

TERAPIA LARVAL CON *Musca domestica* EN EL TRATAMIENTO DE LA ÚLCERA LEISHMÁNICA EN UN MODELO MURINO

Larval therapy with *Musca domestica* in the treatment of leishmanian ulcer in a murine model

Adriana REYES PARRADO², Jazzmin ARRIVILLAGA-HENRÍQUEZ^{1,4}, Milagros OVIEDO³, José Vicente SCORZA DAGERT³
Lenín RON GARRIDO⁴

¹Línea Salud-Calidad. Área Ambiente Territorio. Carrera Turismo Histórico Cultural. FASCO/,Universidad Central del Ecuador, Grupo de Investigación, Biodiversidad, Zoonosis y Salud Pública (GIBCI), Quito, Ecuador

²Postgrado de Ciencias Biológicas. Universidad Simón Bolívar. Caracas. Venezuela.

³Instituto Experimental José Witremundo Torrealba. Universidad de Los Andes. Trujillo. Venezuela.

⁴Centro de investigación en Salud Pública y Zoonosis. Universidad Central del Ecuador. Quito. Ecuador.

*For correspondence: jazzmin.arrivillaga@gmail.com/jcarrivillaga@uce.edu.ec

Received: 09th January 2019, Returned for revision: 23th February 2019, Accepted: 01st April 2019.

Associate Editor: Manuel Patarroyo.

Citation/Citar este artículo como: Reyes A, Arrivillaga-Henríquez JC, Oviedo M, Scorza-Dagert JV, Ron L. Terapia larval con *Musca domestica* en el tratamiento de la úlcera leishmánica en un modelo murino. Acta biol. Colomb. 2020;25(1):82-95. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v25n1.77177>

RESUMEN

La leishmaniosis es una enfermedad con gran impacto en salud pública dado a las características de las lesiones tegumentarias. El tratamiento experimental con terapia larval (TL) ha mostrado su uso potencial para la cura de la leishmaniosis, sin embargo, se han utilizado especies de moscas para TL en heridas causadas por *Leishmania* que no son de fácil colecta y cultivo bajo condiciones de laboratorio como *Lucilia sericata* o *Calliphora vicina*. El objetivo del presente trabajo fue usar una especie de mosca de fácil colecta, y de alta fecundidad como la *Musca domestica* para aplicarlas en TL de úlceras leishmánicas. Se realizó un estudio cuali-cuantitativo, de tipo descriptivo, mediante un diseño experimental empleado un modelo animal (*Mesocricetus auratus*), infectado con *Leishmania amazonensis* para evaluar el efecto terapéutico de la TL y comparar los resultados con el tratamiento químico antimonial de la droga experimental "Ulamina". Se evidencia cicatrización y cura de la úlcera leishmánica en el 66,66 % de los animales tratados con TL en aplicación simple y del 100 % en TL combinada con Ulamina. El uso combinado de TL+Ulamina, muestra un efecto potenciador de la cura clínica de las úlceras, pero con persistente inflamación. Se observó una efectividad óptima de la TL con *M. domestica*, sobre las úlceras, aunque no se evidenció un efecto sobre *L. amazonensis* dado a la presencia de amastigotes en los frotis y a los amplicones obtenidos de 480 bp desde las improntas de los animales.

Palabras clave: Antimonial, cicatrización, Leishmaniosis, moscas, tratamiento, úlcera.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease with significant impact on public health, given the characteristics of the tegumentary lesions. Experimental treatment with larval therapy (LT) has shown its potential use for the cure of leishmaniasis. However, fly species not easy to collect and/or colonize have been used. The objective of the present work was to use a fly of accessible collection and high fecundity, not a producer of human myiasis, such as *Musca domestica*. A qualitative-quantitative study of a descriptive type was carried out through an experimental design with an animal model (*Mesocricetus auratus*) with infection by *Leishmania amazonensis* to evaluate the therapeutic effect of LT and compare the results with the antimonial chemical treatment of the drug experimental "Ulamina". Scarring were observed with the use of LT in 66.66 % with TL-simple and 100 % with TL-combined. However, the combined use of LT + Ulamina, shows an enhancing effect of the clinical cure of the lesions, but with persistent inflammation. Optimal effectiveness of TL with *M. domestica* was observed on the ulcers; however, an effect on *L. amazonensis* was not observed given the presence of amastigotes in the smears and the 480 bp amplicons from the tissue of the ulcers of animals.

Keywords: Antimonial, cicatrization, Leishmaniosis, maggot, treatment, ulcer.

INTRODUCCIÓN

El tratamiento de leishmaniosis se ha centrado en el uso de antimoniales pentavalentes (Glucantime, Pentostam) como primera elección (OMS, 1998; Henao *et al.*, 2004). Sin embargo, dado a los efectos colaterales, costo, distribución, administración parenteral y seguimiento médico estricto, se han propuestos tratamientos alternativos aún en fase experimental ó fase preclínica (Soto y Soto, 2006; Maldonado y Pérez, 2016). Específicamente, una nueva generación de tratamientos químicos como la Ulamina, se orientan hacia la búsqueda de antimoniales menos citotóxicos, más tolerables para el paciente, con una mejor relación costo-beneficio de adecuada disponibilidad para él en las localidades endémicas (Scorza Dagert *et al.*, 2006). Sin embargo, existen otras alternativas de tratamiento no basadas en antimoniales, como la inmunoterapia usada en pacientes leishmánicos. A pesar de no ser un tratamiento propuesto oficialmente por la Organización Mundial de la Salud, a nivel local (Venezuela), se evidenció cura clínica en pacientes tratados con la vacuna de promastigotes atenuados. Sin embargo, existen diferencias en la efectividad entre los servicios locales de salud determinándose en promedio un 60 % de curación exitosa (Convit *et al.*, 2005). En la última década, se han evaluado otras alternativas anti-*Leishmania*, que han favorecido la identificación y validación de nuevas dianas quimio terapéuticas, basadas en la disponibilidad reciente de la secuencia genómica de *Leishmania*. Por ello en la actualidad se están ensayando exhaustivamente inhibidores de la biosíntesis de ergosterol como un blanco de acción (Nieves *et al.*, 2007).

Algunos autores han señalado como una alternativa viable, el uso de fármacos antimicóticos, antifúngicos y anti-rítmicos cardíacos (amiodarona, aplicación experimental) de venta comercial y empleados convencionalmente para tratar otras patologías en humanos, ya que actúan inhibiendo la síntesis del ergosterol y por ende la membrana celular (López-Carvajal *et al.*, 2016; Pinto y Tempone, 2018). No obstante, con su aplicación se ha evidenciado quimio-resistencia y efectos colaterales en niños y mujeres embarazadas (Serrano *et al.*, 2009). Esto ha motivado a otros grupos de investigación en la búsqueda de tratamientos naturales y alternativos, como el uso de extractos de plantas para tratar la úlcera leishmánica (Ponte-Sucre *et al.*, 2007), así como el uso de la terapia larval (TL), que *a priori* brinda la posibilidad de tratar a pacientes con úlceras leishmánicas, clasificadas como lesiones crónicas de piel, en donde el proceso normal de cicatrización está alterado, en su fase inflamatoria y de proliferación, más la frecuente existencia de co-infección bacteriana que deriva en la no cicatrización (Jiménez, 2008). Aunque se señalan efectos colaterales durante el uso de la TL en algunos pacientes, por lo que se necesita evaluar periódicamente al paciente tratado sin necesidad de hospitalización, la relación beneficio-costo de la TL es alta, además de sus propiedades de curación

de heridas (Sánchez *et al.*, 2004; Sherman, 2009; Sherman, 2013; Patarroyo, 2015; Brambilla, 2018).

Teniendo en cuenta lo propuesto anteriormente, la TL combina variables que se centran en las propuestas más efectivas para los tratamientos de leishmaniosis cutánea, tales como la actividad bactericida de amplio espectro debida a la aplicación de antifúngicos y antimicrobiales, el efecto citotóxico de la excreciones y secreciones sobre amastigotes y promastigotes por actividad anti-*Leishmania*, la cicatrización efectiva y rápida de las lesiones a largo plazo, con menor número de aplicaciones locales no invasivas de carácter hospitalaria, y la mejor relación costo-beneficio (Pinheiro *et al.*, 2015; Azad *et al.*, 2016; Laverde-Paz *et al.*, 2018). Siguiendo el enfoque de la terapia larval como un tratamiento de la medicina tradicional (Sánchez *et al.*, 2004), existen previas investigaciones sobre el uso efectivo de la TL para el tratamiento curativo de la leishmaniosis usando *Lucilia sericata*, *L. eximia* y *Sarconesiopsis magellanica* (Arrivillaga *et al.*, 2008; Wolff Echeverri *et al.*, 2010; Polat y Kutlubay, 2014; Cruz-Saavedra *et al.*, 2016). Sin embargo, uno de los principales problemas en la cría de moscas para terapia larval de las úlceras leishmánicas, es que las moscas son necrófagas, lo que implica que uno de los principales problemas a nivel hospitalario es el control del olor durante la colonización y producción de las larvas por lo que se han sugerido diferentes métodos y dietas de alimentación para el uso de especies convencionales en TL como *Lucia sericata* (Sherman y Pechter, 1988), representando beneficios-costos diferenciales a nivel hospitalario.

En el caso de *L. eximia*, se han encontrado resultados que requieren evaluar la idoneidad para su uso en terapia larval con fines biomédicos derivado a la formación de abscesos miásicos, a pesar de su efectividad durante la aplicación de la TL (Calderón-Arguedas *et al.*, 2014). En este sentido, se plantea el uso de *M. domestica*, una promisoriosa especie de mosca en la terapia larval de lesiones crónicas, ya que comparativamente con otras especies de moscas usadas en la TL- *Leishmania*, es una especie no necrófaga, doméstica, rara vez causa miasis en humanos y las pocas veces en que se han reportado han sido casos accidentales, tiene una ciclo de vida más corto, distribución geográfica cosmopolita, mayor abundancia poblacional, es una especie sinantrópica de fácil colecta, y su alimentación con base en una dieta sintética facilita su mantenimiento bajo condiciones de laboratorio con bajo costo de producción (Li *et al.*, 2008; Martiradonna *et al.*, 2009). Adicionalmente, existen estudios que han evidenciado el uso masivo de *Musca domestica* para el tratamiento de lesiones crónicas de piel en humanos, sin evidencia de efectos colaterales en su uso directo (Jun-Cheng *et al.*, 2012). Además, se han caracterizado sus extracciones y secreciones larvales, determinándose una potente actividad antitumoral, antiviral y antibacteriana de las fracciones proteicas de larvas (Fu *et al.*, 2009), así como sus efectos anti-plasmodial sobre *Plasmodium berghei*, lo que

representa la primera evidencia de acción sobre un parásito metaxénico (Shittu *et al.*, 2013). Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar a la especie *M. domestica* como una especie de mosca alternativa para la terapia larval de úlceras causadas por *Leishmania* en un modelo murino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Desinfección de las larvas para TL

El material biológico de *M. domestica*, proviene de una colonia previamente establecida en el laboratorio de Parasitología de la Universidad de los Andes, Venezuela, según el protocolo de Martiradonna *et al.* (2009). Desde el material de colonia, se seleccionó un grupo de huevos que fueron desinfectados según el protocolo de Arrivillaga *et al.* (2008) mediante un tratamiento de desinfección en una solución de hipoclorito de sodio al 5 % (50 000 ppm). Luego, se lavaron con solución fisiológica estéril al 0,9 % (9000 ppm) dentro de una cámara de flujo laminar, se esterilizaron con solución de formalina al 10 % y luego se colocaron en placas en un medio de cultivo agar sangre estéril para su eclosión y verificación de la esterilidad de las larvas (Figuroa *et al.*, 2007).

Modelo animal, *Mesocricetus auratus*

Los animales de experimentación se obtuvieron del Bioterio experimental de la Universidad Centro Occidental “Lisandro Alvarado” de Venezuela. En los ensayos se utilizaron 15 ejemplares machos de cinco semanas de edad y con un peso promedio de 70 gramos. Se escogió esta especie de roedor por sus características inmunes que la hacen susceptible a la infección por *Leishmania*, observándose una respuesta infecciosa superior a la de ratones (Rezzano y Scorza, 1985; Salomón *et al.*, 2001). Adicionalmente, se empleó como modelo animal ya que se obtienen lesiones crónicas similares a las observadas en humanos (Henao *et al.*, 2004). Por otro lado, en la mayoría de los estudios farmacológicos para el tratamiento de la leishmaniosis se emplea este modelo animal, lo que permite comparar los resultados (Rezzano y Scorza, 1985).

Los animales experimentales se mantuvieron en el laboratorio experimental del “Insectario Pablo Anduze”, del Instituto Experimental “José W. Torrealba” de la ULA-Trujillo, y se manejaron bajo las normativas del Código de Bioética y Bioseguridad del Ministerio de Ciencia y Tecnología de Venezuela (MCT, 2002). Los protocolos de bioética para la terapia larval en un modelo animal fueron aprobados por la comisión de bioética de la Universidad Simón Bolívar (6-6-2008) y por la comisión de ética del Fonacit como parte del Proyecto Misión Ciencia “Producción de conocimiento y nuevas tecnologías nacionales para el tratamiento de quemaduras y lesiones crónicas de piel” N. 2007001522 (17-01-2012).

Aplicación de larvas de mosca

Se seleccionaron las larvas de segundo estadio temprano (L2) para optimizar su manipulación, por su efectividad similar a las larvas de primer estadio convencionalmente usadas en la TL (Polat *et al.*, 2012), y para evaluar el efecto de formación potencial de abscesos miásicos por invasividad, vistos en otras especies de moscas que se han usado recientemente en la terapia larval de *Leishmania* (Calderón-Arguedas *et al.*, 2014).

Según la metodología de Arrivillaga *et al.* (2008), se consideró la relación de una larva por 10 mm² de lesión para calcular el número de L2 adecuado al tamaño de cada lesión leishmánica en el modelo experimental murino, lo que equivale a 10 larvas/cm² (Figuroa *et al.*, 2007; Calderón-Arguedas *et al.*, 2014). Las larvas se aplicaron directamente sobre la lesión y en el perímetro de la lesión se colocó un apósito de hidrocoloide (DUODERM CGF), con el fin de que las larvas no salieran del área de tratamiento, y así mantener la humedad de la lesión. El vendaje con las larvas se retiró a las 12 horas, ya que se sugiere que este es el tiempo mínimo para ver los efectos de la TL en el modelo de hámster para *Leishmania*, según Arrivillaga *et al.* (2008).

Inoculación experimental en hámsteres

Se usó una cepa de referencia mundial, *Leishmania amazonensis*, FLA/BR/67/PH8 (De Moura *et al.*, 2005), la cual constituye un material biológico certificado para poder comparar resultados y validar técnicas. Esta cepa de referencia tiene características fenotípicas y genotípicas definidas (WHO, 2000) y fue donada en un hámster infectado por el doctor José Vicente Scorza de la Universidad de los Andes (ULA), Mérida, Venezuela, mantenida en animales de experimentación (*Mesocricetus auratus*) y en medio de cultivo agar sangre (NNN) en el laboratorio de Parasitología de la ULA-Mérida. El mantenimiento y pase de los parásitos en los tubos de cultivo a pH 7,4 se realizó cada siete días y se mantuvieron a una temperatura de 27 °C con 100 µl de solución de antibióticos (20 000 UI/ml de penicilina, 20 000 µg/ml de estreptomycin) y un 1 ml de sangre de conejo desfibrinada por 2 ml de agar (Evans, 1994). Posteriormente, se sacrificó el animal donador infectado con la cepa de *Leishmania* para preparar el inóculo de parásitos desde la impronta del hámster donador. Se tomaron muestras del nódulo con un bisturí y se trituraron en 2 ml de solución salina estéril al 0,9 % con 350 unidades de penicilina cristalina (Pinardi y Barrios, 1993). El tejido fue macerado en un mortero (de Jesus *et al.*, 1999) y luego se filtró mediante una gasa estéril y una inyectadora. Para el conteo se tomó una alícuota de 10 microlitros que se dejó caer en el recuadro del portaobjetos y se distribuyó en forma homogénea en un área de 1 cm³ en una lámina portaobjeto. Posteriormente se fijó con etanol y se coloreó con giemsa al 30 % durante 10 minutos. Bajo el microscopio con objetivo de inmersión se contaron 20 campos escogidos

al azar; el promedio de los parásitos contados se multiplicó por el factor de conversión del microscopio y a partir del valor obtenido se prepararon inóculos del orden de 1×10^6 amastigotes por cada 0,1 ml de macerado. Este volumen de macerado se inoculó en el dorso de las patas traseras de cada uno de los 15 animales (Ampuero *et al.*, 2000; Rosa *et al.*, 2000; Bruzual *et al.*, 2008). El tiempo promedio de evolución para la aparición de la lesión fue de 18 días. Dada la agresividad de la cepa, a los dos días de aparición de la lesión se iniciaron los ensayos, lo que correspondió al día uno de evaluación.

Esquema terapéutico sobre hámsteres infectados con *Leishmania amazonensis*

Primer grupo experimental.

Tres hámsteres (H1, H2, H3) como animales controles positivos fueron infectados con *L. amazonensis* (cepa de referencia PH8); dichos animales no recibieron ningún tratamiento sobre las lesiones leishmánicas que desarrollaron en ambas patas. El tiempo de evaluación fue de 20 días con monitoreo continuo.

Segundo grupo experimental.

Tres hámsteres (H1, H2, H3) fueron tratados con antimonial Ulamina (línea de pentavalente en fase experimental) luego de la aparición de la lesión de piel por *L. amazonensis* en ambas patas. El antimonial se aplicó vía intraperitoneal, con dosis calculadas según el peso del animal, con aplicaciones por 20 días consecutivos y a la misma hora, siguiendo el protocolo empleado para el Glucantime (OMS, 1998). El tiempo de evaluación fue de 20 días con monitoreo continuo.

Tercer grupo experimental.

Tres hámsteres (H1, H2, H3) fueron tratados con la TL local luego de la aparición de las lesiones de piel por *L. amazonensis* en ambas patas. En este tratamiento se usaron las larvas L2 de forma directa sobre la úlcera, siguiendo el protocolo descrito por (Arrivillaga *et al.*, 2008; Calderón-Arguedas *et al.*, 2014). Se evaluaron los animales a las 12 horas de la aplicación de la TL simple (día uno de aplicación), y consecutivamente se realizó un monitoreo hasta el día 20 para la evaluación de la TL sobre las lesiones. Previo al ensayo experimental con la TL los animales del grupo experimental (H1, H2, H3) se anestesiaron con 1 mL de solución de fenobarbital (100 mg/2 mL) vía intraperitoneal, permaneciendo dormidos por 24 horas e hidratándolos durante este tiempo, con la finalidad de que los hámsters no removieran los vendajes de sus patas.

Cuarto grupo experimental.

Tres hámsteres (H1, H2, H3) fueron tratados con la TL + antimonial Ulamina luego de la aparición de las lesiones

de piel por *L. amazonensis* en ambas patas. El tratamiento se inició con la aplicación de la TL local, y al tercer día se aplicó el antimonial durante 20 días consecutivos. La primera evaluación se realizó a las 12 horas aplicada la TL con monitoreo continuo hasta la última evaluación del día 20.

Quinto grupo experimental.

Tres hámsteres (H1, H2, H3) fueron tratados con antimonial Ulamina + TL luego de la aparición de las lesiones de piel por *L. amazonensis*. La primera aplicación de la TL se hizo al tercer día de iniciado el tratamiento con Ulamina. La primera evaluación se realizó a las 12 horas de aplicada la TL y la última evaluación se realizó el día 20.

Análisis de los parámetros cualitativos y cuantitativos

Los parámetros físicos que se utilizaron como criterios de evaluación para la efectividad de la terapia larval y Ulamina (esquema simple y combinado) sobre la cura de las lesiones de leishmaniasis cutánea como variable cualitativa ponderada fue la cicatrización (uno = ausente; dos = parcial; tres = completa). Adicionalmente, como variables cuantitativas se midió el ancho y el largo de la lesión, las cuales son parámetros que determinan la superficie de la úlcera como criterio para evaluar el proceso de cicatrización (ancho x largo en mm), y el parámetro de inflamación (grosor-altura en mm). Los tres parámetros son importantes al evaluar esquemas terapéuticos sobre lesiones crónicas, al igual que los criterios ponderados de pigmentación y de vascularización de las lesiones (Senet, 2008; Prezzavento *et al.*, 2017). Las medidas se tomaron empleando un vernier digital (mm) y los parámetros se evaluaron al inicio y al final de la experimentación por grupo establecido.

Previo al ANOVA se verificaron los supuestos de distribución normal y de homogeneidad de varianzas de los datos de cada una de las variables, mediante las pruebas de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov y de Bartlett. Las mediciones obtenidas se analizaron estadísticamente. A fin de comparar los distintos grupos experimentales se consideró el hámster, la pata, el grupo experimental y el tiempo de evaluación utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para muestras independientes, en donde la varianza (análisis estándar con ponderación de medias) fue equivalente a una prueba *t* para comparaciones dentro de un mismo tratamiento (antes y después por parámetro medido). En caso de determinar diferencias estadísticamente significativas, se aplicó la prueba de Tukey HSD (diferencia absoluta entre los promedios de cualquiera de las muestras para obtener una diferencias significativa en el nivel de significancia $p = 0,05$).

Para los análisis integrales se realizó un ANOVA de dos vías con anidación de individuos, considerando para los factores significativos (grupo experimental y día (antes y después)) determinándose valores de probabilidad significativos. La organización de los datos se llevó a cabo empleando

el programa computacional de Microsoft Office Excel®. Todas las gráficas y análisis estadísticos de varianza se desarrollaron mediante el uso del software R (R Core Team, 2013). Adicionalmente, se analizaron de forma cualitativa-cuantitativa las variables de pigmentación y vascularización utilizando la escala de Vancouver para la evaluación de las lesiones (Prezzavento *et al.*, 2017). También se analizaron el porcentaje de variación de la superficie de la lesión, el porcentaje de incremento-reducción de la superficie y de incremento-reducción de la inflamación de la lesión en los grupos experimentales.

Diagnóstico parasitológico de impronta (frotis)

Antes de iniciar los ensayos no se tomaron muestras parasitológicas para no alterar la superficie de la lesión según el protocolo de Arrivillaga *et al.* (2008). Sin embargo, después de cada tratamiento se colocaron láminas porta objetos sobre las úlceras abiertas y se realizaron frotis por aposición de las improntas y se dejaron secar (Bonfante, 1983). Después de secadas las láminas se agregaron unas gotas de metanol en los frotis para fijar los parásitos y luego unas gotas de Giemsa para colorear las leishmanias. En el caso de las úlceras cicatrizadas, para preparar los frotis se cortó un pedazo de piel regenerada y se colocaron láminas porta objetos sobre la dermis y el tejido inflamado. Toda la búsqueda de las leishmanias se llevó a cabo en un microscopio Leica DM 1000 con objetivo de 100 X en aceite de inmersión.

Diagnóstico molecular de Leishmania vía PCR

De las muestras de las improntas se extrajo ADN utilizando el protocolo de Golczer y Arrivillaga (2010). Para la amplificación vía PCR se utilizó un cebador con las secuencias HSP20d 5'- CCAAGCTTAT GTGGAGCCCCG AGCAACAA -3' y HSP20r 5'- CGGGATCCTT AGTCGATGGT GACTGAGT -3', para la amplificación de un fragmento del gen-específico hsp20 que codifica para la proteína térmica de 20kDa de *L. amazonensis* (Montalvo *et al.*, 2014). El coctel de PCR con un volumen final de 25 µl contiene 0,5 U de Taq polimerase (Go Taq Promega), 5X flexi buffer, 25 mM MgCl₂, 100 nmol dNTPs, 1 pmol/µL primer, y de 3-4 µl ADN de la muestra. La amplificación del ADN de los parásitos se realizó en un termociclador, con desnaturalización a 94 °C x 5 min, seguido por 30 ciclos de 92 °C, 65 °C x 1 min, 72 °C x 1 min y por último 72 °C x 5 min. Finalmente, 5 µl del producto de amplificación de las muestras se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa 8 % en Buffer TBE (89 mM Tris borato, 2 mM EDTA, pH 8,3) que contiene 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. La amplificación del producto (amplicon de 480 pb) se visualizó bajo transiluminador UV con una cámara Sony Ericsson Cyber-Shot con 3,2 megapíxeles (Montalvo *et al.*, 2014).

RESULTADOS

Los análisis de correlación no paramétricos de Spearman de las variables como largo y ancho, superficie

e inflamación que se evaluaron en los animales infectados antes de conformar los grupos experimentales, evidenciaron una correlación positiva entre ellos (valores entre 0,9575 y 0,9953). Posterior a la aplicación de los esquemas terapéuticos en los grupos experimentales dos, tres, cuatro y cinco, se observó que el proceso de cicatrización estuvo correlacionado negativamente con las variables ancho, largo, superficie, inflamación (valores entre -0,8652, -0,8637, -0,892, -0,8665, respectivamente). Estos resultados mostraron que las variables seleccionadas pueden ser empleadas para monitorear el desarrollo, la efectividad y eficacia de un tratamiento sobre una lesión leishmánica.

Antes de iniciar la experimentación y tratamientos, los análisis de varianza del tamaño de lesión de cada grupo experimental no evidenciaron diferencias estadísticas significativas entre hámster ($p = 0,6670$), ni entre patas por hámster ($p = 0,9567$). Además, no se presentaron diferencias estadísticas significativas en cuanto al ancho ($p = 0,9603$), largo ($p = 0,854$), superficie ($p = 0,8449$), inflamación ($p = 0,930$) ni cicatrización ausente ($p = 1,000$), lo que indica que existe una homogeneidad entre las medidas del área de las úlceras, ideal para comparaciones directas entre los 15 animales con lesiones por *L. amazonensis* que conformaron los grupos experimentales. Por otro lado, los análisis de varianza de las variables analizadas con respecto a la lesión, al culminar la experimentación y tratamientos correspondientes, evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($p = 0,002456$).

Infección con *L. amazonensis*

Los tres animales control infectados no tratados, evidenciaron una evolución progresiva y severa en las manifestaciones clínicas de las lesiones ulcerativas de la leishmaniosis de forma localizada sobre las patas inoculadas entre los días dos a siete de la experimentación (22-27 días posterior a la inoculación). Específicamente, se observó un aumento en la profundidad de las lesiones (día 20 de experimentación), con presencia de abundante exudado, edema y una fuerte inflamación acompañada de malos olores, indicativo de coinfección bacteriana y presencia de tejido necrótico en el área de las lesiones. Por lo anterior, en el 100 % de los animales se vio la no curación-cicatrización de heridas de forma espontánea, evidenciándose cualitativamente abundantes parásitos en los frotis, característico de hospedadores no tratados (Fig. 2a). Adicionalmente, durante el periodo de evaluación la inflamación se incrementó en promedio en un 55,90 %, así como la superficie de la lesión en un 71,39 %. Sin embargo, no existen diferencias estadísticamente significativas entre el antes y después para el grupo experimental uno ($p < 0,05$), observándose hiperpigmentación y la vascularización púrpura en las lesiones al final de la experimentación (Fig. 1a, Tablas 1a y 1b). Además, el grupo experimental uno (controles positivos) no mostró diferencias estadísticamente

Úlceras leishmánicas en animales experimentales

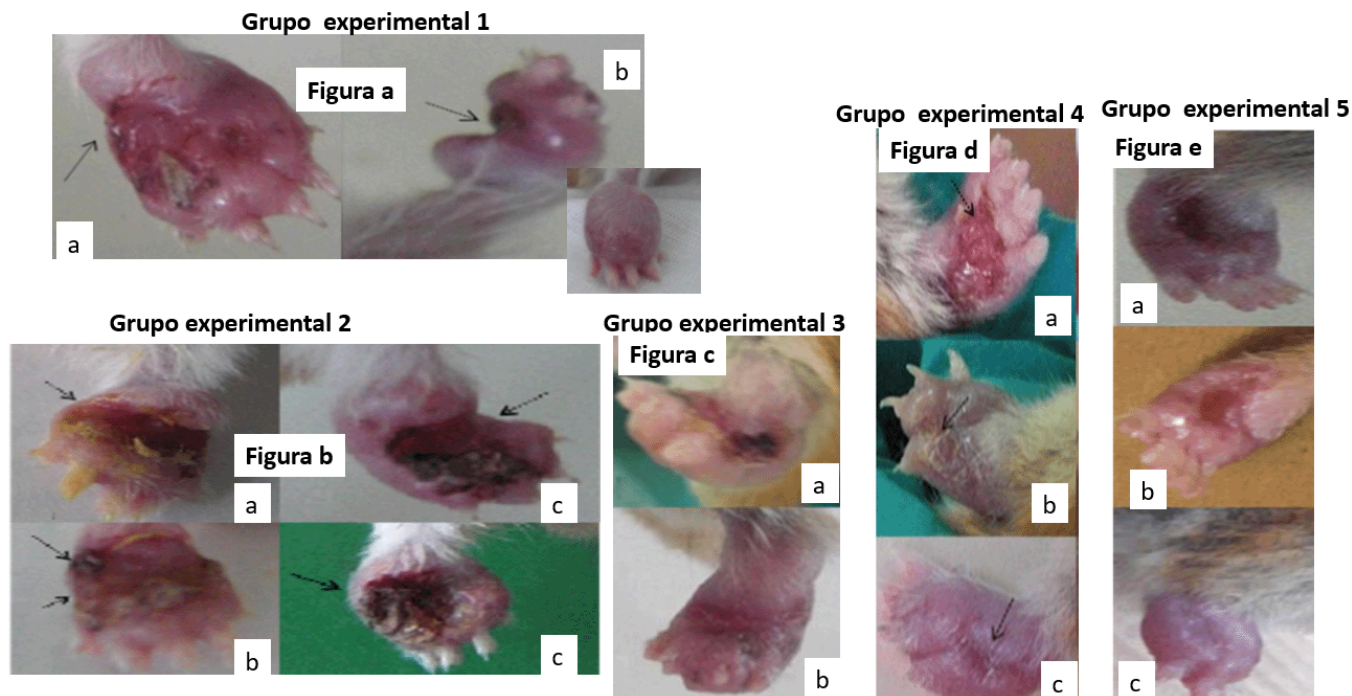


Figura 1. Lesiones de piel por úlceras leishmánicas en animales experimentales: a) Úlcera infectada con *L. amazonensis* en el grupo experimental uno (control positivo no tratado); b) Úlcera infectada con *L. amazonensis* en el grupo experimental dos (animales tratados con Ulamina-simple); c) Úlcera infectada con *L. amazonensis* en el grupo experimental tres (animales tratados con terapia larval-simple); d) Úlcera infectada con *L. amazonensis* en el grupo experimental cuatro (animales tratados con terapia larval-Ulamina); e) Úlcera infectada con *L. amazonensis* en el grupo experimental cinco (animales tratados con Ulamina- terapia larval); a (antes tratamiento), b y c (después de tratamiento).

Tabla 1a. Variables de pigmentación según escala Vancouver antes de iniciar la experimentación. Ge= Grupo experimental.

Pigmentación		GE1	GE2	GE3	GE4	GE5
0	Normal					
1	Hipopigmentada					
2	Mixta			2	2	2
3	Hiperpigmentada	3	3			
Vascularización						
0	Normal					
1	Rosa					
2	Rojo	2	2	2	2	2
3	Púrpura					
Vascularización						
0	Normal, plana					
1	Hasta 1 mm					
2	De 1 a 2 mm					
3	De 2 a 4 mm					
4	De 4 a 6 mm					
5	Más de 6 mm	5	5	5	5	5
TOTAL		10	10	9	9	9

Tabla 1b. Variables de pigmentación según escala Vancouver después de aplicar el bioensayo. Ge= Grupo experimental, *= diferencia estadística significativa antes-después ($p = 0,038$)

Pigmentación		GE1	GE2	GE3	GE4	GE5
0	Normal					
1	Hipopigmentada				1	1
2	Mixta			2		
3	Hiperpigmentada	3	3			
Vascularización						
0	Normal					
1	Rosa			1	1	1
2	Rojo					
3	Púrpura	3	3			
Vascularización						
0	Normal, plana					
1	Hasta 1 mm					
2	De 1 a 2 mm					
3	De 2 a 4 mm					
4	De 4 a 6 mm				4	4
5	Más de 6 mm	5	5	5		
TOTAL		11	11	8	6	6

significativas ($p > 0,05$) con el grupo dos (Ulamina) y grupo tres (TL simple), pero sí se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con los grupos experimentales cuatro (TL+Ulamina) y cinco (Ulamina+TL) (Figs. 3 y 4).

Aplicación Antimonial Ulamina

Durante los 20 días de aplicación de la Ulamina, los animales mostraron una mejoría parcial de los signos leishmánicos, disminuyó el olor, el exudado y el edema, pero con persistencia de la inflamación. Al tercer día después de terminar la aplicación de la Ulamina, se observó la activación de la lesión con desarrollo progresivo de mal olor, exudado y edema. Esto derivó en la dificultad para caminar del 100 % de los animales infectados y tratados con Ulamina, los cuales fueron sacrificados el día cinco después de terminar los tratamientos (45 días después de la inoculación). En general, los resultados obtenidos con Ulamina (grupo experimental dos) fueron similares a los obtenidos para los animales no tratados del grupo experimental uno, ya que no se observó curación-cicatrización de la lesión leishmánica. En promedio hubo un incremento de la superficie (51,18 %) y de la inflamación (12,46 %) en la lesión tratada (Fig. 1b) y se mantuvo la hiperpigmentación y la vascularización púrpura de la lesión (Tabla 1a y 1b).

Los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas entre antes y después de la aplicación de

la Ulamina ($p > 0,05$) dentro del grupo dos experimental de hámsteres, en función de las variables evaluadas (superficie de la lesión ($p = 0,105$), inflamación ($p = 0,7167$), cicatrización ($p = 1,000$). De igual forma, no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los resultados de este grupo (Ulamina) y los obtenidos para los grupos experimentales uno (control) y tres (TL simple), pero sí se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los grupos experimentales cuatro y cinco, que corresponden a los tratamientos combinados ($p < 0,05$). (Figs. 3 y 4).

Aplicación de la TL

En los animales infectados y tratados solo con una aplicación de la TL (durante 12 horas), no se evidenció una evolución progresiva y severa de las manifestaciones clínicas de las lesiones ulcerosas leishmánicas, en contraste con los animales tratados del grupo experimental uno y dos. Se observó una disminución parcial del edema, del exudado, de la profundidad de la herida y del olor (Fig. 1c). Sin embargo, estas diferencias con los grupos experimentales uno y dos no son explicadas sobre la base de los resultados estadísticos ($p > 0,05$). En los animales H1 y H2 (66,66 %) dentro del grupo experimental tres, se percibió pérdida de exudado y edema acompañado de una regeneración epitelial, dando como resultado la aparición de una completa cicatrización (Fig. 1c) a los diez días posteriores a la aplicación de la TL

(día uno de experimentación). Sin embargo, en el animal H3 se evidenció una cicatrización parcial, a pesar de existir una mejoría de los signos leishmánicos ulcerativos (Tablas 1a, 1b).

Durante la experimentación con el grupo tres, en promedio se dio un incremento de la superficie de la lesión del 28,80 % y de la inflamación de 37,03 %. Sin embargo, estas diferencias entre antes y después de la experimentación no son explicadas estadísticamente ($p > 0,05$), con base en las variables de superficie de la lesión ($p = 0,403$) e inflamación ($p = 0,065$). En cambio, sí se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre el antes y después con respecto a la variable cicatrización para el grupo experimental ($p = 0,00134$). Adicional al proceso de cicatrización con la TL, la pigmentación de la lesión mejoró, así como su vascularización (Tablas 1a y 1b). Por otra parte, a pesar de existir mejorías cualitativas de los signos leishmánicos de la úlcera, los resultados no son comparables con los obtenidos para los grupos experimentales cuatro y cinco (Figs. 3 y 4), existiendo diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento TL simple con respecto al TL combinado con el antimonial ($p < 0,05$). Finalmente, por consideraciones bioéticas, los animales se sacrificaron ocho días después de haber culminado el periodo de evaluación experimental.

Aplicación la TL + Ulamina

Se observó un efecto potenciador al combinar la TL (12 horas, día uno) con Ulamina (aplicada durante 20 días, días tres al 20 de experimentación), ya que para el día 20 el proceso de cicatrización y granulación en las lesiones leishmánicas se completó de forma irreversible en el 100 % de los animales tratados. Esto derivó de la reducción de la superficie de la lesión entre un 71-83 % con respecto a su tamaño inicial ($p = 0,01$), con un incremento de la inflamación entre el 5-10 % en relación con el día uno, lo cual no representa una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,4851$). Se observó una hipopigmentación de la lesión y un mejoramiento significativo en su vascularización (Fig. 1d, Tablas 1a y 1b).

En contraste, se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo cuatro y los grupos experimentales uno, dos y tres ($p < 0,05$). Sin embargo, no se determinaron diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$) entre los grupos experimentales cuatro (TL+ Ulamina) y cinco (Ulamina+TL). Adicionalmente, se observó una inflamación persistente similar a la observada en todos los grupos experimentales analizados en el presente trabajo de investigación ($p = 0,176$) (Fig. 3 y 4). Luego de finalizar los tratamientos, a los diez días se observó en uno de los animales (H2) la aparición de úlceras satélites cercanas a los bordes de las lesiones de piel perfectamente cicatrizada. Las lesiones satelitales fueron tratadas con la TL nuevamente por 12 horas, pero sin aplicar nuevamente

Ulamina, observándose la final cicatrización, granulación y reepitalización de las lesiones secundarias en tres días, sin apertura de las lesiones tratadas y con ausencia de la aparición de nuevas lesiones satelitales.

Aplicación de Ulamina + la TL

Durante el ensayo, se observó que luego de combinar los tratamientos (día 20), se logró la cicatrización de las lesiones leishmánicas en el 100 % de los animales ($p < 0,05$), con un incremento de la inflamación (17,60 - 21,71 %) estadísticamente no significativa ($p = 0,207$), y una disminución de la superficie de la lesión del 57-61 %, cuya diferencia fue estadísticamente significativa ($p = 0,048$). Adicionalmente, se observó al culminar la experimentación la hipopigmentación de la lesión y una mejor vascularización (Fig. 1e, Tablas 1a y 1b).

Luego de culminar los experimentos no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre el grupo experimental cuatro (TL+ Ulamina) y el cinco (Ulamina+TL) con relación a las variables superficie ($p = 0,918$), inflamación ($p = 0,195$) y cicatrización ($p = 1,00$). En el grupo experimental cinco no se observaron lesiones satelitales, ni apertura de las úlceras cicatrizadas durante los 20 días de evaluación en ninguno de los animales (Fig. 1e). Adicionalmente, los resultados obtenidos para el grupo experimental cinco mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los obtenidos para los grupos experimentales uno, dos y tres ($p < 0,05$) (Figs. 3 y 4). Finalmente, los análisis del ANOVA de dos vías indicaron diferencias estadísticamente significativas para la interacción de los factores evaluados y los grupos experimentales por día de evaluación para las variables asociadas a la lesión (pata izquierda/pata derecha): largo ($p = 0,006317/p = 0,004623$), ancho ($p = 0,000523/p = 0,0007058$) y superficie ($p = 0,021541/p = 0,001185$). Al evaluar la interacción con el factor día, solo se determinaron diferencias estadísticamente significativas en la variable inflamación ($p = 0,01180$) (Figs. 3 y 4). Adicionalmente, se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en los grupos experimentales solo para tres de los parámetros cuantitativos: largo ($p = 0,024721$), ancho ($p = 0,0005633$) y superficie ($p = 0,006324$), siendo la variable inflamación no significativa entre tratamientos ($p = 0,07502$).

Diagnóstico parasitológico de la infección por *Leishmania* en los animales experimentales

Los análisis parasitológicos directos (frotis) evidenciaron la presencia de *Leishmania* en todos los animales experimentales (Fig. 2). Sin embargo, la diferencia parasitológica más contrastante fue que en los frotis obtenidos de los animales de los grupos experimentales uno y tres, se observó la integridad morfológica de la forma intracelular amastigota. Por su parte, en los frotis de los animales tratados con Ulamina en su esquema simple o combinando, correspondientes a los grupos experimentales dos, cuatro y

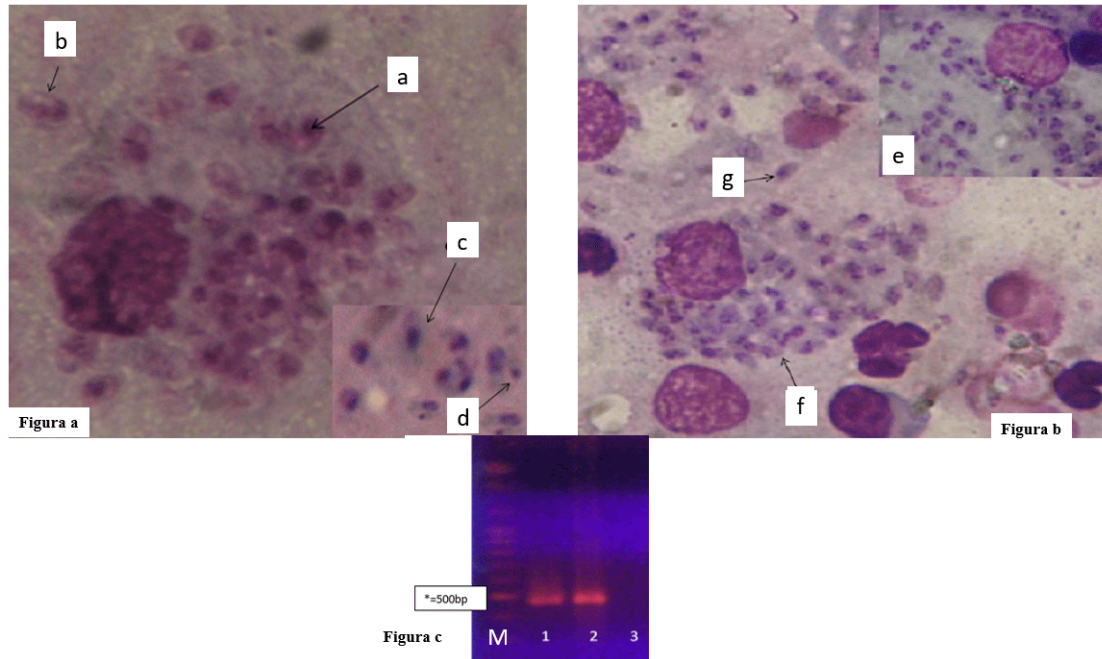


Figura 2. *Leishmania amazonensis* en frotis (improntas) y PCR (amplificones de 480 pb) de muestras de animales experimentales. a) Tipo frotis de animales infectados no tratados o infectados tratados con la TL, b) Tipo frotis de animales infectados y tratados con Ulamina de forma simple o combinada con la TL. a. Amastigotes dentro de macrófagos, b. Amastigotes extracelulares, c. Amastigotes libres, d. Kinetoplasto de amastigotes, e. *Leishmania* fuera de macrófago roto, f. Macrófago con membrana deteriorada, g. *Leishmania* vacuolada, M (Molecular de 100 bp), c) Resultados de PCR. M. Marcador de 100 bp. 1. Control positivo de ADN de *Leishmania amazonensis* de animales pertenecientes al grupo experimental uno, 2. Muestra de ADN desde tejido de las improntas de animales tratados con esquema combinados (TL+Ulamina), 3. Control negativo.

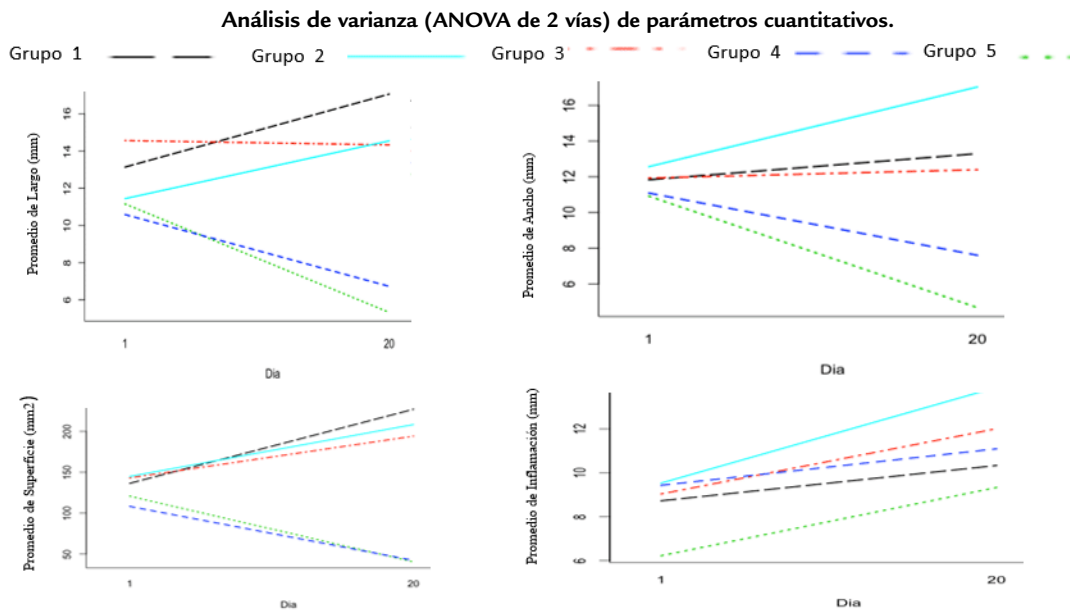


Figura 3. Análisis de varianza (ANOVA- 2 vías) de los parámetros evaluados largo, ancho, superficie e inflamación en la úlcera leishmánica en función de la interacción de los factores grupo experimental y día de evaluación.

cinco, se observó un gran número de amastigotes vacuolados y deformes, así como un gran número de macrófagos deformes, destruidos y sin membrana celular (Figs. 2a y 2b).

En los frotis que correspondieron a los animales tratados con Ulamina, los parásitos no pudieron ser visualizados

de forma apropiada por las características de la tinción, por lo que no se pudo realizar su contabilización de forma correcta al final del periodo de evaluación experimental. Sin embargo, los resultados moleculares de la amplificación gen-específico de *L. amazonensis* evidenciaron la presencia

Análisis de varianza (ANOVA de 2 vías) de parámetros cualitativos ponderados.

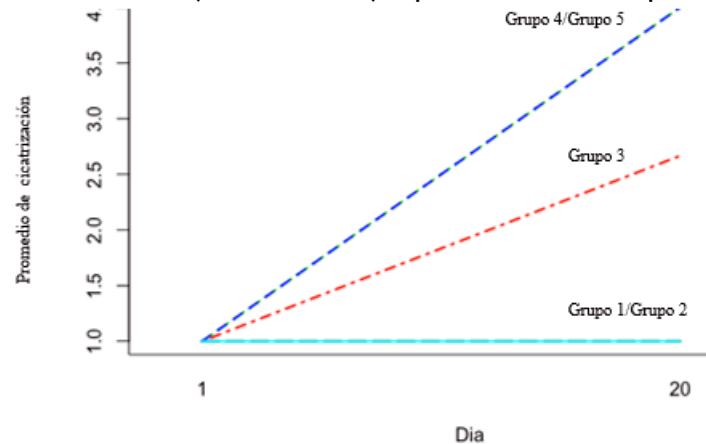


Figura 4. Análisis de varianza (ANOVA- 2 vías) del parámetro evaluado de cicatrización en la úlcera leishmánica en función de la interacción de los factores grupo experimental y día de evaluación.

de una banda de aproximadamente 480 pb en todas las muestras analizadas por grupo experimental, sin visualizarse diferencias en la intensidad ó ancho de la banda (Fig. 2c).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los ensayos experimentales mostraron que el esquema terapéutico de la TL en aplicación simple o combinada con *M. domestica* es efectivo para la desbridación de las úlceras en piel de la leishmaniosis cutánea, basada en la regeneración de la epidermis y la dermis, y en la reducción de la superficie de la lesión que conlleva al proceso de cicatrización. La aplicación de larvas de *M. domestica* para la cicatrización epitelial de úlceras leishmánicas en hámsteres es acorde con otras investigaciones sobre terapia larval (Arrivillaga *et al.*, 2008; Polat y Kutlubay, 2014; Cruz-Saavedra *et al.*, 2016; Sanei-Dehkordi *et al.*, 2016), y con la cicatrización observada en pacientes humanos (Wolff Echeverri *et al.*, 2010). Sin embargo, en la presente investigación la TL simple y combinada muestran resultados diferentes; en el caso de la TL simple se obtuvo una efectividad del 66,66 % sobre los animales tratados, en comparación con el 100 % de cicatrización observada en los animales tratados con la TL combinada con Ulamina. Adicionalmente, se observaron diferencias en el porcentaje de reducción de la superficie de la lesión; en el caso de la TL simple se logró una reducción entre 22 y 36 %, mientras que en la TL combinada osciló entre el 57 y el 83 %.

Los resultados de la TL combinada son similares a los obtenidos por Polat y Kutlubay (2014). En el tratamiento de la TL con *Lucia sericata* estos autores lograron una cicatrización del 100 % en dos de los pacientes humanos infectados con *Leishmania*, quienes previamente mostraron resistencia al Glucantime al ser tratados con este tipo de antimonia. En el caso de los resultados de la TL simple, estos

fueron diferentes a los señalados por otros autores, siendo estos un 100 % de la cicatrización de la úlcera leishmánica en los animales tratados con una aplicación simple de 12 horas de larvas de *Lucilia sericata* sobre úlceras producidas por *L. amazonensis* (Arrivillaga *et al.*, 2008; Polat *et al.*, 2012). Estos resultados sugieren que la especie de mosca es un factor para considerar en la TL de úlceras leishmánicas.

Por otro lado, en el tratamiento de úlceras de piel con diferente etiología no parasitaria (pie diabética, úlcera sacras, osteomielitis, úlceras isquémicas, neoplásicas, lesión por arma de fuego, quemaduras, etc.) no se plantean diferencias significativas en el proceso de cicatrización de la lesión dependiendo de la especie de mosca usada: *Lucilia sericata*, *L. illustris*, *L. caesar*, *L. cuprina*, *L. eximia*, *Phormia regina*, *Calliphora erythrocephala*, *C. vicina*, *Chrysomya rufifacies*, *Cynomyia cadaverina*, *Wohlfahrtia nuba*, *Musca domestica* y *Sarconesiopsis magellanica* (Sherman y Pechter, 1988; Parnés y Lagan, 2007; Li *et al.*, 2008; Sherman, 2009; González- de Paz *et al.*, 2010; Wolff Echeverri *et al.* 2010, Ríos *et al.*, 2013; Sherman *et al.*, 2013; Díaz-Roa *et al.*, 2016).

Los reportes sobre el tratamiento de úlceras leishmánicas no han señalado diferencias estadísticamente significativas en la aplicación de la TL, ni en los parámetros de cicatrización evaluados, luego de lograr la cicatrización de la úlceras aplicando larvas de *L. sericata* y *S. magellanica* en un modelo murino (Díaz-Roa *et al.*, 2016). Sin embargo, los resultados de la TL con *M. domestica* mostrados en el presente estudio, podrían explicarse sobre la base de que esta especie de mosca no pertenece al grupo de las Calliphoridae y no es una especie necrófaga, en contraste con las especies utilizadas en investigaciones anteriores y señaladas en la literatura (Arrivillaga *et al.*, 2008; Wolff Echeverri *et al.*, 2010; Polat *et al.*, 2012; Polat y Kutlubay, 2014; Cruz-Saavedra *et al.*, 2016). Por tanto, su efectividad en la cicatrización y reducción del tamaño de la lesión durante el tratamiento de úlceras leishmánicas pareciera ser menor, pero esto debe

evaluarse con comparaciones directas con otras especies de moscas no necrófagas.

En las especies de califóridos que han resultado efectivas en la aplicación de la TL simple, se han identificado en las ES (excreciones/secreciones) fracciones con actividad antibacteriana-antifúngica (Zapata *et al.*, 2008; Cazander *et al.*, 2013; Pöppel *et al.*, 2014; Góngora *et al.*, 2015; Patarroyo, 2015), proteolítica (Parnés y Lagan, 2007; Pinilla *et al.*, 2013; Bauman *et al.*, 2017) y principalmente anti-*Leishmania*. En relación con la anti-*Leishmania* se han señalado diferencias en su efecto sobre *Leishmania*, al comparar especies de moscas diferentes como *L. sericata*, *S. magellanica* y *C. vicina* (Polat y Kutlubay, 2012; Sanei-Dehkordi *et al.*, 2016; Laverde-Paz *et al.*, 2018). En el caso de *M. domestica* hasta la fecha se han detectado ES con actividad antibacteriana, antimicrobiana, antioxidante, mitogénica, con efecto hepático protector o antitumoral. Otras investigaciones indican que existe actividad biológica de péptidos muy complejas como cecropinas, defensinas y atacinas en las larvas de *M. domestica* (Andersen *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2013; Pinheiro *et al.*, 2015; Chu *et al.*, 2016), pero se desconoce si existen ES con potencial actividad anti-*Leishmania*. Por otro lado, en las investigaciones de la TL sobre úlceras leishmánicas en modelos murinos, se ha trabajado no solo con diferentes especies de moscas, sino también con varias especies de *Leishmania* como *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. major* y *L. tropica*, observándose la efectividad de cicatrización y anti-*Leishmania* de *L. sericata* sobre *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. major* y *L. tropica*. Sin embargo, de forma comparativa, *L. sericata* es menos efectiva que *S. magellanica* al tratar úlceras infectadas con *L. panamensis*, mientras que *L. sericata* es más efectiva en el tratamiento de *L. major* en comparación con *C. vicina* (Arrivillaga *et al.*, 2008; Polat y Kutlubay, 2012; Sanei-Dehkordi *et al.*, 2016; Laverde-Paz *et al.*, 2018). Por ello, las diferencias en los resultados de la TL en una sola aplicación (12 horas tiempo óptimo para el modelo murino en contraste con pacientes humanos donde se requieren más de tres aplicaciones de forma convencional para activar el proceso de cicatrización) sobre las úlceras leishmánicas producidas por *L. amazonensis* aplicando *M. domestica* (en la presente investigación) o *L. sericata* (Arrivillaga *et al.*, 2008), podrían explicarse por las posibles diferencias en la ES anti-*Leishmania* de *M. domestica*. Podría existir ausencia de este tipo de actividad en las ES de *M. domestica*, tener menor actividad o tener menor efecto sobre el parásito, ya que en los frotis no se evidenció ningún efecto citotóxico sobre los amastigotes al usar terapia larval en el esquema simple. Lo anterior se evidenció a través de la PCR con la amplificación de ADN de *L. amazonensis*, al igual que en otros tratamientos de la TL sobre la misma especie de parásito (Arrivillaga *et al.*, 2008) o en tratamientos con antimoniales, en los que después de diez años se ha amplificado el ADN-*Leishmania* en pacientes tratados (Guevara *et al.*, 1994).

En concordancia con los trabajos de Polat y Kutlubay (2012), quienes no evidenciaron la presencia de *L. tropica* luego de aplicar la TL con *L. sericata*, derivado de la actividad anti-*Leishmania*, así como su acción acelerada de curación de lesiones de piel con reducción de la inflamación crónica (Cazander *et al.*, 2013), en el presente trabajo se avala el uso de *M. domestica* en terapia larval de lesiones de piel con fines de desbridación y curación. Igualmente, nuestros resultados son congruentes con los hallazgos obtenidos por Li *et al.* (2008).

Adicionalmente, se evidenció la potenciación del proceso de cicatrización de las lesiones leishmánicas por *L. amazonensis* al combinar la TL con el antimonial Ulamina, en la que la TL permite la desinfección y desbridación de la úlcera, con una disminución parcial de la inflamación. Esto potencia la acción de la Ulamina, por su efecto citotóxico sobre *Leishmania*, lo que controla la inflamación persistente, permite el proceso de activación de fibroblastos y de células endoteliales y ayuda a la formación de la matriz celular que favorece la formación de tejido de granulación (Jaklic *et al.*, 2008; Andersen *et al.*, 2010; Ríos *et al.*, 2013).

El proceso de cicatrización fue completado en un máximo de 20 días, en contraste con el tiempo de cicatrización de diez días que se señala para el tratamiento que combina glucantime (en pacientes humanos con dosis completas del antimonial según OMS) con la TL con *L. sericata* (Polat y Kutlubay, 2014). Estos resultados podrían mostrar un efecto sinérgico entre los dos tratamientos que actúa sobre las *Leishmanias*, como ha sido señalado al combinar tratamientos antibacterianos y antimoniales pentavalentes (Narváez *et al.*, 1979). También puede darse un efecto aditivo, resultado de sumar la acción de los dos tratamientos sobre el proceso de inflamación y cicatrización, en donde se añade el efecto de limpieza, desbridación y reepitalización de la TL al efecto citotóxico de la Ulamina sobre los amastigote de *Leishmania*.

CONCLUSIONES

La terapia larval con *M. domestica* es una alternativa para el tratamiento de úlceras leishmánica por *L. amazonensis*. La aplicación combinada con antimoniales como la Ulamina se muestra como el esquema más adecuado para lograr la cicatrización y cura clínica de la úlcera. Sin embargo, hay que considerar el grado de inflamación persistente, lo cual se ha señalado en la literatura con respecto a los tratamientos convencionales para *Leishmania*. Son necesarios futuros estudios para evaluar la actividad anti-*Leishmania* de *M. domestica*, así como realizar comparaciones directas de la TL y las ES con las especies de moscas que ya han sido evaluadas sobre cultivos de promastigotes y amastigotes de *Leishmania* en el modelo murino.

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del grupo de investigación del Instituto "Witremundo Torrealba" de la Universidad de los Andes,

Venezuela, y a María Dora Feliciangeli (UC-BIOMED) por sus conversas, aportes y discusiones entusiastas durante el desarrollo de esta investigación. A Sandra Enríquez (UCE-CIZ) por sus valiosos comentarios sobre los análisis de los resultados.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no hay conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Andersen S, Sandvang D, Schnorr MK, Kruse T, Neve S, Joergensen B, *et al.* A novel approach to the antimicrobial activity of maggot debridement therapy. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(8):1-9. Doi: <https://doi.org/10.1093/jac/dkq165>
- 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(2):305-10. Doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v28i2.102>
- Azad AK, Azizi WS, Yee BL. Maggot debridement therapy for diabetic foot ulcer: Experience from Maggot treatment Centers. *Asian J Pharm Pharmacol.* 2016;2(1):23-25.
- Brambilla P.B.T. Terapia larval e divulgação científica no Brasil: até quando serão negligenciadas? (Bachelor's thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Norte). Ciudad Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2018. p. 29.
- Baumann A, Skaljac M, Lehmann R, Vilcinskas A, Franta Z. Urate Oxidase produced by *Lucilia sericata* medical maggots is localized in Malpighian tubes and facilitates allantoin production. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2017;83:44-53. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.02.007>
- Bonfante R. Leishmanias y leishmaniasis tegumentaria en América Latina. *Bol. Oficina Sanit. Panam.* 1983;95(5):418-423.
- Calderón-Arguedas O, Belfort K, Troyo A, Gamboa M. Terapia larval con *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae) de Costa Rica en un modelo experimental. *Rev Chilena Ent.* 2014;39(1):57-65.
- Carrero Rangel JA, Borges HR, Convit García J, Avilan Rovira J, de Lima H. Inmunoterapia de la leishmaniasis cutánea: factores que influyen su efectividad. *Bol Mal Salud Amb.* 2011;51(1):25-33.
- Cazander G, Pritchard DI, Nigam Y, Jung W, Nibbering PH. Multiple actions of *Lucilia sericata* larvae in hard-to-heal wounds: larval secretions contain molecules that accelerate wound healing, reduce chronic inflammation and inhibit bacterial infection. *Bioessays.* 2013;35(12):1083-1092. Doi: <https://doi.org/10.1002/bies.201300071>
- Chu F, Jin X, Ma H, Lu X, Zhu J. Effect of *Musca domestica* maggot polypeptide extract on HUVEC dysfunction induced by early activated macrophages. *Pharm Biol.* 2016;54(4):572-575. Doi: <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1060506>
- Convit J, Ulrich M, Pérez M, Hung J, Castillo J, Rojas H, *et al.* Atypical cutaneous leishmaniasis in Central America: possible interaction between infectious and environmental elements. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2005;99(1):13-17. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2004.02.005>
- Cruz-Saavedra L, Díaz-Roa A, Gaona MA, Cruz ML, Ayala M, Cortés-Vecino JA, *et al.* The effect of *Lucilia sericata*- and *Sarconesiopsis magellanica*-derived larval therapy on *Leishmania panamensis*. *Acta Trop.* 2016;164:280-289. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.09.020>
- de Jesus R, Quiñones W, O'Callaghan J. Identificación de proteínas de la membrana glicosomal de *Leishmania mexicana* con fines de diagnóstico. *Rev. Ecol. Lat. Am.* 1999;6(2):9-17.
- De Moura T, Novais F, Oliveira F, Clarêncio J, Noronha A, Barral A, *et al.* Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun.* 2005;73(9):5827-5834. Doi: <https://doi.org/10.1128/IAI.73.9.5827-5834.2005>
- Díaz-Roa A, Gaona MA, Segura NA, Ramirez HA, Cortés VJA, Patarroyo MA, *et al.* Evaluating *Sarconesiopsis magellanica* blowfly-derived larval therapy and comparing it to *Lucilia sericata*-derived therapy in an animal model. *Acta Trop.* 2016;154:34-41. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.10.024>
- Evans DA. In Vitro Cultivation and Biological Cloning of Leishmania. En: *Protocols in Molecular Parasitology.* New Jersey: U.S.A; 1994. p. 29-41
- Figuroa L, Flores J, Rodríguez S. Método de cultivo de larvas de moscas *Lucilia sericata* para terapia larval. *Paras latinoam.* 2007;62(1-2):79-82. Doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-77122007000100014>
- Fu P, Wu J, Guo G. Purification and Molecular Identification of an Antifungal Peptide from the Hemolymph of *Musca domestica* (housefly). *Cell Mol Immunol.* 2009;6(4):245-251. Doi: <https://doi.org/10.1038/cmi.2009.33>
- Golczer G, Arrivillaga J. Modificación de un protocolo estándar de extracción de ADN para flebotominos pequeños (Phlebotominae: *Lutzomyia*). *Rev. Colomb. Entomol.* 2008;34(2):199-203.
- Góngora J, Díaz-Roa A, Gaona MA, Cortés VJ, Bello F. Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos de cuerpos grasos y hemolinfa derivados de la mosca *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae). *Infectio.* 2015;19(1):3-9. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.infect.2014.09.003>

- González-de Paz, L., Fortes-Bordas, M., de Pedro-Elvira, B. Descripción de dos casos de herida, con diferente etiología, tratadas mediante terapia larval desbridante. *Enferm Clin.* 2010;20(1):47-53. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.enfcli.2009.10.004>
- Henaó H, Osorio Y, Saravia N, Gómez A, Travi B. Eficacia y toxicidad de los antimoniales pentavalentes (Glucantime y Pentostam) en un modelo animal de leishmaniasis cutánea americana: aplicación de la luminometría. *Biomédica.* 2004;24(4):393-402. Doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v24i4.1289>
- Jaklic D, Lapanje A, Zupanc K, Smrke D, Cimerman N. Selective antimicrobial activity of maggots against pathogenic bacteria. *J Med Microbiol.* 2008;57(5):617-625. Doi: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47515-0>
- Jiménez CE. Curación avanzada de heridas. *Rev col Cir.* 2008;23(3):146-155.
- Jin X, Mei H, Li X, Ma Y, Zeng AH, Wang Y *et al.* Apoptosis-inducing activity of the antimicrobial peptide cecropin of *Musca domestica* in human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402 and the possible mechanism. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2010;42(4):259-265. Doi: <https://doi.org/10.1093/abbs/gmq021>.
- Jun-Cheng W, Ren-rong L, Ran H, Hong-bin F, Shuang-ming S. Maggot therapy for repairing serious infective wound in a severely burned patient. *Chin J Traumatol.* 2012;15(2):124-125.
- Laverde-Paz MJ, Echeverry MC, Patarroyo MA, Bello FJ. Evaluating the anti-leishmania activity of *Lucilia sericata* and *Sarconesiopsis magellanica* blowfly larval excretions/secretions in an in vitro model. *Acta trop.* 2018;177:44-50. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.033>
- Li Q, Lu R, Huo R, Fu H. Maggots of *Musca domestica* in treatment of acute intractable wound. *Surgery.* 2008;145(1):122-123. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.surg.2008.08.016>.
- López-Carvajal L, Palacio-Barco MA, Cardona-Arias JC. Eficacia de los azoles en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea. *Arch de Med.* 2016;12(2):1-10.
- Maldonado A, Pérez OG. Leishmaniasis: nuevos tratamientos, mecanismos de acción y sus implicaciones. *Rev. INBIOM.* 2016;1(3):22-30.
- Martiradonna G, Soto A, González J. Protocolo de cría de *Musca domestica* en laboratorio. *Bol Mal Salud Amb.* 2009;49(2):317-319.
- Ministerio de Ciencia y Tecnología [MCT]. Código de Bioética y Bioseguridad. Caracas: Editorial MCT; 2002. 1-35p.
- Montalvo AM, Fraga J, Rodríguez O, Blanco O, Llanos C.A, García A *et al.* Detección de *Leishmania* spp. en base al gen que codifica la proteína HSP20. *Rev. perú. med. exp. Salud.* 2014;31(4):635-643
- Narváez D, Moreno E, Scorza J. Acción del Glucantime y del Camolar en hámsteres infectados con cepas de *Leishmanias* dermatropas andino-venezolanas. *Bol Mal Salud Amb.* 1979;19(3):110-118.
- Nieves MP, Díaz E, Romero A, Machuca C, Sucre AP. Valor pronóstico de los cambios fisiológicos asociados a la quimio-resistencia en *Leishmania*. *Vitae: Acad Bioméd Digital.* 2007;(33):1-22.
- OMS. Modelo OMS de información sobre prescripción de medicamentos: Medicamentos utilizados en las enfermedades parasitarias. Ginebra: OMS. 2ª ed. 1998. p. 160
- Parnés A, Lagan KM. Larval therapy in wound management: a review. *Int. J. Clin. Pract.* 2007;61(3):488-493. Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-1241.2006.01238.x>
- Patarroyo MA. Larval therapy in wound healing. *Infectio.* 2015;19(1):1-2. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.infect.2014.12.003>
- Pinardi ME, Barrios M. Diagnóstico parasitológico de leishmaniasis cutánea americana. *Dermatol Venez.* 1993;31(2):18-21.
- Pinheiro MA, Ferraz JB, Junior MA, Moura AD, Da Costa ME, Costa FJ, *et al.* Use of maggot therapy for treating a diabetic foot ulcer colonized by multidrug resistant bacteria in Brazil. *Indian J Med Res.* 2015;141(3):340-342. Doi: <https://doi.org/10.4103/0971-5916.156628>
- Pinilla YT, Moreno PDA, Patarroyo MA, Bello FJ. Proteolytic activity regarding *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae) larval excretions and secretions. *Acta Trop.* 2013;128(3):686-691. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.09.020>
- Pinto EG, Tempone AG. Activity of the antiarrhythmic drug amiodarone against *Leishmania (L.) infantum*: an in vitro and in vivo approach. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2018;24:29-34. Doi: <https://doi.org/10.1186/s40409-018-0166-7>
- Polat E, Cakam H, Aslan M, Sirekbasan S, Kutlubay Z, Ipek T, *et al.* Detection of anti-leishmanial effect of the *Lucilia sericata* larval secretions in vitro and in vivo on *Leishmania tropica*: First work. *Exp. Parasitol.* 2012;132(2):129-134. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.06.004>
- Polat E, Kutlubay Z. Four cutaneous leishmaniasis case resistant to meglumine antimoniate treatment. *Turkiye Parazitoloj Derg.* 2014;38(3):177-180. Doi: <https://doi.org/10.5152/tpd.2014.3410>
- Ponte-Sucre A, Faber JH, Gulder T, Kajahn I, Pedersen SE, Schultheis M, *et al.* Activities of naphthylisoquinoline alkaloids and synthetic analogs against *Leishmania major*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(1):188-94. Doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.00936-06>
- Pöppel AK, Koch A, Kogel KH, Vogel H, Kollwe C, Wiesner J, *et al.* Lucimycin, an antifungal peptide from the therapeutic maggot of the common green bottle fly *Lucilia sericata*. *Biol. Chem.* 2014;395(6):649-656. Doi: <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0263>

- Prezzavento G, Racca LL, Bottai HM. Cicatrización: evaluación de dos tratamientos tópicos de uso habitual en la cicatriz postcirugía estética. *Cir. plást. iberolatinoam.* 2017;43(3):255-263. Doi: <https://doi.org/10.4321/s0376-78922017000400006>
- Rezzano S, Scorza JV. Comportamiento de *Leishmania chagasi*, *L. mexicana* y *L. braziliensis* en hámsteres machos inoculados subcutáneamente. *Bol. Dir. Malariol y Saneam. Amb.* 1985;25(3-4):59-66.
- Ríos YJM, Mercadillo PP, Yuil RE, Ríos CM. Terapia con larvas de mosca para heridas crónicas: alternativa en una época de creciente resistencia a los antimicrobianos. *Dermatología CMQ.* 2013;11(2):134-141.
- Salomón OD, Sosa S, Rossi, G, Spinelli G. Presencia de *Lutzomyia longipalpis* y situación de la Leishmaniosis visceral en Argentina. *Medicina.* 2001;61(2):174-178.
- Sánchez MC, Chuairé L, Narváez R, Segura NA. Biocirugía: utilización de larvas de insectos necrófagos en la curación de heridas. *La terapia larval. Rev. Cienc. Salud.* 2004;2(2):156-164.
- Sanei-Dehkordi A, Khamesipour A, Akbarzadeh K, Akhavan AA, Mohammadi AMA, Mohammadi Y, *et al.* Anti *Leishmania* activity of *Lucilia sericata* and *Calliphora vicina* maggots in laboratory models. *Exp Parasitol.* 2016;170:59-65. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.08.007>
- Senet P. Fisiología de la cicatrización cutánea. *EMC-Dermatología.* 2008;42(1):1-10. Doi: [https://doi.org/10.1016/S1761-2896\(08\)70356-X](https://doi.org/10.1016/S1761-2896(08)70356-X)
- Scorza Dagert JV, Morales C, Petit de Peña Y, Vásquez L, Rojas E, Scorza B. JV. Síntesis de un complejo antimonial pentavalente (Ulamina) y su aplicación experimental para el tratamiento de leishmaniasis cutánea localizada en Venezuela. *Bol Mal Salud Amb.* 2006;46(1):59-65.
- Serrano-Martín X, García-Marchan Y, Fernández A, Rodríguez N, Rojas H, Visbal G, *et al.* Amiodarone Destabilizes Intracellular Ca²⁺ Homeostasis and Biosynthesis of Sterols in *Leishmania mexicana*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009;53(4):1403-1410. Doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.01215-08>
- Sherman RA, Pechter EA. Maggot therapy: a review of the therapeutic applications of fly larvae in human medicine, especially for treating osteomyelitis. *Med. Vet. Entomol.* 1988;2(3):225-230. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1988.tb00188.x>
- Sherman RA. Maggot Therapy Takes Us Back to the Future of Wound Care: New and Improved Maggot Therapy for the 21st Century. *J Diabetes Sci Technol.* 2009;3(2):336-344. Doi: <https://doi.org/10.1177/193229680900300215>
- Sherman RA, Mumcuoglu KY, Grassberger M, Tantawi TI. Maggot therapy. En: *Biotherapy-History, Principles and Practice.* Dordrecht: Springer, 2013. p. 5-29.
- Shittu OK, Olayemi IK, Omalu ICJ, Adeniyi AK. Antiplasmodial properties of methanolic extract of *Musca domestica* maggot on *P. berghei* - infected mice. *IJBPAS.* 2013;2(5):1064-1070.
- Soto J, Soto P. Estado actual y futuro de la terapia anti-leishmaniasis en Colombia. *Biomédica.* 2006;26(Supl1):194-206. Doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v26i1.1513>
- Wang Y, Zhao Y, Lei C, Zhu F. Antiviral and antitumor activities of the protein fractions from the larvae of the housefly, *Musca domestica*. *Afr. J. Biotechnol.* 2012;11(39):9468-9474. Doi: <http://dx.doi.org/10.5897/AJB12.077>
- WHO. World Health Organization. Plan de acción mundial para la contención en el laboratorio de los poliovirus salvajes. Ginebra Suiza: Organización Mundial de la Salud. 2000. p. 35
- Wolff Echeverri MI, Rivera Álvarez C, Herrera Higuera SE, Wolff Idárraga JC, Escobar Franco MM. *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae), una nueva alternativa para la terapia larval y reporte de casos en Colombia. *Iatreia.* 2010;23(2):107-116.
- Zapata C, Bello FJ, Rey M, Castañeda A, González J, Acero V, *et al.* Evaluación de la terapia larval en el proceso de curación de heridas infectadas con *Pseudomonas aeruginosa* en conejos. *Rev Cienc Salud.* 2008;6(2):9-24.
- Zhu L, Wang P, Qin QL, Zhang H, Wu YJ. Protective effect of polypeptides from larva of housefly (*Musca domestica*) on hydrogen peroxide induced oxidative damage in HepG2 cells. *Food Chem Toxicol.* 2013;60(1):385-390. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.074>