

COMUNICACIÓN BREVE

## Evaluación preliminar en un modelo animal de la terapia con larvas de *Lucilia sericata* para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea

Jazzmin Arrivillaga<sup>1</sup>, Jaime Rodríguez<sup>2</sup>, Milagros Oviedo<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Ecología de Vectores, Departamento de Estudios Ambientales, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela

<sup>2</sup> Departamento de Bionálisis, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Maracay, Venezuela

<sup>3</sup> Centro de Investigaciones Parasitológicas José Witremundo Torrealba, Universidad de los Andes, Trujillo, Venezuela

**Introducción.** La terapia con larvas ha sido ampliamente utilizada para el tratamiento de lesiones ulcerativas de la piel; existen registros de enfermedades, como podopatía diabética, osteomielitis y úlceras varicosas, en las cuales el uso de la terapia con larvas ha promovido la cicatrización de la lesión en presencia de patógenos bacterianos resistentes a los antibióticos convencionales.

**Objetivo.** Realizar una prueba piloto de terapia con larvas de *Lucilia sericata* sobre lesiones cutáneas producidas por *Leishmania amazonensis*.

**Materiales y métodos.** En el presente trabajo se empleó un diseño experimental en animales (*Mesocricetus aureatus*, tres réplicas) con la finalidad de analizar las variaciones del tamaño de la lesión por leishmaniasis antes y después de la terapia con larvas de *L. sericata*, utilizando criterios para la evaluación de la terapia tales como tamaño de la lesión, tiempo de aplicación y presencia de edema y secreción.

**Resultados.** Indican una cicatrización efectiva y curación de las lesiones localizadas después de la terapia con larvas de *L. sericata* (80% a 100% de reducción del área de la lesión en 12 horas).

**Discusión.** Los resultados preliminares indican que las larvas de moscas *L. sericata* son de uso potencial como terapia natural alternativa médica y veterinaria para la leishmaniasis cutánea.

### Preliminary evaluation of maggot (Diptera: Calliphoridae) therapy as a potential treatment for leishmaniasis ulcers

**Introduction.** Maggot debridement therapy has been widely used for treating a variety of scarred-over soft-tissue wounds. Published accounts record several illnesses in which treatment with larval therapy has promoted injury healing in conjunction with infection by bacterial pathogens resistant to conventional antibiotics.

**Objective.** An initial test of the maggot therapy was developed for cutaneous injuries produced by *Leishmania amazonensis*.

**Materials and methods.** An experimental design based on an animal model with three replicates in *Mesocricetus aureatus* (Rodentia: Muridae) was used to evaluate size variation lesion before and after larval therapy with *Lucilia sericata* maggots. The criteria used for therapy evaluation were lesion size, maggot application time, and presence or absence of edema and secretions.

**Results.** Effective scarring and wound healing was observed after therapy with *L. sericata* larvae, i.e. 80% to 100% lesion area reduction after 12 hours.

**Conclusion.** The preliminary results suggest that fly maggots of *L. sericata* have a potential use as natural medical and veterinary alternative therapy for the cutaneous leishmaniasis.

**Key words:** leishmaniasis, cutaneous/therapy; therapies, investigational; debridement; larva; ulcer.

Los casos clínicos con lesiones tegumentarias ulcerativas por leishmaniasis son tratados con antimoniales pentavalentes, glucantime (antimoniato de meglumina) y pentostam (estibogluconato de sodio), pero con el tiempo, se ha agravado la situación por falta de respuesta o por respuesta con reacciones secundarias, por lo cual se ha promovido una nueva generación de antimoniales en fase experimental, como la ulamina (1-3).

Sin embargo, existen pacientes inmunosuprimidos por VIH o diabéticos y pacientes con lesiones por leishmaniasis con infecciones secundarias por bacterias, que no responden a los tratamientos, por lo cual la evolución de la enfermedad es más grave, desmejora la calidad de vida del paciente y se dificulta así su curación, lo que se traduce en gastos en fármacos, médicos, hospitalización, transporte y alojamiento (4).

Por otra parte, el costo de producción del tratamiento convencional, su forma de aplicación y la forma de distribución del fármaco, lo hacen inaccesible a la mayoría de los que padecen la enfermedad, lo que dificulta una adecuación del tratamiento en los países que no lo producen. Por estas razones epidemiológicas, ha surgido la necesidad de probar terapias naturales alternativas para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea (5).

Existen tratamientos naturales probados *in vivo*, de bajo costo hospitalario y de producción, tal como la terapia con larvas (6,7), que ha sido aplicada clínicamente en casos de lesiones ulcerativas de piel, como la podopatía diabética y las úlceras varicosas (8-10), y en muchos de los casos, con el compromiso de patógenos, principalmente, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Streptococcus* spp. (11,12). Sin embargo, no han sido evaluadas en lesiones infectadas con protozoarios, como es el caso de las lesiones por *Leishmania* sp.

Correspondencia:

Jazzmin Arrivillaga, Grupo de Ecología de Vectores, Laboratorio de Genética de Poblaciones, Departamento de Estudios Ambientales, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela  
jarrivillaga@usb.ve

Recibido: 31/07/07; aceptado: 20/11/07

El objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar el uso de larvas de *Lucilia sericata* sobre un modelo animal como una terapia natural alternativa o complementaria en el tratamiento de las lesiones cutáneas producidas por *Leishmania amazonensis*, con la intención de promover en primera instancia la curación clínica del paciente con leishmaniasis.

### Materiales y métodos

#### **Animales de experimentación e inducción de leishmaniasis cutánea**

Se infectaron dos hámster machos con la cepa de *L. amazonensis* (IFLA/Br/67/pH 8) en las patas traseras, con 0,1 ml de macerado de las lesiones de un hámster donador. A los 45 días después de aplicar el inóculo, los hámster desarrollaron un infiltrado en ambas patas y en un periodo de 60 días se observaron lesiones abiertas por leishmaniasis.

En este primer ensayo no se realizaron pruebas parasitológicas en los hámster H1 y H2, con el fin de no alterar la superficie de las lesiones antes de la terapia con larvas y porque en esta enfermedad se habla de cura clínica por la cicatrización de la lesión cutánea, a pesar de la presencia del parásito en el paciente determinada por métodos moleculares aun 15 años después del tratamiento (13,14).

#### **Larvas de *L. sericata***

Se aplicaron en forma directa sobre la lesión larvas de primer estadio (cinco larvas por lesión, aproximadamente, una larva por 10 mm<sup>2</sup> de lesión) de la especie *L. sericata* (6), previamente estériles (8), provenientes de la colonia mantenida por Ronald Sherman en la Universidad de California, Irving, a partir de un material donado como resultado de un convenio institucional para su importación.

#### **Diseño experimental**

Los hámster se mantuvieron en el laboratorio bajo las normativas del Código de Bioética y Bioseguridad del Ministerio de Ciencia y Tecnología de Venezuela, para el uso de animales de experimentación (15) y con la previa aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias

de la Salud, Universidad de Carabobo, según normativa interna para la aplicación de la terapia con larvas.

Los hámster se trataron de la siguiente manera:

a) Hámster N° 1 (H1, infectado con *L. amazonensis* y con diagnóstico clínico).

Pata derecha: lesión de leishmaniasis cutánea tratada con larvas de moscas.

Pata izquierda: lesión de leishmaniasis cutánea no tratada, pero con vendaje (control interno)

b) Hámster N° 2 (H2, infectado con *L. amazonensis* y con diagnóstico clínico)

Pata derecha: lesión de leishmaniasis cutánea tratada con larvas de moscas

Pata izquierda: lesión de leishmaniasis cutánea no tratada, pero con vendaje (control interno)

c) Hámster N° 3 (H3, control externo sin infección con *L. amazonensis*)

Pata izquierda: lesión producida experimentalmente por quemadura (previa anestesia del hámster), tratada con larvas de mosca

Los animales fueron anestesiados inoculando 1 ml de solución de fenobarbital (100 mg/2 ml) de forma lenta vía intraperitoneal, con la finalidad de que durmiera por 24 horas, debidamente hidratados. A las dos horas de anestesiado, se procedió a la aplicación de la terapia con larvas.

La lesión de leishmaniasis cutánea se lavó rápidamente con solución fisiológica para eliminar los detritos y elementos celulares, que junto con la fibrina forman una capa endurecida que cubre la lesión de forma superficial y evita la acción de las larvas.

Se aplicó una almohadilla de hidrocólode, con base en el perímetro de la piel intacta que rodea la úlcera. Esta almohadilla tenía en el centro una abertura con la forma de la úlcera. Se procedió a colocar cinco larvas de primer estadio junto con una gasa estéril humedecida con solución salina estéril, para luego extender una capa de pegamento para colostomías, para no permitir la salida de las larvas a través de los bordes de la herida y la cara interna del parche del hidrocólode.

Se colocó un trozo de chifón sobre la abertura y se fijó a la almohadilla en los bordes de la lesión con otra capa de pegamento. Luego, se colocó gasa seca para la absorción de las secreciones durante la acción de las larvas. El vendaje se retiró junto con las larvas 12 horas después, ya que las heridas habían sido desbridadas totalmente y las larvas habían aumentado de tamaño.

Los parámetros físicos utilizados como criterios de la efectividad de la terapia con larvas en la leishmaniasis cutánea fueron: ausencia de edema, área de la lesión (medida en mm<sup>2</sup> con un calibrador vernier) y presencia de secreción por acción de las larvas, granulación y no reapertura de la lesión después de la terapia.

### **Análisis de los datos**

Para el conjunto de datos obtenidos con la cuantificación del tamaño de la lesión se estimó la media total y la desviación estándar. Además, para cada condición experimental se estimó la media interna. Para cada medida de tamaño de lesión, se graficó el cociente entre la diferencia (con signo) de la media total y la media, y la desviación estándar total:  $\text{media total} - \text{media interna} / \text{desviación} = \pm \text{variación}$ .

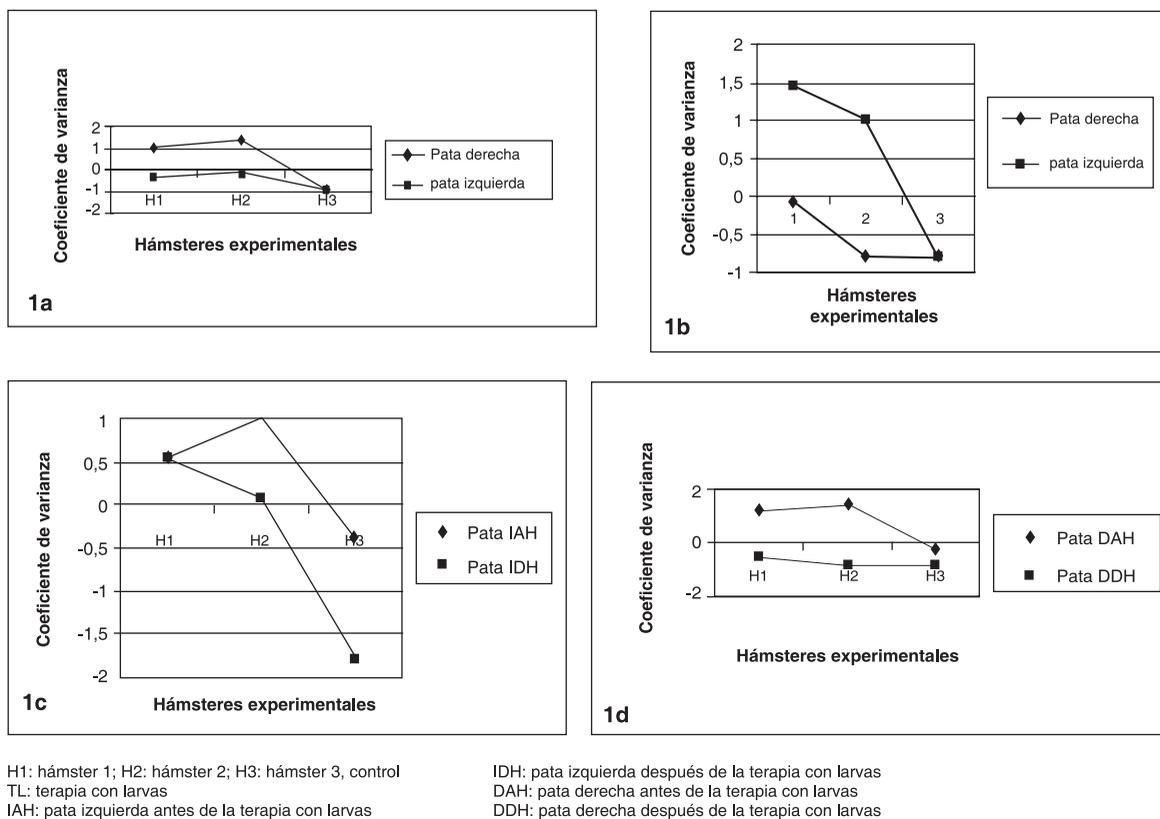
La matriz de los datos, procesamiento y la construcción de las gráficas (figura 1a-d) se llevaron a cabo con el programa Excel, a fin de comparar los datos utilizando un coeficiente de varianza para trabajar con un bajo número de datos.

### **Resultados**

#### ***Coefficiente de variación del área superficial***

La comparación entre los coeficientes indican diferencias en el tamaño de la lesiones entre los tres hámster antes de iniciar la bioterapia. Sin embargo, los análisis de varianza de área indican que hay homogeneidad en el tamaño de las lesiones. Las patas izquierdas son todas más pequeñas (H1: 25 mm<sup>2</sup>, H2: 30 mm<sup>2</sup> y H3: 15 mm<sup>2</sup>) y las patas derechas son comparativamente de mayor tamaño (H1: 56 mm<sup>2</sup> y H2: 50 mm<sup>2</sup>), validándose la aplicación independiente de los tratamientos y lo aleatorio de las réplicas (figura 1a).

Durante la aplicación de la terapia con larvas se observó una respuesta significativa en la



**Figura 1.** Coeficiente de varianza del área ( $\text{mm}^2$ ) de la lesión de cutánea en cada hámster: a) antes de la terapia con larvas; b) después de la terapia independientemente del origen de la lesión; c) antes (IAH) y después (IDH) del vendaje sin terapia sobre las patas izquierdas; d) antes (DAH) y después (DDH) del vendaje con terapia sobre patas derechas. Los valores positivos indican mayor superficie tegumentaria afectada y los negativos menor superficie afectada, ambos por efecto de las diferencias en el tamaño de la lesiones.

disminución del área de la lesión después de las 12 horas, independientemente del hámster experimental, del tamaño previo de la lesión tratada y del origen etiológico de la lesión (figura 1b).

En el caso particular de los hámster con leishmaniasis cutánea, el perfil señala que, cuando las lesiones se vendan sin terapia con larvas (figura 1c), no se observa una reducción en el tamaño de la lesión; por el contrario, cuando se aplica vendaje con terapia sobre los mismos hámster (figura 1d), se evidencia un efecto positivo y local, con una disminución del área afectada de 80% a 100% durante un periodo de acción de 12 horas, sobre una superficie de  $10 \text{ mm}^2$  por larva, suficiente para activar la granulación y la

cicatrización total de la lesión de leishmaniasis cutánea en un periodo de 24 a 48 horas.

#### **Caracterización de las lesiones de los hámsters según la presencia de edema y secreciones antes y después de la terapia con larvas**

Al clasificar las lesiones antes y después de la terapia, según la presencia de edema, todas las lesiones en los hámster H1 y H2 presentaban edema, aunque después de la terapia había disminuido. Sin embargo, en el hámster 3 hubo reducción total del edema después de la terapia. En relación con las secreciones, hubo presencia de las mismas en todas las lesiones antes de la terapia, pero luego de ella sólo se observó en

aquellas lesiones de la pata izquierda que habían sido vendadas sin terapia en los hámster 1 y 2.

### Discusión

El estudio preliminar mostró una terapia de desbridación efectiva, con una curación total sin reaparición de la lesión por leishmaniasis (durante tres meses de evaluación), lo que evidencia el potencial de la terapia con larvas para la leishmaniasis ulcerativa localizada, como una herramienta alternativa de bajo costo hospitalario (US\$ 0,2 por larva) y sin efectos secundarios, y muestra resultados promisorios para los pacientes con leishmaniasis.

No obstante, el mecanismo exacto de acción sobre la leishmaniasis tegumentaria es desconocido. Existen grandes avances en el estudio de los mecanismos de acción de la terapia con larvas sobre algunos patógenos que infectan las lesiones de piel por úlceras varicosas, podopatía diabética u osteomielitis, como *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *Streptococcus* spp. (16,17), y en la cual están involucradas larvas necrobiontófagas, como las de *L. sericata*.

Se sugiere que los mecanismos de acción señalados para otras afecciones de la piel sin el compromiso de protozoarios, pudieran estar mediando también en la respuesta de cicatrización y cura de la lesión por leishmaniasis, como: a) enzimas proteolíticas presentes en la saliva que licúan el tejido necrótico, b) ingestión del tejido por las larvas, c) aumento del exudado, d) presencia de secreciones de las larvas que cambian el pH de la herida, e) acción de infestación de las larvas que estimulan la granulación tisular, f) destrucción del agente patógeno en el tubo digestivo de la larva por acción de sustancias antibactericidas y antibacteriostáticas (18-23).

La ventaja de este tratamiento natural con larvas de moscas, y en especial con el uso de *L. sericata*, es que la especie seleccionada para la aplicación se puede criar masivamente en un corto tiempo de desarrollo. Además, se alimentan sobre el tejido necrótico y dejan de alimentarse cuando se inicia la regeneración del tejido; su acción es inocua, sin reacciones secundarias; aunque se ha reportado la producción de miasis en animales, su incidencia es rara en humanos (24,25).

Los hallazgos de la efectividad de la terapia con larvas para promover la curación clínica, inclinan nuestras investigaciones hacia su aplicación sobre lesiones infectadas con distintas especies productoras de leishmaniasis tegumentaria, con la finalidad de evaluar el espectro de acción y, en especial, su efecto sobre lesiones recurrentes por *L. braziliensis*; también, hacia la caracterización de los componentes salivales y su acción sobre la fase amastigota, con la finalidad de consolidar la fase experimental para la posterior aplicación en pacientes con leishmaniasis. Además, es posible reforzar su uso en pacientes en quienes se han observado efectos tóxicos del antimonial, o respuesta nula o parcial, y en aquéllos con leishmaniasis e infecciones secundarias de tipo bacteriano, para lograr su curación progresiva.

### Agradecimientos

Los autores de este trabajo certificamos el conocimiento y la colaboración de Ronald Sherman durante la ejecución de este trabajo mediante la donación de las larvas y, de igual forma, extendemos nuestros agradecimientos a los árbitros anónimos por sus recomendaciones.

### Conflicto de interés

No declarado.

### Financiación

CDCH-Universidad de los Andes, CDCH-Universidad de Carabobo, DID-Universidad Simón Bolívar.

### Referencias

1. **Berman JD, Grogl M.** *Leishmania mexicana*: chemistry and biochemistry of sodium stibogluconate (Pentostam). Exp Parasitol. 1988;67:96-103.
2. **Herwald BT, Berman JD.** Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (pentostam) and review of pertinent clinical studies. Am J Trop Med Hyg. 1992;46:296-306.
3. **Scorza JV, Morales C, Petit Y, Vásquez L, Rojas E, Scorza JV.** Síntesis de un complejo antimonial pentavalente (Ulamina) y su aplicación experimental para el tratamiento de leishmaniasis cutánea localizada en Venezuela. Bol Malariol San Amb. 2006;1:59-65.
4. **Bofante R, Barroeta S.** Leishmaniasis y leishmaniasis en América con especial referencia en Venezuela. Barquisimeto: Editorial Lara; 2002. p. 270.

5. **Brenzan MA, Nakamura CV, Pardo Dias Filho B, Ueda-Nakamura T, Young MC, Aparacio Garcia Cortz D.** Antileishmanial activity of crude extract and coumestrol from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. Parasitol Res. 2007;101:715-22.
6. **Fitzpatrick M.** Tiny "surgeons" prove surprisingly effective. JAMA. 2000;284:2306-7.
7. **Sherman RA, Sherman J, Gilead L, Lipo M, Mumcuoglu KY.** Maggot debridement therapy in outpatients. Arch Phys Med Rehabil. 2001;82:1226-9.
8. **Sherman RA, Wyle F, Vulpe M.** Maggot therapy for treating pressure ulcers in spinal cord injury patients. J Spinal Cord Med. 1995;18:71-4.
9. **Sherman RA.** A new dressing design for use with maggot therapy. Plast Reconstr Surg. 1997;100:451-6.
10. **Sherman RA.** Maggot debridement in modern medicine. Infect Med. 1998;15:651-6.
11. **Sherman RA, Wyle FA.** Low-cost, low-maintenance rearing of maggots in hospitals, clinics and schools. Am J Trop Med Hyg. 1996;54:38-41.
12. **Thomas S, Andrews AM, Hay NP, Bourgoise S.** The anti-microbial activity of maggot secretions: results of a preliminary study. J Tissue Viability. 1999;9:127-32.
13. **Guevara P, Rojas E, González N, Scorza JV, Añez N, Valera M, et al.** Presence of *Leishmania braziliensis* in blood samples from cured patients to different stages of immunotherapy. Clin Diagn Lab Immunol. 1994;1: 385-9.
14. **Juárez E.** Evaluación en sueros de la quimioterapia específica, por las técnicas de ELISA, PCR e hibridación de pacientes con leishmaniasis cutánea del Estado Trujillo (Tesis). Trujillo: Núcleo Universitario "Rafael Rangel"-Universidad de Los Andes; 2004. p. 72.
15. **Ministerio de Ciencia y Tecnología.** Código de Bioética y Bioseguridad. Caracas: Editorial MCT; 2002. p. 35.
16. **Thomas S, Jones M.** Maggots and the battle against MRSA. Bridgend: SMTL.; 2000. p. 123-40.
17. **Mumcuoglou KY, Miller J, Mumcuoglu M, Friger M, Tarshis M.** Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). J Med Entomol. 2001;38:161-6.
18. **Erdmann GR, Bromel M, Gassner G, Freeman TP, Fischer A.** Antibacterial activity demonstrated by culture filtrates of *Proteus mirabilis* isolated from screwworm (*Cochliomyia homivorax*) (Diptera: Calliphoridae). J Med Entomol. 1984;21:159-64.
19. **Erdmann GR, Khalil SK.** Isolation and identification of two antibacterial agents produced by a strain of *Proteus mirabilis* isolated from larvae of the screwworm (*Cochliomyia hominivorax*) (Diptera: Calliphoridae). J Med Entomol. 1986;23:208-11.
20. **Parnés A, Lagan KM.** Larval therapy in wound management: A review. Int J Clin Pract. 2007;61:488-93.
21. **Horobin AJ, Pritchard DL, Shakesheff LM.** How do larvae of *Lucilia sericata* initiate human wound healing. Eur Cell Mater. 2002;4(Suppl.2):70-1.
22. **Daeschlein G, Mumcuoglu KY, Assadian O, Hoffmeister B, Kramer A.** *In vitro* antibacterial activity of *Lucilia sericata* maggot secretions. Skin Pharmacol Physiol. 2007;20:112-5.
23. **Figuerola L, Flores J, Rodríguez S.** Método de cultivo de larvas de moscas *Lucilia sericata* para terapia larval. Parasitol Latinoam. 2007;62:79-82.
24. **Anderson GS.** Minimum and maximum development rates of some forensically important Calliphoridae (Diptera). J Forensic Sci. 2000;45:824-32.
25. **Talari S, Sadr F, Doroodgar A, Talari M, Gharabagh A.** Wound myiasis caused by *Lucilia sericata*. Arch Iranian Med. 2004;2:128-9.