

ESTERILIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE OVOS DE *Chrysomya megacephala* (FABRICIUS, 1794) PARA APLICAÇÃO TERAPÉUTICA LARVAL

NIEVERSON VICENTIN PERSIO¹; PATRICIA JACQUELINE THYSSEN²; THAÍS ESTÉRCIO³; FRANCIELLY FELCHICHER⁴; BRUNA BACCEGA⁵; FRANCIÉLE DE SOUZA MASIERO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas—nieversonp79@gmail.com; ²Universidade Estadual de Campinas—pjthyssen@yahoo.com.br; ³Universidade Federal de Pelotas—thayseloiza@gmail.com;

⁴Universidade Federal de Pelotas—franciellybio@yahoo.com.br; ⁵Universidade Federal de Pelotas—brubaccega@hotmail.com; ⁶Universidade Federal de Pelotas—franmasiero@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Devido ao envelhecimento da população mundial e da alta incidência de portadores de Diabetes, faz-se necessário, cada vez mais, o aprimoramento no cuidado de feridas. O tratamento curativo de feridas reduz casos de amputações e mortalidade, decorrentes de infecções e de necrose (MIRABZADEH et al., 2017). Sendo assim, tem-se na terapia larval, também conhecida como larvoterapia, desbridamento biológico, bioterapia e biocirurgia (ECHEVERRI et al., 2010; SUN et al., 2014), uma ferramenta eficaz, segura, de baixo custo para a cicatrização de feridas (SHERMAN et al., 2000).

O desbridamento biológico trata-se essencialmente de uma mísse facultativa (infestação dos tecidos de um organismo vivo por larvas necrófagas de dipteros), terapêutica ou artificial, controlada (SHERMAN, 2009). As larvas estéreis, obtidas a partir de criação em laboratório, são aplicadas em lesões e aceleram o processo de cicatrização (SHERMAN et al., 2000). As indicações clínicas da larvoterapia variam, no entanto, as larvas podem ser aplicadas em feridas crônicas (infectadas, ou não, por micro-organismos multirresistentes), especialmente indicadas para aqueles pacientes que não respondem aos tratamentos convencionais, incluindo casos de comorbidades, que impossibilitam intervenções cirúrgicas (WANG et al., 2010). Além disso, este tratamento pode ser utilizado na medicina veterinária (REY et al., 2010), visando a cicatrização de lesões intratáveis dos animais.

A cicatrização através das larvas necrófagas ocorre primariamente devido ao desbridamento (remoção do tecido necrosado) (NIGAM et al., 2006), entretanto o potencial terapêutico larval também contempla: a liberação de componentes antimicrobianos, que promovem a desinfecção da ferida; estimulação da angiogênese (VAN DER PLAS, et al., 2009); inibição da ativação do sistema complemento (TAMURA et al., 2017); e liberação de fatores de crescimento no leito da ferida. Em conjunto estas atividades larvais potencializam a reconstituição tecidual, consequentemente, promovendo a cicatrização.

A terapia larval vem sendo utilizada com sucesso há centenas de anos, para a cicatrização de feridas (NIGAM et al., 2006). Durante a Primeira Guerra Mundial (1914-1918), em campos de batalha Baer (médico cirurgião), observou que as larvas facilitavam o processo de cicatrização de feridas. Após este período passou a manter colônias de moscas em laboratório e a tratar pacientes introduzindo intencionalmente larvas nas feridas (BAER, 2011). No entanto, nos primeiros anos de aplicação larval, a contaminação bacteriana oriunda das larvas de moscas não esterilizadas foi um grande problema (WOLLINA et al., 2000), devido os riscos da introdução de patógenos dentro das feridas, gerando a necessidade do desenvolvimento de procedimentos eficientes para esterilização. Sendo assim, Baer desenvolveu, em seu laboratório, o primeiro método de desinfecção dos ovos, através de uma solução de cloreto de mercúrio e ácido clorídrico (WEIL et al., 1933).

Tendo em vista que, a partir de 2015, a aplicação da larvoterapia em humanos, foi introduzida no Brasil (PINHEIRO et al., 2015), e que este tratamento

está sendo disseminado, para o cuidado de feridas, no país, novos estudos quanto a obtenção de larvas estéreis fazem-se necessários. Dessa forma, o estudo propôs investigar substâncias para a esterilização dos ovos visando à obtenção de larvas estéreis para aplicação medicinal.

2. METODOLOGIA

Colônias de *Chrysomya megacephala* foram estabelecidas a partir de coletas usando armadilhas (MORETTI et al., 2009) expostas em ambiente natural. Após identificação (GRELLA e THYSSEN, 2011), os espécimes triados foram colocados dentro de gaiolas mantidas sob condições controladas ($25\pm1^{\circ}\text{C}$, $70\pm10\%$ UR e 12:12h fotoperíodo). Fêmeas foram estimuladas para ovipostura com carne bovina moída crua. Os ovos, retirados com auxílio de pincel, foram separados em cinco grupos para os testes de desinfecção.

Foram testadas quatro substâncias para a desinfecção dos ovos: hipoclorito de sódio a 1% (NaClO), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formol a 5% e clorexidine, sendo o controle tratado com água destilada estéril. O experimento foi realizado em triplicata e cada grupo continha 30 ovos. Para o processo de desinfecção, os ovos foram colocados e mantidos por três minutos no produto esterilizante, seguido por duas lavagens em água destilada estéril durante três e dois minutos (THYSSEN et al., 2013). Após o tratamento dos ovos, em triplicata, uma alíquota de $100\mu\text{L}$ foi retirada da água de lavagem dos ovos, para testes microbiológicos. Foram realizadas semeaduras em Brain Heart Infusion Agar (BHA) e Sabouraud dextrose ágar (SDA), para teste de crescimento em meio bacteriológico e fúngico, respectivamente. As placas foram mantidas por 24 à 72h à 37°C .

Posteriormente à aplicação dos tratamentos, os 30 ovos, de cada grupo experimental, foram colocados em placa de Petri estéril com papel filtro umedecido e mantidos em câmara climática à 25°C durante 24h, para a eclosão das larvas. Após as 24h, as larvas eclodidas de cada tratamento foram contadas, para a verificação de sobrevivência larval, após desinfecção dos ovos. Além disso, para confirmação da obtenção de larvas medicinais estéreis, cinco larvas de cada grupo experimental foram maceradas em $1000\mu\text{L}$ de água destilada estéril. Deste macerado, em triplicata, alíquotas de $100\mu\text{L}$ foram novamente semeadas em BHA, ágar nutritivo e SDA e mantidas por 24 à 72h à 37°C , para confirmação do processo de esterilização das larvas.

As análises da eclodibilidade larval, após a desinfecção dos ovos com peróxido de hidrogênio, formol a 5%, clorexidine e hipoclorito de sódio a 1%, foram realizadas através da análise de variância (ANOVA). Os resultados foram submetidos à análise e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com significância de 5 % de probabilidade (VIEIRA, 2006), com o auxílio do software estatístico ASSISTAT (SILVA e AZEVEDO, 2009).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os tratamentos testados, NaClO a 1%, mostrou-se o tratamento mais eficaz (Figura 1), para a esterilização dos ovos, apresentando significativa taxa de eclodibilidade larval (66,6%) após o tratamento dos ovos. Corroborando Thyssen et al (2013) e Limsopatham et al (2017), em que os ovos apresentaram boa tolerância e resistência a NaClO. Além disso, neste tratamento não foi verificado crescimento microbiano, não só resultante da alíquota de lavagem dos ovos, mas também das larvas maceradas, confirmando, portanto, a obtenção de larvas medicinais estéreis. Entre as vantagens da utilização de NaClO estão o baixo custo e a fácil aquisição (THYSSEN et al., 2013).

Referente à eclodibilidade larval, todas as substâncias (H_2O_2 , formol a 5%, clorexidine e NaClO a 1%) utilizadas para a desinfecção dos ovos, apresentaram diferença estatística em relação ao controle (água destilada), cuja

taxa de eclosão larval foi de 90%. Entretanto, quando comparadas entre si, H₂O₂ e clorexidine não apresentaram diferença quanto à taxa de eclosão larval (40% e 36,6% respectivamente). Além disso, H₂O₂ não poderá ser elencado como tratamento para a desinfecção dos ovos, já que tanto as semeaduras das alíquotas da água de lavagem, quanto a do macerado larval apresentaram crescimento bacteriano e fúngico, sendo assim, considerado um produto inadequado para a obtenção de larvas estéreis. Clorexidine é um desinfetante conhecido de baixo custo e já foi utilizado para a esterilização da superfície de larvas (MASRI et al., 2005; PAUL et al., 2009), contudo para a desinfecção de ovos de *Chrysomya megacephala* este produto ainda não tinha sido testado. Esta substância apresentou bons resultados quanto à esterilização larval, contudo a sobrevivência destes imaturos foi baixa.

Formol a 5% apresentou a menor taxa de eclodibilidade larval (16,6%) após o processo de desinfecção dos ovos. Adams e Hall (2003) observaram alta taxa de mortalidade larval (80%) após tratamento com formol a 10%. Sendo assim, apesar desta substância apresentar potencial bactericida e ser eficaz na desinfecção dos ovos, torna-se inviável sua utilização, devido a morte larval ser significativa. De acordo com Limsopatham et al (2017), as larvas de *C. megacephala* apresentam maior capacidade de sobrevivência e ausência de crescimento microbiano após o tratamento de esterilização. No Brasil, as larvas desta espécie tem sido utilizadas para o tratamento de feridas de pés diabéticos (PINHEIRO et al., 2015).

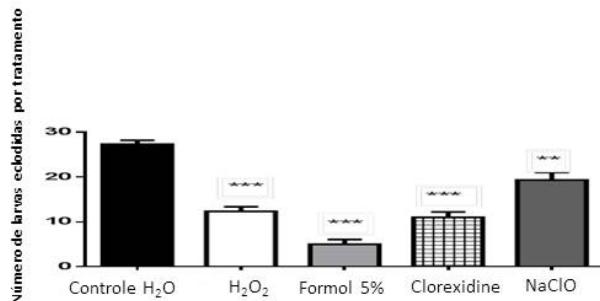


Figura 1- Número de larvas de *Chrysomya megacephala* ecloidas, conforme tratamento: Grupo A (Controle-água destilada), Grupo B (H₂O₂), Grupo C (Formol 5%), Grupo D (Clorexidine) e Grupo E (NaClO 1%). As colunas com * indicam diferença estatística a nível de 5% de significância pelo teste de Tukey($P<0.05$).

4. CONCLUSÕES

Tendo em vista, a alta incidencia de pacientes acometidos por feridas crônicas, tem-se na terapia larval um tratamento seguro e eficaz, para promoção da reconstituição tecidual. A larvoterapia é capaz de diminuir a dor, reestabelecer a autoestima e diminuir o tempo de internação dos pacientes. Sendo assim, estudos referentes à obtenção de larvas medicinais tornam-se indispensáveis, visando isto, o estudo conclui que é necessário cuidado rigoroso, para que larvas estéreis sejam obtidas. Pensando nisto, a escolha adequada de um produto que além de desinfetar a superfície dos ovos, viabilize a sobrevivência larval é fundamental. Dessa forma, encontrou-se no NaClO e na clorexidine substâncias, que contemplam estas características. Assim, a aplicação larval poderá ser feita com segurança, certificando-se que micro-organismos e/ou contaminantes advindos dos ovos não esterilizados sejam inseridos nas feridas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, Z.J.; HALL, M.J. Methods used for the killing and preservation of blowfly larvae, and their effect on post-mortem larval length. *Forensic Science International*, v. 17; n. 138, p.50-61, 2003.
BAER, W. The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larva of the blowfly). *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v.469, n.4, p.438-475, 2011.

- ECHEVERRI, M.I.W.; ÁLVAREZ, C.R.; HIGUITA, S.H.E.; IDÁRRAGA, J.C.W.; FRANCO, M.M.E. Lucilia eximia (Diptera: Calliphoridae), una nueva alternativa para La terapia larval y reporte de casos en Colombia. *Iatreia*, v.23, n.2, p.107-116, 2010.
- GRELLA, M.D.; THYSSEN, P.J.; Chave taxonômica interativa para espécies de dípteros califorídeos (Infraordem: Muscomorpha) do Brasil. Disponível< http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/calliphoridae_brazil>. Acesso em 09 Jan 2015.
- LIMSOPATHAM.K.; KHAMNOI :P.; SUKONTASON :K.L.;BOONYAWAN :D.; CHAIWONG T, SUKONTASON K. Sterilization of blow fly eggs, Chrysomya megacephala and Lucilia cuprina, (Diptera: Calliphoridae) for maggot debridement therapy application. *Parasitology Research*, v.116, n.5, p.1581-1589, 2017.
- MASRI, M.S.; NAZNI, W.A.; LEE,H.L.; ROGAYAH, T.; SUBRAMANIAM, S. Sterilisation of *Lucilia cuprina* Wiedemann maggots used in therapy of intractable wounds. *Tropical Biomedicine*, v.22, n.2, p.185-189, 2005.
- MIRABZADEH, A.;LADANI, M.J.;IMANI, B.;ROSEN, S.A.;SHERMAN, R.A.; Maggot therapy for wound care in Iran: a case series of the first 28 patients. *Journal Wound Care*, v.26, n.3, p.137-143, 2017.
- MORETTI, T.C.; THYSSEN, P.J.; SOLIS, D.R. Breeding of the Scuttle Fly Megasselia scalaris in a fish Carcass and Implications for the use in Forensic Entomology (Diptera: Phoridae). *Entomologia Generalis*, v.31 n.4, p 349-353. 2009.
- NIGAM,Y.; BEXFIELD, A.; THOMAS. S.;RATCLIFFE, N.A. Maggot Therapy: The Science and Implication for CAM Part I—History and Bacterial Resistance. *Evidence Based Complementart Alternative Medicine*, v.3, n.2, p.223-227, 2006.
- PAUL,A.G.; AHMAD,N.W.; LEE,H.L.; ARIFF,A.M.; SARANUM,M.; NAICKER,A.S.; OSMAN, Z. Maggot debridement therapy with *Lucilia cuprina*: a comparison with conventional debridement in diabetic foot ulcers. *International Wound Journal*, v.6, n.1, p.39-46, 2009.
- PINHEIRO,M.A.;FERRAZ,J.B.;JUNIOR,M.A.;MOURA,A.D.;DACOSTA,M.E.;COSTA, F.J.;NETO, V.F.;NETO, R.M.;GAMA, R.A. Use of maggot therapy for treating a diabetic foot ulcer colonized by multidrug resistant bacteria in Brazil. *Indian Journal of Medical Research*,v.141, n.3, p.340-342, 2015.
- REY, A. M.; CASTAÑEDA, A.; GONZÁLEZ, J.; ACERO P.V.; SEGURA,A.G.; BELLO,G.F. Evaluation of maggot therapy applied to four clinical cases of animals in Bogota (Colombia).*Revista Colombiana de Entomología*, v.36, n.2, p.254-259, 2010.
- SHERMAN, R.; HALL, M. J. R.; THOMAS, S. Medical Maggots: an Ancient Remedy for some Contemporary Afflictions. *Annual Reviews Entomology*, v. 45, p.55-81, 2000.
- SHERMAN, R. Maggot Therapy Takes Us Back to the Future of Wound Care: New and Improved Maggot Therapy for the 21st Century. *Journal of Diabetes Science and Technology*, v.3, n.2, p.336-344, 2009.
- SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal components analysis in the software assistat-statistical attendance, 2009.
- SUN, X.; JIANG .; CHEN, J.; WUB, L.; LU, H.; WANGA, A.; WANG, J.; A systematic review of maggot debridement therapy for chronically infected wounds and ulcers. *International Journal of Infectious Diseases*, v.25, p.32-37, 2014.
- TAMURA T.; CAZANDER, G.; ROOIJAKKERS, S.H.; TROUW, L.A.; NIBBERING, P.H. Excretions/secretions from medicinal larvae (*Lucilia sericata*) inhibit complement activation by two mechanisms.*Wound repair regeneration*, v.25, n.1, p.41-50, 2017.
- THYSSEN, P. J.; NASSU,M.P; NIITSCHE, M.J.T.; LEITE, D.; Sterilization of immature blowflies (Calliphoridae) for use in larval therapy. *Journal of Medicine and Medical Sciences*, v. 4, n.10, p. 405-409, 2013.
- VAN DER PLAS, M.; BALDRY, M.; VAN DISSEL, J.; JUKEMA, G.; NIBBERING, P. Maggot secretions suppress pro-inflammatory responses of human monocytes through elevation of cyclic AMP. *Diabetologia*, v.52, n.9, p.1962-1970, 2009.
- VIEIRA, S. *Análise de Variância: (Anova)*. São Paulo: Atlas, 2006. 204 p.
- WANG, S.; WANG, J.; LV, D.; DIAO, Y.; ZHANG, Z. Clinical research on the bio-debridement effect of maggot therapy for treatment of chronically infected lesions. *Orthopaedic Surgery*, v.2, n.3, p.201-206, 2010.
- WEIL, G.; SIMON, R.; SWEADNER, W. Larval or Maggot Therapy in the Treatment of Acute and Chronic Pyogenic Infections. *The American Journal of surgery*,v.19, n.1, p.36-48, 1933.
- WOLLINA, U.; KARTE, K.; HEROLD, C.; LOOKS, A. Biosurgery in wound healing – the renaissance of maggot therapy. *European Academy of Dermatology and Venereology*, v.14, n.4, p.285-289, 2000.