

Estudio de cultivos celulares primarios derivados de *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae)*

Study of primary cell cultures derived from *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae)

Lena Carolina Echeverry Prieto, MSc**; Ángela Cristina Zapata Lesmes, MSc***;
Alexandra Segura, MSc****; Felio Bello, PhD*****

Recibido: 25 de julio de 2009 • Aceptado: 23 de noviembre de 2009

Para citar este artículo: Echeverry LA, Zapata AC, Segura A, Bello F. Estudio de cultivos celulares primarios derivados de *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). Rev. Cienc. Salud 2009; 7 (3): 17-28.

Resumen

El propósito principal de la investigación aquí presentada fue obtener cultivos celulares primarios derivados de *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). Esta mosca necrófaga es utilizada para determinar el intervalo post-mortem y en terapia larval. A partir de huevos embrionados, se realizaron explantes en diversos medios de cultivo (Grace, Schneider, MM/VP12, DMEM, Grace/L-15 y L-15), suplementados con 20% de suero fetal bovino. La esterilización del material biológico se efectuó mediante la aplicación de soluciones de formaldehído e hipoclorito de sodio. El crecimiento celular se inició en los medios L-15, MM/VP12, Grace/L-15 y Schneider, en un tiempo promedio de 10 días después de efectuadas las siembras de tejidos embrionarios, mediante la proliferación de grupos de colonias dispersas en la superficies de los frascos de cultivo y a partir de las terminaciones de los fragmentos larvales. La evolución del crecimiento celular hasta la formación de la monocapa semi-confluyente fue relativamente rápida, se alcanzó a las tres semanas post-explantes. La morfología de las células en los cultivos fue heterogénea, se destacaron formas epitelioides, similares a nerviosas, gigantes e irregulares. La comparación de las características de crecimiento de los cultivos celulares de *L. sericata* con los obtenidos de otras especies de dípteros mostró mayor favorabilidad en la evolución, en razón a que las células se adaptaron mejor a las condiciones físico-químicas de varios medios de cultivo. Este es el primer informe de cultivos celulares de una mosca de la familia Calliphoridae.

Palabras clave: *Lucilia sericata*, cultivos celulares, morfometría celular.

* Correspondencia: Felio Bello, e-mail: felio.bello@urosario.edu.co.

** Miembro del Laboratorio de Entomología Médica y Forense de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas de la Universidad del Rosario.

*** Profesora asistente y miembro del Laboratorio de Entomología y Enfermedades Transmitidas por Vectores de la Universidad de La Salle.

**** Profesora de cátedra y miembro del Laboratorio de Entomología Médica y Forense de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas de la Universidad del Rosario.

***** Profesor principal y miembro del Laboratorio de Entomología Médica y Forense de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas de la Universidad del Rosario.

Summary

The main purpose of this study was to obtain primary cell cultures derived from *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). Necrophagous this fly is used for determination of post-mortem interval and larval therapy. Since explants embryonated eggs were performed in various culture media (Grace Schneider, MM/VP12, DMEM, Grace/L-15 and L-15), supplemented with 20% fetal serum. Sterilization of the biological material was carried out by immersing it in formaldehyde and sodium hypochlorite solutions. The cell growth was initiated in the L-15, MM/VP12, and Schneider Grace/L-15 in an average time of 10 days after completion of planting by the proliferation of groups of colonies scattered on the surface of the boxes crops and also from the endings of larval fragments. The evolution of cell growth to the formation of monolayer semi-confluent was relatively fast, reaching at 3 weeks post-explant. Cellular morphology in cultured cells was heterogeneous, especially epithelioid forms, similar to nerve, giant and irregular. Comparison of the growth characteristics of these cell cultures with those obtained from other species of flies was more favorable in the evolution of those obtained from *L. sericata*, on the grounds that the cells are better adapted to the physical-chemical conditions of several culture media. This is the first report of a cell culture-fly family Calliphoridae.

Key words: *Lucilia sericata*, cellular cultures, cellular morphometry.

Introducción

Lucilia sericata (Meigen, 1826) es una mosca sinatropical, pues se encuentra frecuentemente asociada con asentamientos humanos. Es conocida también con el nombre científico de *Phaenicia sericata* (1). Pertenece al orden Diptera y a la familia Calliphoridae, de la cual existen alrededor de 1000 especies en el mundo; 126 de ellas se encuentran en el Neotrópico y en Colombia. Pertenecientes a dicha taxa se han descrito las subfamilias *Mesembrinellinae*, *Chrysomyinae*, *Calliphorinae* y *Lucillinae* (2). Los califóridos están casi en cualquier parte y pueden ser vistos tomando sol sobre el follaje y sobre rocas; frecuentemente visitan basura, frutas en fermentación, flores, excrementos y carroña (3). La biología de los califóridos es muy variada, ya que se encuentran como necrófagos, predadores, termiteros y parasitoides de caracoles y lombrices de tierra (4, 5). Las especies que producen miasis en aves y mamíferos son de importancia a nivel médico y veterinario (2).

La mosca *L. sericata* es utilizada en entomología forense al relacionarla con el intervalo postmortem (5, 6), y es aplicada en biocirugía larval, razón por la cual es ampliamente utilizada en países como Inglaterra, Israel, Estados Unidos, Argentina y Venezuela, entre otros (7-11) para curar heridas que no responden a tratamientos convencionales cuando se utilizan antibióticos de alta generación; además, es preferido por constituirse en un tratamiento no invasivo, natural, simple y seguro. En Colombia, en los últimos años y en forma esporádica, se ha dado inicio a esta metodología.

La primera línea celular de insectos fue establecida por Grace (12), en Australia en el año 1962, a partir de tejidos de pupas de la polilla *Antherea eucalypti*, desde entonces, más de 500 líneas han sido establecidas a partir de especies pertenecientes a los órdenes díptera, lepidóptera, hemíptera, homóptera y ortóptera (13-16). Los cultivos celulares de insectos se consideran sistemas biotecnológicamente

promisorios, que permiten realizar diversos estudios en la evaluación de procesos ecológicos celulares; también en investigaciones sobre las interacciones célula a célula y en el seguimiento de actividades intracelulares, tales como procesos de transcripción, síntesis de proteínas, flujo intracelular de metabolitos y producción de bioinsecticidas (17-19). Adicionalmente, ante los requerimientos de nuevas fuentes de proteína en los alimentos, los insectos han adquirido gran interés para las industrias dedicadas a esta actividad, ya que sus proteínas son de alta calidad y digestibilidad, además de ser fuente de minerales y aminoácidos esenciales y no esenciales, de vitaminas y energía (13, 20).

Aún no hay registros sobre cultivos celulares de la familia Calliphoridae, en especial de *L. sericata*, por consiguiente, este es el primer reporte de cultivos celulares primarios de *L. sericata*, sustratos que serán útiles para desarrollar futuros estudios aplicados a nivel celular, con repercusión en otras áreas como endocrinología, virología, bioquímica e inmunología (10). La proyección de los cultivos celulares hacia estas áreas interdisciplinarias permitirá conocer la expresión de diferentes genes de *L. Sericata*, según su susceptibilidad a la infección con arbovirus, las relaciones ligando-receptor que se establecerán entre los microorganismos y las células, y la producción de sustancias antimicrobianas que normalmente hacen parte de las excreciones y secreciones larvales. Además, el conocimiento de las diferentes vías metabólicas e inmunológicas, posibilitará la producción de nuevos antígenos, potenciales candidatos para vacunas, así como la expresión y producción en gran escala de proteínas en estos sustratos celulares, mediante técnicas de biología molecular, las cuales podrían ser aplicadas a nivel médico, agrícola e industrial.

En el presente trabajo se obtuvieron cultivos celulares primarios derivados de tejidos

embrionarios de *L. sericata*, los cuales se caracterizaron con base en patrones de crecimiento y morfología celular.

Materiales y métodos

Material biológico

Se utilizaron huevos embrionados, tomados de una colonia de *L. sericata*, previamente establecida en el Laboratorio de Entomología Médica y Forense de la Universidad del Rosario. La colonia se mantuvo a 27°C +/- 2°, con una humedad relativa de 60%, períodos de luz y oscuridad de 12:12 y un alimento sintético rico en proteínas. Los huevos ovipositados por los adultos hembras sobre el medio sintético se recolectaron luego de 12 a 15 horas de su postura. La investigación se realizó en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Universidad del Rosario, desde julio de 2007 hasta junio de 2008.

Medios de cultivo celular

Se evaluaron los siguientes medios de cultivo: Leibovitz (L-15), Grace, Grace/L-15, MM/VP12, Schneider y DMEM; todos éstos fueron suplementados con 20% de Suero Fetal Bovino (SFB).

Desinfección del material biológico y obtención de cultivos primarios

Los huevos embrionados procedentes de la colonia de *L. sericata* se colocaron en tubos estériles cónicos Falcón de 15ml, con 9ml de hipoclorito de sodio al 0,05%; luego, se agitaron vigorosamente por un lapso de 10 minutos. Los huevos se dejaron decantar y se retiró la solución de hipoclorito. Seguidamente, se adicionó a éstos etanol al 70% y se agitó suavemente por 15 minutos. Al finalizar el tiempo de exposición, los huevos se dejaron precipitar al fondo del tubo y se retiró el alcohol, se lavaron dos veces con agua destilada estéril y, por último, se



Figura 1. Vesículas huecas con células epitelioides adheridas al extremo de un fragmento de tejido, en medio L-15, luego de quince días de cultivo. Aumento: 400X.



Figura 2. Monocapa celular de *L. sericata* en medio L-15 a los treinta días de cultivo. Aumento: 100X.

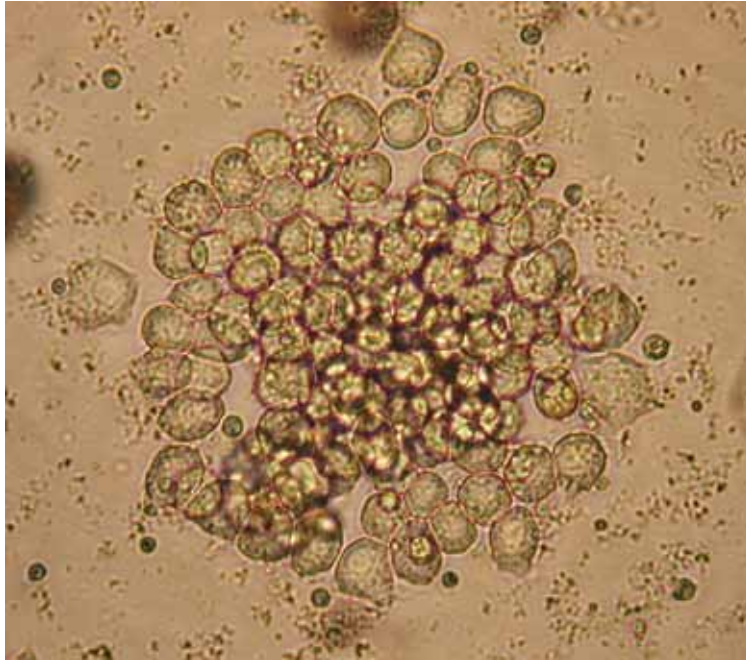


Figura 3. Células epitelioides de *L. sericata* en medio L-15, adheridas a la superficie del frasco, luego de dos días de cultivo. Aumento: 200X.

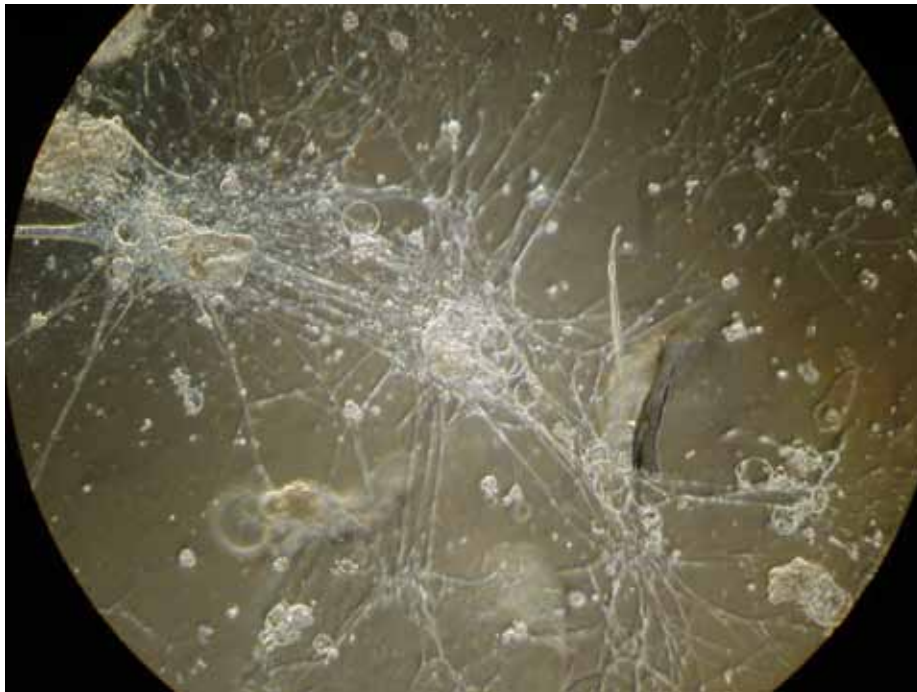


Figura 4. Células similares a nerviosas de *L. sericata* en medio L-15, adheridas a la superficie del frasco, luego de dos días de cultivo. Aumento: 200X.

les adicionó 1,5ml del medio de cultivo a evaluar. A continuación, se realizó la maceración de los huevos con un homogenizador de vidrio. Finalmente, la suspensión celular resultante se llevó a un frasco estéril de cultivo celular para ser incubada a 28°C.

También se evaluó la metodología de desinfección descrita por Figueroa *et al.* (21), a la cual se le hizo ligeras modificaciones. En este procedimiento se utilizaron aproximadamente 200 huevos embrionados de *L. sericata*, que se colocaron en tubos estériles cónicos Falcón de 15ml, con 9ml de hipoclorito de sodio al 0,5%, se agitaron vigorosamente durante 15 minutos, hasta observar que estuvieran completamente separados, y se dejaron decantar. Luego, se retiró el hipoclorito de sodio y fue reemplazado por formaldehído al 5%, se realizó agitación constante durante 15 minutos; una vez decantados los huevos, se retiró la solución de formaldehído y se adicionó agua destilada miliQ (mQ) para el lavado final de dicho material. Se prosiguió retirando el agua y se adicionaron 3ml del medio de cultivo celular a evaluar para el desarrollo de los cultivos primarios. Finalmente, con una pipeta de vidrio estéril se realizó la maceración de los huevos embrionados y se llevó la suspensión a un frasco de cultivo celular estéril de 25cm³, el cual se incubó de inmediato a 28°C. Todos los cultivos celulares se observaron diariamente con un microscopio invertido (Leica DMIL) para determinar su progreso y cada tercer día se realizó cambio del medio de cultivo.

Morfología celular

Durante las observaciones diarias de los cultivos se identificaron las formas celulares procedentes de los fragmentos de tejido embrionario de *L. sericata* y se hizo seguimiento a las características del crecimiento que se fueron configurando en los cultivos a través del tiempo.

Resultados

Cultivos celulares primarios

El crecimiento celular de cada uno de los explantes realizados a partir de huevos embrionados de la mosca *L. sericata*, sembrados en los medios de cultivo Grace y MM/VP12, tuvo una duración entre 10 y 20 días. En el medio Grace las células no presentaron adhesión, ni proliferación, a pesar de que cada tercer día o cada semana se realizaron cambios de medio, en procura de mantener la viabilidad celular. En el medio MM/VP12 las células de tipo epitelioides, provenientes de los explantes, iniciaron la adhesión sobre la superficie de los frascos de cultivo entre los 5 y 8 días después de ser realizados; igualmente, se les hizo cambio de medio y se observó que las células iniciaron la formación de prolongaciones para intercomunicarse y dar continuidad a la división celular. Cuando los cultivos tuvieron aproximadamente 20 días, empezaron a desprenderse y a necrotizarse, lo cual imposibilitó la evolución y obtención de los cultivos primarios en este medio.

Particularmente, con el medio Schneider las células lograron crecer, proliferaron y se adhirieron por mayor tiempo, entre 30 a 45 días, pero después de transcurrido este período se observó desprendimiento y necrotización celular. Por su parte, con los medios Grace/L-15 y DMEM se pudo establecer que las células se mantuvieron en suspensión y que no se presentó replicación celular, por lo cual éstas no se adaptaron a las condiciones de crecimiento *in vitro* provistas por estos medios de cultivo, lo que generó desprendimiento y muerte celular.

En los cinco medios de cultivo anteriores no hubo formación de vesículas, contrario a lo observado con el medio L15, suplementado con SFB al 20%, donde efectivamente la migración celular se inició en las primeras horas después de haberse realizado los explantes, con la particularidad de que al medio no se le

adicionaron sustancias antimicrobianas exógenas, como los antibióticos. Con el transcurso de los días se observó la formación de colonias celulares individuales adheridas a la superficie de los frascos. El crecimiento y proliferación celular superó los 45 días reportados para el crecimiento celular en los otros medios de cultivo, y se obtuvo en este tiempo la monocapa semiconfluente (tabla 1). Se evidenció un patrón de crecimiento fuertemente adherido a la superficie del frasco, con la presencia profusa de formas celulares predominantemente epitelioides (figura 1), las cuales, posteriormente, sufrieron drásticas modificaciones, debido a la formación de prolongaciones celulares, lo que generó en éstas la apariencia de células similares a las nerviosas (figura 2), algunas de las cuales presentaron movimientos pulsátiles. Por último, una característica muy importante fue la presencia de vesículas huecas (figura 3) con células epitelioides adheridas en su superficie, las cuales al desprenderse contribuyeron a la formación de nuevas colonias con gran potencialidad de proliferación en los cultivo.

Al constituirse la monocapa, obtenida en el medio L-15 (figura 4), las formas celulares predominantes fueron similares a las nerviosas y, en menor proporción, hubo presencia de morfologías epitelioides. El cambio parcial de medio de cultivo de crecimiento por medio fresco se realizó cada tres o cuatro días, lo cual indujo en forma acelerada el crecimiento y metabolismo celular, lo que hizo necesario nuevos cambios de medio en menor tiempo. Una vez obtenidas monocapas semiconfluentes en varios frascos se procedió a realizar subcultivos, en los cuales, tras una vigorosa resuspensión, se llevaron las siembras de células a nuevos frascos de cultivo. A la fecha se han realizado más de cinco subcultivos que han evolucionado favorablemente y los cuales han mantenido la morfología celular predominante, aunque su

crecimiento ha sido más lento en comparación con los cultivos primarios.

Los huevos embrionados con los cuales se obtuvieron los mejores resultados correspondieron a aquellos cuyo período de incubación estuvo entre las 12 y las 25 horas después de haber sido ovipositados. El pH óptimo para el crecimiento correspondió a un valor entre 6,8 y 7,0, y la temperatura óptima para el crecimiento se estableció a 28°C.

Discusión

Se utilizaron diferentes protocolos para la desinfección de los huevos embrionados necesarios para la obtención de los cultivos primarios de *L. sericata*. Estos protocolos incluyeron la utilización de hipoclorito de sodio al 0,05%; 0,5% y 1%, en combinación con etanol al 70% y 96% (15, 16); esta mezcla no fue efectiva para la eliminación de la carga microbiana de los huevos. La proliferación de los microorganismos dentro del frasco de cultivo evitó la adhesión celular, al ocupar por completo la superficie del frasco de cultivo donde debían adherirse las células. Con la desinfección mediante el procedimiento de Figueroa *et al.* (21) (con las correspondientes modificaciones efectuadas en el presente trabajo) se logró disminuir la presencia de microorganismos en los huevos empleados para los explantes. En concentraciones menores al 0,5% de hipoclorito de sodio siempre se presentó contaminación bacteriana en los cultivos, lo cual conllevó a la eliminación de los explantes. Al usarlo en una mayor concentración (1%) se observó disminución en la viabilidad de los embriones; por ende, al final se realizaron lavados con solución salina estéril y/o con el medio de cultivo a evaluar; aún así, el material biológico tratado siempre fue inviable, lo que generó necrosis celular por el efecto químico del desinfectante. Por otra parte, el formaldehído en concentraciones superiores al 5% también

afectó el tejido embrionario al producir necrosis celular. Al variar los tiempos de exposición a los desinfectantes se determinó un tiempo óptimo de 15 minutos por cada uno, necesario para obtener un cultivo libre de contaminación bacteriana, con tejido embrionario viable para su crecimiento y proliferación *in vitro*.

Es importante resaltar el orden en el uso de estos químicos para la desinfección de los huevos: el primero en emplearse fue el hipoclorito de sodio, el cual, por su poder detergente, degrada una sustancia aglutinante que las hembras adicionan sobre la masa de huevos cuando los ovipositan (21), lo cual permite la separación y suspensión en la solución química de cada huevo para una desinfección exitosa y, luego, dar continuidad al procedimiento con los demás reactivos.

También se observó que la utilización de sustancias antimicrobianas en los presentes cultivos celulares de *L. sericata*, como gentamicina, penicilina y estreptomycin, aun en concentraciones reportadas como óptimas por otros autores para el establecimiento de cultivos celulares de insectos (22-25), no permitieron el desarrollo celular y, en contraposición, se observó un incremento paulatino en los porcentajes de células necrotizadas o desprendidas de la superficie del frasco de cultivo. Por lo antes mencionado, se retiró todo tipo de antibiótico de los medios de cultivo y posteriormente, se observó crecimiento y adhesión celular. Por otro lado, es posible afirmar que, teniendo en cuenta que una característica de la mosca *L. sericata* es la capacidad de producir antibióticos naturales (7, 10, 11, 14, 26, 27), éstas probablemente estarían realizando un control endógeno de los patógenos, y la adición de otros antibióticos pudo afectar la viabilidad celular, hecho aún por comprobarse con mayor rigurosidad. Con el transcurso del tiempo, en los explantes sin antibiótico exógeno se observó cómo los

cultivos celulares se limpiaron por sí solos de la presencia de contaminación microbiana, hasta eliminarla prácticamente en su totalidad, con la consiguiente formación exitosa de la monocapa confluyente.

Desde los primeros cultivos celulares exitosos derivados de tejidos de un insecto (12) se han establecido más de 500 líneas celulares (28). Sin embargo, de la familia *Calliphoridae*, y aún más específicamente de la especie *L. sericata*, no existe en la actualidad ningún informe de su establecimiento. Luego de realizar diversos explantes con los 6 medios de cultivo utilizados, se logró determinar que el medio L-15 suplementado con 20% de SFB brindó las condiciones óptimas para el crecimiento y proliferación de células provenientes de tejido embrionario de *L. sericata*, sin adición de antibiótico. Lo anterior permite reportar por primera vez el desarrollo de cultivos primarios de esta especie.

Al comparar la composición del medio L-15 con los otros medios utilizados es importante destacar que éste contiene menos sales que los medios MM, VP12 y Schneider, y más aminoácidos que el medio Grace; éstas pudieron ser algunas de las razones por las cuales, debido a la selección natural que hicieron las células, lograron adherirse al sustrato e iniciaron los procesos de crecimiento y formación de vesículas, hasta el establecimiento de una monocapa celular y la obtención de subcultivos. El SFB adicionado al medio de cultivo L-15, en la concentración antes indicada, contribuyó al establecimiento de los cultivos primarios. El SFB está compuesto por esteroides y diferentes hormonas que estimulan la división celular, los cuales, en combinación con los componentes del medio L-15, actuaron en forma óptima para satisfacer las necesidades metabólicas de las células. Al comparar el contenido de iones presentes en la hemolinfa de *Calliphora* (29) con el medio L-15

y el SFB, se observa que la hemolifa contiene 2,08meq/100ml de Ca^{2+} , 3,7meq/100ml de K^{+} y 14,8meq/100ml de Na^{+} ; por su parte, el SFB en su formulación tiene de Ca^{2+} 13,6meq/100ml, de K^{+} 11,2 meq/L y 137 meq/L de Na^{+} ; esto, en combinación con los iones del medio L-15, probablemente contribuyó a simular *in vitro* las condiciones naturales intrínsecas de esta familia, lo que posibilitó la obtención de los cultivos celulares primarios de *L. sericata*.

El tiempo de incubación de los huevos fue un factor determinante para el establecimiento de los cultivos primarios de *L. Sericata* y en general lo es para la obtención de células a partir de embriones de cualquier especie (23-25, 30, 31), debido a que la mitosis celular varía de acuerdo con el estado de desarrollo del organismo o del nivel de diferenciación del tejido seleccionado para realizar los explantes (32-35). Una vez estandarizado el tiempo de embriogénesis para obtener células con capacidad de adaptación y multiplicación celular *in vitro*, se observó excelente adhesión y crecimiento celular. Es importante anotar que al día siguiente de realizar los explantes con huevos embrionados, recolectados entre 12 y 15 horas después de la oviposición y sin necesidad de adicionar antibiótico, disminuyó el nivel de contaminación progresivamente, hasta quedar el cultivo completamente limpio hacia el cuarto día, y con células caracterizadas por su gran capacidad de adherencia y proliferación; ello permitió la formación de la monocapa confluyente.

En las etapas tempranas de crecimiento del cultivo se observó disgregación de células adheridas a la superficie de los frascos de cultivo, derivada de fragmentos de tejido embrionario similar al observado en los cultivos primarios de *Lu. shannoni* (30), *Aedes triseriatus* (36), *A. aegypti* (29), *Lu longipalpis* (24) y *Lu. spinicrassa* (25), con la diferencia de que en esos cultivos la morfología celular predominante fue epitelioide, mientras que en los de *L. sericata*, aunque se presentan formas epitelioides, predominaron las células similares a las neuronales, con largas dendritas y, en algunos casos, con movimientos pulsátiles como los que se pueden observar en células pertenecientes a tejido nervioso o tejido cardíaco (37, 38).

En conclusión, la obtención de cultivos celulares primarios de *L. sericata* fue posible debido a las condiciones nutritivas favorables del medio de cultivo L-15, situación que no brindaron los demás medios de cultivo evaluados. Asimismo, el patrón de crecimiento y las características morfológicas de las células tipificaron de manera particular para esta especie el desarrollo de los cultivos celulares, hasta la evolución exitosa en monocapas confluentes, lo que posteriormente generó subcultivos con lento desarrollo y crecimiento. Estos sustratos celulares representan en la actualidad, en forma potencial, un apoyo promisorio de aplicación para futuros estudios biotecnológicos y biomédicos.

Conflictos de interés: en la realización del presente trabajo no se presentó ningún conflicto de interés financiero, político ni académico.

Agradecimientos: a la Universidad del Rosario y a la Universidad de La Salle por la financiación de la presente investigación. Igualmente, a los laboratorios de Biología Celular y Molecular, y de Entomología Médica y Forense de la Universidad del Rosario, y al laboratorio de Entomología y Enfermedades Transmitidas por Vectores de la Universidad de La Salle.

Referencias

1. Grassberger M, Reiter C. Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the isomegalen–and isomorphen–diagram. *Forensic Sci Int* 2001; 120: 32-36.
2. Pape T, Wolff M, Amat EC. Los califóridos, éstridos, rinofóridos y sarcófagidos (Diptera: Calliphoridae, Oestridae, Rinophoridae, Sarcophagidae) de Colombia. *Biota Colombiana* 2004; 5: 201-208.
3. Drugueri L. *Lucilla sericata*: mosca del vellón o la cascarria. Jul 13 de 2004 [1 página]. Disponible en: URL: <http://www.zoetecnocampo.com/Documentos/miasis/lucilla.htm>. Consultado Enero 6, 2007.
4. Figueroa-Roa L, Linhares AX. Sinantropía de los Calliphoridae (Diptera) de Valdivia, Chile. *Neotrop Entomol* 2002; 31: 233-239.
5. Clark K, Evans L, Wall R. Growth rates of the blowfly *Lucilia sericata* on different bodies tissues. *Forensic Sci Int* 2006; 156: 145-149.
6. Saigusa AK, Matsumasa AM, Yashima AY, Takamiya BM, Aoki Y. Practical applications of molecular biological species identification of forensically important flies. *Legal Medicine* 2009; 11: 344-347.
7. Arrivillaga J, Rodríguez J, Oviedo M. Evaluación preliminar en un modelo animal de la terapia con larvas de *Lucilia sericata* para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea. *Biomédica* 2008; 28: 305-310.
8. Figueroa I, Uherek F, Yusef P, López I, Flores J. Experiencia de terapia larval en pacientes con úlceras crónicas. *Parasitol Latinoam* 2006; 61:160-164.
9. Kerridge A, Lappin-Scott H, Stevens R. Antibacterial properties of larval secretions of the blowfly, *Lucilia sericata*. *Med Vet Entomol* 2005; 19: 333-337.
10. Sánchez MC, Chuaiare L, Narváez R, Segura A. Biocirugía: utilización de larvas de insectos necrófagos en la curación de heridas. La terapia larval. *Rev Cienc Salud* 2004; 2: 156-64.
11. Sherman RA, Hall MJR, Thomas S. Medicinal Maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions. *Annu Rev Entomol* 2000; 45(3-4): 55-81.
12. Grace TDC. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vitro*. *Nature* 1962; 195: 788-789.
13. Smagghe G, Goodman CL, Stanley D. Insect cell culture and applications to research and pest management. *In Vitro Cell Dev Biol - Animal* 2009; 45: 93-105.
14. Sudeep AB, Mourya DT, Mishra AC. Insect cell culture in research: Indian scenario. *Indian J Med Res* 2005; 121: 725-738.
15. Lynn DE. Novel techniques to establish new insect cell lines. *In vitro Cell Dev Biol - Animal* 2001; 37: 319-321.
16. Lynn DE. Development and characterization of insect cell lines. *Cytotechnology* 1996; 20: 3-11.
17. Smagghe G. Insect cell lines as tools in insecticide mode of action research. En: Isaac Ishaaya, Ralf Nauen and A. Rami Horowitz, Ed. *Insecticides design using advanced technologies*. Berlín, Heidelberg: Springer-Verlag; 2007. pp. 263-304.
18. Ikonomou L, Schneider YJ, Agathos SN. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003; 62: 1-20.
19. Lynn DE. Development of insect cell lines: Viruses susceptibility and applicability to prawn cell culture. *Methods Cell Sci* 1999; 21: 173-181.
20. Verkerk MC, Tramper J, Van Trijp JCM, Martens DE. Insect cells for human food. *Biotechnol Adv* 2007; 25: 198-202.
21. Figueroa L, Flores J, Rodríguez S. Método de cultivo de larvas de *Lucilia sericata* para terapia larval. *Parasitol Latinoam* 2007; 62: 79-82.

22. Bello FJ, Boshell J, Rey G, Morales A, Olano V. Initiation of primary cell cultures from embryos of the mosquitoes *Anopheles albimanus* and *Aedes taeniorhynchus* (Diptera: *Culicidae*). Mem Do Inst Oswaldo Cruz 1995; 90: 547-551.
23. Bello FJ, Jiménez ME, Ferro C. Iniciación de cultivos celulares primarios de *Lutzomyia shannoni* (Diptera: *Psychodidae*) y estudio citogenético preliminar de la especie. Biomédica 1997; 17: 49-55.
24. Rey G, Ferro C, Bello FJ. Establishment and characterization of a new continuous cell line from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: *Psychodidae*) and its susceptibility to infections with arboviruses and *Leishmania chagasi*. Mem Do Inst Oswaldo Cruz 2000; 95: 103-110.
25. Zapata AC, Cárdenas E, Bello FJ. Characterization of cell cultures derived from *Lutzomyia spinicrassa* (Diptera: *Psychodidae*) and their susceptibility to infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Med Sci Monit 2005; 11: 457-464.
26. Jones G, Wall R. Maggot-therapy in veterinary medicine. Res Vet Sci 2008; 85: 394-398.
27. Sherman RA, Stevens H, Ng D, Iversen E. Treating wounds in small animals with maggot debridement therapy: a survey of practitioners. Vet J 2007; 173: 138-143.
28. Lynn DE. Methods for maintaining insect cell cultures. J Insect Sci 2002; 2: 1-6.
29. Le Douarin N. Organ culture methods. En: Vago C, Ed. Invertebrate tissue culture. Volume I. Nueva York: Academic Press; 1971. pp. 41-1 14.
30. Ardila A, Escovar J, Bello FJ. Características de nuevos cultivos celulares derivados de tejidos embrionarios de *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*). Biomédica 2005; 25: 65-75.
31. Bello FJ, Brochero H, Boshell J, Olano V, Rey G. Establishment and characterization of a cell line from mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: *Culicidae*). Mem Do Inst Oswaldo Cruz 1997; 92: 123-128.
32. Bello FJ, Rey G, Jiménez ME, Munstermann L, Ferro C. Iniciación de cultivos celulares primarios de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: *Psychodidae*). Diógenes. Revista de Investigación en Ciencias y Enseñanza de las Ciencias 1996; 3: 155-166.
33. Bello FJ, Rodríguez J, Morales A, Olano V. Estudio de cultivos celulares primarios de *Psorophora confinnis* (Diptera: *Culicidae*). Biomédica 1999; 19: 127-135.
34. Bello FJ, Rodríguez J, Olano V, Boshell J, Rey G, Ramírez W. Características de una línea celular de crecimiento continuo del mosquito *Aedes taeniorhynchus* (Diptera: *Culicidae*). Biomédica 1996; 16: 32-40.
35. Bello FJ, Rodríguez JA, Escovar J, Olano V, Morales A, González M, Rey G. A new continuous cell line from the mosquito *Psorophora confinnis* (Diptera: *Culicidae*) and its susceptibility to infections with some arboviruses. Mem Do Inst Oswaldo Cruz 2001; 96: 865-873.
36. Charpentier G, Belloncik S, Ducros G, Fontenille D, Tian L, Quiot JM. Establishment and characterization of three cell lines from *Aedes Triseriatus*. J Medical Entomol 1995; 32: 793-800.
37. Akiyama Y, Iwabuchi K, Furukawa Y, Morishima K. Culture of insect cells contracting spontaneously. Research moving toward and environmentally robust hybrid robotic system. J Biotechnol 2008; 133: 261-266.
38. Takahashi M, Mitsuhashi J, Ohtaki T. Establishment of a cell line from embryonic tissues of the fleshfly, *Sarcophaga peregrine* (Diptera: *Insecta*). Dev Growth Differ 1980; 22: 11-19.

Tabla 1. Resumen del proceso de obtención de los cultivos celulares primarios derivados de tejidos embrionarios de *L. sericata*

<i>Núm. de explantes</i>	<i>Proceso de desinfección</i>	<i>Medio de cultivo</i>	<i>Inicio del crecimiento (días)</i>	<i>Morfología celular</i>	<i>Formación de la monocapa</i>
17	Hipoclorito y alcohol	DMEM	-----		No
13	Hipoclorito y alcohol	MM/VP12	5 – 8	Epitelioides y similares a nerviosas	No
16	Hipoclorito y alcohol	Schneider	5 – 8	Epitelioides y similares a nerviosas	No
14	Hipoclorito y alcohol	Grace	-----	Epitelioides	No
11	Hipoclorito y alcohol	Grace/L-15	5 – 8	Epitelioides	No
27	Hipoclorito y formaldehído	MM/VP12	5 – 8	Epitelioides y similares a nerviosas	No
38	Hipoclorito y formaldehído	Grace/L-15	3 – 6	Epitelioides	No
20	Hipoclorito y formaldehído	Schneider	3 – 6	Epitelioides y similares a nerviosas	No
68	Hipoclorito y formaldehído	L-15	1 – 3	Epitelioides y similares a nerviosas	Sí