



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

CENTRO DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Terapia larval: uso de larvas de *Chrysomya megacephala*
(Diptera, Calliphoridae) no tratamento de úlceras
crônicas em pacientes diabéticos no Hospital
Universitário Onofre Lopes- Natal, RN**

MARÍLIA AUGUSTA ROCHA DE QUEIROZ PINHEIRO

NATAL

2014

MARÍLIA AUGUSTA ROCHA DE QUEIROZ PINHEIRO

**Uso da terapia larval no tratamento de úlceras crônicas em pacientes
diabéticos no Hospital Universitário Onofre Lopes- Natal, RN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências – Área de concentração em Biologia Parasitária e Microbiológica

Orientador: Profa. Dra. Renata Antonaci Gama
Co-orientador: Prof. Dr. Renato Motta Neto

NATAL

2014

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de
Biotecnologias

Pinheiro, Marília Augusta Rocha de Queiroz.

Terapia larval: uso de larvas de *Chrysomya megacephala* (Diptera, Calliphoridae) no tratamento de úlceras crônicas em pacientes diabéticos no Hospital Universitário Onofre Lopes-Natal, RN / Marília Augusta Rocha de Queiroz Pinheiro. – Natal, RN, 2014.

80 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Antonaci Gama.
Coorientador: Prof. Dr. Renato Motta Neto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biotecnologias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

1. Mosca. – Dissertação. 2. Úlcera. – Dissertação. 3. Bioterapia. – Dissertação. I. Gama, Renata Antonaci. II. Motta Neto, Renato. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 595.77

À minha família,

base de tudo.

Dedico.

*Não deixe que a saudade sufoque,
que a rotina acomode,
que o medo te impeça de tentar.
Desconfie do destino e acredite em você.
Gaste mais horas realizando que sonhando,
fazendo que planejando,
vivendo que esperando.
Porque embora quem quase morre esteja vivo,
quem quase vive já morreu.*

Luís Fernando Veríssimo

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas suas bênçãos e misericórdias, pela família maravilhosa que tenho, por iluminar minha mente nos momentos difíceis e por tudo o que tenho, tudo o que sou e o que vier a ser.

À minha mãe, Maria Augusta, por ser esse exemplo de mulher batalhadora, pelo seu amor e pela minha vida.

À minha avó, Cevy Augusta, por toda sua dedicação e desmedido amor devotados a mim.

A Nelson, meu espelho e guia nessa jornada.

À minha irmã Helena, pelo seu companheirismo, pelas madrugadas em claro ao meu lado.

Aos meus familiares, Emília e Júnior (saúde mostra!), Tia Cevy e Tio José por todo o apoio na minha vida.

A todos os meus queridos familiares, cujo incentivo, apoio e carinho sempre se fizeram presentes.

Aos meus amigos, Miguel e Andrew, pela cumplicidade, pela ajuda nos trabalhos, pelas broncas, e por nossos momentos maravilhosos de conversa no corredor. Adoro vocês.

Ao querido amigo Anthony (Queguido/cara) pelas nossas conversas, por sempre me fazer rir, e também pela ajuda nos momentos de sufoco.

Aos meus amigos, por todos os momentos que passamos nesses anos, em especial a Lara (Lala), Gabriela (Gabi), Bruna (Bruneixon), Larissa (Xuxu), Edbar (Dibá), Caio, Anaugusta (Moça), Gabriel (Quero Red Hot outra vez!), e Karol (valeu pelos banners, amore mio), vocês são demais!

Aos colegas da turma de mestrado, por todos os momentos agradáveis compartilhados juntos.

A todos os colegas do LIVE: Paula, Renato, Raíssa, Felipe, e em especial à Tainá e à Larissa pela ajuda com a criação e identificação das moscas.

Aos colegas do LABMIC e LABMAT: Maria Eduarda, Fagner, Hebert e Camila, pela ajuda com os processamentos das amostras de bactérias, pelo companheirismo e pelos bons momentos.

À Janete por aturar meus pedidos e sempre me socorrer com a coleta das moscas.

À Universidade Federal do Rio Grande do Norte e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, pelos ensinamentos compartilhados.

Aos funcionários do DMP, Alessandra Marinho, Dayse Santos, Edson Santana, Érika Galvão, Monique Gabriela, Eva e Rízia, minha gratidão por toda a ajuda de vocês.

Aos membros da banca do exame de qualificação, os professores Dr. Hebert Tadeu de Almeida Andrade e Dr. Renato Motta Neto, pelas críticas e sugestões valiosas.

À banca avaliadora, pelas suas correções e sugestões, pois sei que serão muito valiosas neste trabalho.

À minha orientadora e professora, Dr^a Renata Antonaci, por me receber em seu laboratório, por me abrir as portas do conhecimento científico, pelo seu incentivo, pelos seus ensinamentos e por sua paciência e seu auxílio neste trabalho.

À Comissão de Curativos do HUOL, Genilde, Liz, Mônia, Simone, pela inestimável contribuição nesse projeto, pela realização dos curativos, pela ajuda na marcação das trocas com os pacientes.

À enfermeira chefe da Comissão de Curativos, Julianny Ferraz (Ju), pela sua imensa dedicação ao projeto, por abraçar a causa e ser a grande incentivadora desse trabalho, pela conversa com os pacientes, pela divulgação da terapia larval no HUOL, pelo ânimo nos momentos difíceis e por sempre acreditar que daria certo. Enfim, por fazer acontecer.

E, por fim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos vocês, minha eterna gratidão.

*Escolho meus amigos pela alma lavada e pela cara exposta.
Não quero só o ombro e o colo, quero também sua maior alegria.
Amigo que não ri junto, não sabe sofrer junto.*

Oscar Wilde

ÍNDICE

RESUMO	15
ABSTRACT	17
LISTA DE TABELAS JUSTIFICATIVA	15
LISTA DE FIGURAS	17
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	15
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Conceito e Histórico da Terapia Larval	Erro! Indicador não definido.
1.2 Situação atual da terapia larval.....	2
1.3 Bionomia da espécie <i>Chrysomya megacephala</i>	5
1.4 Aspectos fisiológicos da pele e cicatrização	9
1.5 Fisiopatologia do pé diabético.....	11
2. JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo Geral.....	17
3.2 Objetivos específicos:	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 Protocolo de inclusão dos pacientes no estudo.....	Erro! Indicador não definido.
4.2 Manutenção da colônia de <i>Chrysomya. megacephala</i> no Laboratório de Insetos e Vetores – UFRN Protocolo de inclusão dos pacientes no estudo.....	Erro! Indicador não definido.
4.3 Procedimentos para realização da Terapia Larval	Erro! Indicador não definido.
4.4 Identificação Bacteriana e Teste de Sensibilidade aos Antibióticos (TSA)	21
4.5 Testes fenotípicos confirmatórios para resistência a antibióticos.....	22
4.6 Análise dos custos das aplicações de terapia larval e comparação com terapêuticas convencionais de rotina utilizadas no HUOL.....	23
4.7 Análise Estatística	23
5. RESULTADOS	24
5.1 Perfil geral dos pacientes tratados com a Terapia Larval ...	Erro! Indicador não definido.
5.2 Avaliação do desbridamento com o uso da terapia larval ...	Erro! Indicador não definido.
5.3 Avaliação da Retração das úlceras	Erro! Indicador não definido.
5.4 Espécies bacterianas isoladas, perfil de resistência aos antimicrobianos e espécies confirmadas como produtoras de beta-lactamases de espectro estendido	31
5.5 Análise dos custos das aplicações de terapia larval e comparação com terapêuticas convencionais de rotina utilizadas no HUOL.....	33
6. DISCUSSÃO.....	24
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS:.....	40

8.PERSPECTIVAS:	42
9.REFERÊNCIAS	43
10.ANEXOS.....	50

RESUMO

A terapia larval é a utilização de larvas estéreis no desbridamento de feridas. Atualmente essa técnica vem sendo bastante utilizada na Europa, Estados Unidos da América e Israel, dentre outros países, entretanto, ainda não foi implementada rotineiramente no Brasil e não há relatos de sua aplicação utilizando larvas da mosca *Chrysomya megacephala* em pacientes humanos. O presente trabalho objetivou avaliar o desbridamento de úlceras de difícil cicatrização utilizando larvas de *C. megacephala*. Cinco pacientes com úlceras crônicas foram incluídos no estudo após responderem a um questionário, serem esclarecidos sobre os possíveis riscos e benefícios da terapia larval e assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE. Antes das aplicações, foram colhidas amostras para identificação das bactérias presentes nas úlceras. Após essa etapa, as úlceras foram avaliadas antes e durante o tratamento através de registro fotográfico, mensuração de diâmetros e avaliação dos percentuais de tecido necrótico e de granulação. A avaliação foi seguida da aplicação de aproximadamente cinco larvas estéreis de 2º estágio de *C. megacephala* por cm² de lesão. Os curativos com larvas foram trocados após 48 horas e com 48 horas de intervalo entre as aplicações. As úlceras dos pacientes incluídos no trabalho apresentaram caráter polimicrobiano e em todas elas foi isolada a espécie *Pseudomonas aeruginosa*. Todos os pacientes submetidos à terapia larval apresentaram redução significativa do percentual de necrose e aumento do tecido de granulação na superfície das úlceras e uma consequente melhora no decorrer do tratamento.

Palavras-chave: Úlcera. Desbridamento. Bioterapia. Mosca. Terapia Larval. *Chrysomya megacephala*. Bactéria. Resistência bacteriana.

ABSTRACT

Larval therapy is the use of sterile larvae in the debridement of wounds. Currently this technique has been widely used in Europe, the U.S.A., and Israel, among other countries, however, has not been implemented in Brazil yet, and there are no reports of its application using larvae of the fly *Chrysomya megacephala* in human patients. This study aimed to evaluate the debridement of ulcers difficult to heal by using larvae of *C. megacephala*. Five patients with chronic ulcers were included in the study after answering a questionnaire, to be informed about the possible risks and benefits of larval therapy and signed a Free, Prior and Informed Consent. Before the applications, samples were collected for identification of the bacteria in the ulcers. After this step, the ulcers were evaluated before and during treatment by photographic recording, measurement and evaluation of diameters, percentage of necrotic tissue and granulation. The evaluation was followed by the application of approximately 5 second instar sterile larvae of *C. megacephala* per cm² of lesion. Dressings with larvae were exchanged after 48 hours with 48 hours between applications. The patients' ulcers included in this study had polymicrobial nature and in all of them was isolated *Pseudomonas aeruginosa* species. All patients underwent larval therapy showed a reduction in the percentage of necrosis, increase of granulation tissue on the surface of ulcers and a consequent improvement during treatment.

Key-words: Ulcers. Debridement. Maggots. Flies. Larval Therapy. *Chrysomya megacephala*. Bacteria. Bacterial Resistance.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Hábitos comportamentais predisponentes dos pacientes e informações sobre suas úlceras.....25
TABELA 2	Maior e Menor Diâmetros (D) (cm) e Áreas (A) (cm ²) (mensurados antes e após terapia larval), Redução Percentual (R.P.) das úlceras dos pacientes e Número de Aplicações (N.A.).....31
TABELA 3	Espécies bacterianas isoladas dos seus respectivos pacientes.....32
TABELA 4	Comparação entre a terapia larval e diferentes métodos de desbridamento utilizados no Hospital Universitário Onofre Lopes- HUOL.....33

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Larvas estéreis produzidas em laboratório, para o desbridamento livre no leito da ferida.....	3
FIGURA 2	Larvas estéreis produzidas em laboratório dentro dos biossacos, para uma melhor contenção.....	4
FIGURA 3	Fases do ciclo holometábolo de Calliphoridae (a – ovo, b – larva, c – pupa e d – adulto macho) <i>Chrysomya megacephala</i>	6
FIGURA 4	Espiráculos posteriores de larva de terceiro instar de <i>Chrysomya megacephala</i>	6
FIGURA 5	Adulto macho de <i>Chrysomya megacephala</i>	7.
FIGURA 6	Camadas epiderme, derme e hipoderme e estruturas da pele.....	10
FIGURA 7	Larvas de 2º instar de <i>Chrysomya megacephala</i> estéreis acondicionadas em recipientes estéreis para transporte.....	20
FIGURA 8	Retirada de larvas de <i>C. megacephala</i> após 48 horas da aplicação.....	21
FIGURA 9	Evolução da área percentual de necrose nas úlceras tratadas com terapia larval, em quatro aferições.....	26
FIGURA 10	Evolução da área percentual de granulação das úlceras tratadas com terapia larval, em quatro aferições.....	26
FIGURA 11	Comparação da média total do tecido de necrose e de granulação antes e após os tratamentos.....	27
FIGURA 12	Paciente M.R.S. a) Antes do início do tratamento. b) Superfície da ferida após seis sessões de terapia larval.....	28
FIGURA 13	Paciente J.A.S. a) Antes da terapia larval. b) Após quatro sessões de terapia larval.....	28
FIGURA 14	Paciente S.D.S. a) Antes da aplicação das larvas. b) um mês após início da terapia.....	29
FIGURA 15	Paciente S.F.G. a) Antes da aplicação das larvas. b) Após uma sessão de terapia larval.....	29
FIGURA 16	Paciente F.P.S. a) Antes da aplicação das larvas. b) Após oito sessões de terapia larval.....	30
FIGURA 17	Médias dos diâmetros antes e depois da terapia larval.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLSI	- Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	- centímetro
DM	- Diabetes Melito
DVP	- Doença Vascular Periférica
ESBL	- Extended-Spectrum Beta-Lactamases
HUOL	- Hospital Universitário Onofre Lopes
Hz	- Hertz
mm	- milímetro
MRSA	- Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
TSA	- Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos
TL	- Terapia Larval

1. INTRODUÇÃO

1.1 Conceito e Histórico da Terapia Larval

A terapia larval é a utilização de larvas de moscas vivas de forma estéril, para promover o tratamento de diferentes tipos de lesões em tecido animal, e pode ser considerada uma limpeza biológica utilizada em úlceras crônicas com a finalidade de desbridá-las, reduzir o número de microorganismos nelas existentes e seu odor desagradável e, desse modo, iniciar a cicatrização (WOLF & HANSSON, 2005).

Embora as ações benéficas de larvas de moscas em feridas tenham sido conhecidas pelos aborígenes australianos (LEE, 1968; GROSSMAN, 1994) e pelos maias da América Central (WEIL et al., 1933), as larvas da mosca varejeira *Lucilia sericata* foram utilizadas pela primeira vez clinicamente somente cinco séculos mais tarde. Na primeira metade do século XX, a terapia larval era utilizada por milhares de cirurgiões em centenas de hospitais pelo mundo.

A primeira aplicação de larvas em feridas, oficialmente documentada, foi realizada por John Forney Zacharias (1837-1901), um cirurgião de Maryland, durante a Guerra Civil Americana (1861-1865) (WHITAKER et al, 2007, KRUGLIKOVA & CHERNYSH, 2013).

O Professor clínico do setor de cirurgia ortopédica da Escola de Medicina John Hopkins, William Baer, observou em seu serviço na Primeira Guerra Mundial, que os soldados com fraturas expostas no fêmur e ferimentos no abdômen e sujeitados ao tempo e insetos da região, tinham as feridas infestadas por larvas e não apresentavam febre nem sintomas de septicemia (BAER, 1931). Ele foi o primeiro a aplicar sistematicamente larvas em feridas crônicas em um Hospital infantil em Baltimore, Maryland, EUA, e apresentou seus resultados preliminares em 1929. Todo o seu trabalho de terapia larval - Tratamento de mais de 100 crianças com osteomielite e problemas de feridas de tecido mole – foi publicado postumamente em 1931 (MOHD et al., 2005; SHERMAN, 2002, 2009). Contudo, com o advento dos antibióticos e a melhora nas técnicas cirúrgicas, a terapia larval praticamente desapareceu, sendo usada esporadicamente apenas em feridas de difícil tratamento de pacientes em estado grave. O meio acadêmico perdeu o interesse nessa terapia e em adição, as pessoas mostraram recusa. Em 1988, Wainwright mostrou a opinião da maioria na seguinte pontuação (WHITAKER et al, 2007):

“Felizmente a terapia larval está agora relegada a um momento histórico, de interesse mais por sua natureza bizarra do que pelo seu efeito sobre o curso da ciência médica... uma terapia cujo fim é provável que ninguém lamente...”

Entretanto, nas últimas quatro décadas, a terapia larval tem sido novamente reconhecida como uma alternativa viável para o tratamento convencional de feridas. Seu renascimento na prática clínica começou muito cedo após seu declínio particular. Nos EUA, Ronald Sherman e Edward Pechter têm sido fortes defensores da técnica. No início da década de 1980, Ronald Sherman realizou aplicações em pacientes e estudos comparativos com as terapias convencionais, sempre mostrando resultados mais satisfatórios quando a terapia larval foi a técnica de escolha (WOLF & HANSSON, 2005; WHITAKER et al, 2007).

1.2 Situação atual do uso da Terapia Larval

Atualmente, milhares de pacientes com feridas de diferentes origens como o pé diabético, úlceras de decúbito, queimaduras, fasciítes necrotizantes, gangrenas, úlceras por pressão, tumores, feridas pós-cirúrgicas, lesões traumáticas, dentre outros ferimentos que contenham tecido necrosado vêm sendo tratadas com terapia larval nos Estados Unidos da América, Austrália, Israel, Colômbia e vários países da Europa como Reino Unido, Alemanha, Holanda, Suécia, Bélgica, dentre outros, graças à produção de larvas viabilizada por algumas empresas e institutos. Suas contraindicações são basicamente a utilização em feridas cavitárias ou próximas a órgãos ou grandes vasos. Prurido é uma das queixas frequentes encontradas entres os pacientes submetidos ao desbridamento biológico, e em alguns casos, há reclamações de dor relacionada às aplicações, e ambos os casos podem e são solucionados com a aplicação de analgésicos (MUNCUOGLU et al, 2001; THOMAS, 2002; VARZIM, 2005; NITSCHKE, 2010; AKHTAR et al, 2011; GILEAD et al, 2012).

Contudo, no Brasil ainda não se tem relato de utilização dessa metodologia como procedimento rotineiro, apresentando apenas trabalhos experimentais com ratos e adequações de metodos de esterilização e de criação das moscas. No entanto, no presente trabalho realizado no Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL), Natal, RN, essa prática vem começando a ser testada e utilizada em pacientes com úlceras crônicas e histórico de diabetes, apresentando excelentes resultados. Visto que, estudos que busquem a obtenção de

tratamentos que visem abreviar a cicatrização de úlceras diabéticas e que tendam a reduzir suas complicações são bastante necessários.

As larvas são comercializadas por algumas empresas ou produzidas nos próprios centros de saúde / hospitais. Em geral, existem duas formas de produção: com as larvas livres em recipientes (Figura 1) e com as larvas contidas em biossacos ou como são chamadas em outros países “biobags” (Figura 2), os quais permitem todas as ações larvais com exceção do movimento sobre a superfície da ferida.



Figura 1: larvas estéreis produzidas em laboratório, para o desbridamento livre no leito da ferida. *Fonte:* www.monarchlabs.com/dressings.htm



Figura 2: Larvas estéreis produzidas em laboratório dentro dos biossacos, para uma melhor contenção das larvas.

Fontes:

www.cicatrisation.info/livre/module_2/toussaint/toussaint.htm

www.wondbedekkers.nl/madentherapie/madentherapie-productinformatie.htm

www.cmaj.ca/content/182/2/E121.figures-only

A terapia larval é essencialmente uma miíase secundária terapêutica controlada (infestação de larvas que só ingerem tecido morto num hospedeiro vivo). É controlada pela seleção de uma espécie de mosca segura e eficaz, também pelo fato das larvas serem esterilizadas e por isso livres de contaminantes, por conter as larvas dentro de curativos especiais, que as impedem de deixar as feridas, e através de medidas de controle de qualidade em todo o processo de criação e produção (SHERMAN, 2009). Nem todas as espécies são seguras e eficazes para essa finalidade. As larvas apuradas para comercialização nos Estados Unidos pertencem à espécie *Lucilia sericata* (Sherman 2009). Outras espécies de moscas estão sendo usadas, embora não rotineiramente, com essa finalidade, como *Phormia regina*, *Lucilia cuprina*, dentre outras, e até mesmo a espécie *Musca domestica* (LI et al, 2008; NITSCHKE, 2010; TÉLLEZ et al, 2012).

É sabido que a atuação das larvas sobre as feridas é resultado de ação conjunta entre fatores mecânicos como movimento e desbridamento através das peças bucais, dessa forma, executando a drenagem das feridas; a ação de enzimas proteolíticas, na degradação do tecido necrosado; e dentre outras substâncias, os peptídeos, alantoína e uréia, que atuam na

eliminação dos microrganismos, bem como glicosidasas que desestabilizam a parede bacteriana, importante fator de virulência (JAKLIC et al 2008, TELFORD et al, 2012).

Um estudo recente mostrou que os antibióticos existentes não promovem a cicatrização das feridas. Tal achado, juntamente com o fato da aquisição de resistência pelas bactérias levanta questionamentos sobre a utilização de forma empírica e indiscriminada dos antibióticos (O'MEARA et al, 2010). Portanto, é completamente plausível e relevante que se busque pesquisar e investigar novas substâncias que tenham ação antimicrobiana. Desse modo, muitos dos estudos realizados com larvas de mosca têm se voltado a analisar a ação isolada dos componentes da hemolinfa, tendo em vista a futura produção de novos fármacos e possíveis antibióticos.

Afora esse ponto, as pesquisas atuais objetivam uma melhor análise da ação das larvas, aprimorar formas de realizar a sua contenção na ferida através de curativos e a produção de protocolos bem padronizados de triagem de pacientes para realização da terapia larval.

1.3 Bionomia da espécie *Chrysomya megacephala*

As moscas são incluídas na ordem Diptera, possuem apenas o primeiro par de asas desenvolvido e o segundo atrofiado na forma de halteres ou balancins, subordem Brachycera e infra-ordem Muscomorpha. A ordem Diptera é uma das maiores ordens de insetos, com cerca de 160 famílias descritas e 153.000 espécies conhecidas (FREIRE & MELLO, 2006; THOMPSON, 2008).

O desenvolvimento dos califorídeos, como todo díptero, é do tipo holometábolo, com metamorfose completa, apresentando os estágios de ovo, larva, pupa e adulto (Figura 3).



Figura 3: Fases do ciclo holometábolo de Calliphoridae (a – ovo, b – larva, c – pupa e d – adulto macho) *Chrysomya megacephala*. Fonte: Laboratório de Insetos e Vetores – UFRN.

As larvas de *C. megacephala* são acéfalas (cabeça atrofiada com peças bucais transformadas em ganchos internos) e passam por três estádios (*instares*) de desenvolvimento, L1, L2 e L3, diferenciadas entre si pelo tamanho e pela quantidade de fendas respiratórias no espiráculo. Como diferencial de outras espécies de moscas as larvas de *C. megacephala* apresentam espiráculos respiratórios posteriores com peritrema incompleto e placas peritremais dos espiráculos posteriores muito aproximadas, separadas uma da outra por uma distância de 1/3 à metade do diâmetro de uma das placas, como observado na Figura 4 (FREIRE & MELLO, 2006).

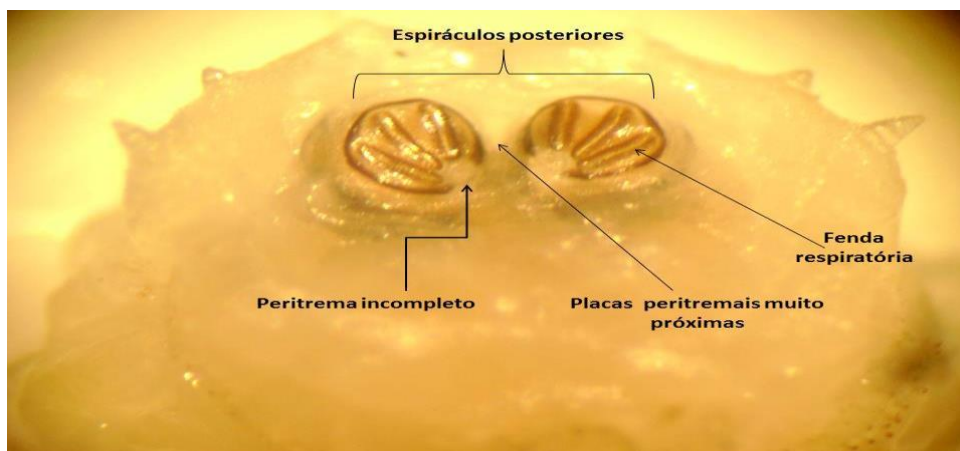


Figura 4. Espiráculos posteriores de larva de terceiro *instar* de *Chrysomya megacephala*. Fonte: Laboratório de Insetos e Vetores. UFRN.

Quanto aos adultos de *C. megacephala*, esses possuem como características de identificação coloração escura com reflexos metálicos; base do rádio, na face ventral, nua; arista, na extremidade distal, plumosa; asas hialinas; mesonoto sem faixas longitudinais distintas; tergitos abdominais, na margem posterior, com faixas pretas transversas; espiráculo prototorácico e calíptera inferior castanho-escuros; antena e gena amareladas; e macho com olhos apresentando área definida superior com grandes facetas e inferior com pequenas facetas (CARVALHO & RIBEIRO, 2000). Algumas dessas características podem ser observadas na figura 5.



Figura 5: Adulto macho de *Chrysomya megacephala*. Laboratório de Insetos e Vetores – UFRN.

A espécie de mosca descrita acima apresenta importância ecológica, médico-sanitária e veterinária, em virtude de ser decompositora de matéria orgânica e causadora de miíase (ZUMPT, 1965), podendo atuar na veiculação de enteropatógenos, bactérias e fungos, em geral (GALINDO, 2009; CORDEIRO & PUJOL-LUZ, 2010; NGOEN-KLAN *et al.*, 2011; MARCHIORI & SILVA, 2011). É válido salientar que as larvas de *C. megacephala* causam miíases secundárias, isto é, quando presente em hospedeiros vivos, alimentam-se apenas de tecido necrosado, morto (FREIRE & MELLO, 2006; MORETTI & THYSSEN, 2006; MCINTOSH *et al.*, 2011).

As características importantes para a escolha da espécie de mosca a ser utilizada na terapia larval são: elevada distribuição geográfica, fácil manutenção em laboratório, elevada velocidade de desenvolvimento, realização de postura de ovos (e não larvas) e possuir baixa

especificidade na escolha de substrato de oviposição. Contudo, a mais importante delas é não ser causadora de miíases primárias, ou seja, não se alimentarem de tecido vivo. Portanto, as larvas da espécie de mosca utilizada devem ser necrófagas ou se alimentar de outros tipos de matéria orgânica (SHERMAN et al., 2000; MARCONDES, 2006).

As larvas auxiliam a cicatrização do tecido por estimularem, com seu movimento, a produção de exsudato serosos, que removem as bactérias, e de tecido granuloso de cicatrização, por se alimentarem de bactérias e de tecido necrosado, esterilizando o material que passa por seu tubo digestivo e por secretarem agentes terapêuticos como a alantoína e uréia. Adicionalmente, causam aumento no pH da lesão, por produzirem amônia, prejudicando com isso o desenvolvimento de bactérias, mesmo as resistentes aos antibióticos modernos e, finalmente, rompem com suas peças bucais as crostas formadas por tecidos mortos na ferida, facilitando a digestão do material (SHERMAN et al., 2000; MARCONDES, 2006).

As larvas de mosca utilizadas em terapia larval pertencem à família Calliphoridae, sendo a espécie *Lucilia sericata* a mais utilizada para esse fim (SHERMAN, 2000; GALINDO, 2009), e apesar de estar presente no Brasil, não é encontrada em todos os estados, e por isso não é a mais indicada para essa prática no país. O gênero *Chrysomya*, ao contrário, está presente em praticamente todo o país e é altamente adaptado às suas várias condições climáticas e ecológicas, sendo por isso o mais indicado para essa prática no Brasil. O gênero é típico das regiões subtropicais e tropicais do velho mundo (HU et al, 2011), porém, foi introduzido no sul do Brasil com sucesso por volta de 1975, período que coincidiu com o êxodo de refugiados da Angola, que traziam seus animais domésticos com eles em navios (GOMES et al. 2003; FREIRE & MELLO, 2006; ROMÃO, 2011). Existem estudos realizados mostrando a eficácia da esterilização de ovos de *C. megacephala* e também a efetividade de suas larvas no desbridamento de úlceras em camundongos, entretanto, a espécie ainda não era utilizada na terapia larval em humanos, apesar de possuir características favoráveis para sua utilização com esse intuito (NITSCHKE, 2010).

A espécie *Chrysomya megacephala* foi escolhida para o presente estudo, dentre outros califórídeos, pois tem ampla distribuição, inclusive no Rio Grande do Norte, possui ciclo de desenvolvimento rápido, é fácil de identificar e coletar e suas larvas são muito ativas e vorazes (FREIRE & MELLO, 2006).

1.4 Aspectos fisiológicos da pele e cicatrização

A pele é o maior órgão do corpo humano e varia de espessura dependendo da região do corpo (de 1 a 4 mm). Ela desempenha um papel importante de barreira física contra microrganismos, alguns parasitas, radiação UV e agressões mecânicas. Tem função de termorregulação, de metabolismo da vitamina D e na sensação de dor, temperatura e tato. Atua também na resposta celular e humoral e na identificação pessoal. Revestindo o corpo, a pele cumpre sua função, a qual é proteger estruturas internas, separando o ambiente externo agressivo do ambiente interno do corpo. A pele é formada por duas camadas, a epiderme e a derme (RIBEIRO et al, 2004; IRION, 2005).

A epiderme é a camada externa da pele, com renovação celular constante (de hora em hora se descama um milhão de células mortas). Não possui vascularização e sua nutrição ocorre por difusão. É composta de camadas de queratina e melanina (Figura 6) (RIBEIRO et al, 2004; IRION, 2005).

Quanto à derme, essa é a segunda camada da pele, medindo de 1 a 4 mm. Nela estão os vasos sanguíneos e linfáticos, os músculos eretores do pelo, os folículos pilosos, os nervos receptores e sensitivos e as terminações nervosas através das quais sentimos o toque, o calor, o frio, e a dor. Na derme também se encontram as glândulas sudoríparas e sebáceas que ajudam a manter a pele flexível e impermeável (Figura 6) (RIBEIRO et al, 2004; IRION, 2005).

Apesar de muitas vezes não ser considerado como pele, o tecido subcutâneo (hipoderme) merece atenção e estudo assim como os músculos, os ossos, os vasos sanguíneos, as terminações nervosas e as demais estruturas que integram as camadas da pele e adjacências (Figura 6) (RIBEIRO et al, 2004; IRION, 2005).

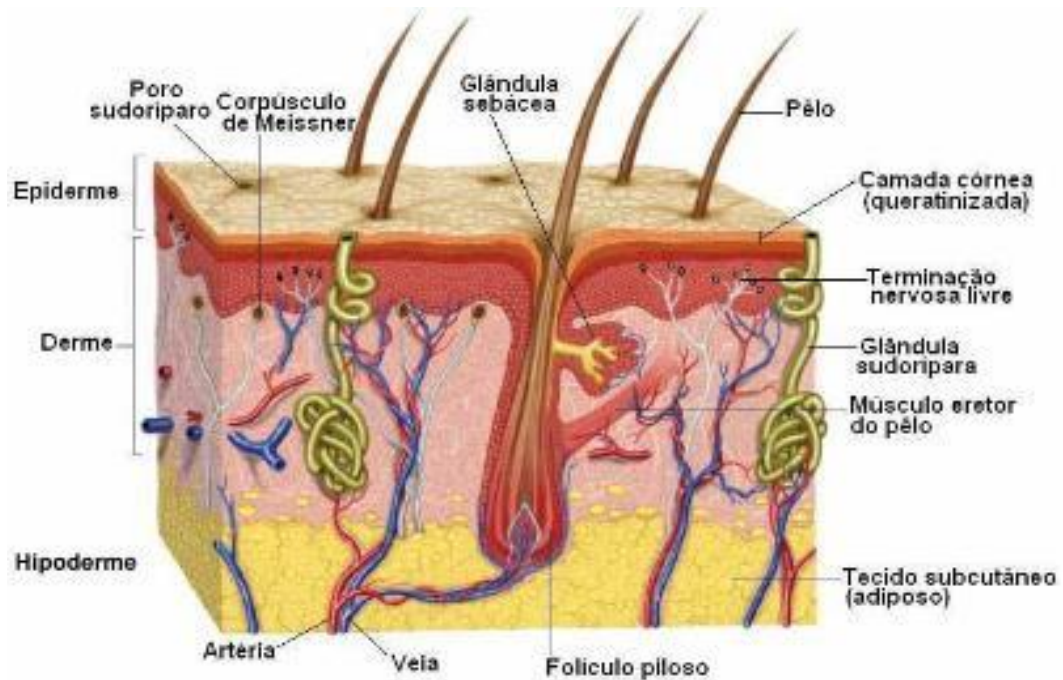


Figura 6: Camadas epiderme, derme e hipoderme e estruturas da pele.
 Fonte: www.ebah.com.br/content/ABAAAeomcAJ/apresentacao-cicatrizacao-final

Quando há um comprometimento da integridade da pele juntamente com uma lesão aos tecidos orgânicos, ocorre a formação de uma ferida. Uma determinada sequência de eventos promove a correção do defeito e a restauração da superfície da pele após uma lesão. A profundidade da lesão determina a sequência desses eventos. E o conjunto dos eventos que promovem a cura da ferida é chamado de cicatrização (RIBEIRO et al., 2001; IRION 2005).

A cicatrização das feridas é um processo altamente complexo. Nele existe uma sequência de estágios/fases interdependentes e sobrepostos descritos como inflamação (fase exsudativa), reconstrução (fase proliferativa), e a fase de maturação (MARTINS et al, 2006).

A fase inflamatória é iniciada através do rompimento dos vasos, resultando na ativação das cascatas de coagulação, formação do tampão e recrutamento de monócitos e neutrófilos. Já na fase proliferativa, ocorrem a formação da granulação e reepitelização e, em algumas feridas, a contração. Esses processos podem ocorrer de forma simultânea. A última fase é a fase de maturação, que é essencialmente a remodelação do tecido. É executada basicamente pelo controle mútuo entre fibroblastos e matriz extracelular (IRION, 2005; NITSCHKE, 2010).

Há diversos fatores que podem afetar positivamente ou negativamente o processo de cicatrização. Idade e fatores como algumas doenças crônicas, diabetes, obesidade e uso de

corticóides, quimioterápicos e radioterapia interferem no processo cicatricial da pele por gerar transformações fisiológicas em todo o organismo. À medida que avança, a idade faz ocorrer uma série de alterações nutricionais, metabólicas, vasculares e imunológicas. Tais alterações tornam o indivíduo mais suscetível ao trauma, à infecção e à dificuldade de cicatrização (RIBEIRO et al, 2004).

1.5 Fisiopatologia do pé diabético

O Diabetes Melito (DM) é uma doença metabólica resultante de defeitos da secreção de insulina ou da ação da insulina, ou ambos. A insulina é um hormônio produzido pelo pâncreas que é responsável pelo controle do nível de glicose no sangue. Os efeitos principais da doença são hiperglicemia crônica relativa, com alterações no metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas; e as complicações macrovasculares, microvasculares e neuropáticas. Dentre os tipos de DM, o tipo 2 corresponde, aproximadamente, a 90% dos casos, e dentre suas complicações crônicas destacam-se as lesões ulcerativas em membros inferiores (CUBAS et al, 2013). A condição de hiperglicemia crônica está associada, após longos períodos, com a lesão e a falência de vários órgãos, especialmente os olhos, rins, nervos, coração, e vasos sanguíneos (MOTTA et al, 2012).

A população diabética mundial vem aumentando nos últimos anos, o que também tem sido acompanhado nos países em desenvolvimento e, no Brasil, não é diferente. No ano de 2005, cerca de oito milhões de pessoas eram acometidas pela doença no Brasil. Em 2002, O Diabetes Melito acometia cerca de 173 milhões de pessoas no mundo e é esperado que esse número cresça e chegue a 300 milhões em 2025. Os números são alarmantes, de tal forma que essa doença tem se tornado um relevante problema de saúde pública mundial e nacional. (MOTTA et al, 2004; NITSCHKE, 2010).

Úlceras nos pés são uma complicação comum do diabetes. O Consenso Internacional Sobre Pé Diabético define pé diabético como uma infecção, ulceração ou destruição de tecidos profundos do pé associada com neuropatia e/ou doença arterial periférica na extremidade inferior de pessoas com diabetes. (INTERNATIONAL CONSENSUS ON THE DIABETIC FOOT, 2011).

Um quinto de todos os indivíduos com diabetes desenvolvem infecção no pé diabético e são hospitalizados pelo menos uma vez em sua vida. Essa complicação apresenta maior

relevância quanto à admissão em hospitais e internações prolongadas. Dados da população mundial mostram que 82 mil pessoas têm extremidades amputadas a cada ano, a cada 30 segundos uma perna é amputada no mundo e é estimado que 14 – 20% de diabéticos sofram amputação. As amputações geralmente decorrem de úlceras crônicas as quais resultam de fatores fisiopatológicos como Doença Periférica Vascular e Neuropatia Diabética (IRION, 2005; BAKKER& SCHAPER, 2011; MOTTA et al, 2004).

Procedimentos padrões de atendimento para o tratamento de úlceras de pé diabético e subsequentes infecções envolvem uma multimodal e interdisciplinar abordagem de equipe, que inclui o tratamento de feridas, administração de antimicrobianos sistêmicos e por muitas vezes, procedimentos cirúrgico. Consequentemente, acarretam em altos custos com tratamentos, desconforto e visitas aos centros de saúde. Entretanto, mesmo sendo realizados os devidos procedimentos, úlceras de pé diabético podem levar a significativa morbidade e mortalidade. E, em adição aos resultados relativamente pobres encontrados nos tratamentos de úlceras crônicas de longa data e infecções graves, as pesquisas recentes têm se concentrado em terapias complementares para promover a cicatrização e reparo dessas feridas (IRION, 2005; APELQVIST et al, 2007; ABAD & N. SAFDAR, 2012; ALEXIADOU & DOUPIS, 2012; WANICZEK et al, 2013).

Vários estudos têm relatado o uso de medidas não tradicionais, em um esforço para melhorar a infecção, a cicatrização das feridas, ou até mesmo a resposta do paciente portador. Estes incluem a avaliação de terapia de feridas por pressão negativa, do fator recombinante estimulador de colônias de granulócitos, oxigenoterapia sistêmica hiperbárica, a terapia larval, aqui estudada, e o uso de mel (BISHOP & MUDGE, 2012; DOERLER ET AL, 2012; WANICZEK et al, 2013).

A etiologia das úlceras do pé diabético é tipicamente multifatorial. É pouco provável que um fator isolado cause as tais lesões nos membros inferiores. A tríade clássica de neuropatia periférica, deformidade do pé e pequeno trauma, que representa a maioria das vias que levam a úlceras nos pés foi identificada num estudo de referência por Reiber et al (1999).

Entretanto, além desses fatores, é válido ressaltar que a negligência é uma condição comum nos pacientes que apresentam diminuição da sensibilidade, pois as deficiências na mobilidade e de visão, além de problemas imediatos como insuficiência renal limitam o autocuidado (IRION, 2005). A neuropatia é provavelmente o fator mais comum na formação da úlcera. Afora a neuropatia, a insuficiência arterial e doença vascular periférica (DVP) têm se mostrado também presentes na fisiopatologia da úlcera (CARVALHO et al, 2004; IRION

2005; SINGH, 2008; BADER, 2008; WANICZEK et al 2013). Contudo é importante ser posto que nem sempre há a coexistência da neuropatia e do fator vascular, em especial a DVP. Alguns indivíduos com diabetes melito em maior ou menor intensidade desenvolverão uma aterosclerose grave, mas sem neuropatia. O que tem se mostrado mais comum é o aparecimento da neuropatia antes da isquemia, entretanto, frequentemente as duas condições citadas acima estão presentes (IRION 2005).

No estudo clássico de Reiber et al. (1999), a neuropatia periférica foi o componente mais comumente identificado nas úlceras de pé, estando presente em 78% dos pacientes que posteriormente desenvolveram úlceras do pé. Esta é uma complicação comum em longo prazo do diabetes, com uma prevalência estimada variando entre 28,5% a quase 50% (REIBER et al, 1999). Da mesma forma, um estudo prospectivo revelou que a presença de neuropatia periférica aumenta o risco de úlceras nos pés em quase sete vezes. A neuropatia sensorial dos membros inferiores nestes estudos foi baseada num limiar de percepção vibratória ≥ 25 Hz ou como uma incapacidade de sentir o monofilamento 5,07 em qualquer local sobre o pé envolvido (YOUNG et al, 1994; ABAD & SAFDAR, 2012).

Como resultado dessa miríade de etiologias (neuropatia, doença vascular periférica e insuficiência arterial), as úlceras são incapazes de progredir rapidamente pelas fases da cicatrização (inflamação, proliferação e maturação) de forma ordenada e em tempo hábil, adquirindo caráter crônico, proporcionando a formação de necrose e comprometendo o ambiente para a proliferação bacteriana. Essas úlceras podem rapidamente tornar-se infectadas e notoriamente difíceis de gerir.

Quando estabelecida a infecção, os microrganismos responsáveis mais frequentes encontrados nas infecções agudas e feridas superficiais, e em pacientes que não tenham sido previamente tratados com antibióticos, são as bactérias aeróbias Gram Positivas (principalmente *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* beta-hemolítico - grupos A e B). Já as infecções em pacientes que tenham recebido recentemente antibióticos ou com feridas profundas ou crônicas são geralmente de caráter polimicrobiano, com a presença de bactérias aeróbias Gram Positivas e Gram Negativas (por exemplo, *Escherichia coli*, espécies de *Proteus* e espécies *Klebsiella*) e anaeróbias (por exemplo, espécies de *Bacteroides*, *Clostridium*, *Peptococcus* e *Peptostreptococcus*). *S. aureus* resistente à meticilina (conhecido pela sigla MRSA – Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) é o patógeno mais comum em pacientes que tenham sido previamente hospitalizados ou que tenham recebido recentemente antibióticoterapia. A infecção por MRSA também pode ocorrer na ausência dos fatores de risco devido ao aumento da prevalência de MRSA na comunidade. As bactérias

anaeróbias estão, em geral, presentes em pacientes com isquemia no pé ou gangrena. Contudo, um trabalho realizado no Estado do Ceará com úlceras de pé diabético mostrou que, de forma geral, as bactérias gram negativas estavam em maior número colonizando as úlceras (177 de um total de 298 bactérias isoladas) (MOTTA et al, 2004; BADER, 2008; VALACHOVÁ et al, 2013). É válido ressaltar que o quadro infeccioso pode ser agravado nos casos em que há resistência bacteriana, a qual tem atingido níveis alarmantes. Casos de resistência têm sido descritos como urgência clínica devido à alta incidência destes isolados em infecções, graças ao surgimento e a disseminação desses microrganismos em todo o mundo.

Deste modo, para a resolução da infecção do pé diabético e a fim de proporcionar a evolução e total cicatrização dessas feridas, medidas de desinfecção e desbridamentos efetivas são o primeiro passo a ser tomado (MORGAN & NIGAM, 2013).

2. JUSTIFICATIVA

A utilização de larvas de moscas é uma alternativa viável no tratamento de úlceras de difícil cicatrização, pois além de possuir menor custo em relação aos métodos atuais de tratamento é mais seletiva. Dentre as principais doenças que resultam em formação de úlceras de difícil cicatrização, destaca-se o diabetes, e devido à falta de informação tanto dos pacientes quanto dos profissionais de saúde e principalmente pela existência de cepas resistentes a antibióticos, uma grande parte dessas lesões não são devidamente tratadas, ocasionando em um grande número de amputações.

O principal tratamento dessas úlceras é feito com desbridamento do tecido, normalmente mecanicamente, e com a aplicação de antibióticos, o que causa dor ao paciente e acaba selecionando microorganismos resistentes. Além disso, as técnicas de desbridamento atuais têm ação mais lenta, o paciente sofre muito com a demora na cura as lesões, ficando sujeito a agravamento e amputação e o desbridamento por limpeza cirúrgica leva a perda considerável de sangue, o que não ocorre com a terapia larval (STEENVOORDE & JUKEMA 2004). Adicionalmente, o custo financeiro mensal desse tratamento, para uma ferida de 2,5 cm² varia de R\$60 a R\$332,00, podendo o valor ser quadruplicado para uma ferida de 10 cm² (CARMO et al. 2007). Ao passo que a criação e manutenção de colônias de moscas é relativamente fácil e de baixo custo, necessitando basicamente de um insetário com controle de temperatura, umidade e fotoperíodo.

Quando comparada a outras metodologias, a terapia larval apresenta resultados melhores ou iguais. Um estudo em 103 pacientes internos, com feridas de pressão, que receberam tratamento convencional ou terapia larval, mostrou que 80% das feridas com TL (terapia larval) foram desbridadas, em comparação com 48% com o tratamento convencional. Houve redução significativa mais rápida na área das feridas com a TL e na quantidade de tecido necrótico, com superioridade da TL sobre o tratamento convencional (SHERMAN 2002).

A terapia larval, em testes realizados nos Estados Unidos, desbridou úlceras de pressão em pacientes com dano em coluna espinal em velocidade muito maior que os tratamentos não cirúrgicos. Feridas necróticas de 5 a 30 cm² foram desbridadas em 1,5 semanas, com TL, em comparação com quatro semanas pelo uso de bandagens convencionais (REAMES 1988). Feridas que estavam aumentando a uma velocidade de 21,8% por semana,

antes de receber a TL, começaram a ter sua área reduzida a cerca de 20% por semana, logo após o tratamento (SHERMAN 1995).

Para avaliar a importância da técnica, em cinco anos, mais de 15 mil tratamentos foram aplicados no Reino Unido, em 650 centros (ANDREWS et al. 1998). Na Alemanha, em um ano, 215 pacientes receberam cerca de mil aplicações, e nos últimos dez anos quase 10 mil pacientes foram tratados no mundo com essa técnica. Tem sido obtido desbridamento completo ou significativo em 80-95% dos casos em que a TL tem sido utilizada, formando-se novas camadas de tecido saudável sobre a lesão. A dor e o mau cheiro provenientes das lesões costumam diminuir rapidamente. Em proporção significativa dos casos, foi evitada amputação dos membros.

Em levantamento feito pelo Surgical Materials Testing Laboratory (SMTL), em Bridget, Gales, foi obtido desbridamento total ou parcial em 100 de 106 feridas (94,3%), com 86,9% delas apresentando tecido de granulação; em 94 feridas, a dor aumentou em 33 (35,1%), diminuiu em sete (7,4%) e não mudou em 54 (57,4%). Quanto aos responsáveis pelo tratamento, consideraram que a terapia larval teve papel importante e limitado, representando respectivamente 65,3% e 34,7% dos consultados. Ainda não houve quem considerasse nulo o seu papel na cura das feridas.

Apesar de apresentar tais dados positivos em relação ao seu uso, beneficiando sobremaneira o processo de cicatrização das feridas, não há relatos da utilização da terapia larval em humanos no Brasil. Portanto, o presente trabalho possui um caráter pioneiro tanto em relação à implementação da técnica, quanto em relação à espécie de mosca utilizada, que no presente estudo foi a espécie *Chrysomya megacephala*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

- Avaliação da eficácia da terapia larval no tratamento de úlceras de difícil cicatrização.

3.2 Objetivos específicos:

- Mensurar o grau de reparação da lesão em cicatrização através da descrição macroscópica qualitativa e quantitativa do processo de cicatrização;
- Identificar a etiologia e resistência bacteriana das possíveis espécies bacterianas presentes nas úlceras, antes do uso da terapia larval.
- Avaliar o custo das aplicações de terapia larval e comparar com terapêuticas convencionais de rotina utilizadas no HUOL.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Protocolo de Inclusão dos pacientes no Estudo

Para a inclusão na pesquisa em questão, os pacientes foram esclarecidos, dentre outros pontos, sobre os procedimentos a serem realizados, os possíveis benefícios bem como limitações, riscos ou incômodos como prurido, por exemplo, da terapia larval, além dos cuidados necessários com os curativos como não encharcar o curativo ou esmagá-lo. Também responderam a um questionário para uma melhor anamnese e avaliação da úlcera e igualmente para que fatores predisponentes pudessem ser identificados (Anexo 1).

Somente foram inclusos pacientes maiores de 18 anos, diabéticos, e que apresentem úlcera/lesão crônica de difícil cicatrização em membros inferiores, em acompanhamento no Hospital Universitário Onofre Lopes, na cidade de Natal, estado do Rio Grande do Norte. Todos os pacientes inclusos eram domiciliados na região metropolitana de Natal.

Após os esclarecimentos, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) do projeto intitulado “**Uso da terapia larval no tratamento de úlceras de difícil cicatrização em pacientes no Hospital Universitário Onofre Lopes- Natal, RN**” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUOL sob número de cadastro 621/11 (Anexo 2).

4.2 Manutenção da colônia de *Chrysomya megacephala* no Laboratório de Insetos e Vetores- UFRN

Os ovos e larvas utilizados nas aplicações dos curativos biológicos foram obtidos de colônias mantidas no insetário do Laboratório de Insetos e Vetores – LIVE do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN. Contudo, os primeiros exemplares adultos de *C. megacephala* foram coletados na área do Centro de Biociências da UFRN, com o auxílio de armadilhas contendo iscas de carne, frango e peixe crus conforme Marcondes (2006).

Após as coletas, as moscas foram encaminhadas ao laboratório e colocadas em freezer por cerca de 90 segundos para serem anestesiadas e com isso procedeu-se a identificação com o auxílio de um microscópio estereoscópio e chaves dicotômicas específicas (CARVALHO & RIBEIRO, 2000, CARVALHO, 2008).

Depois de procedida a identificação, as moscas foram colocadas em gaiolas teladas nas laterais e no fundo com dimensões de 30x30x30 cm e mantidas a temperatura de 26 °C, fotoperíodo de 12 horas, e umidade de 70%. Para manutenção em cada gaiola, foram colocadas placas de petri, contendo algodão umedecido com água destilada e algodão umedecido com solução açucarada a 10%. O substrato de oviposição oferecido era composto por levedo de cerveja, leite em pó, farinha láctea, ração para peixes ornamentais, água destilada e papel toalha picado (PINHEIRO, 2011).

4.3 Procedimentos para a realização da terapia larval

1º passo: Avaliação da úlcera do paciente

Cada paciente foi selecionado pela comissão de curativos do HUOL e todos os curativos foram realizados no ambulatório cirúrgico do HUOL. Após a avaliação clínica inicial das úlceras mediante registro fotográfico, mensuração dos menores e dos maiores diâmetros das úlceras (com o auxílio de um paquímetro digital) os exemplares de *C. megacephala* eram solicitados ao LIVE para o início do tratamento. Essa aferição além de ser feita antes da aplicação da TL, foi realizada também a cada quinze dias, para que fossem notadas mudanças significativas, inclusive com avaliações dos percentuais de necrose tecidual e granulação da superfície da úlcera e para que o cálculo da quantidade de larvas necessárias fosse realizado.

2º passo: Esterilização dos ovos para uso na terapia larval

Após a solicitação para a realização da TL, os ovos, separados para esse fim, foram submergidos em hipoclorito de sódio (solução detergente) e separados em uma placa de petri forrada com papel filtro com o auxílio de uma alça calibrada. Depois da separação, os ovos foram esterilizados utilizando o procedimento descrito por Marcondes (2006) com uso de formalina 10% em capela de fluxo laminar. Depois de procedida a esterilização, os ovos foram lavados com solução fisiológica estéril e incubados em placas de Ágar Mueller Hington suplementado com 5% de sangue de carneiro (DIFCO-Laboratories, Detroit, MI, USA) a

temperatura ambiente por 24 horas. Para o transporte para o HUOL e posterior aplicação, as larvas recém-eclodidas foram transferidas para recipientes estéreis (Figura 7).

Para monitoramento da eficácia da esterilização larval, foram realizados, antes de cada aplicação da bioterapia, ensaios microbiológicos com uma amostra dos ovos. As amostras dos ovos foram retiradas e em seguida, foram semeadas em placas de Ágar Mueller Hinton suplementado com 5% de sangue de carneiro (DIFCO-Laboratories, Detroit, MI, USA), seguindo-se da incubação das placas em estufa bacteriológica a 37°C por 24/48 horas.

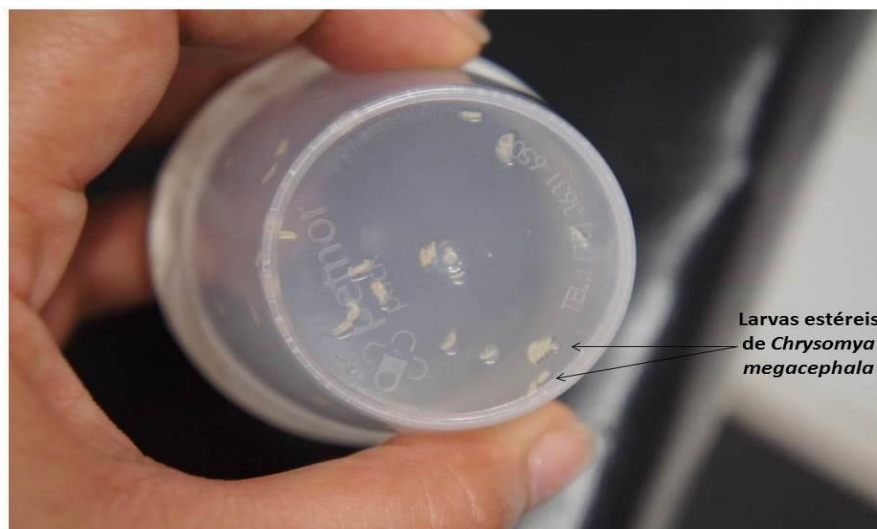


Figura 7: Larvas de 2º instar de *Chrysomya megacephala* estéreis acondicionadas em recipientes estéreis para transporte.

3º passo: Aplicação do biotratamento

Foram utilizadas larvas de segundo estágio que passaram por um rigoroso controle microbiológico nas últimas 24h que antecederam as terapias. Para os curativos, foram utilizadas cinco larvas por cm² de tecido comprometido (MARCONDES, 2006). A técnica da terapia larval consistiu em uma lavagem inicial com solução de cloreto de sódio a 0,85% seguida por coleta do espécime clínico para análise microbiológica e aplicação das larvas livres na base da úlcera sob cobertura de gaze estéril por toda sua extensão. Quando necessário, hidrocolóides CGF eram utilizados para a proteção da área perilesional e formação de uma barreira para as larvas que circulavam a superfície da úlcera. Foram realizados curativos biológicos e as larvas foram deixadas por 48h, com intervalos de 48 horas entre as aplicações (Figura 8). Nesses intervalos, foram utilizadas apenas gazes e solução fisiológica

para realização dos curativos. Após cada ciclo da terapia, as úlceras foram avaliadas e uma nova aplicação era realizada, caso fosse necessária, até obtenção total ou parcial do desbridamento.



Figura 8: Retirada de larvas de *C. megacephala* após 48 horas da aplicação. *Fonte:* Laboratório de Insetos e Vetores UFRN.

4.4 Identificação bacteriana e Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA)

Visando se obter o perfil microbiano presente em cada úlcera, a coleta do espécime clínico foi precedida de lavagem da úlcera com jatos de solução fisiológica 0,85% morna. Após a lavagem, foram realizadas as coletas com dois swabs com a técnica Z (Zig-Zag) (COOPER et al, 1996). Depois da coleta a amostra foi enviada acondicionada em meio de transporte *Stuart* (DIFCO-Laboratories, Detroit, MI, USA) para o Laboratório de Micobactérias do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte DMP/UFRN. O processamento do espécime clínico foi realizado utilizando procedimentos e meios de cultura recomendados por Murray e cols (1999). O espécime foi semeado em meio seletivo Ágar Mac.Conkey, meio de cultura líquido BHI (*BrainHeart Infusion broth*) e Ágar BHI suplementado com 5% de sangue de carneiro (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) seguido de incubação em estufa bacteriológica em atmosfera convencional a 35°C por 24h. Em seguida, foram realizadas provas bioquímicas para identificação das bactérias até o nível de espécie (KONEMAN *et al.*, 2008). Para o Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA) utilizou-se a técnica de Kirby-Bauer- Ágar disco – difusão em placa,

seguindo os critérios de seleção de antibióticos recomendados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2013. Para a estocagem bacteriana, alçadas pesadas de colônias isoladas do microorganismo previamente identificado foram re-suspendidas em dois *ependorf* contendo 1 ml de BHI + glicerol a 10% cada (*Brain Heart Infusion Broth*) e armazenado em *freezer* a -20°C e -80°C.

4.5 Testes fenotípicos confirmatórios para resistência a antibióticos

- Confirmação fenotípica da produção de beta-lactamases de espectro estendido:

Para as enterobactérias não suscetíveis a pelo menos uma cefalosporina de 3º geração, a técnica de disco aproximação, também conhecida como disco sinergismo (JARLIER, 1988; PITOUT *et al.*, 2003) foi efetuada a fim de confirmar a produção de ESBL. Para tanto, foram utilizados os antibióticos Amoxicilina-Ácido clavulânico 20/10µg, Cefepime 30µg, Ceftazidima 30µg, Aztreonam 30µg e Cefotaxima 30 µg a uma distância de 20 mm centro a centro. Uma deformação de halo de inibição ou aparecimento de zona fantasma entre o disco de qualquer β-lactâmico e o de amoxicilina/clavulonato foi considerada evidência de ESBL. (Jarlier *et al.*, 1988). Nos casos em que a avaliação presuntiva de ESBL (resistência a alguma cefalosporina de 3º e/ou 4º e/ou monobactâmico) foi positiva, porém o teste de disco aproximação negativo, a distância entre os discos foi reduzida (Pitout *et al.*, 2003). Para controle de qualidade do teste foi utilizada a cepa controle positivo *Klebsiella pneumoniae* CCBH 3858.

- Confirmação fenotípica da produção de beta-lactamases do tipo Carbapenemases:

Enterobactérias não suscetíveis a pelo menos um carbapenêmico (Ertapenem, Meropenem ou Imipenem) foram submetidas ao teste de Hodge modificado (MHT) seguindo as diretrizes do CLSI 2013, a fim de triar potenciais produtores de carbapenemase. Foram consideradas potenciais produtoras de carbapenemase amostras que favoreceram o crescimento da *E.coli* ATCC 25922 próximo ao disco do carbapenêmico. Para controle de qualidade do teste foram utilizadas as cepas de *E. coli* ATCC 25922 e a cepa controle positivo *Klebsiella pneumoniae* CCBH 4955.

4.6 Análise dos custo das aplicações de terapia larval e comparação com terapêuticas convencionais de rotina utilizadas no HUOL.

Foram avaliados os custos com a produção das larvas para uso em terapia larval e foram comparados aos outros curativos utilizados rotineiramente no HUOL através de uma análise de preço comercial e de licitação. Também foram comparados os gastos com cada tipo de tratamento e o tempo necessário para realização dos procedimentos.

4.7 Análise estatística

Para todas as feridas foram realizadas uma análise descritiva dos dados, com mensuração da área de necrose antes e após a realização da terapia larval, além das espécies de bactérias presentes em cada.

A avaliação da eficácia da terapia larval foi feita usando o próprio paciente como seu controle: uma comparação entre médias de duas amostras pareadas, onde foram comparados os tamanhos da área de necrose, do tecido de granulação e dos diâmetros antes e depois da terapia larval por meio de um Teste t pareado (Callegari- Jacques 2003). O programa usado para as análises foi o BioEstat 5.0.

5. RESULTADOS

5.1 Perfil geral dos pacientes tratados com a Terapia Larval

Cinco pacientes foram submetidos à terapia larval e todos eles apresentaram melhoras significativas nas feridas no curso do tratamento. Apesar deste estudo inicialmente não ser restrito à pacientes diabéticos, todos os pacientes nele inseridos possuíam tal condição crônica e encontravam-se acima de 53 anos de idade. A terapia foi aplicada em três homens (dois idosos) e duas mulheres idosas (Tabela 1).

Em todos os pacientes desse trabalho, pode-se constatar a diminuição do odor exalado pelas úlceras tratadas com TL. Dois pacientes, M.R.S e F.P.S. relataram prurido durante as sessões. Outro relatou dor, J.A.S., o que tentou ser combatido com a prescrição de analgésicos. Após quatro sessões de terapia, o paciente J.A.S. queixou-se de dor mais severa e desistiu do tratamento. Com exceção da paciente S.F.G., os demais pacientes possuíam úlceras que acometiam os tecidos subcutâneo, muscular, ósseo e tendões.

Tabela 1: Hábitos comportamentais predisponentes dos pacientes e informações sobre suas úlceras.

Duração do desbridamento (média)	28 dias (5-45)	
Tratamento Prévio	Agentes químicos desbridantes: 1 Procedimentos Cirúrgicos: 4	
Idade (média)	70 anos (54-83)	
Doenças Associadas	Doença Cardíaca: 1 Doença Periférica Vascular: 1 Hipertensão: 3 Doença Renal: 1	
Sobrepeso/Obesidade	Sobrepeso: 2	Obesidade: 0
Uso de Antibióticos Sistêmicos	Sim: 4	Não: 1 (somente uso prévio ao tratamento)
Atendimento Ambulatorial ou Interno:	Ambulatorial: 2 Interno: 3 Interno e Ambulatorial: 2	
Local da Ferida	Lesão na planta do pé: 1 Lesão no dorso do pé: 1 Lesão transmetatarsiana: 3	
Presença de Outras Feridas	Sim: 0	Não: 5
Uso de Álcool	Sim: 0	Não: 5
Fumante	Sim: 0	Não: 5
Caso Recidivante	Sim: 0	Não: 5
Tempo de Diabetes (média)	30 anos (20-40)	
Restrição Locomotora	Sim: 4	Não: 1

5.2 Avaliação do desbridamento com o uso da terapia larval

A evolução das úlceras dos pacientes, quanto aos percentuais dos tecidos necróticos e de granulação e em relação à superfície da úlcera, durante as aferições estão organizadas nas figuras 9 e 10. As maiores variações foram encontradas nos pacientes M.R.S. e S.F.G.

O percentual de necrose do paciente M.R.S. inicialmente era de 50% e após quatro aferições chegou a apenas 1% com total cobertura de tecido ósseo e tendões por granulação. Já a granulação aumentou durante o curso da terapia (foi de 50% a 99% em relação a superfície total da úlcera). Quanto ao paciente S.F.G., não havia exposição óssea, entretanto, 98% superfície da úlcera era constituída por tecido necrótico. Percentual esse que diminuiu para 65% após uma aplicação. A granulação também aumentou após a primeira aplicação (foi de 2% a 35% em relação à superfície total da úlcera). A comparação da média total do tecido de necrose e de granulação antes e após os tratamentos mostrou diferença significativa e pode ser observada na figura 11.

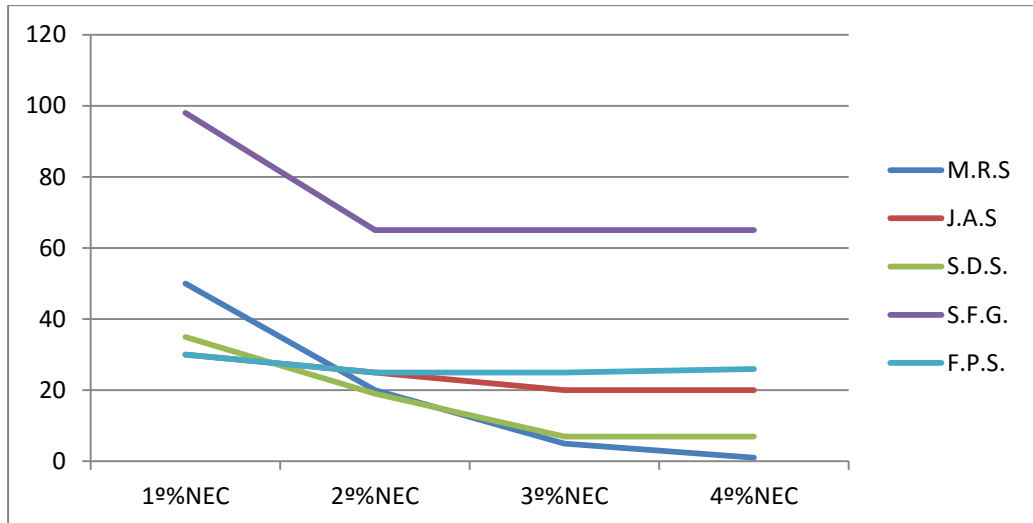


Figura 9: Evolução da área percentual de necrose nas úlceras tratadas com terapia larval, em quatro aferições.

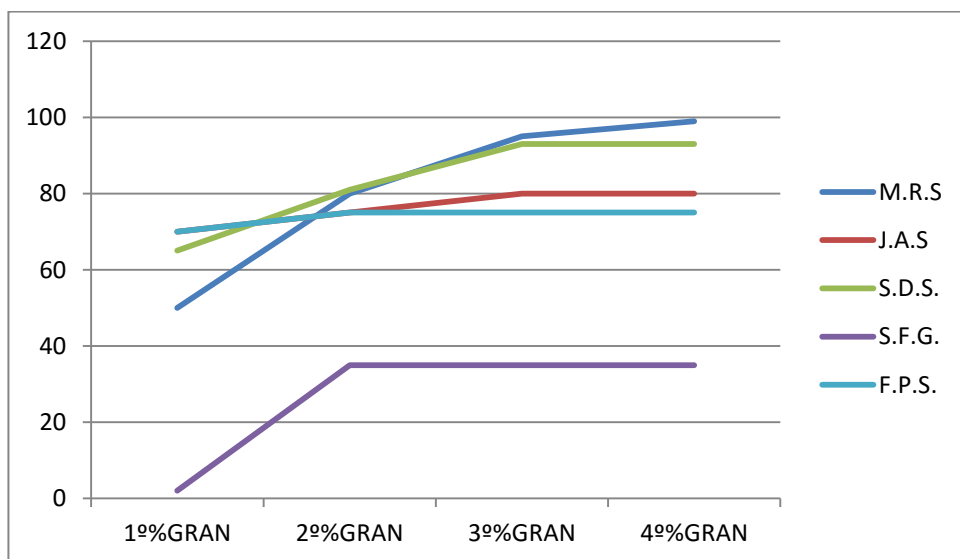


Figura 10: Evolução da área percentual de granulação das úlceras tratadas com terapia larval, em quatro aferições.

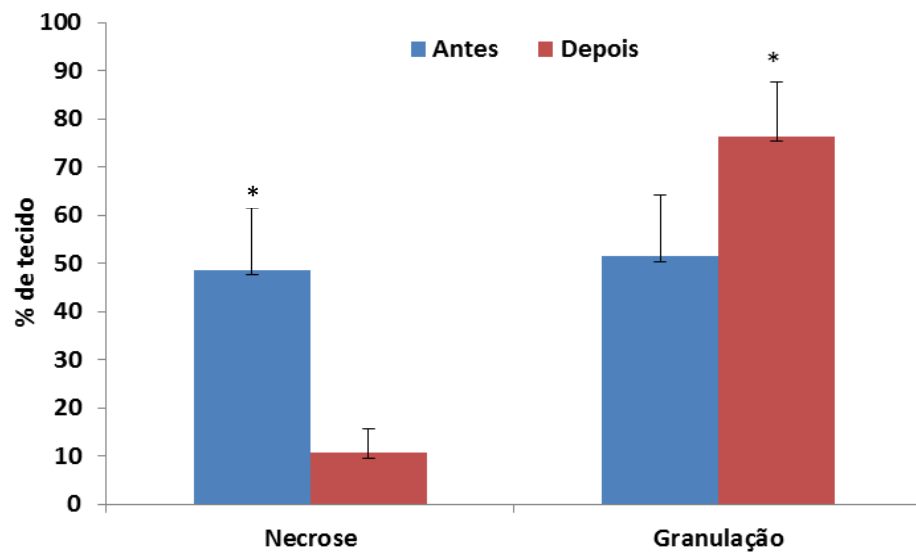


Figura 11: Comparação da média total do tecido de necrose e de granulação, antes e após os tratamentos com terapia larval.

A diferença entre o antes e o pós-terapia larval nas configurações dos leitos das feridas podem ser observadas nas figuras de 12 a 16 abaixo.

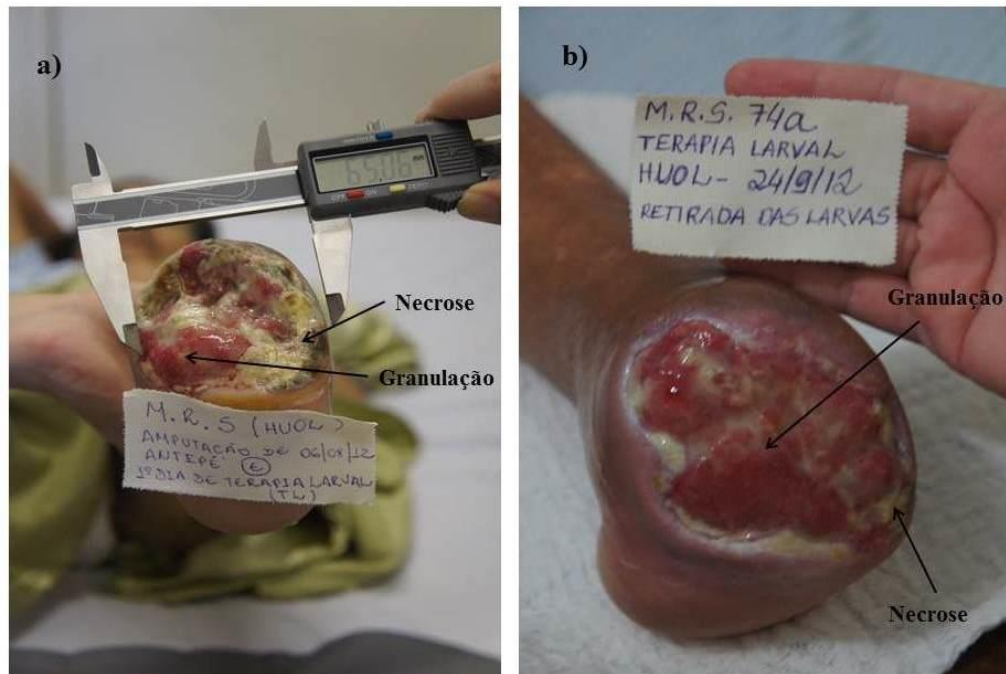


Figura 12: Paciente M.R.S. a) Antes do início do tratamento. b) Superfície da ferida após seis sessões de terapia larval.

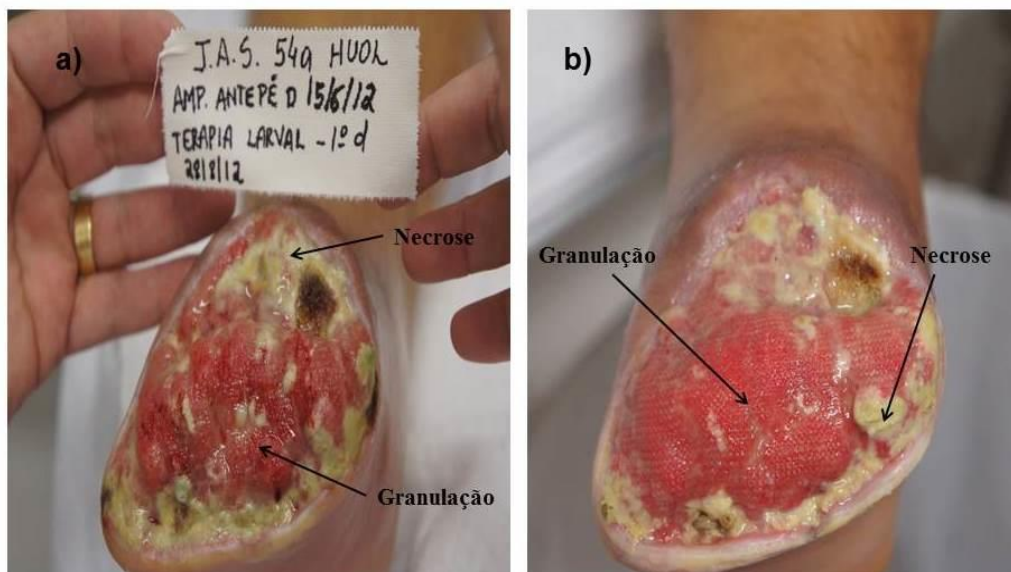


Figura 13: Paciente J.A.S. a) Antes da terapia larval. b) Após quatro sessões de terapia larval.

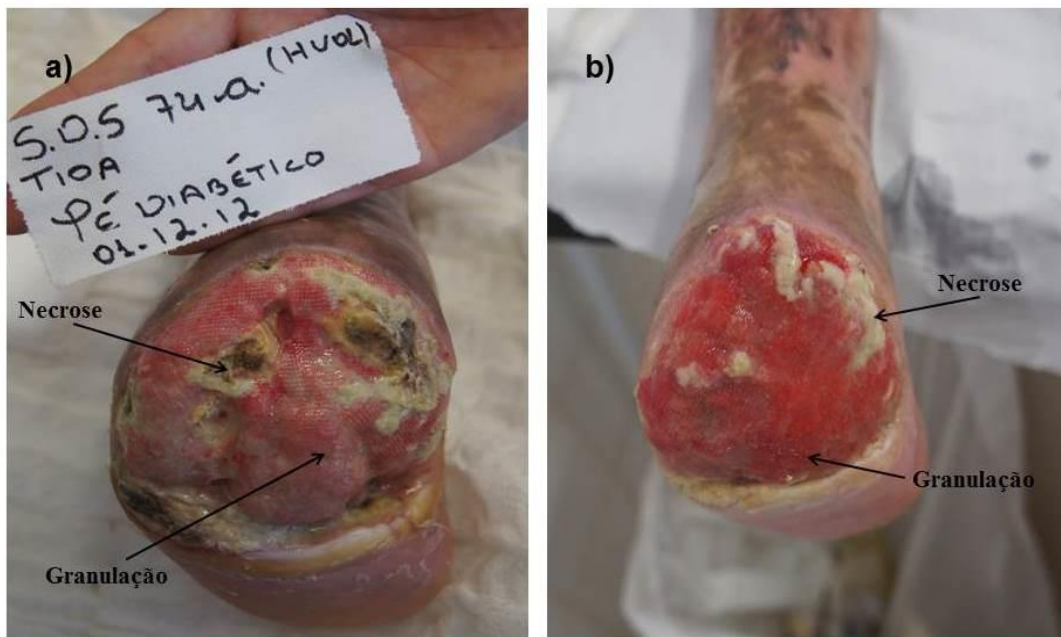


Figura 14: Paciente S.D.S. a) Antes da aplicação das larvas. b) Após sete sessões de terapia larval.

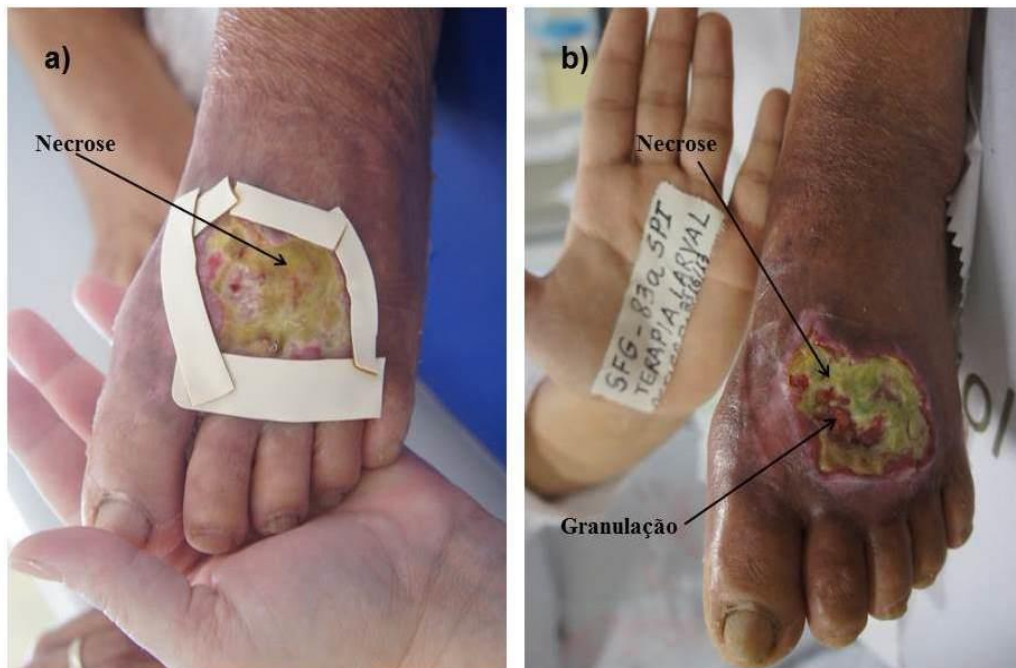


Figura 15: Paciente S.F.G. a) Antes da aplicação das larvas. b) Após uma sessão de terapia larval.

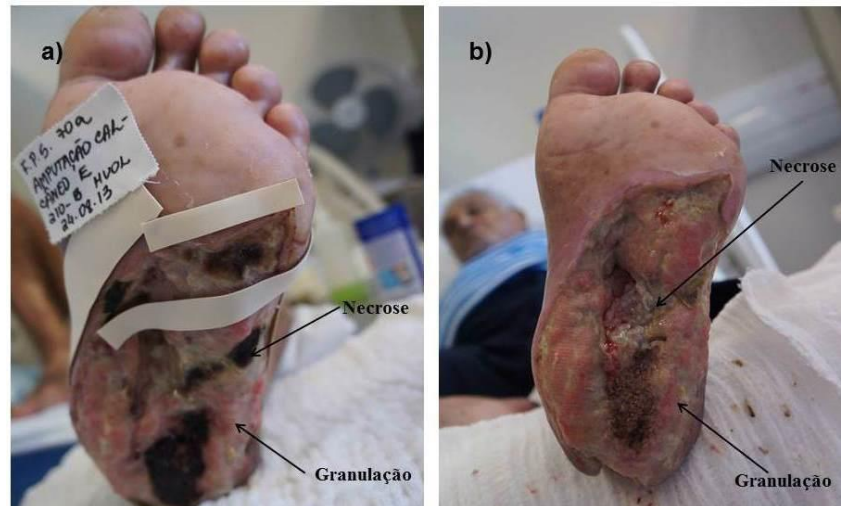


Figura 16: Paciente F.P.S. a) Antes da aplicação das larvas. b) Após oito sessões de terapia larval.

5.3 Avaliação da Retração das úlceras

Algumas mudanças quanto ao perímetro das úlceras foram observadas. Pequenas e grandes retrações foram notadas em diferentes pacientes. Por ausência de ferramentas para este fim, a medição do perímetro não foi realizada, contudo, o menor diâmetro e o maior diâmetro - menor e maior distância entre bordas opostas da úlcera, respectivamente - das lesões foram mensurados antes do tratamento e a cada 15 dias enquanto era realizada a TL a fim de calcular a área aproximada das úlceras.

A maior variação de área de superfície da úlcera foi encontrada na paciente M.R.S. Inicialmente a área de superfície possuía $44,2 \text{ cm}^2$ e após o tratamento chegou a $33,36 \text{ cm}^2$ com redução percentual de 24,52%. Já a úlcera da paciente S.F.G. não sofreu variação de área, apenas nos percentuais de tecidos necrótico e de granulação. A área de sua úlcera permaneceu $13,74 \text{ cm}^2$ após a aplicação. A comparação entre as médias dos diâmetros antes e após terapia larval também mostrou diferença significativa.

Na Tabela 2 estão descritos os maiores e menores diâmetros, as áreas, a redução em percentual das úlceras de cada paciente antes e após a terapia, e a respectiva quantidade de aplicações de larvas. Na Figura 17, podem ser observadas as médias dos diâmetros antes e depois da terapia larval.

Tabela 2: Maior e Menor Diâmetros (D) (cm) e Áreas (Cm²) (Mensurados antes e após terapia larval), Redução Percentual (R.P.) das áreas das úlceras dos pacientes e Número de Aplicações de larvas (N.A.)

Pacientes	Maior D antes	Menor D antes	Área antes	Menor D depois	Maior D depois	Área depois	R.P.	N.A.
M.R.S. (1)	8,40	6,70	44,20	5,90	7,20	33,36	24,52	6
J.A.S. (2)	9,50	7,50	55,96	7,10	9,30	51,86	7,33	4
S.D.S. (3)	9,26	8,98	65,31	8,56	8,53	57,35	12,19	7
S.F.G. (4)	5,00	3,50	13,74	3,50	5,00	13,74	0,00	1
F.P.S. (5)	17,50	9,41	129,34	9,37	17,40	128,05	0,99	8
Média	9,93	7,22	61,71	6,89	9,49	56,87	9,01	
Desvio padrão	4,60	2,35	42,50	2,32	4,72	43,31	9,99	

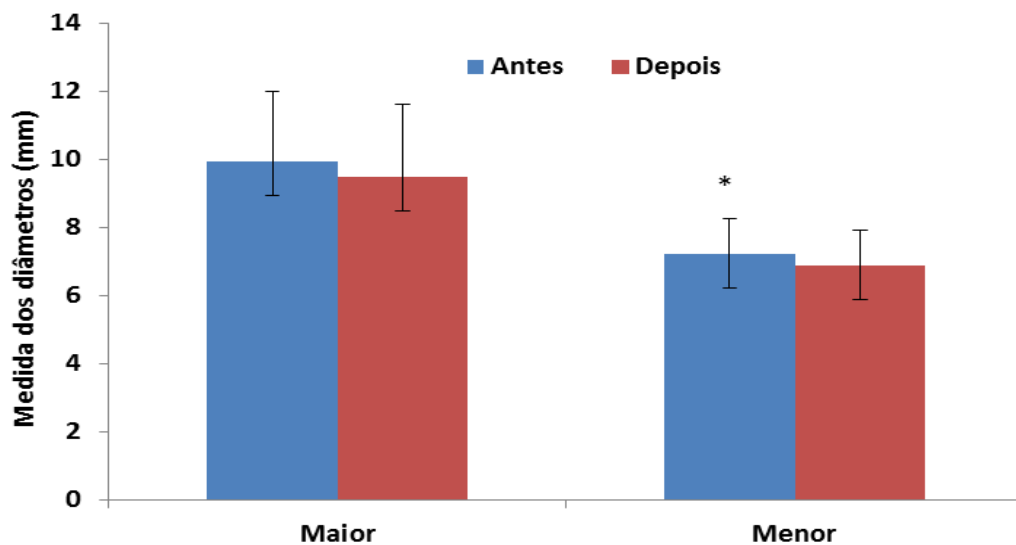


Figura 17: Médias dos diâmetros antes e depois da terapia larval.

5.4 Espécies bacterianas isoladas, perfil de resistência aos antimicrobianos e espécies confirmadas como produtoras de β -lactamases de espectro estendido

Todos os cinco pacientes apresentaram infecções polimicrobianas e todas as espécies identificadas pertenciam ao grupo das bactérias Gram Negativas. A espécie *Pseudomonas aeruginosa* estava presente em todas as úlceras. Na Tabela 3, são encontradas as espécies

bacterianas isoladas nas úlceras dos respectivos pacientes. Os resultados dos Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos das espécies isoladas de seus respectivos pacientes são encontrados nos anexos 3 ao 7.

As frequências das espécies bacterianas isoladas em ordem decrescente foram: *Pseudomonas aeruginosa* (42%), *Escherichia coli* (25%), *Klebsiella pneumoniae* (17%), e *Proteus mirabilis* e *Enterobacter cloacae* com 1% cada.

Tabela 3: Espécies bacterianas isoladas dos seus respectivos pacientes.

Pacientes	Espécies Bacterianas Isoladas
M.R.S.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^c , <i>Klebsiella pneumoniae</i> ^{ac} , <i>Escherichia coli</i>
J.A.S.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> ^a , <i>Escherichia coli</i>
S.D.S	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^b , <i>Enterobacter cloacae</i>
S.F.G.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i>
F.P.S.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^b , <i>Proteus mirabilis</i>

a) Cepas produtoras de β -Lactamases de espectro estendido. b) Cepas resistentes aos carbapenêmicos testados no TSA. c) Cepas submetidas a testes genotípicos.

As duas cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas foram as únicas enterobactérias confirmadas como produtoras de β -lactamases de espectro estendido. Quanto aos gram negativos não fermentadores, duas cepas de *P. aeruginosa* foram identificadas fenotipicamente como produtoras de β -lactamases de espectro estendido (isoladas de S.D.S e F.P.S.). As espécies bacterianas isoladas da paciente M.R.S. foram submetidas a testes genotípicos.

5.5 Análise dos custos das aplicações de terapia larval e comparação com terapêuticas convencionais de rotina utilizadas no HUOL.

Na Tabela 4, é mostrado o custo de uma aplicação de Terapia Larval e são mostrados os valores comerciais e de licitação de curativos convencionais, além do tempo médio demandado para realização de cada procedimento. O valor de uma aplicação de Terapia Larval (5,25 R\$) só é maior do que a papaína em gel 8% (4,60 R\$). No entanto a aplicação de larvas pode permanecer até 72 horas sobre a superfície da úlcera, e possivelmente realizar um desbridamento mais duradouro e eficaz.

Tabela 4: Comparação entre a terapia larval e diferentes métodos de desbridamento utilizados no Hospital Universitário Onofre Lopes- HUOL.

Terapia Larval x Terapêuticas convencionais				
Tipo de terapêutica	Valores (R\$)*		Realização do procedimento***	
	Licitação	Comercial	Em minutos a	Por semana b
Terapia Larval	-	5,25**	30	48 a 72 horas
Desbridamento Cirúrgico	-	-	60 a 120	-
Hidrogel (10g)	8,24	9,96	15	48 a 72 horas
Papaína gel 8% (10g)	-	4,6	15	12/12 h
Kolagenase (10g)	2,64	12,49	15	12/12 h (ideal)

* Valor por aplicação em ferida com aproximadamente 6,0x 5,0cm

** Valor não acrescido de hidrocolóide. Contabilizados os custos com esterilização e manutenção da colônia.

*** Fatores intervenientes ao processo podem postergar o tempo gasto para realizar o procedimento

a- Tempo que leva para a realização da técnica

b- Tempo em que o paciente permanece com a técnica.

6. DISCUSSÃO

A terapia larval vem se solidificando a cada dia nos países onde é utilizada. Os estudos mostram que o seu uso é, em relação aos tratamentos convencionais, de uma eficácia superior no tratamento de feridas de diversas etiologias, como queimaduras, úlceras por pressão, pé diabético, fasciíte necrosante, dentre outras. Quando o seu uso é ineficaz, não chega a ser prejudicial e, em muitos casos, gera apenas um desconforto ou dor temporária relacionada. Contudo, até o presente estudo, ainda não havia sido utilizada no Brasil para tais finalidades, e se mostrou pouco conhecida e compreendida por alguns profissionais de saúde funcionários do HUOL.

Através da análise dos dados produzidos no presente trabalho, pôde-se observar que a terapia larval se mostrou eficaz no tratamento de cinco úlceras crônicas de pés diabéticos infectadas por microrganismos, alguns deles resistentes a múltiplas drogas. O caso clínico da primeira paciente, na qual foram aplicadas larvas de *C. megacephala* para desbridamento de uma úlcera crônica no Brasil foi aceito para publicação na revista Indian Journal of Medical Research (Anexo 8).

As vantagens identificadas com o uso dessa técnica foram a exuberância do tecido de granulação, a rapidez no processo de digestão dos debrís, praticidade na execução da técnica, inclusive por permitir que o procedimento seja feito a nível ambulatorial, além de menor custo.

A terapia larval, que ressurgiu como uma alternativa ao tratamento de feridas infectadas por microrganismos resistentes vêm sendo utilizada rotineiramente em hospitais e centros de saúde pelo mundo. Entretanto, a grande maioria dos estudos foi conduzida a espécie *Lucilia sericata*. Neste estudo, as larvas utilizadas para o desbridamento biológico pertenciam à espécie *C. megacephala*. Quatro das úlceras tratadas receberam previamente tratamentos convencionais cirúrgicos e não cirúrgicos, contudo não apresentaram melhora significativa do quadro até o início do desbridamento biológico.

Quanto ao uso da espécie *C. megacephala* na terapia larval, através dessa pesquisa, permitiu-se elucidar o comportamento dessa espécie para uso terapêutico. A espécie em questão mostrou-se eficaz no desbridamento, confirmando a sua seletividade e preferência por tecidos necróticos sem a invasão dos tecidos viáveis. Tais observações corroboram com os

resultados encontrados em testes com camundongos (NITSCHKE, 2010) e Taha et al. (2010), que evidenciou que as enzimas proteolíticas presentes nos produtos da secreção / excreção de larvas de terceiro estágio de *C. megacephala* foram eficazes no tratamento de feridas em ratos causadas por ácido sulfúrico. Portanto, a utilização de outras espécies de moscas na terapia larval, principalmente endêmicas, pode ser conduzida, sempre respeitando as bionomias das espécies candidatas.

Em vários trabalhos realizados com a terapia larval, há o relato de dor pelos pacientes relacionada às aplicações de larvas, a qual não é severa ao ponto de levar à desistência do tratamento na maioria dos casos (SHERMAN, 2002, 2003; GILEAD et al, 2012; TÉLLEZ et al, 2012). Apenas o paciente J.A.S. relatou dor, que o levou a abandonar o tratamento após quatro aplicações, entretanto, o mesmo apresentava maior sensibilidade e cursava o tratamento com grande infecção nos tecidos moles. Outras desvantagens como “comichão”, sensação de ardor de leve intensidade e aumento do exsudato foram relatadas, mas não interferiram no processo.

No trabalho de Steenvoorde et al (2010), os autores concluíram que vários fatores influenciam significativamente a resposta da ferida à terapia larval, resultando em um saldo negativo. Estes fatores incluem ter 60 anos de idade ou mais, ter isquemia crônica do membro e ter feridas não causadas por trauma, mais antigas ou profundas (onde ossos, músculos ou tendões podem ser visualizados). Neste estudo, praticamente todos os pacientes e suas úlceras possuíam esses fatores, todavia, responderam bem à terapia.

Nos Estados Unidos, entre 1990 e 1995, foram analisadas 43 úlceras tratadas com terapia larval, o tempo médio da realização da terapia foi de 4,8 semanas e atingiu-se o completo desbridamento das úlceras em 80% dos casos. No presente estudo a duração média do tratamento foi de quatro semanas, entretanto, somente em um paciente atingiu-se o completo desbridamento. Em ambos os trabalhos, foram observadas a diminuição do tecido necrótico e aumento do percentual de granulação gradualmente (SHERMAN, 2002).

Quanto ao número de aplicações (curativos), geralmente está relacionado com a área, profundidade e percentual de tecido necrótico da ferida, além de fatores atrelados aos microrganismos colonizadores e ao paciente. Em um estudo com pacientes ambulatoriais, foram realizadas 7,5 aplicações em média (SHERMAN, 2001). Enquanto no trabalho realizado por Steenvoorde & Jukema (2004) o número de aplicações teve grande variação (de 3 a 21 aplicações), contudo o método de desbridamento utilizado foi o curativo realizado com

biossacos, o qual tem um desbridamento menos efetivo e que normalmente requer mais aplicações (STEENVOORDE et al, 2010). Tais achados diferem do encontrado por Jaklic et al (2008), no qual 20 de um total de 30 úlceras foram desbridadas com apenas uma aplicação. No Reino Unido, Bowling et al (2007) utilizaram larvas para o tratamento de 13 úlceras infectadas por MRSA e obteve uma média de três aplicações por ferida até que os MRSA em 92% das úlceras colonizadas fossem eliminados. Neste estudo, a média de aplicações realizadas foi 5,2 (de uma a oito aplicações) e em algumas aplicações, a quantidade de larvas por cm^2 foi diminuída na tentativa de tentar adequar o tratamento à sensibilidade do paciente. Sherman (2002) observou que houve em média uma diminuição de $7,3 \text{ cm}^2$ da área das úlceras de pacientes submetidos à terapia larval com a espécie *L. sericata*. Em outro trabalho, Sherman (2003) obteve uma diminuição de $0,78 \text{ cm}^2$ por semana. Em oito semanas, isso resulta numa redução de $6,24 \text{ cm}^2$. No presente estudo, foi observada uma diminuição média de $4,84 \text{ cm}^2$. O resultado inferior obtido nesse trabalho pode estar relacionado à intercorrências tais como descontinuidade das aplicações devido à altas hospitalares e desaparecimento temporária de pacientes e, não necessariamente, às características e efetividade da espécie *C. megacephala*.

Em seus estudos, Steenvoorde & Jukema (2004) afirmam a partir de seus resultados que as bactérias Gram Positivas são mais facilmente eliminadas das feridas em relação às bactérias Gram Negativas e que um maior número de larvas não é apenas necessário para feridas grandes, mas também para feridas infectadas com bactérias Gram Negativas. Estudos *in vitro* também confirmam uma maior ação larval sobre bactérias Gram Positivas (STEENVOORDE & JUKEMA, 2004, KAWABATA et al, 2010).

É válido salientar que um maior número de aplicações não significa a ineficácia do tratamento para feridas infectadas por bactérias Gram Negativas, visto que as úlceras tratadas nesse trabalho apresentaram visíveis melhoras em seus quadros. Sendo, entretanto, uma limitação metodológica apresentada nesse estudo a não realização de cultura das feridas após as aplicações das larvas, para avaliação de possível eliminação ou surgimento de espécie bacteriana colonizante.

Quanto aos espécimes clínicos, neste estudo, foram isoladas quatro espécies de enterobactérias: *E. coli* (3), *K. pneumoniae* (2), *E. cloacae* (1) e *P. mirabilis* (1). A família Enterobacteriaceae inclui espécies bacterianas importantes que predominam na microbiota intestinal e que são encontradas principalmente associadas a infecções hospitalares e

comunitárias. Estando essas bactérias, isoladas de úlceras de pé diabético, com padrão de multirresistência associadas com o comprometimento tecidual elevado e com falhas terapêuticas, o que reflete no aumento da morbidade e mortalidade nesses pacientes, e na maioria dos casos, pode levar a amputação do membro afetado. O uso empírico de antibióticos também é uma realidade nos países em desenvolvimento, contribuindo diretamente para o aumento dos níveis de resistência dessas bactérias a diferentes classes de antimicrobianos (OLIVEIRA et al, 2009). Observou-se neste estudo que os pacientes apresentavam infecção do tipo polimicrobiana, sempre com a participação de uma enterobactéria e da espécie *P. aeruginosa* (bactéria não fermentadora). As duas espécies de *K. pneumoniae* (isoladas dos pacientes M.R.S. e J.A.S.) foram fenotipicamente identificadas como produtoras de β -lactamases de espectro estendido, enzima que confere resistência às cefalosporinas e aos monobactâmicos, classes de antibióticos β -Lactâmicos. E duas *P. aeruginosa* (isoladas dos pacientes S.D.S. e F.P.S.) apresentaram-se resistentes a todos os carbapenêmicos testados, importante classe de β -Lactâmicos usualmente recomendada para infecções graves causadas por organismos produtores de ESBLs (OLIVEIRA et al, 2009; PITOUT & LAUPLAND, 2008).

Assim sendo, o número de aplicações necessárias no desbridamento das úlceras desse estudo pode ser justificado pelo fato de haver somente a presença de bactérias Gram Negativas, além de todas se encontrarem colonizadas por *Pseudomonas aeruginosa*. Essa espécie apresenta enorme relevância, quando presente nos isolados clínicos, devido à dificuldade de sua erradicação, pois possui resistência intrínseca a diferentes classes de agentes antimicrobianos e é importante produtora de biofilme, sendo continuamente associada a falhas terapêuticas. Além da espécie *P. aeruginosa*, espécies de *Proteus* e *Providencia* também podem formar biofilmes nas feridas, o que pode constituir uma barreira a mais a ser vencida pelas larvas (STEENVOORDE & JUKEMA, 2004; YONEDA et al, 2005).

Novamente no trabalho de Jaklic et al (2008), foram isoladas 61 espécies de bactérias antes da realização da terapia. No trabalho deste grupo, a espécie mais frequentemente isolada foi *S. aureus* e sem segundo lugar a espécie *P. aeruginosa*. Tal dado revela que *S. aureus* é o principal patógeno relacionado, diferindo do que foi encontrado neste estudo, no qual a espécie *P. aeruginosa* foi a espécie mais frequente. Nos trabalhos realizados com terapia larval, comumente não são identificadas as espécies colonizadoras, nem seus perfis de resistência, exceto quando presente a espécie *S. aureus*, e há suspeita de ser MRSA, visto que, ela apresenta maior relevância nas infecções de feridas crônicas aptas à utilização da

terapia larval no exterior. Entretanto, esse perfil não é encontrado no Brasil, onde as bactérias Gram Negativas parecem estar em maior frequência presentes nessas infecções e o mecanismo de resistência mais importante desenvolvido por esses microrganismos é a produção de ESBLs. A presença de Enterobactérias em lesões de pele pode estar relacionada a condições de higiene e falta de escolaridade dos pacientes, como encontrado por Feldmeier et al (2002) (CARBALHO et al, 2004; OLIVEIRA et al, 2009).

Mesmo apresentando-se como uma espécie difícil de ser erradicada das úlceras de pé diabético, a espécie *P. aeruginosa*, dentre outras, encontra-se sob efeito da atividade de várias substâncias presentes na hemolinfa das larvas (identificadas na espécie *L. sericata*), dentre elas a lucifencina, MAMP, seraticina, chymotripsina e DNAses (CAZANDER et al, 2013; VALACHOVÁ et al, 2013). O mesmo vale para a espécie *S. aureus* e MRSA's (BEXFIELD et al, 2004).

Deste modo, utilizando a terapia larval no combate às infecções, tem-se a ação da hemolinfa sobre os microrganismos infectantes. E como consequência da ação dos componentes encontrados na hemolinfa, ocorre o colapso do biofilme, fazendo com que as bactérias fiquem mais susceptíveis à ação dos antibióticos, do sistema imune, e à ação mecânica larval. Combinações de excreção/secreção de larvas e antibióticos poderiam garantir a desagregação completa dos biofilmes, evitando assim um novo crescimento bacteriano a partir da matriz restante, e a ação imediata de antibióticos contra bactérias liberadas do biofilme (VALACHOVÁ et al, 2013).

Portanto, a eficiência da terapia larval, depende por um lado das propriedades das larvas, e por outro, das características microbiológicas e das condições físico-químicas presentes na ferida. Podendo-se, dessa forma, inferir que a diversidade bacteriana presente nas feridas infectadas é um dos fatores primordiais na determinação do sucesso da terapia larval (JAKLIC et al, 2008).

Em relação aos custos, o trabalho de Dumville et al (2009) concluiu que os custos com terapia larval são similares aos dispendidos com a utilização de hidrogel, com uma diferença de apenas nove dias a mais (em média) até a total cicatrização com a utilização de hidrogel. Em seu trabalho, Dumville et al (2009) afirmam que a escolha do tratamento a ser utilizado deve ser feita ou pelo paciente, em virtude de suas expectativas com o tratamento, ou visando o objetivo, por exemplo, um desbridamento mais rápido ou o enxerto de pele. No presente trabalho, a análise dos custos com a produção dos biocurativos e a comparação com

outros produtos utilizados para o desbridamento revelou que os custos com a realização de terapia larval são menores que os empregados na maioria das metodologias convencionais para desbridamento. Além disso, outro fator importante é o tempo em que a técnica permanece no paciente sem que necessite intervenção, que no caso da terapia varia de 48 a 72 horas, diferentemente de outros métodos como a papaína e hidrogel que devem ser substituídos a cada 12 horas, o que demanda mais tempo e mão de obra.

Portanto, neste estudo, a espécie *C. megacephala* provou ser eficaz no tratamento de úlceras de pé diabético infectadas por microorganismos multirresistentes e com carga necrótica. Esse é o primeiro registro da implementação da terapia larval em um hospital brasileiro. E é o primeiro relato da utilização de larvas de *C. megacephala* para terapia larval em humanos, no qual as larvas desta espécie confirmaram a preferência pelo consumo de tecidos necróticos e não se mostraram invasivas.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, ocorreu a tentativa da implementação da Terapia Larval no Hospital Universitário Onofre Lopes - HUOL. O trabalho foi realizado em conjunto com a comissão de curativos do hospital, a qual é coordenada pela Enfermeira Julianny Ferraz. Toda a equipe da comissão se mostrou bastante solícita em relação às aplicações e a realização dos curativos e suas trocas.

Entretanto, a técnica não foi implementada com total sucesso na rotina do hospital devido a algumas intercorrências no trabalho. Alguns fatores dificultaram a realização das aplicações como problemas no insetário, morte precoce da colônia, desenvolvimento lento das larvas e baixa oviposição, dentre outros, provocando uma escassez ou baixa quantidade de larvas disponibilizadas para os procedimentos.

Por algumas vezes, fatores relacionados aos pacientes também foram obstáculos. Alguns pacientes não possuíam transporte próprio e dependiam do cadastramento em programas como o Programa de Acessibilidade Especial – Porta a Porta - PRAE, ou de caronas de vizinhos e parentes. Por determinadas ocasiões, não compareciam ao hospital para realização das trocas de curativos ou não compareciam no turno estipulado. Em outros momentos, os pacientes não retornaram por vontade própria, visto que, apresentavam certa melhora durante o processo. Tais eventos revelam lacunas que precisam ser preenchidas para um melhor atendimento ambulatorial.

Houve a necessidade de instrumentos para uma melhor avaliação do comprometimento das lesões e determinação dos seus graus segundo escalas determinadas. Alguns pacientes necessitaram de exames mais complexos como tomografias, por exemplo, durante o tratamento, os quais não foram realizados no tempo preciso pelo Sistema Único de Saúde.

O projeto foi inteiramente realizado sem financiamento adequado. Ainda sendo de grande relevância para saúde pública e em termos de produção científica, não foi aprovado quando submetido a editais de agências de fomento na área de saúde.

Para o desenvolvimento pleno do trabalho, mostrou-se necessário um maior suporte para realização de procedimentos como criação e esterilização. Fazem-se necessárias

instalações próprias para estes fins, para um melhor desenvolvimento e controle da espécie de mosca utilizada. Sendo claro que o suporte financeiro e apoio de responsáveis técnicos do hospital e da Universidade Federal do Rio Grande do Norte foram insuficientes e sem os mesmos não é possível concretizar um trabalho de tão grande abrangência.

A especialista em curativos, Enfermeira Julianny Ferraz, demonstrou satisfação em fazer parte da pesquisa. Ela esclareceu os benefícios encontrados durante a realização do método, confirmando sua eficácia e afirmando que em sua trajetória foi o melhor método visto por ela no desbridamento das úlceras em questão.

Mesmo sem total sucesso na inserção da terapia larval como tratamento de rotina para feridas, houve certa divulgação da terapia de forma local e até nacional, e principalmente entre os profissionais de saúde do HUOL. Tal fato pode ser considerado uma abertura para uma melhor compreensão e aceitação da técnica pelos profissionais, e conseqüentemente, maior possibilidade de consentimento pelos pacientes.

8. PERSPECTIVAS

- Continuidade na implementação da terapia larval de forma local no HUOL.
- Obtenção de financiamento e aquisição de espaço físico próprio para produção das larvas;
- Capacitação de outros profissionais, prioritariamente os de enfermagem, para aplicação das larvas;
- Capacitação de profissionais técnicos para os processos de produção de larvas estéreis de *C. megacephala*;
- Expansão da técnica para outros centros de saúde do município;

9. REFERÊNCIAS

ABAD C. & SAFDAR N. From Ulcer to Infection: An Update on Clinical Practice and Adjunctive Treatments of Diabetic Foot Ulcers. **Curr Infect Dis Rep**, v. 14, p. 540–550, 2012.

AKHTAR N., ABDEL-REHIM S., RODRIGUES J., BROOKS P. The use of larvae therapy to debride full thickness burns in the anaesthetically unfit patient: The Nottingham experience. **BURNS**, v. 37, p. 44 – 49, 2011.

ALEXIADOU K. & DOUPIS J. Management of Diabetic Foot Ulcers. **Diabetes Ther**, v. 3, 2012. DOI 10.1007/s13300-012-0004-9

APELQVIST J., BAKKER K., VAN HOUTUM W. H., N. C. SCHAPER N. C. Practical guidelines on the management and prevention of the diabetic foot. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 24(Suppl 1), p.181–S187, 2008.

BADER M. S. Diabetic Foot Infection. **American Family Physician**, v. 78 (1), 2008.

BAER W. S. The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larvae of the blowfly). **Journal of Bone Joint Surgery**, v. 13, p. 438–475, 1931.

BAKKER K. & SCHAPER N. C. The development of global consensus guidelines on the management and prevention of the diabetic foot 2011. **Diabetes Metab Res Ver**, v. 28(Suppl 1), p. 116–118, 2012

BISHOP A. J. & MUDGE E. A retrospective study of diabetic foot ulcers treated with hyperbaric oxygen therapy. **Int Wound**, v. 9, p. 665–676, 2012.

BOWLING F. L., SALGAMI E. V., BOULTON A. J. Larval therapy: a novel treatment in eliminating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from diabetic foot ulcers. **Diabet Care**, v. 30(2), p. 370-371, 2007.

CARVALHO C. J. B., RIBEIRO P. B. Chave de identificação das espécies de Calliphoridae (Díptera) no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia e Veterinária**, v. 9 (2), p. 169-173, 2000.

CARVALHO C. B. M., NETO R.M., ARAGÃO L. P., OLIVEIRA M. M., NOGUEIRA M. B., FORTI A. C. Pé Diabético: Análise Bacteriológica de 141 Casos, **Arq Bras Endocrinol Metab** v. 48, nº 3, 2004.

CARVALHO 2012!!!

Clinical and Laboratory Standards Institute (m100-s23). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*; twenty-third informational supplement. Jan 2013.

CORDEIRO K. B. B., LUZ J. R. P., Morfologia e duração do desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) em condições de laboratório. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 50, (47), p. 709-717, 2010.

CAZANDER G., PRITCHARD D. I., NIGAM Y., JUNG W., NIBBERING P. H. Multiple actions of *Lucilia sericata* larvae in hard-to-heal wounds. **Bioessays**, v. 35, p. 1083–1092, 2013.

COOPER R & LAWRENCE J.C. The isolation and identification of bacteria from wounds. **J Wound Care**, v. 5(7), p. 335-40, 1996.

CUBAS M. R., SANTOS O. M., RETZLAFF E. M. A., TELMA H. L. C., ANDRADE I. P. S., MOSER A. D. L., ERZINGER A. R. Pé diabético: orientações e conhecimento sobre cuidados preventivos. **Fisioter Mov**. 2013 v. 26(3), p. 647-55, 2013

DAVYDOV L. Maggot Therapy in Wound Management in Modern Era and a Review of Published Literature. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 24(1), p. 89-93, 2011.

DOERLER M., REICH-SCHUPKE S., ALTMAYER P., STÜCKER M. Impact on wound healing and efficacy of various leg ulcer debridement techniques. **JDDG**, v. 10, p. 624–631, 2012.

DUMVILLE J. C, WORTHY G., BLAND J. M., CULLUM N., DOWSON C., IGLESIAS C. , MITCHELL J. L., NELSON E. A., SOARES M. O., DAVID J TORGERSON D. J. Larval therapy for leg ulcers (VenUS II): randomized controlled trial. **BMJ**, 2009. doi:10.1136/bmj.b773

FELDMEIER H, HEUKEIBACH J, GISELE M, CARVALHO C. B. M., SOUSA A. Q., BARBOSA M.M. Bacterial superinfection in human tungiasis. **Trop. Med. Int. Health**, v. 7, p. 559-569, 2002.

FREIRE N. M. S., MELLO R, P. **Entomologia e Acarologia na Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro/ RJ. Ed L.F. livros. p. 138, 168. 200p, 2006.

GALINDO L. A. **Interações Interespecíficas e Comportamentais entre Moscas-Varejeiras: Abordagens Ecológicas e Médico-Legais Envolvendo Populações Naturais**. Tese (doutorado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, UNESP, 2009.

GILEAD L., MUMCUOGLU K. Y., INGBER A. The use of maggot debridement therapy in the treatment of chronic wounds in hospitalised and ambulatory patients. **J Wound Care**. v. 21, p. 78, 80, 82-85, 2012.

GOMES L., VON ZUBEN C. J. V., SANCHES M. R. Estudo da dispersão larval radial pós-alimentar em *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 47(2), p. 229-234, 2003.

GROSSMAN J. **Flies as medical allies**. The world I 1994; 9:187–94.

International Consensus on the Diabetic Foot Grupo de Trabalho Internacional Sobre Pé Diabético, Consenso Internacional Sobre Pé Diabético - International Working Group on the Diabetic Foot, , 2011.

HU Y., YUAN X., LEI C. Sexual size dimorphism decreases with temperature in a blowfly, *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). **Ecological Entomology**, v. 36, p. 111–115, 2011.

IRION G. L. **Feridas: Novas Abordagens, Manejo Clínico e Atlas em Cores**. Rio de Janeiro – RJ: GUANABARA KOOGAN S.A., 2005.

JAKLIC D., LAPANJE A., ZUPANCIC K., SMRKE D., GUNDE-CIMERMAN N. Selective antimicrobial activity of maggots against pathogenic bacteria. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 617–625, 2008.

JARLIER, V., *et al.* Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. **Rev Infect Dis**, v. 10, n. 4, p. 867-78, 1988.

KRUGLIKOVA A. A. & CHERNYSH S. I. Surgical Maggots and the History of Their Medical Use. **Entomological Review**, v. 93(6), p. 667–674, 2013.

LI Q., LU R., HUO R., HONGBIN FU H. Maggots of *Musca domestica* in treatment of acute intractable wound. **Surgery**, v. 145, nº 1, 2008. doi:10.1016/j.surg.2008.08.016

MARCHIORI C. H., SILVA C. G. Dípteros Sinantrópicos Associados a Restos Alimentares e Seus Parasitóides. **Neotropical Entomology**, v. 30, p.187-189, 2011.

MARCONDES C. B. **Terapia Larval De Lesões De Pele Causadas Por Diabetes E Outras Doenças**. Florianópolis - SC: Ed. da UFSC. 86 p, 2006.

MCINTOSH M. D., MERRITT R. W., KOLAR R. E, KIMBIRASKAS R. K. Effectiveness of wound cleansing treatments on maggot (Diptera: Calliphoridae) mortality. **Forensic Science International**, v. 210, p. 12–15, 2011.

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

MORGAN C. & NIGAM Y. Naturally derived factors and their role in the promotion of angiogenesis for the healing of chronic wounds **Angiogenesis**, v. 16, p. 493–502, 2013.

MOTTA R. N., CARVALHO C. B. M., MOTA M. O., SALDANHA G. B., ABREU C. V. M. P. Pé diabético: etiologia e resistência a antimicrobianos de cepas isoladas em moradores do Estado do Ceará. **NewsLab**, v. 65, p. 118 – 130, 2004.

MUMCUOGLU K., INGBER A., GILEAD L., STESSMAN J., FRIEDMANN R., SCHULMAN H., Maggot therapy for the treatment of intractable wounds. **International Journal Dermatology**, v. 38, p. 623–627, 1999.

MURRAY P. R., BARON E. J., PFALLER M. A., TENOVER F. C., YOLKEN R. H. **Manual of clinical microbiology**. Washington: ASM Press. 7th ed, 1999.

NGOEN-KLAN R., MOOPHAYAK K., KLONG-KLAEW T., IRVINE K.N., SUKONTASON K. L., PRANGKIO C., SOMBOON P., SUKONTASON K. Do climatic and physical factors affect populations of the blow fly *Chrysomya megacephala* and house fly *Musca domestica*? **Parasitol Research**, v. 109, p. 1279–1292, 2011.

NITSCHKE M. J. T. **Avaliação da recuperação das lesões cutâneas por meio da terapia larval utilizando como modelos ratos *Wistar***. Tese (doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu/SP, 2010.

OLIVEIRA C. F., DAL FORNO N. L. F., ALVES I. A., HORTA J. A., RIEGER A., ALVES S. H. Prevalência das famílias TEM, SHV e CTX-M de β -lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp no Hospital Universitário de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul [Prevalence of the TEM, SHV and CTX-M families of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp at the University Hospital of Santa Maria, State of Rio Grande do Sul] **Rev Soc Bras Med Trop** v. 42, p. 556 - 560, 2009.

PINHEIRO M. A. R. Q. **Padronização da Criação e Esterilização de Larvas de *Chrysomya Megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) para uso em Terapia Larval**. In XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia, São Paulo, SP, 2011. Associação Brasileira de Parasitologia

PITOUT J. D., *et al.* Modification of the double-disk test for detection of enterobacteriaceae producing extended-spectrum and AmpC β -lactamases. **J Clin Microbiol**, v. 41 (8), p. 3933-5, 2003.

PITOUT J. D. & LAUPLAND K. B. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. **Lancet Infect Dis**, v. 8(3), p. 159-66, 2008.

REIBER G. E, VILEIKYTE L, BOYKO E. J. Causal pathways for incident lower-extremity ulcers in patients with diabetes from two settings. **Diabetes Care**, v.22, p. 157–62, 1999.

RIBEIRO A. G., SARDENBERG L. M., SARDENBERG J. A. G. N. **Tratamento de Feridas**. Goiânia – GO: Ed. AB. 96 p, 2004.

ROMÃO A. R. R. **Dinâmica populacional, anautogenia e dependência da densidade em moscas-varejeiras: experimentação e teoria populacional**. Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Bocutacu/SP – 2011.

SHERMAN R. A., HALL M. J. R., THOMAS S. MEDICINAL MAGGOTS: An Ancient Remedy for Some Contemporary Afflictions. **Annual. Review of Entomology**, v. 81, p. 45-55, 2000.

SHERMAN R. A. 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 (2), p. 336-344, 2002.

SHERMAN R. A., SHERMAN J., GILEAD L., LIPO M., MUMCUOGLU K.Y. Maggot Debridement Therapy in Outpatients. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 82, p. 1226-9. 2001.

SHERMAN R. A. Maggot Versus Conervative Debridement Therapy For The Treatment Of Pressure Ulcers. **Wound Repair And Regeneration**, v. 10, p. 208-214, 2002.

SHERMAN R. A. Maggot Therapy for Treating Diabetic Foot Ulcers Unresponsive to Conventional Therapy. **Diabetes Care**, v. 26, p. 446–451, 2003.

SINGH S. K., SAHAY R. K., KRISHNA A. Oxidative stress in diabetic foot ulcer. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 2, p. 109—113, 2008.

SOARES M. O., IGLESIAS C. P., BLAND J. M., CULLUM N., DUMVILLE J. C., NELSON E. A., TORGERSON D. J., WORTHY G. Cost effectiveness analysis of larval therapy for leg ulcers. **BMJ**, 2009. doi:10.1136/bmj.b825

STEENVOORDE P., JACOBI C. E., VAN D.L. Maggot debridement therapy of infected ulcers: Patient and wound factors influencing outcome - a study on 101 patients with 117 wounds. *Ann R Coll. Surg Engl*. v. 89(6), p. 596-602, 2007.

STEENVOORDE P., & JUKEMA G. N. The antimicrobial activity of maggots:in-vivo results. **Journal of Tissue Viability**, v. 14(3), p. 97 – 101, 2004.

TAHA N., ABDEL-MEGUID A., EL-EBIARIE A. Application of native excretory /secretory products from third larval instar of *Chrysomya megacephala* (Diptera:Calliphoridae) on an artificial wound. **Journal of American Science**, v. 6, p. 313-317, 2010.

TELFORD G., BROWN A. P., RICH A., J. S. C. ENGLISH J. S. C., PRITCHARD D. I. Wound debridement potential of glycosidases of the wound-healing maggot, *Lucilia sericata*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 26, p. 291–299, 2012.

TÉLLEZ A. G., ACERO M. A., PINEDA L. A., CASTAÑO J. C. Larvaterapia aplicada a heridas con poca carga de tejido necrótico y caracterización enzimática de la excreción, secreción y hemolinfa de larvas. **Biomedica**, v. 32, 312-320, 2012.

VALACHOVÁ I., BOHOVÁ J., PÁLOŠOVÁ Z., TAKÁČ P., KOZÁNEK M., MAJTÁN J. Expression of lucifensin in *Lucilia sericata* medicinal maggots in infected environments. **Cell Tissue Res**, v. 353, p. 165–171, 2013.

VARZIM L.F.S.B. **Esterilização de ovos de moscas varejeiras *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) para utilização em bioterapia.** Dissertação (mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu/SP, 2005.

WANICZEK D., KOZOWICZ A., MUC-WIERZGO M., KOKOT T., UWIWTOCHOWSKA E., NOWAKOWSKA-ZAJDEL E. Adjunct Methods of the Standard Diabetic Foot Ulceration Therapy. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-12, 2013.

WHITAKER I. S., TWINE C., WHITAKER M. J., WELCK M., BROWN C. S., SHANDALL A. Larval therapy from antiquity to the present day: mechanisms of action, clinical applications and future potential. **Postgrad Med J**, v. 83, p. 409–413, 2007.

WILLIAMS K.A., VILLET M.H. A new and earlier record of *Chrysomya megacephala* in South Africa, with notes on another exotic species, *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae). **African Invertebrates**, v. 47, p. 347–350, 2006.

WOLFF H., HANSSON C. Rearing Larvae of *Lucilia sericata* for Chronic Ulcer Treatment – an Improved Method. **Acta Dermatology Venereology**, v. 85, p. 126–131, 2005.

YONEDA K, CHIKUMI H, MURATA T, GOTOH N, YAMAMOTO H, FUJIWARA H, NISHINO T, SHIMIZU E. Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps by quantitative real-time polymerase chain reaction. **FEMS Microbiol Lett**, v. 243, p. 125-131, 2005

YOUNG M. J. , BREDDY J. L., VEVES A., BOULTON AJ. The prediction of diabetic neuropathic foot ulceration using vibration perception thresholds. A prospective study. **Diabetes Care**, v 17, p. 557–60, 1994.

ZARCHI K. & JEMEC G. B. E. The efficacy of maggot debridement therapy – a review of comparative clinical trials. **Int Wound J**, v. 9, p. 469–477, 2012.

VON ZUBEN V.C.J., STANGENHAUS G., GODOY W.A.C. Competição Larval em *Chrysomya megacephala* (F.) (DÍPTERA: CALLIPHORIDAE): Efeitos de diferentes níveis de agregação larval sobre estimativas de peso, fecundidade e investimento reprodutivo. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 60(2), p. 195-203, 2000.

ZUMPT F. Myiasis in man and animals in the Old World. London: **Butterworths**. p.97, 267, 1965.

ANEXO 1: Questionário e ficha de anamnese e avaliação clínica aplicado aos pacientes inclusos na pesquisa

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA**

QUESTIONÁRIO – Uso da terapia larval no tratamento de úlceras de difícil cicatrização em pacientes no Hospital Universitário Onofre Lopes- Natal, NR.

FICHA DE ANAMNESE E AVALIAÇÃO CLÍNICA

Paciente:		Sexo:	
Registro		Idade:	
Profissão:		Estado Civil:	
Bairro/Cidade			
Raça	Negro() Pardo() Caucasiano() Asiático()		
Escolaridade:			

FATORES PREDISPOANTES / ASSOCIADOS:

Diabetes	Sim ()	Não ()	Especifica (Tempo):
Uso de antibióticos:	Sim ()	Não ()	Especificar:
Doença crônica:	Sim ()	Não ()	Especificar:
Doença Associada ao Diabetes	Sim ()	Não ()	(Hipertensão, Asma, Doença Cardíaca, Doença Vascular) Especificar:
Caso recidivante:	Sim ()	Não ()	Para “Sim”, quantas vezes:
Fumante:	Sim ()	Não ()	
Obeso (a):	Sim ()	Não ()	
Uso de álcool:	Sim ()	Não ()	
Restrição (locomotora/intelectual)	Sim ()	Não ()	Especificar:
Ferida Anterior?	Sim ()	Não ()	Se “Sim”, qual o tempo de cicatrização:

DADOS CLÍNICOS / HOSPITALARES:						
Paciente	Controle ()		Terapia Larval ()			
Origem da Ferida:						
Presença de outras Feridas:	Sim ()	Não ()				
Paciente Ambulatorial:	Sim ()	Não ()	Se “Sim”, esteve interno nos últimos 90 dias?			
Paciente Interno:	Sim ()	Não ()	Se “Sim”, especificar tempo de internação:			
Tratamento Caseiro:	Sim ()	Não ()	Se “Sim”, especificar:			
Tratamento hospitalar	Sim ()	Não ()	Se “Sim”, especificar:			
Local da Ferida:						
Estágio/Grau da Ferida:	Observações:					
Diâmetro (cm) da Ferida:						
Área da Ferida (cm²):						
Presença de Necrose:					Sim ()	Não ()
Tipo de Necrose:						
Porcentagem da necrose						
Presença de Tecido de granulação:	Sim ()	Não ()	Se “Sim”, determinar porcentagem: 50% de granulação pálida			
Tecido (s) acometido (s):	Subcutâneo ()	Muscular ()	Ósseo ()	Intraósseo ()		

Enfermeira responsável : _____
Assinatura

Aluno(a) responsável : _____
Assinatura

Paciente: _____
Assinatura

ANEXO 2: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Científica do Hospital Universitário Onofre Lopes 631/11



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO ONOFRE
LOPES – CEP/HUOL**

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes – CEP/HUOL, devidamente reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP/MS, analisou o projeto:

Título: Uso da terapia larval no tratamento de úlceras de difícil cicatrização em pacientes no Hospital no Universitário Onofre Lopes - RN


Protocolo CEP/HUOL: 631/11

CAAE: 2176.0.000.294-11

Pesquisador Responsável: Renata Antonaci Gama

Este projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, incluindo o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as diretrizes da Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde, em reunião plenária realizada dia 16 de Dezembro de 2011 no CEP/HUOL. Toda e qualquer alteração no projeto/protocolo de pesquisa, assim como eventos adversos que venham a ocorrer, deverão ser comunicados oficialmente e imediatamente ao CEP/HUOL. O relatório final do projeto ou a cópia de sua publicação deverá ser encaminhado ao CEP/HUOL após o término do estudo, conforme cronograma.

Natal, 19 de Dezembro de 2011.


Karla Patrícia Cardoso Amorim
Coordenadora do CEP/HUOL

ANEXO 3: Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos das espécies isoladas na úlcera da paciente M.R.S.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
LABORATÓRIOS RESPONSÁVEIS:

Laboratório de Insetos e Vetores – LIVE e Laboratório de Micobacterias – LABMIC

Paciente: M. R. S.

Origem da Amostra: Ferida na perna

Microorganismo(s) Isolado(s): *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Microorganismo 1: *Klebsiella ozanae*

Antibióticos Utilizados	Sensível	Intermediário	Resistente
Amicacina 30	X		
Ampicilina/Clavulanato 30			X
Ampicilina 10			X
Azetreonam 30			X
Cefalotina 30			X
Cefepime 30			X
Cefoxitina 30			X
Ceftazidima 30			X
Ceftriaxona 30			X
Ciprofloxacina 05			X
Cloranfenicol 30		X	
Gentamicina 10	X		
Piperacilina/Tazobactam 110			X

Sulfazotrim 25			X
Tetraciclina 30			X

Microorganismo 2: *Escherichia coli*

Antibióticos Utilizados	Sensível	Intermediário	Resistente
Amicacina 30	X		
Ampicilina/Clavulanato 30			X
Ampicilina 10			X
Azetreonam 30	X		
Cefalotina 30			X
Cefepime 30	X		
Cefoxitina 30	X		
Ceftazidima 30	X		
Ceftriaxona 30	X		
Cefotaxima 30	X		
Ciprofloxacina 05		X	
Cloranfenicol 30	X		
Gentamicina 10	X		
Piperacilina/Tazobactam 110	X		
Sulfazotrim 25			X
Tetraciclina 30			X

Microorganismo 3: *Pseudomas aeruginosa*

Antibióticos Utilizados	Sensível	Intermediário	Resistente
Aztreonam 30		X	
Amicacina 30	X		
Ciprofloxacina 05			X
Cefepime 30	X		
Ceftazidima 30	X		
Piperacilina/Tazobactam 110	X		
Imipenem 10			X
Meropenem			X
Orfloxacina			X
Norfloxacina			X

Observação 2: Falsa sensibilidade às cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações em vitro – abaulamento dos halos de ceftazidima e cefepime na presença do β-lactâmico mais indutor (imipenem).

Possível mecanismo de resistência: Amp C

ANEXO 4: Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos das espécies isoladas na úlcera do paciente J.A.S.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
LABORATÓRIOS RESPONSÁVEIS:

Laboratório de Insetos e Vetores – LIVE e Laboratório de Micobacterias – LABMIC

Paciente: J. A. S.

Origem da Amostra: Ferida na perna

Microorganismo(s) Isolado(s): *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Microorganismo 1: *Klebsiella pneumoniae*

Antibióticos Utilizados	Sensível	Intermediário	Resistente
Amicacina 30			X
Ampicilina/Clavulanato 30			X
Ampicilina 10			X
Aztreonam 30			X
Cefalotina 30			X
Cefepime 30			X
Cefoxitina 30		X	
Ceftazidima 30		X	
Ceftriaxona 30			X
Ciprofloxacina 05			X
Cloranfenicol 30			X
Gentamicina 10			X
Piperacilina/Tazobactam 110			X

Sulfazotrim 25			X
Tetraciclina 30			X

Observação1: Testes fenotípicos confirmatórios sugerem uma possível ESBL.

Microorganismo 2: *Escherichia coli*

Antibióticos Utilizados	Sensível	Intermediário	Resistente
Amicacina 30	X		
Ampicilina/Clavulanato 30			X
Ampicilina 10			X
Azetreonam 30	X		
Cefalotina 30			X
Cefepime 30	X		
Cefoxitina 30	X		
Ceftazidima 30	X		
Ceftriaxona 30	X		
Ciprofloxacina 05			X
Cloranfenicol 30	X		
Gentamicina 10			X
Piperacilina/Tazobactam 110	X		
Sulfazotrim 25			X
Tetraciclina 30			X

Microorganismo 3: *Pseudomas aeruginosa*

Antibióticos Utilizados	Sensível	Intermediário	Resistente
Azetreonam 30		X	
Amicacina 30	X		
Ciprofloxacina 05			X
Cefepime 30	X		
Ceftazidima 30	X		
Piperacilina/Tazobactam 110	X		
Imipenem			X
Meropenem			X
Orfloxacina			X
Norfloxacina			X

Observação 2: Falsa sensibilidade às cefalosporinas de 3^a e 4^a gerações em vitro – abaulamento dos halos de ceftazidima e cefepime na presença do β -lactâmico mais indutor (imipenem).

Possível mecanismo de resistência: Amp C

ANEXO 5: Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos das espécies isoladas na úlcera do paciente S.D.S.

CENTRO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA

LABORATÓRIOS RESPONSÁVEIS:

Laboratório de Insetos e Vetores – LIVE e Laboratório de Micobacterias – LABMIC

Paciente: S. D. S.

Origem da Amostra: Ferida no pé – amputação de antepé direito (pé diabético).

Microorganismo(s) Isolado(s): *Enterobacter cloacae*, e *Pseudomonas aeruginosa*.

Microorganismo 1: *Enterobacter cloacae*

Antibióticos Utilizados	Sensível	Intermediário	Resistente
Amicacina 30			X
Ampicilina/Clavulanato 30			X
Ampicilina 10			X
Azetreonam 30	X		
Cefalotina 30			X
Cefepime 30	X		
Cefoxitina 30			X
Ceftazidima 30	X		
Ceftriaxona 30			X
Ciprofloxacina 05			X
Cloranfenicol 30	X		
Gentamicina 10	X		
Piperacilina/Tazobactam 110	X		
Sulfazotrim 25			X
Tetraciclina 30			X

Microorganismo 2: *Pseudomas aeruginosa*

Antibióticos Utilizados	Sensível	Intermediário	Resistente
Aztreonam 30			X
Amicacina 30			X
Ciprofloxacina 05			X
Cefepime 30			X
Ceftazidima 30			X
Piperacilina/Tazobactam 110			X
Imipenem			X
Meropenem			X
Orfloxacina			X
Norfloxacina			X

ANEXO 7: Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos das espécies isoladas na úlcera do paciente S.F.G.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
LABORATÓRIOS RESPONSÁVEIS:

Laboratório de Insetos e Vetores – LIVE e Laboratório de Micobacterias – LABMIC

Paciente: S. F. G.

Origem da Amostra: Ferida na perna

Microorganismo(s) Isolado(s): *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Microorganismo 1: *Escherichia coli*

Antibióticos Utilizados	Sensível	Intermediário	Resistente
Amicacina 30	X		
Ampicilina/Clavulanato 30	X		
Ampicilina 10			X
Azetreonam 30	X		
Cefalotina 30			X
Cefepime 30	X		
Cefoxitina 30	X		
Ceftazidima 30	X		
Ceftriaxona 30	X		
Ciprofloxacina 05			X
Cloranfenicol 30			X
Gentamicina 10	X		
Piperacilina/Tazobactam 110	X		
Sulfazotrim 25			X

Tetraciclina 30			X
-----------------	--	--	---

Microorganismo 3: *Pseudomas aeruginosa*

Antibióticos Utilizados	Sensível	Intermediário	Resistente
Aztreonam 30	X		
Amicacina 30	X		
Ciprofloxacina 05			X
Cefepime 30	X		
Ceftazidima 30	X		
Piperacilina/Tazobactam 110	X		
Imipenem			X
Meropenem			X
Orfloxacina	-	-	-
Norfloxacina			X

ANEXO 7: Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos das espécies isoladas na úlcera do paciente F.P.S

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
LABORATÓRIOS RESPONSÁVEIS:

Laboratório de Insetos e Vetores – LIVE e Laboratório de Micobacterias – LABMIC

Paciente: F. P. S.

Origem da Amostra: Ferida na perna

Microorganismo(s) Isolado(s): *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Microorganismo 1: *Proteus mirabilis*

Antibióticos Utilizados	Sensível	Intermediário	Resistente
Amicacina 30	X		
Ampicilina/Clavulanato 30	X		
Ampicilina 10			X
Azetreonam 30	X		
Cefalotina 30			X
Cefepime 30	X		
Cefoxitina 30	X		
Ceftazidima 30	X		
Ceftriaxona 30	X		
Ciprofloxacina 05			X
Cloranfenicol 30			X
Gentamicina 10	X		
Piperacilina/Tazobactam 110	X		
Sulfazotrim 25			X

Tetraciclina 30			X
-----------------	--	--	---

Microorganismo 2: *Pseudomas aeruginosa*

Antibióticos Utilizados	Sensível	Intermediário	Resistente
Aztreonam 30	X		
Amicacina 30	X		
Ciprofloxacina 05			X
Cefepime 30	X		
Ceftazidima 30	X		
Piperacilina/Tazobactam 110	X		
Imipenem			X
Meropenem			X
Orfloxacina	-	-	-
Norfloxacina			X

ANEXO 8: Comprovante de aceite para publicação do artigo “THE USE OF MAGGOT THERAPY FOR TREATING A DIABETIC FOOT ULCER COLONIZES BY MULTI-DRUG RESISTANT BACTERIA: FIRST CASE REPORT FROM BRAZIL” no periódico Indian Journal of Medical Research.

Dear Prof. Motta neto,

The Editorial Board of Indian Journal of Medical Research is pleased to inform you that your manuscript entitled THE USE OF MAGGOT THERAPY FOR TREATING A DIABETIC FOOT ULCER COLONIZED BY MULTI-DRUG RESISTANT BACTERIA: FIRST CASE REPORT FROM BRAZIL, with manuscript number IJMR_1397_13, is considered suitable for publication in the Journal.

We will be sending you the edited manuscript and the page proofs before publication of the manuscript. You will get 50 free reprints.

If you have not sent the Undertaking and copyright transfer forms signed by all the contributors and the images, if any, till now, you are requested to do so at the earliest. These forms can be emailed to editorial@ijmr.in

Please note that the journal reserves the rights to make changes in the language, grammar, presentation, etc. to suit the journal's requirements.

We thank you for submitting your valuable research work to Indian Journal of Medical Research.

With warm personal regards,

Yours sincerely,

The Editorial Team

Indian Journal of Medical Research