por la presencia de cuerpos grasos, y las características internas se tornan oscuras, la larva empieza encogiéndose su tamaño preparándose para la pupación (Anderson, 2000). Pueden ser acéfalas o hemicéfalas, ápodas o con pseudopatas, el cuerpo es generalmente alargado y la segmentación es evidente. Las larvas se desarrollan en cadáveres, excrementos, tejido sano del hombre y de animales domésticos (Zumbado, 1999).

2.5 Aspectos taxonómicos de *S. magellanica*

La especie *S. magellanica*, la cual se propone en el presente proyecto para su evaluación y eventual uso en biocirugía, corresponde a la subfamilia Toxotarsine. Su clasificación taxonómica es la siguiente: Reino: Animalia. Phylum: Arthropoda. Clase: Insecta. Orden: Diptera. Suborden Brachycera. Familia: Calliphoridae. Subfamilia: Toxotarsinae. Género: Sarconesiopsis. Especie: *Sarconesiopsis magellanica*. Las sinonimias empleadas en esta especie son: *Sarconesia magellanica*, y *Sarconesiopsis chilensis*. Esta especie ha sido reportada en Argentina (Mariluis & Mulieri, 2003), Bolivia, Chile, Ecuador y Perú (Pape *et al.*, 2004). Además, fue descrita por Figueroa-Roa y Aricio Linhares (2002) en Valdivia, Chile entre 1996-1997, como una especie asinantrópica, ya que presentó un índice de sinantropía de -6.3, (el índice de sinantropía varía de +100 a -100; el primer valor representa el grado más alto de asociación con el hombre, mientras que valores negativos muestran aversión al ambiente humano) indicando una baja relación con el hombre. Mariluis y Mulieri (2003) la describe como una especie de altura, que se encuentra en zonas superiores a los 900 m.s.n.m. En Colombia, está distribuida en los departamentos de Boyacá y Cundinamarca (James, 1970). *S. magellanica* fue reportada como primera especie colonizadora de cuerpos de cerdo en descomposición en Bogotá DC, (biomodelo animal más parecido al ser humano) (Goff, 2000) específicamente en un área urbana de la ciudad (Segura *et al.*, 2009; 2005).

2.6 *L. sericata* en terapia larval

Las larvas de la mosca *L. sericata* (Diptera: Calliphoridae) son consideradas las más eficaces para ser empleadas en los tratamientos de terapia larval (Namias, 2000; Huberman *et al.*, 2007). Las características biológicas y etológicas que hacen a las larvas de *L. sericata* las más convenientes para utilizar en biocirugía incluyen su rápido desarrollo larval, la relativa facilidad para criar estos insectos en condiciones de laboratorio y la continua disposición para la toma de los huevos y su esterilización. No obstante, lo más relevante en el comportamiento biológico es la

acción efectiva de las larvas al actuar como parásitos facultativos que se alimentan sólo del tejido necrótico en las heridas, sin intervenir los tejidos vivos del hospedero. Sin embargo, se han obtenido buenos resultados empleando larvas de *Lucilia caesar*, *Phormia regina*, *Calliphora erythrocephala*, *Cynomyia cadaverina* y más recientemente *Lucilia cuprina* y *L. eximia* (Wolff *et al.*, 2010) sin igualar a *L. sericata* en su efectividad en tratamiento de terapia larval (Tarshis, 1938; Sherman & Pechter, 1988; Paul *et al.*, 2009). En el presente proyecto proponemos evaluar para tratamientos de terapia larval a *S. magellanica*, en razón a que hace parte de la familia Calliphoridae, partiendo, además, de la hipótesis de que es una especie que ocasiona miasis facultativa sin intervenir tejidos sanos, que podría superar o igualar la efectividad de *L. sericata*. Adicionalmente, podría tener fácil manejo para criarse y mantenerse en condiciones de laboratorio, lo cual la convertiría en la sustituta ideal o complementaria de *L. sericata*.

2.7 Modelo de investigación Conejo - *Oryctolagus cuniculus*.

Han sido varios los modelos animales utilizados para evaluar cicatrización, entre estos encontramos cerdos, ratas, ratones, conejos (Davison, 1998), no obstante el modelo que brinda mayor facilidad de manejo y permite la elaboración de una herida mayor que permita mejores observaciones, es el conejo; sin embargo, para lograr la evaluación del proceso de cicatrización en estos animales es necesario la creación de heridas crónicas que permitan la extrapolación de datos utilizables en pacientes con este tipo de heridas. Entre los métodos que se han evaluado para la inducción de heridas crónicas en animales figuran la creación de espacio muerto, inmunosupresión de animales, infección, elaboración de quemaduras por químicos, agua y metales, incluso se ha llegado a utilizar venenos de araña (Davison, 1998), otro método más usado ha sido la inducción de diabetes química por diferentes reactivos como Estreptozotocina, el cual es tóxico en conejos y Alloxan (Rees & Alcolado, 2005; Lenzen, 2008; Wang *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta estos estudios el modelo escogido pertenece a *Oryctolagus cuniculus* de raza Nueva Zelandá. Esta especie se caracteriza por alcanzar grandes tamaños, llegando a pesar

hasta 6 kilos, su promedio de vida está entre los 5 y 8 años, lo que es comparable a 15 años humanos, teniendo en cuenta esta proporción y conociendo que una herida crónica en humanos es considerada como tal si perdura por más de 6 semanas (Wang *et al.*, 2010), una herida de algunas semanas podrá considerarse como crónica en conejos. Entre las características fisiológicas de la especie, encontramos las que se relacionan en la Tabla 1 (Hillyer & Quesenberry, 1997).

Tabla 1. Características fisiológicas del biomodelo Conejo - *O. cuniculus*.

Frecuencia cardiaca	180-300 lat/min
Frecuencia respiratoria	30-60 resp/min
Temperatura corporal	38.5-40 °C
Consumo de alimento/día	50 g/kg
Consumo de agua/día	15-50 ml/kg
Producción diaria de orina	10-35 ml/kg
Peso adulto	1-6 kg
Peso cría	30-80 gr
Promedio de vida	5-8 años

2.8 Heridas

Una herida es la pérdida de la continuidad del tejido (Hardy M 1989), esta situación permite la entrada de microorganismos que pueden llevar a la infección, reconociéndola por enrojecimiento, hinchazón, dolor y calor. La herida provee el ambiente necesario para la proliferación de microorganismos que comúnmente son encontrados en la piel y los cuales normalmente son inofensivos, pero que se pueden tornar patogénicos en la herida (Bowler, 1998). Entre las bacterias que con frecuencia se encuentran en heridas están las observadas en la Figura 1, siendo las más frecuentes *S. aureus* y *P. aeruginosa* (Jaklic *et al.*, 2008).

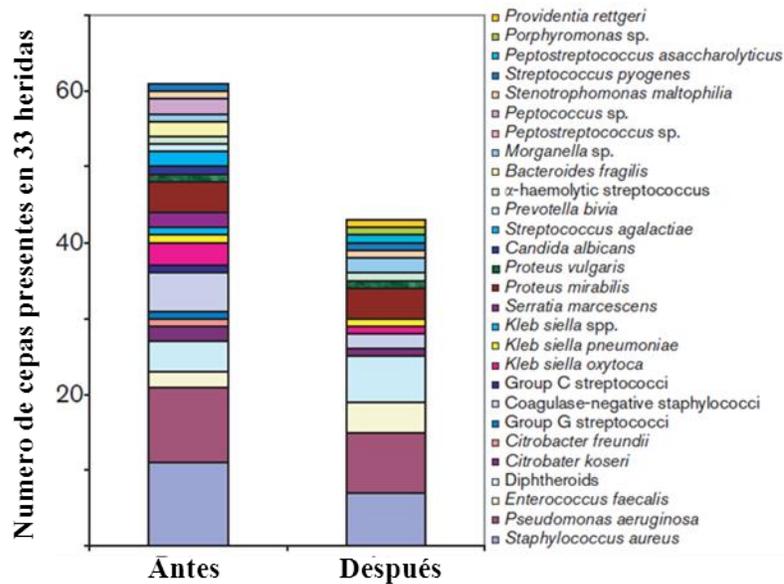


Figura 1. Bacterias presentes en heridas antes y después de aplicación de tratamiento larval (modificado de Jaklic *et al* 2008).

2.8.1 Tipos de Heridas

Se conocen dos tipos de heridas que, clasificadas según su tiempo de curación, se dividen en heridas agudas y crónicas. Las heridas agudas por su parte son aquellas que surgen como resultado de quemaduras, cirugías o trauma y que evolucionan hacia la curación de forma ordenada (Nigam *et al.*, 2006). A diferencia de estas, las heridas crónicas aparecen debido a una condición fisiopatológica, como una insuficiencia vascular, o enfermedad de base; estas heridas crónicas pueden incluir úlceras arteriales, venosas, por presión o diabéticas (Morgan & Nigam, 2013), adicionalmente estas heridas no avanzan normalmente en el proceso de cicatrización, permaneciendo infectadas en la etapa inflamatoria y presentando inhibición de la proliferación celular, remodelación de la matriz extracelular incompleta, requiriendo así, mayor tiempo de curación el cual generalmente puede ser superior a 6 semanas (Cacicedo *et al.*, 2011; Nigam *et al.*, 2006).

Estas heridas presentan inbalances en la presencia de citoquinas, proteasas y diversos factores de crecimiento que dirigen y activan la llegada de las células requeridas para la curación normal, por lo cual en las heridas crónicas la fase

inflamatoria se ve prolongada, intensificándose la presencia de proteasas específicamente por las metaloproteasas de la matriz MMP y la elastasa neutrofilica; estas excesivas MMP degradan proteínas del tejido sano como la fibronectina por lo cual las células tienen capacidad limitada de movimiento y proliferación para avanzar la curación (Jeffcoate *et al.*, 2004). Adicionalmente, la continua presencia de endotoxinas bacterianas y detritus celular mantienen la inflamación, incrementando a su vez la presencia de neutrófilos que a su vez secretan más citoquinas proinflamatorias (Lobmann *et al.*, 2005). Todo esto conlleva a que para lograr el cierre eficaz y el avance hacia el proceso de cicatrización de estas heridas, se requieran estrategias que permitan un desbridamiento y desinfección efectivas como el paso inicial para la curación de las mismas (Morgan & Nigam, 2013).

2.9 Cicatrización

Una vez causada la lesión se activa el proceso de curación. Para que una herida avance hacia la cicatrización debe pasar por estas 3 etapas: inflamación, proliferación y remodelación (Morgan & Nigam, 2013).

Inflamación: el proceso se activa con la formación del coágulo a través de la cascada de coagulación, dando como resultado el coágulo de fibrina que atrapa eritrocitos y plaquetas bloqueando así el flujo sanguíneo. Numerosos factores de crecimiento liberados por las plaquetas atraen las células predominantes en la curación temprana, que incluyen linfocitos, granulocitos y macrófagos (Loots *et al.*, 2008). Luego de 6 horas de producida la lesión, se da la llegada de los neutrófilos que son las primeras células en llegar a la herida, controlando la contaminación y retirando el detritus celular, seguidos de la llegada de los monocitos que al diferenciarse en macrófagos y activados por linfocitos, promueven la fagocitosis (Figura 2) (Lobmann *et al.*, 2005).

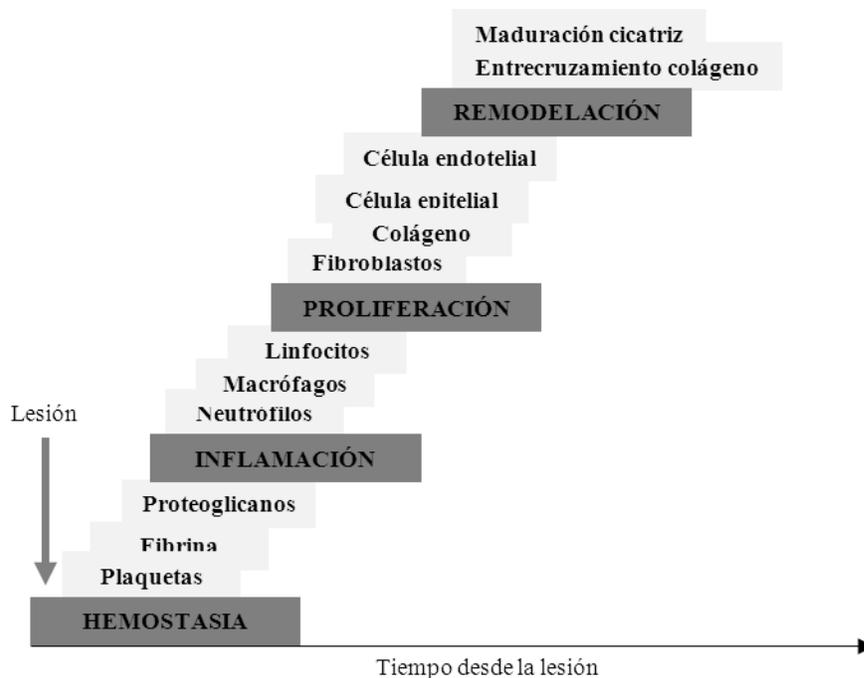


Figura 2. Fases de la cicatrización normal de heridas (modificado de Lobmann *et al.*, 2005).

Luego de 2 a 3 días, la fase siguiente, de proliferación, se caracteriza por la aparición del tejido de granulación. En esta etapa se da la fibroplasia y la angiogénesis, en donde el tejido de granulación es formado, compuesto de nuevos vasos sanguíneos (Jeffcoate *et al.*, 2004). Las células mesenquimales ubicadas alrededor de los vasos sanguíneos, dan origen a los fibroblastos que inician la migración hacia la herida para comenzar su síntesis de colágeno tipo III, dándose allí la acumulación de fibroblastos. Gracias a la acción de las proteasas producidas por las metaloproteasas de la matriz (MMP) se da la migración de keratinocitos y se inicia el proceso de epitelización. Adicionalmente, en la fase proliferativa también se da la contracción de la herida y la producción de colágeno (Hardy, 1989; Jeffcoate *et al.*, 2004).

Finalmente, a los 7 días se inicia la fase de remodelación, donde se presenta disminución de la densidad celular, remplazo de colágeno tipo III por tipo I, la matriz provisional formada por fibrina y fibronectina es remplazada con

proteoglicanos y se da la organización de las fibras de colágeno, las cuales se tornan de mayor grosor y resistencia, este proceso se puede extender hasta por un año (Villalba *et al.*, 2008; Hardy, 1989; Lobmann *et al.*, 2005).

2.10 Diabetes en heridas

La diabetes mellitus es una alteración metabólica caracterizada por la presencia de hiperglucemia crónica (Conget, 2002), en el caso de la diabetes tipo 1, surge como resultado de una destrucción progresiva de las células beta del páncreas y en el caso de la diabetes tipo 2, esta surge debido a un defecto en la producción de insulina y por una resistencia a la misma (Quan *et al.*, 2001, ACA 2004). La hiperglicemia resultante, desencadena en complicaciones microvasculares que afectan el cierre de heridas (Brem & Tomic-Canic, 2007; Brownlee, 2001). Estas alteraciones, son causadas por sobreproducción mitocondrial de superóxidos (ROS) en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, produciendo una angiogénesis defectuosa en respuesta a la isquemia y activando numerosas vías que aumentan la expresión de genes proinflamatorios (Brownlee 2001, Giacco & Brownlee 2010). Las heridas diabéticas, se caracterizan por presentar un aumento en las células inflamatorias y ausencia de tejido de granulación sano (Brem *et al.* 2007).

La curación en úlceras diabéticas es inhibida por factores extrínsecos como la isquemia y la infección e intrínsecos como el desequilibrio celular y de proteasas en el tejido. La isquemia que normalmente se presenta en las heridas diabéticas impide la curación de las heridas al reducirse el suplemento de oxígeno y otros nutrientes requeridos para la correcta cicatrización. Adicionalmente, estos problemas de curación son causados por enfermedades periféricas arteriales y neuropatía periférica en donde los vasos sanguíneos crecen más estrechos, reduciendo la circulación de la sangre (Singer & Clark, 1999; Jeffcoate ., 2004).

2.11 Diabetes inducida por Alloxan®

El Alloxan® causa la necrosis específica de las células beta del páncreas, las cuales son las encargadas de la producción y liberación de la insulina (Dunn *et al.* 1943). El Alloxan® al igual que la glucosa, son compuestos hidrofílicos con formas similares, esta similitud le permite al Alloxan®, ser transportado al citosol a través del transportador de glucosa GLUT 2 de la membrana plasmática de la célula beta, en donde finalmente causa la necrosis celular, inducida por la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Lenzen, 2008; Gorus *et al.*, 1982). Estos ROS causan lesiones en el ADN celular activando la poli ADP- ribosa polimerasa encargada de la muerte celular programada (Sun *et al.*, 2010). Adicionalmente, el Alloxan® reacciona con grupos tiol; la glucoquinasa es el grupo tiol más sensible de la célula beta, que al ser inhibida reduce la oxidación de la glucosa y la generación de ATP, esto a su vez suprime la señal que activa la secreción de insulina generando así, la hiperglicemia observada en pacientes diabéticos (Lenzen, 2008).

Investigaciones en modelos animales diabéticos, inducidos por Alloxan®, han permitido aproximaciones para el estudio de la curación de heridas por distintas metodologías, indicando que la curación de heridas en conejos diabéticos, se ve notablemente disminuida en comparación con los controles normales (Breen *et al.*, 2008), Adicionalmente, se ha reportado que la administración de Alloxan en animales, produce varios efectos similares a los que se presentan en humanos (Quan *et al.*, 2001).

3. OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar la especie *S. magellanica* (Le Guillou, 1842) en tratamientos de terapia larval sobre heridas crónicas e infectadas, inducidas experimentalmente en un modelo animal (conejos).

Objetivos específicos:

1. Identificar las características macroscópicas del proceso de cicatrización de las heridas mediante parámetros internacionalmente aceptados tales como: DPI (Debridment Performance Index), Wollina, 2002 y PUSH (Pressure Ulcer Scale for Healing).
2. Evaluar el proceso de cicatrización en heridas crónicas e infectadas en conejos, mediante pruebas dermohistopatológicas, usando terapia larval con *S. magellanica* y comparar su efecto con *L. sericata*.
3. Comparar la acción antibacterial de las excreciones y secreciones larvales de *S. magellanica* con larvas de *L. sericata*, en un modelo *in vitro* y evaluar su efecto citotóxico.

4. METODOLOGÍA

4.1 Captura de especímenes adultos y mantenimiento de colonias de *S. magellanica*

Las formas adultas de *S. magellanica* fueron capturadas en campo en la parte montañosa del Parque Nacional (Bogotá DC) latitud: 4°62'28,81'' longitud: 74°06'09,84''. La colecta de los insectos se realizó de forma periódica en horas de la mañana. Estos fueron colectados con jama entomológica y almacenados vivos en frascos de vidrio para luego ser transportados al Laboratorio de Entomología Médica y Forense de la Universidad del Rosario. Los individuos se mantuvieron en jaulas Gerber de 45x45x45cm, a una temperatura de 20-25°C; humedad relativa de 60-70% y 12 horas de fotoperiodicidad. Estos permanecieron con una solución azucarada e hígado de cerdo para continuar el ciclo vital. El material biológico utilizado en este trabajo provino de una colonia de *S. magellanica* previamente establecida (Pinilla *et al.*, 2013). Los huevos se colectaron a partir del sustrato alimenticio, posteriormente, se colocaron en frascos de vidrio con nuevo sustrato alimenticio estéril y se cubrió la boca del frasco con velos esterilizados. Una parte de las larvas se emplearon en el mantenimiento de la colonia, otra se utilizó en el proceso de extracción de las excreciones y secreciones larvales para evaluar actividad antibacterial, y finalmente un número importante de larvas se usaron periódicamente para los tratamientos de terapia larval.

4.2 Colonia *L. sericata*.

Los huevos y larvas de la especie *L. sericata* requeridos para los diversos ensayos, se extrajeron de una colonia previamente establecida en el laboratorio de Entomología Médica y Forense de la Universidad del Rosario (Rueda *et al.*, 2010). El mantenimiento de la misma, se desarrolló en jaulas Gerber de 45x45x45cm en las mismas condiciones controladas de temperatura y humedad que *S. magellanica*. Para la continuidad de los individuos, se suministró hígado como sustrato para oviposición y alimento de las larvas. Una vez las larvas iniciaron la fase de prepupa se colocaron en arena hasta la emergencia de los adultos y de esta forma dar continuidad al ciclo de vida de la especie.

4.3 Animales de Experimentación

Para la evaluación *in vivo*, como biomodelo experimental en los ensayos de terapia larval, se emplearon 12 conejos Nueva Zelanda, machos de 70 días, los cuales permanecieron por 7 días en cuarentena y acondicionamiento, estos a su vez fueron divididos en 4 grupos de tres individuos cada uno: los dos primeros grupos fueron tratados con larvas de *L. sericata* y *S. magellanica*, el grupo 3 se le administró antibiótico y el grupo 4 se estableció como control negativo ambiental. Todos los animales permanecieron en un área previamente esterilizada en el Bioterio Central de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional sede Bogotá. Durante los experimentos los animales se mantuvieron separados en jaulas acondicionadas con comida y agua “*ad libitum*”. Para el manejo de los animales antes, durante y después de los procesos experimentales, se tuvo en cuenta la debida sedación, anestesia y analgesia. Durante el desarrollo del trabajo se tuvo en cuenta la Ley 84 de 1989 para el uso de animales de experimentación y las normas éticas para investigación sin riesgos de acuerdo con la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia. Previamente se obtuvo la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad del Rosario. Durante todo el proceso se midieron diariamente los consumos de alimento y agua para verificar el buen estado de los animales. Una vez finalizados los tratamientos los conejos se sacrificaron, mediante la inyección de Euthanex® previa sedación, al día 23 de realizada la herida, y se les retiró el páncreas para su respectivo análisis histopatológico.

4.4 Inducción de Diabetes.

Para lograr que todos los animales experimentales fueran susceptibles a desarrollar heridas crónicas, una vez superada la cuarentena, se les indujo diabetes, mediante la inoculación vía endovenosa de Alloxan® marca Sigma A7413 en dosis de 150 mg/kg, según el protocolo de Wang (Wang *et al.*, 2010). Este promueve el daño de las células beta del páncreas y desencadena retraso en la cicatrización normal de las heridas. El mismo día de la inoculación de la droga, se realizó seguimiento de los niveles de glucosa en sangre (NGS) a los conejos, cada hora durante 12 horas, mediante la punción con lanceta en la vena marginal de la oreja y toma de una gota de sangre con el

glucómetro FastCheck®; en los casos en que se presentó hipoglucemia, por debajo de 70mg/dl, se suministró a cada animal 10ml de dextrosa vía subcutánea y 10ml de glucosa oral hasta estabilizar los NGS por encima de 100mg/dl, según el mismo protocolo antes indicado. Para el manejo de la diabetes, se continuo monitoreando diariamente la medida de glucosa y se aplicaron dosis diarias de insulina, acorde a los NGS, cuando estos fueron mayores a 400mg/dl, así: (1) NGS= 400–500 mg/dl recibieron 2 U/kg, (2) NGS = 500–600 mg/dl recibieron 3U/kg, y (3) NGS > 600 mg/dl recibieron 4 U/kg) (Wang *et al.*, 2010), la insulina se manejó hasta el día del sacrificio de los animales de experimentación.

4.5 Elaboración de la herida.

La elaboración de la herida se realizó 3 días después de la inducción de la diabetes, tomando este día como el número 1 para las evaluaciones macroscópicas y tomas de biopsia. A cada conejo se le efectuó, previa sedación y anestesia con Ketamina 30mg/kg y Xilacina 5mg/kg y luego de la correspondiente rasurada, una herida en el dorso caudal a la cabeza de 4x4 cm², mediante la cual se retiró una porción de piel y el pániculo adiposo subcutáneo. Al cuarto día de elaborada la herida a los conejos, se inoculó en ésta 2 ml de una suspensión mixta de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) y *S. aureus* (ATCC 29213) en concentración de 5x10⁶ unidades formadoras de colonia (CFU)/mL, con el propósito de generar la colonización bacteriana y promover la cronicidad de las heridas.

4.6 Tratamientos en el modelo animal.

Previo a la aplicación de los tratamientos, se preparó la herida cubriéndola con Fixomull®, para facilitar la acción larval. Todos los tratamientos se iniciaron al día 7 después de efectuada la herida. Para los grupos de tratamiento con terapia larval (1 al 2): sobre la herida de cada espécimen, y luego de aplicar sobre la lesión 5 larvas de primer estadio por cm², se cubrió ésta con un dispositivo rectangular de 1cm de grosor. y encima se colocaron los apósitos, teniendo el cuidado de posibilitar la difusión de oxígeno hacia la herida. El vendaje se retiró junto con las larvas a las 48 horas, mediante lavados con solución slaina, estas fueron sacrificadas y desechadas en solución de hipoclorito de sodio al 10%. Al grupo (3) se le administró el antibiótico

ZooFloxin® tableta, dosificando 50mg cada 12 horas por 7 días; este antibiótico estuvo en dependencia del resultado que arrojó el antibiograma para las cepas bacterianas. Al grupo control negativo (4) no se les aplicó ningún tratamiento larval.

4.7 Antibiograma.

Para la selección del antibiótico contra *S. aureus* se realizó la prueba de Kirby-Bauer, la cual permitió evaluar los siguientes antibióticos: Clindamicina, Oxacilina, Ciprofloxacina, Erythromycina, Vancomicina, Cephalothin y para *P. aeruginosa* se evaluaron: Aztreonam, Ceftriaxone, Ciprofloxacina y Gentamicina (Louie & Cockerill, 2001). El antibiograma se efectuó en agar Mueller- Hinton y se leyó el diámetro del halo de inhibición (mm) para determinar, con las tablas de equivalencias correspondientes a cada cepa, si hubo sensibilidad o resistencia frente a los antibióticos probados, previa inoculación con una suspensión estándar de la bacteria correspondiente a 10^6 microorganismos viables/ml de caldo. La escogencia del antibiótico a trabajar, en el modelo animal y como control positivo para las pruebas antimicrobianas de las ES, dependió del resultado que arrojó este ensayo, el cual se desarrolló de acuerdo con los procedimientos descritos por el *Clinical Laboratory Institute Standards* (CLSI).

4.8 Desinfección de huevos de las dos especies de moscas necrófagas.

Los huevos de ambas especies, se les efectuó por separado, un proceso de asepsia, que se inició al tomar grupos de 100 a 200 huevos colectados de las colonias. Los huevos embrionados se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5%, con agitación continua durante 5 minutos, luego se pasaron por formaldehído al 5% durante otros 5 min. Finalmente, se lavaron tres veces con agua estéril con antibiótico al 1% (Penicilina y Estreptomicina) por 3 minutos. Los huevos desinfectados en su superficie fueron transferidos a cajas de Petri estériles que contenían agar sangre en capa fina, aquí ocurrió la eclosión de las larvas, previa incubación de los huevos a 27°C por 18 horas, adicionalmente, se verifico la ausencia de bacterias en el agar, para corroborar la esterilidad de las larvas. Estas larvas, correspondientes a cada una de las especies, se aplicaron en los tratamientos de las heridas en los grupos de conejos 1 y 2 de acuerdo con lo indicado anteriormente.

4.9 Evaluación macroscópica de las lesiones.

Al día 7, antes de aplicar los tratamientos, se realizó, para cada animal, una evaluación del estado de la lesión. Posteriormente se continuaron los seguimientos y evaluaciones los días 9, 13, 16, 20 y 23. Todas las imágenes se analizaron con el software ImageJ®, delimitando el área de la herida. El porcentaje de reducción en el tamaño de la misma se calculó siguiendo la fórmula: $\text{Área inicial} - \text{Área final} / \text{Área inicial} * 100$ (Coelho *et al.*, 2013). Adicionalmente, las observaciones macroscópicas, se anotaron teniendo en cuenta las escalas PUSH, DPI y Wollina 2002, para valorar la lesión en todas sus fases. La escala PUSH (Pressure Ulcer Scale for Healing) evaluó el tamaño, cantidad de exudado y tipo de tejido en la herida, mediante el registro de puntajes de 0 a 10 de acuerdo con la Figura 3 (www.npuap.org), y tomando como el mayor valor alcanzable un puntaje de 17, indicativo del mal aspecto de la herida y como valor deseable los valores cercanos a 0. Para la escala Wollina se tuvo en cuenta la presencia de edema, cantidad de exudado, mal olor, inflamación y tejido de granulación, asignándoles puntajes de 0= ausente, 1= leve, 2= moderado y 3=abundante. Finalmente, para la escala DPI (Debridment Performance Index), las variables que se tuvieron en cuenta incluyeron la presencia de callo, aspecto de la piel circundante y tejido del lecho de la herida, asignándose los valores siguientes: 1= ausente, 2= tejido no viable blanco/gris y/o escara no adherida amarilla, 3= escara amarilla poco adherida, 4= escara negra suave o adherida, 5= escara negra firmemente adherida.

LENGTH X WIDTH (in cm ²)	0 0	1 < 0.3	2 0.3 – 0.6	3 0.7 – 1.0	4 1.1 – 2.0	5 2.1 – 3.0	Sub-score
		6 3.1 – 4.0	7 4.1 – 8.0	8 8.1 – 12.0	9 12.1 – 24.0	10 > 24.0	
EXUDATE AMOUNT	0 None	1 Light	2 Moderate	3 Heavy			Sub-score
TISSUE TYPE	0 Closed	1 Epithelial Tissue	2 Granulation Tissue	3 Slough	4 Necrotic Tissue		Sub-score
							TOTAL SCORE

Figura 3. Parámetros para medición de variables según las escala PUSH.

4.10 Análisis dermohistopatológicos.

Se tomaron 3 biopsias de las lesiones en el tiempo, antes (día 7) y después (día 9) de los tratamientos y al día final 23. Las biopsias de piel de las lesiones, se tomaron previa anestesia del área con 0,6ml de lidocaína intradérmica. Posteriormente, se realizaron placas dermohistopatológicas de cada biopsia, las cuales fueron fijadas y luego coloreadas con hematoxilina-eosina. Se desarrolló, en los análisis, un sistema de puntuación que incluyó el recuento de células inflamatorias en 10 campos elegidos al azar a una magnificación de 100x. Para verificar inflamación crónica, se realizaron los conteos de las células inflamatorias: heterófilos, histiocitos, linfocitos, y células plasmáticas, de igual forma se produjo un resultado general por lámina, discriminando por cada una de las etapas de la cicatrización: inflamación (presencia de células inflamatorias), proliferación (aparición de fibroblastos), remodelación (formación de fibras de colágeno, lamina basal).

4.11 Análisis microbiológico.

Cuando los animales presentaron signos de colonización bacteriana, ésta fue confirmada mediante estudios microbiológicos (Louie & Cockerill, 2001), así: a las 48 horas se tomaron muestras de la secreción de la herida infectada de cada animal con la ayuda de hisopos estériles, luego se sembraron en agar sangre, finalmente se incubaron a 37°C por 18 horas, este procedimiento se repitió al momento de retirar los tratamientos larvales para verificar si se presentaba o no disminución bacteriana. También, se realizaron frotis directos, tomados de las lesiones, sobre láminas portaobjetos desengrasadas, donde se fijaron, y posteriormente se realizó la tinción de Gram. Este proceso finalizó con la observación microscópica de las muestras. Después de 2 días de inoculados los animales con las bacterias, se iniciaron los respectivos tratamientos, asignados a los grupos correspondientes (Rey *et al.*, 2008).

4.12 Extracción de las ES de ambas especies de mosca.

Para la evaluación *in vitro*, las ES fueron colectadas de larvas de tercer estadio, de acuerdo con el procedimiento descrito por Van der Plas *et al.*, 2008. La identificación del estadio se realizó mediante la observación y conteo de los espiráculos posteriores larvales, tomando como tercer estadio la presencia de 3 espiráculos. Aproximadamente

200 larvas fueron desinfectadas siguiendo el mismo procedimiento realizado para los huevos. Luego del lavado en agua con antibiótico, fueron sumergidas en 0.5 ml de PBS y se incubaron a 25°C por 1 hora. El PBS con las ES larvales fue removido y centrifugado por 10 minutos a 12500 g. En esta forma, se pudo conservar congelado a –70°C hasta su utilización. Para ser usadas, las ES fueron diluidas en PBS para preparar las diferentes concentraciones a ensayar: 800µg/ml en diluciones seriadas 1:2. Se llevó a cabo la susceptibilidad de las cepas bacterianas a las ES larvales de *S. magellanica* comparadas con *L. sericata*. La adición de las diferentes concentraciones de las ES larvales se realizó sobre una solución bacteriana a concentración de 5×10^6 UFC/mL de acuerdo con los procedimientos descritos por el CLSI para evaluar susceptibilidad sobre un inóculo final de 5×10^5 UFC/ml (Wiegand *et al.*, 2008) y se sembró dicha mezcla en medio de cultivo Mueller Hinton para verificar inhibición de crecimiento bacteriano.

4.13 Cuantificación de las ES por BCA.

Una vez extraídas las ES, se cuantificaron con el ensayo Pierce ®BCA Protein Assay Kit 23225, siguiendo las instrucciones del fabricante. Este procedimiento se realizó para llevar las diluciones a evaluar a las concentraciones especificadas (800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 µg/ml).

4.14 Estandarización de curvas de crecimiento.

Se realizaron curvas de crecimiento para las cepas *S. aureus* (ATCC 29213) y *P. aeruginosa* (ATCC 27853). Para la obtención de colonias aisladas, las bacterias fueron sembradas por agotamiento en medio de cultivo agar Mueller-Hinton, e incubadas toda la noche a 37 °C. Posteriormente, se tomaron 4 colonias morfológicamente similares y se inocularon en 5 mL de medio de cultivo LB a 37 °C en constante agitación. Se tomaron medidas de absorbancia en densidad óptica (OD) a 595 nm cada hora durante 14 h. Con estos resultados se conoció el tiempo en que las bacterias alcanzaron su fase exponencial, estableciéndose así el período de incubación requerido para la elaboración de los posteriores ensayos antibacteriales.

4.15 CMI por difusión en agar.

Se adicionaron, por separado, 25 mL de las bacterias a evaluar a una concentración de 5×10^6 UFC/mL, a 250 mL de medio Tripticasa de soya (TSB) bajo en nutrientes (0.03%

TSB, 1% agarosa, 0.02% Tween 20), la mezcla se sirvió en cajas de Petri. Después de solidificado el medio se realizaron pozos de 4mm de diámetro y se colocaron en cada uno de ellos 10µL de las diferentes concentraciones de las ES a evaluar. Estas cajas fueron incubadas a 37°C por 1 hora para permitir la difusión de las ES. Posteriormente, se cubrió el medio con 10 mL de TSB nutritivo (6% TSB, 0.02% Tween 20 y 1% agarosa) para posibilitar el crecimiento bacteriano y se incubó a 37°C durante 16 horas. La concentración mínima inhibitoria se determinó por medición del diámetro del halo de inhibición alrededor de cada pozo, este se expresó como Unidades de Actividad (UA) siguiendo la relación 0.1 mm = 1 UA (Lozano & Cuca 2008). Se utilizó ciprofloxacina a una concentración de 50 µg/ml y PBS sobre las bacterias, como control positivo y negativo, respectivamente. Los ensayos se realizaron por triplicado.

4.16 Concentración mínima inhibitoria (CMI) por Turbidimetria.

Se evaluaron diluciones seriadas 1:2 de las ES, derivadas de las especies *S. magellanica* y *L. sericata*, iniciando con un rango de concentración de proteínas de 800 µg/mL hasta 12,5 µg/mL. Posteriormente, estas diluciones de las ES en un volumen de 150 µL se colocaron en placas de 96 pozos, luego se adicionaron, por separado, 15 µL de cada una de las cepas bacterianas a una concentración de 5x10⁶ UFC/mL. Las placas se incubaron a 37 °C por 16 h y se determinó la CMI, la cual correspondió a la menor cantidad de concentración de proteínas, a partir de las ES, que inhibió el crecimiento bacteriano. Los ensayos se realizaron por triplicado. Como control positivo se utilizó Ciprofloxacina a una concentración de 50 µg/ml sobre pozos conteniendo las bacterias y como control negativo medio LB con las respectivas soluciones bacterianas.

4.17 Cinética bactericida de las ES.

La cinética bactericida se evaluó utilizando la CMI encontrada para las dos bacterias con las ES de las moscas evaluadas. En una caja de 96 pozos, se incubaron a 37°C 100 µl de las ES con 10µl de las cepas bacterianas 5x10⁶ UFC/mL por separado, y se realizaron lecturas de OD a 595 nm, durante 12 horas cada hora. De forma simultánea se midieron las bacterias sin presencia de ES.

4.18 Determinación de las UFC con la CMI.

En una placa de 96 pozos se sembraron 20 μ L de las CMI, establecidas por turbidimetría y difusión en agar, con 2 μ L de las cepas bacterianas seleccionadas a una concentración de 5×10^6 UFC/mL, posteriormente, esta placa fue llevada a incubación a 37 °C; a partir de cada uno de los pozos se tomaron alícuotas de la mezcla CMI/bacteria en diferentes tiempos de incubación (0, 1, 2, 3 y 4 horas), se diluyeron serialmente para hacer posible el conteo y luego se efectuó la siembra uniforme en agar MH. El conteo se realizó para determinar el número de UFC/mL. Finalmente, se incubó a 37 °C durante 18 horas. Los ensayos se realizaron por triplicado. Como control positivo se sembraron bacterias, similar al procedimiento anterior, pero en ausencia de ES.

4.19 Evaluación citotóxica de las ES en la línea celular de fibroblastos MRC5.

La línea celular de fibroblastos MRC5 (células derivadas de pulmón humano) se mantuvieron en medio de cultivo RPMI y SFB al 10%, permanecieron en incubación a 37°C en una atmosfera con 5% de CO₂. Cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia, fueron lavadas con PBS y desprendidas con tripsina para ser transferidas a otro frasco de cultivo y continuar así su crecimiento en medio fresco. La citotoxicidad fue evaluada en placas de 96 pozos, siguiendo el protocolo de MTT (3-(4, 5-dimetiltiazol-2-yl)-2, 5-difenil tetrazolium bromide) (ATCC® 30-1010K, 2011). Para registrar el número de células, éstas se tiñeron con azul de tripan y se contaron en cámara de Neubauer. Se sembraron 20.000 células por pozo, y se incubaron a 37°C con atmósfera de CO₂ por 18 horas. Luego de la adherencia celular, se adicionaron en pozos separados y diferenciados 20 μ l de ES, disueltos en medio de cultivo, derivadas de ambos tipos de moscas en las diferentes concentraciones a evaluar. Se tuvieron como controles negativos pozos con concentración tóxica de DMSO y como control positivo pozos con medio de cultivo, todos estos se incubaron a 37°C durante 48 horas. Luego de la incubación se adicionó a cada pozo 50 μ l de MTT (1mg/ml) y se incubó por 4 horas. Posteriormente la solución de MTT se removió y el sustrato fue disuelto en 150 μ l de DMSO. Finalmente, se midió la absorbancia, usando un lector de Elisa, a 570 nm. Se determinó el porcentaje de viabilidad siguiendo la fórmula: % Viabilidad = DO

células tratadas / DO células control x 100. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

4.20 Análisis estadístico.

La base de datos se construyó en Excel Version 2007, la depuración y procesamiento de los datos se realizó en el programa SPSS, Version 20.0 y Stata Version 11.1. Las pruebas estadísticas se evaluaron a un nivel de significancia al 5% ($p < 0,05$). Todos los datos cuantitativos se analizaron inicialmente con estadística descriptiva, y luego se estableció normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilks ($\alpha 0,05$).

Para determinar si los tratamientos presentaban diferencias significativas, las mediciones de área de la herida y las variables histológicas se analizaron mediante la prueba estadística de Kruskal-Wallis ($\alpha 0,05$). Para determinar si los tratamientos por actividad antibacterial presentaron diferencias, se aplicó estadística no paramétrica, con una regresión logística ordenada en el programa Stata 11.1.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Inducción de diabetes

Las mediciones efectuadas para el control de glucosa, antes del procedimiento, registraron valores promedios de 100,7 (± 47) mg/dL. Los niveles de glucosa luego de la inoculación del Alloxan® estuvieron por encima de los 180 mg/dL, lo cual es considerado como diabetes (Huralikuppi, 1991), estos niveles se mantuvieron hasta el final del estudio (Figura 4).

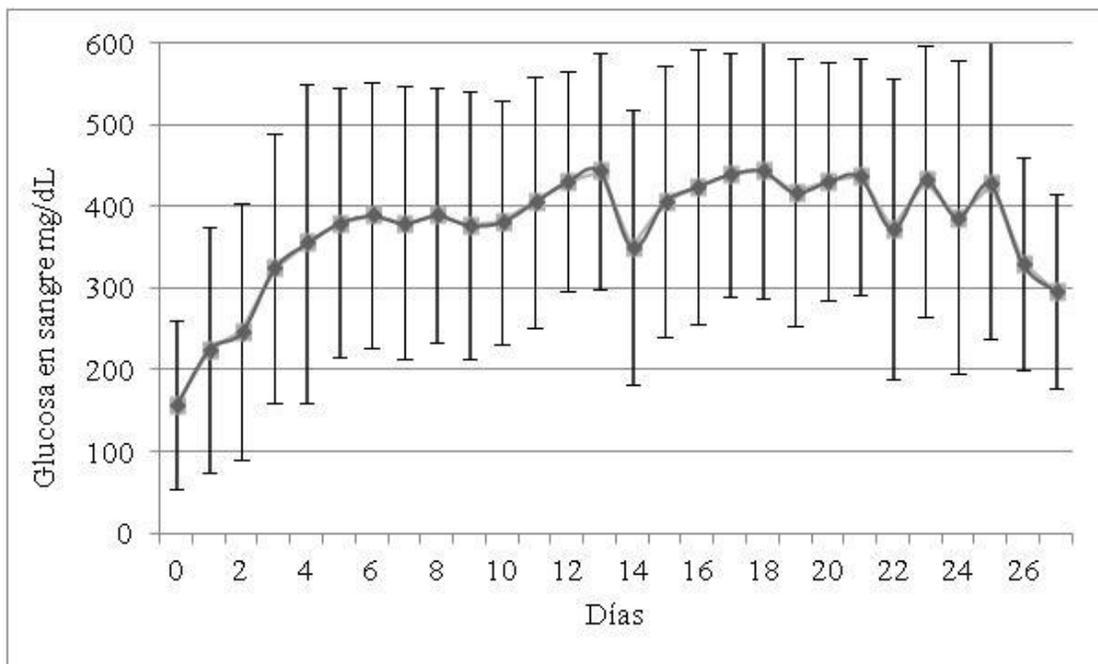


Figura 4. Hiperglicemia debida a la inducción de diabetes tipo I con Alloxan®. Los datos representan el valor promedio \pm desviación estándar (DS).

Los análisis anatomopatológicos mostraron alteraciones, evidenciándose disminución de los islotes de Langherhans y necrosis celular parcial del páncreas, en un estado subclínico compatible con la vida (Figura 5)

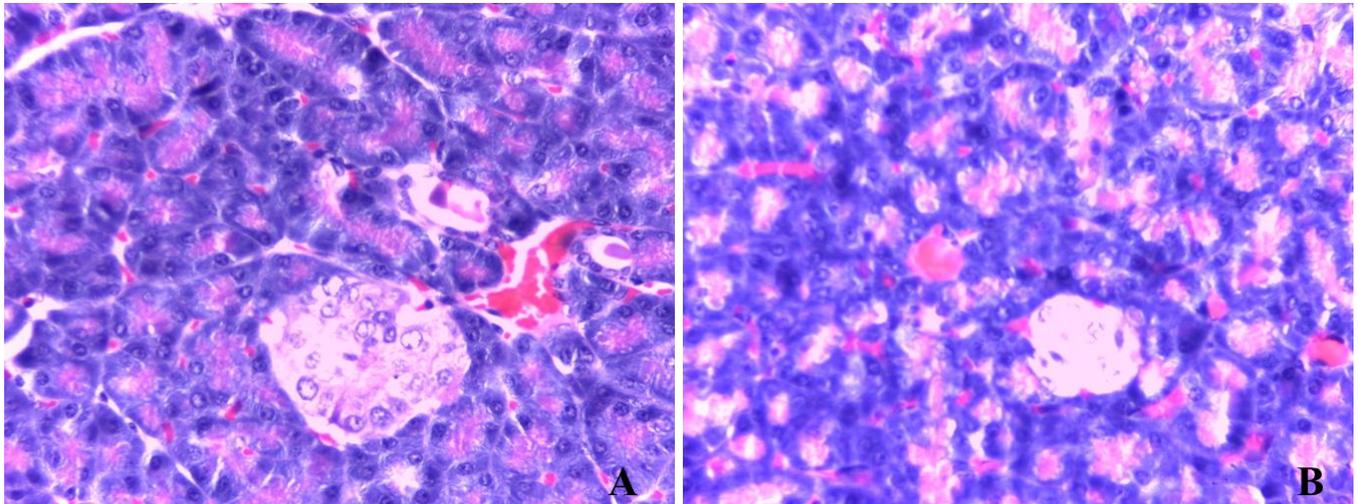


Figura 5. Histopatología del páncreas sano (A) y diabético (B), que presenta disminución de islotes de Langerhans y menor número de células beta al interior de los islotes.

5.2 Microbiológicos

Todos los antibióticos evaluados en el antibiograma presentaron halo de sensibilidad, sin embargo se escogió la ciprofloxacina (CIP5) debido a sus facilidades para aplicación (oral), tiempo de dosificación (cada 12 horas) y sensibilidad frente a las dos bacterias a evaluar tanto *in vitro* como *in vivo*.

Tabla 2. Sensibilidad obtenida frente a los antibióticos probados con las bacterias *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

Antibiótico	Halo inhibición (mm)	Sensible (S) - Resistente (R)
<i>S. aureus</i>		
DA2	27	S
OX1	21	S
CIP5	29	S
CF30	28	S
E15	27	S
VA30	18	S

<i>P. aeruginosa</i>		
CAZ30	30	S
ATM30	30	S
CRO30	27	S
CIP5	39	S
GM10	24	S

Los cultivos microbiológicos, confirmaron la presencia bacteriana de *P. aeruginosa* y *S. aureus* en todos los animales del estudio. De igual forma, el resultado de la evaluación de los frotis validó el estado de inflamación e infección de las heridas, observándose la presencia de macrófagos y cocos Gram + y bacilos Gram –, antes de la aplicación de los tratamientos (Figura 6).

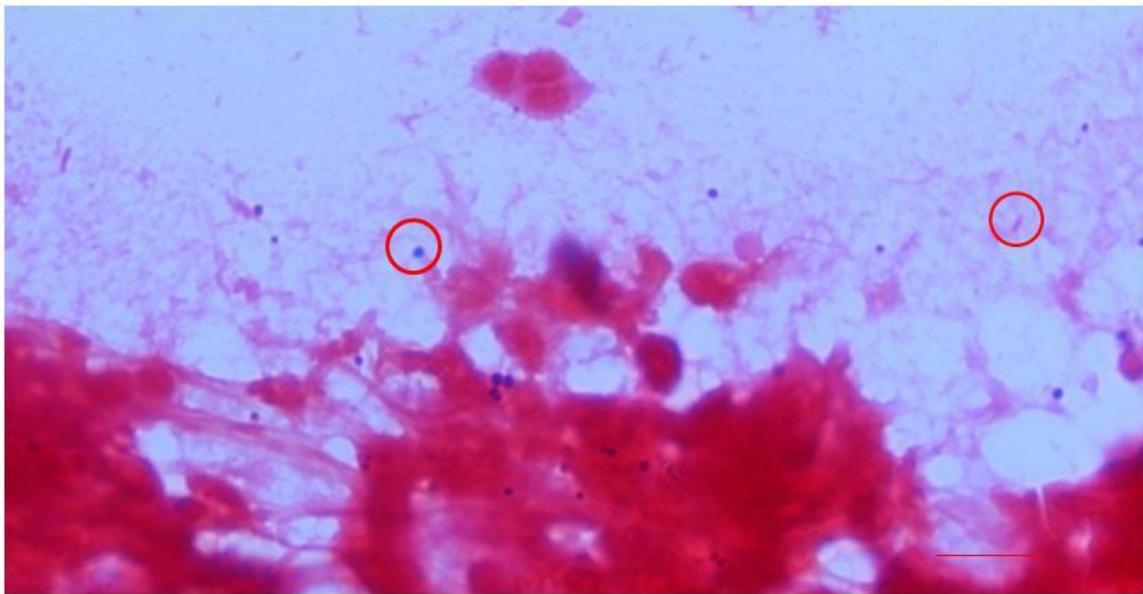


Figura 6. Frotis microbiológico, se observan cocos Gram + y bacilos Gram –.

Luego de las 48 de aplicación de los tratamientos, el análisis microbiológico no mostró crecimiento de bacterias para los tratamientos de terapia larval (grupo 1 y 2); sin embargo, si hubo un registro en el conteo bacteriano, correspondiente a 16500 UFC de *S. aureus* y de 17000 UFC de *P. aeruginosa* para el grupo control negativo, en tanto que

para el grupo antibiótico se observó disminución bacteriana, estableciéndose un conteo de 1900 UFC de *S. aureus* y de 2300 UFC de *P. aeruginosa*.

5.3 Macroscópicos

El tiempo de curación de los grupos tratados con terapia larval fue más corto, comparado con los grupos antibiótico y control negativo. Al día 9, luego de la aplicación de los tratamientos, se observó que los primeros en aparecer tejido de granulación fueron los animales tratados con terapia larval, de igual forma sus heridas registraron mayor debridación y menor exudado (Figura 7).

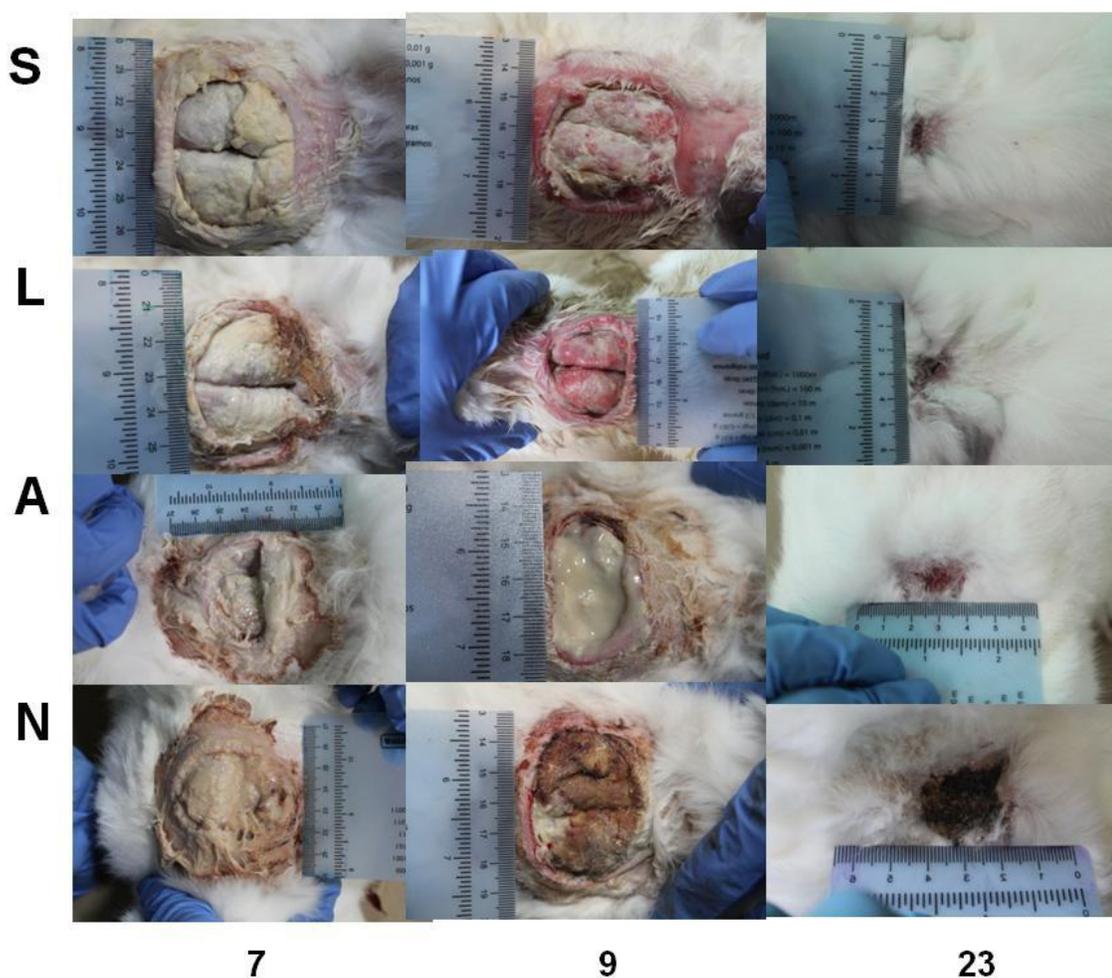


Figura 7. Superficie dorsal de las heridas de los conejos a los días 7, 9 y 23 antes y luego de la aplicación con los distintos tratamientos: S terapia larval con *Sarconesiopsis magellanica*, L terapia larval con *Lucilia sericata*, A antibiótico, N control negativo.

Hacia el día 23 se observó en los animales tratados con terapia larval un área mayor, casi completa de cicatrización de las heridas (95%), comparadas con el grupo de antibiótico, en tanto que el control negativo mantuvo aún abierta la herida. Las secuencias en los días de evaluación de las heridas, correspondientes a los diferentes grupos en el proceso de cicatrización, se observan en la Figura 7. La cicatrización de las heridas de los grupos tratados con terapia larval no presentaron entre ellos, 1 y 2, diferencias significativas ($p=0,939$) (Figura 8).

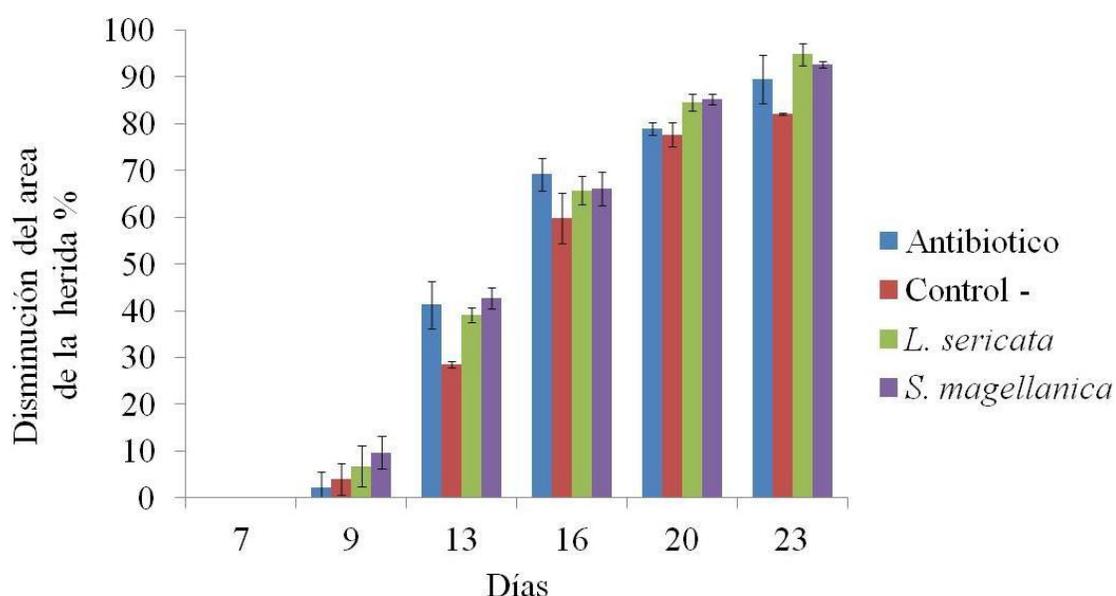


Figura 8. Porcentaje de contracción de las heridas por día. Los datos representan el valor promedio \pm DS.

De los resultados macroscópicos en el modelo diabético, los tratamientos con terapia larval con *S. magellanica* y *L. sericata* mostraron mejores resultados comparado con los grupos controles. Esto coincide con reportes previos en donde se compararon terapias convencionales, incluida la aplicación de antibióticos, con la terapia larval con *L. sericata* y *L. cuprina* (Sherman, 2003; Paul *et al.*, 2009) y se obtuvieron los mejores resultados con bioterapia, permitiendo la aparición temprana de tejido de granulación y ayudando a que la herida saliera de su estado de inflamación crónica, avanzando así, en

el proceso de cicatrización hacia las demás fases hasta la completa cicatrización, se han reportado algunas sustancias excretadas por *L. sericata* como alantoina (2,5-Dioxo-4-imadazolidinil úrea) o bicarbonato de amonio (Robinson, 1935; 1940) podrían ser los responsables del crecimiento de tejido de granulación. En efecto, Robinson (1935), usando estas sustancias en las heridas demostró estimulación en el crecimiento local del tejido de granulación, es posible que en las ES larvales de *S. magellanica* estén también presentes estas sustancias.

Los óptimos resultados obtenidos con terapia larval derivada de *S. magellanica* también se deben a la oxigenación que se da en el tejido lesionado, gracias al debridamiento que ejercen las larvas al moverse sobre el lecho de la herida, lo cual se ha reportado inicialmente para *L. sericata* (Buchman & Blair, 1932; Jones & Thomas, 2000; Wollina 2002). Otro factor que aporta beneficios a la curación de las heridas con terapia larval, es la simbiosis que se da con *Proteus mirabilis*, comensal del intestino de las larvas y facilitador de la acción antibacterial (Greenberg, 1968), lo cual se observó al día 9, luego de la aplicación de los tratamientos larvales.

En las escalas de evaluación macroscópica de la herida se observó que los tratamientos larvales al día 9, comparados con el tratamiento negativo, presentaron mayores cambios al disminuir el valor de su puntuación (Figura 9); así mismo, en la escala PUSH, al día 23, se registró la curación más avanzada estableciéndose los menores puntajes en los tratamientos de los grupos con terapia larval de *L. sericata* 4,8 y de *S. magellanica* 4,3. En la escala Wollina *et al.* 2002 se determinó una notable mejoría luego de los tratamientos larvales al día 9 para los tratamientos larvales, pasando de puntajes de 12 a 9, también se evidenció una disminución inicial de los valores para todos los tratamientos hasta el día 16, a partir del cual empezaron a incrementar solo los tratamientos larvales, a diferencia de lo observado en la escala DPI, en donde al finalizar la evaluación macroscópica no se observaron diferencias entre tratamientos, pero si en los primeros días de evaluación; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos larvales en ninguna de las escalas evaluadas: PUSH ($p=0,989$), Wollina *et al.* 2002 ($p=0,751$) y DPI ($p=0,390$).

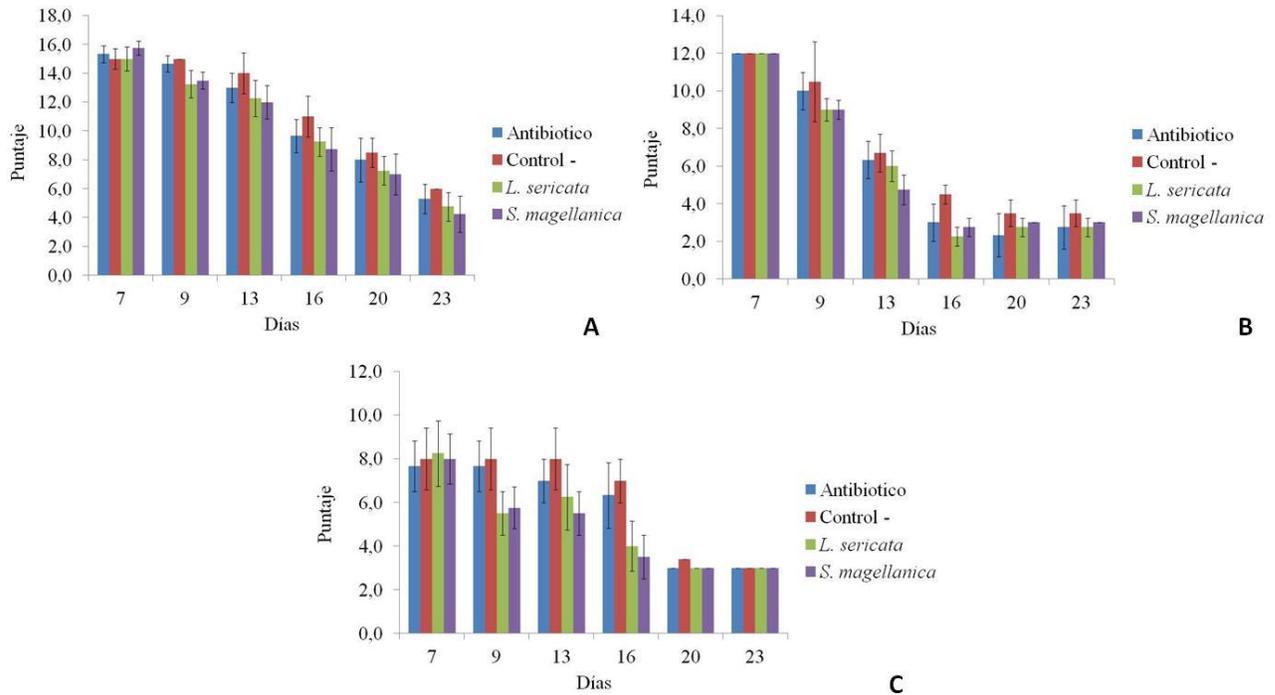


Figura 9. Puntaje total de las escalas de evaluación de la cicatrización: A. PUSH, B. WOLLINA ET AL. 2002, C. DPI. Los datos representan el valor promedio \pm DS.

En relación con las escalas utilizadas para evaluar el progreso de la herida, la única que permitió registrar con claridad el avance de la herida hacia la cicatrización fue la escala PUSH. Este parámetro de medición adicionalmente permitió encontrar mayores diferencias biológicas en los tratamientos aplicados, quizás en parte, debido a que esta involucra no solo la apariencia de la herida sino también la variable del área. En las otras escalas no se tuvo en cuenta esta variable, debido a esto probablemente se alcanzó a observar un solapamiento de los registros y no fue posible evidenciar de forma clara la mejoría de la herida por tratamiento, pues inicialmente, estas dieron puntajes altos por la presencia abundante de exudado y hacia el final de las evaluaciones, a pesar de la disminución del exudado en algunos tratamientos, los puntajes se mantienen por la aparición del tejido de granulación.

El presente estudio validó la curación de heridas con terapia larval con *S. magellanica* en un modelo animal diabético. Son amplias las investigaciones que aplican la terapia larval

en modelos animales, sin embargo nunca se había trabajado con esta especie y tampoco en modelos diabéticos; se han trabajado diferentes larvas en pacientes diabéticos obteniendo resultados positivos en la curación de heridas crónicas cutáneas (Stoddard *et al.*, 1995; Sherman, 1997; Thomas *et al.*, 1999; Kerridge *et al.*, 2005; Téllez *et al.*, 2012). Los efectos benéficos de las larvas sobre las heridas se producen debido a la acción de varias sustancias que ellas secretan y excretan, participando en tres mecanismos fisiológicos diferentes: debridamiento, actividad antimicrobiana y estimulación del tejido de granulación, la articulación de todo el proceso conduce finalmente a la cura y cicatrización de las lesiones cutáneas (Parnés & Lagan, 2007), como se demostró en el estudio los tratamientos larvales al día 23 fueron los únicos en alcanzar el 95% de cicatrización de la herida, evidenciando así los beneficios de esta terapia.

Adicionalmente, se ha demostrado la efectividad antibacterial mediante evaluación *in vitro* de ciertas sustancias principalmente péptidos de bajo peso molecular, catiónicos, que cumplen esta función en las excreciones y secreciones larvales (Bexfield *et al.*, 2004; 2008; Kerridge *et al.*, 2005; Huberman *et al.*, 2007), contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, tales como *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus luteus* y *P. aeruginosa* (Kerridge *et al.*, 2005; Huberman *et al.*, 2007), recientemente se comprobó la efectividad antibacterial *in vitro* con la especie *S. magellanica* arrojando mejores resultados que *L. sericata* (Díaz *et al.*, sometido). Adicionalmente, *S. magellanica* puede ser una especie más promisorio pues no se han presentado reportes de miasis cutánea lo que si se ha encontrado para *L. sericata* (Mateos *et al.*, 1990), teniendo en cuenta lo anterior, la terapia larval con esta especie, puede ser indicada como alternativa terapéutica para el proceso de curación de heridas.

5.4 Histopatológicos

Los tratamientos al día 7 (primera biopsia) presentaron un valor promedio de $198,5 \pm 38$ heterófilos (Figura 10), para la segunda biopsia estos datos disminuyeron para los tratamientos con antibiótico y control negativo, mientras que los tratamientos larvales se

mantuvieron. El registro en número de histiocitos, se mantuvo en la primera biopsia con un valor promedio de $29,5(\pm 13)$ para la totalidad de los tratamientos, no obstante se observó un incremento para el grupo tratado con *S. magellanica*, que hacia la tercera biopsia aumento a un valor de $105,5(\pm 33)$. El promedio de linfocitos antes de los tratamientos fue de $26,3(\pm 8,6)$, luego de retirados todos los tratamientos, se encontró que los tratamientos larvales en la biopsia 2, presentaron una disminución en cantidad de linfocitos. En cuanto a las células plasmáticas, antes de los tratamientos el conteo se encontró alrededor de $16,2(\pm 8,9)$, las demás biopsias presentaron valores bastantes cercanos para todos los tratamientos; sin embargo, se observó un incremento para la última biopsia en el grupo antibiótico. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ($p=0,363$), evidenciando así que la herida permaneció a lo largo del estudio en su estado de cronicidad.

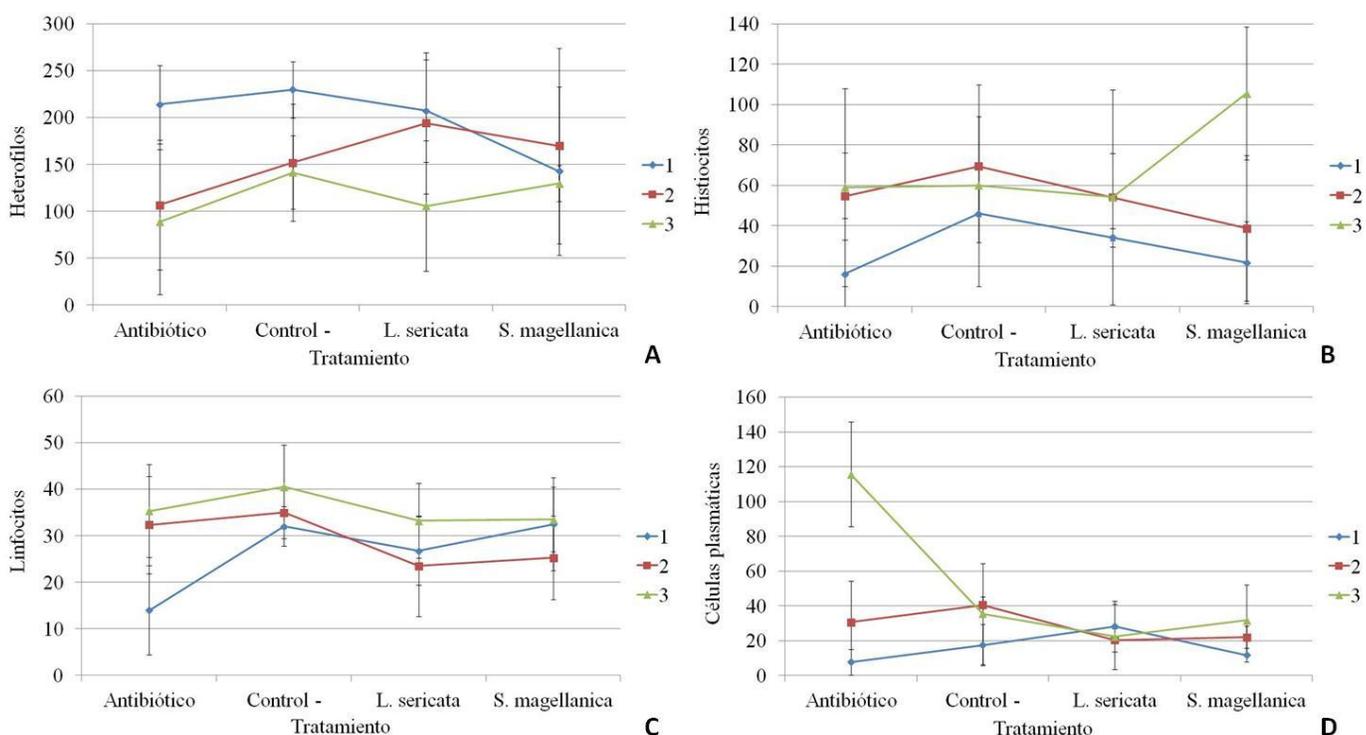


Figura 10. Número de células inflamatorias por tratamientos en diferentes tiempos de evaluación: A. heterófilo, B. histiocito, C. linfocito, D. células plasmáticas. Biopsia 1, 2 y 3 corresponden a los días 7, 9 y 23 respectivamente. Los datos representan el valor promedio \pm DS.

La evaluación por etapa de cicatrización indicó que todos los tratamientos al día 7 se encontraron en la fase inicial de cicatrización (Figura 11), confirmando así, mediante sus características, la inflamación general de las heridas en los animales (Figura 12). En el día 9 solo los tratamientos larvales avanzaron hacia la fase intermedia de proliferación, presentando tejido de granulación, el tratamiento con *S. magellanica* presentó algunos individuos más avanzados hacia la etapa de regeneración epitelial. En el día 23 todos los tratamientos se identificaron en la fase final de la cicatrización, sin embargo el grupo control presentó evidencia un estado de transición entre la etapa de proliferación y regeneración. Se registraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p=0,014$).

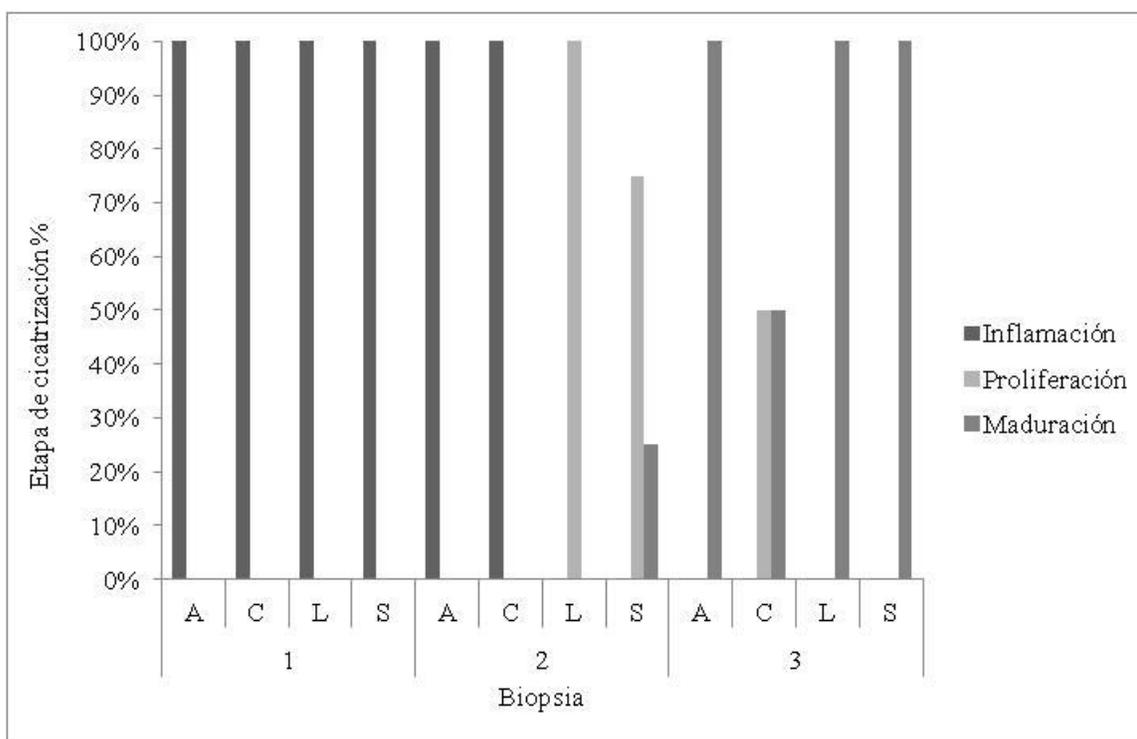


Figura 11. Etapa de cicatrización por biopsia, según el tratamiento aplicado. Antibiótico (A), Control negativo (C), *L. sericata* (L), *S. magellanica* (S).

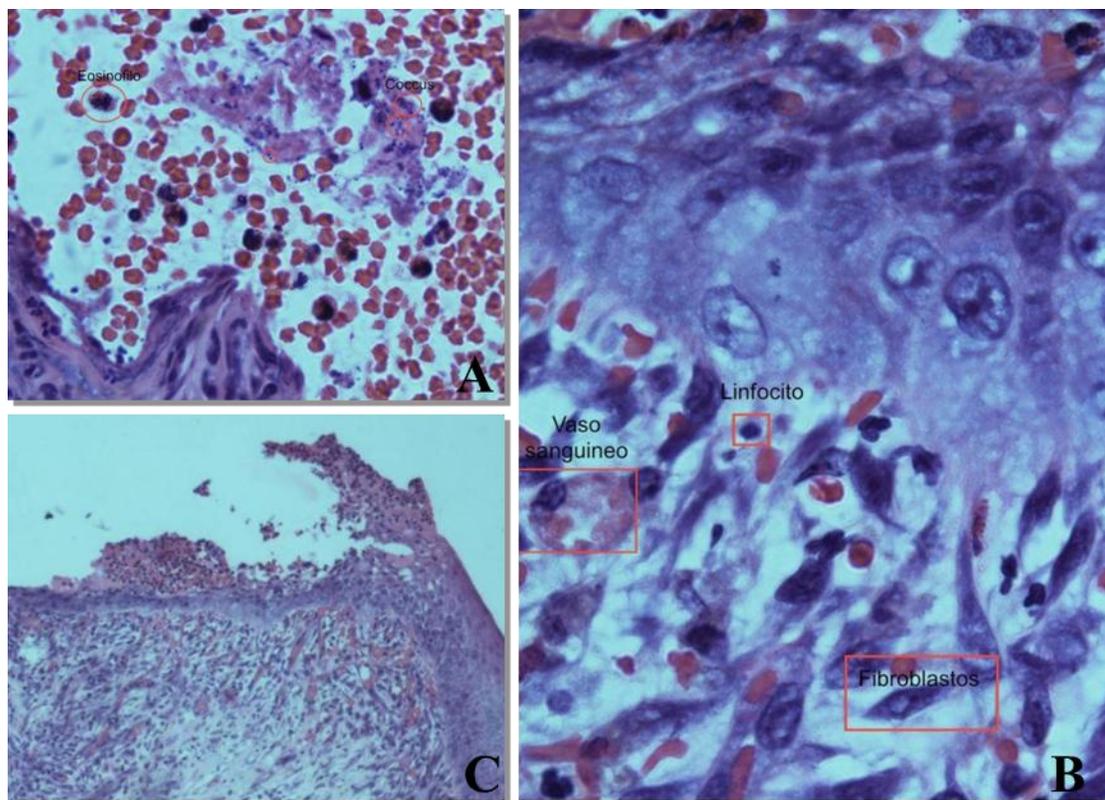


Figura 12. Observación histológica de las biopsias en los diferentes tratamientos. A. Células inflamatorias al día 7 para todos los tratamientos. B. Proliferación al día 9 para los tratamientos larvales, aparición de fibroblastos. C. Etapa de remodelación al día 23 para todos los tratamientos, con formación de la lámina basal.

A nivel microscópico, los tratamientos de los grupos con terapia larval mostraron una rápida cicatrización, alcanzando de forma temprana el proceso regenerativo. Estos tratamientos no registraron diferencias significativas por conteo celular, sin embargo al observar el diagnóstico general histopatológico, sí hubo una cicatrización más avanzada en los animales tratados con *S. magellanica*, en relación con los demás tratamientos. Adicionalmente, se observó que el conteo de heterófilos permaneció constante para las dos primeras biopsias en los tratamientos larvales, mientras que en los controles este valor disminuyó, lo cual pudo ser debido a la acción quimiotóxica de las proteínas presentes en las excreciones y secreciones (ES) larvales, las cuales atraen células inflamatorias permitiendo que el conteo celular se mantenga estable para esta biopsia.

Chambers y colaboradores (Chambers *et al.* 2003), indicaron que cuando las larvas son introducidas en heridas necróticas, ellas potencialmente influyen en los eventos de la cicatrización de la herida con proteasas presentes en las ES las cuales están involucradas en la remodelación de los componentes de la matriz extracelular, de igual forma se ha sugerido que estas son liberadas durante el debridamiento, al observar heridas tratadas con terapia larval (Schmidtchen *et al.* 2003) y que estas estimulan el crecimiento y la división celular (Sherman 2002).

5.5 Cuantificación de proteína por Acido bicinoninico (BCA).

La totalidad de los extractos de las ES para *L. sericata* arrojaron cuantificaciones promedio de proteína de 1369,24 (± 18) $\mu\text{g/mL}$, a diferencia de lo encontrado para *S. magellanica* cuyos extractos cuantificados, mostraron lecturas menores de proteína 1074,8 (± 29) $\mu\text{g/mL}$, sin encontrar diferencias entre las especies ($p=0,060$).

5.6 Estandarización de curvas de crecimiento.

Las curvas de crecimiento para las bacterias *S. aureus* y *P. aeruginosa* fueron estandarizadas en medio LB, para conocer el tiempo en el cual alcanzaron su fase exponencial. Se encontró que *S. aureus* y *P. aeruginosa* lo hicieron pasadas las 4 horas de incubación. Estos tiempos de incubación se tuvieron en cuenta para activar los inóculos en los ensayos posteriores.

5.7 CMI por difusión en agar.

Se encontró que la CMI para *P. aeruginosa* con las ES de *L. sericata* fue de 200 $\mu\text{g/mL}$ y de 100 $\mu\text{g/mL}$ con *S. magellanica*. Además, se determinó la CMI para *S. aureus* con un registro de 100 $\mu\text{g/mL}$ usando las ES derivadas de las dos moscas evaluadas. Se encontraron diferencias significativas por moscas ($p=0,002$). No se obtuvo halo de inhibición en las concentraciones 50, 25 y 12,5 $\mu\text{g/mL}$ con ninguna de los dos insectos seleccionados. De igual forma, no hubo halo inhibitorio al incubar 100 $\mu\text{g/mL}$ de las ES de *L. sericata* con *P. aeruginosa* (Figura 13).

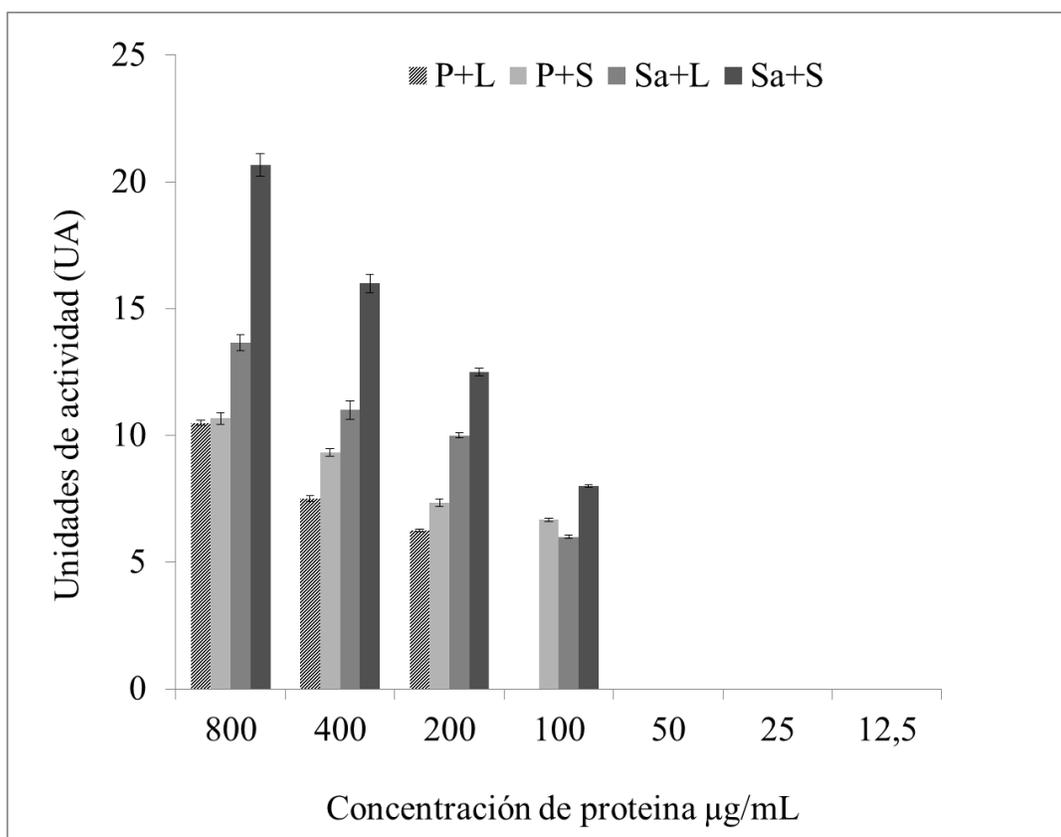


Figura 13. Unidades de actividad (UA) encontradas para *P. aeruginosa* (P) y *S. aureus* (Sa) incubadas con las ES de las especies de mosca *L. sericata* (L) y *S. magellanica* (S).

No se dio inhibición en las concentraciones de 50, 25 ni 12,5 µg/mL. Se encontraron diferencias significativas por moscas ($p=0,002$). Los datos representan el valor promedio \pm DS.

Al comparar los resultados de la actividad antibacteriana de las ES derivadas de las moscas *S. magellanica* y *L. sericata*, es evidente que ambas especies demostraron efectividad en los tratamientos contra las bacterias seleccionadas, no obstante la cantidad de proteína de *S. magellanica* que se requirió para el mismo resultado fue menor ($p=0,060$). Sin embargo, también se registraron notables diferencias. Así por ejemplo, mediante la técnica de difusión en agar la CMI que se determinó para *P. aeruginosa*, después de los tratamientos con las ES obtenidas a partir de larvas de *L.*

sericata, fue de 200 $\mu\text{g/mL}$, mientras que para estos mismos propósitos solo se necesitaron 100 $\mu\text{g/mL}$ (CMI) de las concentraciones proteicas derivadas de *S. magellanica*. Con base en lo anterior, se puede inferir que las ES de *S. magellanica* serían más efectivas contra bacterias Gram-negativas que las obtenidas de la otra especie de mosca, lo cual en cierta forma, y con algunas variables, coincide con los resultados registrados en trabajos previos (Thomas *et al.* 1999b, Kerridge *et al.* 2005) donde se demostró limitada actividad antibacteriana in vitro de las ES larvales de *L. sericata* contra bacterias Gram-negativas. No obstante lo anterior, donde se hace más notoria la diferencia entre las dos especies con la técnica de turbidimetría, en razón a que la CMI, a partir de las concentraciones de proteínas evaluadas correspondientes a *L. sericata*, en los tratamientos contra ambas especies de bacterias fue de 100 $\mu\text{g/mL}$, en tanto que con las ES de *S. magellanica* la CMI correspondió al valor de 50 $\mu\text{g/mL}$. Esta diferencia cobra mayor relevancia si tenemos en cuenta que la técnica de turbidimetría es recomendada como la más segura para investigar actividad antibacteriana (Rippere 1979, Cazander *et al.* 2009, Teh *et al.*, 2013). Por lo tanto, es evidente que las ES larvales de *S. magellanica* tuvieron una mayor efectividad comparadas con las derivadas de *L. sericata*. Asimismo, por UFC se activa la reducción de colonias de *P. aeruginosa* con ES larvales de *S. magellanica* en proteínas 100 mg / ml, mientras que la CMI con las ES derivadas de *L. sericata* se obtuvo la reducción de colonias con el doble de la concentración, lo que demuestra una vez más que las ES larvales de *S. magellanica* fueron más efectivas que las ES derivadas de *L. sericata*.

5.8 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por Turbidimetría.

Con esta técnica se estableció, en los controles positivos, que el crecimiento para *S. aureus* sin excreciones y secreciones (ES), luego de 16 horas de incubación registró una lectura de absorbancia promedio de 0.91 ± 0.16 , mientras que para *P. aeruginosa*, en dichos controles, el crecimiento bacteriano fue menor con una lectura de 0.68 ± 0.02 DO. Por otro lado, la evaluación de las ES larvales mostraron actividad antimicrobiana frente a Gram-positivas a una CMI de 100 $\mu\text{g/mL}$ con las sustancias derivadas de *L. sericata*, en tanto solo se requirió una CMI de 50 $\mu\text{g/mL}$ a partir de *S. magellanica*. Así mismo, para

la otra cepa Gram-negativa se obtuvo también una CMI con 100 $\mu\text{g/mL}$ de las ES de *L. sericata* y de 50 $\mu\text{g/mL}$ con las diluciones evaluadas de *S. magellanica*, mostrando esta última mayor efectividad al inhibir las bacterias con menor requerimiento en la concentración de proteínas; se encontraron diferencias significativas entre las ES de las moscas evaluadas ($p=0,000$) y entre las concentraciones de ES utilizadas ($p=0,000$) (Figura 14).

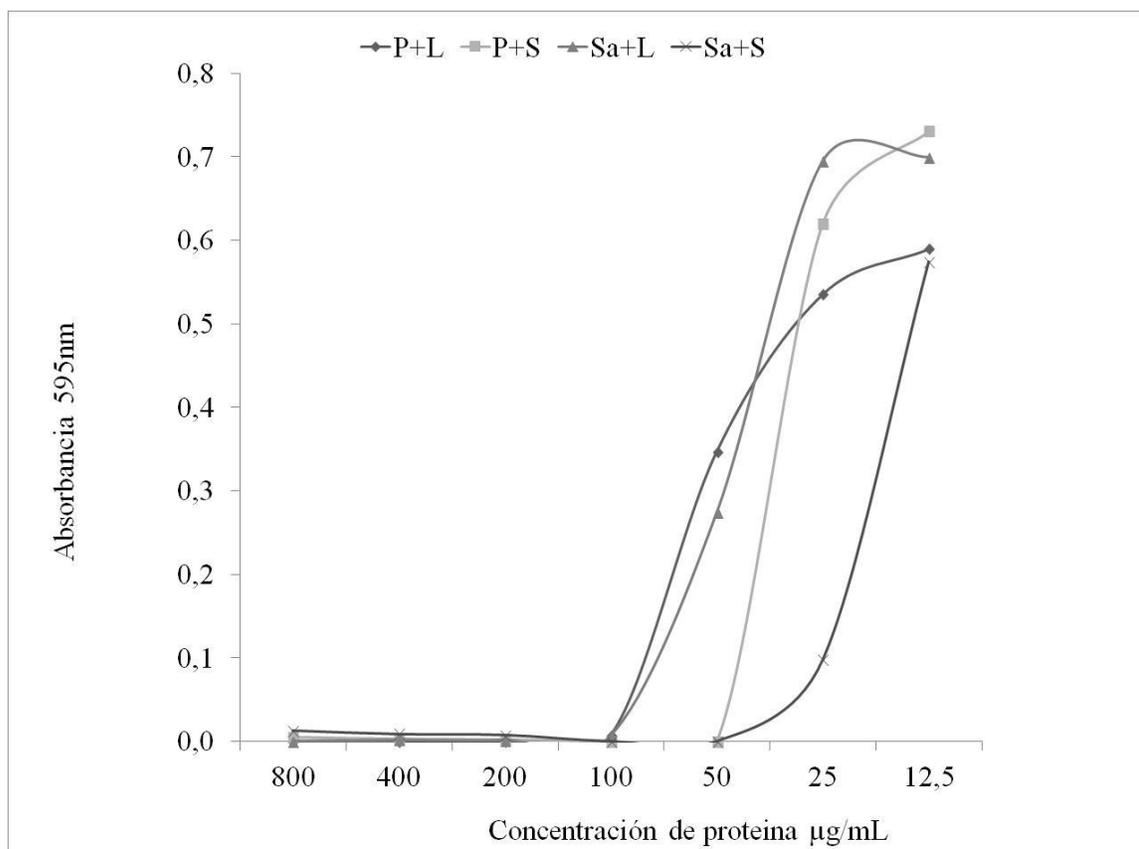


Figura 14. CMI por dilución en caldo. *P. aeruginosa* (P) y *S. aureus* (Sa) fueron incubadas con ES de las especies de mosca evaluadas *L. sericata* (L) y *S. magellanica* (S). Se encontraron diferencias significativas por ES de las moscas evaluadas ($p=0,000$).

Las bacterias evaluadas, Gram-positiva (*S. aureus*) y Gram-negativa (*P. aeruginosa*), fueron por igual inhibidas en su crecimiento por las ES larvales derivadas de *S. magellanica*, de acuerdo con las CMI registradas en cada una de las técnicas empleadas.

Este hecho es concordante con los trabajos pioneros realizados por Simmons (1935 a,b), Pavillard & Wright (1957) y más recientemente por Kerridge *et al.* (2005), van der Plas *et al.* (2008), Bexfield *et al.* (2008), Jaklic *et al.* (2008), Cazander *et al.* (2009) y Harris *et al.* (2009), quienes demostraron actividad antimicrobial contra ambas clases de bacterias. Sin embargo, en otros trabajos previos (Steenvoorde & Jukema, 2004; Bowling *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 1999b; Kawabata *et al.*, 2010) establecieron que la actividad antibacterial de las ES larvales de algunas moscas necrófagas es más efectiva contra bacterias Gram-positivas que contra Gram-negativas. También, diferentes registros sobre este mismo tópico son reportados por Barnes *et al.*, (2010), los cuales indicaron que la jerarquía en la susceptibilidad de tres diferentes especies de bacterias frente a las ES de *L. sericata* mostró el orden siguiente: *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Estos resultados, en donde aparecen las dos primeras especies de bacterias Gram-negativas más susceptibles a los efectos de las ES larvales que la Gram-positiva, están en desacuerdo con los mencionados anteriormente. Aunque algunos autores han sugerido que los resultados no concordantes u opuestos podrían ser debido a los procedimientos utilizados, tanto para extraer las ES larvales como también por los técnicas empleadas para determinar la actividad antibacterial (Barnes *et al.*, 2010).

5.9 Cinética bactericida de las ES.

Luego de evaluar en el tiempo (en intervalos de 1 hora) el comportamiento de las CMI, determinadas a partir de los métodos anteriores, se encontró, a partir de las lecturas de DO, que estas concentraciones mantienen su actividad inhibitoria frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas a lo largo del tiempo evaluado (14 horas) (Figura 15).

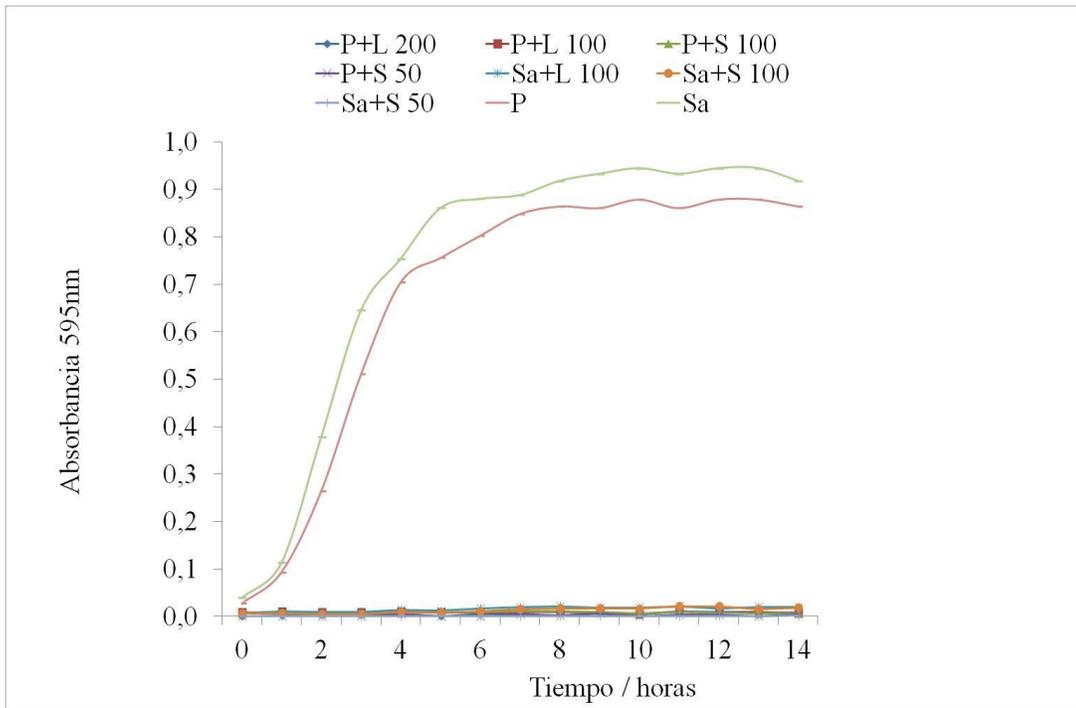


Figura 15. Cinética de la actividad inhibitoria para las diferentes concentraciones de ES de *L. sericata* (L) y *S. magellanica* (S) encontradas como CMI frente a las dos cepas bacterianas *P. aeruginosa* (P) y *S. aureus* (Sa).

5.10 Determinación de las UFC con la CMI.

Se observó reducción de las colonias de *S. aureus* luego de 1 hora de incubación con las ES de *L. sericata* y *S. magellanica* a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, el valor equivalente del conteo de las UFC/ml correspondió a 5-log. Por otro lado, la disminución de colonias de *P. aeruginosa* ocurrió entre las 2 y 3 horas de incubación, utilizando 200 $\mu\text{g/mL}$ de ES de *L. sericata* y 100 $\mu\text{g/mL}$ de ES de *L. sericata* y *S. magellanica* respectivamente. La reducción de las UFC/ml para esta bacteria fue de aproximadamente 2-log cada hora. No se observó reducción de colonias de la cepa *S. aureus* con la CMI de 50 $\mu\text{g/mL}$ derivada de *S. magellanica*. En ausencia de exposición de las bacterias a las ES, a las 4 horas de incubación, las UFC registraron un valor de 6-log. Se encontraron algunas diferencias por cepas bacterianas; sin embargo, estas no fueron significativas ($p=0.086$), así mismo se registraron diferencias significativas por

concentración y tiempos de incubación ($p=0.017$ y $p=0.000$), pero no por especie de moscas ($p=0.786$) (Figura 16).

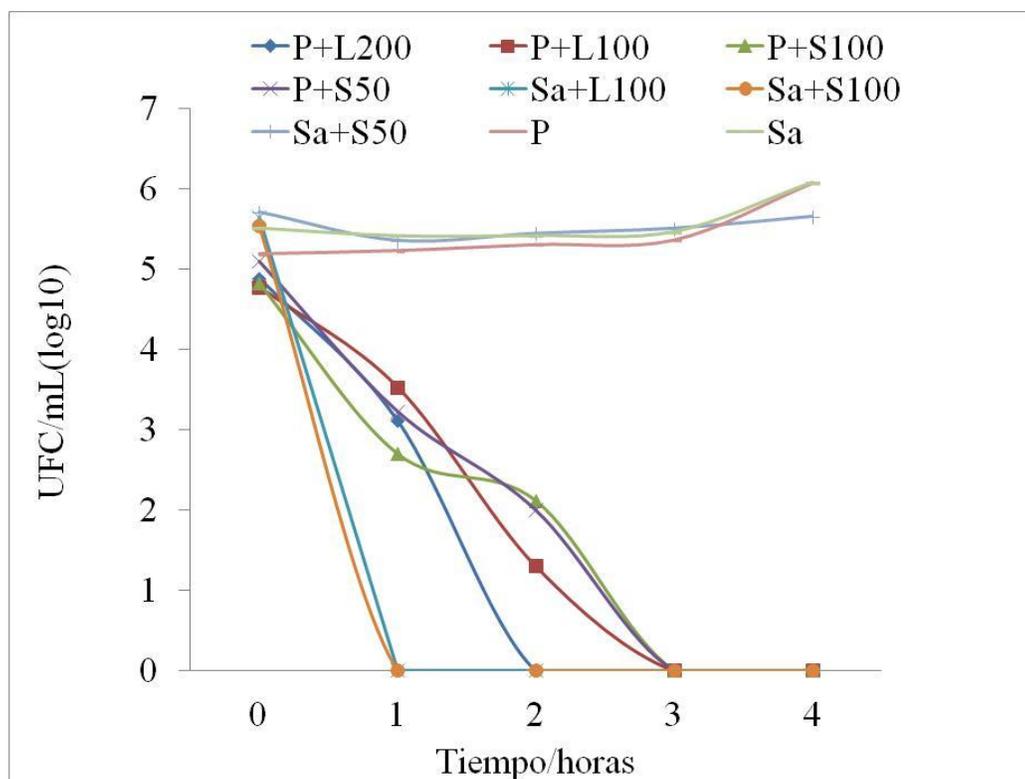


Figura 16. UFC de las dos cepas bacterianas *P. aeruginosa* (P) y *S. aureus* (Sa) incubadas con la CMI de las ES de *L. sericata* (L) o *S. magellanica* (S). No se encontraron diferencias por cepas bacterianas, ni por mosca, pero si por concentración y tiempos de incubación respectivamente ($p=0.086$; $p=0.786$; $p=0.017$ y $p=0.000$). Los datos representan el valor promedio \pm DS.

En el presente estudio se pudo demostrar, mediante las pruebas utilizadas, difusión en agar, turbidimetría y unidades formadoras de colonia (UFC), que las ES larvales de *S. magellanica* poseen potente actividad antibacterial contra las bacterias *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Además, en general se estableció que la eficacia de los resultados en los tratamientos contra dichas bacterias estuvo en dependencia de las diluciones más altas.

Sin embargo, la CMI fue de 100 $\mu\text{g/mL}$ (ensayos sobre difusión en agar y UFC) y 50 $\mu\text{g/mL}$ (ensayos con turbidimetría).

5.11 Determinación de la citotoxicidad en fibroblastos MRC5.

No se encontró disminución de la viabilidad celular, para ninguna de las ES de las dos especies de mosca evaluadas (Figura 17), esto coincide con lo reportado previamente para *L. sericata*, especie para la cual no se encontró disminución de viabilidad a ninguna de las concentraciones evaluadas desde 0,1 $\mu\text{g/mL}$ a 100 $\mu\text{g/mL}$ (Wang *et al.* 2010a). Al observar el potencial antimicrobiano y compararlo con la viabilidad observada, esta situación, en general, permite inferir que las ES larvales de *S. magellanica* contienen, al igual que las ES de otras moscas necrófagas evaluadas en trabajos previos, las moléculas necesarias para desarrollar actividades bacteriostáticas y bactericidas (Cazander *et al.*, 2010; Cazander *et al.*, 2009; Daeschlein *et al.*, 2007), sin dañar la viabilidad del tejido, al observar que no se presentó toxicidad en ninguna de las concentraciones.

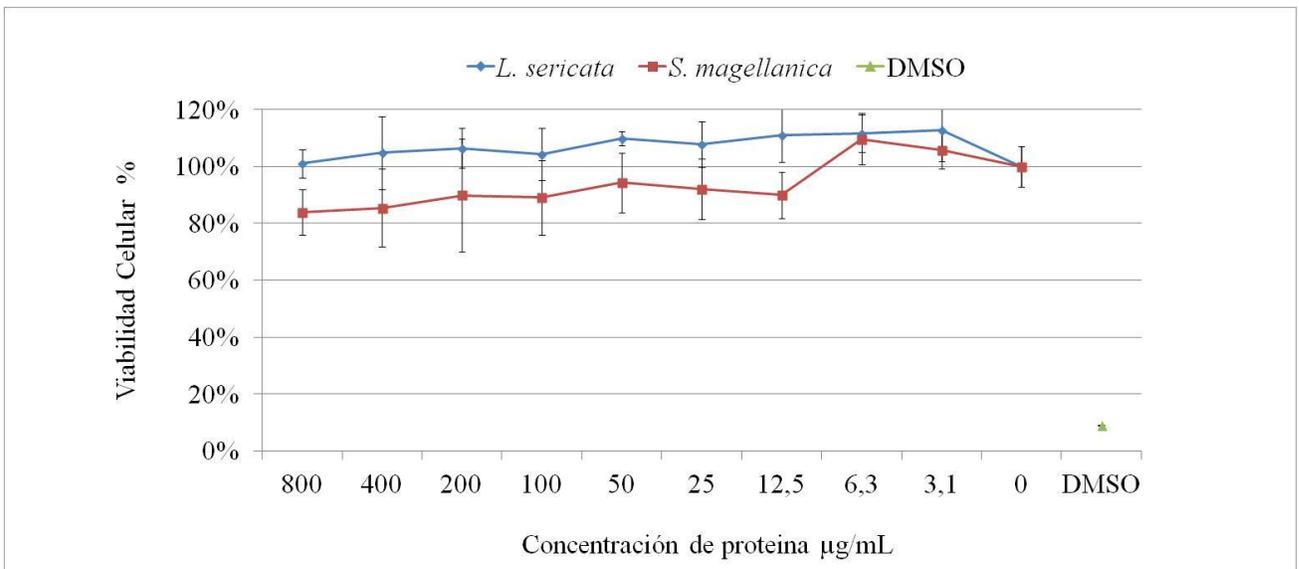


Figura 17. Viabilidad celular en fibroblastos MRC5 con las diferentes concentraciones de ES de las especies de mosca evaluadas. No se encontraron diferencias significativas entre las moscas evaluadas ($p=1.000$). Los datos representan el valor promedio \pm DS.

Aunque el mecanismo de acción antibacterial, aun no es claro (Zhang *et al.*, 2013), en *L. sericata* se ha demostrado que sus secreciones contienen una variedad de compuestos alcalinos, incluyendo carbonato de amonio, calcio, alantonina y úrea que inhiben el crecimiento bacteriano (Robinson, 1940; Simmons, 1935a, b). Así mismo, se ha establecido en estudios relativamente recientes que sustancias orgánicas de bajo peso molecular, presentes en las ES larvales, estarían implicadas en actividades bacteriostáticas (Bexfield *et al.*, 2004; Huberman *et al.*, 2007; Kerridge *et al.*, 2005). Es probable que algunas de estas mismas sustancias o una combinación sinérgica de ellas, en las ES de la especie de mosca evaluada en el presente trabajo, sean las responsables de ejercer la acción antibacterial en un medio externo, por demás, no favorable para el crecimiento microbiano debido a su pH fuertemente alcalino (Bexfield *et al.*, 2004).

En el presente trabajo se usaron, en los ensayos correspondientes, números iguales de larvas de estadio III de ambas especies de moscas para obtener las ES, debido a que la producción de estas sustancias en el estadio mencionado es mayor comparado con los primeros estadios larvales, tal como ha sido registrado en trabajos previos (Cazander *et al.*, 2009). De acuerdo con Cazander *et al.* 2010, en un estudio de evaluación in vivo de las ES de larvas de estadio I y III sobre la actividad antibacterial en biopelículas, encontraron mayor reducción de este material con las ES larvales de estadio III. Aunque la concentración de proteínas fue igual en las ES de ambos estadios larvales, los autores sostienen que las larvas de último estadio producen una mayor cantidad de las ES, lo cual a su vez explicaría una mayor efectividad en la reducción de las biopelículas. En nuestra investigación, a pesar de que hubo una mayor concentración de proteínas en las ES larvales de *L. sericata*, posiblemente por el mayor tamaño y peso de sus larvas, al tomarse concentraciones iguales en los tratamientos contra las bacterias se demostró para la mayoría de los ensayos una acción antibacterial más potente de las ES larvales derivadas de *S. magellanica*. Por otro lado, es importante resaltar que la desinfección de las larvas se efectuó en el estadio III y no desde la fase de huevo, tal como ha ocurrido en otros trabajos (Bexfield *et al.*, 2004; Kerridge *et al.*, 2005), lo cual pudo haber potenciado el efecto antibacterial de las ES larvales debido a la respuesta inmune inducida previamente en el ambiente contaminado en el que se desarrollaron las larvas

(Kawabata *et al.*, 2010), para el presente caso, desde la eclosión de larva hasta el estadio en que fueron utilizadas.

De manera general se ha descrito en otros trabajos la presencia de defensinas en las ES de *L. sericata*, es posible que debido a que presentaron similares efectos antibacterianos, las ES de *S. magellanica* puedan contener entre algunos de sus péptidos estas defensinas. Se conoce que una de las más estudiadas es la llamada lucifensina cuya masa molecular se encuentra en los 4114 Da (Kruglikova A, 2011). De igual forma, es posible que las ES de *S. magellanica* tengan presentes otros péptidos antimicrobianos como los reportados para *C. vicina*, entre las que se encuentran algunas dipterocinas y cecropinas (Chernysh & Gordja, 2011). Sin embargo, a pesar que aún no se conocen con claridad la mayoría de los componentes responsables de la actividad antibacteriana, es posible que las ES de *S. magellanica*, tengan presentes otros componentes ya reportados como oligopeptidos (Bexfield *et al.*, 2004) y algunos desinfectantes (Jaklic *et al.*, 2008).

Adicionalmente, puede que el mecanismo de acción de la bioterapia, más específicamente el que se refiere a la actividad antibacteriana, no solo sea debido a los componentes presentes en las ES de *S. magellanica*, sino que adicionalmente varios de estos resultados observados *in vivo* e *in vitro*, como ya ha sido previamente reportado por Greenberg para otras especies, sean debidos y producidos por el comensal *P. mirabilis*; aunque no se han realizado estudios que confirmen esta simbiosis con *S. magellanica* es posible que este comensal también albergue en el intestino de las larvas de esta mosca, pues ya se ha reportado en otros individuos de la familia Calliphoridae (Jaklic *et al.*, 2008). Por otro lado, esta acción antibacteriana *in vivo* se ve también reforzada, debido al pH ácido del intestino medio de las larvas, que con el paso de los microbios, a través del tracto digestivo, tiene efecto bactericida en organismos Gram-positivos y Gram-negativos (Greenberg, 1986; Mumcuoglu *et al.*, 2001).

Como se ha demostrado en varios estudios *in vitro*, los componentes presentes en las ES son los mayores responsables de la actividad antibacteriana; sin embargo, el movimiento de las larvas de *S. magellanica* a través de la herida se torna importante, debido a que

puede afectar de forma considerable las bacterias, en especial cuando se forma en las heridas biofilm, ayudando así a la remoción del tejido, destrucción del biofilm y a facilitar que antibióticos penetren la herida exponiendo las bacterias a su acción (Costerton *et al.*, 1994; Jaklic *et al.*, 2008).

6. CONCLUSIONES

La inducción con Alloxan® fue una metodología exitosa, que generó diabetes como enfermedad de base, permitiendo la cronicidad de las heridas generadas.

A nivel del análisis microbiológico realizado para cada uno de los grupos experimentales; se logró en los tratamientos larvales, la no formación de colonias bacterianas.

Los grupos larvales demostraron mayor efectividad en el desbridamiento de heridas, alcanzando en menor tiempo, la etapa de proliferación celular, y avanzando así en la cicatrización.

Se demostró que tanto las larvas de *S. magellanica* como las de *L. sericata* mostraron avances en el proceso de cicatrización comparado con los otros grupos, sin diferencias entre ellos, evidenciando su efectividad para el cierre de heridas crónicas de difícil cicatrización.

En el presente estudio se demostró la efectividad de las ES larvales de *S. magellanica* contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, sugiriendo que esta especie de la familia Calliphoridae puede ser un modelo alternativo para usar en terapia larval.

Las ES larvales se pueden aplicar en los tejidos al observar que no presentaron ningún efecto citotóxico, por lo cual se puede aprovechar su acción antibacteriana en las heridas crónicas infectadas.

Además, en los ensayos correspondientes, con cada una de las técnicas empleadas, con particular referencia en el procedimiento de turbidimetría, se evidenció en los resultados una mejor efectividad, para inhibir crecimiento bacteriano, de las ES larvales de *S. magellanica* comparada con la especie cosmopolita más utilizada en terapia larval como lo es *L. sericata*.

Las ES larvales de la nueva especie evaluada resultan promisorias para preparar, por ejemplo, fármacos antibióticos contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

7. RECOMENDACIONES

Ensayar con otras especies de bacterias que también estén presentes en las heridas crónicas.

Evaluar y comparar el efecto de ES de larvas asépticas con ES extraídas de larvas pre inmunizadas con diferentes tiempos de incubación.

Evaluar el efecto en comunidades bacterianas mixtas y bacterias de forma independiente.

Evaluar el efecto de las ES frente a *biofilms* de diferentes bacterias.

Caracterizar y extraer péptidos antimicrobianos para evaluar su posible efecto individualmente y determinar su producción en masa.

Estandarizar el empleo del biomodelo para otros estudios de investigación aplicada en medicina.

BIBLIOGRAFÍA

1. ACA. 2004. Cartilla de la diabetes. Asociación Colombiana de Diabetes. Panamericana Formas e Impresos S.A. p156. ISBN. 958-05254-2-3.
2. Altincicek, B. & Vilcinskas, A. (2009) Septic injury-inducible genes in medicinal maggots of the green blow fly *Lucilia sericata*. *Insect Molecular Biology*, 18, 119–125.
3. Amat, E., Pape, T. & Wolff, M. (2004). Los Califóridos, Éstridos, Rinofóridos y Sarcófágidos (Diptera: Calliphoridae, Oestridae, Rhinophoridae, Sarcophagidae) de Colombia. *Biota Colombiana*. 5,(2), 201-208.
4. Amat E, Velez M, Wolff M. 2008. Clave ilustrada para la identificación de los géneros y las especies de Califóridos (Díptera: Calliphoridae) de Colombia. *Caldasia*.
5. Amorin DS, Silva C, Balbi MI. 2002 Estado do conhecimento dos dípteros neotropicais, Proyecto de red Iberomaericana de Biogeografía y Entomología Sistemática Pribes 2002. Pp. 29-36.
6. Anderson, G. 2000. Minimum and maximum development rates of some forensically important Calliphoridae (Diptera). *J. Forensic Sci.*45,(4),824-832.
7. Andersen, A.S., Joergensen, B., Bjarnsholt, T., Johansen, H., Karlsmark, T., Givskov, M. & Krogfelt, K.A. 2010. Quorum-sensing regulated virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* are toxic to *Lucilia sericata* maggots. *Microbiology*, 156, 400–407.
8. ATCC® 30-1010K. 2011. American Type Culture Collection. MTT Cell Proliferation Assay.

<http://www.atcc.org/~media/DA5285A1F52C414E864C966FD78C9A79.ashx>

(Visitado 10-10-13).

9. Baer WS. 1931. The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larva of the Blowfly). *J. Bone Joint Surg.* 13: 438-75.
10. Barnes, K.M., Gennard, D.E., Dixon, R.A., 2010. An assessment of the antibacterial activity in larval excretion/secretion of four species of insects recorded in association with corpses, using *Lucilia sericata* Meigen as the marker species. *Bulletin of entomological research* 100, 635-640.
11. Bexfield A, Bond AE, Roberts EC, Dudley E, Nigam Y, Thomas S, Newton RP, Ratcliffe NA. 2008. The antibacterial activity against MRSA strains and other bacteria of a <500Da fraction from maggot excretions/secretions of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Microbes Infect.* 10: 325-233.
12. 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 Infect.* 6: 1297-1304.
13. Bowling, F.L., Salgami, E.V., Boulton, A.J., 2007. Larval therapy: a novel treatment in eliminating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from diabetic foot ulcers. *Diabetes care* 30, 370-371.
14. Breen A, Redmond G, Dockery P, O'Brien T, Pandit A. 2008. Assesment of wound healing in the Alloxan-induced diabetic rabbit ear model. *Journal of Investigative Surgery.* 21:261-269
15. Brem, H., Tomic-Canic, M., 2007. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *The Journal of Clinical Investigation* 117 (5), 1219–1222.

16. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414: 813–820, 2001.
17. Bowler P. 1998. The anaerobic and aerobic microbiology of wounds: a review. *Wounds*. 10:170-8.
18. Buchman J, Blair JE. 1932. Maggots and their use in the treatment of chronic osteomyelitis. *Surg Gynecol Obstet*. 55:177–190.
19. Byrd, J, Castner J.. 2001. Insects of Forensic Importance. Ch. 2, p. 44-79 en: Byrd, J. y J. Castner. eds. *Forensic Entomology: The utility of arthropods in legal investigations*, CRC Press Boca Raton, Florida 418 pp.
20. Cacicedo R, Castañedo C, Cossio F, Delgado A, Fernandez B, *Et al.* 2011. Manual de prevención y cuidados locales de heridas crónicas. Editorial Servicio cántabro de Salud, 1ra edición, ISBN: 978-84-692-2677-3
21. Cazander, G., van de Veerdonk, M.C., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Schreurs, M.W., Jukema, G.N., 2010. Maggot excretions inhibit biofilm formation on biomaterials. *Clinical orthopaedics and related research* 468, 2789-2796.
22. Cazander, G., van Veen, K.E., Bernards, A.T., Jukema, G.N., 2009. Do maggots have an influence on bacterial growth? A study on the susceptibility of strains of six different bacterial species to maggots of *Lucilia sericata* and their excretions/secretions. *Journal of tissue viability* 18, 80-87.
23. Centeno N. 2002. La sinantropía de Calliphoridae (Insecta: Diptera) en Hudson, Argentina. En: Resúmenes del V Congreso Argentino de Entomología. Buenos Aires, Argentina, Marzo, 2002. pp: 433.

24. Chambers L, Woodrow S, Brown AP, Harris PD, Philips D, Hall M. 2003. Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds. *Br J Dermatol.* 148: 14–23.
25. Chan D, Fong D, Leung J, Patil N, Leung G. 2007. Maggot debridement therapy in chronic wound care. *Hong Kong Med J.* 13(5): 382-6.
26. Chernin E. 1986. Surgical Maggots. *Southern Medical Journal.* 79: 1143-45.
27. Chernysh SI & Gordja NA. 2011. Immune system of the blowworm *Calliphora vicina* (diptera, calliphoridae) as a source of medicines. *Zh Evol Biokhim Fiziol.* 47(6):444-52.
28. Church S. 1996. The traditional use of maggots in wound healing and the development of larval therapy (biosurgery) in modern medicine. *J Altern Complement Med.* 2: 525-527.
29. CLSI, 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard, third edition, M31-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
30. Coelho, Nayana Pinheiro Machado de Freitas, Nogueira, Veruska Cronemberger, Cardoso, Maria Angélica Gargione, Lopes, Luciano da Silva, Nascimento, Paulo Pedro do, Rocha, Evair dos Santos, Silva, Caio Leôncio Probo da, & Arisawa, Emília Ângela Loschiavo. 2013. *Cenostigma macrophyllum* Tul. on the healing of skin wounds in rats with Diabetes mellitus. *Acta Cirurgica Brasileira,* 28(8), 594-600.
31. Conget I. 2002. Diagnosis, classification and pathogenesis of diabetes mellitus. *Rev Esp Cardiol.* 55(5):528-35.

32. Costerton J.W, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. 1994. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol.* 176, 2137-2142.
33. Daeschlein, G., Mumcuoglu, K.Y., Assadian, O., Hoffmeister, B., Kramer, A., 2007. In vitro antibacterial activity of *Lucilia sericata* maggot secretions. *Skin pharmacology and physiology* 20, 112-115.
34. Daly H, Purcell A, Doyen J. 1998. Introduction to insect biology and diversity. Second Edition. Oxford. 493-523.
35. Davidson J. M. 1998. Animal models for wound repair, *Arch Dermatol Res.* 290 (Suppl) :S1–S11.
36. Derraik J, Heath A, Rademaker M. 2010. Human myiasis in New Zealand: imported and indigenously-acquired cases; the species of concern and clinical aspects. *Journal of the New Zealand Medical Association.* 123:1322.
37. Dunn JS, Sheehan HL, McLetchie NGB. 1943. Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. *Lancet* 244:484–487
38. Dunbar, G.K. 1944, 'Notes on the Ngemba Tribe of the Central Darling River, Western New South Wales, concluded, *Mankind*, vol. 3, no. 6.
39. Dumville JO, Worthy G, Bland M, Cullum N, Dowson C, Iglesias C, Mitchell J, Nelson A, Soares M, Torgerson D. 2009. Larval therapy for leg ulcers (VenUS II): randomized controlled trial. *BMJ*, 338:b773.
40. Florez E, Wolff M. 2009. Descripción y clave de los estadios inmaduros de las principales especies de Calliphoridae (Diptera) de importancia forense en Colombia. *Neotrop. entomol.* vol.38 no.3.

41. Giacco F, Brownlee M. 2010. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res.* October 29; 107(9): 1058–1070. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.223545.
42. Goff, M.L. 2000. A fly for the prosecution. How insects evidence helps solve crimes. Harvard University Press, Cambridge. 225p.
43. Gorus FK, Malaisse WJ, Pipeleers DG. 1982. Selective uptake of Alloxan by pancreatic B-cells. *Biochem J*;208:513-5
44. Greenberg B. 1968. Model for destruction of bacteria in the midgut of blow fly maggots. *J med Entomol.* 5, 31-38.
45. Grenier, D. & Mayrand, D. 2001. Cleavage of human immunoglobulin G by *Treponema denticola*. *Anaerobe*, 7, 1–4.
46. Hardy M. 1989. The biology of scar formation. *Physical Therapy.* 69(12): 1014-1024.
47. Harris, L.G., Bexfield, A., Nigam, Y., Rohde, H., Ratcliffe, N.A., Mack, D., 2009. Disruption of *Staphylococcus epidermidis* biofilms by medicinal maggot *Lucilia sericata* excretions/secretions. *The International journal of artificial organs* 32, 555-564.
48. Horobin A. J, Shakesheff, K. M., Woodrow S, Robinson C, Pritchard D. I. 2003 Maggots and wound healing: The effects of *Lucilia sericata* larval secretions upon human dermal fibroblasts. *Br. J. Dermatol.* 148: 923-933.
49. Hillyer F, Quesenberry H. 1997. *Ferrets: Rabbits and Rodents: Clinical medicine and surgery*, Philadelphia : W.B. Sanders.

50. Huberman L, Gollop N, Mumcuoglu KY, Breuer E, Bhusare SR, Shai Y. 2007. Antibacterial substances of low molecular weight isolated from the blowfly, *Lucilia sericata*. Med Vet Entomol; 21: 127-131.
51. Huralikuppi J.C. (1991). Antidiabetic effect of *Nelumbo nucifera* extract: Part 2. Phytother. Res., 5. 217-223.
52. Jaklic, D., Lapanje, A., Zupancic, K., Smrke, D., Gunde-Cimerman, N., 2008. Selective antimicrobial activity of maggots against pathogenic bacteria. Journal of medical microbiology 57, 617-625.
53. James MT. 1970. Family Calliphoridae. En: A Catalogue of the America South of The United Status, Sao Paulo, Museu de Zoologia da USP, Sao Paulo. Fas. 102: 88 pp
54. Jeffcoate W, Price P, Harding K. 2004. Wound healing and treatments for people with diabetic foot ulcers. Diabetes/Metabolism Research and Reviews. 20(1): S78-S89.
55. Jones M, Thomas S. 2000. Larval therapy. Nurs Stand. 14: 47-51.
56. Kawabata T, Mitsui H, Yokota K, Ishino K, Oguma K, Sano S. 2010. Induction of antibacterial activity in larvae of the blowfly *Lucilia sericata* by an infected environment.
57. Kerridge A, Lappin-Scott H, Stevens JR. 2005. Antibacterial properties of larval secretions of the blowfly, *Lucilia sericata*. Medical and Veterinary Entomology.19:333–337.

58. Kruglikova A. 2011. Antimicrobial components of Haemolymph and excretion of larvae *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera, Calliphoridae). *Journal of evolutionary Biochemistry and physiology*. 47(6):534-543.
59. Lenzen S. 2008. The mechanisms of Alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51:216–226.
60. Livingston SK. 1936. The therapeutic active principle of maggots. *J. Bone Joint Surgery*. 18: 751-756.
61. Lobmann R, Schultz G, Lehnert H. 2005. Proteases and the diabetic foot syndrome: Mechanisms and therapeutic implications. *Diabetes Care*. 28(2):461-471.
62. Loots M, Lamme E, Zeegelaar J, Mekkes J, Bos J & Middelkoop E. 1998. Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. *The Journal of Investigative Dermatology*. 111(5): 850-857.
63. Louie M, Cockerill F. 2001. Susceptibility Testing of Phenotypic and Genotypic tests for bacteria and mycobacteria, *Infect Dis Clin northam* 15: 1205-1226.
64. Lozano JM, Cuca LE. 2008. Propiedades antimicrobianas in vitro de metabolitos secundarios aislados de *Peltostigma guatemalense*, una especie colombiana de Rutaceas contra el parásito *Plasmodium falciparum* y contra cepas bacterianas. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm*. Vol. 37 (2), 164-176.
65. Mariluis J.C, Mulieri PR. 2003. The distribution of the Calliphoridae in Argentina (Diptera). *Rev. Soc. Entomol. Argent*. 62 (1-2): 85-97.
66. Martínez W. 2004. Inventario preliminar de los Calliphoridae (Insecta: Diptera) de Popayán (Cauca – Colombia), *Antropacifico*. 2: 113-116.

67. Mateos M, Leon A, Gonzales Herranz P, Burgos J, Lopez Mondejar JA, Baquero F. 1990. *Lucilia sericata* infestation of the skin openings for the bone traction device in lengthening of the tibia: a propos of a case. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 8: 365–7.
68. Mecer M, McClellan R. 1935. Surgical maggots, a study of their functions in wound healing. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 20: 1219.
69. Mello RP. 2003. Chave para la identificacaodas formas adultas das especies da familia Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorrhapha) encontradas no Brasil. *Entomologia y Vectores* 10(2):255-268.
70. Morgan C & Nigam Y. 2013. Naturally derived factors and their role in the promotion of angiogenesis for the healing of chronic wounds. *Angiogenesis*. 16(3):493-502.
71. Mumcuoglu KY, Ingber A, Gilead L, Stessman J, Friedmann R, Schulman H, Bichucher H, Ioffe-Uspensky I, Miller J, Galun R, Raz I. 1998. Maggot therapy for treatment of intractable wounds. *Diabetes Care*. 21:2030-2031.
72. 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). *J Med Entomol*. 38(2):161-6.
73. Mumcuoglu KY. 2001. Clinical applications for maggots in wound care. *American Journal of Clinical Dermatology*. 4:219-227.
74. Namias CJ. 2000. A case report of maggot therapy for limb salvage after fourth-degree burns. *J Burn Care Rehab*. 21: 254-257.

75. Nigam Y, Bexfield A, Thomas S, Ratcliffe NA. 2006. Maggot Therapy: The Science and Implication for CAM Part II-Maggots Combat Infection. *Evid Based Complement Alternat Med.* 3: 303-308.
76. Pape T, Wolff M, Amat, E. 2004. Los califóridos, éstridos, rinofóridos y sarcófágidos (Diptera: Calliphoridae, Oestridae, Rhinophoridae, Sarcophagidae) de Colombia. *Biota Colombiana* 5: 201-208.
77. Parnés A, Lagan KM. 2007. Larval Therapy in Wound Management: A Review. *Int J Clin Pract.*61: 488-493
78. Paul AG, Ahmad NW, Lee HL, Ariff AM, Saranum M, Naicker AS, Osman Z. 2009. Maggot debridement therapy with *Lucilia cuprina*: a comparison with conventional debridement in diabetic foot ulcers. *Int Wound J.* 6: 39-46.
79. Pavillard, E.R., Wright, E.A., 1957. An antibiotic from maggots. *Nature* 180, 916-917.
80. Peris SV. 1992. Claves preliminares para los géneros de las subfamilias Toxotarsinae, Chrysominae y Rhiiniinae (Diptera: Calliphoridae) del Mundo. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (Sección Biología)* 88:79-98.
81. Pinilla YT, Segura NA, Bello F. 2012. Synantropy of Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) in Bogotá, Colombia. *Neotrop Entomol.* 41: 237-242.
82. Prete PE. 1997. Growth effects of *Phaenicia sericata* larval extracts on fibroblasts: mechanism for wound healing by maggot therapy. *Life Sci.* 60: 505–510.
83. Quan N, HO E, La W, Tsai Y.H, Bray T. 2001. Administration of NF-kappaB decoy inhibits pancreatic activation of NF-kappaB and prevents diabetogenesis by Alloxan in mice. *FASEB J.* 15:1616-1618.

84. Rees D, Alcolado J. 2005. Animal models for diabetes mellitus. *Diabetic Medicine*, 22: 359-370
85. Rey M, Castañeda A, González J, Acero V, Segura A, Zapata C, Gaona MA, Ríos D, Bello F. 2008. Evaluación de la terapia larval en el proceso de curación de heridas infectadas con *Pseudomonas aeruginosa* en conejos. *Rev. Cienc. Salud*. 6: 9-24.
86. Rippere, R.A., 1979. Some principles of microbiological turbidimetric assays of antibiotics. *Journal - Association of Official Analytical Chemists* 62, 951-956.
87. Roa FL, Linhares XA. 2002. Sinantropía de los Calliphoridae (Diptera) de Valdivia, Chile. *Neotropical Entomology*. 31 (2): 233-239.
88. Robinson W. 1935. Stimulation of healing in non-healing wounds by allantoin in maggot secretions and of wide biological distribution. *J Bone Joint Surg*. 17: 267–271.
89. Robinson W. 1940. Ammonium bicarbonate secreted by surgical maggots stimulates healing in purulent wounds. *Am J Surg*. 47: 111–115.
90. Schmidtchen, A., Wolff, H., Rydengard, V. & Hansson, C. 2003. Detection of Serine Proteases Secreted by *Lucilia sericata* In vitro and During Treatment of a Chronic Leg Ulcer. *Acta Dermato Venereologica*, 83, 310 – 311.
91. Segura NA, Bonilla MA, Usaquén W, Bello F. 2011. Entomofauna resource distribution associated with pig cadavers in Bogotá DC. *Medical and Veterinary Entomology*. 25, 46-52.

92. Segura NA., Usaquén W, Sánchez M, Chuaira L, Bello F. 2009. Succession pattern of cadaverous entomofauna in a semi-rural area of Bogotá, Colombia. *Forensic Sci Int.*
93. Sherman RA. 2003. Maggot therapy for treating diabetic foot ulcers unresponsive to conventional therapy. *Diabetes Care.* 26:446-451.
94. Sherman, R. 2002. Maggot versus conservative debridement therapy for the treatment of pressure ulcers. *Wound Repair Regeneration,* 10, 208 – 214.
95. Sherman RA. 1997. A new dressing design for treating pressure ulcers with maggot therapy. *Plast Reconstr Surg.* 100: 451–456.
96. Sherman RA, Hall MJR, Thomas S. 2000. Medicinal maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions. *Annu Rev Entomol.* 45: 55–81.
97. Sherman RA, Pechter EA. 1988. Maggot therapy a review of a therapeutic applications of fly larvae in human medicine, especially for treating osteomyelitis. *Med Vet Entomol.* 2: 225-30.
98. Sherman RA, Wyle F. 2000. Medicinal maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions. *Annual Review of Entomology.* 45:55-81.
99. Sherman RA, Wyle F, Vulpe M, Leuse L, Castillo L. 1993. The utility of maggot therapy for treating chronic wounds. *Am J Trop Med Hyg;* 49: 266.
100. Simmons, S.W., 1935a. A Bactericidal Principle in Excretions of Surgical Maggots which Destroys Important Etiological Agents of Pyogenic Infections. *Journal of bacteriology* 30, 253-267.

101. Simmons, S.W., 1935b. The bactericidal properties of excretions of the maggot of *Lucilia sericata*. Bulletin of entomological research 26, 559-563.
102. Singer A & Clark R. 1999. Cutaneous wound healing. The New England of Medicine. 341(10):738-746.
103. Steenvoorde, P., Jukema, G.N., 2004. The antimicrobial activity of maggots: in-vivo results. Journal of tissue viability 14, 97-101.
104. Stewart MS. 1934. The role of *Lucilia sericata* meig: larvae in osteomyelitis wounds. Ann Trop Med Parasitol. 28: 445-60.
105. Stevens J, Wall R. 1996. Classification of the genus *Lucilia* (Díptera: Calliphoridae): a preliminary parsimony analysis. Journal of Natural History, 30, 1087-1094.
106. Stoddard SR, Sherman RM, Mason BE, Pelsang DJ. 1995. Maggot Debridement Therapy. An Alternative Treatment of Nonhealing Ulcers. Journal of the American Podiatric Medical Association.;85(4):218-221.
107. Smith, K. 1986. A manual of forensic entomology. London: University Printing House.205 pp.
108. Spilsbury K, Cullum N, Dumville J, O'Meara S, Petherick E, Thompson C. 2008. Exploring patient perceptions of larval therapy as a potential treatment for venous leg ulceration. Health Expect. 11:148-159.
109. Sun WT, Lei CL, Bi CC, Chen ZL, Zhang L. 2010. Effect of Alloxan time administer Drug on establishing diabetic rabbit model. 3(3):200-202.

110. Tarshis MS. 1938. Surgical maggots in modern medicine. *The Scientific Monthly*. 47: 252-257.
111. Teh, C.H., Nazni, W.A., Lee, H.L., Fairuz, A., Tan, S.B., Sofian-Azirun, M., 2013. In vitro antibacterial activity and physicochemical properties of a crude methanol extract of the larvae of the blow fly *Lucilia cuprina*. *Medical and veterinary entomology*.
112. Telford G, Brown A, Rich A, English J, Pritchard D. 2012. Wound debridement potential glycosidases of the wound- healing maggot, *Lucilia sericata*. *Medical and veterinary entomology*, 26: 291-299.
113. Téllez G, Acero MA, Pineda LA, Castaño JC. 2012. Larvaterapia aplicada a heridas con poca carga de tejido necrótico y caracterización enzimática de la excreción, secreción y hemolinfa de larvas. *Biomedica*. 32:312-320.
114. Thomas AML, Harding K.G. & Moore K. 1999a. The structure and composition of chronic wound eschar. *J. Wound Care*. 8: 285-286.
115. Thomas, S., Andrews, A., Jones, M., Church, J., 1999b. Maggots are useful in treating infected or necrotic wounds. *Bmj* 318, 807-808.
116. Thomas S. 2006. Cost of managing chronic wounds in the UK, with particular emphasis on maggot debridement therapy. *Journal of Wound Care*. 15 (10): 465-9.
117. Thomas S, Jones M, Shutler S, Jones S. 1996. Using larvae in modern wound management. *J Wound Care*. 5: 60-69.
118. Torruela J. 1995. Miasis cutánea por larvas de *Lucilia sericata* (Meigen) en el hombre; Reporte de un caso clínico en Barcelona. *Ses. Entom. ICHN-SCL*, IX: 151-160.

119. Vargas, J. & Wood, D.M. (1999). Calliphoridae (Blow Flies). Instituto nacional de biodiversidad, Santo Domingo de Heredia, Costa Rica, 9.
120. Van der Plas MJA, Jukema GN, Wai SW *et al.* 2008. Maggot excretions/secretions are differentially effective against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 61:117–122.
121. Villalba L, Bilevich E, Bermúdez S, Herrera M, Hochman A, Moreno H, Mosca I, Rodriguez M, Videla E. 2008. Consenso sobre cicatrización de heridas. *Sociedad argentina de dermatología*. 2-10.
122. Wang J, Wan R, Mo Y, Zhang Q, Sherwood L, & Chien S. 2010. Creating a Long-Term Diabetic Rabbit Model. *Exp Diabetes Res*. Volume 2010, Article ID 289614, 10.
123. Wang S, Wang K, Xin Y, Lv D. 2010a. Maggot excretions/secretions induces human microvascular endothelial cell migration through AKT1. *Mol Biol Rep*. 37:2719-2725.
124. Wayman J, Nirojogi V, Walker A, Sowinski A, Walker MA. 2001. The cost effectiveness of larval therapy in venous ulcers. *J.TissueViability*. 10:91-4. Erratum in: *J Tissue Viability*;11:51.
125. Weil GC, Simon RJ, Sweadner WR. 1933. A biological. Bacteriological and clinical study of larval or maggot therapy in the treatment of acute and chronic pyogenic infections. *Am J Surg*. 19: 36-46.
126. Wiegand, I., K. Hilpert, and R.E. Hancock, Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*, 2008. 3(2): p. 163-75.

127. Wollina U. 2002. Biosurgery supports granulation and debridement. *International Journal of Dermatology*. 41:635–639.
128. Wolff H, Hansson C. 2005. Rearing larvae of *Lucilia sericata* for chronic ulcer treatment--an improved method. *Acta Derm Venereol*. 85:126-131.
129. Wolf M, Alvarez C, Herrera S, Wolff J, Escobar M. 2010. *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae), una nueva alternativa para la alternativa larval y reporte de casos en Colombia. *Iatreia*, 23(2):107-116.
130. Young, A., Meeusen, T., & Bowles, V. (1996) Characterization of ES Products Involved in Wound Initiation by *Lucilia cuprina* Larvae. *International Journal for Parasitology*, 26, 245 – 252.
131. Zarchi K, Jemec GBE. 2012. The efficacy of maggot debridement therapy –a review of comparative clinical trials. *Int Wound J*. 9: 469-477.
132. Zhang, Z., Wang, J., Zhang, B., Liu, H., Song, W., He, J., Lv, D., Wang, S., Xu, X., 2013. Activity of antibacterial protein from maggots against *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. *International journal of molecular medicine* 31, 1159-1165.
133. Zumbado M. 1999. *Diptera of Costa Rica and the New World tropics*. Santo Domingo de Heredia Costa Rica: Instituto Nacional de Biodiversidad, INBio. 267p.

ANEXOS

Participación en eventos

2012

1. Ponencia oral

Díaz Andrea, Gaona María A, Bello Felio Jesús. “Eficacia de las excreciones y secreciones de *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae) en la inhibición del crecimiento de bacterias gram positivas y gram negativas”. XLVII Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. ACCB.

2. Ponencia oral

Díaz Andrea, Pinilla Tatiana, Gaona Maria A, Bello Felio Jesús. “Actividad antibacterial de excreciones y secreciones de *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae)” p.74 - 74 , v.39 <, fasc.1. 39° Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología.

NOMINACION: *Premio* Nacional Hernán Alcaraz Viecco

2013

3. Ponencia oral

40 Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología (SOCOLEN). Bogota.

Díaz Andrea, Ramírez Alejandro, Cortés Jesús, Segura Nidya A., Gaona Maria Antonia, Bello Felio. “Evaluación de la terapia larval derivada de *Sarconesiopsis magellanica*, Le Guillou 1842, (Diptera: Calliphoridae) en un biomodelo animal.”

NOMINACION: *Premio* Nacional Hernán Alcaraz Viecco

4. Ponencia oral

Díaz Andrea; Ramírez-Hernández Alejandro; Cortés-Vecino Jesús; Segura Nidya Alexandra; Gaona María Antonia; Bello Felio. “*Sarconesiopsis*

magellanica (Diptera: Calliphoridae): Modelo biológico alternativo para usar en terapia larval” XLVIII Congreso Nacional de Ciencias Biológicas (ACCB).

5. Ponencia oral

Díaz Andrea; Gongora Jennifer; Ramírez-Hernández Alejandro; Cortés-Vecino Jesús; Segura Nidya A; Bello Felio. “Evaluación de diabetes mellitus en un modelo experimental de conejos (*Oryctolagus cuniculus*), inducida por Alloxan®.” XLVIII Congreso Nacional de Ciencias Biológicas (ACCB).

6. Poster evento internacional.

Díaz Andrea, Ramírez Alejandro, Cortes Jesús Alfredo, Segura Nidya Alexandra, Gaona María Antonia, Bello Felio. “Assessment of larval therapy from *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae) in an animal biomodel”. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. ASTMH 62nd Annual Meeting. Washington, DC, USA. 13 al 17 de Noviembre 2013.

Publicaciones

7. Artículo Internacional

Sometido 3 de Octubre 2013.

Revista: Acta Tropica

Díaz-Roa A; Gaona Maria A; Segura Nidya A; Suárez Diana; Patarroyo Manuel A; Bello Felio J. “*Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae) excretions and secretions have potent antibacterial activity”.

8. Artículo próximo a ser sometido en una revista Internacional

“Evaluación del proceso de curación de heridas crónicas, con *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae), en conejos diabéticos.”