



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LARVOTERÁPICO DAS ESPÉCIES
HEMILUCILIA SEGMENTARIA E HEMILUCILIA SEMIDIAPHANA (DIPTERA:
CALLIPHORIDAE) NO REPARO TECIDUAL DE LESÕES CUTÂNEAS DE RATOS
DIABÉTICOS**

PRISCILA GONÇALVES JACINTO

Manaus-AM
Setembro de 2025

PRISCILA GONÇALVES JACINTO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LARVOTERÁPICO DAS ESPÉCIES
HEMILUCILIA SEGMENTARIA E HEMILUCILIA SEMIDIAPHANA (DIPTERA:
CALLIPHORIDAE) NO REPARO TECIDUAL DE LESÕES CUTÂNEAS DE RATOS
DIABÉTICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade
Federal do Amazonas, como pré-requisito para
obtenção do título de Doutora em Imunologia.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Linha de Pesquisa: Pesquisa clínica e análise de dados em imunologia.

Orientador: Dr. José Fernando Marques Barcellos

Coorientadora: Dra. Maria do Carmo Queiroz Fialho

Coorientador: Dr. Bruno Bezerra Jensen

Manaus-AM

Setembro de 2025

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

-
- J12a Jacinto, Priscila Gonçalves
Avaliação do potencial larvoterápico das espécies *Hemilucilia* segmentaria e *Hemilucilia semidiaphana* (Diptera: calliphoridae) no reparo tecidual de lesões cutâneas de ratos diabéticos / Priscila Gonçalves Jacinto. - 2025.
186 f. ; 31 cm.
- Orientador(a): José Fernando Marques Barcellos.
Coorientador(a): Maria do Carmo Queiroz Fialho.
Coorientador(a): Bruno Bezerra Jensen.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Manaus-AM, 2025.
1. Tratamento. 2. Larvas. 3. Calliphoridae. 4. Cicatrização de feridas. 5. in vivo. I. Barcellos, José Fernando Marques. II. Fialho, Maria do Carmo Queiroz. III. Jensen, Bruno Bezerra. IV. Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada. V. Título
-

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LARVOTERÁPICO DAS ESPÉCIES
HEMILUCILIA SEGMENTARIA E HEMILUCILIA SEMIDIAPHANA (DIPTERA:
CALLIPHORIDAE) NO REPARO TECIDUAL DE LESÕES CUTÂNEAS DE RATOS
DIABÉTICOS**

PRISCILA GONÇALVES JACINTO

PARECER

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutora em Imunologia em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus-AM, 12 de setembro de 2025.

Prof. Dr. Allyson Guimarães da Costa

Coordenador do PPGIBA

A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes examinadores:

Dr. José Fernando Marques Barcellos

Presidente da Banca Examinadora

Dra. Antônia Maria Ramos Franco Pereira

Membro interno do PPGIBA (INPA/UFAM)

Dr. Marcus Vinicius Alves da Silva

Membro Externo da Banca Examinadora (UFAM)

Dra. Renata Antonaci Gama

Membro Externo da Banca Examinadora (UFRN)

Dra. Fabíola Silva dos Santos

Membro Externo da Banca Examinadora (UEA)

AGRADECIMENTOS

Finalizar esta tese é, para mim, um marco que vai além da realização acadêmica. É a expressão de um percurso feito de entrega, renúncia, persistência e fé. Foi uma jornada interior de amadurecimento, dúvidas, reconstruções e resiliências. Cada etapa vivida, cada obstáculo superado e cada momento de silêncio ou exaustão compõem um ciclo de profundas transformações — científicas e humanas. Chegar até aqui me ensinou que o conhecimento não floresce apenas nas publicações, mas também nos silêncios, nas pausas, nas angústias e nos encontros.

À Deus, minha eterna gratidão. Sua presença foi meu alicerce nos dias em que minhas forças se esgotaram. A fé foi meu refúgio e meu guia, e foi Nele que encontrei sentido para seguir, mesmo quando tudo parecia incerto.

Aos meus queridos orientadores, Dr. José Fernando Marques Barcellos, Dra. Maria do Carmo Queiroz Fialho e Dr. Bruno Bezerra Jensen, deixo minha mais sincera gratidão. Cada um, à sua maneira, contribuiu de forma fundamental para a construção deste trabalho. Obrigada por me conduzirem com firmeza, respeito e dedicação, incentivando sempre a excelência, mas sem jamais perder de vista a sensibilidade do cuidado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas, agradeço pela formação sólida, pelos debates enriquecedores e pelo espaço de crescimento intelectual e pessoal. Levo comigo não apenas conhecimento, mas também vivências e aprendizados que moldaram quem sou hoje.

Ao Instituto Nacional de Pesquisa na Amazônia- INPA, pela parceria na utilização do Biotério Central, em especial aos colaboradores Dr. Marcelo Cutrim Moreira de Castro e Dr. José Albertino Rafael que possibilitaram o acesso e o desenvolvimento da pesquisa na área da Entomologia. Meu muito obrigada!

À minha inspiração de ser humano, minha mãe Jacirlene, pelas palavras de apoio e empoderamento nos momentos que eu não me sentia capaz. O seu exemplo de vida me fortaleceu para conquistar esse título. Mãe nós vencemos mais uma batalha, te amo! Ao meu pai José, que na sua simplicidade falava orgulhoso que a filha iria ser doutora. Fico feliz em poder realizar o seu sonho, principalmente por saber da sua infância sofrida e oportunidades limitadas para o estudo. Vocês me ensinaram que a educação é uma forma de liberdade, e com amor e simplicidade mostraram que é possível ir além, mesmo com poucos recursos. Essa conquista também é de vocês.

Aos meus filhos, Augusto (primogênito) e Gustavo José (que veio durante o doutorado), vocês são minha motivação diária. Quando pensei em desistir, foi por vocês que permaneci. Espero que um dia possam compreender que cada ausência teve um propósito maior: construir caminhos para que vocês sonhem alto e saibam que também são capazes de conquistar o impossível. A mamãe ama muito vocês.

À minha família como um todo, por sonhar comigo e me ajudar no processo.

Aos meus colegas de jornada, voluntários da pesquisa (acadêmicos de Enfermagem e Medicina vinculados à Ulbra- Manaus, Uninorte e Fametro) alunos de PIBIC e PROEXT-UFAM e amigas/irmãs de alma (Liseane, Patrícia, Vânia, Rayane e Raylma) que estiveram presentes nos momentos mais duros e também nos sorrisos partilhados, meu muito obrigada. Cada palavra de incentivo, cada gesto de carinho, cada abraço silencioso foi combustível nesta travessia. A todos os participantes, colaboradores e profissionais, em especial Rose e Mayza do laboratório de histologia, que contribuíram direta ou indiretamente para esta pesquisa, minha profunda gratidão. Vocês deram vida e propósito a este trabalho, sem vocês eu não teria conseguido, afinal ninguém faz ciência sozinho.

A Estomaterapia, campo ao qual me dedico com paixão, me ensinou que o cuidado ultrapassa técnicas — é presença, escuta e respeito à dignidade humana. Que esta tese possa ecoar essa essência e contribuir para que pessoas com feridas crônicas tenham melhora da qualidade de vida e redução de desfechos desfavoráveis.

Finalizo esse ciclo com a sensação de dever cumprido. Como mulher, muitas vezes consumida por demandas invisibilizadas que impactaram diretamente o rendimento acadêmico, como a maternidade, responsabilidades familiares, vínculos de trabalho e o peso das expectativas sociais de ser “tão competente quanto” os colegas homens, posso dizer: nós vencemos! Esta conquista não é apenas minha, ela pertence a todos que abdicaram por um tempo das coisas mais valiosas dessa vida para contribuir com a ciência.

Muito obrigada!

JACINTO, Priscila Gonçalves. 2025. **Avaliação do potencial larvoterápico das espécies *Hemilucilia segmentaria* e *Hemilucilia semidiaphana* (Dipteras: calliphoridae) no reparo tecidual de lesões cutâneas de ratos diabéticos**. 2025. 186 f. Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2025.

RESUMO

A Terapia Larval (TL), caracterizada pelo uso de larvas desinfetadas de moscas para tratamento de lesões com tecido necrótico, tem se destacado como terapêutica segura e eficaz no desbridamento de feridas crônicas. Em busca de validar novas espécies de dípteras (Calliphoridae) para TL, este estudo propôs avaliar o potencial larvoterápico das moscas-varejeiras *H. segmentaria* e *H. semidiaphana*, no reparo tecidual de lesões cutâneas de ratos diabéticos. Trata-se de um estudo experimental que buscou integrar três frentes para viabilidade terapêutica: (i) Compreender os mecanismos imunológicos/desbridamento/antibiofilme em espécie já validada para TL em uma revisão integrativa da literatura; (ii) Estabelecer protocolo de criação das espécies em laboratório e desinfecção dos ovos para aplicação clínica; e (iii) Ensaio pré-clínico randomizado em ratos diabéticos, comparando TL a collagenase e solução salina. Ratos wistar foram induzidos ao diabetes, posteriormente lesões cutâneas foram provocadas nos animais, e, após 48 h, os grupos experimentais foram tratados com as larvas de ambas as espécies, o grupo controle positivo com collagenase e o negativo com solução salina a 0,9%. Para avaliação da atividade cicatricial, as lesões foram registradas e analisadas no 3º, 7º e 14º dia após as intervenções, onde foram verificadas características macroscópicas e histológicas das lesões. Os resultados de área e contração das feridas foram expressos em média $\pm$ desvio padrão, submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste post-hoc de Tukey. As variáveis de avaliação histológica foram analisadas pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney e a análise inter-grupo foi realizada pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Foram considerados significativos os valores comparados ao nível de 5% de significância, onde $p \leq 0,05$. A revisão mostrou que as excreções/secreções (ES) de larvas reduzem respostas pró-inflamatórias (neutrófilos/monócitos), inibem complemento sem perder atividade antimicrobiana e quebram biofilmes, favorecendo a transição para fase proliferativa. Em condições de laboratório, o período de desenvolvimento de ovo a adulto foi de 10,1 dias para *H. semidiaphana* e 12,2 dias para *H. segmentaria*. No processo de esterilização dos ovos para TL, a solução mais acessível e que obteve maior taxa de eclosão dos ovos, foi o hipoclorito de sódio a 1%. Os grupos tratados com larvas apresentaram melhor desempenho quanto ao desbridamento, redução precoce de sinais de inflamação e contração da ferida, sendo até 15,2% superior à collagenase e 7,9% maior em relação à solução salina, além de maior deposição de colágeno e reepitelização. A avaliação histológica evidenciou que a TL esteve associada a uma inflamação discreta, deposição mais organizada de colágeno, proliferação fibroblástica e vascular em padrões compatíveis com uma cicatrização ordenada, além de reepitelização precoce e eficiente. A quantificação de mastócitos mostrou menores percentuais nos grupos submetidos à terapia larval, indicando modulação importante da resposta inflamatória. Estes resultados confirmam o potencial da larvoterapia com *H. segmentaria* e *H. semidiaphana*, mas evidenciam a necessidade de novos ensaios pré-clínicos randomizados para elucidar respostas imunológicas específicas de cada espécie e sua relevância causal no reparo de lesões cutâneas, assim como, estudos em humanos para validar a terapêutica com segurança, eficácia e custo-benefício principalmente no tratamento de lesões diabéticas.

Palavras-chave: Tratamento; Larvas; Calliphoridae; Cicatrização de feridas; *in vivo*.

JACINTO, Priscila Gonçalves. 2025. **Evaluation of the larvotherapeutic potential of the species *Hemilucilia segmentaria* and *Hemilucilia semidiaphana* (Diptera: Calliphoridae) in tissue repair of cutaneous lesions in diabetic rats.** 2025. 186 f. Thesis (Doctorate in Basic and Applied Immunology) – Federal University of Amazonas, Manaus, 2025.

ABSTRACT

Larval Therapy (LT), characterized by the use of disinfected fly larvae for the treatment of lesions with necrotic tissue, has emerged as a safe and effective therapeutic approach for the debridement of chronic wounds. In the search to validate new dipteran (Calliphoridae) species for LT, this study aimed to evaluate the larval therapeutic potential of the blowflies *H. segmentaria* and *H. semidiaphana* in tissue repair of cutaneous lesions in diabetic rats. This is an experimental study that sought to integrate three fronts for therapeutic feasibility: (i) understanding the immunological, debridement, and antibiofilm mechanisms of a species already validated for LT through an integrative literature review; (ii) establishing a laboratory rearing protocol for the species and disinfection of eggs for clinical application; and (iii) a randomized preclinical trial in diabetic rats, comparing LT with collagenase and saline solution. Wistar rats were induced to diabetes, followed by the induction of cutaneous lesions. After 48 hours, the experimental groups were treated with larvae of both species, the positive control group with collagenase, and the negative control group with 0.9% saline solution. To evaluate healing activity, lesions were recorded and analyzed on the 3rd, 7th, and 14th days after interventions, assessing macroscopic and histological characteristics. Wound area and contraction results were expressed as mean $\pm$ standard deviation, subjected to analysis of variance (ANOVA), and Tukey's post-hoc test. Histological evaluation variables were analyzed using the nonparametric Mann-Whitney test, while intergroup analysis was performed with the nonparametric Kruskal-Wallis test. Values were considered significant at the 5% level, where $p \leq 0.05$. The review showed that larval excretions/secretion (ES) reduce pro-inflammatory responses (neutrophils/monocytes), inhibit complement without losing antimicrobial activity, and disrupt biofilms, thereby promoting the transition to the proliferative phase. Under laboratory conditions, the developmental period from egg to adult was 10.1 days for *H. semidiaphana* and 12.2 days for *H. segmentaria*. In the process of egg sterilization for LT, the most accessible solution that achieved the highest hatching rate was 1% sodium hypochlorite. The groups treated with larvae showed superior performance in terms of debridement, early reduction of inflammatory signs, and wound contraction—being up to 15.2% greater than collagenase and 7.9% greater compared with saline solution—along with greater collagen deposition and reepithelialization. Histological evaluation revealed that LT was associated with mild inflammation, more organized collagen deposition, fibroblast and vascular proliferation consistent with orderly healing, as well as early and efficient reepithelialization. Mast cell quantification showed lower percentages in groups subjected to larval therapy, indicating significant modulation of the inflammatory response. These results confirm the potential of larval therapy with *H. segmentaria* and *H. semidiaphana* but highlight the need for further randomized preclinical trials to elucidate the specific immunological responses of each species and their causal relevance in wound repair, as well as human studies to validate the therapy regarding safety, efficacy, and cost-effectiveness, particularly in the treatment of diabetic wounds.

Keywords: Treatment; Larvae; Calliphoridae; Wound healing; *in vivo*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma decisório para diagnóstico diferencial de diversos tipos de diabetes, em caso de dúvida diagnóstica	28
Figura 2 - Esquema simplificado das influências patogênicas nas células Beta no DM1	29
Figura 3 - Fisiopatologia do Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2)	31
Figura 4 - Camadas epiderme, derme e hipoderme e estruturas da pele	37
Figura 5 - Fases da cicatrização e a deposição dos componentes da matriz cicatricial ao longo do tempo	41
Figura 6 - Micrografias eletrônicas de <i>Bacillus subtilis</i> corado negativamente, não tratado (A) ou tratado com lucifensina por 60 min (B)	51
Figura 7 - Súmula acerca das espécies objeto do estudo: <i>Hemilucilia segmentaria</i> e <i>Hemilucilia semidiaphana</i> .	55
Figura 8 - Diferenças entre larvas de terceiro ínstar de <i>Hemilucilia segmentaria</i> (A) e <i>Hemilucilia semidiaphana</i> (B)	62
Figura 9 - Diferenciação das espécies <i>H. segmentaria</i> (à direita) e <i>H. semidiaphana</i> (à esquerda)	64
Figura 10 - Fluxograma das etapas metodológicas desenvolvidas em cada capítulo	72
Figura 11 - Controle microbiológico do processo de desinfecção dos ovos das moscas	75
Figura 12- A: Recipiente utilizado para acondicionar os ovos desinfetados; B: Microfuros realizados nas tampas rosqueáveis	76
Figura 13 - Protocolo de dieta para indução do DM	81
Figura 14 - Aplicação do indutor diabético (Estreptozotocina) via IP	81
Figura 15- Indução da lesão com administração da solução via subcutânea	82
Figura 16- Moscas criadas em laboratório cheias de ovos	146

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Fluxograma do processo de seleção dos artigos para revisão integrativa	89
--	----

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Cadáver de coelho utilizado como substrato para captura das moscas	105
Figura 2 - Materiais utilizados para captura e alocação da mosca em campo	106
Figura 3 - Adaptação e armazenamento dos tubos falcons com posturas de ovos/larvas.	106

Figura 4 - Gaiola e alocação sob recipiente	107
Figura 5 - Recipientes utilizados para alocação de imaturos, de ambas as espécies.	109
Figura 6 - Dietas testadas para adultos, modo de preparo e finalidade	110

CAPÍTULO 3

Figura 1 - Preparo e aplicação das larvas para terapia larval	122
Figura 2 - Evolução macroscópica das lesões cutâneas nos diferentes grupos experimentais ao longo do período de tratamento.	126
Figura 3 - Boxplots do percentual de contração da ferida (%) ao longo dos tempos experimentais (dias 3, 7 e 14), comparando os diferentes grupos (n = 5 por grupo) de tratamento: Colagenase, Solução salina 0,9%, <i>Hemilucilia segmentaria</i> e <i>Hemilucilia semidiaphana</i> .	127
Figura 4 - Imagens representativas das alterações teciduais observadas em ratos Wistar dos tratamentos positivo (Colagenase) e negativo (Solução Salina 0,9%)	129
Figura 5 - Alterações teciduais restritas aos ratos Wistar dos tratamentos controle (colagenase e solução salina 0,9%).	129
Figura 6 - Imagens representativas dos achados histológicos observados nos tratamentos com larvoterapia (<i>H. segmentaria</i> e <i>H. semidiaphana</i>).	130
Figura 7 - Percentual médio de mastócitos (média $\pm$ EP) no 3º dia de avaliação nos diferentes grupos experimentais: Colagenase, Solução salina 0,9%, TL – <i>H. semidiaphana</i> e TL – <i>H. segmentaria</i> .	135
Figura 8 - Percentual médio de mastócitos (média $\pm$ EP) no 7º dia de avaliação.	135
Figura 9 - Percentual médio de mastócitos (média $\pm$ EP) no 14º dia de avaliação..	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de glicose plasmáticas (em mg/dl) para diagnóstico de Diabetes Mellitus (DM) e seus estágios pré-clínicos. 26

Tabela 2 - Comparação entre a terapia larval e diferentes métodos de desbridamento utilizados no Hospital Universitário Onofre Lopes-HUOL 47

CAPÍTULO 2

Tabela 1 -Apresentação da média do tempo de desenvolvimento, em horas, das espécies criadas em condições de laboratório. 108

CAPÍTULO 3

Tabela 1 -Classificação e atribuição de índices aos achados histológicos de HE (Hematoxilina – Eosina) 125

Tabela 2 -Comparações pareadas entre os grupos de tratamento quanto à porcentagem de contração das lesões cutâneas nos dias 3, 7 e 14. 128

Tabela 3 -Frequência de células polimorfonucleares: frequência absoluta dos escores atribuídos a alteração histológica avaliada nos diferentes grupos experimentais (Colagenase, Solução salina 0,9%, TL – *H. semidiaphana* e TL – *H. segmentaria*) nos dias 3, 7 e 14 pós-tratamento. 131

Tabela 4 -Frequência de células mononucleares: frequência absoluta dos escores atribuídos a alteração histológica avaliada nos diferentes grupos experimentais (Colagenase, Solução salina 0,9%, TL – *H. semidiaphana* e TL – *H. segmentaria*) nos dias 3, 7 e 14 pós-tratamento. 131

Tabela 5 -Frequência de proliferação vascular: frequência absoluta dos escores atribuídos a alteração histológica avaliada nos diferentes grupos experimentais (Colagenase, Solução salina 0,9%, TL – *H. semidiaphana* e TL – *H. segmentaria*) nos dias 3, 7 e 14 pós-tratamento. 132

Tabela 6 -Frequência de proliferação fibroblástica: frequência absoluta dos escores atribuídos a alteração histológica avaliada nos diferentes grupos experimentais (Colagenase, Solução salina 0,9%, TL – *H. semidiaphana* e TL – *H. segmentaria*) nos dias 3, 7 e 14 pós-tratamento. 132

Tabela 7 -Frequência de colagenização: frequência absoluta dos escores atribuídos a alteração histológica avaliada nos diferentes grupos experimentais (Colagenase, Solução salina 0,9%, TL – *H. semidiaphana* e TL – *H. segmentaria*) nos dias 3, 7 e 14 pós-tratamento. 133

Tabela 8 -Frequência de reepitelização: frequência absoluta dos escores atribuídos a alteração histológica avaliada nos diferentes grupos experimentais (Colagenase, Solução salina 0,9%, TL – *H. semidiaphana* e TL – *H. segmentaria*) nos dias 3, 7 e 14 pós-tratamento. 133

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Características histológicas da epiderme	34
Quadro 2 - Fases: Ovo, ínstares larvais e pupário da <i>H. segmentaria</i>	56
Quadro 3 - Fases: Ovo, estádios larvais e pupário da <i>H. semidiaphana</i>	59

CAPÍTULO 1

Quadro 1 - Modulação da Terapia Larval a partir de ES de <i>L. sericata</i> sobre a imunidade do hospedeiro	92
Quadro 2 - Ação antimicrobiana, pró-desbridamento e pró-cicatrização da TL.	96

CAPÍTULO 3

Quadro 1 - Critérios de escore histológico das variáveis avaliadas	124
---	-----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

aabs - Autoanticorpo

aag - Autoantígeno

Aap - Proteína Associada à Acumulação

AC- Ativação do Complemento

AD - Água Destilada

AGE - Ácidos Graxos Essenciais

AGEs - Produtos Finais de Glicação Avançada

AM - Amazonas

AMPs - Peptídeos Antimicrobianos

AN - Ágar Nutriente

ANOVA - Análise de Variância

APA - Área de Preservação Ambiental

ARRIVE - Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments (Pesquisa Animal: Relatórios de Experimentos *In Vivo*)

anti- ICA - Autoanticorpo Anti-Ilhotas

anti- IAA - Autoanticorpo Anti-Insulina

anti- GAD - Anti Descarboxilase do Ácido Glutâmico

BDENF-Base de Dados da Enfermagem

BHI - Brain Heart Infusion Agar

BIREME - Centro Latino Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde

BOD - Biochemical Oxygen Demand (Demanda Bioquímica de Oxigênio)

BVS- Biblioteca Virtual de Saúde

c AMP - Monofosfato de Adenosina Cíclica

CCL8- C - C Motif Chemokine Ligand 8

CEUA - Comissão de Ética na Utilização de Animais

CFB- Fator de Complemento B

ch - Córion

CH50- Atividade Hemolítica Total Clássica

CNS - Conselho Nacional de Saúde

COFEN - Conselho Federal de Enfermagem

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CXCL10- Quimiocinas CXC 10

C3a - Molécula Resultante da Clivagem Realizada por C3 (Molécula com Função Quimiotática no Sistema Complemento)

C5a - Molécula Resultante da Clivagem Realizada por C5 (Enzima Convertase)-Sistema Complemento

C5b-9 - Complexo de Ataque à Membrana (promove a lise osmótica de células-alvo, ex: bactérias)

DAP - Doença Arterial Periférica

DeCs- Descritores em Ciências da Saúde

DM - Diabetes Mellitus

DMG - Diabetes Gestacional

ECR- Ensaio Clínico Randomizado

EGF - Fator de Crescimento Epidérmico

ER - Retículo Endoplasmático

ES - Excreções / Secreções

EUA - Estados Unidos da América

EVES - Elementos Virais Endógenos

F1 - Primeira Geração Filial em Condições de Laboratório

FGF - Fator de Crescimento Derivado dos Fibroblastos

FID - Federação Internacional de Diabetes

Foxp3- Fator de Transcrição-Forkhead Box Protein P3

FPR- Receptor de Formila Peptídeos

Grupo CP - Controle Positivo

Grupo CN - Controle Negativo

HAS - Hipertensão Arterial Sistêmica

hi- Linha de Eclosão

H0 - Hipótese Nula

H1 - Hipótese Alternativa

HIF-1 - Fator induzível por hipóxia

HE - Hematoxilina Eosina

H2O2 - Peróxido de Hidrogênio

HUOL - Hospital Universitário Onofre Lopes

IA2 - Anti Tirosina Fosfatase

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

IFNs - Interferons

IL-8 - Interleucina 8

IL-12p40 - Interleucina 12p40

IL-10 - Interleucina 10

IL-1 β - Interleucina 1 β

INPA - Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas

IP - Intraperitonal

IRF-4 - Fator Regulador de Interferon 4

ISP - Enzima quimotripsina 1

KM - Quilômetro

L2 - Larvas no segundo estágio de desenvolvimento

LAB - Laboratório

LE - Linha de Eclosão

LESUF - Laboratório de Entomologia Sistemática e Urbana Forense

LILACS - Literatura Latino-Americana em Ciências da Saúde

LPS - Lipopolissacarídeo Bacteriano

M1 - Macrófago Fenótipo tipo 1

M2 - Macrófago Fenótipo tipo 2

MBL - Lectinas Ligantes de Manose

MEC - Matriz extracelular

MEDLINE - Sistema Online de Busca e Análise de Literatura Médica

MDT - Terapia de Desbridamento por Larvas

MeSH - Medical Subject Headings

MC - Micrópila

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MCP-1 - Proteína Quimiotática de Monócitos

MIP-1 β - Proteína Inflamatória de Macrófago

MMP - Metaloproteases de Matriz

MPO - Mieloperoxidase

MSCRAMMs - Componentes da Superfície Microbiana que Reconhecem Macromoléculas da Matriz Adesiva

NaClO - Hipoclorito de Sódio

Neoags - Neoantígenos

NF- κ B - Fator Nuclear Kappa B

NPD - Neuropatia Periférica Diabética

NO- Óxido Nítrico

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPAS - Organização Pan-Americana de Saúde

PAM - Peptídeo Antimicrobiano

PFGE - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

PHMB - Polihexametileno Biguanida

pi - Plastrão

PIA- Adesina Polissacarídica Intercelular

PMA - Phorbol 12 – Myristate 13 – Acetate

PNS - Pesquisa Nacional de Saúde

PUBMED - Base de dados gratuita da Biblioteca Nacional de Medicina dos EUA

RAGE - Receptores de Produtos da Glicação Avançada

RN - Rio Grande do Norte

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio

SCN- Staphylococcus Coagulase-Negativa

SDA - Sabouraud Dextrose Ágar

SES - Secretaria de Estado do Amazonas

SBCBM - Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica

SBD - Sociedade Brasileira de Diabetes

SIAPD - Sistema Integrado de Atenção ao Pé Diabético

SGE - Extrato de Glândulas Salivares

TAST - Técnica de Captura de Sinais de Secreção

TGF- β - Fator de Crescimento de Transformação Beta

TIMP- Inibidores Teciduais de Metaloprotease

TL - Terapia Larval

TM - Tricrômico de Masson

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral- Alfa

TXA2 - Tromboxano A2

WHO - World Health Organization

UDP - Úlceras do Pé Diabético

UVP- Úlcera Venosa Profunda

UFAM - Universidade Federal do Amazonas

UFRN - Universidade Federal do Rio Grande do Norte

UPR - Resposta Proteica Desdobrada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 DIABETES MELLITUS	25
2.1.1 Conceito, sintomatologia e diagnóstico	25
2.1.2 Prevalência do DM no Mundo, no Brasil e no Amazonas	26
2.1.3 Classificação da DM	27
2.1.4 Fisiopatologia da DM	28
2.1.5 Predisposição para surgimento de feridas	32
2.2 ESTRUTURAS DA PELE	34
2.2.1 Histologia da pele	34
2.2.2 Lesão Cutânea	37
2.2.3 Fases de cicatrização de lesões cutâneas	39
2.3 DIABETES MELLITUS E O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA	42
2.4 TRATAMENTO PARA LESÕES CUTÂNEAS	44
2.4.1 Terapia Larval	45
2.4.1.1 Terapia larval e aspectos imunológicos	49
2.5 CALIFORÍDEOS	52
2.5.1 <i>Hemilucilia segmentaria</i> (Fabricius, 1805)	56
2.5.1.1 Descrição de imaturos	56
2.5.2 <i>Hemilucilia semidiaphana</i> (Rondani, 1850)	59
2.5.2.1 Descrição de imaturos	59
2.5.3 Descrição dos adultos de <i>H. segmentaria</i> e <i>H. semidiaphana</i>	63
3. JUSTIFICATIVA	65
4. OBJETIVOS	68
4.1 OBJETIVO GERAL:	68
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	68
5. MATERIAIS E MÉTODOS	70
5.1 MATERIAL E MÉTODOS (CAPÍTULO 2)	73
5.1.1 Tipo de Estudo	73
5.1.2 População, local e período do estudo	73

5.1.3 Cálculo da amostra	73
5.1.4 Aspectos éticos	74
5.1.5 Critérios de Inclusão, Não inclusão e Exclusão	74
5.1.5.1 Critérios de Inclusão	74
5.1.5.2 Critérios de Não Inclusão	74
5.1.5.3 Critérios de Exclusão	74
5.1.6 Métodos aplicados.....	74
5.1.6.1 Processo de esterilização dos ovos para viabilizar a Terapia Larval.....	74
5.1.7 Limitações do estudo	76
5.1.8 Processamento, análise e apresentação dos resultados	76
5.2 MATERIAL E MÉTODOS (CAPÍTULO 3)	77
5.2.1 Tipo de estudo	77
5.2.2 População, local e período do estudo	78
5.2.3 Cálculo da amostra	78
5.2.4 Aspectos éticos	78
5.2.5 Critérios de Inclusão, Não inclusão e Exclusão	79
5.2.5.1 Critérios de Inclusão	79
5.2.5.2 Critérios de Não Inclusão	79
5.2.5.3 Critérios de Exclusão	79
5.2.6 Métodos a serem aplicados	79
5.2.6.1 Alocação e alimentação dos animais	79
5.2.6.2 Grupos do experimento	79
5.2.6.3 Randomização e Cegamento	80
5.2.6.4 Indução do DM	80
5.2.6.5 Indução da lesão cutânea	82
5.2.6.6 Hipóteses	83
5.2.7 Limitações do estudo	83
5.2.8 Plano Analítico dos dados	84
6. CAPÍTULO 1	85
7. CAPÍTULO 2	100
8. CAPÍTULO 3	118

9. DISCUSSÃO GERAL	144
10. CONCLUSÃO GERAL	148
11. PERSPECTIVAS	150
12. EQUIPE DO PROJETO	152
REFERÊNCIAS	154
APÊNDICES	171
APÊNDICE A- Artigo publicado em novembro de 2023 na Revista Peer Review relacionado ao estudo piloto da indução do DM e da lesão cutânea.....	171
ANEXOS	186
ANEXO 1 - CARTA DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)	186

1. INTRODUÇÃO

As feridas de difícil cicatrização são caracterizadas como qualquer interrupção na continuidade de um tecido corporal, de qualquer extensão, decorrente de traumas ou afecções clínicas que desencadeia um retardo no processo de cicatrização que pode ultrapassar seis semanas para cura (Oliveira *et al.*, 2019).

Devido à dificuldade de cicatrizar, podem estar associadas a infecções frequentes e complicações decorrentes do histórico de doenças anteriores do paciente, como por exemplo, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e diabetes mellitus (DM) (Bedin *et al.*, 2014) ou a outros fatores, tais como, comprometimentos vasculares, neuropatias, neoplasias, déficit de mobilidade e alterações nutricionais que requerem avaliação especializada e acompanhamento contínuo (Salomé *et al.*, 2016).

Considerado um problema de saúde pública mundial, as lesões crônicas acometem cerca de 5% da população adulta ocidental, gerando altos custos para os serviços de saúde, devido envolver assistência domiciliar, internações hospitalares prolongadas, o uso de tratamentos complexos e terapias auxiliares e por estarem associados com elevados índices de recorrência (Cavassan *et al.*, 2018). Além disso, gera um grande impacto na qualidade de vida, bloqueia funções, afeta a aparência (Erdmann; Stokes, 2007) e podem levar a incapacidade, dependência de cuidadores e depressão (Sen *et al.*, 2009).

O DM, citado anteriormente como afecção clínica que pode estar envolvida no processo de cronicidade de lesões cutâneas, é caracterizado por níveis elevados de glicose no sangue e associado a distúrbios metabólicos, que aumenta a probabilidade de os indivíduos desenvolverem várias complicações de saúde, corroborando para crescente índices de morbimortalidade (Baena-Díez, 2016).

Entre os agravos mais comuns do DM estão as lesões cutâneas em membros inferiores, denominados pés diabéticos. Existem 13 milhões de diabéticos só no Brasil e esse número tem estimativas de um aumento de 150 % até 2035. Destes, estima-se que 25% desenvolverão pelo menos uma lesão no pé durante a vida e os custos de saúde são cinco vezes maiores quando comparados à ausência de lesões (SBCBM, 2019), além da existência de bactérias resistentes a antibióticos, o que dificulta o tratamento das lesões diabéticas, ocasionando maior número de casos de amputação (Pinheiro, 2014).

O processo de cicatrização de feridas por sua vez, envolve uma cadeia de eventos complexa e altamente desenvolvida que exige uma coordenada cascata de eventos celulares e

bioquímicos, compostos por fases (inflamatória, proliferativa e de maturação), que irão desencadear o reparo tecidual (Childs; Murthy, 2017). Quando associado a fatores extrínsecos, como o DM, esse processo tende a ser deficiente levando ao estado de inflamação patológica (Leal; Carvalho, 2014) que ocasiona o retardo na mudança de fases da cicatrização e consequentemente, o total reparo tecidual.

Diante disto, um dos maiores desafios para tratamento de lesões crônicas é controlar os fatores influenciadores no processo de reparação tecidual, entre eles, a escolha do tratamento tópico mais adequado para a lesão no momento da avaliação (Silva *et al.*, 2023).

São inúmeros os tratamentos padronizados e comumente utilizados, que visam a restauração tecidual das lesões, como: ácidos graxos essenciais (AGE), hidrogel, gazes umidificadas, filmes, hidrocoloide, espumas, colagenase, papaína, sulfadiazina de prata (Azevedo *et al.*, 2014), dentre outras, que geralmente são opções de tratamento de feridas adotadas nos estágios iniciais.

Porém, os curativos modernos disponíveis atualmente são, em sua maioria, importados e de alto custo, fazendo-se necessário o desenvolvimento de opções terapêuticas nas quais utilizem matérias-primas mais viáveis e que sejam produzidos através de tecnologias simples e de baixo custo (Lima *et al.*, 2012).

Associado a isso, existem lesões de difícil cicatrização, que não respondem aos tratamentos convencionais, mostrando-se ineficazes no reparo tecidual. Neste sentido, a Terapia Larval (TL) também conhecida como desbridamento biológico tem demonstrado ser uma opção viável, segura, eficaz e de baixo custo para tratamento de feridas com difícil cicatrização (Sherman, 2009).

A Larvoterapia ou Terapia Larval, caracteriza-se pelo uso das larvas de moscas desinfetadas em lesões com presença de tecido desvitalizado, que podem ser encontrados em vários tipos de lesões, especialmente nas crônicas. A TL ainda contribui para redução do número de micro-organismos presentes, diminui ou elimina odor fétido e promove o crescimento de tecido viável (tecido de granulação) essencial para cicatrização (Ferraz; Pinheiro; Gama, 2014).

Os efeitos benéficos da larvoterapia estão além daqueles observados macroscopicamente, entre eles, estão: estimulação da angiogênese (Tellez *et al.*, 2012); modulação da resposta imune: atuando na função dos fagócitos humanos (Van Der Plas *et al.*, 2009); manutenção da atividade antimicrobiana, mesmo com a inibição do processo inflamatório (Van Der Plas *et al.*, 2007); inibição da ativação do sistema complemento (Tamura

et al., 2017); controle e quebra de biofilme bacteriano (Jiang *et al.*, 2012), liberação de substâncias com potencial antimicrobiano, controle eficaz do exsudato e resolução dos processos celulares e bioquímicos que se encontram alterados; excreção de enzimas digestivas no leito da lesão, que favorecem a elevação do pH; estimulação de fibroblastos, células endoteliais e de oxigenação do tecido, como consequência da formação de tecido de granulação (Sanchez *et al.*, 2004), favorecendo, assim, a regeneração das lesões.

Ante exposto, este estudo partiu da seguinte indagação: As espécies *Hemilucilia segmentaria* (Fabrícus, 1805) e *Hemilucilia semidiaphana* (Rondani, 1850) (Diptera: Calliphoridae) possuem potencial larvoterápico para tratamento de lesões cutâneas diabéticas? Contudo, busca-se identificar os benefícios macroscópicos (avaliação morfológica) e microscópicos (avaliação histológica) de lesões cutâneas induzidas em ratos diabéticos, a partir do uso inédito de larvas das espécies supracitadas para o tratamento das lesões.

Portanto, o objetivo deste trabalho será avaliar se as moscas *Hemilucilia segmentaria* e *Hemilucilia semidiaphana* (Diptera: Calliphoridae) possuem potencial larvoterápico através do reparo tecidual de lesões cutâneas de ratos diabéticos.

Considerando que são espécies encontradas abundantemente na floresta amazônica, este estudo facilita o acesso à informação e pode viabilizar posteriormente a Larvoterapia no Estado do Amazonas como alternativa para tratamento de lesões de difícil cicatrização, em especial, pés diabéticos. Com vistas a diminuir o tempo de internação hospitalar, minimizar os danos provenientes da má evolução das lesões, como infecção e amputações, acelerar o processo de cicatrização das feridas e elevar a qualidade de vida dos pacientes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Diabetes Mellitus

2.1.1 Conceito, sintomatologia e diagnóstico

De acordo com o Ministério da Saúde, o diabetes é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia e associadas a complicações, disfunções e insuficiência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, cérebro, coração e vasos sanguíneos. Pode resultar de defeitos de secreção e/ou ação da insulina envolvendo processos patogênicos específicos, por exemplo, destruição das células beta do pâncreas (produtoras de insulina), resistência à ação da insulina, distúrbios da secreção da insulina, entre outros (Brasil, 2006).

O diabetes mellitus (DM) configura-se como uma epidemia mundial, traduzindo-se em grande desafio para os sistemas de saúde de todo o mundo. O envelhecimento da população, a urbanização crescente e a adoção de estilos de vida pouco saudáveis como sedentarismo, dieta inadequada e obesidade são os grandes responsáveis pelo aumento da incidência e prevalência do diabetes em todo o mundo (OPAS, 2022).

Os sintomas clássicos de diabetes são: poliúria, polidipsia, polifagia e perda involuntária de peso (os “4 Ps”). Outros sintomas que levantam a suspeita clínica são: fadiga, fraqueza, letargia, prurido cutâneo e vulvar, balanopostite e infecções de repetição. Algumas vezes o diagnóstico é feito a partir de complicações crônicas como neuropatia, retinopatia ou doença cardiovascular aterosclerótica. Entretanto, o diabetes é assintomático em proporção significativa dos casos, a suspeita clínica ocorrendo então a partir de fatores de risco para o diabetes (Brasil, 2006, p.15).

Considerando os níveis plasmáticos de glicose, o diagnóstico do DM pode ser realizado conforme descrito na **tabela 1**.

Tabela 1 - Valores de glicose plasmáticas (em mg/dl) para diagnóstico de Diabetes Mellitus (DM) e seus estágios pré-clínicos.

Categoria	Jejum*	2h após 75g de glicose	Casual*
Glicemia normal	< 100	< 140	
Glicemia de jejum alterada ¹	≥ 100 e < 126	< 140	
Tolerância à glicose diminuída ²	≥ 100 a < 126	≥ 140 a < 200	
Diabetes mellitus	≥ 126	≥ 200	≥ 200 com sintomas clássicos**

**O Jejum é definido como falta de ingestão calórica por no mínimo 8h e a glicemia casual é aquela realizada a qualquer hora do dia, sem considerar o intervalo desde a última refeição.*

***Os sintomas clássicos do DM incluem poliúria, polidipsia e perda de peso não explicada.*

NOTA: o diagnóstico do DM deve sempre ser confirmado pela repetição do teste em outro dia, a menos que haja hiperglicemia inequívoca com descompensação metabólica aguda ou sintomas óbvios de DM.

1 e 2: As duas situações são também conhecidas por pré-diabetes ou risco aumentado para DM.

Fonte: Adaptado de Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes, (2019-2020).

2.1.2 Prevalência do DM no Mundo, no Brasil e no Amazonas

Mundialmente, o diabetes se tornou um sério problema de saúde pública, cujas previsões vêm sendo superadas a cada nova triagem. Por exemplo, em 2000 a estimativa global de adultos vivendo com diabetes era de 151 milhões e ultrapassou o cálculo, sendo 177 milhões de portadores da doença. Em 2009, havia crescido 88%, ou seja, 285 milhões de portadores da doença. Em 2020, 9,3% dos adultos, entre 20 e 79 anos (assombrosos 463 milhões de pessoas) viviam com diabetes. Estima-se alcançar 350 milhões de pessoas em 2025, ou seja, 5,4% da população mundial (Brasil, 2006; Brasil, 2020), e em 2030 chegará a 21,5 milhões e em 2045 chegará a 23,2 milhões de adultos. Além disso, 1,1 milhão de crianças e adolescentes com menos de 20 anos apresentam diabetes tipo 1 (IDF, 2021).

O Brasil é o 5º país em incidência de diabetes no mundo, com 16,8 milhões de doentes adultos (20 a 79 anos), perdendo apenas para China, Índia, Estados Unidos e Paquistão (IFD, 2023). As estimativas da prevalência de DM são em geral autorreferidas pelos brasileiros. O Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel) estima que ocorreu crescimento da prevalência nas capitais do Brasil, aumentando de 5,5% em 2006 para 7,6% em 2017 (Brasil, 2017). A Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), utilizando o mesmo critério, identificou prevalência de 6,2% da população brasileira em

2013, o que representaria um contingente populacional de cerca de nove milhões de portadores de DM (Malta *et al.*, 2013).

A pesquisa Vigitel Brasil (2023) aponta que o Diabetes atinge 10,2% da população do país, mais frequente entre as mulheres, afetando 11,1% delas, contra 9,1% dos homens, e cerca de 90% dos diabéticos brasileiros apresentam o DM2. O resultado representa um aumento em relação a 2021, quando 9,1% dos brasileiros sofriam com a doença. Entre as capitais brasileiras, Brasília (DF) e São Paulo (SP) apresentam o maior percentual de prevalência de Diabetes no Brasil em 2023, com 12,1% (Brasil, 2023).

Dados da Secretaria de Estado de Saúde do Amazonas (SES-AM) mostram que, no Amazonas, existem mais de 185 mil pessoas vivendo com diabetes. Deste total, a maioria (61,72%) está na capital, Manaus, onde o número de diabéticos ultrapassa 114 mil (SES, 2023).

A crescente prevalência de diabetes em todo o mundo é impulsionada por uma complexa interação de fatores socioeconômicos, demográficos, ambientais e genéticos. O aumento contínuo se deve, em grande parte, ao aumento do diabetes tipo 2 e dos fatores de risco relacionados, que incluem níveis crescentes de obesidade, dietas não saudáveis e falta de atividade física. No entanto, os níveis de diabetes tipo 1, com início na infância, também estão aumentando (Rodacki *et al.*, 2023).

Ainda, a crescente urbanização e a mudança de hábitos de vida (por exemplo, maior ingestão de calorias, aumento do consumo de alimentos processados, estilos de vida sedentários) são fatores que contribuem para o aumento da prevalência de diabetes tipo 2 em nível social. Enquanto a prevalência global de diabetes nas áreas urbanas é de 10,8%, nas áreas rurais é menor, de 7,2%. No entanto, essa lacuna está diminuindo, com a prevalência rural aumentando (FID, 2023).

2.1.3 Classificação da DM

A classificação do diabetes mellitus permite o tratamento adequado e a definição de estratégias de rastreamento de comorbidades e complicações crônicas. A Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) recomenda a classificação baseada na etiopatogenia do diabetes, que compreende o diabetes tipo 1 (DM1), o diabetes tipo 2 (DM2), o diabetes gestacional (DMG) e os outros tipos de diabetes raros, como por exemplo: Mature Onset Diabetes of the Young/MODY, diabetes neonatal transitório ou permanente e diabetes mitocondrial etc.) (Rodacki *et al.*, 2023; SBD, 2023).

Outras classificações têm sido propostas, incluindo classificação em subtipos de DM levando em conta características clínicas como o momento do início do diabetes, a história familiar, a função residual das células beta, os índices de resistência à insulina, o risco de complicações crônicas, o grau de obesidade, a presença de autoanticorpos e eventuais características sindrômicas (WHO, 2019).

O DM2 é o tipo mais comum e está frequentemente associado à obesidade e ao envelhecimento. Tem início insidioso e é caracterizado por resistência à insulina e deficiência parcial de secreção de insulina pelas células β -pancreáticas, além de alterações na secreção de incretinas. Apresenta frequentemente características clínicas associadas à resistência à insulina, como acantose nigricans e hipertrigliceridemia (SBD, 2021).

Para o diagnóstico diferencial dos diversos tipos de diabetes é recomendado o fluxograma abaixo (figura 1).

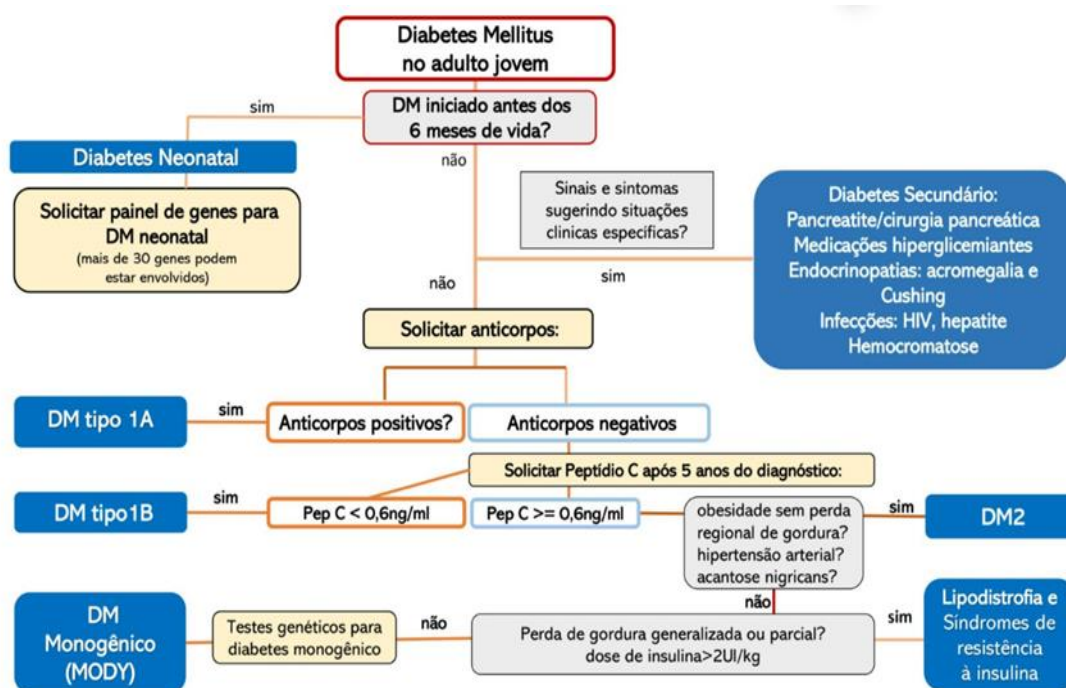


Figura 1 - Fluxograma decisório para diagnóstico diferencial de diversos tipos de diabetes, em caso de dúvida diagnóstica

Fonte: Sociedade Brasileira de Diabetes (2023).

2.1.4 Fisiopatologia da DM

O diabetes mellitus tipo 1 é causado por destruição das células β , geralmente autoimune, o que leva a uma deficiência grave da secreção de insulina. O DM1 pode ser diagnosticado em qualquer idade. Embora seja o tipo mais comum de DM em crianças e adolescentes, dados

recentes indicam que atualmente há mais casos novos de DM1 diagnosticados na vida adulta do que na infância e adolescência. Pacientes com DM1 diagnosticados na vida adulta muitas vezes são erroneamente classificados como DM2 (Leslie *et al.*, 2021).

A doença é caracterizada pela infiltração linfocítica e destruição das células secretoras de insulina das ilhotas de Langerhans. A destruição das células beta-pancreáticas leva a uma deficiência de insulina que por sua vez acarreta hiperglicemia e outras complicações metabólicas secundárias. Esta destruição é mediada por respostas autoimunes que lesam irreversivelmente as células, levando ao aumento da glicose no sangue por déficit absoluto de produção de insulina. Nesse sentido os principais marcadores imunológicos do comprometimento pancreático são os auto-anticorpos anti-ilhota (anti-ICA), anti-insulina (anti-IAA), antidescarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD), antitirosina fosfatase (IA2 e IA2B) e anti-transportador de zinco estão presentes em 90% dos pacientes por ocasião do diagnóstico (Chiang *et al.*, 2014).

A **figura 2** a seguir, descreve a interação de diferentes influências patogênicas que iniciam a resposta autoimune das células β durante a progressão do DM1 para a manifestação da doença.

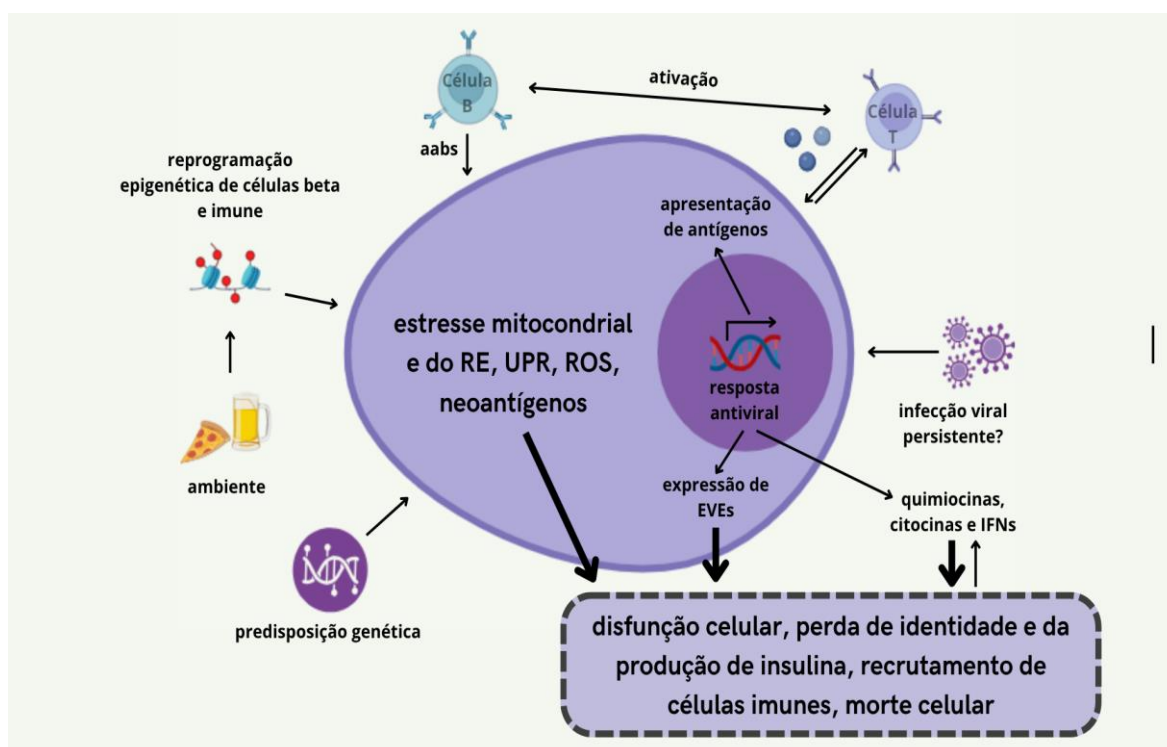


Figura 2 - Esquema simplificado das influências patogênicas nas células Beta no DM1

Legenda: aabs - autoanticorpos, aag - autoantígeno, ER - retículo endoplasmático, EVEs - elementos virais endógenos, IFNs - interferons, neoags. - neoantígenos, ROS - espécies reativas de oxigênio, UPR - resposta proteica desdobrada.

Fonte: Adaptado de Zajec *et al.* (2022).

A apresentação clínica clássica do DM1 geralmente é abrupta, com maior propensão à cetose e cetoacidose, necessidade de insulino-terapia plena desde o diagnóstico ou após curto período. Pacientes com diagnóstico na vida adulta podem apresentar uma forma mais lentamente progressiva da doença, com evolução clínica mais branda (Leslie *et al.*, 2021).

Quanto ao DM tipo 2, sua maior característica é a resistência à ação da insulina associada à disfunção progressiva das células beta do pâncreas, levando à deficiência relativa, e, em alguns casos, absoluta, da secreção deste hormônio. Não há hiperglicemia a menos que a célula beta entre em disfunção, ou seja, todo paciente com diabetes tipo 2 tem algum grau de disfunção das células beta (Rodacki *et al.*, 2023).

Deste modo, com a diminuição da ação da insulina sobre a glicose, ocorre o aumento da secreção dos hormônios contra reguladores, principalmente o glucagon. Assim, acaba ocorrendo o fenômeno catabolismo, de modo que ocorre uma menor captação de glicose no músculo esquelético, o tecido adiposo aumenta a lipólise e ocorre o aumento na produção hepática de glicose, o que explica a hiperglicemia crônica (Galicía-García *et al.*, 2020, Valaiyapathi *et al.*, 2020).

A seguir observa-se a representação esquemática da fisiopatologia no diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (**figura 3**):

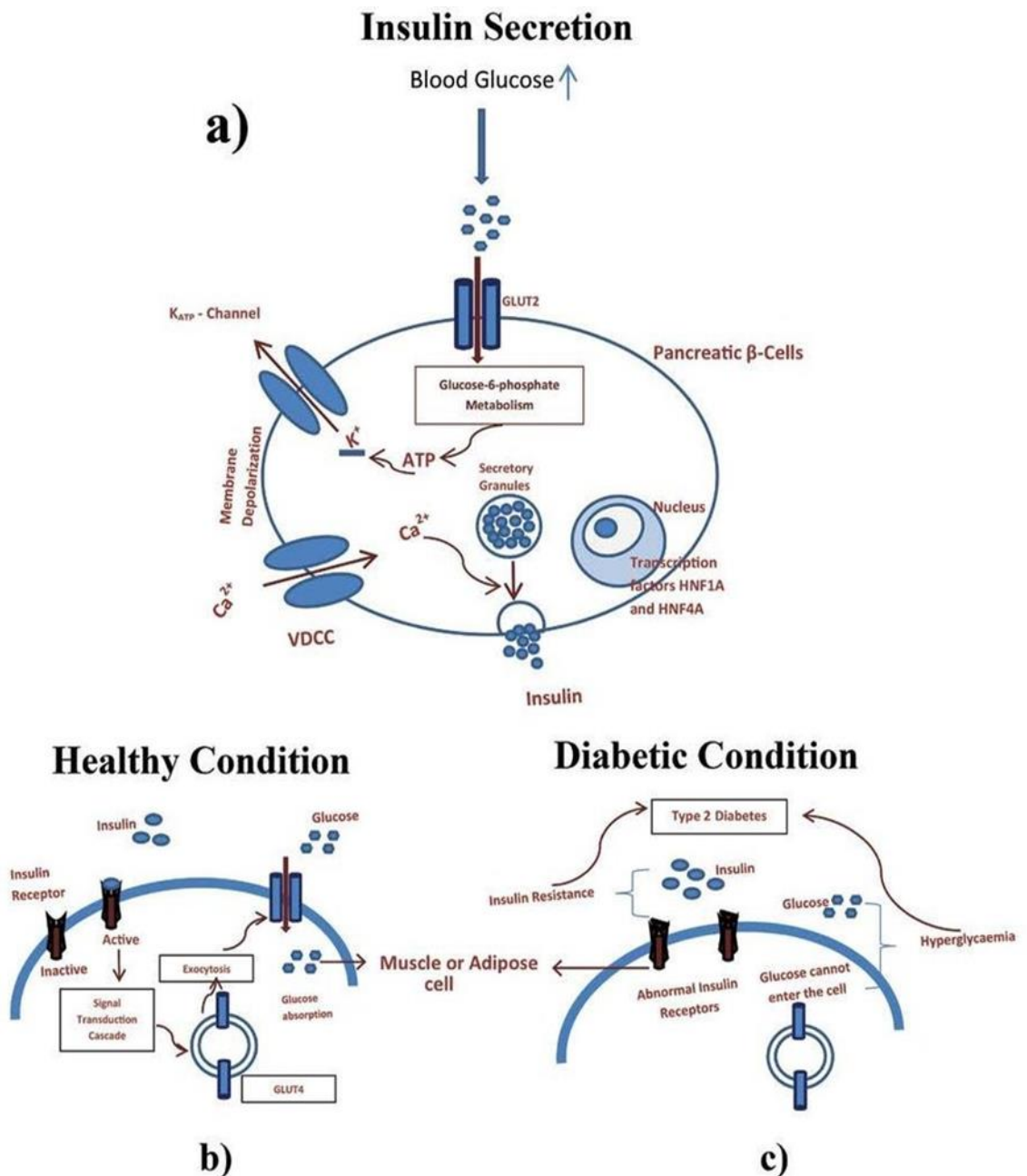


Figura 3 - Fisiopatologia do diabetes mellitus tipo 2 (DM2)

No esquema a): os transportadores de membrana do transportador de glicose tipo 2 (GLUT2) facilitam a entrada de glicose no sangue pós-prandial na célula. A glicose intracelular é fosforilada pela glicose-6-fosfatase em glicose-6-fosfato que entra no ciclo da glicólise gerando piruvato e adenosina trifosfato (ATP). O piruvato entra no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), gerando ainda mais ATP. O aumento na proporção ATP: ADP bloqueia o canal K_{ATP} , levando à despolarização da membrana, permitindo assim que os íons Ca^{2+} entrem na célula através do canal de cálcio dependente de voltagem/dependente. Os íons Ca^{2+} estimulam a secreção do peptídeo de insulina; No esquema b): em indivíduos saudáveis, a insulina liga-se ao receptor de insulina que inicia a cascata de sinalização baseada na fosforilação que resulta na translocação do GLUT4 intracelular para a membrana para captação de moléculas de glicose; No esquema c): na condição diabética, os receptores de insulina tornam-se não funcionais e o GLUT4 citoplasmático não é translocado para a membrana, resultando em resistência à insulina. Consequentemente, a captação de glicose não ocorre, o que leva à hiperglicemia (aumento dos níveis de açúcar no sangue).

Fonte: VSS *et al.* (2018).

A diabetes mellitus tipo 2 tem início tardiamente, sendo associado ao envelhecimento, a fatores genéticos e ambientais. Os pacientes com predisposição à DM2, somados a hábitos alimentares não saudáveis, sedentarismo, síndrome metabólica, sobrepeso e obesidade, têm uma maior chance de desenvolver a doença (Valaiyapathi *et al.*, 2020).

2.1.5 Predisposição para surgimento de feridas

Os portadores de DM são em geral reconhecidos como pacientes mais vulneráveis a uma série de complicações de natureza metabólica e/ou de origem infecciosa, como os processos bacterianos, fúngicos e virais. Somam-se as implicações próprias da doença que, como se sabe, incluem doenças cardiovasculares e cerebrovasculares à neuropatia, retinopatia, nefropatia e má cicatrização de feridas, que muitas vezes contribuem para agravar as condições clínicas vigentes (Minelli *et al.*, 2003; Khamaisi; Balanson, 2017; Menezes *et al.*, 2022).

A morbidade e a mortalidade no DM estão associadas ao surgimento de diversas complicações, como Neuropatia Periférica Diabética (NPD), Doença Arterial Periférica (DAP) e feridas no pé diabético, consideradas manifestações crônicas que elevam o risco de incapacidades físicas e amputações (Bantie *et al.*, 2019). As complicações microvasculares podem ocorrer de forma precoce em pessoas com intolerância à glicose, mesmo antes do diagnóstico de DM tipo 2. Entretanto, a progressão da DM e suas complicações estão ligadas a diversos fatores, como o tempo em que a pessoa permanece sem controlar o índice glicêmico (Stolar, 2010).

A má cicatrização de feridas, ou mais frequentemente referida como úlceras de pé diabético (UDP), pode ser devastadora, tornando-se uma infecção sistêmica com osteomielite e levando à amputação. A cicatrização dessas lesões ainda requer maior investigação, especialmente em relação à eficácia de tratamentos inovadores. A ferida pode ser descrita como a sequela de dano a um epitélio e seus tecidos conectivos subjacentes, agravada por má perfusão e oxigenação tecidual, fatores determinantes para a evolução clínica negativa (Lavery *et al.*, 2016; Khamaisi; Balanson, 2017).

Os diabéticos apresentam peculiaridades que os tornam suscetíveis a dermatoses por vezes infrequentes em não diabéticos. Muitas dessas alterações cutâneas necessitam de diagnóstico precoce e intervenção imediata, para que sejam evitadas complicações graves ou fatais, já que a pele fragilizada constitui porta de entrada importante para infecções secundárias e recorrentes (Carvalho *et al.*, 2019).

A literatura evidencia que a úlcera diabética é resultado de uma interação complexa entre neuropatia periférica, DAP e resposta imunológica deficitária, fatores que juntos favorecem a instalação de infecções recorrentes e complicações graves. Estudos apontam que aproximadamente 50% dos pacientes com úlcera plantar desenvolvem algum grau de infecção, sendo que até 5% evoluem para amputações maiores em menos de um ano, o que reforça a gravidade desse agravo e a necessidade de estratégias preventivas (Ferreira, 2020).

A cicatrização diabética é marcada por um descompasso entre processos fisiopatológicos (p. ex., inflamação persistente, angiogênese insuficiente, infecção/biofilme, neuropatia/isquemia) e gatilhos bioquímicos (p. ex., hiperglicemia sustentada, estresse oxidativo, AGE–RAGE, desequilíbrio MMP/TIMP, disfunção de NO/HIF-1). Esses impasses mantêm o leito da ferida num estado inflamatório e proteolítico, com matriz extracelular degradada e reparo fraco. Em síntese, o fenótipo crônico deriva de vias bioquímicas ativas no microambiente diabético que sustentam alterações celulares e teciduais típicas de feridas de difícil cicatrização (Burgess *et al.*, 2021).

Louiselle *et al.* (2021) resumem que no eixo inflamação e imunidade inata, o “switch” macrofágico M1→M2, crucial para sair da fase inflamatória, costuma falhar. O resultado fisiopatológico é uma inflamação prolongada e pobre resolução; bioquimicamente, o ambiente hiperglicêmico e pró-oxidante favorece mediadores como IL-1 β e TNF- α que “seguram” o fenótipo M1.

Já o estresse oxidativo é um nó bioquímico central. Espécies reativas de oxigênio alimentam dano celular, ativam TNF- κ B e degradam fatores de crescimento, perpetuando, fisiopatologicamente, a inflamação e a má granulação. Deng *et al.* (2021) destacam que AGEs (produtos finais de glicação) amplificam isso no leito da ferida.

Fadini *et al.* (2019) sintetizam que a angiogênese insuficiente traduz-se em granulação escassa e hipóxia tecidual, enquanto, bioquimicamente, a hiperglicemia interfere diretamente em vias pró-angiogênicas e de óxido nítrico. Além disso, a via HIF-1, um sensor de hipóxia indispensável à angiogênese, fica deprimida no diabetes (Catrina *et al.*, 2021).

No que se refere ao remodelamento da matriz extracelular, observa-se um desequilíbrio proteolítico: MMPs elevadas e TIMPs insuficientes degradam colágeno e fatores de crescimento, sabotando a reepitelização, conforme apresentado por Fu; Robbins; McDougall, (2022).

A susceptibilidade a infecções e a presença de biofilmes fecham o ciclo vicioso. Fisiopatologicamente, biofilmes mantêm a inflamação e dificultam o controle bacteriano;

bioquimicamente, proteases e exopolímeros do biofilme sequestram/ degradam sinais pró-reparo (Afonso *et al.*, 2021) Somam-se ainda déficits funcionais de neutrófilos induzidos pela glicose elevada por exemplo, quimiotaxia prejudicada via FPR que atrasam o recrutamento e o “clearance” bacteriano (Roy *et al.*, 2022).

Além dos aspectos relacionados ao microambiente da ferida diabética, pesquisas recentes confirmam que o perfil sociodemográfico e clínico dos pacientes exerce influência significativa na evolução das lesões. Pacientes com menor escolaridade, histórico de amputação prévia e presença de neuropatia apresentaram maior vulnerabilidade ao desenvolvimento de úlceras diabéticas, evidenciando o impacto clínico e social da doença. Nesse contexto, compreender tais características é essencial para subsidiar estratégias de prevenção, acompanhamento e intervenção direcionadas, capazes de reduzir o risco de complicações e melhorar a qualidade de vida (Silva, 2024).

2.2 Estruturas da pele

2.2.1 Histologia da pele

A pele é composta por duas camadas: epiderme e derme. Devido à proximidade e ao comportamento reacional do tecido subcutâneo nos diferentes processos patológicos, alguns autores o consideram como uma terceira camada. Aproximadamente 95% da epiderme é composta por células denominadas queratinócitos, que sintetizam uma proteína denominada queratina. Os queratinócitos agrupam-se em camadas, que sofrem constante diferenciação. Da base à superfície, temos: camada basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea. Melanócitos, células de Langerhans e de Merkel compõem os 5% restantes (Barcaui *et al.*, 2015).

Histologicamente, a pele é um tecido de revestimento com células diferenciadas, e a epiderme é composta, da base à superfície, pela camada basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea, conforme quadro abaixo.

Quadro 1 - Características histológicas da epiderme

Camadas da pele	Características histológicas
-----------------	------------------------------

Camada basal	Células prismáticas ou cuboides, ligeiramente basófilas, que repousam sobre a membrana basal que separa a epiderme da derme. A camada basal, rica em células-tronco (<i>stem cells</i>) da epiderme, é também chamada de germinativa. Apresenta atividade mitótica, sendo responsável, junto com a camada seguinte (espinhosa), pela constante renovação da epiderme. Os queratinócitos proliferam na camada basal e migram em direção à superfície da epiderme, diferenciando-se progressivamente até contribuir para a formação da camada córnea. Fatores mitogênicos produzidos pelos fibroblastos presentes na derme subjacente, são muito importantes para a proliferação celular na camada basal. Calcula-se que a epiderme humana se renove a cada 15 a 30 dias, dependendo principalmente do local e da idade da pessoa. Os queratinócitos contêm filamentos intermediários de queratina, que se tornam mais abundantes à medida que a célula avança para a superfície.
Camada espinhosa	Células cuboides ou ligeiramente achatadas, com volume maior que o das células da camada basal, núcleo central e citoplasma com feixes de filamentos de queratina (tonofilamentos). Nessa camada os queratinócitos estão unidos entre si por inúmeras junções intercelulares do tipo desmossomo. Os filamentos de queratina e os desmossomos têm importante papel na manutenção da coesão entre as células da epiderme e na resistência ao atrito.
Camada granulosa	Células poligonais achatadas, núcleo central e citoplasma carregado de grânulos basófilos, chamados de grânulos de querato-hialina, que não são envolvidos por membrana. Somente pode ser visualizada ao microscópio eletrônico, são os grânulos lamelares, que contêm discos lamelares formados por bicamadas lipídicas e são envoltos por membrana. Esses grânulos se fundem com a membrana plasmática e expulsam seu conteúdo para o espaço intercelular da camada granulosa, onde o material lipídico se deposita, contribuindo para a formação de uma barreira (Barreira Hídrica-Epidérmica) contra a penetração de substâncias e para tornar a pele impermeável à água, impedindo a desidratação do organismo.
Camada lúcida	Mais evidente na pele espessa, é constituída por uma delgada camada de células achatadas, eosinófilas e translúcidas, cujos núcleos e organelas citoplasmáticas foram digeridos por enzimas dos lisossomos e desapareceram. Ainda se podem ver desmossomos entre as células ao microscópio eletrônico, mas as células são indistinguíveis ao microscópio óptico.

Estrato córneo	Apresenta espessura muito variável e é constituída por células achatadas, mortas e sem núcleo, cujo citoplasma se apresenta repleto de queratina. Os tonofilamentos se aglutinam junto com uma matriz formada pelos grânulos de querato-hialina. Nessa etapa da diferenciação, os queratinócitos estão transformados em placas sem vida e descamam continuamente.
----------------	---

Fonte: Junqueira; Carneiro (2013).

A derme, segunda camada da pele, possui espessura de 1 a 4 mm. Estão presentes nessa camada: vasos sanguíneos e linfáticos, os músculos eretores do pelo, os folículos pilosos, os nervos receptores e sensitivos e as terminações nervosas através das quais sentimos o toque, o calor, o frio, e a dor. Além disso, estão presentes as glândulas sudoríparas e sebáceas que ajudam a manter a pele flexível e impermeável (Irion, 2005).

A derme é o tecido conjuntivo em que se apoia a epiderme e que une a pele ao tecido subcutâneo (hipoderme). É essencial para a nutrição da epiderme (que não é vascularizada). Os vasos sanguíneos da derme são importantes para a função de termorregulação da pele e para a defesa imunológica da pele. A derme é constituída por duas camadas de limites pouco distintas: a papilar, superficial e a reticular, mais profunda (Junqueira; Carneiro, 2013).

A hipoderme, também conhecida como tecido subcutâneo, proporciona reserva calórica, proteção contra lesão traumática e promove o isolamento térmico. Têm em sua estrutura os adipócitos, que são envolvidos em feixes de tecido conjuntivo e agrupados em lobos gordurosos (Cândido, 2006). Abaixo a representação das três camadas da pele e suas estruturas.

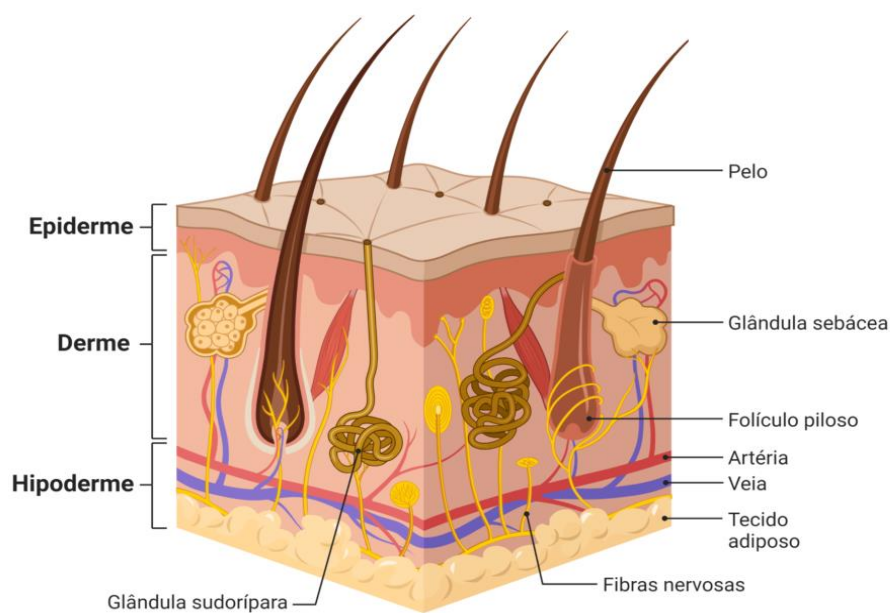


Figura 4 - Camadas epiderme, derme e hipoderme e anexos da pele
 Fonte: Internet, 2024 (<https://cursaeducacao.com.br/blog/camadas-da-pele/>)

2.2.2 Lesão Cutânea

Ferida ou lesão refere-se a ruptura da pele, ou seja, a perda da solução de continuidade do tegumento cutâneo, demonstrado pelo rompimento das camadas da pele ou de estruturas mais profundas. Podem ter por etiologia, agentes físicos, químicos ou biológicos, como lesões traumáticas, distúrbios metabólicos ou doenças vasculares (Mittag *et al.*, 2017).

As feridas são classificadas de várias formas, como por exemplo pela causa, evolução da cicatrização, grau de contaminação e morfologia. Dentre essas classificações, pode-se citar: as feridas agudas e crônicas, conforme o processo cicatricial (Ferreira *et al.*, 2015; Olivas; Oliveira, 2017); quanto à presença de infecção, sendo classificada como não contaminada, limpa, limpa contaminada, contaminada ou suja e infectada; quanto à profundidade e/ou à causa sendo intencional ou não intencional, cirúrgica ou traumática (Calisto *et al.*, 2015).

As feridas são descritas como agudas, quando, no geral, a cicatrização ocorre em até três semanas. Podem ser decorrentes de um trauma, como: cortes, feridas cirúrgicas, lesões perfurantes e escoriações. A resolução é rápida, responde imediatamente ao tratamento e não geram complicações (Borges *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2016).

Já as feridas crônicas possuem uma cicatrização tardia e demorada, decorrente de lesões reincidentes e de longa duração, que dificulta a reintegridade anatômica e funcional do local acometido. O processo cicatricial considerado estagnado pode ultrapassar seis semanas

(Cavalcante et al., 2020) ou três meses, provocando danos ao portador, como dor permanente, sofrimento, afastamento do trabalho e pode causar problemas biopsicossociais (Almeida et al., 2018; Cotrim, 2017; Olivas; Oliveira, 2017).

A difícil e lenta cicatrização destas lesões, podem resultar em diversos agravos ao indivíduo, desde incapacidade, dependência, infecções, amputações e, até mesmo, a morte. O aumento da incidência e prevalência das feridas crônicas na população brasileira implica em um grande problema de saúde pública (Masiero, 2019).

As causas das feridas crônicas são diversas, seu desenvolvimento e velocidade de cicatrização não são iguais (Yao; Fu; Cheng, 2020). Entretanto, algumas causas interferem diretamente no processo de cicatrização, estando principalmente ligadas a idade, a existência de comorbidades, como diabetes, alterações cardiocirculatórias e de coagulação, disfunção renal, quadros infecciosos sistêmicos, a permanência prolongada em leitos, tabagismo, etilismo e à presença de resíduos dentro da ferida, como tecido necrosado, corpos estranhos, biofilme e hipóxia tecidual (Oliveira; Dias, 2012; Tavares, 2018).

Franco (2010), enfatiza que a presença de tecido desvitalizado em feridas, tais como necrose onde ocorre a morte celular a partir de uma agressão que interfere na estrutura ou função vital de uma célula, constitui-se em fator de influência negativa na evolução da cicatrização.

Embora a não cicatrização da ferida seja considerada de natureza multifatorial, a infecção e a implantação microbiana, destaca-se como a causa mais provável e inevitável de cicatrização retardada da lesão (Zhou; Jin; Lu, 2020).

Em resposta a uma lesão uma série de processos metabólicos e atividade de diversas células do corpo agem com o objetivo de reconstituir a integridade física do tecido afetado. Primeiramente, o processo inflamatório é ativado, seguido com regeneração ou reparação dos tecidos lesionados. As células sanguíneas são as guardiãs desse processo e os fibroblastos são células que participam ativamente com a excreção de colágeno reconstruindo a área afetada (Souza et al., 2021).

De um modo geral, em resposta a um estímulo lesivo (físico, químico ou biológico), o organismo reage com a liberação, ativação ou síntese de substâncias conhecidas como mediadores químicos ou farmacológicos da inflamação, que determinam uma série de alterações locais, que manifestam-se inicialmente por dilatação de vasos da microcirculação, aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, com extravasamento de líquido plasmático e formação de edema, diapedese de células para o meio extravascular, fagocitose, aumento da viscosidade do sangue e diminuição do fluxo sanguíneo, podendo ocorrer até uma

estase. Assim, o processo inicial, agudo, se manifesta localmente de forma uniforme, padronizada ou estereotipada, qualquer que seja a natureza do estímulo lesivo (Bechara; Szabó, 2006).

2.2.3 Fases de cicatrização de lesões cutâneas

Após a lesão, o corpo desenvolve procedimentos rápidos para voltar a continuidade fisiológica que havia antes, iniciando assim os processos de hemostasia e cicatrização tecidual (Guirro *et al.*, 2016). A cicatrização divide-se em 3 fases (Campos *et al.*, 2007) conforme descrito a seguir:

Fase Inflamatória

Após a lesão, a fase inicial começa imediatamente com a liberação de substâncias vasoconstritoras, como o tromboxano A₂ (TXA₂) e as prostaglandinas, pelas membranas celulares. O endotélio danificado e as plaquetas ativam a cascata de coagulação. As plaquetas desempenham um papel essencial na regeneração. Com o objetivo de promover a hemostasia, essa cascata é ativada e os grânulos são liberados das plaquetas, que contêm o fator de crescimento de transformação beta (TGF- β) e também outros fatores de crescimento, como o PDGF, FGF, EGF, prostaglandinas e tromboxanas, que atraem os neutrófilos para o local da ferida (Broughton; Janis; Attinger, 2006 a).

O coágulo é composto por colágeno, plaquetas e trombina, que funcionam como um reservatório protéico para a síntese de citocinas e fatores de crescimento, potencializando seus efeitos. Assim, a resposta inflamatória se inicia com a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular, facilitando a migração de neutrófilos para a ferida (Campos *et al.*, 2007).

Os neutrófilos são os primeiros a chegarem até o local da lesão, com sua maior concentração ocorrendo 24 horas após o ferimento. Eles são atraídos por substâncias quimiotáticas liberadas pelas plaquetas. Para aderirem à parede do endotélio, os neutrófilos utilizam as selectinas como ligação (receptores de membrana). Durante o processo, os neutrófilos produzem radicais livres que ajudam na eliminação das bactérias e são progressivamente substituídos pelos macrófagos (Broughton; Janis; Attinger, 2006 a).

Estes últimos migram para a lesão após 48 - 96 horas e são as principais células presentes antes da chegada dos fibroblastos, responsáveis por iniciar o processo de reparação. Os macrófagos desempenham um papel crucial no término do desbridamento iniciado pelos

neutrófilos, destacando-se pela secreção de citocinas e fatores de crescimento, além do envolvimento na formação de novos vasos sanguíneos, produção de tecido fibroso e criação de uma matriz extracelular (Broughton; Janis; Attinger, 2006 a), todos essenciais para a transição para a fase de proliferação (Campos *et al.*, 2007).

Fase proliferativa

A fase proliferativa consiste em quatro fases básicas: epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno. Esta fase começa por volta do quarto dia após a lesão e dura até o final da segunda semana. A epitelização ocorre precocemente. Se a membrana basal estiver intacta, as células epiteliais migram para cima e as camadas normais da epiderme são restauradas em 3 dias. Quando a membrana basal é danificada, as células epiteliais começam a proliferar nas bordas da ferida para restaurar a barreira protetora (Lawrence; Diegelmann, 1994).

A angiogênese é estimulada pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e é caracterizada pela migração de células endoteliais e formação de capilares, essenciais para a cicatrização adequada (Campos *et al.*, 2007).

A última parte da fase proliferativa é a formação do tecido de granulação. Os fibroblastos e as células endoteliais são as principais células da fase proliferativa. Os fibroblastos dos tecidos adjacentes migram para a ferida, mas devem ser ativados para sair da dormência. O fator de crescimento mais importante na proliferação e ativação de fibroblastos é o PDGF (Broughton; Janis; Attinger, 2006 b).

Posteriormente, o TGF- β é liberado e estimula os fibroblastos a produzir colágeno tipo I, converter-se em miofibroblastos e promover a contração da ferida (Campos *et al.*, 2007).

Os fatores de crescimento envolvidos no processo de cicatrização incluem PDGF, que induz a proliferação celular, quimiotaxia e síntese de matriz. Fatores epidérmicos que estimulam a epitelização. Fator de transformação alfa, responsável pela angiogênese e epitelização. fator de fibroblastos, que estimula a proliferação celular e a angiogênese, e fator de transformação beta, que está envolvido no aumento da síntese da matriz (Witte; Barbul, 1997).

Fase de maturação ou remodelamento

A característica mais importante desta fase é a deposição sistemática de colágeno, razão pela qual é a mais importante clinicamente. O primeiro colágeno produzido é mais fino que o

colágeno encontrado na pele normal e corre paralelo à pele. Com o tempo, o colágeno original (colágeno tipo III) é reabsorvido, produzindo colágeno mais espesso e organizado ao longo das linhas de tensão. Estas alterações refletem-se num aumento da resistência à tração da ferida (Campos *et al.*, 2007).

A reconstituição da nova matriz é um importante processo de cura. Fibroblastos e leucócitos secretam collagenase, que promove a dissolução da matriz antiga. A reparação é bem sucedida quando existe um equilíbrio entre a síntese da nova matriz e a dissolução da matriz antiga, e quando os depósitos são maiores. Mesmo após 1(um) ano, o colágeno organizado na cicatriz é menor do que na pele saudável, e a resistência à tração nunca mais chega a 100%, chegando a cerca de 80% após 3 (três) meses (Broughton; Janis; Attinger, 2006 b).

A falha em umas destas fases no processo de cicatrização da ferida pode prolongar o tempo de reparo e conduzir complicações, cerca de 60 milhões de pessoas em todo o mundo sofrem de feridas crônicas e seus custos de tratamento representam 4% do total de despesas de saúde e 68% do tempo de enfermagem (Yao; Fu; Cheng, 2020).

A **figura 5** apresenta um gráfico com as fases da cicatrização e a deposição dos componentes da matriz cicatricial ao longo do tempo.

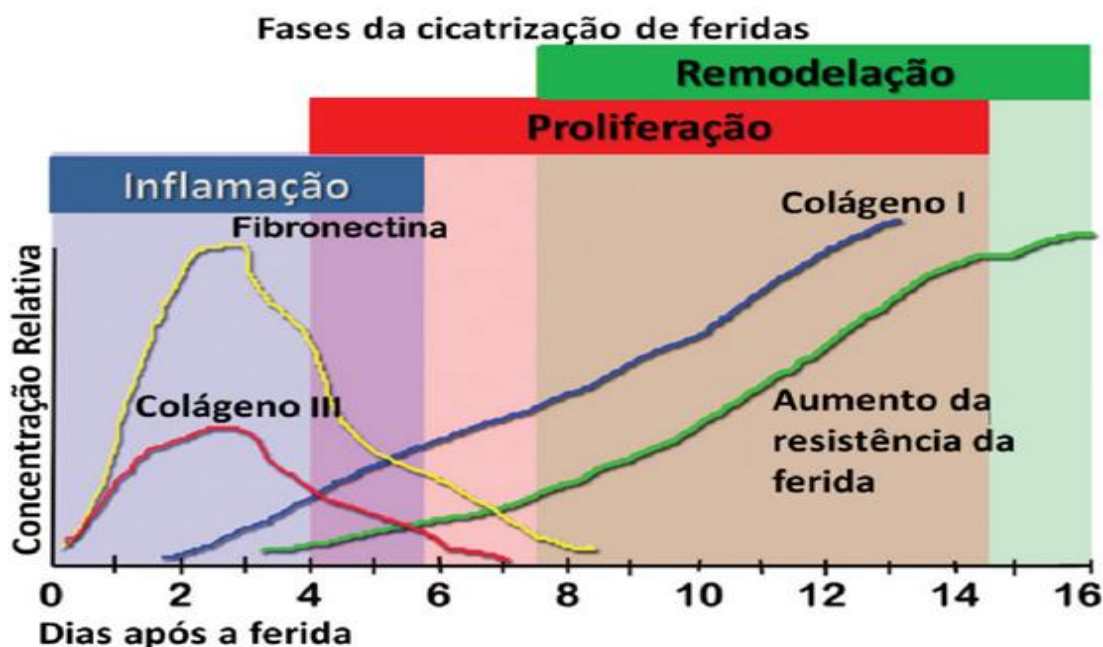


Figura 5 - Fases da cicatrização e a deposição dos componentes da matriz cicatricial ao longo do tempo

Fonte: Adaptado de Broughton *et al.* (2006).

2.3 Diabetes mellitus e o processo de cicatrização cutânea

As feridas são consideradas um problema grave e de abrangência mundial, responsáveis por significativos índices de morbidade, mortalidade e aumento dos gastos anualmente para tratar complicações de saúde relacionadas às lesões interligado ao diabetes mellitus (Vieira, 2019).

Essas feridas com dificuldade em cicatrizar geralmente não progridem através do processo normal de cura. Estas feridas entram frequentemente num estado de inflamação patológica devido a um processo de cicatrização prolongado, incompleto ou descoordenado (Leal; Carvalho, 2014).

Os portadores de DM são em geral reconhecidos como pacientes mais vulneráveis a uma série de complicações de natureza metabólica e/ou de origem infecciosa, como os processos bacterianos, fúngicos e virais. Somam-se as implicações próprias da doença que, como se sabe, incluem doenças cardiovasculares e cerebrovasculares à neuropatia, retinopatia, nefropatia e má cicatrização de feridas, que muitas vezes contribuem para agravar as condições clínicas vigentes (Khamaisi; Balanson, 2017; Menezes *et al.*, 2022; Minelli *et al.*, 2003).

A morbidade e a mortalidade no DM estão associadas ao surgimento de diversas complicações, como Neuropatia Periférica Diabética (NPD), Doença Arterial Periférica (DAP) e feridas no pé diabético (Bantie *et al.*, 2019).

As complicações microvasculares podem ocorrer de forma precoce em pessoas com intolerância à glicose, mesmo antes da DM tipo 2. Entretanto, a progressão da DM e suas complicações estão ligadas a diversos fatores, como o tempo em que a pessoa permanece sem controlar o índice glicêmico (Stolar, 2010).

Má cicatrização de feridas ou mais frequentemente referida como úlceras de pé diabético (UDP) pode ser devastadora, tornando-se uma infecção sistêmica com osteomielite e levando a amputação. A cicatrização de UDP ainda requer mais pesquisa de eficácia e descrição de tratamentos aprovados. A ferida pode ser descrita como a sequela de dano a um epitélio e seus tecidos conectivos subjacentes que pode ser complicada por dano tecidual excessivo subjacente, patologia e má perfusão e oxigenação tecidual (Khamaisi; Balason, 2017; Lavery *et al.*, 2016).

Os diabéticos apresentam peculiaridades que os tornam suscetíveis a dermatoses por vezes infrequentes em não-diabéticos. Muitas de suas doenças necessitam diagnóstico rápido e tratamento imediato, para que sejam evitadas complicações ocasionalmente graves ou mesmo fatais (Carvalho *et al.*, 2019).

Feridas associadas ao DM apresentam uma ligeira inflamação crônica sistêmica, que irá influenciar os tecidos e a sua regeneração. Além disso, os neutrófilos mostram uma redução das atividades quimiotáticas e fagocíticas, tornando as feridas mais propensas à infecção. Em feridas diabéticas, também se verifica a disfunção das células T, a diminuição na quimiotaxia, fagocitose e capacidade bactericida dos leucócitos, a disfunção dos fibroblastos e das células epidérmicas. Estes defeitos são responsáveis pela inadequada remoção bacteriana e reparação demorada ou deficiente das feridas em pessoas com diabetes (Gary; Woo, 2008).

Como resultado, e em contraste com a cicatrização normal de feridas, onde a inflamação ocorre de um modo sequencial e regulada, a inflamação em feridas diabéticas é prolongada levando a uma cicatrização deficiente.

Esse tipo de lesão sempre está acompanhado por hipóxia. A situação de hipoxia prolongada, que pode ser derivada da insuficiente irrigação sanguínea e da reduzida angiogênese, é prejudicial para a cicatrização de feridas. A hipóxia pode amplificar a resposta inflamatória precoce, prolongando assim a lesão, aumentando os níveis de radicais livres de oxigênio (Woo *et al.*, 2007).

A hiperglicemia também pode aumentar o stress oxidativo, quando a produção de ROS excede a capacidade antioxidante. A formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), consequente da hiperglicemia, e a interação com seus receptores (RAGE) estão associados a dificuldades de cicatrização em ratos diabéticos. Os níveis elevados de metaloproteases são uma característica das úlceras do pé diabético, e os níveis de metaloproteases de matriz (MMP) no fluido de feridas crônicas são quase 60 vezes superiores do que em feridas agudas. Este aumento da atividade das proteases permite a destruição dos tecidos e inibe os processos normais de reparação (Huijbert *et al.*, 2008).

As feridas de diabéticos exibem uma angiogênese reduzida. Vários estudos onde investigaram os mecanismos pelos quais ocorre a diminuição da restauração da vasculatura em feridas diabéticas, demonstraram que há disfunção na mobilização e a migração da matriz extracelular (MEC) para as feridas. Tem sido demonstrado que as MEC de pacientes diabéticos apresentam uma menor proliferação, menor aderência e menor incorporação nas estruturas vasculares (Leal; Carvalho, 2014).

A neuropatia periférica que ocorre em indivíduos diabéticos também contribui para a cicatrização deficiente das feridas. O sistema imunológico é normalmente considerado como autorregulado, mas vários estudos sugerem que o sistema nervoso periférico interage estreitamente com o sistema imune e que desempenha funções de regulação neuroimuno

importantes. Os nervos sensoriais desempenham um papel importante na modulação dos mecanismos de defesa imunitária, uma vez que a pele desnervada exibe uma reduzida infiltração de leucócitos. Os nervos aferentes podem responder a uma grande variedade de estímulos e, após estimulação, os neuropeptídeos são rapidamente liberados no microambiente (Shepherd *et al.*, 2005).

Na pele, esses neuropeptídeos atuam através da ativação de receptores presentes numa variedade de células, incluindo células endoteliais microvasculares, queratinócitos, mastócitos, fibroblastos e células do sistema imune. A deficiente inflamação neurogênica, devido à neuropatia diabética, contribui para uma maior susceptibilidade para úlcera do pé diabético (Leal; Carvalho, 2014; Steinhoff *et al.*, 2003).

Em síntese, a cura das feridas em indivíduos com diabetes envolve conduta para tratar hipóxia, disfunção de fibroblastos e de células epidérmicas, redução da angiogênese e disfunção neovascular, elevados níveis de metaloproteases, danos das ROS e MEC, diminuição da resistência ao hospedeiro imune e neuropatia periférica.

2.4 Tratamento para lesões cutâneas

Dentre as principais terapêuticas recomendadas pelo Ministério da Saúde do Brasil, estão: Polihexametilenobiguanida (PHMB) solução ou em rolo; Papaína em gel ou creme (8, 10 e 12%); Hidrocoloide; Ácidos graxos essenciais (AGE); Óxido de zinco; Carvão ativado associado com alginato de prata; Hidrofibra com prata e espuma de poliuretano; Alginato de cálcio; Hidrofibra sem prata; Bandagem de algodão puro ou misto impregnada com óxido de zinco, glicerina, óleo de castor ou mineral; Sulfadiazina de prata; Filmes semipermeáveis; Colágeno biológico; Fator de crescimento celular e Curativo de gaze não aderente (Tavares, 2018).

São inúmeras as terapêuticas existentes para tratamento de feridas, com destaque para o debridante enzimático que será utilizado no estudo, a collagenase composta por clostridiopeptidase A e enzima proteolítica, apresenta ação seletiva de degradar o colágeno nativo da ferida. Este produto pode ser usado onde há tecido desvitalizado, em feridas limpas ou infectadas, com exceção de feridas com cicatrização por primeira intenção e sensíveis à enzima (Mandelbaum *et al.*, 2003). É uma das coberturas desbridantes mais disponível e de acesso facilitado nas Unidades de Saúde vinculadas ao SUS, no Estado do Amazonas.

Outros tratamentos de feridas, que envolvem altas tecnologias vem ganhando espaço no mercado, como as terapias de Oxigenoterapia Hiperbárica; Plasma autólogo rico em plaquetas

(Cabral *et al.*, 2022); Ultrassom de baixa frequência (Ponte *et al.*, 2019); Terapia fotodinâmica (Domingues *et al.*, 2022); Biocelulose (Netto; Jacon, 2022) e Laserterapia (Lucio; Paula, 2020) Terapia por pressão negativa (Dunville, 2013), Terapia de fechamento assistida por vácuo (Daskalaki, 2016).

Além destes, o tratamento pode ser realizado por meio da Bioterapia, onde utiliza-se um microrganismo vivo ou seus produtos a favor da recuperação humana. As principais bioterapias adotadas atualmente têm sido a terapia com sanguessuga, abelhas, protozoários, bactérias, helmintos, cães, cavalos e larvas. Dentre estas, se sobressai, a terapia com larvas de moscas, eficiente no desbridamento de lesões cutâneas (Franco, 2010).

2.4.1 Terapia Larval

Este tratamento consiste na aplicação de larvas de moscas necrófagas selecionadas a partir da disponibilidade no território, pois são capturadas diretamente da natureza, os ovos são desinfetados em laboratório, após eclosão das larvas, estas são aplicadas sobre a lesão, e tem como finalidade a promoção da cicatrização, por meio do desbridamento biológico, ou seja, pela remoção de secreção, tecido desvitalizado ou necrosado (Masiero, 2019; Nitsche, 2010; Thyssen *et al.*, 2021).

A Terapia Larval (TL) ou larvoterapia apresenta originalmente seus primeiros relatos de execução em tribos aborígenes Australianas e Maias na América Central. As contribuições dessa terapia já eram mencionadas por soldados pertencentes ao exército de Napoleão Bonaparte, durante as batalhas. Em 1829, o cirurgião chefe do exército de Napoleão Bonaparte, Baron Dominic Larrey, relatou que quando larvas se desenvolviam nas feridas dos combatentes, elas preveniam o aparecimento de infecção e aceleravam a cicatrização (Tanyuksel *et al.*, 2005).

Nos primeiros anos de aplicação larval, a contaminação bacteriana oriunda das larvas de moscas não desinfetadas foi um problema sério (Wollina *et al.*, 2000), devido os riscos da introdução de patógenos dentro das feridas, gerando a necessidade do desenvolvimento de procedimentos eficientes para esterilização. O primeiro método de desinfecção dos ovos foi desenvolvido por Baer, em seu laboratório, através de uma solução de cloreto de mercúrio e ácido clorídrico (Weil *et al.*, 1933). Atualmente, os ovos são desinfetados antes da aplicação, sendo evitado o uso de substâncias tóxicas, que podem matar o inseto durante este processo (Wolf; Hansson, 2005).

Apesar de seu grande potencial no tratamento de feridas, somente no século XX, no decorrer das guerras mundiais e após o aperfeiçoamento de métodos estéreis para a criação de

ovos das larvas, que a TL se torna aceitável para ser utilizada com segurança e êxito como terapêutica em diversos tipos de lesões, apresentando dentre os seus principais benefícios o debridamento de tecidos necrosados, a ação antimicrobiana e reparação dos tecidos (Chan, *et al.* 2007; Erdmann, 1987).

O primeiro profissional médico a utilizar sistematicamente larvas em feridas incuráveis foi William Baer por volta de 1929, num Hospital Infantil em Baltimore Maryland, EUA. Ele tratou com TL mais de 100 crianças com osteomielite e feridas de partes moles. Nesse período, Baer que era o professor clínico de cirurgia ortopédica da Escola de Medicina John Hopkins, observou durante o serviço militar na Primeira Guerra Mundial, que as fraturas expostas e ferimentos abdominais eram tomados por larvas e não apresentavam febre e sinais de infecção sistêmica. Aplicou a técnica posteriormente com êxito, apresentando resultados satisfatórios, publicados em 1931 (Baer, 1931; Sherman, 2002, 2009).

A larvoterapia foi abandonada no início dos anos de 1940 com o aparecimento dos antibióticos, sendo somente “redescoberta” nos anos de 1980, frente à resistência dos micro-organismos aos fármacos (Akhtar *et al.*, 2011; Chan *et al.*, 2007).

Nos últimos quarenta anos, a terapia larval tem sido novamente reconhecida como alternativa viável para o tratamento de lesões. Nos EUA, na década de 80, o americano Ronald Sherman trouxe estudos comparativos entre o uso da TL e coberturas convencionais e mostrou resultados mais eficazes quando a TL foi a técnica utilizada (Whitaker *et al.*, 2007; Wolf; Hansson, 2005).

Em 1996 a “*Biosurgical Research Unit*” (Unidade de Pesquisa em Biocirurgia) organizou a primeira conferência internacional de biocirurgia, após o evento, fundou-se a Sociedade Internacional em bioterapia para investigar e desenvolver o uso de organismos vivos ou seus produtos no reparo tecidual (Thomas *et al.*, 2001). Atualmente, a TL está sendo utilizada especialmente no tratamento de feridas crônicas e/ou infectadas, devido ao sucesso de sua aplicação e eficácia na eliminação de micro-organismos resistentes às drogas em uso (Bonn, 2000; Thomas *et al.*, 2001; Van Der Plas *et al.*, 2007; Valachova, 2013).

Nos Estados Unidos e no continente europeu a TL é reconhecida como tratamento para feridas por suas agências reguladoras, enquanto que na América do Sul (Chile, Colômbia, Venezuela e Brasil) seu uso tem se restringido em nível de pesquisa (Thyssen *et al.*, 2021).

A TL pode ser entendida como uma miíase induzida de modo artificial, controlada e assistida cuidadosamente. Salienta-se que apenas algumas espécies de moscas podem ser elencadas para aplicação terapêutica, às classificadas como necrobiontófagas (Masiero, 2019).

As moscas mais frequentemente utilizadas no mundo são pertencentes a família Calliphoridae (Diptera) em especial *Lucilia sericata* (Meigen, 1826), *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830), *Phormia regina* (Meigen, 1826), *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794), *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775). (Marcondes, 2006; Masiero, 2019; Pinheiro *et al.*, 2015)

No Brasil, a terapia larval ainda é recente. Tem-se utilizado principalmente larvas de *Chrysomya megacephala* em humanos, para o tratamento de úlceras de pés diabéticos. Entretanto, *Cochliomyia macellaria* tem se demonstrado uma espécie muito promissora, para aplicação terapêutica no país, já que possui ampla distribuição geográfica e estudos em animais com bons resultados (Masiero, 2019; Pinheiro *et al.*, 2015).

O aumento do interesse pela TL, está associado a resistência dos microrganismos a vários antibióticos, mesmo os mais modernos, já que as larvas não são influenciadas por esta resistência. Elas destroem bactérias de forma bastante eficiente, além do mais, pode ser aplicada em feridas de várias etiologias, como as úlceras vasculogênicas, neuropáticas, sistêmicas, por pressão, lesões traumáticas, pós-cirúrgicas e queimaduras, infectadas ou não (Franco, 2010; Marcondes, 2006). Sendo contraindicado para feridas com leito seco, excessivamente exsudativas e hemorrágicas (Viana *et al.*, 2020).

Outra vantagem da TL citada na literatura é seu baixo custo. Um estudo revelou que tratamento feito com TL custa em média 300 euros por pacientes, enquanto outras formas de tratamento custam em média 2.200 euros por paciente (Dallavecchia; Proença; Coelho, 2011).

No Brasil, a técnica ainda é pouco conhecida e vem sendo alvo de estudos e experimentos em animais de pequeno porte, como ratos. O Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL), em Natal, RN, é pioneiro em testes da técnica em humanos desde 2013. A responsável técnica pela aplicação da TL é a enfermeira Julianny Barreto Ferraz, coordenadora da comissão de curativo do hospital, em parceria com Departamento de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte- UFRN, na pessoa da Dr^a Renata Antonaci (COFEN, 2015; Pinheiro, 2014).

A técnica inicialmente foi utilizada no tratamento de lesões crônicas de pacientes diabéticos e vem sendo aprimorada para atender mais diversidades de lesões com tecidos necrosados (Pinheiro, 2014). Em comparação com outras terapêuticas, pode ser observado melhor custo benefício, como exemplificado, na **tabela 2**.

Tabela 2 - Comparação entre a terapia larval e diferentes métodos de desbridamento utilizados no Hospital Universitário Onofre Lopes-HUOL

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

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

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

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

a- Tempo que leva para a realização da técnica

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

Fonte: Pinheiro, (2014).

Apesar de a TL apresentar grande eficácia em sua aplicabilidade, ainda é escassa a sua execução e aceitação nos serviços de saúde brasileiros, e um dos fatores impeditores de sua utilização é o desconhecimento dos profissionais de saúde e dos usuários dos serviços acerca da ecologia das moscas, além da cultura de que estes insetos estão associados diretamente à sujeira, matéria orgânica em decomposição e lixo contaminado, sendo considerados vetores de doenças, atribuindo insegurança e aversão a este tipo de tratamento (Franco *et al.*, 2016).

Para a realização da técnica de TL, alguns fatores são de fundamental importância e conhecimento: o tipo de curativo utilizado, a espécie, serem necrófagas (se alimentarem exclusivamente de tecido morto, evitando o risco de atacar tecidos vivos), entender o seu ciclo de vida para evitar o seu amadurecimento na ferida e que as mesmas sejam desinfetadas, dentre outros, fatores que possam garantir qualidade e segurança durante sua aplicação (Sherman, 2014).

Os mecanismos pelos quais as larvas promovem a cicatrização de feridas incluem em primeiro lugar seu movimento sobre o leito da ferida, secretando enzimas digestivas que elevam o pH e estimulam a produção de exsudato seroso, promovendo ativação de macrófago e induzindo a cicatrização com crescimento tecidual, ou seja, promoção da oxigenação do tecido e estimulação de fibroblastos e células endoteliais, com consequente formação de tecido de granulação (Sanchez *et al.*, 2004),

Em segundo lugar, vai haver escavações por meio dos seus ganchos bucais na superfície da ferida, possibilitando a ruptura das membranas tissular (escarificação), permitindo a penetração das suas secreções proteolíticas. Em terceiro lugar, haverá secreções de enzimas equivalentes à colagenase, que liquefaz o tecido necrótico facilitando sua alimentação,

consumindo todo o tecido necrosado inclusive as bactérias presentes, fazendo a desinfecção da ferida. E, por fim substâncias com propriedades antibactericidas serão excretadas, com ação semelhante aos antimicrobianos (Marcondes, 2006; Sherman *et al.*, 2006).

Além disso, estudos *in vitro* têm demonstrado o potencial antimicrobiano, antioxidante, antibiofilme e cicatrizante das excreções/secreções (ES) liberadas pelas larvas (Barnes *et al.*, 2010; Hassan *et al.*, 2016).

O tratamento de feridas com larvas é o único em que ocorre a liquefação e remoção do tecido necrótico com ingestão simultânea e destruição de micro-organismos, evidenciando aparente aumento da formação de tecido de granulação. Além disso, nenhum outro agente tópico proporciona um fornecimento contínuo de enzimas ativas desbridantes, enquanto apresenta potencial antimicrobiano (Churchy, 1999).

Em relação a aplicação das larvas nas feridas, primeiramente é necessário higienizar a ferida e lavar o leito com solução salina estéril 0,9% até a superfície amolecer. O curativo hidrocoloide deve ser cortado no tamanho do orifício da lesão, e tem a dupla finalidade de proteger a pele saudável do contato com as larvas e evitar qualquer tipo de lesão causada pelas enzimas proteolíticas em sua saliva, ao mesmo tempo em que serve de barreira para evitar que as larvas escapem (Echeverri *et al.*, 2010).

Em seguida, as larvas são inseridas no leito necrosado, o número recomendado são cinco larvas de 1mm por cm² de tecido, logo após, as larvas são cobertas por gaze estéril, em tamanho maior que a ferida e menor que o hidrocolóide, este tecido deve ser fixado ao hidrocolóide por uma fita adesiva, permitindo que as larvas respirem (Dallavecchia; Proença; Coelho, 2011).

2.4.1.1 Terapia larval e aspectos imunológicos

O sistema imune de um hospedeiro responde de forma diferente diante dos microrganismos. Com relação às larvas de moscas, após algumas aplicações, o corpo percebe a cobertura larval como corpo estranho, reagindo com resposta local (Calich; Vaz, 2009).

As larvas quando se movimentam no leito da lesão, favorecem a produção de exsudato seroso, e essa ação estimula a ativação de macrófagos, induzindo a cicatrização e secreção de fatores do crescimento (Marcondes, 2006).

Além disso, dentre os inúmeros benefícios das secreções larvais, está o potencial bactericida e bacteriostático, por exemplo contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (Masiero, 2017); controle de biofilme bacteriano, devido a presença das defensas (Masiero, 2019) ; modulação da resposta imune, pela inibição da liberação de peróxido de

hidrogênio pelos neutrófilos e de enzimas, como a elastase, responsáveis pela fase inflamatória persistente e pela demora na cicatrização e também, enzimas proteolíticas ainda não identificadas, capazes de recrutar células que estimulam a proliferação de fibroblastos e a produção de fibras de colágeno, como observado por Masiero *et al.* (2015).

Simmons (1935) registrou pela primeira vez, as potentes substâncias antimicrobianas encontradas nas secreções das larvas, que incluíam: alantoína, ureia, fenilacetaldéido, carbonato de cálcio e enzimas proteolíticas. Além disso, as excreções obtidas nas abluções de larvas não desinfetadas de *Lucilia sericata*, apresentaram importante atividade antimicrobiana contra bactérias piogênicas, que ao serem expostas às secreções, foram exterminadas entre cinco a dez minutos.

Cerovcky e Bém (2014) acrescentam que as moscas, em especial da família Calliphoridae, respondem às bactérias através da rápida produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) que possuem amplo espectro de atividade contra bactérias gram-positivas e fungos. Tais peptídeos, são considerados conservados evolutivamente do sistema imunológico inato do hospedeiro, formando primeira linha de defesa contra infecções.

Após décadas de estudos tentando isolar defensinas de excreções/ secreções (ES) e do corpo de larvas medicinais, Cerovcký e Bém (2014) conseguiram decifrar os compostos (defensinas) das dípteras *Lucilia sericata* e *Lucilia cuprinas* chamadas de *lucifensina* e *lucifensina II*. Esses compostos são dois peptídeos cíclicos quase idênticos de resíduos de 40 aminoácidos e três pontes dissulfeto intramoleculares pertencentes à família amplamente distribuída de defensinas de insetos. Tais compostos são os principais AMPs envolvidos no sistema de defesa das larvas de varejeiras e agem com o mesmo mecanismo de ação da defensina da *Sarcophaga peregrina* - a sapecina homóloga – essa defensina oligomeriza na parede bacteriana, formando canais nela, que culminam no extravasamento dos componentes citoplasmáticos e morte celular bacteriana. Conforme verificado na **figura 6**.

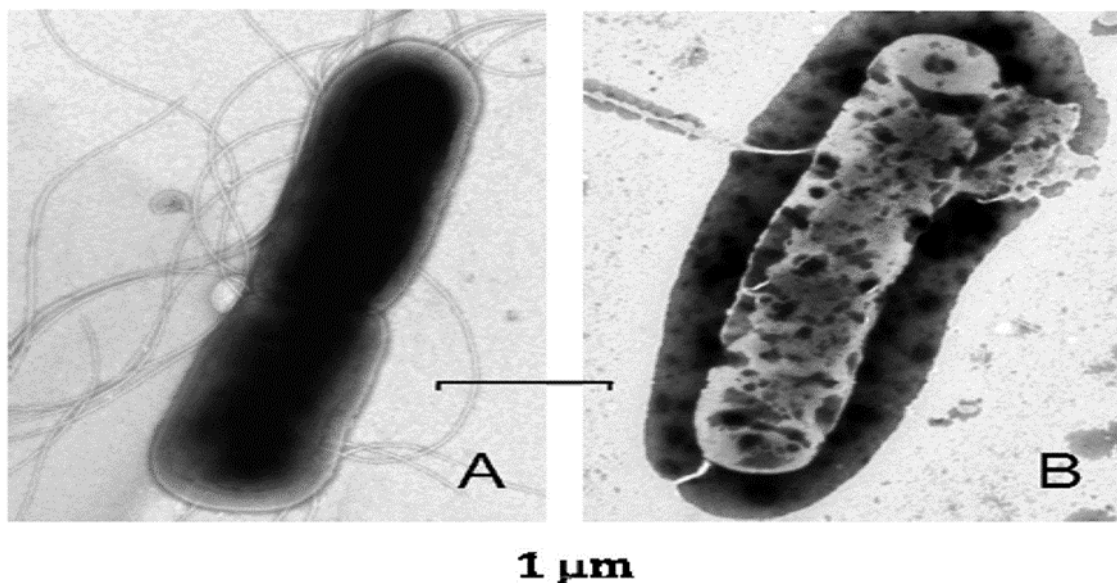


Figura 6 - Micrografias eletrônicas de *Bacillus subtilis* corado negativamente, não tratado (A) ou tratado com lucifensina por 60 min (B)
 Fonte: Cerovsky e Bém (2014)

Estudos revelaram que fatores antimicrobianos ($< 1\text{kDa}$) presentes nas secreções de larvas medicinais, mostraram-se ativas contra *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus* (Gram-positivas), incluindo aqueles *S. aureus* resistentes ou sensível à meticilina (Kerridge *et al.*, 2005). As bactérias que não são eliminadas com as secreções larvais, ao serem ingeridas, morrem no interior das larvas (Mumcuoglu *et al.*, 2001).

O uso da terapêutica larval também beneficia o organismo do hospedeiro por meio da modulação da resposta imune do paciente: atuando na função dos fagócitos humanos, para eliminação das bactérias, conforme estudo de Van Der Plas *et al.* (2009, p. 9-10):

As secreções de larvas inibiram de forma dependente da dose a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF-alfa, IL-12p40 e fator inibidor da migração de macrófagos por monócitos estimulados por lipopolissacarídeos e ácido lipoteicoico, enquanto aumenta a produção da citocina anti-inflamatória IL-10. A expressão dos receptores da superfície celular envolvidos no reconhecimento do patógeno não foi afetada pelas secreções. Além disso, as secreções de larvas alteraram o perfil de quimiocinas dos monócitos ao regular negativamente a proteína-1beta inflamatória de macrófagos e regular positivamente a proteína-1 quimioatraente de monócitos e IL-8. [...] As secreções de larvas não afetaram a fagocitose e a morte intracelular de *S. aureus* por monócitos humanos.

Van Der Plas *et al.* (2007) evidenciaram que os neutrófilos aumentam o dano ao tecido em vez de contribuir para a cura de feridas crônicas e que os efeitos benéficos das larvas, estão associados em parte, com a inibição de múltiplas respostas pró-inflamatórias de neutrófilos ativados por ES. As secreções agem a jusante da ativação da proteína quinase C mediada pela fosfolipase C. Em concordância, ES inibem as atividades funcionais dos neutrófilos ativados

por PMA; induzem um aumento na concentração intracelular de cAMP em neutrófilos e ativadores farmacológicos de mecanismos dependentes de cAMP imitam seus efeitos inibitórios em neutrófilos.

Tamura *et al.* (2017) observaram que ES das larvas de *L. sericata* inibem a ativação do sistema complemento, o que provoca diminuição de inflamação excessiva. Dentre as atividades anti-complemento da ES, destacaram-se: a degradação de múltiplas proteínas do complemento em todas as etapas das três vias de ativação do complemento, através das serinas proteases sensíveis ao calor presentes nas secreções. Salientaram ainda, que C3a e C5a – considerados os principais ativadores da inflamação, também foram degradados por ES e o pré-tratamento desses fatores com ES bloqueou completamente sua capacidade de induzir a ativação de neutrófilos humanos, mas sem afetar sua atividade antimicrobiana.

2.5 Califorídeos

Moscas-varejeiras da família Calliphoridae possuem importante papel no desenvolvimento de várias funções ecológicas. Dentre algumas funções que podem ser preocupantes na perspectiva da saúde pública, está o transporte mecânico para diversos patógenos. Isso ocorre, devido a afinidade que os adultos de califorídeos possuem com a matéria orgânica em decomposição. Como por exemplo, excremento humano ou animal, lixões, e carcaças de animais (Carneiro *et al.*, 2014). Além disso, também podem ser associadas à miíase em vertebrados, inclusive o homem (Azevedo *et al.*, 2015).

Entretanto, califorídeos apresentam funções benéficas para o meio em que vivem e para o homem. São importantes polinizadores de plantas com flores (Silva *et al.*, 2001) são frequentemente avaliados em estudos de entomologia forense, onde auxiliam na determinação do intervalo pós- morte (Vasconcellos *et al.*, 2015) constituindo o tipo mais comum de evidências de insetos coletadas durante uma investigação criminal (Catts; Haskell, 1990); ou são considerados para uso na terapia larval, que é caracterizada pela utilização de larvas desinfetadas de moscas para o tratamento de feridas de difícil cicatrização (Nitsche, 2010). As fêmeas de Calliphoridae usam substratos ricos em proteínas para oviposição, potencializando o pleno desenvolvimento dos estágios imaturos (Stevens, 2003).

A família possui distribuição mundial e está composta por espécies típicas de diferentes ambientes, sejam florestais, rurais ou urbanos (Otsuka, 2008).

A distribuição sazonal dos califorídeos é muito influenciada pela variação das condições climáticas (Ferreira; Lacerda, 1993), podendo cada espécie reagir de diferentes formas, não sendo apenas esses os fatores que atuam na dinâmica populacional de dípteros.

Hemilucilia

O gênero *Hemilucilia* inclui seis espécies endêmicas da América Central e da América Sul (Marinho; Madeira-Ott, 2024; Tyssen; Linhares, 2007). Dentre elas, *H. segmentaria* e *H. semidiaphana* são consideradas assinantrópicas, ou seja, evitam locais urbanos (Otsuka, 2008), sendo mais facilmente encontradas em áreas silvestres e em menor proporção em áreas rurais.

A baixa abundância populacional dessas duas espécies em ambientes urbanos e semiurbanos, por vezes, era associada diretamente com a presença de califorídeos exóticos, porém não significa que essas espécies tiveram suas populações reduzidas devido à competição com as espécies invasoras, pois já eram consideradas raras antes da chegada das espécies exóticas (Ferreira, 1978).

A *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius, 1805) tem registro em El Salvador, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Equador, Bolívia, Peru, Guiana, Brasil, Paraguai, Argentina (Dear, 1985), Chile e no México (Fraga, 2004). É caracterizada como necrófaga, pelo hábito das larvas alimentarem-se de matéria animal em decomposição (Thyssen; Linhares 2007); por isso tem se destacado em estudos feitos em muitas localidades em todo o Brasil. É registrada quase exclusivamente em áreas de floresta (Ferraz *et al.*, 2010; Souza; Zuben 2012) e quando em área urbana, ocorre principalmente em fragmentos de floresta (Figueiredo *et al.*, 2018).

Em área de floresta em Manaus-AM esteve entre as espécies mais abundantes em cadáveres (Fraga 2004; Rodrigues 2008); também foi registrada em área urbana (Barros-Souza; Ferreira-Keppler; Agra, 2012; Souza 2009) entre as menos abundantes. O primeiro registro do uso de *H. segmentaria* em investigação criminal para estimar o intervalo pós morte, ocorreu em Minas Gerais (Kosmann *et al.*, 2011) e o segundo relato foi no Amazonas, em Manaus, com base nos dados do desenvolvimento de imaturos e comportamento de colonização (Souza *et al.*, 2014).

A *Hemilucilia semidiaphana* (Rondani, 1850) também ocorre em região neotropical, desde o México até a Argentina (Baumgartner; Greenberg, 1985). É parecida com a espécie anterior, tanto em comportamento quanto em morfologia, apesar de ter menor porte. Já foi considerada sinônimo de *H. segmentaria* (James, 1970). Também é necrófaga, e em estudos de

entomologia forense sempre é registrada como a espécie colonizadora subsequente à *H. segmentaria* (Fraga, 2004).

Por serem necrófagas, as larvas de ambas as espécies têm potencial para serem usadas em Terapia Larval.

A figura em seguida, apresenta uma sùmula de ambas as espécies.

MOSCAS VAREJEIRAS

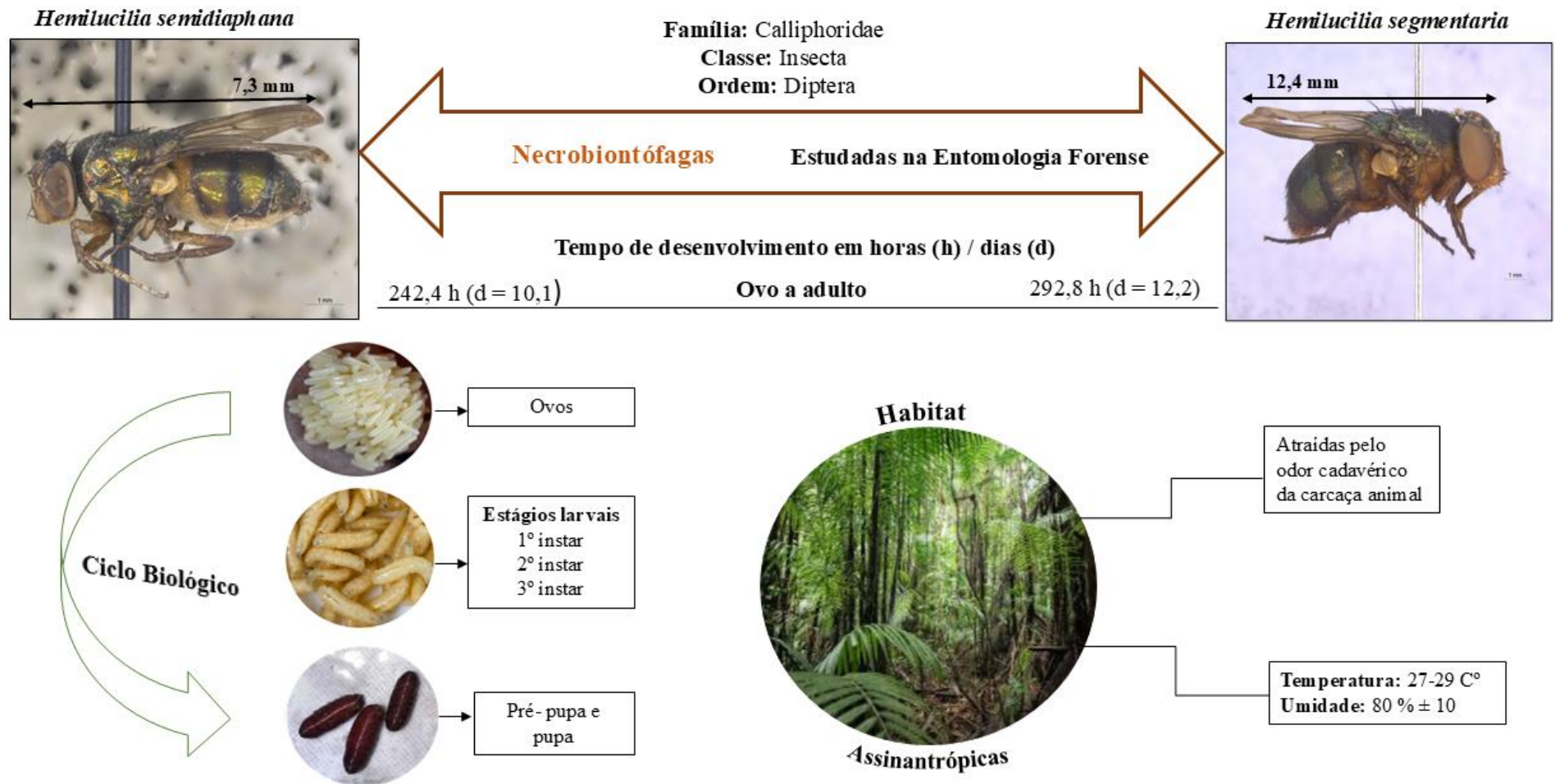


Figura 7 - Símula acerca das espécies objeto do estudo: *Hemilucilia segmentaria* e *Hemilucilia semidiaphana*.

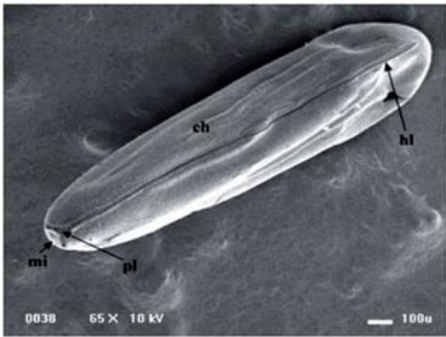
Fonte: Dados da pesquisa, (2025); Kosmann *et al.* (2011); Figueiredo *et al.* (2018).

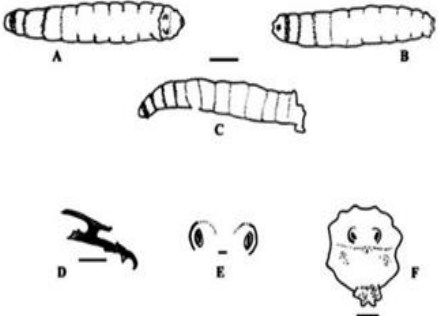
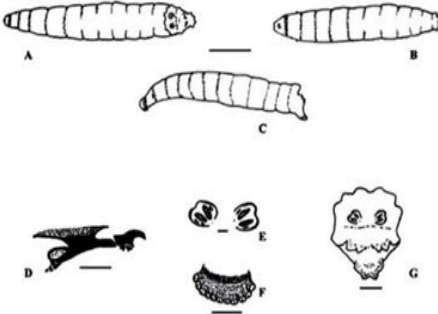
2.5.1 *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius, 1805)

2.5.1.1 Descrição de imaturos

Hemilucilia segmentaria é morfologicamente semelhante a *Hemilucilia semidiaphana* (Rondani, 1850) e foi classificada como uma espécie separada em levantamentos recentes de dípteros necrófagos, pois diferem em suas taxas de crescimento e maturação (Thyssen *et al.*, 2005).

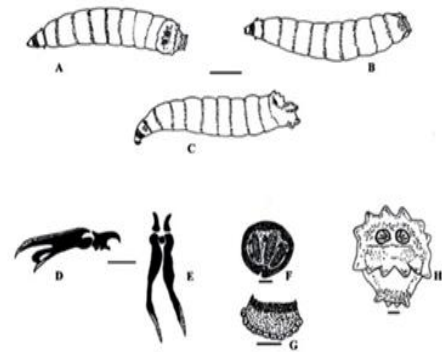
Quadro 2 - Fases: Ovo, ínstares larvais e pupário da *Hemilucilia segmentaria*

Fases de desenvolvimento	Descrição das características	Características
Ovo	Apresenta 1,51 de comprimento e 0,32 de largura, de coloração branco cremoso, alongado com as extremidades arredondadas, ligeiramente curvadas, com uma das pontas afiada. A superfície do córion é coberta por tênues reticulações hexagonais, parece bastante lisa, translúcida, permitindo a observação do embrião em seu interior. Na extremidade anterior há uma micrópila simples. O plastrão é estreito, estende-se por quase todo o comprimento do ovo e bifurca-se perto da micrópila em forma de Y, tendo o "Y" braços curtos. Superfície dorsal com linha de eclosão lisa e inchada percorrendo quase todo o comprimento do ovo.	 Micrografia eletrônica de varredura do ovo de <i>Hemilucilia segmentaria</i> onde: micrópila (mi), plastrão (pi), córion (ch) e linha de eclosão (hi). A escala é igual a 100 µm.

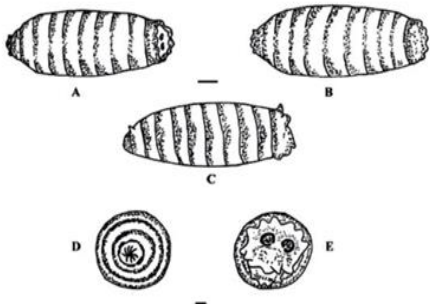
Primeiro instar	Apresenta comprimento de 3,12 e largura 0,58, cor branco cremoso. Corpo cilíndrico com a extremidade anterior afinando gradualmente até uma cabeça delgada e pontiaguda, e a extremidade posterior arredondada. O corpo é composto por 12 segmentos. Um sulco longitudinal ventral separa o segmento da cabeça em dois lobos cefálicos, com a abertura da boca na base do sulco. Ventralmente, no segmento posterior, está a placa anal coberta por muitos espinhos. Espiráculo anterior ausente. Dentro da cabeça da larva e estendendo-se até o tórax está um esqueleto cefafaríngeo quitinoso.	 Primeiro ínstar de <i>Hemilucilia segmentaria</i>. (A) vista dorsal; (B) vista ventral; (C) vista lateral; (D) esqueleto cefafaríngeo; (E) espiráculos posteriores mostrando peritreme incompleto e uma fenda reta; e (F) segmento posterior evidenciando protuberância anal. A escala é igual a 0,5 mm (AC), 0,1 mm (DE) e 0,25 mm (F).
Segundo ínstar	Apresenta comprimento de 9,23 e largura de 1,61, cor branco cremoso. No corpo, as faixas da coluna são mais esclerotizadas que as do primeiro instar. O último segmento do corpo larval apresenta 6 pares de tubérculos, mais definidos que os do ínstar anterior. A placa anal é fortemente desenvolvida. Esqueleto cefalofaríngeo ligeiramente maior e mais esclerotizado. A esclerita dentária acessória é mais evidente neste ínstar.	 Segundo ínstar de <i>Hemilucilia segmentaria</i>. (A) vista dorsal; (B) vista ventral; (C) vista lateral; (D) esqueleto cefafaríngeo; (E) espiráculos posteriores mostrando peritreme incompleto e duas fendas retas; (F) espiráculo anterior; e (G) segmento posterior mostrando protuberância anal e distribuição de tubérculos. A escala é igual a 2 mm (AC), 0,1 mm (DF) e 0,5 mm (G).

Terceiro ínstar

Apresenta comprimento de 14,86 e largura 3,05. Branco cremoso a rosado. As faixas da coluna são mais esclerotizadas que as do segundo ínstar. Os seis pares de tubérculos estão bem desenvolvidos e distribuídos. A placa anal é completamente desenvolvida e coberta por espinhos marrons fortemente esclerotizados. Espiráculos posteriores com três fendas retas dispostas aproximadamente paralelas entre si, inclinadas para baixo e para dentro em cerca de 45° em relação ao eixo vertical, com peritreme incompleto. Esqueleto cefalofaríngeo semelhante ao segundo ínstar, maior e mais esclerotizado; gancho bucal e esclerito dentário acessório mais curvo e conspicuo.



Terceiro ínstar de *Hemilucilia segmentaria*. (A) vista dorsal; (B) vista ventral; (C) vista lateral; (D) vista lateral do esqueleto cefafaríngeo; (E) vista dorsal do esqueleto cefafaríngeo; (F) espiráculos posteriores mostrando peritreme incompleto e três fendas retas; (G) espiráculo anterior; e (H) segmento posterior mostrando protuberância anal e distribuição de tubérculos. A escala é igual a 3 mm (AC), 0,1 mm (DG) e 0,5 mm (H).

Pupário	Apresenta comprimento de 9,87 e largura de 3,60, de coloração marrom a preto. Em forma de barril, fortemente esclerotizado, formado pelo endurecimento da cutícula larval do terceiro ínstar. Região anterior ligeiramente mais estreita que a região posterior. Espiráculos anteriores localizados apicalmente. Faixas de espinhos semelhantes às do ínstar anterior, com as fileiras de espinhos mais próximas e dobradas para dentro. Os cornos respiratórios pupais estão presentes no segmento VIII. Espiráculos posteriores semelhantes aos do ínstar anterior, porém mais próximos e mais esclerotizados.	 Pupário de <i>Hemilucilia segmentaria</i>. (A) vista dorsal; (B) vista ventral; (C) vista lateral; (D) segmento anterior evidenciando espiráculos anteriores; e (E) segmento posterior mostrando protuberância anal, distribuição de tubérculos e espiráculos posteriores. A escala é igual a 0,5 mm (AC) e 1 mm (DE).
-----------------------	---	--

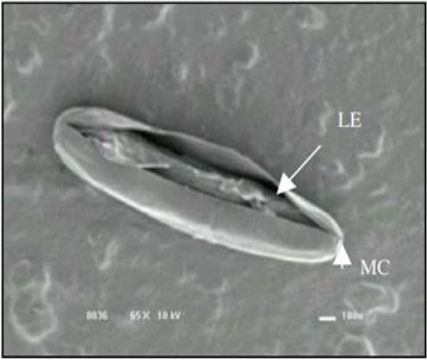
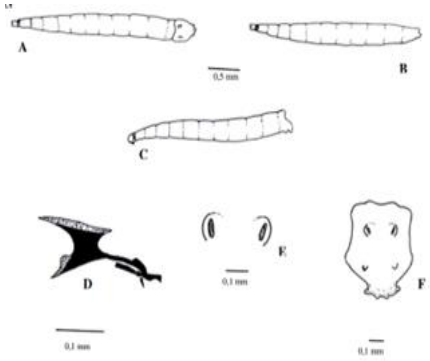
Fonte: Thyssen *et al.* (2005).

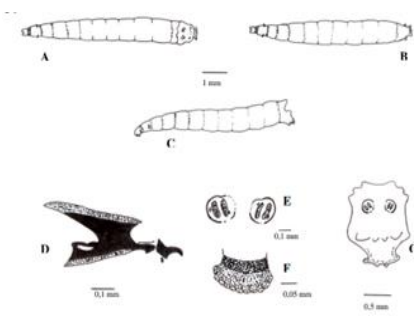
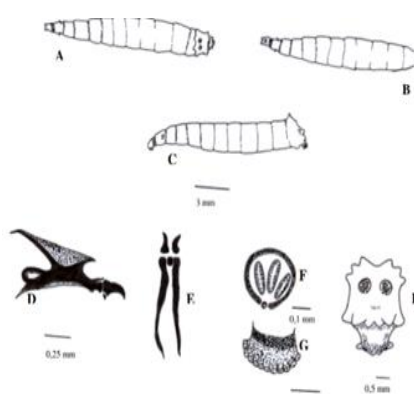
2.5.2 *Hemilucilia semidiaphana* (Rondani,1850)

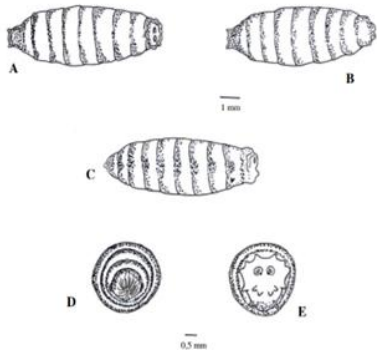
2.5.2.1 Descrição de imaturos

Quadro 3 - Fases: Ovo, estádios larvais e pupário da *Hemilucilia semidiaphana*

Fases de desenvolvimento	Descrição das características	Características
--------------------------	-------------------------------	-----------------

Ovo	Comprimento médio de 1,21 mm e largura média de 0,26 mm. Apresenta coloração branco-leitoso, alongado de forma cilíndrica, com a superfície ventral ligeiramente convexa. Metade anterior um pouco mais estreita que a metade posterior. Cório recoberto por um retículo fino, superficial e translúcido, permitindo visualizar o embrião no seu interior. Micrópila simples, situada na porção apical anterior. Superfície dorsal com uma linha de eclosão caracterizada por uma disjunção do cório que se inicia na região da micrópila e se estende até o terço posterior.	 Ovo mostrando em detalhe a micrópila (MC) e a linha de eclosão (LE) por MEV.
Larva de primeiro estágio	Exibe um comprimento médio de 2,59 mm e largura média de 0,46 mm. Tem coloração branco-leitoso, é cilíndrica, com a região anterior mais afilada que a posterior. O corpo compreende 12 segmentos sendo 1 formado pela cabeça, 3 torácicos e 8 abdominais. A cabeça é pouco desenvolvida e dividida por um sulco longitudinal em 2 lobos cefálicos pouco pronunciados. O esqueleto cefalofaríngeo é de tamanho reduzido e formado por poucos escleritos; Ganchos orais pares, reduzidos a pequeno esclerito em forma de gancho, não articulados com os demais escleritos.	 Desenho esquemático da larva de 1º estágio mostrando em (A) vista dorsal, em (B) vista ventral, em (C) vista lateral, em (D) o esqueleto cefalofaríngeo, em (E) os espiráculos posteriores e em (F) a região posterior.

Larva de segundo estágio	Apresenta um comprimento médio de 7,2 mm e largura média de 1,2 mm, de coloração branco-leitoso. A cabeça apresenta um sulco longitudinal mais proeminente do que na larva de primeiro estágio, realçando um pouco mais os lobos cefálicos. Esqueleto céfalofaríngeo semelhante ao de primeiro estágio, estando este um pouco mais esclerotizado e de tamanho maior com os escleritos mais evidentes. Ganchos orais mais desenvolvidos e recurvados. Esclerito intermediário em forma de “H” mais alongado. Bandas de espinhos mais esclerotizados que nas larvas de primeiro estágio, completas até o quinto segmento e também no 11º segmento, e nos demais segmentos ainda permanecem incompletas com fileiras irregulares e algumas com espinhos sem coloração.	 Desenho esquemático da larva de 2º estágio mostrando em (A) vista dorsal, em (B) vista ventral, em (C) vista lateral, em (D) o esqueleto céfalofaríngeo, em (E) os espiráculos posteriores, em (F) o espiráculo anterior e em (G) a região posterior.
Larva de terceiro estágio	Comprimento médio: 14,69±0,1 mm Largura média: 2,3±0,02 mm Coloração: branco-leitoso Descrição: A cabeça apresenta lobos cefálicos mais pronunciados devido ao sulco longitudinal ser mais profundo. Espiráculos anteriores com a mesma forma do estágio anterior, porém com projeções digitiformes maiores e sulcos espiraculares mais esclerotizados. Esqueleto céfalofaríngeo fortemente esclerotizado com os ganchos orais recurvados anteriormente e com base alargada, saindo do canal alimentar mais pronunciado do que no estágio anterior.	 Desenho esquemático da larva de 3º estágio mostrando em (A) vista dorsal, em (B) vista ventral, em (C) vista lateral, em (D) vista lateral do esqueleto céfalofaríngeo, em (E) vista dorsal do esqueleto céfalofaríngeo, em (F) o espiráculo posterior, em (G) o espiráculo anterior e em (H) a região posterior.

Pupário	Exibe comprimento médio de 8,2 mm e largura média de 2,71mm, coloração marrom escuro, em forma de barril, formado pela cutícula da larva de terceiro estágio, totalmente esclerotizada, com diminuição de comprimento em relação ao estágio anterior. A retração dos segmentos do corpo é evidenciada nas dobras laterais do corpo. Região anterior mais afilada que a posterior e com os espiráculos anteriores dispostos apicalmente. Bandas de espinhos com a mesma disposição do estágio anterior sendo que as fileiras de espinhos estão mais aproximadas entre si. Espiráculos posteriores semelhantes aos do estágio anterior, porém mais aproximados entre si e mais esclerotizados, com presença de botão.	 Desenho esquemático do pupário mostrando em (A) vista dorsal, em (B) vista ventral, em (C) vista lateral, em (D) região anterior e em (E) a região posterior.
-----------------------	--	---

Fonte: Thyssen *et al.* (2005).

Ao comparar as espécies o mesmo autor apresenta as diferenças entre as larvas de 3º instar. Os espiráculos posteriores e a placa anal de *H. segmentaria* neste estudo fornecem mais evidências da separação das duas espécies. O peritreme do espiráculo posterior de *H. segmentaria* é muito mais esclerotizado, enquanto o de *H. semidiaphana* é moderadamente esclerotizado com peritreme delicado e um botão mais distinto. No entanto, a placa anal é mais estendida em *H. semidiaphana* do que em *H. segmentaria*, conforme **figura 8** a seguir:

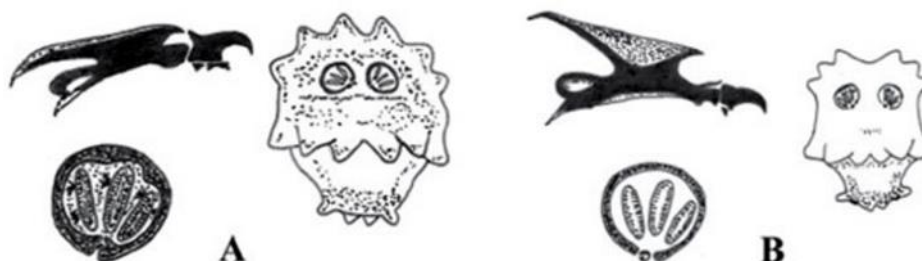


Figura 8 - Diferenças entre larvas de terceiro instar de *Hemilucilia segmentaria* (A) e *Hemilucilia semidiaphana* (B)

Fonte: Thyssen *et al.* (2005)

2.5.3 Descrição dos adultos de *H. segmentaria* e *H. semidiaphana*

Descrição morfológica: *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius, 1805)

Comprimento médio de 12,4 mm e largura do tórax (mesotórax) de 3,4 mm. Cabeça com olhos marrom, fronte reta em vista lateral marrom, corpo marrom, tórax e abdômen verde escuro dorsalmente, abdômen na porção ventral ao longo da linha mediana com coloração marrom e amarelo no último segmento, escutelo verde mais claro, caliptra e espiráculos anterior e posterior marrom amarelado, fileira de cerdas fortes nas margens externas do pronoto, mesonoto, metanoto e escutelo, mais longas e fortes no metanoto e escutelo, mancha marrom escura ao longo da metade final da veia R2+3, mais clara na metade final da R4+5 e ao longo da margem da asa desde R4+5 até CuA1. As manchas das veias ao longo das veias R2+3 e R4+5 não se conectam.

Descrição morfológica: *Hemilucilia semidiaphana* (Rondani, 1850)

Comprimento médio de 7,3 mm e largura do tórax (mesotórax) de 3,2 mm. Cabeça com olhos marrom, fronte reta em vista lateral marrom, corpo marrom amarelado, tórax e abdômen verde amarelado metálico dorsalmente, abdômen na porção ventral ao longo da linha mediana com coloração creme, escutelo verde amarelado metálico, caliptra e espiráculos anterior e posterior amarelados, fileira de cerdas fortes nas margens externas do pronoto, mesonoto, metanoto e escutelo, mais longas e fortes no metanoto e escutelo, mancha marrom escura ao longo da metade final da veia R2+3, mais clara na metade final da R4+5 e ao longo da margem da asa desde R4+5 até CuA1. As manchas das veias ao longo das veias R2+3 e R4+5 se conectam.

Diferenciação das espécies

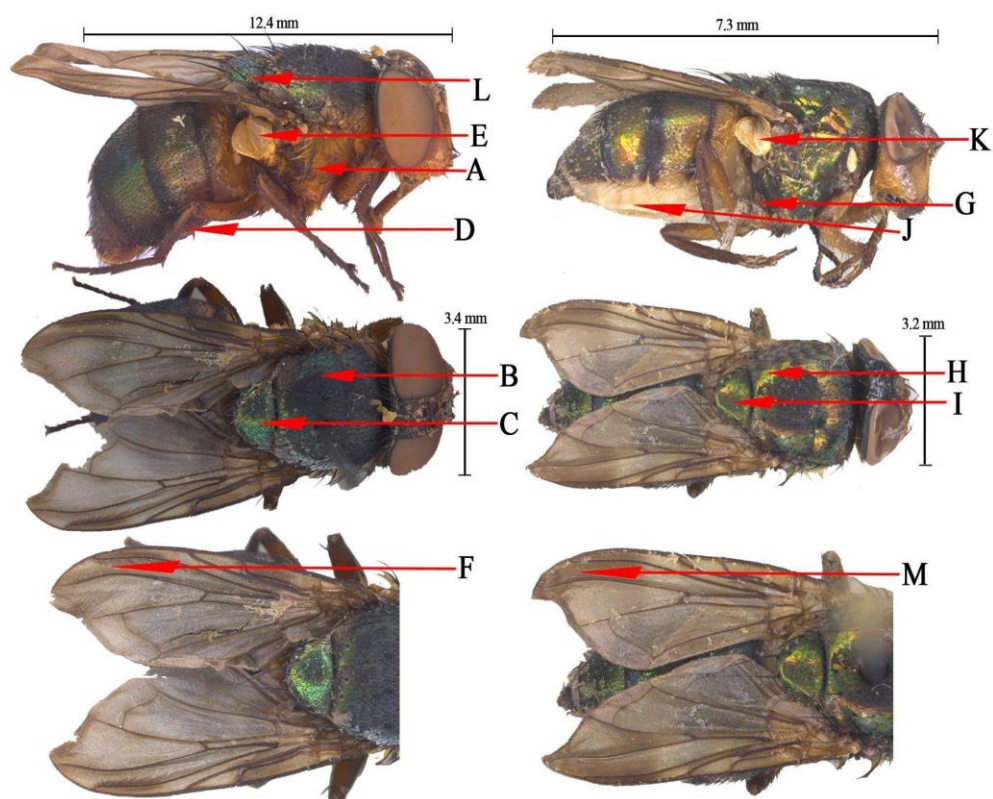


Figura 9 - Diferenciação das espécies *H. segmentaria* (à direita) e *H. semidiaphana* (à esquerda)

H. segmentaria é maior, mais escura, possui mais cerdas e possui mais manchas nas asas que *H. semidiaphana*. *H. segmentaria* é maior que *H. semidiaphana*, tanto em comprimento quanto em largura; tem corpo marrom (Fig.A), tórax e abdômen verde escuro não metálico (Fig.B), escutelo verde escuro (Fig.C), ventre do abdômen marrom (Fig.D), calpita e espiráculos marrom amarelado (Fig.E) enquanto *H. semidiaphana* tem corpo marrom amarelado (Fig.G), tórax e abdômen verde amarelado metálico (Fig.H), escutelo verde amarelado metálico (Fig.I), ventre do abdômen creme (Fig.J), calpita e espiráculos amarelados (Fig.K), ou seja, é mais escuro que *H. semidiaphana*; tem fileira de cerdas mais numerosas e mais fortes (Fig.L) que *H. semidiaphana*; as manchas das veias ao longo das veias R2+3 e R4+5 se conectam (Fig.F) enquanto em *H. semidiaphana* não se conectam (Fig.M).

Fonte: Dados da pesquisa – acervo pessoal (2024).

3. JUSTIFICATIVA

O presente estudo foi idealizado no decorrer da experiência profissional como Estomaterapeuta atuante na Comissão de Curativos do HPS Dr Aristóteles Platão Bezerra de Araújo, Manaus-AM. A unidade hospitalar é referência na oferta de cuidados da Atenção Terciária à Saúde ao paciente com pé diabético complexo. Na oportunidade, foi possível identificar as limitações dos tratamentos convencionais utilizados em pacientes com lesões diabéticas.

O crescimento de desfechos desfavoráveis durante o tratamento, como amputações de dedos e membros, a dificuldade em adquirir curativos pelas condições financeiras precárias, atrelado ao conhecimento prévio do potencial da terapia larval para desbridamento de tecidos necrosados e controle de biofilme bacteriano da lesão, foram as principais motivações para estudar espécies de moscas necrófagas abundantes em região amazônica que pudessem ser utilizadas como opção terapêutica diante de um mal prognóstico.

Até o presente momento, não foram realizados estudos sobre a Terapia Larval no Amazonas, e ao propor a implantação da técnica utilizando espécies de moscas necrófagas na Amazônia, torna-se relevante para o desenvolvimento científico e tecnológico do Estado. Considerando que as espécies de moscas são adaptadas às condições de umidade e temperatura características ao longo do ano, facilita o seu uso nos experimentos. Sousa, Esposito e Carvalho Filho (2010) fortalecem este argumento ao relatarem que a diversidade de espécies de dípteros califorídeos encontradas na região amazônica nos diversos ambientes (clareiras pouco, semi ou bem recuperadas e floresta preservada) são abundantes e a obtenção dessas espécies saprófagas é relativamente simples, o que viabiliza um estudo na região amazônica.

Uma vez, que instituída a colônia de moscas e assegurada sua manutenção em condições de laboratório, será aplicado primeiramente em modelo animal e posteriormente estudos em humanos poderão ser realizados, validando o tratamento de pacientes com pés diabéticos ou lesões afins, internados em Hospitais do Estado do Amazonas ou acompanhados em ambulatórios de feridas.

Só no município de Manaus-AM, mais de 170 mil pacientes já fizeram acompanhamento e tratamento de pés diabéticos no Programa ambulatorial “Pé Diabético”, disponibilizado desde 2014, na Rede Estadual de Saúde da Capital (AGÊNCIA CENARIUM, 2023).

Os pés diabéticos, são responsáveis por mais de 80% das feridas em membros inferiores, constituem um dos principais tipos de lesões crônicas. A taxa de amputação em pés diabéticos

são 17 a 40 vezes maior do que em pacientes não portadores da doença (Castro et al., 2009). Estudos revelam que após amputação, 50% dos indivíduos apresentam tempo médio de sobrevivência de três anos (Brasil, 2005).

Dentre as características que afetam ou retardam o processo de cicatrização em lesões diabéticas, está: o biofilme, alta exsudação, presença de tecidos necróticos e a existência de bactérias resistentes a antibióticos, ocasionando maior número de casos de amputação (Pinheiro, 2014).

Nessa perspectiva, avaliar terapias alternativas simples e eficazes, de fácil aplicação e de baixo custo, como a larvoterapia é necessária. Este tratamento é uma estratégia terapêutica bem documentada, destinada a solucionar problemas clínicos associados com certas alterações moleculares e celulares, que impedem ou retardam a cicatrização das feridas (Sanchez et al., 2004).

Estudos *in vitro* demonstraram o potencial antimicrobiano, antioxidante, antibiofilme e cicatrizante das excreções/secreções (ES) liberadas pelas larvas (Barnes et al., 2010; Hassan et al., 2016).

O tratamento de feridas com larvas é o único em que ocorre a liquefação e remoção do tecido necrótico com ingestão simultânea e destruição de micro-organismos, evidenciando aparente aumento da formação de tecido de granulação. Nenhum outro agente tópico proporciona um fornecimento contínuo de enzimas ativas desbridantes, enquanto apresenta potencial antimicrobiano (Churchy, 1999).

Além disso, um estudo realizado no HUOL-RN, ao comparar os custos do tratamento de uma lesão com aproximadamente 6,0 x 5,0cm, considerando também o período que o paciente permanece com a cobertura, evidenciou que a TL comparada a Kollagenase® e Hidrogel, mostrou ter o melhor custo benefício (Pinheiro, 2014).

Comprovadamente, o potencial da larvoterapia para remoção de tecido necrótico é um fato, ela ainda é mencionada por trazer benefícios ao organismo do hospedeiro, como: estimulação da angiogênese (Tellez et al., 2012); modulação da resposta imune: atuando na função dos fagócitos humanos (Van Der Plas et al., 2009); manutenção da atividade antimicrobiana, mesmo com a inibição do processo inflamatório (Van Der Plas et al., 2007); inibição da ativação do sistema complemento (Tamura et al., 2017); controle e quebra de biofilme bacteriano (Jiang et al., 2012), liberação de substâncias com potencial antimicrobiano, controle eficaz do exsudato e resolução dos processos celulares e bioquímicos que encontram alterados; excreção de enzimas digestivas no leito da lesão, que favorecem a elevação do pH;

estimulação de fibroblastos, células endoteliais e de oxigenação do tecido, como consequência da formação de tecido de granulação (Sanchez *et al.*, 2004), favorecendo, assim, a regeneração das lesões.

Nesse ínterim, este projeto de pesquisa justifica-se, por propor a avaliação de novas espécies de dípteras calliphoridae para fins terapêuticos, trazendo uma nova perspectiva para tratamento de lesões cutâneas de difícil cicatrização.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral:

- Avaliar se as moscas *Hemilucilia segmentaria* e *Hemilucilia semidiaphana* (Diptera:Calliphoridae) possuem potencial larvoterápico através do reparo tecidual de lesões cutâneas de ratos diabéticos.

4.2 Objetivos Específicos:

Capítulo 1: Terapia larval: Implicações imunológicas na interação parasito-hospedeiro.

- Descrever os efeitos imunomoduladores de larvas e suas excretas no hospedeiro;
- Apresentar a ação antimicrobiana e antibiofilme da terapia larval em lesões cutâneas;
- Discorrer acerca do mecanismo de desbridamento e promoção da cicatrização tecidual.

Capítulo 2: Método de criação laboratorial das moscas *H. segmentaria* (Fabricius, 1805) e *H. semidiaphana* (Rondani,1850) para fins terapêuticos.

- Estabelecer protocolo para criação e reprodução das espécies em condições de laboratório;
- Determinar o período de desenvolvimento dos estágios imaturos (ovo, larva e pupa) e adulto em condições de laboratório;
- Eleger método de desinfecção viável para os ovos das moscas, considerando agente desinfetante com maior taxa de eclosão dos ovos e viabilidade das larvas para uso em Terapia Larval.

Capítulo 3: Avaliação Pré-Clínica do Potencial Larvoterápico de Espécies de Calliphoridae no reparo tecidual de lesões diabéticas.

- Avaliar os aspectos lesionais (tecido presente no leito, bordos, exsudação, sinais flogísticos, sangramento, odor e crostas) diariamente durante o experimento;
- Mensurar o tamanho e o grau de contração das lesões cutâneas no (3º, 7º e 14º dia após as intervenções);
- Avaliar a atividade desbridante das larvas de *H. segmentaria* e *H. semidiaphana* no tratamento de lesões cutâneas de ratos diabéticos;

- Analisar a evolução da cicatrização através da quantificação dos achados histológicos: células polimorfonucleares, células mononucleares, proliferação vascular, proliferação fibroblástica, colagenização e reepitelização, no 3º, 7º e 14º dia após as intervenções;
- Quantificar a presença de mastócitos durante as diferentes fases do processo de cicatrização, com o intuito de compreender sua participação na modulação da resposta inflamatória e na formação do tecido cicatricial;

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa experimental envolve tratamentos para feridas crônicas e foi desenvolvido nos seguintes locais:

- Biotério Central do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, coordenado pelo Me. Leonardo Brandão Matos;
- Laboratório de Histologia Funcional, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas – UFAM, coordenado pelo Dr. José Fernando Marques Barcellos;
- Laboratório multidisciplinar de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas– UFAM, coordenado pela Dra. Maria do Carmo Queiroz Fialho.
- Laboratório de Entomologia Sistemática e Urbana Forense- LESUF, Instituto Nacional de Pesquisa no Amazonas –INPA, coordenado pelo Dr. José Albertino Rafael e sob a colaboração do Dr. Marcelo Cutrim Moreira de Castro.
- Reserva Florestal Adolpho Ducke (AM 010- KM 26, Manaus), Instituto Nacional de Pesquisa no Amazonas –INPA, sob a colaboração do Dr. José Albertino Rafael.

Esta tese foi dividida por capítulos, conforme detalhado abaixo:

Capítulo 1- Intitulado “Terapia Larval: Implicações imunológicas na interação parasito-hospedeiro”, trata-se de uma Revisão Integrativa da Literatura-RIL que abordou os efeitos imunomoduladores de larvas e suas excretas no hospedeiro; a ação antimicrobiana e antibiofilme da terapia larval e os mecanismos de desbridamento e promoção da cicatrização tecidual. Todo o percurso metodológico foi abordado no próprio capítulo.

Capítulo 2- Destinada a avaliação do potencial terapêutico das larvas de *Hemilucilia segmentaria* e *Hemilucilia semidiaphana* (Calliphoridae) para tratamento de lesões cutâneas, a partir do conhecimento acerca do método de criação das espécies em condições de laboratório, bem como, a determinação do processo de esterilização dos ovos, para viabilizar o uso em Terapia Larval.

Capítulo 3- Destinada a avaliação da atividade desbridante e cicatricial do uso de larvas no tratamento de lesões cutâneas em modelo animal diabético, em comparação aos tratamentos convencionais, mediante análise macroscópica e histológica das lesões.

Conforme fluxograma apresentado na **figura 11**.

A seguir, serão descritos de forma parcial/complementar os procedimentos metodológicos referentes aos capítulos 2 e 3 do estudo, tendo em vista que estes não foram contemplados na seção de métodos dos próprios capítulos. Cabe destacar que o capítulo 3, que se trata de um Ensaio Pré- Clínico Randomizado, foi desenvolvido de acordo com as Diretrizes Arrive (*Animal Research: Reporting of in Vivo Experiments*).

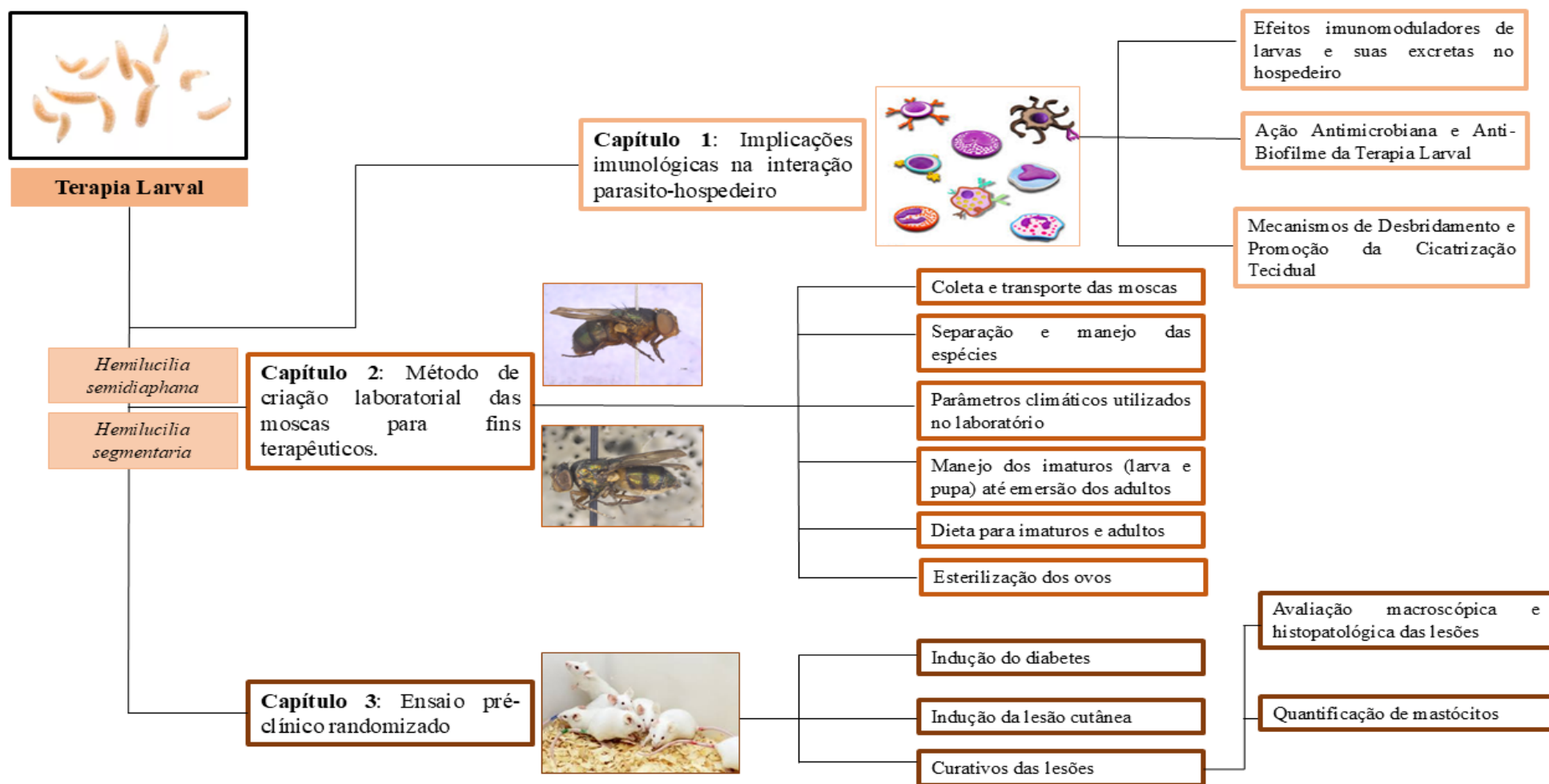


Figura 10 - Fluxograma das etapas metodológicas desenvolvidas em cada capítulo.

Fonte: Dados da Pesquisa, 2025

5.1 MATERIAL E MÉTODOS (CAPÍTULO 2)

5.1.1 Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo exploratório descritivo de campo e de laboratório.

As pesquisas exploratórias têm como propósito proporcionar maior familiaridade com o problema, com vistas a torná-lo mais explícito ou a construir hipóteses. Seu planejamento tende a ser bastante flexível, pois interessa considerar os mais variados aspectos relativos ao fato ou fenômeno estudado (Gil, 2017, p.32).

As pesquisas descritivas têm como objetivo a descrição das características de determinada população ou fenômeno. Podem ser elaboradas também com a finalidade de identificar possíveis relações entre variáveis. São em grande número as pesquisas que podem ser classificadas como descritivas e a maioria das que são realizadas com objetivos profissionais provavelmente se enquadram nesta categoria (Gil, 2017, p.32).

A Pesquisa de Campo é descrita como aquela realizada no local onde ocorre ou ocorreu o fenômeno estudado. Já a Pesquisa Laboratorial, permite a investigação em local fechado e tem como característica a participação ativa do pesquisador na condução das variáveis a serem estudadas, controlando o desfecho da pesquisa, além de evitar equívocos, favorecendo maior confiabilidade dos dados (Fontenelle, 2009).

5.1.2 População, local e período do estudo

As espécies de califorídeos *Hemilucilia segmentaria* e *Hemilucilia semidiaphana* foram eleitas para o estudo.

A coleta dos adultos, de ambas as espécies, foi realizada na Reserva Florestal Adolpho Ducke, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), localizada na Rodovia AM-010, Km-26, a leste da Cidade de Manaus- AM.

Considerando as características das espécies estudadas e o período de adaptação dos métodos para se obter êxito, o estudo iniciou em abril de 2021 e terminou em dezembro de 2024.

5.1.3 Cálculo da amostra

Não foi realizado cálculo amostral nesta etapa do estudo. Após a identificação de várias espécies de califorídeos candidatas ao uso para TL, utilizou-se a conveniência, considerando o volume de informações que deveriam ser levantadas para subsidiar essa etapa, assim como, o critério de originalidade e priorização de espécies abundantes na região amazônica, foram então

eleitas apenas duas espécies para o estudo: *Hemilucilia segmentaria* e *Hemilucilia semidiaphana*.

5.1.4 Aspectos éticos

O estudo atendeu a Lei Federal 11.794, de 8 de outubro de 2008, e as demais normas aplicáveis à utilização de animais para o ensino e pesquisa, especialmente as resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Foi analisado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais- (CEUA) do Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas- (INPA), e aprovado sob o Parecer 001/2021 -SEI 01280.000034/2021-09.

5.1.5 Critérios de Inclusão, Não inclusão e Exclusão

5.1.5.1 Critérios de Inclusão

- Espécies de dípteros da família Calliphoridae;
- Espécies da região amazônica ou abundantes na região amazônica;
- Espécies sarcosaprófagas e ou necrófagas;
- Espécies cosmopolitas e ou assinantrópicas.

5.1.5.2 Critérios de Não Inclusão

- Espécies de dípteros que não fossem da família Calliphoridae;
- Espécies de dípteros Calliphoridae com registro de miíase primária na literatura;
- Espécies de dípteros Calliphoridae que não possuem registro na região amazônica.

5.1.5.3 Critérios de Exclusão

- Espécies de dípteros Calliphoridae que possuem registro na literatura, do uso comprovado para TL.

5.1.6 Métodos aplicados

5.1.6.1 Processo de desinfecção dos ovos para viabilizar a Terapia Larval

O método de desinfecção dos ovos das espécies *H. segmentaria* e *H. semidiaphana* foi adaptado do estudo de Pércio *et al.* (2017), no qual testou métodos compatíveis para a espécie *Chrysomya megacephala*. Entre as soluções esterilizantes avaliadas, estavam hipoclorito de sódio a 1% (NaClO) e formaldeído a 5%.

Para início dos testes, sob uma capela de fluxo laminar, as posturas de ovos foram extraídas do substrato (carne moída) utilizando uma haste de plástico usada para inoculação. O

manejo com a haste permitiu que a massa de ovos fosse removida por completo. Os ovos foram colocados sobre um (voil) estéril e com auxílio de luvas e pinças foi formada uma pequena trouxa. As trouxas foram utilizadas para imergir a massa de ovos na solução e minimizar a dispersão durante o processo.

Foram considerados três grupos experimentais de 50 ovos de cada espécie e 3 beckers com soluções para imersão dos ovos. Os grupos foram:

Grupo Controle AD- Ovos imersos em água destilada estéril por 3(três) minutos, seguido de mais duas lavagens em água destilada estéril por 2 (dois) minutos em cada recipiente.

Grupo (NaClO) 1%- Ovos imersos em hipoclorito de sódio a 1% por 3(três) minutos, seguido de duas lavagens em água destilada por 2 (dois) minutos em cada recipiente.

Grupo Formaldeído 5%- Ovos imersos em formaldeído a 5% por 3(três) minutos, seguido de duas lavagens em água destilada por 2 (dois) minutos em cada recipiente.

Para cada teste proposto foram preparadas três réplicas. Buscando confirmar a esterilização dos ovos e viabilidade das larvas, uma alíquota de 100µL foram retiradas da última “solução de enxágue” oriundas de cada grupo e com auxílio de swab, as amostras foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultivo seletivos de uso exclusivo para crescimento de microorganismos, como: *Brain Heart Infusion Agar* (BHI), *Sabouraud dextrose agar* (SDA) e *Ágar Nutriente* (AN) (**figura 11**). As placas foram avaliadas a cada 24 horas por um período de 7 dias com temperatura de 37°C, em uma estufa BOD (*Biochemical Oxygen Demand*).

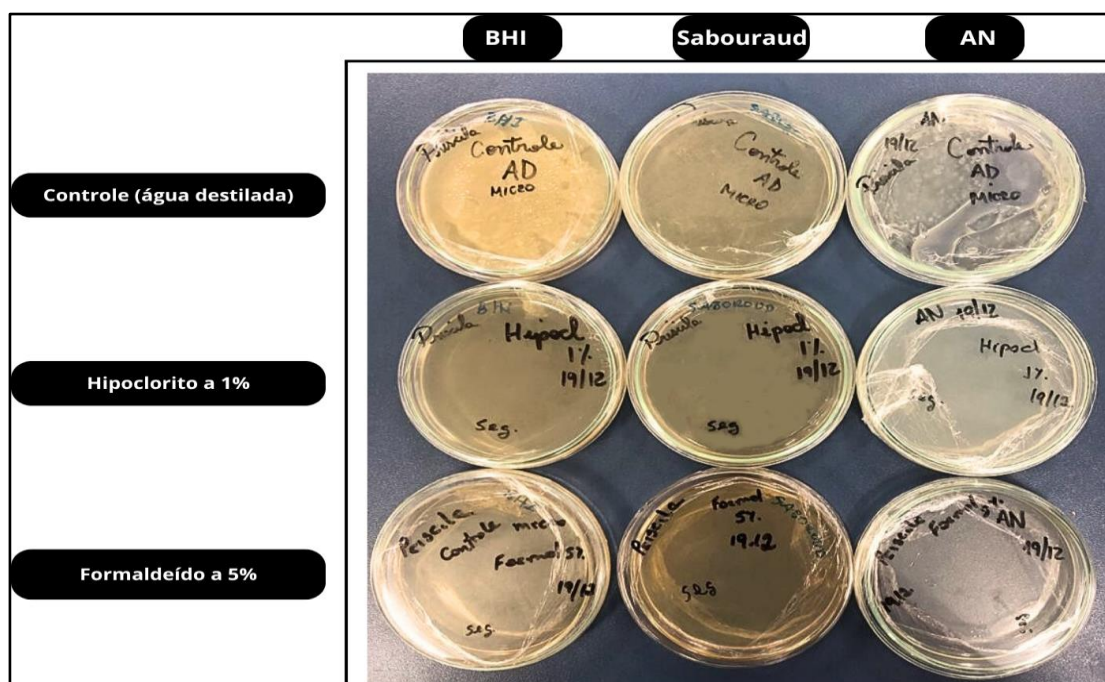


Figura 11 - Controle microbiológico do processo de desinfecção dos ovos das moscas

Fonte: Dados da pesquisa, 2024

Após o processo de imersão dos ovos, as trouxas foram desfeitas e acondicionadas em potes de coleta estéril contendo meio Ágar Nutriente. Nas tampas rosqueáveis foram realizados microfuros com agulhas estéreis para permitir o aporte de oxigênio (**figura 12 A/B**). Os potes foram mantidos sob a temperatura de 27 a 29° C e aproximadamente 14 a 16 horas depois, ocorreram a eclosão das larvas.

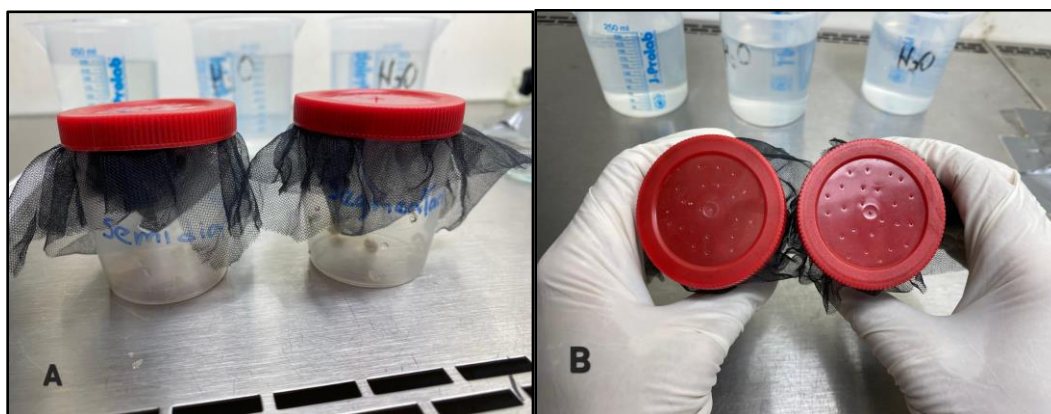


Figura 12 - **A:** Recipiente utilizado para acondicionar os ovos desinfetados; **B:** Microfuros realizados nas tampas rosqueáveis.

Fonte: Dados da Pesquisa, 2024

Para garantir que o processo de obtenção de larvas estéreis para fins terapêuticos fosse exitoso, dez larvas de cada espécie foram maceradas em 1000µL de água destilada estéril. Deste macerado, em triplicata, alíquotas de 100µL foram novamente semeadas em BHI, ágar nutriente e SDA, sendo mantidas até 7 dias com temperatura de 37°C em estufa BOD para confirmar a ausência de crescimento microbiológico.

5.1.7 Limitações do estudo

A ausência de estudos que avaliaram as espécies *H. segmentaria* e *H. semidiaphana* para Terapia Larval, dificultou a adaptação das espécies às condições de laboratório. A falta de informações demandou maior período na determinação dos métodos exitosos para criação das espécies em laboratório e limitou o processo de escolha e aperfeiçoamento dos métodos aplicados, uma vez que não foi possível realizar comparações.

5.1.8 Processamento, análise e apresentação dos resultados

Na descrição dos métodos aplicados para criação das espécies em condições de laboratório, utilizou-se registro diário manual de todas as intervenções realizadas e

comportamentos observados, além de registros fotográficos com código de identificação estabelecidos pela equipe de pesquisa. Os registros foram cruciais para se estabelecer comunicação entre os membros da equipe que participaram ativamente desta fase, minimizando erros humanos na reprodução dos métodos e para buscar respostas diante das falhas.

Para determinação do período de desenvolvimento dos estágios imaturos (ovo, larva e pupa) e adulto em condições de laboratório, foi realizado acompanhamento rigoroso das fases de desenvolvimento, através da filmagem do processo, associado à identificação dos imaturos pelas características morfológicas descritas por Thyssen (2005) e compilação dos dados em planilhas criadas pela equipe de pesquisa. Desse modo, foi possível determinar o tempo médio em horas, do período de desenvolvimento de cada fase das espécies.

Para eleição do método de desinfecção dos ovos das espécies do estudo, foi realizado levantamento na literatura que trouxesse resultados exitosos acerca de agentes desinfectantes utilizados para viabilizar as larvas de outras espécies à TL. Foram testadas então, as soluções mais utilizadas com essa finalidade e que apresentavam bom custo benefício.

Não foi aplicada análise estatística desta etapa do estudo, contudo, todo o experimento foi controlado pela pesquisadora e seus colaboradores, garantindo replicabilidade dos métodos e resultados encontrados.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS (CAPÍTULO 3)

5.2.1 Tipo de estudo

Trata-se de um ensaio pré-clínico randomizado. Caracteriza-se como estudos pré-clínicos aqueles que utilizam organismos-modelo (*in vitro*, *in silico*, *ex vivo* e ou *in vivo*) definidos como espécies não humanas, extensivamente estudadas com o objetivo de compreender uma gama de fenômenos biológicos, com a esperança de que os dados, modelos e teorias gerados serão aplicáveis a outros organismos, particularmente àqueles que são de muitos modos mais complexos do que o original (Leonelli; Ankeny, 2013)

O delineamento experimental foi necessário para avaliar a aplicabilidade da Terapia Larval e comparar sua eficácia com outros tratamentos. A experimentação animal viabilizará a prática clínica em seres humanos.

Desse modo, é possível determinar um objeto de estudo, selecionar variáveis capazes de influenciá-lo, aplicar diferentes intervenções que lhes são alocadas aleatoriamente, definir as formas de controle e de observação dos efeitos que cada variável produz no objeto (OPAS; OMS; BIREME, 2018).

5.2.2 População, local e período do estudo

Foram utilizados como modelo animal, ratos albinos machos da espécie *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar, com 10 semanas de vida, pesando aproximadamente 200 a 250g. A escolha desse espécime se dá pelo pequeno porte, curto ciclo biológico, baixo custo de criação e grande similaridade genética aos humanos (Mattaraia Moura, 2012).

Os animais foram disponibilizados pelo Biotério Central do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia -INPA e toda manipulação dos animais aconteceu nas dependências do mesmo. A experimentação animal durou de novembro de 2024 à abril de 2025.

5.2.3 Cálculo da amostra

Foram utilizados 60 ratos ao todo. Cada grupo, incluindo os controles, contaram com 15 espécimes cada um. Os grupos, por sua vez, foram divididos aleatoriamente em três subgrupos de acordo com o período de observação (3º, 7º e 14º dia após intervenção), com 5 animais em cada subgrupo. Para determinar o tamanho amostral não foi realizado cálculo de poder estatístico, determinou-se a amostra partindo do princípio de que o estudo em questão, por se tratar de uma investigação inédita, ou seja, as larvas das espécies de dípteros que serão utilizadas ainda não foram investigadas neste modelo experimental. Portanto, utilizamos dados do estudo de Nitsche (2010) para avaliar a atividade desbridante e cicatricial do uso de larvas observadas no tratamento de feridas de ratos da linhagem Wistar. O estudo foi conduzido com 15 animais por grupos, com 3 subgrupos compostos por 4, 5 e 6 animais respectivamente. Com base nestes dados e considerando a semelhança com os objetivos deste estudo, adotou-se o quantitativo de 5 animais por cada subgrupo (Madden *et al.*, 2012).

5.2.4 Aspectos éticos

O estudo atendeu a Lei Federal 11.794, de 8 de outubro de 2008, e as demais normas aplicáveis à utilização de animais para o ensino e pesquisa, especialmente as resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Foi analisado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais- (CEUA) do Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas- (INPA), e aprovado sob o Parecer 001/2021 -SEI 01280.000034/2021-09.

5.2.5 Critérios de Inclusão, Não inclusão e Exclusão

5.2.5.1 Critérios de Inclusão

- Foram incluídos, ratos albinos da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, de ambos os sexos, pesando entre 200 a 250g, com 10 semanas de vida, provindos do Biotério Central do INPA, ambientados e livres de patógenos.

5.2.5.2 Critérios de Não Inclusão

- Ratos que apresentaram comportamento agressivo/incompatível com o protocolo experimental ou ratos que apresentaram sinais e sintomas (antes da experimentação) de adoecimento.

5.2.5.3 Critérios de Exclusão

- Foram excluídos, ratos que não alcançaram o peso alvo.

5.2.6 Métodos a serem aplicados

5.2.6.1 Alocação e alimentação dos animais

Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas forradas com maravalha. A maravalha minimiza o contato com o solo, fezes e urina, evitando o acarretamento de doenças. As gaiolas foram trocadas semanalmente para manutenção da higiene dos animais. Todos os animais foram alimentados com água e ração para roedores *ad libitum* e mantidos com ciclo de luz/escuridão a cada 12 horas, temperatura constante de 22°C e umidade relativa de 55% durante todo experimento.

5.2.6.2 Grupos do experimento

Os ratos foram induzidos ao diabetes mellitus tipo 1 e posteriormente lesões cutâneas foram produzidas no dorso dos animais. Grupos experimentais para tratamento das lesões foram determinados e descritos a seguir:

Grupo 1: Terapia Larval com espécie *H. semidiaphana* (Grupo TL- *H. semidiaphana*)- 15 animais induzidos a diabetes mellitus e a lesão, tratamento com larvas de *H. semidiaphana*;

Grupo 2: Terapia Larval com espécie *H. segmentaria* (Grupo TL- *H. segmentaria*)- 15 animais induzidos a diabetes mellitus e a lesão, tratamento com larvas de *H. segmentaria*;

Grupo 3: Controle positivo (Grupo Colagenase)- 15 animais induzidos a diabetes mellitus e a lesão, tratamento com pomada debridante Colagenase;

Grupo 4: Controle negativo (Grupo Solução salina 0,9%)- 15 animais induzidos a diabetes mellitus e a lesão, sem tratamento, apenas irrigação da lesão com solução salina.

5.2.6.3 Randomização e Cegamento

Para separação dos grupos foi utilizada a estratégia de randomização em blocos, a aleatoriedade foi obtida através de números gerados usando a função padrão = RAND no Microsoft Excel.

Para estratégia de cegamento e ocultação, foram considerados quatro investigadores diferentes, que estiveram envolvidos da seguinte forma: o primeiro investigador foi responsável pela alocação dos animais nos respectivos grupos com base na tabela de randomização. O segundo investigador foi responsável pelo procedimento de indução de diabetes e da lesão. O terceiro investigador aplicou o tratamento correspondente a cada grupo do estudo, ele também foi o responsável pelo registro fotográfico, mensuração, avaliação macroscópica das lesões e coleta de tecido para análise histopatológica. Este investigador foi a única pessoa ciente da alocação dos grupos focais. Por fim, um quarto investigador realizou a análise das peças histológicas e a avaliação final dos registros macroscópicos obtidos. Os dados foram confrontados com a literatura para subsidiar conclusões fidedignas.

5.2.6.4 Indução do DM

Após a liberação dos animais para o estudo, foram acompanhados por uma semana para adaptação de ambiente e ganho de peso. Os animais foram divididos em 20 gaiolas contendo 3 animais em cada, ou seja, cada grupo foi composto por 5 gaiolas, que foram etiquetadas para evitar possíveis confusões. Essa estratificação foi realizada para manter o ambiente de cativeiro menos estressante para o animal e menos competitivo para alimentação. Os ratos permaneceram por 2 ou 3 semanas até atingirem o peso alvo de 200 a 250 gramas.

Ao ser constatado o peso ideal para início do experimento, os animais foram submetidos ao protocolo de dieta para indução do DM, no qual foram tratados durante 1 (uma) semana com dieta hiper glicosada alternando com dieta padrão para roedores, conforme esquema da **figura 13**.

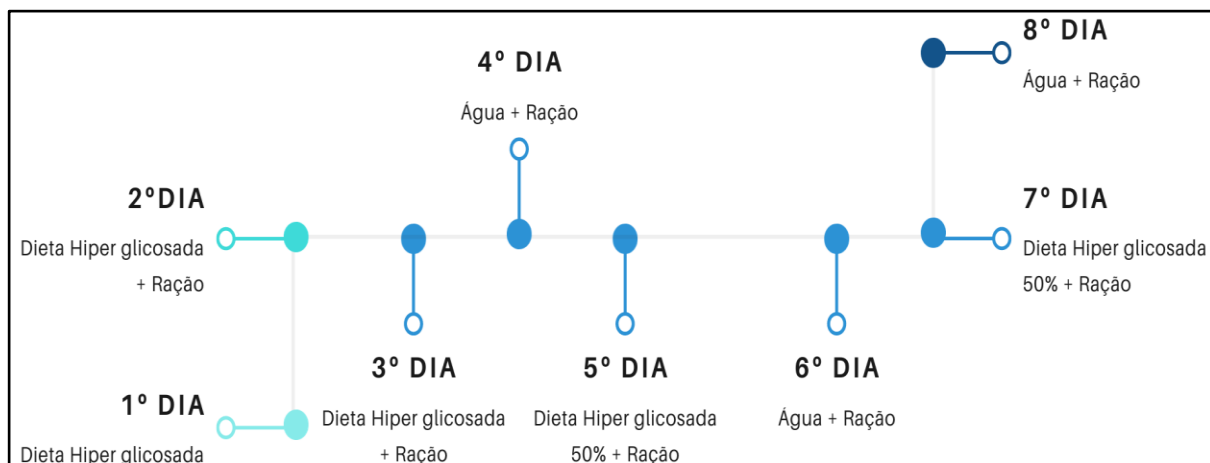


Figura 13 - Protocolo de dieta para indução do DM

Dieta Hiper glicosada = 25 g de suco em pó + 500g de açúcar para cada 2L de água
 Dieta Hiper glicosada 50%= 12,5g de suco em pó + 250g de açúcar para cada 2L de água

Fonte: Figuerêdo *et al.*, (2023)

As soluções hiper glicosadas foram preparadas todos os dias para evitar a fermentação e a rejeição do animal à dieta. A indução do DM foi realizada no oitavo dia da dieta, onde receberam a aplicação de Estreptozotocina (Sigma® S-130) na dose única de 60 mg/kg de peso corporal, diluído em tampão citrato (0,1M pH 4,5) (Masiero, 2015).

Para aplicação da droga não foi realizada sedação, os animais foram contidos pela cabeça e pelas patas e o abdômen exposto pelo pesquisador auxiliar. Foi utilizada seringa de 1ml e agulha 13 x 4,5 mm na administração da droga intraperitoneal (IP), conforme a **figura 14**.



Figura 14 - Aplicação do indutor diabetogênico (Estreptozotocina) via IP

Fonte: Figuerêdo *et al.*, (2023)

Após 7 dias da indução do DM, o nível glicêmico foi aferido por obtenção de sangue da veia caudal dos ratos e analisada com o glicosímetro Accu-Chek Guide (Roche®). Os animais com níveis de glicose maior ou igual a (≥ 200 mg/dL) foram considerados diabéticos (Ferreira; Nicolau, 2011). Durante o período de indução, a água oferecida aos ratos foi substituída por soro fisiológico a 0,9%, para minimizar a desidratação ocasionada pela poliúria e consequentemente a morte dos animais.

5.2.6.5 Indução da lesão cutânea

Ao se constatar o diabetes, foi realizada a indução das lesões. Inicialmente os animais foram anestesiados/analgesiados utilizando Cetamina (75mg/kg) e Xilazina (10mg/kg) via intraperitoneal e na sequência, a área que receberia a lesão foi higienizada com sabonete antisséptico com PHMB (Pielsana®) e tricotomizada com uso de aparelho elétrico.

As lesões foram produzidas a partir da administração de 0,2 ml de solução na proporção de 1:4 de ácido clorídrico e água destilada, por via subcutânea não transfixante (Masiero, 2015; Figuerêdo *et al.*, 2023)- **figura 15**. A administração da solução causou lesão semelhante à queimadura. Após 48 horas depois da indução da lesão, iniciaram as abordagens de curativos específicos para cada grupo experimental.



Figura 15 - Indução da lesão com administração da solução via subcutânea

Fonte: Dados da Pesquisa, 2024.

5.2.6.6 Hipóteses

Pergunta relacionada ao capítulo 3 do estudo: O uso de larvas das espécies *Hemilucilia segmentaria* e *Hemilucilia semidiaphana* (Diptera:Calliphoridae) para tratamento de lesões cutâneas diabéticas, proporciona desbridamento^a apenas de tecido desvitalizado e acelera a atividade cicatricial^b dos tecidos em comparação a tratamento desbridante convencional?

H0(a)- O uso de larvas das espécies *Hemilucilia segmentaria* e *Hemilucilia semidiaphana* (Diptera:Calliphoridae) para tratamento de lesões cutâneas diabéticas, não proporciona desbridamento apenas de tecido desvitalizado, ocasionando miíase obrigatória no hospedeiro.

H0(b)- O uso de larvas das espécies *Hemilucilia segmentaria* e *Hemilucilia semidiaphana* (Diptera:Calliphoridae) para tratamento de lesões cutâneas diabéticas, não acelera a atividade cicatricial dos tecidos em comparação a tratamento desbridante convencional.

H1(a)- O uso de larvas das espécies *Hemilucilia segmentaria* e *Hemilucilia semidiaphana* (Diptera:Calliphoridae) para tratamento de lesões cutâneas diabéticas, proporciona desbridamento apenas de tecido desvitalizado, confirmando miíase facultativa no hospedeiro.

H1(b)- O uso de larvas das espécies *Hemilucilia segmentaria* e *Hemilucilia semidiaphana* (Diptera:Calliphoridae) para tratamento de lesões cutâneas diabéticas, acelera a atividade cicatricial dos tecidos em comparação a tratamento desbridante convencional.

5.2.7 Limitações do estudo

Estudos realizados com animais em laboratório, ou seja, em ambiente que permita controlar as variáveis, reduz o grau de subjetividade na aferição dos dados. Deve-se ter cautela com a expectativa de obter o mesmo resultado para seres humanos, uma vez que se trata de experimentos realizados em outras espécies que não a humana, ainda que similares.

5.2.8 Plano Analítico dos dados

As análises estatísticas foram realizadas no programa R versão 4.4.1. Os resultados de área e contração das feridas foram expressos em média $\pm$ desvio padrão, submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste post-hoc de Tukey. As variáveis de avaliação histológica foram analisadas pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney e a análise inter-grupo foi realizada pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Foram considerados significativos os valores comparados ao nível de 5% de significância, onde $p \leq 0,05$.

6. CAPÍTULO 1

Terapia larval: implicações imunológicas na interação parasito-hospedeiro

Larval therapy: immunological implications in host-parasite interaction

Terapia larval: implicaciones inmunológicas en la interacción huésped-parásito

Heitor Afonso Oliveira¹, Priscila Gonçalves Jacinto¹, Jonatas de Sousa Queiroz¹, José Fernando Marques Barcellos¹, Maria do Carmo Queiroz Fialho¹, Bruno Bezerra Jensen².

RESUMO

Objetivo: Identificar as implicações imunológicas do hospedeiro decorrentes da utilização da terapia larval (TL) no tratamento de feridas crônicas, bem como analisar seu potencial antimicrobiano.

Métodos: Trata-se de uma Revisão Integrativa, com busca nas bases de dados LILACS, BDENF e MEDLINE, utilizando os seguintes descritores: Terapia de Desbridamento Larval; Imunidade; Ferimentos e Lesões, nas línguas inglês e português, sejam revisões ou experimentais *in vitro* ou *in vivo*.

Resultados: Foram selecionados 16 artigos. Os estudos evidenciam uma ampla ação imunomoduladora da TL, favorecendo a angiogênese, o reparo tecidual e a resolução do processo inflamatório. Dentre os principais efeitos, destacam-se a redução da atividade neutrofílica; o aumento de diferenciação de macrófagos M2 e linfócitos Treg; inibição do sistema complemento, entre outros. No que tange ao potencial antimicrobiano, as larvas secretam substâncias como quimiotripicinas, lusifensinas e glicosidades, capazes de combater biofilmes e bactérias, especialmente gram-positivas. **Considerações finais:** Os estudos analisados indicam que a TL é um processo biológico complexo, havendo a necessidade de elucidar com maior precisão as moléculas bioativas e seus mecanismos de ação, a fim de ampliar e qualificar seu uso terapêutico.

Palavras-chave: Terapia de desbridamento larval, Imunidade, Ferimentos e lesões.

ABSTRACT

Objective: To identify the host immunological implications caused by the use of larval therapy (LT) in the treatment of chronic wounds, in addition to unraveling its antimicrobial potential. **Methods:** The research is an Integrative Review, with search in the LILACS, BDENF and MEDLINE databases, using the following descriptors: Larval Debridement Therapy; Immunity; Wounds and Injuries, in English and Portuguese, whether reviews or *in vitro* or *in vivo* experiments. **Results:** 16 articles were included. The articles demonstrate a broad immunomodulatory action of LT in favor of angiogenesis, tissue repair and inflammatory resolution, highlighting actions of reduction of neutrophil activity; increase in

differentiation of M2 macrophages and Treg lymphocytes; deactivation of the complement system, among others. Regarding the antimicrobial potential, the larvae secrete substances (chymotrypsins, lusifensins, glycosylates) capable of combating biofilms and bacteria, especially Gram-positive bacteria.

Conclusion: The studies analyzed demonstrate that LT is a complex process, and there is a need to elucidate more precisely the bioactive molecules and their mechanisms of action, in order to understand and expand the therapeutic use.

Keywords: Larval debridement therapy, Immunity, Wounds and injuries.

RESUMEN

Objetivo: Identificar las implicaciones inmunológicas del huésped causadas por el uso de la terapia larval (TL) en el tratamiento de heridas crónicas, además de desentrañar su potencial antimicrobiano.

Métodos: La investigación es una Revisión Integrativa, con una búsqueda en las bases de datos LILACS, BDENF y MEDLINE, utilizando los siguientes descriptores: Terapia de Desbridamiento Larval; Inmunidad; Heridas y Lesiones, en inglés y portugués, ya sean revisiones o experimentos in vitro o in vivo.

Resultados: Se incluyeron 16 artículos. Los artículos demuestran una amplia acción inmunomoduladora de TL a favor de la angiogénesis, la reparación tisular y la resolución inflamatoria, destacando acciones de reducción de la actividad de los neutrófilos; aumento en la diferenciación de macrófagos M2 y linfocitos Treg; desactivación del sistema del complemento, entre otros. En cuanto al potencial antimicrobiano, las larvas secretan sustancias (quimotripsinas, lusifensinas, glicosilatos) capaces de combatir biopelículas y bacterias, especialmente bacterias Gram-positivas. **Consideraciones finales:** Los estudios analizados demuestran que la TL es un proceso complejo, y existe la necesidad de dilucidar con mayor precisión las moléculas bioactivas y sus mecanismos de acción, para comprender y ampliar el uso terapéutico.

Palabras clave: Terapia de desbridamiento larval, Inmunidad, Heridas y lesiones.

¹ Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus – AM.

² Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus – AM

SUBMETIDO EM: 7/2025 | ACEITO EM: 8/2025 | PUBLICADO EM: 9/2025

INTRODUÇÃO

Simmons (1935) foi o primeiro a registrar substâncias com potente ação antimicrobiana nas secreções das larvas, incluindo alantoína, ureia, fenilacetaldéido, carbonato de cálcio e enzimas proteolíticas. Excreções obtidas de larvas não estéreis de *Lucilia sericata* demonstraram atividade antimicrobiana significativa contra bactérias piogênicas, sendo capazes de eliminá-las em um intervalo de cinco a dez minutos após exposição. A Terapia Larval (TL) consiste na aplicação de larvas de moscas necrófagas, selecionadas com base na disponibilidade local. Essas larvas são obtidas a partir de coleta de ovos diretamente na natureza, os quais são desinfetados em laboratório antes da eclosão, para posterior aplicação sobre a lesão. Esse processo tem a finalidade da promoção da cicatrização por meio do desbridamento biológico (NITSCHKE MJT, 2010; MASIERO FS, 2019; THYSSEN PJ, et al., 2021).

Os benefícios da larvoterapia ultrapassam os efeitos visíveis macroscopicamente. Estudos apontam ações como estimulação da angiogênese; modulação da resposta imune (com atuação sobre a função de fagócitos); manutenção da atividade antimicrobiana mesmo em contexto de inibição inflamatória; inibição da ativação do sistema complemento; controle e degradação de biofilmes bacterianos, excreção de substâncias com efeito antimicrobiano, controle eficaz do exsudato e resolução dos processos celulares e bioquímicos alterados. Além disso, as larvas secretam enzimas digestivas que elevam o pH local, estimulam fibroblastos, células endoteliais e promovem maior oxigenação tecidual, favorecendo a formação de tecido de granulação e, conseqüentemente, a regeneração da lesão (TELLEZ G, et al., 2012; VAN DER PLAS MJA, et al., 2007; VAN DER PLAS MJA, et al., 2009; TAMURA T, et al., 2017; JIANG KC, et al., 2012).

O movimento das larvas no leito da lesão estimula a produção de exsudato seroso, que por sua vez ativa macrófagos, induzindo a cicatrização e secreção de fatores de crescimento (MARCONDES CB, 2006). Entre os diversos benefícios das secreções larvais, destacam-se ainda as propriedades bactericidas e bacteriostáticas, especialmente contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, bem como a capacidade de controle de biofilmes bacterianos, devido a presença de defensinas (MASIERO FS, 2019).

Estudos revelaram que fatores antimicrobianos de baixo peso molecular (<1 kDa), presentes nas secreções de larvas medicinais, são eficazes contra bactérias Gram-positivas, como *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*, incluindo cepas sensíveis e resistentes à metilicina (Kerridge et al., 2005). Bactérias que não são eliminadas diretamente pelas secreções podem ser ingeridas pelas larvas, sendo destruídas em seu interior (MUMCUOGLU KY, et al., 2001).

Van Der Plas MJA, et al. (2007) evidenciaram que os neutrófilos aumentam o dano ao tecido em vez de contribuir para a cura de feridas crônicas e que os efeitos benéficos das larvas, estão associados

em parte, com a inibição de múltiplas respostas pró-inflamatórias de neutrófilos ativados por ES. As secreções agem a jusante da ativação da proteína quinase C mediada pela fosfolipase C. Em concordância, ES inibem as atividades funcionais dos neutrófilos ativados por PMA; induzem um aumento na concentração intracelular de cAMP em neutrófilos e ativadores farmacológicos de mecanismos dependentes de cAMP imitaram seus efeitos inibitórios em neutrófilos.

Tamura T, et al. (2017) observaram que as ES das larvas de *L. sericata* inibem a ativação do sistema complemento, reduzindo a inflamação exacerbada. Essa atividade anti-complemento se dá por meio da degradação de proteínas envolvidas em todas as etapas das três vias de ativação do complemento, mediada por serinas proteases termo-sensíveis presentes nas secreções. Componentes inflamatórios chave como C3a e C5a foram inativados após pré-tratamento com ES, o que bloqueou sua capacidade de ativar neutrófilos humanos, sem comprometer a atividade antimicrobiana da secreção.

Diante dos benefícios registrados, torna-se imprescindível aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos imunológicos envolvidos na Terapia Larval, de modo a respaldar sua aplicação clínica como primeira linha terapêutica em feridas crônicas. Assim, esta revisão tem como objetivo identificar as principais implicações imunológicas da TL no hospedeiro, por meio da análise de estudos de revisão e experimentais (*in vitro* e *in vivo*) que investiguem seus efeitos imunomoduladores e antimicrobianos.

MÉTODOS

Este estudo é uma Revisão Integrativa da Literatura, com abordagem quali-quantitativa, estruturada com base na ferramenta PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) (PAGE MJ, et al, 2021), a partir da seguinte pergunta: “Quais as implicações imunológicas do hospedeiro ocasionadas pela terapia larval no tratamento de feridas crônicas?”. A estratégia de busca foi definida através de termos retirados do Medical Subject Headings (MeSH), para termos em inglês, e Descritores em Ciências da Saúde (DeCS), para termos em português, associados aos operadores booleanos “AND” e “OR”. Foram retirados 6 termos principais e seus respectivos sinônimos: 1 - Terapia de Desbridamento Larval, 2 - Imunidade e 3 - Ferimentos e Lesões, retirados do DeCS e 4 - Maggot Debridement Therapy, 5 - Immunity e 6 - Wounds and injuries, retirados do MeSH.

A busca ocorreu nas bases de dados Literatura Latino-Americana em Ciências da Saúde (LILACS), Bases de Dados da Enfermagem (BDENF) e Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (MEDLINE), por meio da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), e PUBMED. Critérios de inclusão: textos disponíveis eletronicamente na íntegra, nos idiomas português e inglês, estudos de revisão, pré-clínicos com pesquisa *in vitro* e *in vivo*. Critérios de exclusão: artigos indexados

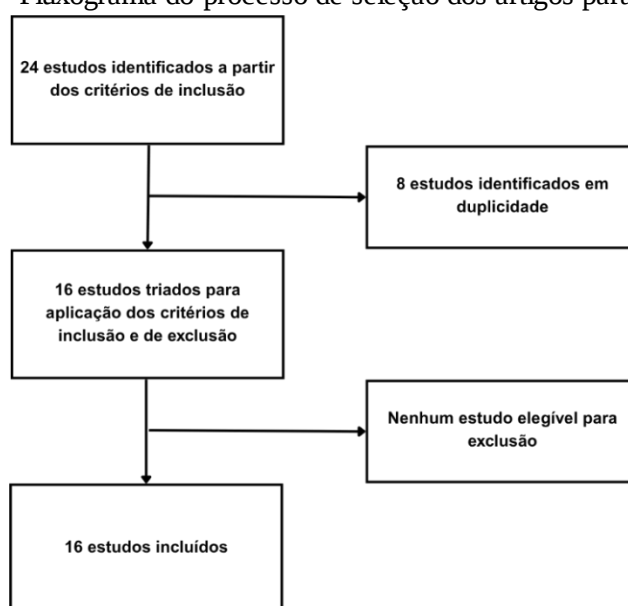
repetidamente; artigos que não respondem à questão da pesquisa; artigos com indisponibilidade de acesso.

A seleção dos estudos se deu em três etapas: 1. Leitura do título e do resumo de cada artigo, mediante à adequação dos critérios de inclusão. 2. Aplicação dos critérios de exclusão, com auxílio da plataforma Rayyan, que reconhecia títulos e resumos duplicados. 3. Os artigos selecionados foram classificados em diferentes categorias de avaliação, a partir da leitura analítica e crítica. A pesquisa foi realizada no Laboratório de Histologia Funcional, no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a busca nas bases de dados, foram localizados 24 artigos que atendiam aos critérios de seleção. Desses, 8 artigos duplicados foram excluídos, embora todos estivessem relacionados à pergunta-chave. Assim, os 16 artigos restantes foram triados e incluídos na revisão, conforme demonstrado na **Figura 1**.

Figura 1 - Fluxograma do processo de seleção dos artigos para revisão integrativa



Fonte: Oliveira HA, et al., 2025.

Os artigos analisados discutem as propriedades imunológicas da terapia larval (TL), com base nas excreções e secreções (ES) de dípteros da família Calliphoridae, principalmente da espécie *Lucilia sericata*, principal referência na aplicação clínica da TL. A discussão abrange amplamente as propriedades imunomoduladoras da TL sobre os componentes da imunidade inata e adaptativa, tanto celulares quanto não celulares, além de suas características antimicrobianas. Dos 16 incluídos, 14 são estudos experimentais e 2 são revisões.

1. Implicações imunológicas da terapia larval na resposta do hospedeiro

A TL interfere ativamente com o sistema imunológico do hospedeiro, modulando tanto a imunidade inata quanto a adaptativa para criar um microambiente propício à cicatrização.

1.1 Modulação de células imunes inatas: neutrófilos e monócitos/macrófagos

As Excreções/Secreções (ES) larvais exercem efeitos imunomoduladores notáveis sobre as células da linha de frente da resposta imune. Pečivová J, *et al.* (2008) investigaram o efeito do extrato de glândulas salivares (SGE) de larvas de *Lucilia sericata* em neutrófilos humanos. Utilizando ensaios de quimioluminescência em sangue total, medição da geração de superóxido (pela redução do citocromo C) e liberação de mieloperoxidase (MPO) (pela oxidação da o-dianisidina) após estimulação com zimosano opsonizado, os autores demonstraram que o SGE, na maior concentração testada, diminuiu significativamente todas essas respostas pró-inflamatórias dos neutrófilos. É importante notar que o SGE não afetou neutrófilos não estimulados nem a atividade de enzimas isoladas, sugerindo uma modulação da resposta celular ativada, e não uma interferência basal ou enzimática direta. Este achado corrobora a ideia de que a TL pode mitigar o dano tecidual excessivo mediado por neutrófilos em feridas crônicas.

No que tange aos monócitos e macrófagos, Dauros SP, *et al.* (2017), ao analisarem as respostas transcricionais de diferentes tipos celulares (queratinócitos, células endoteliais, fibroblastos e monócitos THP-1) às ES de *L. sericata* utilizando microarranjos Affymetrix, observaram que os monócitos THP-1 exibiram a resposta transcricional mais robusta. As vias enriquecidas nestas células estavam predominantemente ligadas à resposta imune e inflamatória. Este estudo também citou trabalhos anteriores que indicam que as ES podem direcionar a diferenciação de monócitos para macrófagos do tipo M2, associados à resolução da inflamação e ao reparo tecidual. Foi citado por Gürel T e Umur Ş (2024) que as ES inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-12p40) por monócitos, enquanto aumentam a IL-10 anti-inflamatória e alteram perfis de quimiocinas (redução de MIP-1 β , aumento de MCP-1 e IL-8), sem comprometer a capacidade fagocítica contra *S. aureus*.

1.2 Impacto no sistema complemento

O sistema complemento, um componente crucial da imunidade inata, também é significativamente modulado pela TL. Cazander G, et al. (2012) investigaram o efeito das ES de *L. sericata* na ativação do complemento (AC) em soro humano. Utilizando imunoenaios enzimáticos (Wieslab) para as vias clássica (ativador: IgM humana), alternativa (ativador: lipopolissacarídeo) e das lectinas ligantes de manose (MBL) (ativador: manana), e confirmando com o ensaio de atividade hemolítica total clássica (CH50), os pesquisadores demonstraram que as ES reduziram a AC em até 99,9% através de todas as vias. As ES promoveram a quebra das proteínas C3 e C4 de forma independente de cátions, um mecanismo distinto da ativação fisiológica do complemento. Notavelmente, o efeito redutor da AC pelas ES foi tolerante à temperatura, sendo até potencializado pelo aquecimento, e dependente de um componente proteico, pois a degradação de proteínas nas ES diminuiu parcialmente sua capacidade de reduzir a AC. Estes efeitos foram observados tanto em soro de indivíduos saudáveis quanto em soro pós-operatório de pacientes traumatizados, indicando relevância clínica.

1.3 Influência na imunidade adaptativa e rede de citocinas

A TL também influencia a imunidade adaptativa, particularmente promovendo um perfil anti-inflamatório e regulatório. Zhang J, et al. (2022) estudaram o impacto da Terapia de Desbridamento por Larvas (MDT) em úlceras de pé diabético (UPD), focando nas células T reguladoras (Tregs). Por meio de imuno-histoquímica e RT-PCR em tecidos de pacientes com UPD tratados ou não com MDT, e co-cultura *in vitro* de células esplênicas de camundongos com ES de larvas, eles observaram um aumento acentuado na expressão do fator de transcrição Foxp3 (marcador de Tregs) em pacientes tratados com MDT. Adicionalmente, os níveis de expressão gênica de Foxp3, da citocina anti-inflamatória interleucina-10 (IL-10), do fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e do fator regulador de interferão 4 (IRF-4) foram significativamente mais elevados nos pacientes submetidos à MDT. Os resultados *in vitro* corroboraram esses achados, sugerindo que a MDT/ES promovem a expansão ou função das Tregs, o que pode contribuir para a resolução da inflamação e cicatrização das UPD.

Dauros SP, et al. (2017) também identificaram que genes de citocinas e quimiocinas como IL-8, CXCL10, C3, CCL8 e CFB foram modulados. Um achado interessante foi que as ES foram consideravelmente menos potentes em desencadear a secreção de IL-8 por

fibroblastos em comparação com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) em quantidades equivalentes às encontradas nas ES. Além disso, o co-tratamento com LPS e ES resultou em uma diminuição da secreção de IL-8 desencadeada apenas pelo LPS, sugerindo um efeito modulador dominante das ES sobre respostas inflamatórias induzidas por outros estímulos. No **Quadro 1**, estão os principais achados em relação à modulação imune da TL.

Quadro 1 - Modulação da Terapia Larval a partir de ES de *L. sericata* sobre a imunidade do hospedeiro.

Estudo	Ramo Imune	Alvo	Efeito no Hospedeiro
PEČIVOVÁ J, et al. (2008)	Imunidade Inata	Neutrófilos humanos	Diminuição da quimioluminescência (atividade oxidativa), geração de superóxido e liberação de MPO após estimulação com zimosano opsonizado. Sem efeito em células não estimuladas.
DAUROS SP, et al. (2017)	Imunidade Inata	Monócitos THP-1 (linhagem celular)	Resposta transcricional robusta, enriquecimento de vias de resposta imune/inflamatória. Citação de direcionamento para diferenciação M2.
GÜREL T e UMUR Ş (2024)	Imunidade Inata	Monócitos humanos	Inibição da produção de TNF- α , IL-12p40; aumento da IL-10. Alteração do perfil de quimiocinas (redução de MIP-1 β , aumento de MCP-1, IL-8). Sem afetar fagocitose de <i>S. aureus</i> .
CAZANDER G, et al. (2012)	Sistema Complemento	Vias clássica, alternativa e das lectinas.	Redução da ativação do complemento (até 99,9%). Quebra de C3 e C4 (independente de cátions). Efeito tolerante à temperatura e dependente de componente proteico.
ZHANG J, et al. (2022)	Imunidade adaptativa	Células T Reguladoras (Tregs)	Aumento da expressão de Foxp3. Aumento da expressão gênica de Foxp3, IL-10, TGF- β , IRF- 4.
DAUROS SP, et al. (2017)	Imunidade Inata	Rede de Citocinas (em várias células)	Modulação de genes de citocinas/quimiocinas. ES menos potente que LPS para induzir IL-8. Co-tratamento ES+LPS diminui IL-8 induzida por LPS.

Fonte: Oliveira HA, et al., 2025.

2. Ação antimicrobiana e anti-biofilme da terapia larval

As larvas e suas ES possuem um arsenal para combater infecções, incluindo atividade contra bactérias planctônicas e biofilmes.

2.1 Peptídeos antimicrobianos e espectro de ação

A lucifensina, uma defensina de inseto, é um peptídeo antimicrobiano (PAM) chave identificado nas ES de *L. sericata*. Andersen AS, et al. (2010), utilizando uma técnica de captura

de sinais de secreção (TAST) em bibliotecas de cDNA de glândulas salivares e larvas inteiras, identificaram a lucifensina. Produzida de forma recombinante, a lucifensina demonstrou atividade *in vitro* contra bactérias Gram-positivas, incluindo *Staphylococcus carnosus*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae* (CIM 2 mg/L), e *Staphylococcus aureus* (CIM 16 mg/L). A atividade contra cepas de MRSA e GISA variou (CIM 8–>128 mg/L), e não foi observada atividade contra as bactérias Gram-negativas testadas. Čeřovský V e Bém R (2014), em sua revisão sobre lucifensinas, corroboram este espectro de ação, destacando o papel desses peptídeos na MDT e a observação clínica da menor eficácia da MDT em feridas infectadas por *Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter* sp., o que se alinha com a especificidade da lucifensina.

Explorando o potencial de engenharia de PAMs, Gao B e Zhu S (2014) desenvolveram um peptídeo em gancho β (NvBH) derivado da navidefensina2-2 de *Nasonia vitripennis*. O NvBH sintético e sua forma oxidada exibiram atividade antibacteriana potente e de espectro mais amplo que a defensina original, atuando contra bactérias Gram-positivas (incluindo *S. aureus* e *S. epidermidis* resistentes a antibióticos) e Gram-negativas (*Serratia marcescens* e *Salmonella typhimurium*) através de um mecanismo de disrupção da membrana bacteriana.

2.2 Disrupção de biofilmes bacterianos

Os biofilmes são uma barreira significativa no tratamento de feridas crônicas. Harris LG, et al. (2009) demonstraram que as ES de *L. sericata* inibem a formação de biofilmes nascentes e desmantelam biofilmes pré-formados de *Staphylococcus epidermidis*, independentemente do mecanismo de adesão intercelular da bactéria (adesina polissacarídica intercelular - PIA ou proteína associada à acumulação - Aap). A atividade anti-biofilme foi dependente da temperatura e do tempo, termolábil (sugerindo natureza proteica) e associada a moléculas com peso molecular superior a 10 kDa, possivelmente proteases ou glicosidases.

Pritchard DI e Brown AP (2015) focaram na enzima quimotripsina 1 (ISP) de *L. sericata* e sua capacidade de degradar macromoléculas alvo de MSCRAMMs (Componentes da Superfície Microbiana que Reconhecem Macromoléculas da Matriz Adesiva) presentes no esfacelo de úlceras venosas de perna (UVP). Eles identificaram fibrinogênio, fibronectina, IgG, colágeno e albumina sérica humana no esfacelo, todos potenciais alvos para adesinas bacterianas. A ISP degradou eficientemente essas macromoléculas, mesmo na presença de atividade de gelatinase tecidual (como MMP-9, também detectada no esfacelo), sugerindo que a ISP pode remover o esfacelo e, consequentemente, os sítios de ancoragem bacteriana e os próprios biofilmes. Gürel T e Umur Ş (2024), em sua revisão, também destacam a capacidade

da quimotripsina larval de inibir a formação de biofilme de *S. epidermidis* e de ES reduzirem biofilmes de *Enterobacter cloacae* e *S. aureus*.

2.3 Controvérsias sobre efeitos antimicrobianos diretos

Apesar da identificação de PAMs e enzimas com atividade anti-biofilme, o efeito direto das larvas vivas ou ES brutas sobre o crescimento bacteriano planctônico é um ponto de debate. Cazander G, et al. (2009) investigaram a suscetibilidade de seis cepas bacterianas a larvas vivas de *L. sericata* (Instar-1 e Instar-3) e suas ES. Contrariamente ao esperado, larvas vivas geralmente promoveram um aumento no crescimento bacteriano para a maioria das espécies testadas (*S. aureus*, *K. oxytoca*, *S. pyogenes*, e *Staphylococcus* Coagulase-Negativa - SCN) em meio líquido. Apenas *P. aeruginosa* apresentou uma diminuição significativa do crescimento na presença de larvas Instar-3. As ES, testadas por ensaio turbidimétrico, não demonstraram inibição do crescimento bacteriano para nenhuma das cepas. Os autores postularam que o valor nutricional das ES poderia, em condições *in vitro*, sustentar o crescimento bacteriano, e que os benefícios clínicos da MDT poderiam advir de mecanismos indiretos, como a modulação imune, em vez de uma ação antibacteriana direta potente no contexto de crescimento planctônico. Esta observação contrasta com os achados de atividade de PAMs purificados como a lucifensina (ANDERSEN AS, et al., 2010) e ressalta a complexidade da interação. Gürel T e Umur Ş (2024) também mencionam o uso sinérgico entre TL e antibióticos como gentamicina, flucloxacilina, daptomicina e ciprofloxacino.

3. Mecanismos de desbridamento e promoção da cicatrização tecidual

O desbridamento eficaz e a estimulação dos processos de reparo são marcas registradas da TL.

3.1 Enzimas de desbridamento: proteases e glicosidases

A remoção de tecido necrótico é fundamental para a cicatrização. Telford G, et al. (2011) demonstraram que a quimotripsina I recombinante de *L. sericata* é resistente a importantes inibidores de protease endógenos presentes em feridas, como a $\alpha 1$ -antiquimotripsina e a $\alpha 1$ -antitripsina, embora seja inibida pela $\alpha 2$ -macroglobulina. Em contraste, a α -quimotripsina humana é inibida por todos esses compostos. Essa resistência da enzima larval permite sua atividade desbridante no ambiente hostil da ferida. Pritchard DI e Brown AP (2015) também confirmaram que a quimotripsina 1 (ISP) de *L. sericata* degrada diversas macromoléculas no esfacelo de UVP, como fibrinogênio, fibronectina, IgG e colágenos, e que essa atividade persiste na presença de gelatinases teciduais como a MMP-9.

Complementando a ação das proteases, as glicosidases também desempenham um papel. Telford G, et al. (2012) investigaram o potencial de desbridamento das glicosidases presentes nas ES de larvas de primeiro instar (ES1) de *L. sericata*. Eles identificaram que o esfacelo/escara de úlceras venosas crônicas continha predominantemente resíduos de α -D-glicosil, α -D-manosil e N-acetilglicosamina em suas proteínas. As ES1 continham as atividades correspondentes de α -D-glicosidase, α -D-manosidase e N-acetil- β -D-glicosaminidase, que se mostraram ser enzimas distintas. O tratamento do esfacelo/escara com ES1 reduziu significativamente a presença desses grupamentos de carboidratos, e o mesmo foi observado em amostras de esfacelo/escara de feridas tratadas *in vivo* com larvas. Os autores sugerem que a remoção desses açúcares pelas glicosidases larvais pode tornar as proteínas do esfacelo mais suscetíveis à digestão proteolítica subsequente, facilitando um desbridamento mais eficiente.

3.2 Estímulo à Angiogênese e Reparo Tecidual

A neoformação de tecido de granulação e a angiogênese são essenciais para o fechamento da ferida. Masiero FS, et al. (2015), em um estudo histopatológico utilizando larvas de *Cochliomyia macellaria* em lesões induzidas em ratos Wistar, observaram que o grupo tratado com TL apresentou resposta inflamatória e angiogênese abundantes. No sétimo dia, observaram-se muitos vasos sanguíneos recém-formados. Nassu MP e Thyssen PJ (2015), também trabalhando com *C. macellaria* em ratos Wistar, avaliaram diferentes densidades larvais (5, 15 ou 25 larvas/cm²). Embora não tenha havido diferença significativa no tempo total de cicatrização entre os grupos, o grupo LT 25 (25 larvas/cm²) apresentou maior vascularização nos tecidos em comparação com os outros tratamentos, sugerindo que uma maior densidade larval pode otimizar este efeito. Zhang J, et al. (2022) também relataram crescimento significativo de tecido de granulação em pacientes com UPD tratados com MDT. Dauros SP et al. (2017), no entanto, não encontraram efeitos diretos das ES na angiogênese *in vitro* em células endoteliais (HMEC-1), apesar das alterações transcricionais em genes relacionados, sugerindo que os efeitos pró-angiogênicos da TL *in vivo* podem ser mediados indiretamente, possivelmente através da modulação de citocinas ou outras células. No **Quadro 2**, há a relação dos principais achados em relação ao poder desbridativo, cicatricial e antimicrobiano da TL.

Quadro 2 - Ação antimicrobiana, pró-desbridamento e pró-cicatrização da TL.

Estudo	Alvo/Processo	Efeito Observado	Componentes Larvais
TELFORD G, et al. (2011)	Desbridamento (resistência a inibidores)	Quimotripsina I recombinante de <i>L. sericata</i> é resistente a α 1-antiquimotripsina e α 1-antitripsina (presentes em feridas).	Quimotripsina I.
PRITCHARD DI e BROWN AP (2015)	Desbridamento de esfacelo de Úlcera Venosa de Perna (UVP)	Quimotripsina 1 (ISP) degrada macromoléculas (fibrinogênio, fibronectina, IgG, colágenos) no esfacelo, mesmo na presença de MMP-9.	Quimotripsina 1 (ISP) de <i>L. sericata</i> .
TELFORD G, et al. (2012)	Desbridamento (remoção de glicanos)	ES1 removem resíduos de α -D-glicosil, α -D-manosil e N-acetilglicosamina de proteínas do esfacelo/escara.	Glicosidases em ES1 de <i>L. sericata</i> (α -D- glicosidase, α -D-manosidase, N-acetil- β -D- glicosaminidase).
MASIERO FS, et al. (2015)	Angiogênese, Resposta Inflamatória	Resposta inflamatória e angiogênese abundantes. Muitos vasos sanguíneos recém-formados no 7º dia.	Larvas de <i>Cochliomyia macellaria</i> .
NASSU MP e THYSSEN PJ (2015)	Angiogênese (densidade larval)	Maior vascularização tecidual com densidade larval de 25 larvas/cm ² .	Larvas de <i>Cochliomyia macellaria</i> .
DAUROS SP, et al. (2017)	Angiogênese (<i>in vitro</i>)	Sem efeitos diretos das ES na angiogênese de células endoteliais (HMEC-1) <i>in vitro</i> , apesar de alterações transcricionais.	ES de <i>L. sericata</i> .
ZHANG J, et al. (2022)	Tecido de granulação	Crescimento significativo de tecido de granulação.	MDT (presumivelmente <i>L. sericata</i>).
ANDERSEN AS, et al. (2010)	Bactérias Gram-positivas (<i>S. carnosus</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i>). Cepas de MRSA/GISA.	Atividade antimicrobiana (CIM 2–16 mg/L para sensíveis; 8→128 mg/L para resistentes). Sem atividade vs Gram-negativas.	Lucifensina (recombinante).
ČEŘOVSKÝ V e BÉM R (2014)	Bactérias Gram-positivas; <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Acinetobacter</i> sp.	Revisão: Lucifensina ativa vs Gram-positivas; MDT menos eficaz vs <i>Pseudomonas</i> / <i>Acinetobacter</i> .	Lucifensina.
GAO B e ZHU S (2014)	Bactérias Gram-positivas (incl. <i>S. aureus</i> / <i>S. epidermidis</i> resistentes) e Gram-negativas (<i>S. marcescens</i> , <i>S. typhimurium</i>).	Atividade antibacteriana potente, de amplo espectro, por ruptura da membrana.	Peptídeo NvBH (engenheirado de navidefensina2-2).
HARRIS LG, et al. (2009)	Biofilmes de <i>S. epidermidis</i> (dependentes de PIA ou Aap).	Inibição da formação de biofilmes nascentes. Desmantelamento de biofilmes pré-formados. Atividade termolábil, >10 kDa.	ES de <i>L. sericata</i> (provavelmente proteases/glicosidases).
PRITCHARD DI e BROWN AP (2015)	Macromoléculas alvo de MSCRAMM (fibrinogênio, fibronectina, IgG, colágeno) em esfacelo de UVP; Biofilmes estafilocócicos.	Degradação das macromoléculas do esfacelo. Potencial para remover biofilmes.	Quimotripsina 1 (ISP) de <i>L. sericata</i> .
CAZANDER G, et al. (2009)	<i>S. aureus</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>S. pyogenes</i> , SCN, <i>P. aeruginosa</i> .	Larvas vivas: Aumento do crescimento da maioria das bactérias; diminuição do crescimento de <i>P. aeruginosa</i> (Instar-3). ES: Sem inibição do crescimento.	Larvas vivas de <i>L. sericata</i> (Instar-1 e -3), ES de <i>L. sericata</i> .
GÜREL T e UMUR Ş (2024)	Biofilmes de <i>S. epidermidis</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>S. aureus</i> . Bactérias em geral.	Revisão: Quimotripsina inibe biofilme de <i>S. epidermidis</i> . ES reduzem biofilmes de <i>E. cloacae</i> , <i>S. aureus</i> . Sinergia com antibióticos.	ES, Quimotripsina.

Fonte: Oliveira HA, et al., 2025.

4. Resposta imune da larva à exposição a patógenos

A interação não é unilateral; as próprias larvas respondem imunologicamente aos microrganismos. McKenna CH, et al. (2022) investigaram a expressão gênica em larvas de *L. sericata* após exposição alimentar a *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. A exposição induziu a expressão diferencial de genes relacionados à imunidade, incluindo uma variedade de PAMs (Diptericinas, Cecropinas, Defensinas, Atacinas e Edinas) e outros efetores imunes como Pirk (um regulador negativo da via IMD) e IM18. A resposta a *P. aeruginosa* foi mais robusta e dependente do tempo em comparação com *A. baumannii*. Além dos genes imunes canônicos, genes não imunes relacionados a respostas intestinais, vias de sinalização (como Hippo e TOR) e formação da cutícula também foram afetados. Este estudo indica que as larvas possuem mecanismos para reconhecer e montar respostas imunes específicas aos patógenos, o que pode influenciar a eficácia da TL contra diferentes tipos de infecção e a produção de componentes terapêuticos. A regulação da própria resposta imune larval, como a indução de Pirk, sugere mecanismos de homeostase para evitar autotoxicidade ou gasto energético excessivo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em síntese, os estudos analisados demonstram que a Terapia Larval é um processo bioativo complexo, cujos efeitos vão além do desbridamento e da ação antimicrobiana. As larvas e suas secreções (ES) modulam significativamente a resposta imune do hospedeiro, atenua a inflamação crônica promovendo um ambiente favorável à angiogênese, à formação de tecido de granulação e à cicatrização. No entanto, controvérsias ainda persistem, especialmente quanto à extensão da atividade antimicrobiana observada *in vitro* em comparação ao contexto *in vivo*, bem como à identificação e compreensão dos mecanismos de ação das moléculas bioativas envolvidas. Tais lacunas indicam a necessidade de investigações contínuas, que contribuam para a otimização e ampliação do uso terapêutico dessa promissora estratégia baseada na interação parasito-hospedeiro.

AGRADECIMENTOS E FINANCIAMENTO

Agradecimento ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas por tornar essa pesquisa possível. Esse estudo não foi financiado.

REFERÊNCIAS

1. ANDERSEN AS, et al. A novel approach to the antimicrobial activity of maggot debridement therapy. *J Antimicrob Chemother*, 2010; 65(8):1646-1654.
2. AROMATARIS E, MUNN Z (Orgs.). *JBIManual for Evidence Synthesis*. [S.l.]: JBI, 2020.
3. CAZANDER G, et al. Do maggots have an influence on bacterial growth? A study on the susceptibility of strains of six different bacterial species to maggots of *Lucilia sericata* and their excretions/secretions. *J Tissue Viability*, 2009; 18(3):80-87.
4. CAZANDER G, et al. Maggot excretions affect the human complement system. *Wound Repair Regen*, 2012; 20(6):879-886.
5. ČEŘOVSKÝ V, BÉM R. Lucifensins, the insect defensins of biomedical importance: the story behind maggot therapy. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2014; 7(3):251-264.
7. DAUROS SP, et al. The transcriptional responses of cultured wound cells to the excretions and secretions of medicinal *Lucilia sericata* larvae. *Wound Repair Regen*, 2017; 25(1):51-61.
8. GAO B, ZHU S. An insect defensin-derived β -hairpin peptide with enhanced antibacterial activity. *ACS Chem Biol*, 2014; 9(2):405-413.
9. GÜREL T, UMUR Ş. Can parasites be useful? *Türkiye Parazitolo Derg*, 2024; 48(2):120-127.
10. HARRIS LG, et al. Disruption of *Staphylococcus epidermidis* biofilms by medicinal maggot *Lucilia sericata* excretions/secretions. *Int J Artif Organs*, 2009; 32(9):555-564.
11. JIANG KC, et al. Excretions/secretions from bacteria-pretreated maggot are more effective against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLOS ONE*, 2012; 7(11):e49815.
12. MARCONDES C. *Terapia larval de lesões de pele causadas por diabetes e outras doenças*. Florianópolis: Editora da UFSC, 2006; 88p.
13. MASIERO FS. *O uso de larvas de dípteros (Arthropoda: Insecta) para o tratamento de lesões tegumentares: uma abordagem multissistêmica*. Tese (Doutorado em Microbiologia e Parasitologia) – Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019; 207p.
14. MASIERO FS, NASSU MP, SOARES MP, THYSSEN PJ. Histological patterns in healing chronic wounds using *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) larvae and other therapeutic measures. *Parasitol Res*, 2015; 114(8):2865-2872.
15. MCKENNA CH, et al. Gene expression in *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) larvae exposed to *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* identifies shared and microbe-specific induction of immune genes. *Insect Mol Biol*, 2022; 31(1):85-100.
16. MUMCUOGLU KY, et al. Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol*, 2001; 38(2):161-166.
17. NASSU MP, THYSSEN PJ. Evaluation of larval density *Cochliomyia macellaria* F. (Diptera: Calliphoridae) for therapeutic use in the recovery of tegumentar injuries. *Parasitol Res*, 2015; 114(9):3255-3260.
18. NITSCHKE MJT. *Avaliação da recuperação das lesões cutâneas por meio da terapia larval utilizando como modelos ratos Wistar*. Tese (Doutorado em Terapia Larval) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências de Botucatu, 2010; 51p.
19. PAGE MJ, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*, 2021; 372:n71.
20. PECIVOVÁ J, et al. Effect of the extract from salivary glands of *Lucilia sericata* on human neutrophils. *Neuro Endocrinol Lett*, 2008; 29(5):794-797.
21. PRITCHARD DI, BROWN AP. Degradation of MSCRAMM target macromolecules in VLU slough by *Lucilia sericata* chymotrypsin 1 (ISP) persists in the presence of tissue gelatinase activity. *Int Wound J*, 2015; 12(4):414-421.

22. SIMMONS, SW. A bactericidal principle in excretions of surgical maggots which destroys important etiological agents of pyogenic infections. *J Bacteriol*, 1935; 30(3):253-67.
23. TAMURA T, CAZANDER G, ROOIJAKKERS SH, TROUW LA, NIBBERING PH. Excretions/secretions from medicinal larvae (*Lucilia sericata*) inhibit complement activation by two mechanisms. *Wound Repair Regen*, 2017; 25(1):41-50.
25. TELLEZ G, PIXLEY C, WOLFENDEN RE, et al. Probiotics/direct fed microbials for *Salmonella* control in poultry. *Food Res Int*, 2012; 45:628–633.
26. TELFORD G, BROWN AP, KIND A, ENGLISH JS, PRITCHARD DI. Maggot chymotrypsin I from *Lucilia sericata* is resistant to endogenous wound protease inhibitors. *Br J Dermatol*, 2011; 164(1):192-196.
27. TELFORD G, BROWN AP, RICH A, ENGLISH JS, PRITCHARD DI. Wound debridement potential of glycosidases of the wound-healing maggot, *Lucilia sericata*. *Med Vet Entomol*, 2012; 26(3):291-299.
28. THYSSEN PJ, FERRAZ JB, MASIERO FS, SUGUIMOTO PU, SILVA SM. Terapia do desbridamento larval: como a biologia atua em favor da reparação e cicatrização tecidual. In: LEITE CRM, PARISI MC, ROSA MFF (Orgs.). *Interdisciplinaridade no contexto das doenças dos pés no diabetes*. Mossoró: EDUERN, 2021; p. 225-250.
30. VAN DER PLAS MJ, BALDRY M, VAN DISSEL J, JUKEMA G, NIBBERING PH. Maggot secretions suppress pro-inflammatory responses of human monocytes through elevation of cyclic AMP. *Diabetologia*, 2009; 52(9):1962-1970.
32. VAN DER PLAS MJ, JUKEMA GN, WAI SW, DOGTEROM-BALLERING HCM, LAGENDIJK EL, VAN GULPEN C, NIBBERING PH. Maggot excretions/secretions are differentially effective against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*, 2007; 61(1):117–122.
34. ZHANG J, et al. Maggot treatment promotes healing of diabetic foot ulcer wounds possibly by upregulating Treg levels. *Diabetes Res Clin Pract*, 2022; 184:109187.

7. CAPÍTULO 2

Method of laboratory rearing of flies *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius, 1805) and *Hemilucilia semidiaphana* (Rondani, 1850) for therapeutic purposes

Método de criação laboratorial das moscas *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius, 1805) e *Hemilucilia semidiaphana* (Rondani, 1850) para fins terapêuticos

Received: 10-02-2024 | Accepted: 15-03-2024 | Published: 21-03-2024

Priscila Gonçalves Jacinto Figuerêdo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3965-2538>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: pris.fly2@gmail.com

CPF: 026.829.141-10

José Fernando Marques Barcellos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2149-7899>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: fmarques@ufam.edu.br

Maria do Carmo Queiroz Fialho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9161-1074>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: mcqfialho@ufam.edu.br

Marcelo Cutrim Moreira de Castro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7147-5300>

Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas, Brasil

E-mail: marcelocutrim@gmail.com

José Albertino Rafael

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0170-0514>

Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas, Brasil

E-mail: jarafael@inpa.gov.br

Jonatas de Souza Queiroz

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1083-9670>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: jonatas.queiroz@ufam.edu.br

Mariana Toniolli de Freitas

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8292-5781>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: mariana.toniollif@gmail.com

Adriano Figuerêdo Neves

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7084-6181>

Centro Universitário Luterano de Manaus-AM, Brasil

E-mail: adriano.neves@ulbra.br

ABSTRACT

The blowflies *Hemilucilia segmentaria* and *Hemilucilia semidiaphana* are species of forensic importance and, as scavengers, they have potential in Larval Therapy (LT). LT consists of sterile fly larvae to treat lesions with necrotic tissue. It is a descriptive exploratory laboratory and field study, which aims to describe the methods of rearing flies under laboratory conditions for therapeutic purposes. The staging period from egg to adult was 10.1 days for *H. semidiaphana* and 12.2 days for *H. segmentaria*. Considering that they are neotropical species, they need a room temperature ranging from 27 to 29 °C, humidity of 80± 10% and a light/dark cycle of 12 hours were adopted. The larvae were feeded with ground beef in room temperature and the adult diet varied according to the purpose of rearing. In the egg sterilization process for LT, the most accessible solution, which achieved the highest egg hatching rate, was 1% sodium hypochlorite. The aim of study is to use the larvae to treat injuries. The breeding methods can be use any scientific purposes that require evaluating these species.

Keywords: Diptera; Calliphoridae; Larvae; Therapy; Procedures and Techniques Utilization.

RESUMO

As moscas-varejeiras *H. segmentaria* e *H. semidiaphana* são espécies de importância forense e, por serem necrófagas, possuem potencial para serem usadas em Terapia Larval (TL). A TL consiste no uso de larvas estéreis de moscas para tratamento de lesões com tecido necrótico. Trata-se de um estudo exploratório descritivo de campo e de laboratório, que objetivou descrever os métodos de criação das moscas em condições de laboratório para fins terapêuticos. O período de desenvolvimento de ovo a adulto foi de 10,1 dias para *H. semidiaphana* e 12,2 dias para *H. segmentaria*. Considerando que são espécies neotropicais, adotou-se temperatura de 27 a 29 °C (graus), umidade de 80± 10% e ciclo luz/ escuridão de 12 horas. As larvas foram alimentadas com carne bovina moída em temperatura ambiente e a dieta do adulto variou de acordo com a finalidade da criação. No processo de esterilização dos ovos para TL, a solução mais acessível e que obteve maior taxa de eclosão dos ovos, foi o hipoclorito de sódio a 1%. Apesar de o estudo ter a finalidade de utilização das larvas para tratamento de lesões, os métodos de criação aqui apresentados, podem ser utilizados para quaisquer fins científicos que necessitem avaliar essas espécies.

Palavras-chave: Diptera; Calliphoridae; Larvas; Terapia; Utilização de Técnicas e Procedimentos.

INTRODUÇÃO

Califorídeos

Moscas-varejeiras da família Calliphoridae possuem importante papel no desenvolvimento de várias funções ecológicas. Dentre algumas funções que podem ser preocupantes na perspectiva da saúde pública, está o transporte mecânico para diversos patógenos. Isso ocorre, devido a afinidade que os adultos de califorídeos possuem com a matéria orgânica em decomposição. Como por exemplo, excremento humano ou animal, lixões, e carcaças de animais (Carneiro *et al.*, 2014). Além disso, também podem ser associadas à miíase em animais de sangue quente, inclusive o homem (Azevedo *et al.*, 2015).

Entretanto, califorídeos apresentam funções benéficas para o meio em que vivem e para o homem. São importantes polinizadores de plantas com flores (Silva *et al* 2001) são frequentemente avaliados em estudos de entomologia forense, onde auxiliam na determinação

do intervalo pós- morte (Vasconcellos *et al.*, 2015) constituindo o tipo mais comum de evidências de insetos coletadas durante uma investigação criminal (Catts; Haskell, 1990); ou são considerados para uso na terapia larval, que é caracterizada pela utilização de larvas estéreis de moscas para o tratamento de feridas de difícil cicatrização (Nitsche, 2010). As fêmeas de Calliphoridae usam substratos ricos em proteínas para oviposição, potencializando o pleno desenvolvimento dos estágios imaturos (Stevens, 2003). A família possui distribuição mundial e está composta por espécies típicas de diferentes ambientes, sejam florestais, rurais ou urbanos.

A distribuição sazonal dos califorídeos é muito influenciada pela variação das condições climáticas (Ferreira; Lacerda, 1993), podendo cada espécie reagir de diferentes formas, não sendo apenas esses os fatores que atuam na dinâmica populacional de dípteros.

Hemilucilia

O gênero *Hemilucilia* inclui seis espécies endêmicas da América Central e da América Sul (Marinho; Madeira-Ott, 2024; Tyssen; Linhares, 2007). Dentre elas, *H. segmentaria* e *H. semidiaphana* são consideradas assinantrópicas, ou seja, evitam locais urbanos (Otsuka, 2008), sendo mais facilmente encontradas em áreas silvestres e em menor proporção em áreas rurais.

A baixa abundância populacional dessas duas espécies em ambientes urbanos e semiurbanos, por vezes, era associada diretamente com a presença de califorídeos exóticos, porém não significa que essas espécies tiveram suas populações reduzidas devido à competição com as espécies invasoras, pois já eram consideradas raras antes da chegada das espécies exóticas (Ferreira, 1978).

A *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius, 1805) tem registro em El Salvador, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Equador, Bolívia, Peru, Guiana, Brasil, Paraguai, Argentina (Dear, 1985), Chile e no México (Fraga, 2004). É caracterizada como necrófaga, pelo hábito das larvas alimentarem-se de matéria animal em decomposição (Thyssen; Linhares 2007); por isso tem se destacado em estudos feitos em muitas localidades em todo o Brasil. É registrada quase exclusivamente em áreas de floresta (Ferraz *et al.*, 2010; Souza; Zuben 2012) e quando em área urbana, ocorre principalmente em fragmentos de floresta (Figueiredo *et al.*, 2018).

Em área de floresta em Manaus-AM esteve entre as espécies mais abundantes em cadáveres (Fraga 2004; Rodrigues 2008); também foi registrada em área urbana (Barros-Souza; Ferreira-Keppler; Agra, 2012; Souza 2009) entre as menos abundantes. O primeiro registro do uso de *H. segmentaria* em investigação criminal para estimar o intervalo pós morte, ocorreu em

Minas Gerais (Kosmann *et al.*, 2011) e o segundo relato foi no Amazonas, em Manaus, com base nos dados do desenvolvimento de imaturos e comportamento de colonização (Souza *et al.*, 2014).

A *Hemilucilia semidiaphana* (Rondani, 1850) também ocorre em região neotropical, desde o México até a Argentina (Baumgartner; Greenberg, 1985). É parecida com a espécie anterior, tanto em comportamento quanto em morfologia, apesar de ter menor porte. Já foi considerada sinônimo de *H. segmentaria* (James, 1970). Também é necrófaga, e em estudos de entomologia forense sempre é registrada como a espécie colonizadora subsequente à *H. segmentaria* (Fraga, 2004).

Por serem necrófagas, as larvas de ambas as espécies têm potencial para serem usadas em Terapia Larval.

Terapia larval

A Terapia Larval (TL), também conhecida como Bioterapia ou Larvoterapia faz uso de organismos vivos, ou dos produtos produzidos por estes, com finalidades terapêuticas (Tyssen *et al.*, 2021). A TL consiste no uso de larvas estéreis de moscas, em lesões com presença de tecido desvitalizado, que podem ser encontradas em feridas de diversas etiologias, especialmente nas crônicas. A TL reduz o número de micro-organismos presentes, diminui ou elimina o odor fétido e promove o crescimento de tecido viável - essencial para cicatrização (Pinheiro, 2014).

Essa terapia é realizada em diversos países, como Estados Unidos da América, alguns países da Europa, Austrália, Israel, Colômbia entre outros, através da parceria feita com empresas e institutos que viabilizam a produção estéreis das larvas (Nítche, 2010), e sua aplicação é considerada segura, conforme a Sociedade Internacional de Bioterapia (IBS, 2024).

No Brasil, ainda que estudos estejam sendo desenvolvidos, a aplicabilidade ainda é escassa, e um dos fatores impedidores de sua utilização é o desconhecimento dos profissionais de saúde e dos usuários dos serviços acerca da ecologia das moscas (Franco *et al.*, 2016).

Para que uma espécie de mosca possa ser considerada para TL, é preciso distingui-las quanto ao tipo de miíase que podem causar. Aquelas que se alimentam de tecido animal, são chamadas de causadoras de miíase.

As moscas podem causar dois tipos de miíases: (i) obrigatórias, quando se alimentam de tecidos vivos; e (ii) facultativas, quando se alimentam de

tecidos mortos. No Brasil, apenas duas espécies de moscas estão associadas com miíases obrigatórias: *Cochliomyia hominivorax* (responsável pela bicheira) e *Dermatobia hominis* (responsável pelo berne). As demais espécies se alimentam de fezes, lixo e matéria orgânica em decomposição, incluindo tecidos mortos (causando oportunamente as miíases facultativas), e é deste grupo que são selecionadas as moscas que terão alguma finalidade terapêutica. (Tyssen *et al.*, 2021, p.9).

Durante a alimentação das larvas ocorre o debridamento ocasionado por meio de mecanismos físicos dos ganchos orais (das larvas) ou por meio de processos químicos (usando enzimas digestivas proteolíticas). Ambos os procedimentos, facilitam a restauração do tecido lesionado devido à eliminação dos elementos necróticos (Masiero *et al.*, 2015).

Além disso, dentre os inúmeros benefícios das secreções larvais, está o potencial bactericida e bacteriostático, por exemplo contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (Masiero, 2017); controle de biofilme bacteriano, devido a presença das defensinas (Masiero, 2019) ; modulação da resposta imune, pela inibição da liberação de peróxido de hidrogênio pelos neutrófilos e de enzimas, como a elastase, responsáveis pela fase inflamatória persistente e pela demora na cicatrização e também, enzimas proteolíticas ainda não identificadas, capazes de recrutar células que estimulam a proliferação de fibroblastos e a produção de fibras de colágeno, como observado por Masiero *et al.* (2015).

No Brasil, os Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul e Distrito Federal encontram-se com estudos em andamento para identificar diferentes tipos de moscas encontradas na região, seus produtos e seu uso adequado no tratamento de feridas (Nassu; Thyssen, 2015).

Nesse contexto, este estudo objetiva descrever os métodos de criação das moscas em condições de laboratório para fins terapêuticos e apresentar dados biológicos sobre tempo de desenvolvimento desde ovo até adulto para as espécies de moscas abundantes na Amazônia que tem potencial para a terapia larval, assim como, descrever os métodos de esterilização dos ovos para viabilizar o processo.

MÉTODOS E RESULTADOS DOS PROCESSOS

Tipo do Estudo, Local de realização e Aspectos Éticos

Trata-se de um estudo exploratório descritivo de campo e de laboratório, que buscou adaptar o ambiente artificial do laboratório ao mais próximo do habitat natural e das condições

necessárias ao desenvolvimento biológico das espécies de moscas, *H. segmentaria* e *H. semidiaphana*.

O estudo foi desenvolvido no Laboratório Multidisciplinar de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas- ICB, vinculado à Universidade Federal do Amazonas-UFAM. Considerando as características das espécies estudadas e o longo período de adaptação dos métodos para se obter êxito, o estudo perdurou de abril de 2021 a janeiro de 2024. A coleta das moscas foi iniciada após aprovação pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, registrado com SEI 01280.000034/2021-09.

Coleta e Transporte das Moscas

Para início da colônia, a coleta de moscas adultas das duas espécies foi realizada na Reserva Florestal Adolpho Ducke, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), localizada na Rodovia AM-010, Km-26, a leste da Cidade de Manaus- AM.

O substrato utilizado para atrair ambas as espécies de moscas, foi cadáver de coelho, eutanasiado 1 (uma) hora antes da exposição na mata (**Figura 1**). Considerando que as espécies em estudo são importantes instrumentos forenses e estão diretamente ligadas à decomposição orgânica, optou-se pela utilização do coelho, pelo pequeno porte e por ser mamífero. A espécie de coelho utilizada foi a *Oryctolagus cuniculus domesticus*, independente de sexo, com 12 semanas, pesando aproximadamente 1800g, preferencialmente na cor branca para facilitar o reconhecimento das moscas no campo.

Figura 1- Cadáver de coelho utilizado como substrato para captura das moscas.



Fonte: Dados da pesquisa (2024).

As moscas foram coletadas com uso de rede entomológica (puçá) e separadas previamente pelas características morfológicas destacadas (coloração verde acastanhada; ponto pigmentado da cor preta localizado nas extremidades externas das asas, corpo afilado e asas bem próximas ao eixo abdominal, quando em repouso) sendo alocadas individualmente em tubos falcons de 50 ml, contendo pequena porção de carne bovina moída em temperatura ambiente. Os tubos falcons foram armazenados em estantes de tubos de ensaio para evitar deslocamento do substrato e possível morte do adulto por esmagamento (**Figura 2-A/B**). Após coleta satisfatória, em torno de 100 adultos capturados foram conduzidos ao laboratório para confirmação das espécies e início da aplicação dos métodos laboratoriais para criação.

Figura 2- Materiais utilizados para captura e alocação da mosca em campo.



A - Rede entomológica (puçá) **B** - Tubos falcons de 50ml com carne bovina moída

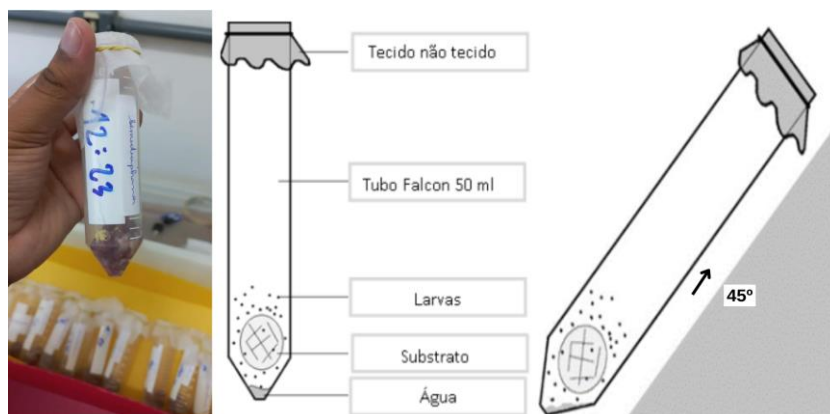
Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Separação e manejo das espécies

A circunstância de contenção no tubo, induzia na maioria das vezes, à oviposição. Os adultos foram retirados dos tubos e para confirmação da espécie foi realizada observação sob um estereomicroscópio. O processo geralmente ocasionava a morte do adulto, que então foi separado em microtubos Eppendorf (1,5 ml) e conservado em via úmida (álcool 70%) para formar o acervo de provas.

Já as posturas de ovos foram mantidas no tubo falcon vedado com tecido não tecido-TNT e liga elástica. Isso permitia a troca gasosa e favoreceu a eclosão dos ovos horas depois. Os tubos foram mantidos na posição de 45° graus para evitar que as larvas se afogassem no conteúdo líquido. (**Figura 3**).

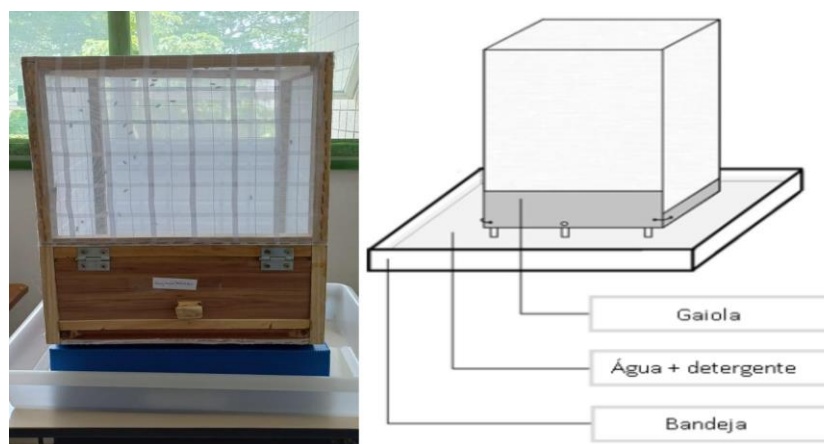
Figura 3- Adaptação e armazenamento dos tubos falcons com posturas de ovos/larvas.



Fonte: Dados da pesquisa (2024)

Para evitar a invasão de espécies oportunistas os tubos falcons foram acondicionados dentro de gaiolas e estas apoiadas sobre bandejas plásticas contendo solução de água + detergente (**Figura 4**). Essa técnica impedia o acesso de outros insetos, devido à capacidade de diminuir a tensão superficial da água (Ulisses *et al.*, 2017).

Figura 4 - Gaiola e alocação sob recipiente.



Fonte: Dados da pesquisa (2024)

Condições do ambiente e Tempo de desenvolvimento dos estágios imaturos (ovo, larva e pupa) e adulto em laboratório

Em busca de parâmetros similares ao encontrado no ambiente de mata, foi realizada coleta de temperatura e umidade no mês de outubro (mês de transição do período de seca para período chuvoso) no ponto de trilha da Área de Preservação Ambiental (APA) localizada no entorno das instalações prediais do Campus da Universidade Federal do Amazonas- Setor Norte. A temperatura encontrada e adotada para os experimentos foi de 27 a 29 C° (graus), umidade relativa do ar de $80 \pm 10\%$ e ciclo luz/ escuridão de 12 horas.

Durante o período do estudo foram realizadas 5 (cinco) coletas para formação da colônia e avaliação do ciclo biológico de ambas as espécies de moscas. Determinou-se então, o tempo médio em horas, das fases de desenvolvimento de ovo a adulto em condições de laboratório (**Tabela 1**).

Tabela 1- Apresentação da média do tempo de desenvolvimento, em horas, das espécies criadas em condições de laboratório.

Estágios de desenvolvimento	Tempo de desenvolvimento em horas (h)	
	H. semidiaphana	H. Segmentaria
Ovo	16,8 (n = 540)	14,2 (n = 514)
1º instar larval	16,9 (n = 403)	16,3 (n = 497)
2º instar larval	21,2 (n = 391)	13,5 (n = 455)
3º instar larval	38,2 (n = 365)	42,9 (n = 312)
Pré-pupa	26,2 (n = 309)	50,3 (n = 296)
Pupa	123,1 (n = 202)	155,6 (n = 211)
Ovo a adulto	242,4 (d = 10,1)	292,8 (d = 12,2)

(n) = número de ovos, de espécimes por estágio larval, de pré-pupa e pupa utilizados.

(d) = dias

Fonte: Dados da pesquisa (2024)

Durante o primeiro e segundo instar, as larvas foram mantidas nos tubos falcons com reposição de substrato e umidade (carne bovina moída e 2 gotas de água) sempre que necessário. Na transição para o terceiro instar larval, as larvas foram removidas dos tubos para potes de plástico transparente de 500ml e tampa adaptada com tecido voil. Além disso, foi acrescentado mais substrato e papel toalha úmido dentro do pote. Nesse cenário permaneceram do terceiro instar larval até o estágio de pré-pupa (**Figura 5-A**).

O estágio de pré-pupa caracterizado pela semelhança morfológica com o instar larval 3, e associado a perda de interesse pelo substrato, além do comportamento de dispersão, fuga do local de alimentação, foi descrito no estudo de Pires *et al.*, (2010). Nessa fase de pré-pupa,

foram colocadas em recipientes com 3/4 (três- quartos) de Vermiculita Expandida para empupar (**Figura 5-B**). Posteriormente, os recipientes com as pupas foram transferidos para dentro das gaiolas, separadas por espécie. Essa estratégia facilita a emergência das moscas adultas diretamente dentro da gaiola.

Figura 5- Recipientes utilizados para alocação de imaturos, de ambas as espécies.



A- Potes com larvas contendo substrato e papel toalha úmido; **B-** Pote com pupas imersas na Vermiculita Expandida.

Fonte: Dados da pesquisa (2024)

Dieta para imaturos e adultos

A alimentação dos imaturos (larvas) foi realizada com carne bovina moída em temperatura ambiente. A quantidade ofertada foi relativa à necessidade diária de cada fase de desenvolvimento e do quantitativo de imaturos em cada pote, aproximadamente 40 gramas de carne (equivalente a duas colheres de sopa cheias) diariamente.

Para a manutenção dos espécimes adultos, as dietas testadas foram preparadas e oferecidas em placas de Petri 60 x 15 mm. As opções exitosas de dietas para alimentação de adultos de *H. segmentaria* e *H. semidiaphana* estão apresentadas na (**Figura 6**).

Figura 6- . Dietas testadas para adultos, modo de preparo e finalidade

Dieta para Adultos	Modo de preparo	Finalidade da Dieta
H.semidiaphana H. segmentária ////// Dieta A (Associação)	////// - Solução pastosa: 20 ml de água filtrada + 2 colheres de sopa de Farinha Láctea ou Cereal Infantil Multicereais, diluídos em placa de Petri 60x15mm; - Solução de sacarose: 60 gramas de açúcar cristalizado para 500 ml de água filtrada, usar 15ml da solução no algodão em placa de Petri 60x15mm; - Água: usar 10 ml no algodão em placa de Petri.	////// Manutenção do espécime vivo em cativeiro
////// Dieta B (Associação)	////// - Fígado bovino liquidificado: 50g diárias, ofertar em placa de Petri de 60x15mm; - Solução de sacarose: 60 gramas de açúcar cristalizado para 500 ml de água filtrada, usar 15ml da solução no algodão em placa de Petri 60x15mm; - Água: usar 10 ml no algodão em placa de Petri.	////// Nutrição dos adultos para oviposição
////// Dieta C	////// Carne moída: Em temperatura ambiente por 24h, 50g de carne ofertado em placa de Petri no 4º/5º dia após emersão da mosca.	////// Estímulo à oviposição / coleta das posturas de ovos para esterilização e aplicação da Terapia Larval

Fonte: Dados da pesquisa (2024)

Processo de esterilização dos ovos para viabilizar a Terapia Larval

O método de esterilização dos ovos das espécies *H. segmentaria* e *H. semidiaphana* foi adaptado do estudo de Pércio et al (2017), no qual testou métodos compatíveis para a espécie *Chrysomya megacephala*. Entre as soluções esterilizantes avaliadas, estavam Hipoclorito de sódio a 1% (NaClO) e Formaldeído a 5%. Considerando a solução mais acessível e que obteve maior taxa de eclosão dos ovos, optou-se pelo uso de Hipoclorito de sódio a 1%.

A *priori*, o experimento foi realizado para ambas espécies em triplicata e cada grupo com 50 ovos. As posturas de ovos foram extraídas do substrato (carne moída) utilizando uma haste de plástico usada para inoculação. O manejo com a haste permitiu que a massa de ovos fosse removida por completo. Em seguida, sob uma capela de fluxo laminar, três beckers de 50 ml foram preparados com as seguintes soluções: Hipoclorito de sódio a 1% (NaClO) e água destilada estéril na segunda e terceira amostra.

Os ovos foram colocados sobre um (voil) estéril e com auxílio de luvas e pinças foi formada uma pequena trouxa. A trouxa foi emergida por 3 (três) minutos no produto esterilizante, seguido de duas lavagens em água destilada por 2 (dois) minutos cada. Para os testes de crescimento microbiológico, foram retirados da última amostra de lavagem dos ovos, uma alíquota de 100µL. Com auxílio de swab, as amostras foram semeadas em placas de Petri

contendo meio Brain Heart Infusion Agar (BHA), Sabouraud dextrose agar (SDA) e Ágar Nutriente (AN). As placas foram mantidas até 7 dias com temperatura de 37°C, em uma estufa BOD (Biochemical Oxygen Demand).

Para garantir que o processo de obtenção de larvas estéreis para fins terapêuticos fosse exitoso, dez larvas de cada espécie foram maceradas em 1000µL de água destilada estéril. Deste macerado, em triplicata, alíquotas de 100µL foram novamente semeadas em BHA, ágar nutriente e SDA, sendo mantidas até 7 dias com temperatura de 37°C em estufa BOD para confirmar a ausência de crescimento microbiológico.

Após o processo de imersão dos ovos, as trouxas foram desfeitas e acondicionadas em potes de coleta estéril contendo meio Ágar Nutriente. Nas tampas rosqueáveis foram realizados microfuros com agulhas estéreis para permitir o aporte de oxigênio. Os potes foram mantidos sob a temperatura de 27 a 29° C e aproximadamente 14 a 16 horas depois, ocorreram a eclosão de 70% dos ovos.

DISCUSSÃO

Ao acompanhar o desenvolvimento biológico das espécies de moscas *H. semidiaphana* e *H. segmentaria* em condições de laboratório, comparou-se os achados com o estudo de Fraga (2004) e Thyssen (2005).

O estudo de Fraga (2004) foi realizado na Reserva Adolpho Ducke, Manaus-Amazonas, e os comportamentos descritos para *H. segmentaria* foram: oviposição 3 horas após a exposição de carcaça, principalmente nos estágios fresco e de inchamento (maior número de espécimes entre 15:00 e 19:00h); ciclo de desenvolvimento de ovo a adulto na estação seca: 293,6 h (12,2 dias). Para *H. semidiaphana* foram: oviposição 3 a 4h após a exposição de carcaça, principalmente nos estágios fresco e de inchamento (maior número de espécimes entre 15:00 e 19:00h); ciclo de desenvolvimento de ovo a adulto na estação seca: 235,3h (9,8 dias).

Durante a realização do estudo, observou-se no campo que as moscas foram atraídas pelo odor cadavérico e surgiam cerca de 1 hora após a exposição do coelho na mata (estágio fresco). O comportamento de oviposição para ambas as espécies foi similar ao descrito por (Fraga, 2004). Foram observadas várias tentativas de oviposição antes da captura com o puçá. Focinho, patas, orelhas e rabo, eram os segmentos corporais mais visitados pelos espécimes. Em relação ao horário de maior visitação ao cadáver, assim como descrito no estudo de Fraga

(2004), o período da tarde, mais precisamente no final do dia, o fluxo foi intensificado, ao ponto de impedir que outras espécies se aproximassem.

Apesar do lapso temporal e mudanças do ambiente ao longo dos anos, ainda foi possível observar semelhança no período de desenvolvimento de imaturos a adultos, de ambas as espécies. Os resultados deste estudo podem estar associados ao de Fraga (2004) por terem sido desenvolvidos em períodos e condições climáticas semelhantes.

No entanto, os dados relacionados ao período de desenvolvimento de imaturos a adultos descritos por Thyssen (2005), divergiu deste estudo, mesmo considerando condições de laboratório e parâmetros climáticos semelhantes (30 C°/ UR 70 ±10%). Foi observado discrepância no quantitativo de horas/dias do ciclo biológico registrados para *H. semidiaphana*, respectivamente 393 h (16,3 dias), enquanto foram encontrados 242,4 h (10,1 dias). Em relação a *H. segmentária*, a diferença foi menor, sendo 298 h (12,4 dias), enquanto foram verificados 292,8 h (12,2 dias).

No que diz respeito à dieta, após testar dietas apresentadas no Protocolo de criação da mosca *Chrysomya megacephala* (Gama *et al.*, 2021), houve morte em massa das espécies deste estudo. Não é possível afirmar que as espécies são totalmente intolerantes à dieta do protocolo, pois pode haver outros fatores associados que não foram mensurados, como por exemplo, o tempo de vida do adulto. Todavia, as tentativas de adaptação para a dieta foram suspensas pelo receio da perda de mais espécimes.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora a principal finalidade de se estabelecer método de criação para essas espécies esteja relacionado a possibilidade de utilização das larvas para terapia larval, as técnicas descritas possibilitam o acompanhamento do ciclo biológico para quaisquer fins científicos. Por se tratar de espécies de interesse forense, estudos com essa temática podem necessitar do método aqui apresentado.

Cabe destacar que os parâmetros climáticos adotados no estudo, são condizentes ao encontrado na floresta tropical amazônica. As espécies assinantrópicas estudadas, requereram a reprodução das condições de mata para o laboratório. Desse modo, justifica-se a adoção de temperatura e umidade mais alta do que a relatada na literatura.

Até o presente momento, não foram encontrados registros do uso de *H. segmentaria* e *H. semidiaphana* para fins terapêuticos. Contudo, o estudo pode colaborar na inserção dessas espécies de moscas necrófagas para TL no Brasil. As espécies são abundantes na floresta amazônica, que é encontrada em áreas preservadas dentro ou no entorno dos ambientes urbanos do Estado do Amazonas. Associado à disponibilidade das espécies, a região Norte como um todo, possui elevada demanda de saúde pública voltada para o tratamento de feridas crônicas, logo, a adoção de terapias alternativas eficazes e de baixo custo como a TL, poderiam minimizar os danos gerados ao paciente e consequentemente ao Sistema Único de Saúde.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) (Programa POSGRAD [#002/2023]). Os financiadores não tiveram papel no desenho do estudo e na decisão de publicação ou na preparação do manuscrito.

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, W. T. de A. *et al.* Record of the First Cases of Human Myiasis by *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae), Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, [s. l.], v. 52, n. 6, p. 1368–1373, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jme/tjv130>. Acesso em: 22 fev. 2024.
- BARROS-SOUZA, A. S.; FERREIRA-KEPPLER, R. L.; AGRA, D. de B. Development Period of Forensic Importance Calliphoridae (Diptera: Brachycera) in Urban Area Under Natural Conditions in Manaus, Amazonas, Brazil. **EntomoBrasilis**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 99–105, 2012. Disponível em: <https://www.entomobrasilis.org/index.php/ebbras/article/view/ebrazilis.v5i2.201>. Acesso em: 22 fev. 2024.
- BAUMGARTNER, D. L.; GREENBERG, B. Distribution and Medical Ecology of the Blow Flies (Diptera: Calliphoridae) of Peru1. **Annals of the Entomological Society of America**, [s. l.], v. 78, n. 5, p. 565–587, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/aesa/78.5.565>. Acesso em: 22 fev. 2024.
- CARNEIRO, J. S. *et al.* Bacteria carried by *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) in Sinop, Mato Grosso, Brazil. **Scientific Electronic Archives**, [s. l.], v. 6, p. 18–22, 2014. Disponível em: <https://sea.ufr.edu.br/SEA/article/view/57>. Acesso em: 22 fev. 2024.
- CATTS, E. P.; N. H. HASKELL. 1990. Entomology and death: a procedural guide. **Clemson, Joyce's Print Shop**, 182 p.
- DEAR, J. P. A revision of the New World Chrysomyini (Diptera: Calliphoridae). **Revista Brasileira de Zoologia**, [s. l.], v. 3, p. 109–169, 1985. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rbzool/a/p9W3mJqFWfjZ36KQ9TWVfdv/?lang=en>. Acesso em: 22 fev. 2024.

FERRAZ, A. C. P.; GADELHA, B. Q.; AGUIAR-COELHO, V. M. Influência climática e antrópica na abundância e riqueza de Calliphoridae (Diptera) em fragmento florestal da Reserva Biológica do Tinguá, RJ. **Neotropical Entomology**, [s. l.], v. 39, p. 476–485, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ne/a/FtgDXGHjrVwPBRVDyY9nCZD/>. Acesso em: 22 fev. 2024.

FERREIRA, M.J.M. (1978) Sinantropia de dípteros muscoideos de Curitiba, Paraná. I: Calliphoridae. **Revista Brasileira de Biologia**, 38, 445-454.

FERREIRA, M. J. de M.; LACERDA, P. V. de. Muscóides sinantrópicos associados ao lixo urbano em Goiânia, Goiás. **Revista Brasileira de Zoologia**, [s. l.], v. 10, p. 185–195, 1993. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbzool/a/YphZx6Kc3NbHbLtbNJxcMjr/>. Acesso em: 22 fev. 2024.

FIGUEIREDO, A. L. de et al. Faunistic Analysis of the Families Calliphoridae and Mesembrinellidae (Diptera) at Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, [s. l.], v. 55, n. 6, p. 1527–1535, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jme/tjy123>. Acesso em: 1 mar. 2024.

FRAGA, N. de J. **Comportamento de oviposição de adultos, tempo de desenvolvimento e morfologia dos imaturos de Hemilucilia segmentaria (Fabricius), H. semidiaphana (Rondani) e Lucilia eximia (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) na Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus, Brazil**. 2004. Dissertação - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, [s. l.], 2004. Disponível em: <https://repositorio.inpa.gov.br/handle/1/12541>. Acesso em: 22 fev. 2024.

FRANCO, L. C. *et al.* Aceitabilidade da terapia larval no tratamento de feridas. **Revista Recien - Revista Científica de Enfermagem**, [s. l.], v. 6, n. 17, p. 13–18, 2016. Disponível em: <https://www.recien.com.br/index.php/Recien/article/view/102>. Acesso em: 22 fev. 2024.

GAMA, R. A. *et al.* Terapia larval: protocolo básico de manutenção, desinfecção, transporte e aplicação de larvas de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae). **Entomological Communications**, [s. l.], v. 3, p. ec03022–ec03022, 2021. Disponível em: <https://www.entomologicalcommunications.org/index.php/entcom/article/view/ec03022>. Acesso em: 22 fev. 2024.

IBS (International Biotherapy Society). Disponível em: <http://biotherapysociety.org/maggot-debridement-therapy-mdt/>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2024.

JAMES, M. **Catalogue of the diptera of the Americas South of United States**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1970. v. 102 Disponível em: <https://www.biodiversitylibrary.org/bibliography/110114>.

KOSMANN, C. *et al.* *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) and *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae) used to estimate the postmortem interval in a forensic case in Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, [s. l.], v. 55, p. 621–623, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbent/a/4TzJt7KsKMfgGhd6p8pBqzN/?lang=en>. Acesso em: 22 fev. 2024.

MASIERO, F. S. *et al.* Histological patterns in healing chronic wounds using *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) larvae and other therapeutic measures. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 114, n. 8, p. 2865–2872, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4487-y>. Acesso em: 22 fev. 2024.

MASIERO, F. S. *et al.* First Record of Larval Secretions of *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) (Diptera: Calliphoridae) Inhibiting the Growth of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Neotropical Entomology**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 125–129, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13744-016-0444-4>. Acesso em: 22 fev. 2024.

MASIERO, F. S. **O uso de larvas de dípteros (Arthropoda: Insecta) para o tratamento de lesões tegumentares: uma abordagem multissistêmica**. 2019. doctoralThesis - Universidade Federal de Pelotas, [s. l.], 2019. Disponível em: <http://guaiaca.ufpel.edu.br/xmlui/handle/prefix/4446>. Acesso em: 22 fev. 2024.

MARINHO, M.A.T., MADEIRA-OTT, T. 2024. Calliphoridae in **Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil**. PNUD. Disponível em: <<http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadoBrasil/9521>>. Acesso em: 22 fev. 2024

NASSU, M. P.; THYSSEN, P. J. Evaluation of larval density *Cochliomyia macellaria* F. (Diptera: Calliphoridae) for therapeutic use in the recovery of tegumentar injuries. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 114, n. 9, p. 3255–3260, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4542-8>. Acesso em: 22 fev. 2024.

NITSCHKE, M. J. T. **Avaliação da recuperação das lesões cutâneas por meio da terapia larval utilizando como modelos ratos Wistar**. 2010. Tese - Universidade Estadual Paulista (Unesp), [s. l.], 2010. Disponível em: <http://acervodigital.unesp.br/handle/11449/100592>. Acesso em: 22 fev. 2024.

OTSUKA, H. [UNESP. **Sinantropia e sazonalidade de moscas varejeiras (Diptera: Calliphoridae) no Sudeste do Brasil: visões ecológica, médica, veterinária e forense**. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Estadual Paulista (Unesp), [s. l.], 2008. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/120360>. Acesso em: 22 fev. 2024.

PERSIO, N.V; THYSSEN, P.J; ESTÉRCIO, F.F; BACCEGA, B; MASIERO, F.S. Esterilização da superfície de ovos de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) para aplicação terapêutica larval. **XXVI Congresso de Iniciação Científica. UFPEL**, 2017.

PINHEIRO, M. A. R. de Q. **Uso da terapia larval no tratamento de úlceras crônicas em pacientes diabéticos no Hospital Universitário Onofre Lopes- Natal, RN**. 2014. Dissertação - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, [s. l.], 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/23572>. Acesso em: 22 fev. 2024.

PIRES, S. M. *et al.* Dispersão larval pós-alimentar de *Lucilia sericata* (Diptera, Calliphoridae) em condições de laboratório. **Iheringia. Série Zoologia**, [s. l.], v. 100, p. 254–258, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/isz/a/qLKvXyDCqdfNTznFxJvMVVM/?lang=pt>. Acesso em: 22 fev. 2024.

RODRIGUES, A. U. Distribuição Temporal dos Calliphoridae (Diptera) associados à decomposição de *Sus scrofa* Linnaeus (Suidae) na Reserva Adolpho Ducke, Manaus,

Amazonas. [s. l.], 2008. Disponível em: <https://repositorio.inpa.gov.br/handle/1/12327>. Acesso em: 22 fev. 2024.

SOUZA, A. S. B. de. **Calliphoridae (Diptera) associados a cadáver de porco doméstico Sus scrofa (L.) na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil**. 2009. Dissertação - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, [s. l.], 2009. Disponível em: <https://repositorio.inpa.gov.br/handle/1/12423>. Acesso em: 22 fev. 2024.

SOUZA, C. R.; ZUBEN, C. Diversity and Synanthropy of Calliphoridae (Diptera) in the Region of Rio Claro, SP, Brazil. **Neotropical Entomology**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 243–248, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13744-012-0037-9>. Acesso em: 22 fev. 2024.

SOUZA, E. R. de *et al.* First Medicolegal Forensic Entomology Case of Central Amazon: A Suicide by Hanging with Incomplete Suspension. **EntomoBrasilis**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 12–15, 2014. Disponível em: <https://www.entomobrasilis.org/index.php/ebras/article/view/ebrasilis.v7i1.375>. Acesso em: 22 fev. 2024.

SOUZA-SILVA, M.; FONTENELLE, J. C. R.; MARTINS, R. P. Seasonal Abundance and Species Composition of Flower-Visiting Flies. **Neotropical Entomology**, [s. l.], v. 30, p. 351–359, 2001. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ne/a/t7QsFYWvHqkF48yt6tnxt5G/?lang=en>. Acesso em: 22 fev. 2024.

STEVENS, J. R. The evolution of myiasis in blowflies (Calliphoridae). **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 33, n. 10, p. 1105–1113, 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002075190300136X>. Acesso em: 22 fev. 2024.

THYSSEN, P. J. **Caracterização das formas imaturas e determinação das exigências térmicas de duas espécies de califorídeos (Diptera) de importância forense**. Tese (Doutorado em Parasitologia)- Instituto de Biologia, Universidade Estadual Paulista, Campinas-SP, p.116. 2005

THYSSEN, P. J.; LINHARES, A. X. First description of the immature stages of *Hemilucilia segmentaria* (Diptera: Calliphoridae). **Biological Research**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 271–280, 2007. Disponível em: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0716-97602007000400001&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 22 fev. 2024.

THYSSEN, P. J et al. Terapia do Desbridamento Larval: como a biologia atua em favor da reparação e cicatrização tecidual. IN: PARISI, M. C. R et al. **Interdisciplinaridade no Contexto das Doenças dos Pés no Diabetes: tratamentos clínicos, políticas públicas e tecnologia em saúde**. Mossoró/RN, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte: Edições UERN, 2021. p. 229-253.

ULISSES, A. de F. et al. Verificação experimental de aspectos relevantes sobre a tensão superficial em uma abordagem didática. **Revista Ifes Ciência**, v. 3, n. 2, p. 3-15, 2017. <https://doi.org/10.36524/ric.v3i2.318>

VASCONCELOS, S. D.; BARBOSA, T. M.; OLIVEIRA, T. P. B. Diversity of Forensically-Important Dipteran Species in Different Environments in Northeastern Brazil, with Notes on the Attractiveness of Animal Baits. **Florida Entomologist**, [s. l.], v. 98, n. 2, p. 770–775,

2015. Disponível em: <https://bioone.org/journals/florida-entomologist/volume-98/issue-2/024.098.0256/Diversity-of-Forensically-Important-Dipteran-Species-in-Different-Environments-in/10.1653/024.098.0256.full>. Acesso em: 22 fev. 2024.

8. CAPÍTULO 3

Avaliação Pré-Clínica do Potencial Larvoterápico de Espécies de Calliphoridae no Reparo Tecidual de Lesões Diabéticas

Preclinical Evaluation of the Larvotherapeutic Potential of Calliphoridae Species in Tissue Repair of Diabetic Injuries

Priscila Gonçalves Jacinto¹, Maria do Carmo Queiroz Fialho², Bruno Bezerra Jensen³, Jonatas de Souza Queiroz⁴, José Fernando Marques Barcellos⁵

¹Enfermeira. Discente do Programa de Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas/ UFAM; ²Bióloga. Doutora em Biologia Celular e Estrutural pela Universidade Federal de Viçosa/UFV. Pós- Doutora em Biologia Celular e Estrutural; ³Farmacêutico. Doutor em Inovação Farmacêutica pela Universidade Federal do Amazonas/UFAM; ⁴Enfermeiro. Mestre em Imunologia Básica e Aplicada; ⁵Biólogo. Doutor em Anatomia Morfológica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ. Pós- Doutor em Engenharia celular.

Resumo

A cicatrização é um processo fisiológico complexo, mediado por eventos celulares, moleculares e bioquímicos que culminam na formação de colágeno, fibroblastos e reepitelização da ferida. No entanto, condições crônicas como o diabetes mellitus comprometem esse processo, dificultando a restauração tecidual. Nesse contexto, a larvoterapia surge como alternativa promissora, associada a desbridamento seletivo, efeito antimicrobiano e modulação da resposta inflamatória. O presente estudo investigou o potencial reparador de larvas de *Hemilucilia segmentaria* e *H. semidiaphana* em feridas cutâneas de ratos diabéticos (*Rattus norvegicus*). Foram utilizados 60 animais em um ensaio pré-clínico randomizado, distribuídos em quatro grupos: collagenase (controle positivo), solução salina 0,9% (controle negativo) e larvoterapia com *H. segmentaria* ou *H. semidiaphana*. As feridas foram avaliadas aos 3, 7 e 14 dias pós-lesão quanto à macroscopia, área e contração percentual, além de análises histológicas (incluindo contagem de mastócitos). Os resultados demonstraram que *H. segmentaria* foi o tratamento mais eficaz na aceleração da cicatrização, apresentando contração até 15,2% superior à collagenase e 7,9% maior em relação à solução salina, além de maior deposição de colágeno e reepitelização, enquanto a collagenase exibiu os desfechos menos favoráveis. Esses resultados mostram o potencial das espécies para subsidiar protocolos de larvoterapia adaptados à fauna local e ampliar as estratégias terapêuticas no manejo de feridas crônicas em pacientes diabéticos.

Palavras-chave: terapia larval, diabetes mellitus, cicatrização de feridas, modelos pré-clínicos.

Abstract

Wound healing is a complex physiological process mediated by cellular, molecular, and biochemical events that culminate in fibroblast proliferation, collagen deposition, and wound re-epithelialization. However, chronic conditions such as Diabetes Mellitus impair this process, hindering tissue restoration. In this context, maggot debridement therapy (MDT) has emerged as a promising alternative, associated with selective debridement, antimicrobial effects, and modulation of the inflammatory response. The present study investigated the reparative potential of larvae of *Hemilucilia segmentaria* and *H. semidiaphana* in cutaneous wounds of diabetic rats (*Rattus norvegicus*). Sixty animals were used in a randomized preclinical trial and allocated to four groups: collagenase (positive control), 0.9% saline (negative control), and MDT with *H. segmentaria* or *H. semidiaphana*. Wounds were assessed at 3, 7, and 14 days post-injury for macroscopic appearance, area and percentage contraction, and histological parameters (including mast cell counts). The results showed that *H. segmentaria* was the most effective treatment in accelerating healing, exhibiting up to 15.2% greater contraction than collagenase and 7.9% greater than saline, along with increased collagen deposition and re-epithelialization, whereas collagenase produced the least favorable outcomes. These findings highlight the potential of these species to inform MDT protocols tailored to the local fauna and to expand therapeutic strategies for managing chronic wounds in patients with diabetes.

Keywords: larval therapy, Diabetes Mellitus, wound healing, preclinical models.

INTRODUÇÃO

De acordo com estimativas recentes¹ o Brasil apresenta aproximadamente 16,6 milhões de adultos (20–79 anos) vivendo com diabetes, correspondendo a uma prevalência de 10,6% nessa faixa etária. Esses dados refletem a magnitude da doença no país e reforçam o impacto do diabetes como importante problema de saúde pública, tanto pelo aumento progressivo da incidência quanto pelas complicações associadas, entre as quais se destacam o desenvolvimento de úlceras nos pés.

As lesões cutâneas associadas ao diabetes mellitus (DM) representam uma das complicações mais desafiadoras no cenário clínico, devido à cicatrização deficiente, ao risco aumentado de infecção e às frequentes amputações. O atraso na regeneração tecidual decorre de fatores como hiperglicemia persistente, disfunção imunológica e comprometimento da vascularização local^{2,3}.

O reparo cutâneo fisiológico, que envolve as fases de hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento, apresenta atrasos e alterações estruturais em indivíduos diabéticos^{4,5}. Nessas feridas, a inflamação se mantém prolongada, com infiltração persistente de neutrófilos e macrófagos M1, responsáveis pela liberação excessiva de TNF- α , IL-1 β e IL-6, o que intensifica o estresse oxidativo e o dano tecidual^{6,7}. A transição para o fenótipo M2,

de caráter reparativo, é comprometida, resultando em baixa depuração de restos celulares e manutenção de um estado inflamatório crônico ^{8,9}.

Na fase proliferativa, há redução da angiogênese, com menor expressão de VEGF e formação limitada de capilares ⁹. A deposição de matriz extracelular (MEC) também é prejudicada, marcada por alta atividade de MMP-9 e MMP-1 e baixa regulação por TIMPs, o que gera colágeno desorganizado e instabilidade da matriz ⁷. Além disso, fibroblastos e queratinócitos apresentam migração e proliferação deficientes, retardando a formação de tecido de granulação e a reepitelização ^{3,7}. A acumulação de produtos de glicação avançada (AGEs) e a ativação do receptor RAGE agravam esse quadro, promovendo rigidez da matriz, apoptose e senescência de fibroblastos e células endoteliais, resultando em cicatrizes frágeis e mecanicamente instáveis ⁹.

Nesse contexto, terapias alternativas têm despertado crescente interesse, destacando-se a terapia larval (larvoterapia). A técnica consiste na aplicação controlada de larvas vivas e estéreis de moscas necrófagas sobre feridas de difícil cicatrização, promovendo desbridamento seletivo, ação antimicrobiana e modulação da resposta inflamatória ¹⁰. A espécie *Lucilia sericata* é a mais estudada e utilizada, especialmente em protocolos clínicos padronizados na Europa e América do Norte ¹¹. Estudos epigenéticos ¹², moleculares ¹³ e clínicos ¹⁴ mostraram que os efeitos da terapia larval com *Lucilia sericata* não é apenas mecânico (debridamento), mas também biologicamente ativo, atuando sobre vias imunológicas essenciais, modulando a inflamação e reparo, suplementando deficiências do microambiente diabético e acelerando o processo cicatricial. Outras espécies como *Chrysomya megacephala*, *Lucilia cuprina* e *Cochliomyia macellaria*, apresentam resultados promissores em modelos experimentais ¹¹.

Entretanto, a dependência de poucas espécies com uso consolidado limita a aplicabilidade da técnica em países de alta biodiversidade, como o Brasil. Nesse sentido, espécies da família Calliphoridae presentes na região amazônica, como *Hemilucilia segmentaria* e *Hemilucilia semidiaphana* – moscas neotropicais assinantrópicas, também encontradas em ambientes urbanos – permanecem inexploradas quanto ao seu potencial terapêutico ¹⁵.

Assim, considerando a possibilidade da inserção da TL como terapia alternativa eficaz e de acesso facilitado no sistema público de saúde, este estudo teve como objetivo investigar, em modelo pré-clínico com ratos diabéticos, o potencial reparador de feridas tratado com larvas

de *H. segmentaria* e *H. semidiaphana*, comparando seu desempenho ao da terapia padrão por meio de análises macroscópicas e histopatológicas do processo cicatricial.

METODOLOGIA

Este estudo corresponde a um ensaio pré-clínico randomizado aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (SEI: 01280.000034/2021-09) conduzido no Biotério Central do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Os animais permaneceram nesse local durante todo o período experimental, onde foram realizadas as avaliações clínicas. As amostras de tecido cutâneo coletadas foram processadas e analisadas no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Foram utilizados 60 ratos albinos (*Rattus norvegicus*), linhagem Wistar, de ambos os sexos, com 10 semanas de idade e peso entre 200-250 g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com maravalha (trocada semanalmente), recebendo alimentação e água *ad libitum*. As condições ambientais foram controladas, com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura de 22 ± 2 °C e umidade relativa de 55%.

A alocação dos animais nos grupos experimentais foi realizada por randomização em blocos, resultando em quatro grupos experimentais ($n = 15$ por grupo): TL – *H. semidiaphana*: ratos induzidos ao diabetes mellitus (DM) e à lesão cutânea, tratados com larvas estéreis de *H. semidiaphana*; TL – *H. segmentaria*: ratos induzidos ao DM e à lesão cutânea, tratados com larvas desinfetadas de *H. segmentaria*; Colagenase: ratos induzidos ao DM e à lesão cutânea, tratados com pomada debridante à base de colagenase (controle positivo); e Solução salina 0,9%: ratos induzidos ao DM e à lesão cutânea, tratados apenas com irrigação da ferida com solução salina estéril (controle negativo).

Cada grupo foi subdividido aleatoriamente em três subgrupos, de acordo com o tempo de avaliação (3º, 7º e 14º dias após pós-indução da lesão), contendo cinco animais em cada subgrupo.

Indução do diabetes mellitus e da lesão cutânea

Após atingirem o peso corporal adequado, os animais foram submetidos ao protocolo de indução do diabetes mellitus, que consistiu na oferta de dieta hiperglicídica alternada com dieta padrão para roedores, durante sete dias consecutivos. No oitavo dia, foi administrada

estreptozotocina (Sigma® S-130) na dose única de 60 mg/kg, diluída em tampão citrato (0,1 M; pH 4,5), por via intraperitoneal (IP) ⁹.

Sete dias após a administração da droga, a glicemia foi aferida por coleta de sangue da veia caudal e análise em glicosímetro (Accu-Chek Guide®, Roche®). Animais com valores $\geq$ 200 mg/dL foram considerados diabéticos ¹⁶.

Confirmada a condição diabética, procedeu-se à indução das lesões cutâneas. Para isso, os animais foram anestesiados com cetamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), ambas por via IP. A região escolhida foi higienizada com sabonete antisséptico contendo PHMB (Pielisana®) e tricotomizada com aparelho elétrico.

As lesões foram induzidas por injeção subcutânea não transfixante de 0,2 mL de solução ácido clorídrico:água destilada (1:4) ^{10,15}, produzindo queimadura química localizada. Após 48 horas, foram iniciados os curativos de acordo com o protocolo experimental de cada grupo.

Curativos das lesões cutâneas

Os curativos foram realizados sob anestesia. Nos grupos Terapia Larval, o leito da ferida foi irrigado com solução salina estéril, seguido da aplicação de 5 a 10 larvas desinfetadas por cm² de lesão ¹⁵. As larvas foram mantidas em frascos plásticos estéreis até o segundo estágio, considerado ideal para uso terapêutico. Para manuseio com pipeta Pausteur, adicionou-se 2 mL de solução salina ao frasco contendo as larvas. Após a aplicação, procedeu-se à contagem individual e à remoção do excesso de solução salina com gaze estéril, evitando afogamento.

Com a área perilesional seca, posicionou-se gaze de rayon como cobertura secundária, fixada com esparadrapo. O curativo completo foi removido a cada 24 horas para inspeção. Na presença de tecido desvitalizado, as larvas eram mantidas por mais 24 horas ou iniciava-se um novo ciclo terapêutico.

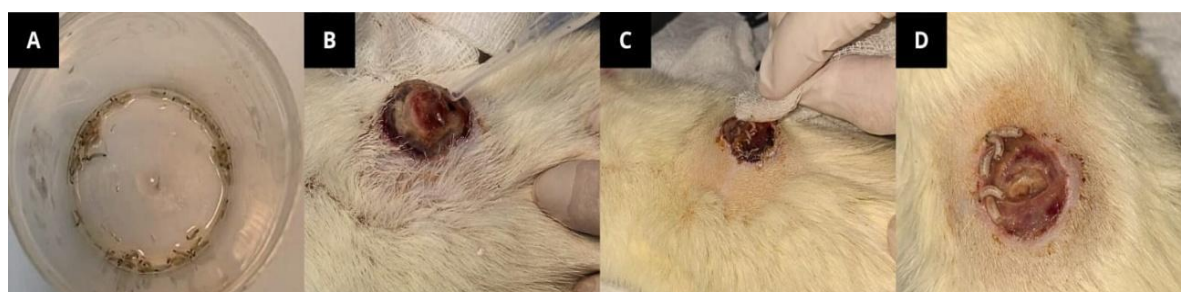


Figura 1. Preparo e aplicação das larvas para terapia larval. **A** – Larvas desinfetadas no segundo estágio imersas em solução salina; **B** – Aplicação das larvas sobre a lesão utilizando pipeta Pausteur; **C** – Remoção do excesso de solução salina antes da colocação da cobertura secundária; **D** – Larvas em estágio 3, observadas após 24 horas de desbridamento da lesão (início do segundo ciclo de terapia larval).

Fonte: dados da pesquisa.

Nos grupos controle, a abordagem inicial do leito da ferida foi idêntica à dos grupos submetidos à terapia larval. No grupo colanegase, aplicou-se fina camada de pomada à base de colagenase diretamente sobre o leito da ferida, seguida de gaze estéril, atadura e esparadrapo. No grupo Solução salina 0,9%, não houve cobertura primária; as lesões foram apenas ocluídas com gaze, atadura e esparadrapo. Todos os grupos foram avaliados a cada 24 h.

Avaliação macroscópica e microscópica das lesões

Os animais foram pesados e monitorados diariamente quanto à condição clínica geral e às características das lesões (tipo de tecido no leito, bordos, exsudato, sinais flogísticos, sangramento, odor e crostas).

Sob anestesia, antes da aplicação dos tratamentos (dia 0) e após as intervenções (3º, 7º e 14º), as lesões foram mensuradas com paquímetro digital (King Tools). As medidas foram obtidas nos eixos horizontal e vertical, sendo cada ferida fotografada com câmera de 12 MP e resolução de 4000 × 3000 pixels (Apple iPhone 13), posicionada em tripé para padronização.

A área da ferida (A , em cm^2) foi calculada pela fórmula: $A = \pi \times R \times r$, onde R representa o raio maior e r o raio menor. O percentual de contração da ferida foi obtido pela equação ¹⁶: % contração = $100 \times (W_o - W_i) / W_o$, em que W_o é a área inicial (dia 0) e W_i a área no dia da biópsia (3º, 7º ou 14º dias).

A avaliação histológica da cicatrização incluiu células polimorfonucleares, mononucleares, proliferação vascular, proliferação fibroblástica, deposição de colágeno e reepitelização. Cada parâmetro foi convertido em *escore* quantitativo: ausente (0), discreto (1), moderado (2) e acentuado (3), conforme descrito no Quadro 1.

Quadro 1. Critérios de escore histológico das variáveis avaliadas ¹⁷

Variável histológica	0 (Ausente)	1 (Discreto)	2 (Moderado)	3 (Acentuado)
Células polimorfonucleares	Ausentes no campo óptico	Poucas, isoladas, muitas áreas livres	Agregados com áreas adjacentes livres	Agregados densos, frequentes, sem áreas livres
Células mononucleares	Ausentes no campo óptico	Poucas, isoladas, áreas livres	Agregados densos, ainda áreas livres	Agregados densos e justapostos, sem áreas livres
Proliferação vascular	Sem vasos evidentes	Poucos vasos, dispersos	Mais frequentes, dispersos	Muito frequentes, por todo o campo

Proliferação fibroblástica	Ausente	Poucos fibroblastos no tecido conjuntivo frouxo	Moderada, formando pequenos feixes	Grande quantidade, formando feixes compactos
Colagenização	Sem fibras colágenas	Poucas fibras no tecido conjuntivo frouxo	Feixes de colágeno espessos e eosinofílicos	Grande quantidade de feixes compactos
Reepitelização	Sem epitélio	Incompleta ou parcial	Incompleta ou parcial	Total ou completa sobre o tecido conjuntivo

Fonte: quadro adaptado inserido aqui

A interpretação das variáveis e a intensidade dos achados foram avaliadas conforme descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação e atribuição de índices aos achados histológicos de HE (Hematoxilina – Eosina) ¹⁸

Intensidade dos achados				
Achados HE	Ausente	Discreto	Moderado	Acentuado
Proliferação vascular	0	1	2	3
Células mononucleares	0	1	2	3
Células polimorfonucleares	0	1	2	3
Proliferação fibroblástica	0	1	2	3
Colagenização	0	1	2	3
Reepitelização	1	2	2	3

Concomitante à mensuração da área da lesão, os animais foram eutanasiados por administração da dosagem associada de xilazina (150 mg/Kg) e cetamina (200 mg/Kg). Em seguida, utilizando lâmina de bisturi nº 11, realizou-se a ressecção da lesão com suas bordas.

Os fragmentos de tecido foram fixados em formol tamponado a 10% por 24 h, desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 85%, 95% e 100%) e diafanizados em três banhos de xilol. Posteriormente, foram incluídos em parafina (Synth®) e seccionados em micrótomo semiautomático (LEICA) em cortes de 5-7 µm.

As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) para avaliação geral da morfologia e com azul de toluidina 0,1% para identificação de mastócitos. As análises foram realizadas em microscópio óptico acoplado a câmera, e as imagens capturadas foram processadas no *software* Stepanizer (versão 2b28 -7). A quantificação de mastócitos foi feita em campos representativos da região central das lesões, com aumento de 400×, totalizando 400 pontos de contagem por grupo em cada tempo experimental (100 pontos por lâmina). A

porcentagem de mastócitos foi obtida pela razão entre os pontos coincidentes com essas células e o total de pontos avaliados.

Análise estatística

A análise macroscópica da contração da ferida foi analisada por ANOVA two-way, considerando tratamento e tempo como fatores, seguida de teste Tukey quando observadas diferenças significativas, após verificação das premissas de normalidade e homocedasticidade. Já os *scores* histológicos e a contagem de mastócitos, por não atenderem a essas premissas, foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis. Todas as análises foram realizadas no *software* R (versão 4.5.1), adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Avaliação macroscópica e contração da lesão cutânea

De acordo com análise macroscópica do reparo tecidual demonstrou evolução significativa das lesões ao longo do tempo, conforme os tratamentos aplicados. Observou-se redução progressiva do diâmetro das feridas, compatível com as fases do processo cicatricial:

O 3º dia caracterizou a fase inflamatória, o 7º dia correspondeu à fase proliferativa e o 14º dia evidenciou a fase de remodelação. Esses achados estão ilustrados na Figura 2.

No dia 0 (48 h após a indução), todas as lesões apresentavam sinais inflamatórios, caracterizados por edema, rubor perilesional e calor local. Observou-se ainda exposição do tecido subcutâneo na maioria dos animais, acompanhada de exsudato piosanguinolento, discreto odor fétido e áreas de tecido desvitalizado.

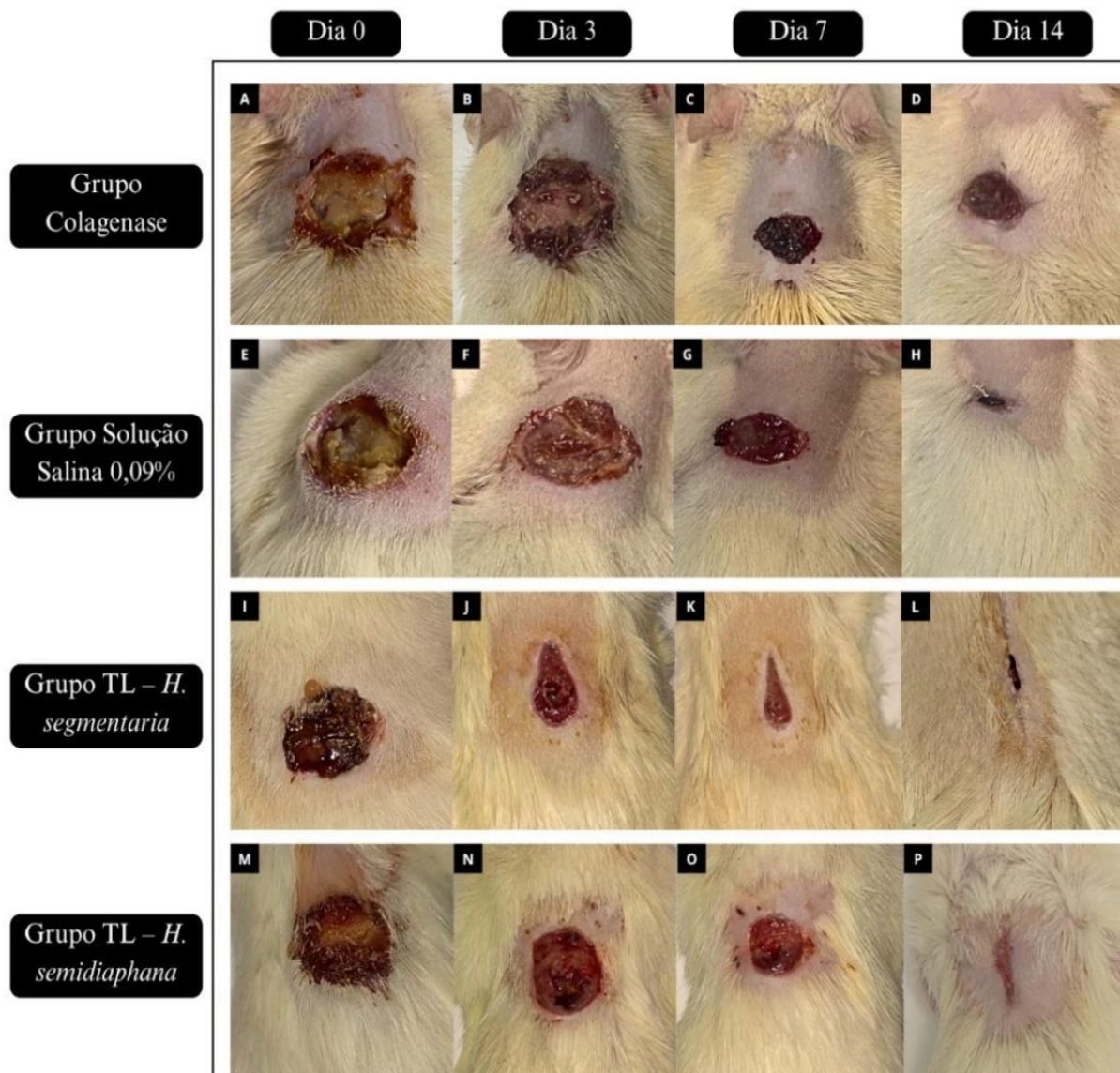


Figura 2. Evolução macroscópica das lesões cutâneas nos diferentes grupos experimentais ao longo do período de tratamento. **A–D:** Grupo Colagenase — lesão antes do curativo (A) e após 3 (B), 7 (C) e 14 dias (D) de tratamento. **E–H:** Grupo Solução Salina 0,9% — lesão antes do curativo (E) e após 3 (F), 7 (G) e 14 dias (H). **I–L:** Grupo *H. segmentaria* — lesão antes do curativo (I) e após 3 (J), 7 (K) e 14 dias (L) de uso das larvas. **M–P:** Grupo *H. semidiaphana* — lesão antes do curativo (M) e após 3 (N), 7 (O) e 14 dias (P) de uso das larvas.

Fonte: dados da pesquisa

No 3º dia, os grupos controles apresentaram discreta melhora dos sinais flogísticos. Entretanto, no grupo Colagenase, houve aumento da necrose e persistência do odor fétido. Já nos grupos tratados com larvas de *H. segmentaria* e *H. semidiaphana*, verificou-se efetiva limpeza das lesões, com desbridamento do tecido desvitalizado e presença de exsudato serosanguinolento característico 48 h após o início da terapia larval.

No 7º dia, observou-se redução significativa da área das lesões em todos os grupos, sendo mais pronunciada no grupo tratado com larvas de *H. segmentaria*. No 14º dia, verificou-se fechamento parcial ou total das lesões, com epitelização e/ou formação de crosta, exceto no grupo tratado com Colagenase, que manteve áreas residuais de lesão.

A análise estatística da contração das feridas revelou diferenças significativas entre os grupos nos dias 3, 7 e 14, com desempenho superior das larvas *H. segmentaria* e *H. semidiaphana* em comparação à Colagenase e à Solução salina.

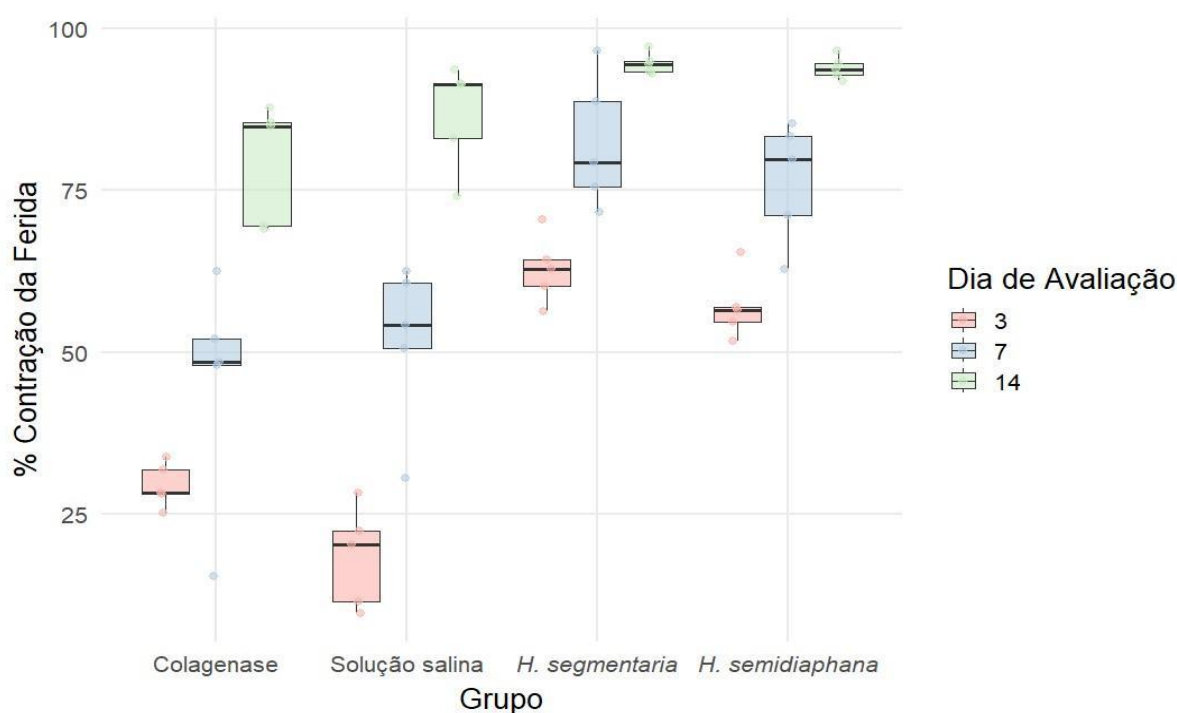


Figura 3: Boxplots do percentual de contração da ferida (%) ao longo dos tempos experimentais (dias 3, 7 e 14), comparando os diferentes grupos (n = 5 por grupo) de tratamento: Colagenase, Solução salina 0,9%, Hemilucilia segmentaria e Hemilucilia semidiaphana. Os pontos representam valores individuais de cada animal. Observa-se maior contração das feridas nos grupos tratados com larvas, principalmente a partir do 7º dia (p = 0.001).

Fonte: dados da pesquisa

Tabela 2. Comparações pareadas entre os grupos de tratamento quanto à porcentagem de contração das lesões cutâneas nos dias 3, 7 e 14.

Dia	Comparação	Diferença (estimativa)	p-valor	Significância
3	<i>H. segmentaria</i> vs. Salina	+ 44.47	< 0.0001	***
3	<i>H. semidiaphana</i> vs. Salina	+38.65	< 0.0001	***
3	<i>H. segmentaria</i> vs. Colagenase	+33.43	<0.0001	***
3	<i>H. semidiaphana</i> vs. Colagenase	+27.61	<0.0006	***
7	<i>H. segmentaria</i> vs. Salina	+30.68	<0.0001	***
7	<i>H. semidiaphana</i> vs. Salina	+24.78	<0.0001	***
7	<i>H. segmentaria</i> vs. Colagenase	+37.11	<0.0031	**
7	<i>H. semidiaphana</i> vs. Colagenase	+31.21	<0.0007	***
14	<i>H. segmentaria</i> vs. Salina	+7.90	0.0603	Tendência
14	<i>H. semidiaphana</i> vs. Salina	+7.15	0.5868	NS
14	<i>H. segmentaria</i> vs. Colagenase	+15.29	0.0439	*
14	<i>H. semidiaphana</i> vs. Colagenase	+14.54	0.5598	NS
Todos	<i>H. segmentaria</i> vs. <i>H. semidiaphana</i>	≤0.99	0.7523	NS

NS: não significativo; p < 0.05: *; p < 0.01: **; p < 0,001: ***

Fonte: dados da pesquisa

No 3º dia, os grupos tratados com larvas apresentaram contração significativamente superior em comparação aos controles. O grupo *H. segmentaria* atingiu $62,86 \pm 5,2\%$ e *H. semidiaphana* $57,04 \pm 5,1\%$, enquanto colagenase e solução salina alcançaram apenas $29,43 \pm 3,4\%$ e $18,39 \pm 7,8\%$, respectivamente.

No dia 7º dia, a diferença entre os grupos manteve-se evidente. *H. segmentaria* apresentou $82,42 \pm 10,2\%$ de contração e *H. semidiaphana* $76,52 \pm 9,4\%$, valores superiores obtidos com colagenase ($45,31 \pm 17,7\%$) e solução salina ($51,74 \pm 12,7\%$).

No 14º dia, os grupos tratados com larvas atingiram valores próximos ao fechamento completo da lesão, sendo $94,64 \pm 1,7\%$ para *H. segmentaria* e $93,89 \pm 1,8\%$ para *H. semidiaphana*. Já colagenase e solução salina apresentaram $79,35 \pm 9,3\%$ e $86,74 \pm 8,2\%$, respectivamente.

Avaliação histológica das lesões

Descrição das alterações histológicas

Nos grupos controle (colagenase e solução salina), as lesões mantiveram inflamação persistente, áreas de necrose em diferentes estágios, colagenização tardia, fibras colágenas desorganizadas e presença de colônias bacterianas esféricas, observadas exclusivamente nesses

grupos. Em contraste, nos grupos tratados com larvas, o tecido de granulação apresentou-se mais organizado, com fibras colágenas densas e alinhadas, epiderme com queratinização evidente e maior frequência de mastócitos. Esse efeito foi mais pronunciado em *H. segmentaria* nos dias 3 e 7, sugerindo participação ativa dessas células na modulação da inflamação e no reparo tecidual.

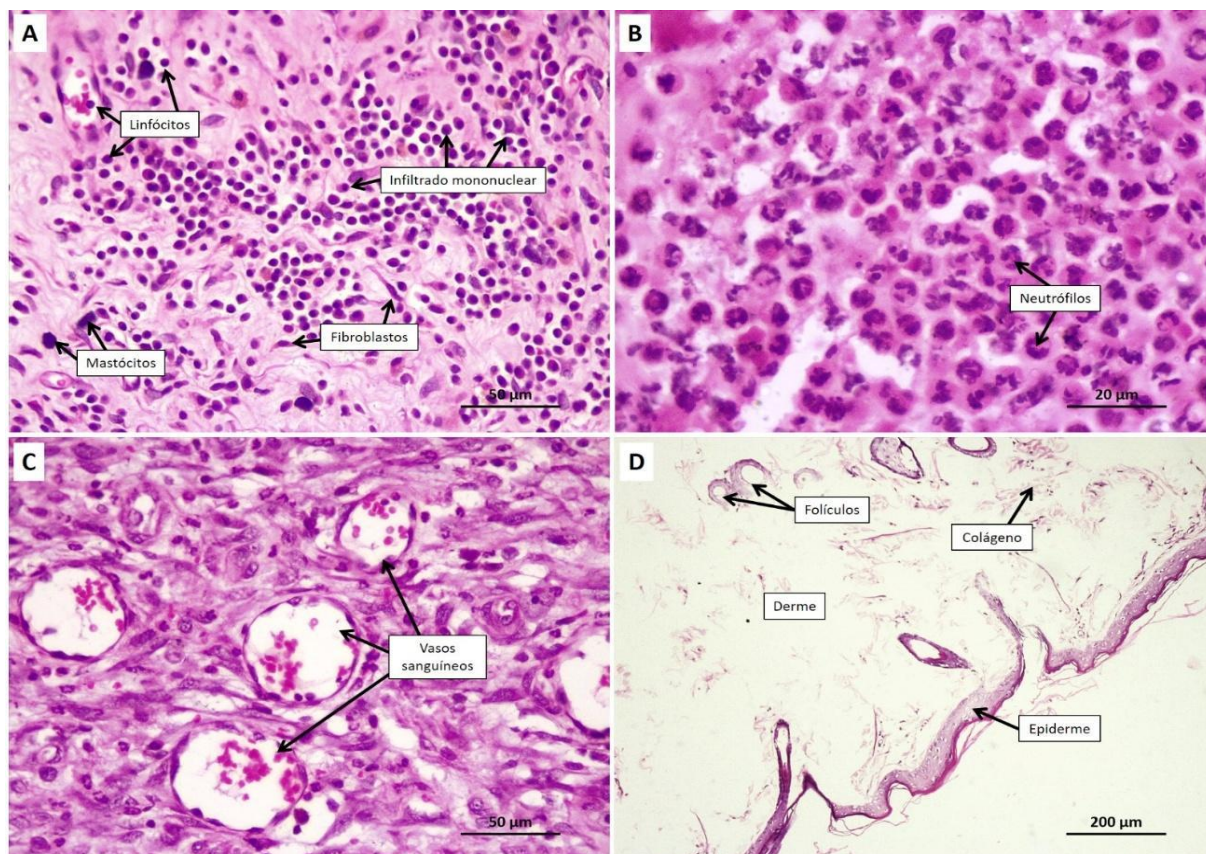


Figura 4: Imagens representativas das alterações teciduais observadas em ratos Wistar dos tratamentos positivo (Colagenase) e negativo (Solução Salina 0,9%). **A** - infiltrado leucocitário mononuclear, mastócitos, linfócitos e fibroblastos visíveis. **B** - infiltrado leucocitário composto por células polimorfonucleares (neutrófilos). **C** - proliferação de vasos sanguíneos e **D** - tegumento com reepitelização (epiderme de espessura fina) e região da derme com fibras colágenas dessarranjadas/espaçadas

Fonte: dados da pesquisa

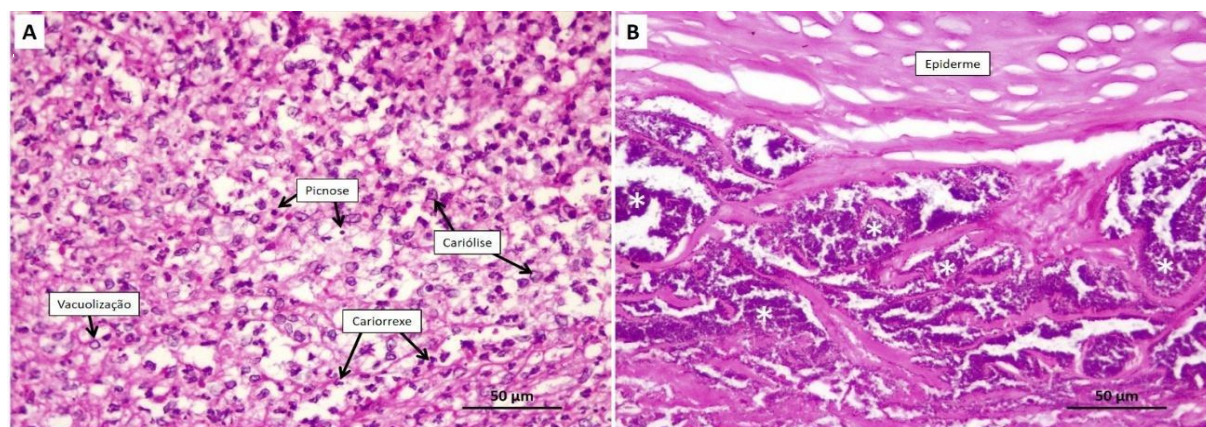


Figura 5: Alterações teciduais restritas aos ratos Wistar dos tratamentos controle (colagenase e solução salina 0,9%). **A** - Mudanças nucleares inerentes a necrose como picnose (núcleos de tamanho reduzido), cariólise (núcleos irregulares) e cariorexe (fragmentação nuclear) e **B** - colônias bacterianas adjacentes a epiderme (asteriscos)

Fonte: dados da pesquisa

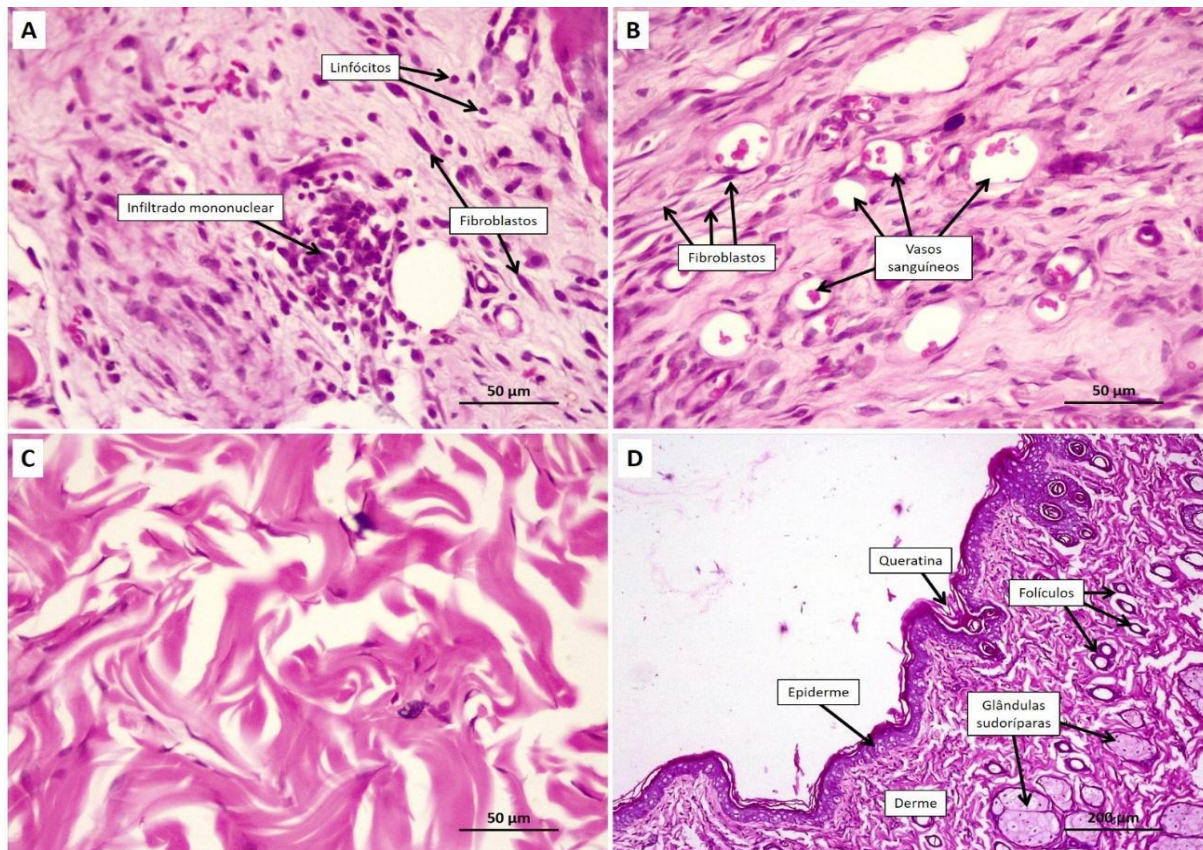


Figura 6: Imagens representativas dos achados histológicos observados nos tratamentos com larvoterapia (*H. segmentaria* e *H. semidiaphana*). **A** - infiltrado constituído por células mononucleares. **B** - proliferação de fibroblastos e formação de vasos sanguíneos na região central da lesão. **C** - Colagenização concluída, com fibras colágenas agrupadas e organizadas em feixes irregulares e **D** - reepitelização avançada com vários folículos pilosos visíveis na epiderme e derme.

Fonte: dados da pesquisa

Scores histológicos

3º dia

No 3º dia, o infiltrado polimorfonuclear esteve presente em todos os grupos, variando de discreto a moderado. Em *H. semidiaphana*, predominou intensidade discreta, enquanto em Colagenase os scores oscilaram entre discreto e moderado ($p = 0,07$; Tabela 3). Microscopicamente, o infiltrado era composto majoritariamente por neutrófilos dispersos no tecido de granulação inicial. O infiltrado mononuclear foi mais acentuado no grupo Colagenase, com predomínio de macrófagos e linfócitos, contrastando com menor intensidade em *H. semidiaphana*. O grupo *H. segmentaria* apresentou infiltrado acentuado e a solução salina mostrou padrão heterogêneo ($p = 0,01$; Tabela 4).

Tabela 3. Frequência de células polimorfonucleares: frequência absoluta dos escores atribuídos a alteração histológica avaliada nos diferentes grupos experimentais (Colagenase, Solução salina 0,9%, TL – *H. semidiaphana* e TL – *H. segmentaria*) nos dias 3, 7 e 14 pós-tratamento. Valores de p indicam a significância estatística para as comparações entre grupos em cada tempo de avaliação.

Dia	Tratamento	Ausência	Discreto	Moderado	Acentuado	p-valor
3º	Colagenase	0	2	2	0	0,07
	Solução Salina (0,9%)	2	2	0	0	
	TL - <i>H. semidiaphana</i>	0	4	0	0	
	TL - <i>H. segmentaria</i>	2	2	0	0	
7º	Colagenase	0	0	2	2	0,01
	Solução Salina (0,9%)	2	0	2	0	
	TL- <i>H. semidiaphana</i>	4	0	0	0	
	TL- <i>H. segmentaria</i>	3	1	0	0	
14º	Colagenase	0	0	0	4	0,002
	Solução Salina (0,9%)	0	0	4	0	
	TL- <i>H. semidiaphana</i>	3	1	0	0	
	TL- <i>H. segmentaria</i>	4	0	0	0	

Fonte: dados de pesquisa

Tabela 4. Frequência de células mononucleares: frequência absoluta dos escores atribuídos a alteração histológica avaliada nos diferentes grupos experimentais (Colagenase, Solução salina 0,9%, TL – *H. semidiaphana* e TL – *H. segmentaria*) nos dias 3, 7 e 14 pós-tratamento. Valores de p indicam a significância estatística para as comparações entre grupos em cada tempo de avaliação.

Dia	Tratamento	Ausência	Discreto	Moderado	Acentuado	p-valor
3º	Colagenase	0	0	0	4	0,01
	Solução Salina (0,9%)	2	0	1	1	
	TL - <i>H. semidiaphana</i>	0	0	0	4	
	TL - <i>H. segmentaria</i>	0	2	2	0	
7º	Colagenase	0	0	0	4	0,002
	Solução Salina (0,9%)	0	4	0	0	
	TL- <i>H. semidiaphana</i>	0	0	4	0	
	TL- <i>H. segmentaria</i>	0	2	0	2	
14º	Colagenase	0	4	0	0	0,09
	Solução Salina (0,9%)	0	4	0	0	
	TL- <i>H. semidiaphana</i>	0	3	1	0	
	TL- <i>H. segmentaria</i>	0	2	2	0	

Fonte: dados de pesquisa

A proliferação vascular foi moderada em Colagenase e *H. segmentaria*, ausente em quatro animais de *H. semidiaphana* e variável na solução salina ($p = 0,03$; Tabela 5). Histologicamente, caracterizou-se por vasos de pequeno calibre, revestidos por endotélio ativo e envolvido por matriz frouxa. Na proliferação fibroblástica foi acentuada em *H. segmentaria*, moderada em *H. semidiaphana* e variou entre discreta e acentuada nos controles ($p = 0,04$; Tabela 6).

Tabela 5. Frequência de proliferação vascular: frequência absoluta dos escores atribuídos a alteração histológica avaliada nos diferentes grupos experimentais (Colagenase, Solução salina 0,9%, TL – *H. semidiaphana* e TL – *H. segmentaria*) nos dias 3, 7 e 14 pós-tratamento. Valores de p indicam a significância estatística para as comparações entre grupos em cada tempo de avaliação.

Dia	Tratamento	Ausencia	Discreto	Moderado	Acentuado	p-valor
3º	Colagenase	0	0	4	0	0,03
	Solução Salina (0,9%)	2	0	1	1	
	TL - <i>H. semidiaphana</i>	4	0	0	0	
	TL - <i>H. segmentaria</i>	0	0	4	0	
7º	Colagenase	0	0	2	2	0,05
	Solução Salina (0,9%)	0	4	0	0	
	TL- <i>H. semidiaphana</i>	0	2	2	0	
	TL- <i>H. segmentaria</i>	0	0	4	0	
14º	Colagenase	0	2	0	2	0,005
	Solução Salina (0,9%)	2	2	0	0	
	TL- <i>H. semidiaphana</i>	0	2	2	0	
	TL- <i>H. segmentaria</i>	0	4	0	0	

Fonte: dados da pesquisa

Tabela 6. Frequência de proliferação fibroblástica: frequência absoluta dos escores atribuídos a alteração histológica avaliada nos diferentes grupos experimentais (Colagenase, Solução salina 0,9%, TL – *H. semidiaphana* e TL – *H. segmentaria*) nos dias 3, 7 e 14 pós-tratamento. Valores de p indicam a significância estatística para as comparações entre grupos em cada tempo de avaliação.

Dia	Tratamento	Ausência	Discreto	Moderado	Acentuado	p-valor
3º	Colagenase	0	2	0	2	0,04
	Solução Salina (0,9%)	2	0	0	2	
	TL - <i>H. semidiaphana</i>	0	0	2	2	
	TL - <i>H. segmentaria</i>	0	0	0	4	
7º	Colagenase	0	0	4	0	0,01
	Solução Salina (0,9%)	0	2	0	2	
	TL- <i>H. semidiaphana</i>	0	2	2	0	
	TL- <i>H. segmentaria</i>	0	0	0	4	
14º	Colagenase	0	4	0	0	0,01
	Solução Salina (0,9%)	0	4	0	0	
	TL- <i>H. semidiaphana</i>	0	0	4	0	
	TL- <i>H. segmentaria</i>	2	0	2	0	

Fonte: dados da pesquisa

A colagenização mostrou-se mais avançada nos grupos larvais, com fibras densas e organizadas, especialmente em *H. segmentaria* (score acentuado). Em contraste, Colagenase apresentou fibras desorganizadas e score discreto ($p = 0,003$; Tabela 7). A reepitelização foi mais pronunciada em *H. segmentaria*, moderada em *H. semidiaphana* e variando entre discreto e moderado nos controles ($p = 0,01$; Tabela 8).

Tabela 7. Frequência de collagenização: frequência absoluta dos escores atribuídos a alteração histológica avaliada nos diferentes grupos experimentais (Colagenase, Solução salina 0,9%, TL – *H. semidiaphana* e TL – *H. segmentaria*) nos dias 3, 7 e 14 pós-tratamento. Valores de p indicam a significância estatística para as comparações entre grupos em cada tempo de avaliação.

Dia	Tratamento	Ausência	Discreto	Moderado	Acentuado	p-valor
3º	Colagenase	0	4	0	0	0,003
	Solução Salina (0,9%)	2	1	1	0	
	TL - <i>H. semidiaphana</i>	0	0	0	4	
	TL - <i>H. segmentaria</i>	0	0	0	4	
7º	Colagenase	0	4	0	0	0,04
	Solução Salina (0,9%)	0	0	2	2	
	TL- <i>H. semidiaphana</i>	0	0	2	2	
	TL- <i>H. segmentaria</i>	0	0	0	4	
14º	Colagenase	0	0	4	0	0,03
	Solução Salina (0,9%)	0	2	2	0	
	TL- <i>H. semidiaphana</i>	0	0	2	2	
	TL- <i>H. segmentaria</i>	0	0	0	4	

Fonte: dados da pesquisa

Tabela 8. Frequência de reepitelização: frequência absoluta dos escores atribuídos a alteração histológica avaliada nos diferentes grupos experimentais (Colagenase, Solução salina 0,9%, TL – *H. semidiaphana* e TL – *H. segmentaria*) nos dias 3, 7 e 14 pós-tratamento. Valores de p indicam a significância estatística para as comparações entre grupos em cada tempo de avaliação.

Dia	Tratamento	Ausência	Discreto	Moderado	Acentuado	p-valor
3º	Colagenase	0	2	2	0	0,01
	Solução Salina (0,9%)	0	3	1	0	
	TL - <i>H. semidiaphana</i>	0	0	3	1	
	TL - <i>H. segmentaria</i>	0	0	1	3	
7º	Colagenase	0	2	2	0	1
	Solução Salina (0,9%)	0	2	2	0	
	TL- <i>H. semidiaphana</i>	0	0	4	0	
	TL- <i>H. segmentaria</i>	0	2	2	0	
14º	Colagenase	0	2	0	2	0,01
	Solução Salina (0,9%)	0	0	4	0	
	TL- <i>H. semidiaphana</i>	0	0	2	2	
	TL- <i>H. segmentaria</i>	0	0	1	3	

Fonte: dados da pesquisa

7º dia

No 7º dia, o infiltrado polimorfonuclear permaneceu elevado em Colagenase (acentuado), enquanto os grupos de terapia larval, sobretudo *H. semidiaphana*, apresentaram ausência ou intensidade discreta ($p = 0,01$; Tabela 3). O infiltrado mononuclear seguiu padrão semelhante, com maior intensidade em Colagenase e menor nos grupos com larvas ($p = 0,002$; Tabela 4). Morfologicamente, nos grupos larvais exibiram resolução inflamatória, com predomínio de fibroblastos e matriz em maturação, ao passo que os controles ainda apresentavam focos inflamatórios ativos.

A proliferação vascular foi persistente em Colagenase, mas reduzida nos grupos larvais ($p = 0,05$; Tabela 5). A proliferação fibroblástica manteve-se acentuada em *H. segmentaria*, moderada em *H. semidiaphana* e Colagenase, e variável na solução salina ($p = 0,01$; Tabela 6). A colagenização foi mais intensa em *H. segmentaria* (score acentuado e fibras agrupadas), moderada em *H. semidiaphana*, e discreta nos controles ($p = 0,04$; Tabela 7). A reepitelização foi semelhante entre os grupos ($p = 1,0$; Tabela 8), embora nos grupos larvais a epiderme já exibisse camada córnea contínua, ausente nos controles.

14º dia

No 14º dia, o infiltrado polimorfonuclear manteve-se acentuado apenas em Colagenase, enquanto nos demais grupos foi ausente ou discreto ($p = 0,002$; Tabela 3). O infiltrado mononuclear mostrou tendência à resolução, com scores discretos ou ausentes em todos os grupos, sem diferença estatística significativa ($p = 0,09$; Tabela 4).

A proliferação vascular foi persistente em Colagenase (moderada e acentuada), mas discreta ou ausente nos grupos larvais ($p = 0,005$; Tabela 5). A proliferação fibroblástica diminuiu em todos os grupos, manteve-se menos intensa nos tratados com larvas ($p = 0,01$; Tabela 6). A colagenização foi mais evidente em *H. segmentaria* (acentuada), seguida de *H. semidiaphana* (moderada), e permaneceu menor nos controles ($p = 0,03$; Tabela 7). A reepitelização atingiu padrão acentuado na maioria dos animais tratados com *H. segmentaria*, enquanto nos demais grupos variou entre discreto e acentuado ($p = 0,01$; Tabela 8).

Quantificação dos mastócitos

A quantificação do percentual de mastócitos revelou diferenças consistentes entre os grupos ao longo do experimento. No 3º dia (Figura 8), Colagenase e solução salina apresentaram médias semelhantes ($16,5\% \pm 2,72$ e $16,5\% \pm 2,40$, respectivamente), enquanto *H. semidiaphana* mostrou valor intermediário ($14,8\% \pm 0,48$) e *H. segmentaria* registrou o menor percentual ($10\% \pm 1,35$). Apesar da tendência de redução nos grupos tratados com larvas, especialmente em *H. segmentaria*, a diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,09$), sugerindo que, nos estágios iniciais, os tratamentos ainda não haviam impactado de forma expressiva o recrutamento de mastócitos.

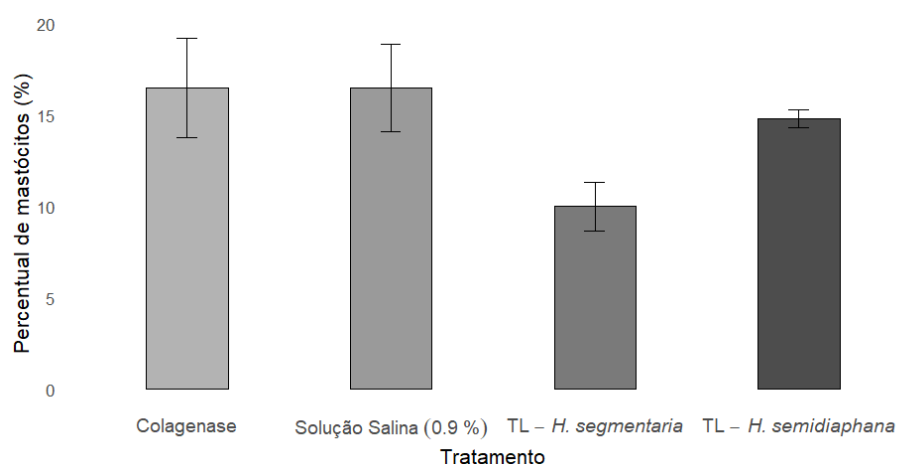


Figura 7: Percentual médio de mastócitos (média $\pm$ EP) no 3º dia de avaliação nos diferentes grupos experimentais: Colagenase, Solução salina 0,9%, TL – *H. semidiaphana* e TL – *H. segmentaria*. Não houve diferença entre os grupos ($p = 0,09$).

Fonte: dados da pesquisa

No 7º dia (Figura 9), observou-se aumento da frequência de mastócitos nos grupos Colagenase ($17,8\% \pm 1,89$) e solução Salina ($20,2\% \pm 1,31$), enquanto os grupos tratados com larvas mantiveram valores inferiores: *H. semidiaphana* ($14,8\% \pm 0,63$) e *H. segmentaria* ($12\% \pm 1,35$). Nesse período, a diferença entre os tratamentos foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$), indicando que a terapia larval contribuiu para limitar o acúmulo dessas células na fase inflamatória intermediária.

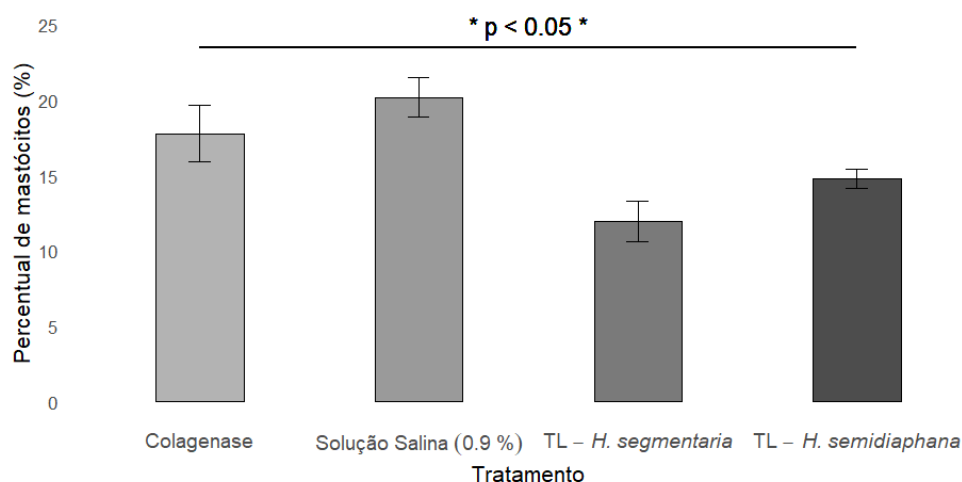


Figura 8: Percentual médio de mastócitos (média $\pm$ EP) no 7º dia de avaliação. Os grupos tratados com terapia larval apresentaram percentuais significativamente menores em comparação aos grupos Colagenase e Solução salina ($p = 0,01$).

Fonte: dados da pesquisa

No 14º dia (Figura 10), essa tendência tornou-se mais evidente. Colagenase e solução Salina apresentaram os maiores percentuais de mastócitos ($26,8\% \pm 9,73$ e $26,5\% \pm 2,90$, respectivamente), enquanto *H. segmentaria* ($8,3\% \pm 0,48$) e *H. semidiaphana* ($8\% \pm 0,41$) permaneceram em níveis significativamente mais baixos ($p < 0,05$). Esses achados reforçam que a terapia larval modulou a resposta inflamatória ao longo do processo cicatricial, reduzindo a participação dos mastócitos e favorecendo um microambiente mais propício à reparação tecidual.

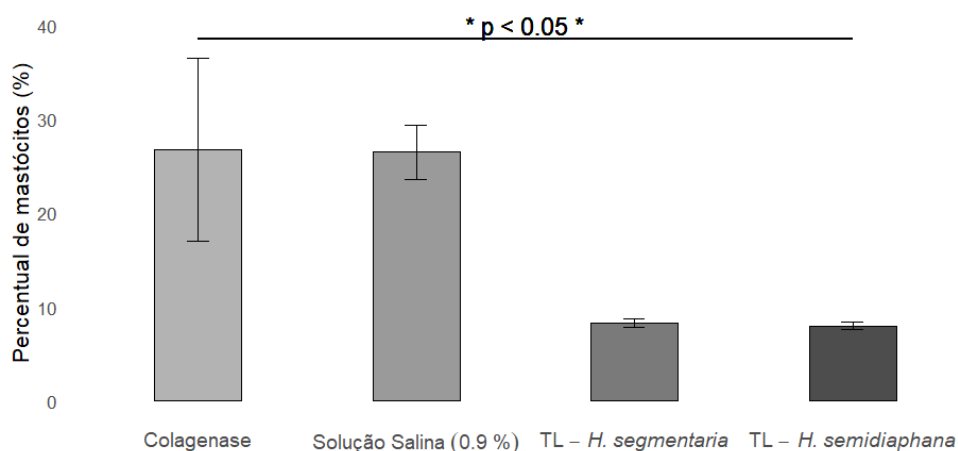


Figura 9: Percentual médio de mastócitos (média $\pm$ EP) no 14º dia de avaliação. Observa-se redução expressiva nos grupos tratados com terapia larval em relação aos grupos Colagenase e Solução salina ($p < 0,05$).

Fonte: dados da pesquisa

DISCUSSÃO

Avaliação macroscópica e contração da lesão cutânea

A terapia larval apresentou vantagens no desbridamento e limpeza das lesões nas primeiras 48 horas, confirmando sua capacidade de degradar biofilmes bacterianos e remover tecido desvitalizado por meio das excreções e secreções (ES) das larvas, ricas em enzimas proteolíticas como serina-proteases, metaloproteases e colagenases, que atuam na degradação do tecido necrótico e remodelação da matriz extracelular²³⁻²⁷. Além do efeito enzimático e mecânico, observou-se redução precoce do odor fétido, associado à diminuição da carga bacteriana, efeito já documentado na literatura^{28,29}.

Na fase proliferativa (7º dia), *H. segmentaria* apresentou maior redução da área da lesão em comparação aos demais grupos, reforçando evidências de que a terapia larval acelera a formação de tecido de granulação mesmo em condições de hiperglicemia, que compromete a

atividade de fibroblastos, células endoteliais e a síntese de colágeno³⁰⁻³². A ação combinada de desbridamento seletivo, modulação microbiana e estímulo tecidual parece favorecer uma progressão mais rápida e eficiente da caracterização em relação a tratamentos convencionais, como a collagenase ou a irrigação com solução salina.

Apesar dos benefícios, a literatura apresenta resultados heterogêneos quanto ao tempo total até o fechamento da ferida^{33,34}, possivelmente devido a diferenças metodológicas (tamanho amostral, etiologia das lesões, protocolos e terapias associadas). Dessa forma, a terapia larval deve ser considerada uma estratégia eficaz para preparo do leito da ferida, criando um ambiente favorável para terapias subsequentes e reduzindo complicações como biofilmes persistentes, odor e excesso de exsudato.

A análise da contração das lesões ao longo de 14 dias corroborou com esses achados: os grupos tratados com larvas exibiram contração superior desde as primeiras avaliações, indicando resposta tecidual precoce e sustentada. Esse efeito resulta tanto do desbridamento rápido quanto do estímulo à formação de tecido de granulação, como descrito por Bazaliński et al.²⁸. A manutenção desse padrão até o final do período experimental sugere contribuição contínua da terapia para modulação bacteriana e a remoção de barreiras físicas à cicatrização, favorecendo proliferação celular e angiogênese^{18, 23, 37, 38}.

Em conjunto, os resultados sustentam a terapia larval como ferramenta eficaz no manejo de feridas, integrando desbridamento seletivo, controle microbiano e estímulo regenerativo. Além disso, indicam que espécies neotropicais como *H. segmentaria* e *H. semidiaphana* apresentam desempenho comparável ao de espécies tradicionalmente utilizadas na prática clínica, configurando alternativas promissoras em regiões de alta biodiversidade.

Avaliação histológica das lesões

A análise histológica evidenciou diferenças relevantes entre os tratamentos em ambiente hiperglicêmico. Nos grupos collagenase e solução salina, observou-se persistência de infiltrado inflamatório polimorfonuclear e mononuclear até o sétimo dia, refletindo manutenção do estado inflamatório, característica comum em feridas diabéticas devido à dificuldade de transição de macrófagos M1(fenótipo associado à ação inflamatória) para M2 (ação regenerativa)³⁻⁷. Em contraste, a terapia larval reduziu significativamente a intensidade inflamatória já no sétimo dia, possivelmente devido à presença de enzimas proteolíticas e de peptídeos antimicrobianos, bem como moléculas imunomoduladoras como alantoína e ácido úrico, presentes nas secreções larvais^{23-27, 37}.

Outro achado importante foi a modulação da angiogênese e da proliferação fibroblástica. Nos grupos tratados com larvas, esses processos ocorreram de forma mais equilibrada, ao contrário dos controles, que apresentaram proliferação resistente e desorganizada, sobretudo com collagenase. A menor intensidade de neovascularização no 14º dia sugere estágio mais avançado de maturação tecidual nos grupos larvais, enquanto nos controles ainda predominavam sinais inflamatórios. A proliferação fibroblástica, mais evidente em *H. segmentaria*, associou-se à deposição organizada de colágeno, confirmado ambiente favorável à remodelação da matriz extracelular, resultado semelhante ao observado por Tombulurk et al. (2017)³² com *Lucilia sericata*.

A collagenização foi outro ponto de destaque: os grupos larvais apresentaram deposição precoce e organizada de fibras colágenas, mantida até o 14º dia, em contraste com a deposição tardia e desorganizada observada nos controles. Esse efeito está relacionado à presença de collagenases e metaloproteases endógenas nas secreções larvais, capazes de degradar tecido desvitalizado e estimular síntese de matriz extracelular estável^{25,26}. A reepitelização acompanhou esse padrão, sendo mais evidente nos grupos larvais, com epitélio estratificado e formação de camadas de queratina.

Quanto aos mastócitos, observou-se elevação progressiva nos grupos controle, enquanto os tratados com larvas mantiveram valores baixos e estáveis até o 14º dia. Esse achado é relevante, já que os mastócitos, embora participem da angiogênese e remodelação, também estão associados à perpetuação da inflamação e à fibrose em ambientes desfavoráveis^{4-7,9}. Assim, a menor ativação dessas células nos grupos larvais reforça o papel modulador da terapia.

Em síntese, a histopatologia confirmou que a terapia larval, especialmente com *H. segmentaria*, promove cicatrização ordenada, caracterizada por resolução precoce da inflamação, deposição eficiente de colágeno e reepitelização acelerada. Esses resultados corroboram a literatura que reconhece a larvoterapia não apenas como agente de desbridamento, mas também como moduladora do microambiente inflamatório, favorecendo a transição para fases mais avançadas da cicatrização^{10, 15, 16, 28, 29, 33, 34, 39, 41}.

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a terapia larval com *Hemilucilia segmentaria* e *Hemilucilia semidiaphana* foi mais eficaz que os tratamentos convencionais com collagenase e solução salina na cicatrização de feridas cutâneas em modelo experimental de diabetes. Macroscopicamente, os grupos tratados com larvas apresentaram desbridamento mais rápido,

menor inflamação e maior contração da ferida, enquanto nos controles houve persistência de necrose e odor fétido.

A análise histológica confirmou tais achados, evidenciando menor intensidade inflamatória, deposição organizada de colágeno, proliferação fibroblástica e vascular adequadas e reepitelização precoce. Além disso, a menor quantidade de mastócitos nos grupos tratados indicou modulação da resposta inflamatória. Os resultados reforçam que a terapia larval atua não apenas como método de desbridamento biológico, mas também como moduladora do microambiente inflamatório e estimuladora da reparação tecidual, mesmo sob hiperglicemia crônica.

Entre as espécies testadas, *H. segmentaria* apresentou desempenho ligeiramente superior, sugerindo potencial clínico ampliado. Assim, a terapia larval desponta como alternativa promissora para o manejo de feridas complexas, com efeitos antimicrobianos, debridantes e imunomoduladores, merecendo investigação em cenários clínicos aplicados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas* [Internet]. 2024 update. Country data: Brazil. Available from: <https://diabetesatlas.org/data-by-location/country/brazil/> [accessed 2025-08-21].
2. Armstrong DG, Boulton AJM, Bus SA. Diabetic foot ulcers and their recurrence. *N Engl J Med*. 2017;376(24):2367–75.
3. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet*. 2005;366(9498):1736–43.
4. Boulton AJM, Armstrong DG, Kirsner RS. Diabetic wound-healing science. *Medicina (Lithuania)*. 2021;57(10):1072._
5. Mohsin F, Javaid S, Tariq M, Mustafa M. Molecular immunological mechanisms of impaired wound healing in diabetic foot ulcers (DFU): current therapeutic strategies and future directions. *Int Immunopharmacol*. 2024 Sep 30;139:112713.
6. Mirza RE, Fang MM, Ennis WJ, Koh TJ. Macrophage dysregulation and impaired skin wound healing in diabetes. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:528.
7. Mirza RE, Koh TJ. Macrophage dysregulation in diabetic wounds: Hyperglycemia decreases phagocytosis of apoptotic neutrophils and sustains inflammation. *Mol Cell Endocrinol*. 2023;560:111435.

8. Sharifiaghdam M et al. Macrophage dysregulation and impaired skin wound healing in diabetes. *Front Cell Dev Biol.* 2022;8:528.
9. Hassanshahi A et al. Macrophage-mediated inflammation in skin wound healing. *Cells.* 2022;11(19):2953
10. Masiero FS, et al. Histological patterns in healing chronic wounds using *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) larvae and other therapeutic measures. *Parasitol Res.* 2015;114(8):2865–72. doi:10.1007/s00436-015-4487-y
11. Sherman RA. Maggot therapy for treating diabetic foot ulcers unresponsive to conventional therapy. *Diabetes Care.* 2003;26(2):446–51.
12. Kılınç Ö, Arkan H, Akbaş F, Polat E, Tunçdemir M, Onaran İ, et al. The Effects of *Lucilia sericata* Larval Secretions on the Expressions of MicroRNAs that are Suggested to be Related with Wound Healing in Experimental Diabetic Rat Wound Model. *Bezmialem Science.* 2020;8(1):8-13. doi:10.14235/bas.galenos.2018.2370.
13. Linger RJ, Belikoff EJ, Yan Y, Li F, Wantuch HA, Fitzsimons HL, et al. Towards next generation maggot debridement therapy: transgenic *Lucilia sericata* larvae that produce and secrete a human growth factor. *BMC Biotechnol.* 2016;16:30. doi:10.1186/s12896-016-0263-z.
14. Jafari A, Hosseini SV, Hemmat HJ, Khazraei H. *Lucilia sericata* larval therapy in the treatment of diabetic chronic wounds. *J Diabetes Metab Disord.* 2022;21:305-12. doi:10.1007/s40200-022-00973-w.
15. Sherman RA, Hall MJ, Thomas S. Larval Therapy for Chronic Cutaneous Ulcers: Historical Review and Future Perspectives. *Wounds.* 2017;29(9):262–70.
16. Barbosa TA, Mendes J, Ferreira LAC, Souza ML, Almeida MHA, Almeida RJ. Perfil sinantrópico de *Hemilucilia segmentaria* e *H. semidiaphana* (Diptera: Calliphoridae) em áreas urbanas da Região Sudeste do Brasil. *Rev Bras Entomol.* 2020;64(3):e20190109.
17. Figuerêdo PGJ, Barcellos JFM, Queiroz J, Freitas MT. Indução de Diabetes Mellitus e Úlcera diabética em Ratos Wistar: um estudo piloto. *Peer Rev.* 2023;5(21):786–800. doi:10.53660/1447.prw2941. Disponível em: <https://peerw.org/index.php/journals/article/view/1447>
18. Ferreira CLR, Nicolau RA. Diabetes experimental em ratos: revisão sistemática. In: XV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e XI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação. São José dos Campos: Univap; 2011.

19. Echeverri MIW, Álvarez CR, Higuera SHE, Idárraga JCW, Franco MME. *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae), una nueva alternativa para la terapia larval y reporte de casos en Colombia. *Iatreia*. 2010;23(2):107–16.
20. Prata MB, Haddad CM, Goldenberg S, Simões MJ, Moura LAR, Trabulsi LR. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea: estudo experimental em ratos. *Acta Cir Bras*. 1988;3(2):43–8.
21. Ramsey DT, Pope ER, Wagner-Mann C, Berg JN, Swain SF. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full thickness skin wounds in dogs. *Am J Vet Res*. 1995;56(7):941–9.
22. Garros IC, Campos ACL, Tâmbara EM, Tenório SB, Torres OJM, Agulham MA, Araújo ACF, Santis-Isolan PMB, Oliveira RM, Arruda ECM. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. *Acta Cir Bras*. 2006;21(supl3):55–65.
23. Cazander G, van Veen KE, Bouwman LH, Bernards AT, Jukema GN. Maggot excretions/secretions are differentially effective against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 2009;64(5):917–22. doi:10.1093/jac/dkp313
24. Jiang K-C, Li H-F, Wang X-J, Wang H-X, Zhang H. Excretions/Secretions from Bacteria-Pretreated Maggot Are More Effective against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PLoS One*. 2012;7(11):e49815. doi:10.1371/journal.pone.0049815
25. Bexfield A, Bond AE, Morgan C, Wagstaff J, Newton RP, Ratcliffe NA, et al. Aminopeptidase activity in *Lucilia sericata* medicinal maggots: Evidence for the digestion of collagen. *Insect Mol Biol*. 2010;19(2):119–27. doi:10.1111/j.1365-2583.2009.00945.x
26. Van der Plas MJ, van der Does AM, Baldry M, Dogterom-Ballering HC, van Gulpen C, van Dissel JT, et al. Maggot excretions/secretions inhibit multiple neutrophil pro-inflammatory responses. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59(5):964–72. doi:10.1093/jac/dkm066
27. Pöppel A-K, Vogel H, Wiesner J, Vilcinskas A. Antimicrobial peptides expressed in medicinal maggots of the blow fly *Lucilia sericata* show combinatorial activity against bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(5):2508–14. doi:10.1128/AAC.05180-14
28. Bazaliński D, Kózka M, Karnas M, Więch P. Effectiveness of chronic wound debridement with the use of *Lucilia sericata* larvae therapy. *Adv Dermatol Allergol*. 2019;36(2):111–5. doi:10.5114/ada.2018.74513
29. Suraya AS, Salmah AU, Shahida S, Siti Mazlipah IS. A systematic review of efficacy on larva debridement in diabetic foot ulcers. *Health Life Sci*. 2024;1(1):15–25. doi:10.4081/hls.2024.11839

30. Huang J, Heng S, Zhang W, Liu Y, Xia T, Ji C, et al. Dermal extracellular matrix molecules in skin development, homeostasis, wound regeneration and diseases. *Semin Cell Dev Biol*. 2022;128:137–144. doi:10.1016/j.semcdb.2022.02.027.
31. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins e Cotran: Patologia – Bases Patológicas das Doenças*. 10ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2021
32. Tombulturk FK, Aydin BE, Kalkan Y, Gunes S, Sahin A, Ozturk G, et al. Effects of *Lucilia sericata* on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats and analysis of its secretome. *Biosci Rep*. 2017;37(2):BSR20160555. doi:10.1042/BSR20160555.
33. Wilasrusmee C, Thanalertkit C, Jitpratoom P, Srikuea K, Sinsomros S, Lertsithichai P. Maggot therapy for chronic ulcer: a retrospective cohort and meta-analysis. *Asian J Surg*. 2014;37(2):138–47. doi:10.1016/j.asjsur.2013.07.003
34. Opletalová K, Blaizot X, Mourgeon B, Chêne Y, Creveuil C, Combemale P, et al. Maggot therapy for wound debridement: a randomized multicenter trial. *JAMA Dermatol (JAMA Network)*. 2012;148(4):432–8. doi:10.1001/archdermatol.2011.1895
35. Van der Plas MJ, Dogterom-Ballering HC, Nibbering PH, et al. Maggot excretions/secretions are differently effective against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61(1):117–22. doi:10.1093/jac/dkm407.
36. Hinz B. Myofibroblasts in wound healing: role and regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2022;14(1):a041231. doi:10.1101/cshperspect.a041231
37. Hosseini M, Brown J, Khosrotehrani K, Bayat A, Shafiee A. Skin biomechanics: a potential therapeutic intervention target to reduce scarring. *Burns Trauma*. 2022 Aug 23;10:tkac036. doi:10.1093/burnst/tkac036
38. Becerikli M, Wallner C, Dadras M, Wagner JM, Dittfeld S, Jettkant B, Gestmann F, Mehlhorn H, Mehlhorn-Diehl T, Lehnhardt M, et al. Maggot Extract Interrupts Bacterial Biofilm Formation and Maturation in Combination with Antibiotics by Reducing the Expression of Virulence Genes. *Life*. 2022;12(2):237. doi:10.3390/life12020237.
39. Elder JW, Armstrong DG. Wound debridement: lessons learned of when and how. *Clin Podiatr Med Surg*. 2013;30(1):109–23. doi:10.1016/j.cpm.2012.08.009
40. Mello RAA, Espinosa AM, Souza CJ. Desbridamento biológico: o uso da terapia larval em feridas complexas. *Rev Multidisciplinar em Saúde*. 2021; [citado 2025 Aug 12]; Disponível em: <https://doi.org/10.51161/rem/1458>

- 41.** Geng K, Ma X, Jiang Z, Huang W, Gao C, Pu Y, Luo L, Xu Y. Innate immunity in diabetic wound healing: focus on the mastermind hidden in chronic inflammatory. *Front Pharmacol.* 2021;12:653940. doi:10.3389/fphar.2021.65394

9. DISCUSSÃO GERAL

A cicatrização de feridas crônicas depende da quebra do ciclo de biofilme, necrose e inflamação desregulada. Nesse cenário, a terapia larval, tradicionalmente realizada com *Lucilia sericata*, tem recebido crescente atenção científica por combinar desbridamento biológico seletivo, controle de carga microbiana/biofilme e modulação imunológica, favorecendo a transição da ferida para fases proliferativa e de remodelamento (Stadler, 2022).

Conforme discutido acerca das implicações imunológicas na interação parasito-hospedeiro (Capítulo 1), uma contribuição central da TL é conter a inflamação patológica. Em relação à imunorregulação, estudos *in vitro* demonstram que as secreções/excreções (ES) larvais induzem respostas pró-inflamatórias de monócitos ($\downarrow$ TNF- α , $\downarrow$ IL-12p40; $\uparrow$ IL-10), por via cAMP-dependente, sem comprometer a defesa antimicrobiana (Van Der Plas *et al.*, 2009). Em neutrófilos, também atenuam múltiplas respostas inflamatórias (Van Der Plas *et al.*, 2007) e modulam o sistema complemento ($\downarrow$ C3a/C5a; bloqueio de C5b-9), reduzindo quimiotaxia e ativação neutrofílica excessivas (Tamura *et al.*, 2017). Esse “rebaixamento fino” da inflamação é particularmente relevante em úlceras do pé diabético, nas quais há excesso de citocinas e proteases.

Dados *in vivo* recentes confirmam esses achados. Gazi *et al.* (2025) observaram que, em úlceras de diabéticos, a TL promoveu maior redução de neutrófilos/macrófagos M1 e aumento de M2/T/B, além de recuperação completa que o desbridamento cirúrgico. Assim, o mecanismo imunomodulador conecta-se diretamente às consequências clínicas.

Quanto à atividade antimicrobiana, feridas crônicas frequentemente abrigam biofilmes multiespécies (p. ex., *S. aureus*, *P. aeruginosa*), resistentes a antibióticos e à imunidade. As ES de *L. sericata* inibem formação e desorganizam biofilmes, com ação sinérgica a antibióticos, eliminando bactérias com maior eficácia que fármacos isolados (Van Der Plas *et al.*, 2008; 2010). Outras investigações estendem o efeito a biomateriais e espécies adicionais (p. ex., *S. epidermidis*, *E. cloacae*), reforçando a ação antibiofilme transversal das secreções larvais. Mecanismos implicados incluem proteases termo-sensíveis, DNases e peptídeos antimicrobianos, como a lucifensina (Bohová *et al.*, 2014).

Além disso, a TL mostrou efeito antibiofilme superior a vários curativos/enzimas isoladas, e ação sinérgica com antibióticos na remoção de *S. aureus* em biofilme — vantagem difícil de replicar com hidrogel ou alginato sem adjuvantes (Van Der Plas *et al.*, 2008). No estudo com úlceras de pé diabético desenvolvido por Motley *et al.* (2018) o ECR mostrou a

colagenase superior a produto com prata como adjuvante ao desbridamento, mas sem a componentização antibiofilme/imunomoduladora típica da TL; na prática, TL e colagenase não são excludentes, podendo ser sequenciais e ou associadas com outras terapias como pressão negativa (TL para “zerar” biofilme/necrose; enzimas/pressão negativa para avançar granulação/epitelização).

Evidências recentes sugerem atividade antibacteriana direta dos “secretomas” larvais contra Gram-positivos e Gram-negativos, inclusive como adjuvantes a antibióticos. Essa dimensão antimicrobiana, somada ao desbridamento seletivo, reduz substrato para biofilmes e melhora a penetração de terapias tópicas/sistêmicas (Kaihanfar *et al.*, 2018).

Ensaios reforçam essa vantagem: enquanto Dumville *et al.* (2009), mostraram que a TL reduziu significativamente o tempo até o desbridamento em úlceras venosas, embora sem diferença em tempo de cicatrização final, e com aumento de dor durante o desbridamento (aspecto manejável com analgesia e escolha de “bagged larvae”). Já o estudo de Gazi *et al.* (2025) evidenciaram em pés diabéticos, menos sessões e maior taxa de recuperação completa *versus* desbridamento cirúrgico. Convergem, portanto, a sinais de eficiência de desbridamento e modulação imune que podem se traduzir em redução de procedimentos.

Quanto à custo-efetividade, os resultados são mistos. Em úlceras venosas, não houve vantagem econômica frente ao hidrogel, apesar do desbridamento mais rápido (Soares *et al.*, 2009). Contudo, em úlceras do pé diabético, há indícios de melhor valor quando se contabilizam menor número de sessões e progressão mais rápida do leito da ferida, embora a qualidade da evidência ainda peça ECRs maiores (Motley *et al.*, 2018).

Contudo, a dependência quase exclusiva de *L. sericata* limita a aplicação da TL em regiões tropicais. Guias recentes de bioprospecção recomendam avaliar espécies neotropicais estritamente necrófagas, não causadoras de miíases obrigatórias e passíveis de criação desinfectada, seguindo etapas de validação que incluem ensaios *in vitro*, *in vivo* e clínicos, preferencialmente com larvas confinadas em bolsas (*bagged larvae*) para maior segurança (Thyssen; Stadler, 2022).

Na Amazônia, as espécies *Hemilucilia segmentaria* e *H. semidiaphana* da família Calliphoridae, se destacam como candidatas potenciais. Embora ainda sem ensaios clínicos publicados de TL com *Hemilucilia*, os avanços apontados neste estudo evidenciaram o potencial larvoterápico das espécies. Cabe ressaltar que outras espécies não-tradicionais como *Chrysomya megacephala* já demonstraram bioatividade pela análise de homogenatos, onde exibiam atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus* e *B. subtilis*, sugerindo um “arsenal”

bioquímico compartilhado entre califorídeas que pode ser explorado na TL, desde que cumpridos os critérios de segurança sanitária e ética clínica (Chaiwong *et al.*, 2016; Mohamed; Azam, 2022).

Em busca de viabilizar a TL com espécies alternativas, o presente estudo avançou na criação e reprodução dessas espécies em laboratório, embora sem oviposição consistente em cativeiro. Por serem assinantrópicas, evitam ambientes humanos e apresentam baixo risco sanitário. A coleta em áreas de preservação forneceu ovos em quantidade suficiente para esterilização e aplicação experimental, com hipoclorito de sódio a 1% sendo a solução mais eficaz, confirmando literatura prévia (Limsopatham *et al.* 2017). Apesar de alternativas como formaldeído apresentaram forte ação bactericida, resultaram em baixa eclodibilidade larval, inviabilizando seu uso.

Ao que diz respeito, a reprodução das espécies em condições de laboratório, até o presente momento, não foi possível alcançar F1 (primeira geração filial de moscas em condições de laboratório). A oviposição descrita neste manuscrito, foi observada de forma excepcional em cativeiro ou adquirida horas depois da coleta das fêmeas adultas no campo. Foi constatado que houve cópula e algumas fêmeas se encontravam cheia de ovos (**figura 16**), porém não foi suficiente para oviposição.



Figura 16 - Moscas criadas em laboratório cheias de ovos

Fonte: Dados da pesquisa, 2024.

Após as tentativas de replicar o estudo de Gama *et al.* (2021) buscou-se adaptar o método de criação em laboratório ao mínimo de intervenção humana possível. Todavia não houve estímulo suficiente para oviposição em massa.

Para amenizar a dificuldade de acesso aos ovos das espécies, necessários para o processo de desinfecção, buscou-se coletar as espécies no ponto de trilha da Área de Preservação Ambiental (APA) localizada no entorno das instalações prediais do Campus da Universidade Federal do Amazonas- Setor Sul.

A coleta foi exitosa, onde verificou-se um grande número de ambas as espécies, apenas em meio período do dia. A quantidade de ovos retirados do substrato era mais que suficiente para o processo de desinfecção dos ovos e posterior aplicação das larvas na TL. Desse modo, não houve empecilho para aplicação das larvas.

A aplicação de espécies amazônicas reduz a dependência de importação e adapta a TL às condições locais, mantendo consistência imunológica e antimicrobiana conforme descritos no Capítulo 1(Oliveira *et al.*, 2025) e demonstrando benefício macro e histológico mesmo em condições hiperglicêmicas (Tombulturk *et al.*, 2017).

10. CONCLUSÃO GERAL

Esta tese investigou o potencial larvoterápico das espécies (*H. segmentaria* e *H. semidiaphana*) no reparo tecidual de lesões cutâneas de ratos diabéticos, questionando se tais espécies conseguiam debridar seletivamente tecido desvitalizado e se em comparação a tratamentos convencionais aceleraram o processo de cicatrização.

A viabilidade terapêutica buscou integrar três frentes: (i) Compreensão dos mecanismos imunomoduladores, antibiofilme e desbridamento da terapia larval (TL) em espécie já validada para TL em revisão integrativa da literatura; (ii) desenvolvimento de protocolo laboratorial de criação e desinfecção dos ovos para aplicação clínica; e (iii) Ensaio pré-clínico randomizado em ratos diabéticos, comparando TL, collagenase e solução salina.

Dentre as hipóteses estabelecidas para este estudo, concluiu-se:

A hipótese H1a (desbridamento seletivo): foi sustentada pela promoção de desbridamento seletivo do tecido desvitalizado, sem danificar o tecido viável. Macroscopicamente, as feridas tratadas apresentaram liquefação/degradação e remoção eficiente do necrosado com duas abordagens dentro de 48 hs, com formação de bordas bem delineadas e tecido de granulação saudável emergindo rapidamente. Ao nível histológico, a TL com ambas as espécies revelou uma redução drástica do tecido desvitalizado acompanhado por uma proliferação robusta de fibroblastos e capilares, que indicam formação precoce de tecido de granulação, além da regulação inflamatória que apoia a transição entre as fases de cicatrização. Desse modo, sendo consistentes com a seletividade tecidual típica para terapia larval.

A hipótese H1b (a TL acelera o reparo tecidual): foi confirmada pela superioridade da contração da lesão cutânea no decorrer dos 14 dias de avaliação, apresentando contração até 15,2% superior à collagenase e 7,9% maior em relação à solução salina, além de maior deposição de colágeno e reepitelização.

Considerando os capítulos que integram essa tese, obteve-se os seguintes desfechos:

A revisão integrativa mostrou que as excreções/secreções (ES) de larvas reduzem respostas pró-inflamatórias (neutrófilos/monócitos), inibem complemento sem perder atividade antimicrobiana e quebram biofilmes, favorecendo a transição para fase proliferativa.

O protocolo de criação em laboratório, ajustado ao microclima amazônico (27–29 °C; 80 ± 10% UR; 12/12 h) determinou o ciclo ovo→adulto $\approx$ 10,1 d para *H. semidiaphana* e $\approx$ 12,2 d para *H. segmentaria*; e a esterilização dos ovos com NaClO 1% entregaram lotes estéreis com bom rendimento. Todavia, a oviposição em condições de laboratório não foi alcançada.

No ensaio pré-clínico, no 3º dia de avaliação houve melhora dos sinais flogísticos em todos os grupos, mas a TL mostrou ser superior quanto ao desbridamento de tecido desvitalizado, gestão do exsudato e controle de microrganismos; no 7º dia, a *H. segmentaria* apresentou vantagem pontual na contração da lesão, colagenização e reepitelização quando comparado a solução salina e collagenase, porém com tendência de desempenho semelhante entre as duas *Hemilucilia*. No 14º dia verificou-se fechamento parcial ou total das lesões, com epitelização e/ou formação de crosta, exceto no grupo tratado com collagenase, que manteve áreas residuais de lesão. Deste modo, validando ambas as espécies como candidatas à aplicação clínica.

A quantificação de mastócitos demonstrou diferenças significativas entre os tratamentos, com menores percentuais nos grupos submetidos à terapia larval, indicando modulação importante da resposta inflamatória e contribuindo para reduzir o risco de cicatrização deficiente ou fibrose desorganizada.

Em síntese, os achados reforçam o potencial da larvoterapia com *H. segmentaria* e *H. semidiaphana*, mas evidenciam a necessidade de novos ensaios pré-clínicos randomizados para elucidar respostas imunológicas específicas de cada espécie e sua relevância causal no reparo de lesões cutâneas. Esses estudos, idealmente em modelos diabéticos reprodutíveis e com amostras dimensionadas, permitirão distinguir efeitos espécie-específicos de fenômenos gerais da terapia larval, acelerando a translação para protocolos clínicos adaptados à fauna local e otimizando desfechos de cicatrização em feridas crônicas.

11. PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados nesta tese evidenciam o potencial terapêutico das espécies *Hemilucilia segmentaria* e *Hemilucilia semidiaphana* no reparo de lesões cutâneas em modelo experimental de diabetes mellitus, fortalecendo o papel promissor da terapia larval como recurso de baixo custo, eficaz e adaptável às realidades tropicais, como a Amazônia. A constatação de que essas espécies alternativas contribuem para o desbridamento, estimulação da granulação e controle da inflamação local reforça a necessidade de aprofundamento no estudo de sua composição bioquímica, em especial quanto aos metabólitos secundários com ação antimicrobiana, imunomoduladora e pro-regenerativa específica.

Estudos futuros poderão concentrar-se na caracterização molecular dos exsudatos larvais, visando identificar peptídeos antimicrobianos, proteases específicas e fatores de crescimento liberados durante o processo terapêutico. A partir disso, será possível isolar, sintetizar ou potencializar compostos bioativos com aplicação clínica direta em produtos tópicos farmacêuticos, especialmente para populações com feridas crônicas de difícil manejo, como os pacientes diabéticos. A tecnologia de proteômica e metabolômica aplicada às secreções larvais poderá, inclusive, impulsionar o desenvolvimento de curativos inteligentes baseados em biomoléculas derivadas de larvas.

Outra perspectiva importante é o estudo da interação imunológica entre larvas e tecido hospedeiro, com ênfase na modulação da resposta inflamatória crônica presente em feridas diabéticas. Avaliar o impacto da larvoterapia sobre a dinâmica de mastócitos, neutrófilos, macrófagos e fibroblastos em diferentes momentos da cicatrização poderá esclarecer mecanismos celulares responsáveis pela aceleração do reparo tecidual. Este conhecimento poderá direcionar terapias combinadas, associando larvoterapia a agentes imunomoduladores que favoreçam uma resposta mais eficiente e menos fibrogênica.

Para estudos subsequentes, a aplicação de estratégias que visam condicionar o ambiente artificial do laboratório ao vivenciado no habitat original das espécies assinantrópicas *H. segmentaria* e *H. semidiaphana* torna-se indispensável para fortalecer o uso terapêutico das larvas, uma vez que a produção em massa de lotes estéreis, viabilizado pela oviposição em laboratório e manutenção da colônia facilitaria o tratamento concomitante de pacientes e favorece a importação para outras localidades, difundindo a terapia larval como terapêutica alternativa ou de primeira escolha para tratamento de lesões de difícil cicatrização.

Por fim, destaca-se a relevância de ensaios clínicos futuros em humanos, que avaliem a segurança, eficácia e custo-benefício da aplicação de *H. segmentaria* e *H. semidiaphana* em

pacientes com lesões crônicas, especialmente úlceras de pé diabético. A incorporação desses bioinsumos em protocolos do Sistema Único de Saúde (SUS), respeitando critérios técnicos, bioéticos e sanitários, pode representar uma virada no manejo das lesões crônicas no Brasil, especialmente em contextos de desigualdade socioeconômica. A continuidade dessa linha de pesquisa representa não apenas uma inovação biomédica, mas também uma valorização dos recursos biológicos da biodiversidade amazônica.

12. EQUIPE DO PROJETO

Nome completo	Priscila Gonçalves Jacinto Figueredo
Instituição	Universidade Federal do Amazonas
Nível acadêmico	Mestre
Telefone	(63)984002593
E-mail	pris.fly2@gmail.com
Link do Currículo Lattes	http://lattes.cnpq.br/1066810752883157
Função no projeto	Pesquisadora

Nome completo	José Fernando Marques Barcellos
Instituição	Universidade Federal do Amazonas
Nível acadêmico	Doutor
Telefone	(92) 98122-6666
E-mail	fmarques@ufam.edu.br
Link do Currículo Lattes	http://lattes.cnpq.br/9296854102700928
Função no projeto	Orientador

Nome completo	Maria do Carmo Queiroz Fialho
Instituição	Universidade Federal do Amazonas
Nível acadêmico	Doutora
Telefone	(92) 99245-7391
E-mail	mcqfialho@hotmail.com
Link do Currículo Lattes	http://lattes.cnpq.br/6847985219834200
Função no projeto	Coorientadora

Nome completo	Bruno Bezerra Jensen
Instituição	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Nível acadêmico	Doutor
Telefone	(92) 98404-3590
E-mail	brunobjensenfarma@gmail.com
Link do Currículo Lattes	http://lattes.cnpq.br/9739896616838681
Função no projeto	Coorientador

Nome completo	José Albertino Rafael
Instituição	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Nível acadêmico	Doutor
Telefone	(92) 99142-2699

E-mail	jarafael2@gmail.com
Link do Currículo Lattes	http://lattes.cnpq.br/9512798757714471
Função no projeto	Parceria para avaliar as características específicas dos dípteros coletados para o estudo e utilização do Biotério Central do INPA.

Nome completo	Marcelo Cutrim Moreira de Castro
Instituição	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Nível acadêmico	Doutor
Experiência / Treinamento	Sim
Telefone	(92) 99192-5406
E-mail	marcelocutrim@gmail.com
Link do Currículo Lattes	http://lattes.cnpq.br/3509511123815350
Função no projeto	Colaborador nas técnicas laboratoriais e sala de criação dos dípteros

Nome completo	Jonatas de Souza Queiroz
Instituição	Universidade Federal do Amazonas
Nível acadêmico	Mestre PPGIBA
Telefone	(92) 99308-4093
E-mail	jonatas.queiroz@ufam.edu.br
Link do Currículo Lattes	http://lattes.cnpq.br/6671287839360046
Função no projeto	Colaborador geral para desenvolvimento das Etapas 1 e 2 do estudo.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, A. C.; OLIVEIRA, D.; SAAVEDRA, M. J.; BORGES, A.; SIMÕES, M. Biofilms in diabetic foot ulcers: impact, risk factors and control strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 15, p. 8278, 2021.
- AGÊNCIA CENARIUM. Programa ‘Pé Diabético’ atende mais de 170 mil pacientes no AM. 2023. Disponível em: <<https://agenciacenarium.com.br/programa-pe-diabetico-atende-mais-de-170-mil-pacientes-no-am/>> Acesso em: 26 de março de 2024.
- AKHTAR, N; ABDEL-REHIM, S; RODRIGUES, J; BROOKS. The use of larvae therapy to debride full thickness burns in the anaesthetically unfit patient: The Nottingham experience. *Burns*, Dalas, v.37, n.6, p.44- 49, abril 2011.
- ARMSTRONG, D. G.; BOULTON, A. J. M.; BUS, S. A. Diabetic foot ulcers and their recurrence. *New England Journal of Medicine*, v. 376, n. 24, p. 2367–2375, 2017.
- AZEVEDO, W. T. de A. *et al.* Record of the First Cases of Human Myiasis by *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae), Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, [s. l.], v. 52, n. 6, p. 1368–1373, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jme/tjv130>. Acesso em: 22 fev. 2024.
- BAENA-DÍEZ, J. M., PEÑAFIEL, J., SUBIRANA, I., et al. Risk of cause-specific death in individuals with diabetes: a competing risks analysis. *Diabetes Care*, v. 39 (11), p. 1987-1995, 2016.
- BAER, W. S. The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larvae of the blowfly). *Journal of Bone Joint Surgery*, v. 13, p. 438–475, 1931.
- BAER, W. The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larva of the blowfly). *Clinical Orthopaedics and Related Research*, Philadelphia, v.469, n.4, p.438-475, 2011.
- BANTIE, G.M. et al. Prevalence of undiagnosed diabetes mellitus and associated factors among adult residents of Bahir Dar city, northwest Ethiopia: a community-based cross-sectional study. *BMJ Open*. 2019.
- BARBOSA, T. A. et al. Perfil sinantrópico de *Hemilucilia segmentaria* e *H. semidiaphana* (Diptera: Calliphoridae) em áreas urbanas da Região Sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 64, n. 3, p. e20190109, 2020.
- BARCAUI, E. de O; CARVALHO, A. C. P; PINEIRO-MACEIRA, J; BARCAUI, C. B; MORAES, H. (2015). Study of the skin anatomy with high-frequency (22 MHz) ultrasonography and histological correlation. *Radiologia Brasileira*, 48(5), 324–329.
- BARNES, K.M.; GENNARD, D.E.; DIXON, R.A. An assessment of the antibacterial activity in larval excretion/secretion of four species of insects recorded in association with corpses, using *Lucilia sericata* Meigen as the marker species. *Bulletin of entomological research*,

v.100, n.6, p.635-640, 2010.

BARROS-CORDEIRO, K. B; PUJOL-LUZ, J. R. (2010) Morfologia e duração do desenvolvimento pós-embriônico de *Chrysomya megacephala* (Diptera: *Calliphoridae*) em condições de laboratório. *Papeis Avulsos de Zoologia*, 50(47): 709-717. doi: 10.1590/S0031-10492010004700001

BAZALIŃSKI, D. et al. Effectiveness of chronic wound debridement with the use of *Lucilia sericata* larvae therapy. *Advances in Dermatology and Allergology*, v. 36, n. 2, p. 111–115,

BECERIKLI, M. et al. Maggot extract interrupts bacterial biofilm formation and maturation in combination with antibiotics by reducing the expression of virulence genes. *Life*, v. 12, n. 2, p. 237, 2022. DOI: 10.3390/life12020237.

BECHARA, G. H; SZABÓ, M. P. J. Processo Inflamatório. 1. **Alterações Vasculares e Mediação Química**. 2006. Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/patologia/GERVASIOHENRIQUEBECHARA/inflam_aspectosvasculares2006.pdf> Acessado em: 26 de fev de 2024.

BEDIN, L.F; BUSANELLO, J; SEHNEM, G.D; SILVA, F.M; POLL, M.A. Estratégias de promoção da autoestima, autonomia e autocuidado das pessoas com feridas crônicas. *Revista Gaúcha de Enfermagem*. 2014; 35 (3) 61-7. 8.

BEXFIELD, A. et al. Aminopeptidase activity in *Lucilia sericata* medicinal maggots: evidence for the digestion of collagen. *Insect Molecular Biology*, v. 19, n. 2, p. 119–127, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2583.2009.00945.x.

BOULTON, A. J. M.; ARMSTRONG, D. G.; KIRSNER, R. S. Diabetic wound healing science. *Medicina (Lithuania)*, v. 57, n. 10, p. 1072, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Caso complexo. Ilhas das Flores. Fundamentação teórica. Feridas. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 6ª. Edição. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Diabetes Mellitus**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 64 p. (Cadernos de Atenção Básica, n. 16) (Série A. Normas e Manuais Técnicos) Disponível em: http://dtr2004.saude.gov.br/dab/docs/publicacoes/cadernos_ab/abcad16.pdf[1]

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por inquérito telefônico** (Vigitel) 2017. Brasília: Ministério da Saúde ; 2017

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por inquérito telefônico** (Vigitel) 2023. Brasília: Ministério da Saúde ; 2023.

BROUGHTON, G; JANIS, J. E; ATTINGER, C.E. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2006 a;117(7 Suppl):12S-34S.

BROUGHTON, G; JANIS, J.E; ATTINGER, C.E. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg* 2006 b; 117(7 Suppl):1e-S-32e-S.

BOHOVÁ, J.; MAJTÁN, J.; MAJTÁN, V.; TAKÁČ, P. Selective antibiofilm effects of *Lucilia sericata* larvae excretions/secretions against wound pathogens. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, Article ID 857360.

BONN, D. Maggot therapy: an alternative for wound infection. *The Lancet*, London, v.356, n. 9236, p. 1174, setembro 2000.

BURGESS, J. L.; WYANT, W. A.; ABUJAMRA, B. A.; KIRSNER, R. S.; JOZIC, I. Diabetic wound-healing science. *Medicina (Kaunas)*, v. 57, n. 10, p. 1072, 2021.

CABRAL, A. D. et al. Terapias inovadoras para reparo tecidual em pessoas com pé diabético. *Rev. enfermagem atual*, [S. l.], p. 01 a 20, 13 jul. 2022. DOI <https://doi.org/10.31011/reaid-2022-v.96-n.39-art.1365>. Disponível em: <<https://revistaenfermagematual.com/index.php/revista/article/view/1365/1436>> Acesso em: 13 abr. 2023.

CALICH, V. L. G; VAZ, C. A. C. *Imunologia*. São Paulo: Revinter; 2009.

CALISTO, F.C.F.S; CALISTO, S.L.S; SOUZA, A.P; FRANÇA, C.M; FERREIRA, A.P.L; MOREIRA, M.B. Use of low power laser to assist the healing of traumatic wounds in rats. *Acta cirurgica brasileira*. 2015; 30(3): 204-208

CAMPOS, A. C. L; BORGES-BRANCO, A; GROTH, A. K. (2007). Cicatrização de feridas. *ABCD. Arquivos Brasileiros De Cirurgia Digestiva* (São Paulo), 20(1), 51–58

CÂNDIDO, L.C. **Livro do Feridólogo**: tratamento clínico cirúrgico de feridas cutâneas agudas e crônicas. Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Tratamento de Feridas, Santos, 648p. 2006.

CARVALHO, L. A. N. et al. Úlcera do pé diabético (UDP) no Diabetes Mellitus 2: Uma abordagem molecular. *Revista Eletrônica do Programa de Mestrado em Direitos Humanos, Cidadania e Violência/Ciência Política do Centro Universitário Unieuro* ISSN: 1809-1261 UNIEURO, Brasília, número 27 (Especial), 2019, pp. 291-320.

CARVALHO, L.M.L; LINHARES, A.X. 2001. Seasonality of insect succession and pig carcass decomposition in a natural forest area in Southeastern Brazil. *J. For. Sci.*, 46: 604-608.

CARVALHO, L.M.L; THYSSEN, P.J; LINHARES, A.X; PALHARES, F.B. 2000. A checklist of arthropods associated with carrion and human corpses in southeastern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 95: 135-138.

CASTRO, G.; C.; ARACELI, A.; JUAN, M.C.; ALEJANDRO, E.; FLORES, J.; GARCÍA, T.; HERNÁNDEZ, S. Guía clínica basada en evidencia para el manejo del pie diabético. *Medicina Interna do México*, v.25, n.6, p.481-526, 2009.

CATRINA, S. B.; ZHENG, X. Hypoxia and hypoxia-inducible factors in diabetes and its complications. *Diabetologia*, v. 64, n. 4, p. 709-716, 2021.

CAVASSAN, N.R.V; CAMARGO, C.C; PONTES, L.G; BARRAVIERA, B; FERREIRA, R.S; MIOT, A.M. et al. Correlation between chronic venous ulcer exudate proteins and clinical profile: A cross sectional study. *J Proteomics*. 2018;192:280-90.

CAZANDER, G. et al. Maggot excretions/secretions are differentially effective against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 64, n. 5, p. 917–922, 2009. DOI: 10.1093/jac/dkp313.

CEROVSKY, V; BÉM, R. Lucifensins, the insect defensins of biomedical importance: the story behind maggot therapy. *Pharmaceutics* 2014, 7, 251-264.

CHAN, D; FONG, D; LEUNG, J; PATIL, N.G; LEUNG, G. Maggot Debridement Therapy In Chronic Wound Care. *Hong Kong Medical Journal*, Hong Kong, v.13, n.5, p.382-386, 2007.

CHAPMAN, R.F. 1998. The insects structure and function, 4. ed. New York, Cambridge University Press

CHAUDHURY, M.F; ZHU, J.J; SKODA, S.R. 2016. Bacterial volatiles attract gravid secondary screwworms (Diptera: *Calliphoridae*). *Journal of Economic Entomology*, 109(2): 947-951.

CHIANG, J.L; KIRKMAN, M.S; LAFFEL, L.M; PETERS, A.L. Type 1 Diabetes Sourcebook Authors. Type 1 diabetes through the life span: a position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2014;37(7):2034-54.

CHILDS, D.R.; MURTHY, A.S. Overview of Wound Healing and Management. *The Surgical Clinics of North America*, v.97, p.189-207, 2017.

CHAIWONG, T. et al. Antibacterial Activity of Excretions-Secretions from *Chrysomya megacephala* Against *Escherichia coli*. *J. Med. Assoc. Thai.*, 99 (Suppl. 1): S7–S11, 2016.

CHURCH, J.C.T. Larva Therapy in Modern Wound Care: A Review. *Primary Intention* 1999;7(2):63-68.

DALLAVECCHIA, D. L; PROENÇA, B. N; COELHO, V. M. de A. Bioterapia: uma alternativa eficiente para o tratamento de lesões cutâneas. *Revista de Pesquisa Cuidado é Fundamental Online*, [s. l], v. 3, n. 3, p. 2071–2079, 2011.

DASKALAKI, A., XENAKI, S., VENIANAKI, M., TOPALIDOU, A., ATHANASAKIS, E., CHRYSOS, E., CHALKIADAKIS, G. Well-promising outcomes with vacuum-assisted closure in an infected wound following laparotomy: a case report. *Ann. Med. Surgery*, v. 10, p. 73-76, 2016.

DENG, L. et al. The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic wound healing. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2021, p. 8852759, 2021.

DOMINGUES, E. A. R. et al. Efeito da terapia fotodinâmica em feridas agudas e crônicas: revisão de escopo. *Revista enfermagem Atual*, São Paulo, p. 1 a 17, 2022. doi

<https://doi.org/10.31011/reaid-2022-v.96-n.38-art.1260> Rev Enferm Atual In Derme v. 96, n. 38, 2022 e-021243. Disponível em: <<https://revistaenfermagematual.com/index.php/revista/article/view/1360>> Acesso em: 3 mar. 2023.

DUMVILLE, J. C., HINCHLIFFE, R. J., CULLUM, N., GAME, F., STUBBS, N., SWEETING, M., PEINEMANN, F., Negative pressure wound therapy for treating foot wounds in people with diabetes mellitus. *Cochrane Database System*, v. (10), 2013.

ECHEVERRI, M.I.W.; ÁLVAREZ, C.R.; HIGUITA, S.H.E.; IDÁRRAGA, J.C.W.; FRANCO, M.M.E. *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae), uma nova alternativa para a terapia larval e reporte de casos em Colômbia. *Iatreia*, v.23, n.2, p.107-116, 2010.

ELDER, J. W.; ARMSTRONG, D. G. Wound debridement: lessons learned of when and how. *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*, v. 30, n. 1, p. 109–123, 2013. DOI: 10.1016/j.cpm.2012.08.009.

ELGAR, M.A; ZHANG, D; WANG, Q; WITTWER, B; PHAM, H.T; JOHNSON, T.L; FREELANCE, C; COQUILLEAU, M. 2018. Insect antennal morphology: the evolution of diverse solutions to odorant perception. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 91(4): 457-469.

ERRDMANN, G. Antibacterial action of myiasis-causing flies. *Parasitol. Today*. V.3, n.17, p. 214-216, 1987.

FADINI, G. P.; ALBIERO, M.; BONORA, B. M.; AVOGARO, A. Angiogenic abnormalities in diabetes mellitus: mechanistic and clinical aspects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 104, n. 11, p. 5431-5444, 2019.

FALANGA, V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *The Lancet*, v. 366, n. 9498, p. 1736–1743, 2005.

FID -Federação Internacional de Diabetes. *Atlas do Diabetes da Federação Internacional de Diabetes* (IDF). 2021.

FID – Federação Internacional de Diabetes. *Atlas do Diabetes da Federação Internacional de Diabetes* (IDF). 2023. Disponível em: <<https://diabetesatlas.org/atlas-reports/?report-year=2023>> Acessado em: 26 de fev de 2024.

FERRAZ, J.B; PINHEIRO, M.A.R.Q; GAMA, R.A. Biocirurgia. In: Blanck M, Giannini T. **Úlceras e feridas: As feridas têm alma**. Rio jan.: Di livros Editora Ltda, 2014. p. 693-697.

FERREIRA, Cláudia Luísa Ribeiro; NICOLAU, Renata Amadei. Diabetes experimental em ratos- Revisão Sistemática. In: XV ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E XI ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO-UNIVERSIDADE DO VALE DA PARAÍBA- UNIVAP, 2011. *Anais [...]*. [S. l.: s. n.], 2011.

FERREIRA, A. M. et al. Topical therapy of wounds: availability and use in primary health care centers. *Journal of Nursing UFPE*. v. 9, n. 5, p. 8401-8410, jun., 2015.

FIGUERÊDO, P. G. J. et al. Indução de diabetes mellitus e úlcera diabética em ratos Wistar: um estudo piloto. *Peer Review*, v. 5, n. 21, p. 786–800, 2023. DOI: 10.53660/1447.prw2941. Disponível em: <https://peerw.org/index.php/journals/article/view/1447>.

FONTELLES, Mauro José. **Metodologia da pesquisa científica**: diretrizes para a elaboração de um protocolo de pesquisa. 2009. Disponível em: https://files.cercomp.ufg.br/web/150/o/Anexo_C8_NONAME.pdf. Acessado em 29 de junho de 2020.

FRAGA, N. J. **Comportamento de oviposição de adultos, tempo de desenvolvimento e morfologia dos imaturos de Hemilucilia segmentaria (Fabricius), H. semidiaphana (Rondani) e Lucilia eximia (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) na Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus, Brazil**. 2004. Dissertação - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, [s. l.], 2004. Disponível em: <https://repositorio.inpa.gov.br/handle/1/12541>. Acesso em: 22 fev. 2024.

FRANCO, L. C. **Avaliação da aceitabilidade da terapia larval no tratamento de feridas**. [s. l.], p. 112, 2010.

FRANCO, L.C; et al. Aceitabilidade da terapia larval no tratamento de feridas. *Revista Recien*, São Paulo, v. 17, n. 6, p.13-18, jul. 2016.

FU, K.; ROBBINS, S. R.; MCDOUGALL, J. J. Diabetic foot ulcers: current advances in antimicrobial therapies and emerging treatments. *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, p. 856294, 2022.

GALICIA-GARCIA, U. et al. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 17, p. 6275, 30 ago. 2020.

GAMA, R.A; BRAMBILLA, P.B.T; SILVA, S.R.A; MEDEIROS, J.R; JALES, J.T; PINHEIRO, M.A.R.Q; BARBOSA, T.M. (2021). Terapia larval: protocolo básico de manutenção, infecção, transporte e aplicação de larvas de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: *Calliphoridae*). *Comunicações Entomológicas*, 3, ec03022. <https://doi.org/10.37486/2675-1305.ec03022>

GARY SIBBALD, R; WOO, KY. The biology of chronic foot ulcers in persons with diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2008; 24 (Suppl 1): S25-30.

GARROS, I.C; CAMPOS, A.C.L; TIMBARA, E.M; TENÓRIO, S.B; TORRES, O.J.M; AGULHAM, M.A; ARAÚJO, A. C.F; SANTIS-ISOLAN, P.M.B; OLIVEIRA, R.M; ARRUDA, E.C.M. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. *Acta cirúrgica Brasileira*, v.2, p.55-65, 2006.

GAZI, U. et al. Cutaneous immune cell levels in patients with hard-to-heal wounds after maggot therapy and surgical debridement therapy. *Journal of Wound Care*, v. 34, n. 6, p. 424-432, 2025. DOI: 10.12968/jowc.2023.0186.

GENG, K. et al. Innate immunity in diabetic wound healing: focus on the mastermind hidden in chronic inflammatory. *Frontiers in Pharmacology*, v. 12, p. 653940, 2021. DOI: 10.3389/fphar.2021.653940.

GIL, A. C. 1946 – **Como elaborar projetos de pesquisa** / Antonio Carlos Gil. – 6. ed. – São Paulo : Atlas, 2017. Bibliografia. ISBN 978-85-97-01292-7

HASSANSHAHI, A. et al. Macrophage-mediated inflammation in skin wound healing. *Cells*, v. 11, n. 19, p. 2953, 2022.

HASSAN, M.I; MOHAMED, A.F; TAHER, F; REDA, M. Antimicrobial Activities of Chitosan Nanoparticles Prepared from *Lucilia Cuprina* Maggots (Diptera: *Calliphoridae*). *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, v.46, n.3, p.563- 570, 2016.

HINZ, B. Myofibroblasts in wound healing: role and regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 14, n. 1, p. a041231, 2022. DOI: 10.1101/cshperspect.a041231.

HOSSEINI, M. et al. Skin biomechanics: a potential therapeutic intervention target to reduce scarring. *Burns & Trauma*, v. 10, p. tkac036, 2022. DOI: 10.1093/burnst/tkac036.

HUANG, J. et al. Dermal extracellular matrix molecules in skin development, homeostasis, wound regeneration and diseases. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, v. 128, p. 137–144, 2022. DOI: 10.1016/j.semcdb.2022.02.027.

HUIJBERTS, M.S; SCHAPER, N.C; SCHALKWIJK, C.G. Advanced glycation end products and diabetic foot disease. *Diabetes Metab Res Rev*. 2008; 24 (Suppl 1): S19-24.

JAMES, M. 1970. A Catalogue of the Diptera of the Americas South of the United States. Family *Calliphoridae*. *Museu de Zoologia*, Universidade de São Paulo, São Paulo. 102: 1-27.

JIANG, K.C; SUN, X.J; WANG, W; LIU, L; CAI, Y; CHEN, Y.C; LUO, N; YU, J.H; CAI, D.Y; WANG, A.P. Excretions/secretions from bacteria-pretreated maggot are more effective against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS One*, v.7, n.11, e49815, 2012.

JUNQUEIRA, LC; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KAIHANFAR, M. et al. Investigation of antimicrobial effects of treated *Lucilia sericata* larvae extract on bacteria. *Iranian Journal of Microbiology*, v. 10, n. 6, p. 409-416, 2018

KERRIDGE, A.; LAPPIN-SCOTT, H.; STEVENS, J.R. Propriedades antibacterianas das secreções larvais da mosca varejeira, *Lucilia sericata*. *Med. Veterinario. Entomol*. 2005, 19, 333–337.

KHAMAISI, M; BALANSON, S. Dysregulation of wound healing mechanisms in diabetes and the importance of negative pressure wound therapy (NPWT). *Diabetes Metab Res Rev*. 2017;33

KOSMANN, C; MACEDO, M.P; BARBOSA, T.A.F; PUJOL-LUZ, J.R. 2011. *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) and *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius) (Diptera, *Calliphoridae*) used to estimate the postmortem interval in a forensic case in Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 55(4): 621-623.

KOVAČ, J. Patogênese do Diabetes Tipo 1: Fatos Estabelecidos e Novos Insights. *Genes*, 2022, 13, 706.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. *Robbins e Cotran: patologia – bases patológicas das doenças*. 10. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2021.

LAVERY, L.A; DAVIS, K.E; BERRIMAN, S.J; BRAUN, L; NICHOLS, A; KIM, P.J; et al. WHS guidelines update: Diabetic foot ulcer treatment guidelines. *Wound Repair Regen*. 2016;24(1):112–26.

LAWRENCE, W.T; DIEGELMANN, R.F. Growth factors in wound healing. *Clin Dermatol* 1994; 12(1):157-69

LEAL, E. C; CARVALHO, E. Cicatrização de Feridas: O Fisiológico e o Patológico *Revista Portuguesa de Diabetes*. 2014; 9 (3): 133-143.

LESLIE, R.D; EVANS-MOLINA, C; FREUND-BROWN, J; BUZZETTI, R; DABELEA, D; GILLESPIE, K.M; GOLAND, R; JONES, A.G; KACHER, M; PHILLIPS, L.S; ROLANDSSON,O; WARDIAN, J.L; DUNNE, J.L. Adult-Onset Type 1 Diabetes: Current Understanding and Challenges. *Diabetes Care*. 2021 Nov;44(11):2449-2456. doi: 10.2337/dc21-0770.

LEONELLI, S; ANKENY, R. A. What makes a model organism? *Endeavour*, Oxford, v. 37, n. 4, p. 209-212, 2013.

LEITE, C. R. M. Interdisciplinaridade no contexto das doenças dos pés no diabetes [recurso eletrônico] : tratamentos clínicos, políticas públicas e tecnologia em saúde / Cicília Raquel Maia.

LEITE, M. C. R. P; ROSA, M. F. F. (Organizadores). – Mossoró, RN: EDUERN, 2021. 569p.

LIMA, R. O. L; RABELO, E. R; MOURA, V. M. B. D; SILVA, L. A. F; TRESVENZOL, L. M. F. Cicatrização de feridas cutâneas e métodos de avaliação. *Revista CFMV*. Ano. XVIII. v. 56, p. 53-59, 2012

LIMSOPATHAM, M.K; KHAMNOI, P; SUKONTASON, K.L ;BOONYAWAN, D; CHAIWONG, T; SUKONTASON, K. Sterilization of blow fly eggs, *Chrysomya megacephala* and *Lucilia cuprina*, (Diptera: *Calliphoridae*) for maggot debridement therapy application. *Parasitology Research*, v.116, n.5, p.1581-1589, 2017.

LIU, W; LONGNECKER, M; TARONE, A.M; TOMBERLIN, J.K. 2016. Responses of *Lucilia sericata* (Diptera: *Calliphoridae*) to compounds from microbial decomposition of larval resources. *Animal Behaviour*, 115: 217-225.

LOUISELLE, A. E.; NIEMIEC, S. M.; ZGHEIB, C.; LIECHTY, K. W. Macrophage polarization and diabetic wound healing. *Translational Research*, v. 236, p. 109-116, 2021.
LUCIO, F. D; PAULA, C. F. B. Fotobiomodulação no processo cicatricial de lesões – estudo de caso. *Cuid Enferm*, [S. l.], p. 111 a 114, 18 ago. 2020. Disponível em: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1120343>>. Acesso em: 23 mar. 2023.

MADDEN, J. C. et al. Strategies for the optimisation of *in vivo* experiments in accordance with the 3Rs philosophy. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 140–154, 2012. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273230012000578>>. Acesso em: 29 mar. 2024.

MALTA, D.C; ISER, B.P.M; CHUEIRI, P.S; STOPA, S.R; SZWARCOWALD, C.L; SCHIMIDT, M.I. et al. Cuidados em saúde entre portadores de diabetes mellitus autorreferido no Brasil, Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. *Rev Bras Epidemiol* [Internet]. 2015 [acessado em 5 jan. 2018]; 18(Supl. 2): 17-32.

MANDELBAUM, S.H; DI SANTIS, E.P; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares-parte II. *Anais Brasileiro de Dermatologia*. 2003;78(4):393-410.

MARCONDES, C. B. **Terapia larval de lesões de pele causadas por diabetes e outras doenças.** Florianópolis: UFSC, 2006.

MARINHO, R. T.S. **A importância da entomologia forense no processo médico-legal /** Rayna Teresinha Saraiva Marinho - Laranjal do Jari, 2022. 30 f.: il. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amapá, Campus Laranjal do Jari, Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, 2022.

MARINHO, C.R; BARBOSA, L.S; AZEVEDO, A.C.G.D; QUEIROZ, M.M; VALGODE, M.A; COELHO, V. 2003. Hemilucilia segmentaria (Fabricius, 1805) (Diptera: Calliphoridae) as new biological vector of eggs of Dermatobia hominis (Linnaeus Jr., 1781) (Diptera: Oestridae) in Reserva Biológica do Tingüá, Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(7): 937-938

MASIERO, F. S. *et al.* Histological patterns in healing chronic wounds using Cochliomyia macellaria (Diptera: Calliphoridae) larvae and other therapeutic measures. *Parasitology Research*, [s. l.], v. 114, n. 8, p. 2865–2872, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4487-y>. Acesso em: 22 fev. 2024.

MASIERO, F. S. *et al.* First Record of Larval Secretions of Cochliomyia macellaria (Fabricius, 1775) (Diptera: Calliphoridae) Inhibiting the Growth of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa. *Neotropical Entomology*, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 125–129, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13744-016-0444-4>. Acesso em: 22 fev. 2024.

MASIERO, F. S. (2019). **O uso de larvas de dípteros (Arthropoda: Insecta) para o tratamento de lesões tegumentares: uma abordagem multissistêmica.** [Tese de Doutorado]. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas. 208 p.

MATTARAIA, Vania Gomes de Moura; MOURA, Ana Silvia Alves Meira Tavares. Produtividade de ratos Wistar em diferentes sistemas de acasalamento. *Cienc. Rural*, Santa Maria, v. 42, n. 8, p. 1490-1496, Aug. 2012.

MELLO, R. A. A.; ESPINOSA, A. M.; SOUZA, C. J. Desbridamento biológico: o uso da terapia larval em feridas complexas. *Revista Multidisciplinar em Saúde*, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.51161/rem/1458>. Acesso em: 12 ago. 2025.

MENEZES, S. M. et al. Perfil de pacientes com lesões cutâneas hospitalizados em uma unidade de internação de clínica médica. *HRJ*, v.3, n.15 (2022).

MINELLI, L. et al. Diabetes mellitus e afecções cutâneas. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 78, n. 6, p. 735–747, nov. 2003.

MIRZA, R. E.; FANG, M. M.; ENNIS, W. J.; KOH, T. J. Macrophage dysregulation and impaired skin wound healing in diabetes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 8, p. 528, 2020.

MIRZA, R. E.; KOH, T. J. Macrophage dysregulation in diabetic wounds: hyperglycemia decreases phagocytosis of apoptotic neutrophils and sustains inflammation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 560, p. 111435, 2023.

MITTAG, B.F; KRAUSE, T.C.C; ROEHRS, H; MEIER, M.J; REICHEMBACH, M.T. Cuidados com lesões de pele: ações da enfermagem. *Estima* 2017; 15(1):19-25.

MOHAMED, N. T.; AZAM, K. S. The anti-bacterial of whole body homogenates of third instar larvae of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) against different bacterial strains. *Journal of Egyptian Academic Society for Environmental Development – D (Environmental Studies)*, v. 23, n. 1, p. 43–49, 2022. DOI: 10.21608/jades.2022.247628.

MOHSIN, F.; JAVAID, S.; TARIQ, M.; MUSTAFA, M. Molecular immunological mechanisms of impaired wound healing in diabetic foot ulcers (DFU): current therapeutic strategies and future directions. *International Immunopharmacology*, v. 139, p. 112713, set. 2024. DOI: 10.1016/j.intimp.2024.112713.

MOTLEY, T. A. et al. Clinical outcomes for diabetic foot ulcers treated with clostridial collagenase ointment or with a product containing silver. *Advances in Wound Care*, v. 7, n. 10, p. 1-10, 2018. DOI: 10.1089/wound.2018.0784.

MUMCUOGLU, K.Y. Clinical applications for maggot in wound care. *Am j clin dermatol*. 2001;2(4):219-227.

NASSU, M. P; THYSSEN, P. J. (2015). Evaluation of larval density *Cochliomyia macellaria* F. (Diptera: Calliphoridae) for therapeutic use in the recovery of tegumentar injuries. *Parasitology Research*, 114, 3255-3260.

NETTO, L. E; JACON, J. C. Efetividade da biocelulose na cicatrização de úlceras venosas. *Cuid Enferm*, [S. l.], p. 51 a 58, 4 set. 2022. Disponível em: <<https://docs.fundacaopadrealbino.com.br/media/documentos/1a25e2d17cf30e1c8ba1c33f38d0d55f.pdf>> Acesso em: 5 abr. 2023

NITSCHKE M. J. T. **Avaliação da recuperação das lesões cutâneas por meio da terapia larval utilizando como modelos ratos Wistar**. Tese (doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu/SP, 2010. Disponível online:<https://www2.ibb.unesp.br/posgrad/teses/bga_do_2010_maria_nitsche.pdf> Acesso em: 26 abril de 2022.

OPAS-Organização Pan-Americana da Saúde. **Número de pessoas com diabetes nas Américas mais do que triplica em três décadas, afirma relatório da OPAS**, 2022. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/11-11-2022-numero-pessoas-com-diabetes-nas-americas-mais-do-que-triplica-em-tres-decadas>> Acesso em: 08 mar. 2024.

OLIVAS, L. C; OLIVEIRA, C. A. G. S. O amor terapêutico no tratamento de feridas crônicas. *Revista Eletrônica de Enfermagem do Vale do Paraíba*, v. 1, n. 3, p. 103-121, ago., 2017.

OLIVEIRA, A.C; ROCHA, D.M; BEZERRA, S.M; ANDRADE, EM; SANTOS, A.M; NOGUEIRA, L.T. Qualidade de vida de pessoas com feridas crônicas. *Acta Paul Enferm.* 2019; 32(2):194-201.

OLIVEIRA, I. V. P; DIAS, R. V. da C. Cicatrização de feridas: Fases e fatores de influência. *Acta Veterinaria Brasilica*, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 267–271, 2012.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE-AMÉRICAS; CENTRO LATINO-AMERICANO E DO CARIBE DE INFORMAÇÕES EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. *Tipos metodológicos de estudo*. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/oer/2018/07/842/aula-1-tipos-metodologicos-de-estudos_2.pdf> Acesso em: 10 de janeiro de 2023.

OTSUKA, H. [UNESP. **Sinantropia e sazonalidade de moscas varejeiras (Diptera: Calliphoridae) no Sudeste do Brasil: visões ecológica, médica, veterinária e forense**. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Estadual Paulista (Unesp), [s. l.], 2008. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/120360>. Acesso em: 22 fev. 2024.

OPLETALOVÁ, K. et al. Maggot therapy for wound debridement: a randomized multicenter trial. *JAMA Dermatology*, v. 148, n. 4, p. 432–438, 2012. DOI: 10.1001/archdermatol.2011.1895.

PERSIO, N.V; THYSSEN, P.J; ESTÉRCIO, F.F; BACCEGA, B; MASIERO, F.S. Esterilização da superfície de ovos de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) para aplicação terapêutica larval. *XXVI Congresso de Iniciação Científica. UFPEL*, 2017.

PINHEIRO, M. A. R. Q. **Terapia larval: uso de larvas de *Chrysomya megacephala* (Diptera, Calliphoridae) no tratamento de úlceras crônicas em pacientes diabéticos no Hospital Universitário Onofre Lopes-Natal, RN**. Disponível online: <<https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/23572>> Acesso em: 14 de janeiro de 2024.

PINHEIRO, M. A. R. Q; FERRAZ, J. B; JÚNIOR, M. A. A; MOURA, A. D; COSTA, M. E. S. M; COSTA, F. J. M. D; NETO, V. F. A; NETO, R. M; GAMA, R. A. (2015). Use of maggot therapy for treating a diabetic foot ulcer colonized by multidrug resistant bacteria in Brazil. *Indian Journal of Medicine and Research*, 141, 340-342.

PIRES, S. M. et al. Dispersão larval pós-alimentar de *Lucilia sericata* (Diptera, Calliphoridae) em condições de laboratório. *Iheringia. Série Zoologia*, [s. l.], v. 100, p. 254–258, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/isz/a/qLKvXyDCqdfNTznFxJvMVVM/?lang=pt>. Acesso em: 22 fev.

2024.

PONTE, V.A; SILVA, A.S.J; MORORÓ, D.G.A. et al. Avaliação dos Efeitos da Irradiação Ultrassônica de Baixa Frequência no Tratamento de Úlcera Venosa. *Rev Fund Care Online*.2019. out./dez.; 11(5):1219-1225. DOI: <http://dx.doi.org/10.9789/2175-5361.2019.v11i5.1219-1225>

PÖPPEL, A.-K. et al. Antimicrobial peptides expressed in medicinal maggots of the blow fly *Lucilia sericata* show combinatorial activity against bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 59, n. 5, p. 2508–2514, 2015. DOI: 10.1128/AAC.05180-14.

PRATA, M.B; HADDAD, C.M; GOLDENBERG, S; SIMÕES, M.J; MOURA, L.A.R; TRABULSI, L.R.Uso tópico do açúcar em ferida cutânea. Estudo experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.3, n.2, p.43-48, 1988.

RAMSEY, D.T; POPE, E.R; WAGNER-MANN, C; BERG, J.N; SWAIN, S.F. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full thickness skin wounds in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v.56, n.7, p.941-949, 1995.

RODACKI, M; TELES, M; GABBAY, M; MONTENEGRO, R; BERTOLUCI, M. Classificação do diabetes. *Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes* (2023). DOI: [10.29327/557753.2022-1](https://doi.org/10.29327/557753.2022-1), ISBN: 978-85-5722-906-8.

ROY, R. et al. Overriding impaired FPR chemotaxis signaling in diabetic neutrophils stimulates infection control in murine wounds. *eLife*, v. 11, p. e72071, 2022.

SALOMÉ, G.M; ALMEIDA, S.A; PEREIRA, M.T.J; MASSAHUD, M.R; MOREIRA C.N; BRITO, M.J. et al. The impact of venous leg ulcers on body image and self-esteem. *Adv Skin Wound Care*. 2016; 29(7):316-21.

SÁNCHEZ, M.C; CHUAIRE, L; NARVÁEZ, R; SEGURA, N.A. Biocirugía: utilización de larvas de insectos necrófagos en la curación de heridas. La terapia larval. *Rev Cienc Salud* 2004;2(2):156-64.

SEN, C.K.; GORDILLO, G.M.; ROY, S.; KIRSNER, R.; LAMBERT, L.; HUNT, T.K.; GOTTRUP, F.; GURTNER, G.C.; LONGAKER, M.T. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound repair and regeneration*, v.17, p.763-771, 2009

SES. Secretaria Estadual de Saúde do Amazonas. **Dia do Diabetes: SES-AM alerta sobre os mais de 100 mil casos no Amazonas**. Disponível em: <<https://www.saude.am.gov.br/dia-do-diabetes-ses-am-alerta-sobre-os-mais-de-100-mil-casos-no-amazonas/>, 2023>. Acesso em: 25 de fev de 2024.

SHARIFIAGHDAM, M. et al. Macrophage dysregulation and impaired skin wound healing in diabetes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 8, p. 528, 2022.

SHEPHERD, A.J; DOWNING, J.E; MIYAN, J.A. Without nerves, immunology remains incomplete -in vivo veritas. *Immunology*. 2005; 116(2): 145-63.

SHERMAN, R. A. Maggot therapy for treating diabetic foot ulcers unresponsive to conventional therapy. *Diabetes Care*, v. 26, n. 2, p. 446–451, 2003.

SHERMAN, R.A; MORRISON, S; DAVID, N.G. Maggot debridement therapy for serious horse wounds - A survey of practitioners. *The Veterinary Journal*, v.172, p. 1562-1683, 2006.

SHERMAN R. A. Maggot Therapy Takes Us Back to the Future of Wound Care: New and Improved Maggot Therapy for the 21st Century. *Journal Diabetes Science and Technology*, v. 3, n. 2, p. 336-344, 2009.

SHERMAN, R. A.; HALL, M. J.; THOMAS, S. Larval therapy for chronic cutaneous ulcers: historical review and future perspectives. *Wounds*, v. 29, n. 9, p. 262–270, 2017.

STADLER, F. (ed.). A Complete Guide to Maggot Therapy: Clinical Practice, Therapeutic Principles, Production, Distribution, and Ethics. Cambridge: *Open Book Publishers*, 2022.

SILVA, S. M. **Intrapuparial development of *Hemilucilia semidiaphana* (Rondani, 1850) (Diptera, Calliphoridae) and its use in forensic entomology.** / Sabrina Machado da Silva. – Curitiba, 2018. 48 p.

SILVA, M.T; KREMER, T.S; COSTA, S.P; RUIZ, L.S; GANDRA, R.F; AULER, M.E. Os desafios na conduta terapêutica em pacientes acometidos com feridas crônicas. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, Umuarama, v.27, n.3, p. 1242-1268, 2023.

SIMMONS, S.W. Um princípio bactericida em excreções de larvas cirúrgicas que destrói importantes agentes etiológicos de infecções piogênicas. *J. Bacteriol.* 1935 , 30 , 253–267.

SOARES, F.V; **Estudos pré-clínicos com nanopartículas de antimônio pentavalente no tratamento da leishmaniose cutânea.** Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Manaus-AM, 2017, f.176.

SOARES, M. O. *et al.* Cost-effectiveness analysis of larval therapy for leg ulcers. *BMJ*, v. 338, b825, 2009. DOI: 10.1136/bmj.b825.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA BARIATRICA E METABÓLICA. **Brasil registra aumento de 60% do número de diabético e obesos em 10 anos.** Mar, 2019. Disponível em: <sbcbm.org.br/brasil> Acesso em: 21 de dez de 2022.

SOUSA, J.R.P; ESPOSITO, M.C; CARVALHO FILHO, F.S. Composição, abundância e riqueza de *Calliphoridae* (Diptera) das matas e clareiras com diferentes coberturas vegetais da Base de Extração Petrolífera, bacia do Rio Urucu, Coari, Amazonas. *Rev. Bras. entomol.* vol.54 n. 2 São Paulo Apr./June 2010.

SOUZA, I. et al. Biologia, Histologia e Fisiologia da Pele. *Cosmetics & Toiletries Brasil*, 32(3): 14-21, 2020.

SOUZA, E.R; RAFAEL, J.A; XAVIER FILHO, F.F; DA-SILVA-FREITAS, J.O; OLIVEIRA-COSTA, J; URURAHY-RODRIGUES, A. 2014. First medicolegal forensic entomology case of central Amazon: a suicide by hanging with incomplete suspension. *EntomoBrasilis*, 7: 12-15.

SOUZA, P. G. et al. A Biologia da proliferação fibroblástica: a excessiva deposição extracelular de colágeno durante o reparo de lesões na pele. *Brazilian Journal of Development*, Curitiba, v.7, n.3, p. 28989-29010 mar 2021.

STEINHOFF, M; STANDER, S; SEELIGER, S; ANSEL, J.C; SCHMELZ, M; LUGER T. Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Arch Dermatol*. 2003; 139(11): 1479-88.

STOLAR, M. Glycemic Control and Complications in Type 2 Diabetes Mellitus. *Am J Med*. 2010;123:S3-S11.

SURAYA, A. S. et al. A systematic review of efficacy on larva debridement in diabetic foot ulcers. *Health Life Science*, v. 1, n. 1, p. 15–25, 2024. DOI: 10.4081/hls.2024.11839.

TAMURA, T.; CAZANDER, G.; ROOIJAKKERS, S.H.M.; TROUW, L.A.; NIBBERING, P.H. Excretions/secretions from medicinal larvae (*Lucilia sericata*) inhibit complement activation by two mechanisms. *Wound Repair Regeneration*, v. 25, n.1, p.41-50, 2017.

TANYUKSEL, M; ARAZ, E; DUNDAR, K; UZUN, G; GUMUS, T; ALTEN, B; SAYLAM, F; TAYLAN-OZKAN, A; MUMCUOGLU, K. Maggot Debridement Therapy in the Treatment of Chronic Wounds in a Military Hospital Setup in Turkey. *Dermatology*, Basel, v.210, n.2, p.115-118, 2005.

TAVARES, E. A. **Efeito da Membrana de Quitosana com Complexo de Zincovanilina no Tratamento de Lesões Cutâneas em Ratos Diabéticos**. Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Natal, 2018. 60f.

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

THOMAS, S; JONES, M; WYNN K; FOWLER, T. The current status of maggot therapy in wound healing. *British Journal of Nursing*, Londres, v.10, n.22, p.5-8, dezembro 2001.

THYSSEN, P. J; NASSU, M.P; NITSCHKE, M.J.T; LEITE, D. Sterilization of immature blowflies (*Calliphoridae*) for use in larval therapy. *Journal of Medicine and Medical Sciences*, v. 4, n.10, p. 405-409, 2013.

THYSSEN, P. J. et al. **Terapia do Desbridamento Larval: como a biologia atua em favor da reparação e cicatrização tecidual**. In: Interdisciplinaridade no contexto das doenças dos pés no diabetes [recurso eletrônico] : tratamentos clínicos, políticas públicas e tecnologia em saúde / Cicília Raquel Maia Leite, Maria Cândida Ribeiro Parisi, Mário Fabrício Fleury Rosa (Organizadores) – Mossoró, RN: EDUERN, 2021. 569p.

THYSSEN, P.J; LESSINGER, A.C; AZEREDO-ESPIN, A.M.L; LINHARES, A.X. (2005) O valor dos marcadores moleculares PCR-RFLP para a diferenciação de estágios imaturos de duas moscas necrófagas (Diptera: *Calliphoridae*) de potencial importância forense. *Neotropical Entomol* 34: 777-783

THYSSEN, P. J; LINHARES, A. First description of the immature stages of *Hemilucilia segmentaria* (Diptera: *Calliphoridae*). *Biol. Res.*, Santiago , v. 40, n. 3, p. 271-280, 2007 .

THYSSEN, P. C.; STADLER, F. *Complete guide to maggot therapy* — boas práticas para testagem de novas espécies. Cambridge: OBP, 2022.

TOMBULTURK, F. K. *et al.* Effects of *Lucilia sericata* on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats and analysis of its secretome at the proteome level. *Human & Experimental Toxicology*, v. 37, n. 5, p. 508-520, 2018.

ULISSES, A. de F. *et al.* Verificação experimental de aspectos relevantes sobre a tensão superficial em uma abordagem didática. *Revista Ifes Ciência* , v. 3, n. 2, p. 3-15, 2017. <https://doi.org/10.36524/ric.v3i2.318>

VALAIYAPATHI, B; GOWER, B; ASHRAF, A. P. Pathophysiology of Type 2 Diabetes in Children and Adolescents. *Current Diabetes Reviews*, v. 16, n. 3, p. 220–229, 20 mar. 2020.

VAN DER PLAS, M; VAN DER DOES, A; BALDRY, M; DOGTEROM-BALLERING, H; GULPEN, C; VAN DISSEL, J; NIBBERING, P; JUKEMA, G. Maggot excretions/secretions inhibit multiple neutrophilpro-inflammatory responses. *Microbes and Infection*, California, v.9, p.507-514, abril 2007.

VAN DER PLAS, M. J. A. *et al.* Maggot excretions/secretions are differentially effective against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 61, n. 1, p. 117-122, 2008. DOI: 10.1093/jac/dkm407.

VAN DER PLAS, M. J. A. *et al.* Maggot secretions suppress pro-inflammatory responses of human monocytes through elevation of cyclic AMP. *Diabetologia*, v. 52, n. 9, p. 1962-1970, 2009. DOI: 10.1007/s00125-009-1432-6.

VAN DER PLAS, M. J. A.; DAMBROT, C.; DOGTEROM-BALLERING, H. C. M.; KRUITHOF, S.; VAN DISSEL, J. T.; NIBBERING, P. H. Combinations of maggot excretions/secretions and antibiotics are effective against *Staphylococcus aureus* biofilms and the bacteria derived therefrom. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 65, n. 5, p. 917-923, 2010. DOI: 10.1093/jac/dkq042.

VSS, P. *et al.* Nutritional Components Relevant to Type-2-Diabetes: Dietary Sources, Metabolic Functions and Glycaemic Effects. *Journal of Research in Medical and Dental Science* 6(5):52-75, 2018.

VALACHOVÁ, I; BOHOVÁ, J; PÁLOŠOVÁ, Z; TAKÁČ, P; KOZÁNEK, M; MAJTÁN, J. Expression of lucifensin in *Lucilia sericata* medicinal maggots in infected environments Cell and tissue research, *Freiburg*, v.353, n.1, p.165-171, julho 2013.

VIANNA, E. E. S; BRUM, J. G. W; RIBEIRO, P. B; BERNE, M. E. A; SILVEIRAJR, P. 1998. Synanthropy of *Calliphoridae* (Diptera) in Pelotas, Rio Grande do Sul state, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 7: 141–147.

VIANA, L. P. et al. A atuação do Enfermeiro na aplicação de Terapia Larval para lesões de difícil cicatrização / The Nurse's performance in the application of Larval Therapy for lesions of difficult healing. *Brazilian Journal of Health Review*, [s. l.], v. 3, n. 6, p. 16945–16958, 2020.

VIEIRA, A.J. **Avaliação do creme à base de mentol na cicatrização de feridas cutâneas em ratos diabéticos** [dissertação]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista; 2019.

WEIL, G; SIMON, R; SWEADNER, W. Larval or Maggot Therapy in the Treatment of Acute and Chronic Pyogenic Infections. *The American Journal of surgery*, Birmingham, v.19, n.1, p.36-48, janeiro1933.

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

WILASRUSMEE, C. et al. Maggot therapy for chronic ulcer: a retrospective cohort and meta-analysis. *Asian Journal of Surgery*, v. 37, n. 2, p. 138–147, 2014. DOI: 10.1016/j.asjsur.2013.07.003.

WILGUS, Traci A.; WULFF, Brian C. *The importance of mast cells in dermal scarring*. *Advances in Wound Care*, v. 3, n. 4, p. 356–365, 2014. DOI: 10.1089/wound.2013.0457.

WITTE, M.B; BARBUL, A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am*. 1997; 77(3):509-28.

WHO- World Health Organization. **Classification of diabetes mellitus**. Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

WOLFF ECHEVERRI, M. I. et al. *Lucília eximia* (Diptera: *Calliphoridae*) una nueva alternativa para la terapia larval y reporte de casos em Colombia. *Iatreia*, v. 23, n. 2, junho-2010.

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

WOLLINA, U; KARTE, K; HEROLD, C; LOOKS, A. Biosurgery in wound healing – the renaissance of maggot therapy. *European Academy of Dermatology and Venereology*, Amsterdam, v.14, n.4, p.285-289, junho 2000.

WOO, K; AYELLO, E.A; SIBBALD, R.G. The edge effect: current therapeutic options to advance the wound edge. *Adv Skin Wound Care*. 2007; 20(2): 99-117; quiz 8-9.
BRASIL. *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes* 2019-2020. Brasília: Sociedade Brasileira de Diabetes, 2019. 491 p. ISBN: 978-85-93746-02-4

YAO, Z.X; FU, X. B; CHENG, B. [New concept of chronic wound healing: advances in the research of wound management in palliative care]. *Zhonghua shao shang za zhi = Zhonghua shaoshang zazhi, Chinese journal of burns*, [s. l.], v. 36, n. 8, p. 754–757, 2020.

ZAJEC, A; TREBUŠAK PODKRAJŠEK, K; TESOVNIK, T; ŠKET, R; ČUGALJ KERN, B; JENKO BIZJAN, B; ŠMIGOC SCHWEIGER, D; BATTELINO, T; DELL, R. B; HOLLERAN, S; RAMAKRISHNAN, R. Sample Size Determination. *Ilar Journal*, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 207–213, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/ilar.43.4.207>>. Acesso em: 29 mar. 2024.

ZHOU, H; JIN, Q; LU, H. Exposure risk of patients with chronic infectious wounds during the COVID-19 outbreak and its countermeasures. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 452, 2020.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Artigo publicado em novembro de 2023 na Revista Peer Review relacionado ao estudo piloto da indução do DM e da lesão cutânea



PEER REVIEW, Vol. 5, Nº 21, 2023
DOI: 10.53660/1447.prw2941
ISSN: 1541-1389

Indução de Diabetes Mellitus e Úlcera diabética em Ratos Wistar: um estudo piloto

Induction of Diabetes Mellitus and diabetic Wound in Wistar rats: a pilot study

Priscila Gonçalves Jacinto Figuerêdo

ORCID: (<https://orcid.org/0000-0002-3965-2538>)

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: pris.fly2@gmail.com

José Fernando Marques Barcellos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2149-7899>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: fmarques@ufam.edu.br

Mariana Toniolli de Freitas

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8292-5781>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: mariana.toniolli@gmail.com

Jonatas de Souza Queiroz

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1083-9670>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: jonatas.queiroz@ufam.edu.br

RESUMO

Trata-se de um estudo piloto que tem por objetivo realizar a indução de Diabetes Mellitus e Úlceras Diabéticas em Ratos Wistar. Foram utilizados 20 ratos machos com aproximadamente 300-350 gramas. Após aplicação de dieta hiper glicosada, os ratos foram induzidos ao diabetes com 70mg/Kg de Estreptozotocina via intraperitoneal. Confirmado o diabetes, lesões subcutâneas ocasionados por solução de ácido clorídrico no dorso dos ratos foram induzidas. Durante o estudo acompanhou-se peso, nível glicêmico, comportamento, sinais e sintomas, e a avaliação do processo de cicatrização da lesão seguiu o método observacional macroscópico. O processo de indução do Diabetes Mellitus e da úlcera foi exitoso, apesar do grande quantitativo de óbitos dos espécimes durante o experimento. A cronicidade do processo cicatricial foi confirmada e condizente com a ação da doença no organismo. Diante das limitações do estudo, não é crível atribuir qualquer demora na cicatrização apenas a um fator causal. Julga-se indispensável novos estudos para sanar questionamentos.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus 1; Úlcera cutânea 2; Experimento de Laboratório 3; Cicatrização 4; Ratos Wistar 5.

ABSTRACT

This is a pilot study that aims to induce Diabetes Mellitus and Diabetic Ulcers in Wistar Rats. 20 male rats weighing approximately 300-350 grams were used. After application of a hyper glucose, the rats were induced to diabetes with 70 mg/kg of Streptozotocin intraperitoneally. Once diabetes was confirmed, subcutaneous lesions caused by hydrochloric acid solution on the back of the rats were induced. During the study, weight, glycemic level, behavior, signs and symptoms were monitored, and the evaluation of the wound healing process followed the macroscopic observational method. The process of inducing Diabetes Mellitus and ulcers was successful, despite the large number of specimen deaths during the experiment. The chronicity of the scarring process was confirmed and consistent with the action of the disease in the body. Given the limitations of the study, it is not credible to attribute any delay in healing solely to a causal factor. Further studies are deemed essential to address existing questions.

Keywords: Diabetes Mellitus 1; Skin ulcer 2; Laboratory Experiment 3; Healing 4; Wistar rats 5.

INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM), ou comumente chamado de diabetes, é uma condição grave e crônica, que se caracteriza como um distúrbio metabólico evidenciado pela hiperglicemia persistente, em razão da deficiência na produção de insulina ou baixa eficiência da insulina que produz, ou ainda em ambos os mecanismos (Rodacki *et al.*, 2021).

Mais comumente classificada em Diabetes Mellitus tipo 1(DM1) e Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), na doença do tipo 1 ocorre a destruição das células beta pancreáticas devido a resposta autoimune, onde há autoanticorpos reagindo contra as células. Esse processo ocasiona o comprometimento da produção de insulina. O mecanismo responsável pela eliminação das células beta pancreáticas envolve anticorpos que reagem contra a ilhota pancreática, devido a apresentação dos auto antígenos por células dendríticas e subsequente resposta de células T CD4+ e CD8+ autoimunes (Katsarou *et al.*, 2017).

O tipo 2, considerado o mais comum, está associado à obesidade e ao envelhecimento. Possui início pérfido e é evidenciado por resistência à insulina e deficiência parcial de secreção de insulina pelas células beta pancreáticas, além de alterações na secreção de incretinas. Nessa condição, a pessoa com DM2 apresenta frequentemente características clínicas associadas à resistência à insulina, como acantose nigricans e hipertrigliceridemia (American Diabetes Association Professional Practice Committee, 2021; Rodacki *et al.*, 2021).

De acordo a Sociedade Brasileira de Diabetes (2022), o portador de DM encontra-se vulnerável a diversas complicações associadas, dentre elas, as alterações

microvasculares (retinopatia, neuropatia) sendo agregado danos celulares e teciduais, e macrovasculares (doenças cardiovasculares e cerebrovasculares) (Gois *et al.*, 2021). Os 10 sinais e sintomas mais comuns presentes no diabetes são: Poliúria (urinar a toda hora); Polidipsia (excessiva sensação de sede); Cansaço e falta de energia; Perda de peso; Polifagia ou hiperfagia (fome frequente); Visão embaçada; Cicatrização lenta; Infecções frequentes; Mau hálito e Cetoacidose diabética (Ferri, 2018).

Dentre as complicações mais comuns do DM estão as feridas cutâneas. Conhecidas como crônicas por apresentarem dificuldades de cura, estão associadas a internações hospitalares prolongadas, infecções por bactérias resistentes a antibióticos, consequentemente aumento do risco de amputações e até mesmo o óbito (Marcondes, 2006). Tem se verificado um aumento da prevalência de úlcera diabética associada à idade dos pacientes, principalmente neuro isquêmicas, uma vez que, à medida que envelhecem, desenvolvem mais complicações do diabetes. No Brasil, a úlcera diabética apresenta 5,9% de prevalência a cada ano (Oliveira *et al.*, 2019; Vieira *et al.*, 2019).

Pessoas com DM apresentam diversas alterações fisiopatológicas que influenciam na má cicatrização. O DM demonstrou ser uma causa importante no retardo da cura por meio de alterações celulares, moleculares e bioquímicas. Uma consequência dessa deficiência são as recaídas e a inflamação prolongada, que retarda ainda mais a cicatrização, tornando o processo crônico (Gois *et al.*, 2021).

A doença tem o potencial de alterar a estrutura da membrana celular, variando a resposta inflamatória por alterações tanto quimiotática como fagocítica das células brancas, reduzindo o processo de vascularização. Com isso, há redução do fluxo sanguíneo em função da angiogênese deficiente, presença de altas concentrações de metaloproteinases (MMPs), neuropatia, alta probabilidade de infecção, resposta inflamatória não-fisiológica, estresse oxidativo e formação excessiva de produtos de glicoxidação avançada (AGEs) (Andrade; Santos, 2016).

Nessa perspectiva, o presente estudo objetiva realizar a indução de Diabetes Mellitus e Úlceras Diabéticas em Ratos Wistar. Acredita-se que compreender o processo experimental de indução, contribuirá para realização de estudos que buscam definir mecanismos da doença e possíveis tratamentos para feridas associadas ao DM em humanos.

MATERIAL E MÉTODO

Local, Tipo do Estudo e Aspectos Éticos

Trata-se de um estudo piloto de indução de Diabetes Mellitus e úlceras diabéticas em ratos Wistar. O estudo faz parte de um projeto de tese vinculado à Universidade Federal do Amazonas-UFAM e foi desenvolvido entre os meses de novembro de 2021 e fevereiro de 2022. Adotou-se métodos experimentais de conveniência com o intuito de aprimorar habilidades para o desenvolvimento de um futuro ensaio pré-clínico legítimo. Os experimentos foram iniciados após aprovação na Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) e atendeu as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi submetido e aprovado pelo CONCEA do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, sendo registrado com o nº 001/2021, SEI 01280.000034/2021-09.

Seleção dos animais e caracterização do ambiente

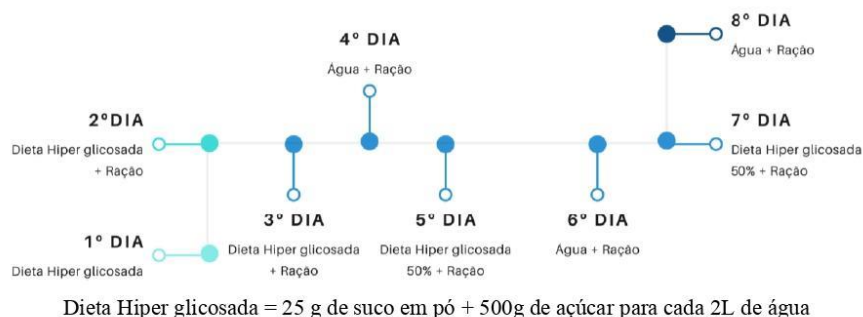
Foram utilizados 20 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com massa corpórea inicial de 300 a 350 gramas. Esses animais foram procedentes do Biotério Central do INPA, onde foram mantidos em gaiolas apropriadas (plásticas, forradas com maravalha), em número de 2 animais por gaiola. Todos receberam ração para roedores e água da torneira ad libitum, permanecendo nas mesmas condições ambientais de ciclos luz/escuridão de 12 horas e temperatura ambiente de 22°C durante todo o experimento. As gaiolas eram trocadas semanalmente para controle de higiene.

Desenho Experimental

Após a liberação dos animais para o estudo, houve uma semana para adaptação de ambiente e ganho de peso (apresentavam cerca de 100g). Nesse período, os animais foram então divididos em 10 gaiolas com 2 animais em cada uma, e permaneceram por mais 6 semanas até atingirem o peso alvo de 300 a 350 gramas. As gaiolas foram nomeadas como G1A; G1B; G2A; G2B; G3A; G3B; G4A; G4B; G5A; G5B; G6A; G6B; G7A; G7B; G8A; G8B; G9A; G9B; G10A e G10B.

Os animais foram então submetidos ao protocolo de dieta hiper glicosada para indução do DM, conforme a **Figura 1**:

Figura 1: Protocolo de dieta para indução do DM.



Fonte: Adaptação do estudo de Cândido (2019).

As soluções hiper glicosadas eram preparadas todos os dias para evitar a fermentação e a rejeição do animal à dieta. Foi realizada a indução do DM no oitavo dia da dieta, através da administração intraperitoneal de Estreptozotocina (Sigma® S-130) na dose única de 70mg/kg de peso corporal, diluído em tampão citrato (0,1M pH 4,5) (Masiero, 2015). Segundo Ferreira e Nicolau (2011) este modelo provoca diabetes por um longo período de tempo. Para aplicação da droga não foi realizada sedação, os animais tiveram a cabeça e patas contidas e o abdômen exposto pelo pesquisador auxiliar. Foi utilizada seringa de 1ml e agulha 13 x 4,5 mm na administração, conforme a **Figura 2-A**.

Após 5 dias da indução do DM, o nível glicêmico foi aferido por obtenção de sangue da veia caudal dos ratos e analisada com o glicosímetro Accu-Chek Guide (Roche®) **Figura 2-B**. Os animais com níveis de glicose superiores a 200 mg/dL foram considerados diabéticos **Figura 2-C** (Ferreira; Nicolau, 2011).

Durante quatro semanas de acompanhamento foi realizado controle glicêmico com administração de insulina regular para correção de níveis de glicose acima de 400 mg/dL. Todos os animais do estudo mantiveram glicose mínima na faixa de 200 mg/dL durante o período, constatando o diabetes. Os animais foram então submetidos a indução da lesão. Para obtenção das lesões, inicialmente os animais receberam anestesia e analgesia utilizando Cetamina (75mg/kg) e Xilazina (10mg/kg) via intraperitoneal e na sequência, foram tricotomizados na região dorsal com uso de aparelho elétrico.

As lesões foram produzidas a partir da administração de 0,2 ml de solução na proporção de 1:4 de ácido clorídrico e água destilada, por via subcutânea não transfixante

(Masiero, 2015). A administração da solução causou lesão semelhante à queimadura, como mostra a **Figura 2-D**.

Figura 2: Procedimentos da experimentação animal



A - Indução de DM com administração intraperitoneal de Estreptozotocina. B - Aferição de índice glicêmico com punção em veia caudal. C - Valor HI (high=alto) ≥ 600 mg/dL de índice glicêmico aferido pelo glicosímetro Accu-Chek Guide (Roche®). D - Resultado imediato após administração de 0,2 ml de solução na proporção de 1:4 de ácido clorídrico e água destilada, por via subcutânea não transfixante.

Fonte: Dados do estudo (2022).

A avaliação da lesão seguiu o método observacional macroscópico, foram realizados registros fotográficos, bem como, o preenchimento de instrumento com os dados observados. Os primeiros curativos foram realizados após 48h da indução da lesão e foram trocados a cada 48 horas, empregando-se de técnica e material estéril para a realização da antissepsia da ferida utilizando apenas gaze estéril e soro fisiológico 0,9%. O curativo foi ocluído com gazes, ataduras e esparadrapo.

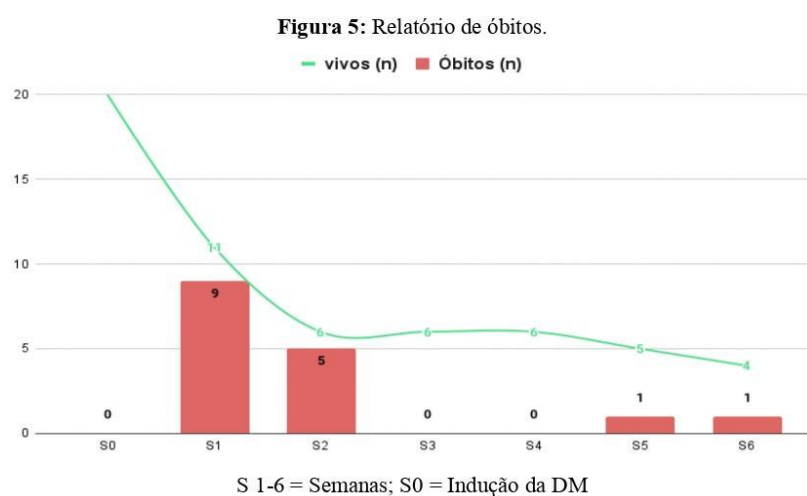
O estudo totalizou um período de 16 semanas de execução. Os animais que permaneceram vivos até o final da sexta semana pós indução da lesão, foram submetidos a eutanásia com dose letal associada de 200 mg/Kg de Cetamina e 150 mg/Kg de Xilazina por via intraperitoneal. Após constatado o óbito, foram entregues para incineração.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Indução do Diabetes Mellitus

Na primeira semana de indução do DM, 9 espécimes vieram a óbito. Os espécimes G1B, G2A e G2B morreram três dias após a indução, seus índices glicêmicos foram registrado como (HI), configurando valores acima de 600mg/dL (Estock *et al.*, 2018), segundo os valores de referência do glicosímetro utilizado.

Abaixo, a **Figura 5**, apresentando o relatório de óbitos:

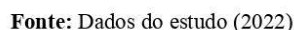


Fonte: Dados do estudo (2022).

No dia anterior aos óbitos, os espécimes G1B e G2B apresentavam letargia importante, enquanto o espécime G2A apresentava comportamento agressivo, destoante dos demais e do comportamento regular da espécie, seguido de letargia e por fim parestesia nas patas inferiores. A parestesia é uma frequente complicação clínica do DM, e os sinais observados são condizentes com os descritos por Gois (2021).

No quarto dia de observação mais três espécimes morreram (G1A, G7A e G7B), também apresentando HI. Neste dia, segundo o protocolo de indução do DM, a dieta deveria ser hiperglicêmica, contudo, devido ao grande número de óbitos por HI, foi mantido apenas o consumo de água e ração. No quinto dia ainda foram à óbito mais dois ratos (G6A e G8B), seus índices glicêmicos também apresentavam HI. No sexto dia, o espécime (G9B) faleceu apresentando HI.

Figura 6. Índice glicêmico e peso dos ratos na primeira semana após indução de DM.



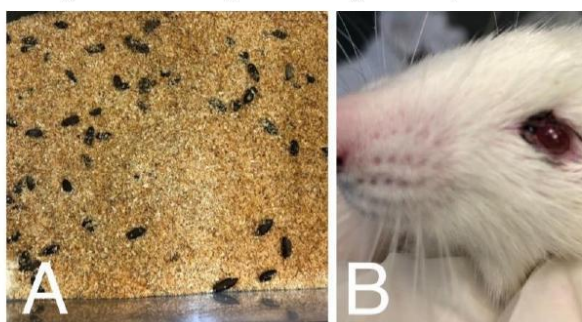
Além do aumento significativo do índice glicêmico, outro sinal importante para o diagnóstico de DM, foi o aumento do consumo de água e ração, levando a um aumento expressivo do volume de urina e fezes. A maravalha que forrava as gaiolas dos animais passaram a ficar encharcadas com urina, fazendo com que a troca das gaiolas passassem de a cada sete dias para a cada dois dias- **Figura 7-A**. Esses achados foram condizentes com as informações apresentadas pela International Diabetes Federation (IDF) (2021), mostrando que o DM causa um expressivo aumento da sede, e consequentemente a

frequência da micção. Além disso, pôde-se observar perda de peso (com retorno do crescimento apenas após 7 dias da indução. Segundo Dorado (2008) esse decréscimo do peso pode estar vinculado a poliúria, polidipsia, polifagia, noctúria, enurese, xerostomia, prurido, visão turva, fadiga e dores musculares.

Entre os principais efeitos do DM, pôde-se identificar a letargia como a principal complicação, seguido das neuropatias, parestesia e retinopatia. As neuropatias diabéticas representam a complicação crônica mais comum, frequentemente subdiagnosticada e insuficientemente tratada associada ao Diabetes Mellitus (Rolim et al., 2022).

A letargia se tornou uma complicação crônica entre os espécimes, já a parestesia e a retinopatia foram pontuais. No nono dia após a indução da DM, os espécimes G8A e G9A apresentaram coágulos em ambos os olhos- **Figura 7-B**, além de letargia importante. Os achados corroboram com os dados apresentados pela American Diabetes Association Professional Practice Committee (2021b) e pela Associação Brasileira de Diabetes (Rolim et al., 2022), revelando que o modelo de DM induzida nos animais mostrou ser consistente com a doença crônica vista em seres humanos.

Figura 7: Manifestações clínicas após a Indução do DM.



A= Maravalha encharcada com urina, compatível com os sinais de poliúria e polidipsia apresentados no DM; B= Sangramento ocular associado à retinopatia.

Fonte: Dados do estudo (2022).

Com a administração de insulina, os índices glicêmicos passaram a se estabilizar, mantendo uma média de 300 mg/dL, além de que, foram atenuados os sintomas das complicações, como a letargia e a retinopatia. No entanto, o espécime G9A morreu no décimo dia, apresentando HI e sangramento nos olhos. Isso pode estar associado ao fato de que a insulina utilizada tinha uma ação mais rápida e de curta duração, possibilitando

um intervalo muito alto para o consumo de alimento e a mudança na curva glicêmica (Novo Nordisk Farmacêutica do Brasil Ltda, 2020).

No décimo primeiro dia, o espécime G8A apresentava sangramento em ambos os olhos e letargia. O sangramento nos olhos se estendeu por dois dias, apresentando melhora apenas no décimo terceiro dia. Nas demais semanas que seguiram, a glicemia dos animais se manteve acima de 200 mg/dL, porém não foram observadas manifestações clínicas associadas.

Indução da Úlcera Diabética

A indução do modelo de úlcera diabética se iniciou na quinta semana após indução do DM, sendo observada por mais seis semanas em seis espécimes: G3A, G3B, G4A, G4B, G8A e G10A. Os ratos foram sedados e anestesiados com cloridrato de cetamina (75mg/kg) e de xilazina (10mg/kg). Abaixo, a representação do processo de indução e avaliação macroscópica das fases de cicatrização.

Figura 8. Indução da úlcera e fases de cicatrização



Fonte: Dados do estudo (2022)

O processo todo consistiu em 5 etapas, sendo elas: 1ª etapa - indução da úlcera propriamente dita, através da administração de solução ácida por via subcutânea utilizando agulha 13 x 4,5mm; 2ª etapa - fase de cicatrização (Inflamatória); 3ª etapa - fase de cicatrização (Proliferativa); 4ª etapa - fase de cicatrização (Maturação); 5ª etapa - fechamento da ferida.

A primeira e segunda etapa aconteceram na primeira e segunda semana após a indução da lesão, a terceira etapa ocorreu entre a segunda e terceira semana, já a quarta etapa levou cerca de três semanas, ocorrendo entre as semanas três e cinco, a última etapa

ocorreu entre a quinta e sexta semana. Somente o espécime G4B teve uma lentificação no avanço das etapas, tendo a sua segunda etapa concluída apenas no final da terceira semana, e a sua quarta etapa acontecendo somente no início da quarta semana. Segundo Markova e Mostow (2012) uma ferida é considerada crônica quando há difícil processo de cicatrização e ultrapassa a duração de seis semanas. Considerando a avaliação macroscópica das úlceras deste estudo, pode-se afirmar a cronicidade e o perfil compatível com a ação do diabetes.

Houveram duas mortes (G4A e G8A) decorrentes do processo, uma aconteceu dois dias depois da indução da lesão e a outra aconteceu na segunda semana.

Após a indução do DM, a segunda queda de peso médio aconteceu após a indução das lesões com o ácido clorídrico. Isso pode estar associado a grande demanda metabólica do organismo para cicatrizar a ferida. Os animais passaram cerca de 8 dias na primeira fase de cicatrização. O descolamento da crosta de exsudato dos animais ocorreu entre o sexto e o sétimo dia após a indução. A segunda fase de cicatrização (Proliferação) durou cerca de 7 dias. Com exceção do 4B, que durou 13 dias na segunda fase. A terceira fase (de maturação) durou cerca de 19 dias, atingindo o fechamento da ferida por volta do vigésimo dia. Com exceção do espécime G4B, que levou a 5ª etapa da cicatrização até o vigésimo quinto dia.

Abaixo, segue a **Figura 9** apresentando registros das lesões e suas fases.

Figura 9. Evolução das lesões.



A= Imediatamente após indução de lesão; B= Crosta formada 48h após indução de lesão; C= Descolamento da crosta (aproximadamente 6-7 dias) e permanência da fase inflamatória no processo de cicatrização; D= Formação de necrose e tecido desvitalizado; E= Transição entre a fase inflamatória e fase proliferativa; F= Fase proliferativa da cicatrização; G= Fase de maturação no processo de cicatrização; H= Cicatrização da ferida; I - Demonstração do curativo oclusivo estéril realizado durante o processo.

Fonte: Dados do estudo (2022).

O tempo total da abertura ao fechamento da ferida configurou um período médio de 35 dias. O espécime G4B foi um dos exemplos de retardo no processo de cicatrização da úlcera. As hipóteses levantadas se apoiam no comportamento e atividade do animal. O G4B se tornou o espécime mais estressado, apresentando comportamento agressivo e mais ativo, interagindo mais com o seu curativo e oportunizando chances de infecção, tanto com a maravalha quanto com as próprias fezes (Melo *et al.*, 2019).

Em contrapartida, o espécime G10A, apresentava ainda um comportamento mais letárgico, causado pelo efeito da hiperglicemia, conforme foi descrito no Atlas apresentado pela IDF (2021), o que nesse sentido favoreceu o processo de cicatrização,

devido ao fato de que ele interagiu menos com o seu curativo e causava menos risco de contaminação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, verificou-se algumas limitações, entre elas, dificuldade em replicar um experimento de referência devido a ausência de detalhes dos métodos utilizados. Outro ponto considerado limitante, foi a utilização de apenas uma dosagem do indutor diabetogênico, ocasionando a impossibilidade de comparação dos efeitos da administração da droga. A associação da dose da droga e a ocorrência de níveis glicêmicos muito elevados, pode ter implicado diretamente no grande quantitativo de óbitos dos espécimes durante o experimento, sugerindo a necessidade para estudos futuros e semelhantes, a utilização da Estreptozotocina em dosagens menores.

Todavia, a indução do diabetes e de úlceras em ratos Wistar foi considerada exitosa. Observou-se que houve lentificação na transição das fases de cicatrização das úlceras diabéticas. Esse achado confirma a cronicidade no processo de cicatrização e o resultado foi condizente com a ação da doença no organismo.

Considerando que não adotamos grupo controle para comparar se houve ou não, retardo no processo de cicatrização das úlceras diabéticas, assim como, a não aplicação de tratamento “padrão ouro” de acordo com as características apresentadas pela lesão, ou ainda, controle glicêmico inicial com níveis mais baixos no contexto do diabetes. Não é crível atribuir qualquer demora na cicatrização apenas a um fator causal. Julga-se indispensável novos estudos para diminuir os vieses observados.

REFERÊNCIAS

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION PROFESSIONAL PRACTICE COMMITTEE. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. **Diabetes Care**, [s. l.], v. 45, n. Supplement_1, p. S17–S38, 2021a. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/dc22-S002>. Acesso em: 15 fev. 2022.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION PROFESSIONAL PRACTICE COMMITTEE. 12. Retinopathy, Neuropathy, and Foot Care: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. **Diabetes Care**, [s. l.], v. 45, n. Supplement_1, p. S185–S194, 2021b. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/dc22-S012>. Acesso em: 19 fev. 2022.

ANDRADE, Sabrina Meireles de; SANTOS, Isabel Cristina Ramos Vieira. Oxigenoterapia hiperbárica para tratamento de feridas. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, [s. l.], v. 37, p. e59257, 2016. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rgenf/a/yv9BDkBw9h84m4dZYGHZ4Hb/>. Acesso em: 9 nov. 2023.

CÂNDIDO, Kadmiel. **Benefícios do Tratamento com insulina no Diabetes Mellitus tipo 1 em roedores- Associação com a via das Quinureninas**. Dissertação- Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2019, p.94.

DORADO, Juan Pablo Hayes. Diabetes mellitus tipo 1. **Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 90–96, 2008. Disponível em: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1024-06752008000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es. Acesso em: 19 fev. 2022.

ESTOCK, Jamie L. *et al.* Reducing Treatment Errors Through Point-of-Care Glucometer Configuration. **The Joint Commission Journal on Quality and Patient Safety**, [s. l.], v. 44, n. 11, p. 683–694, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1553725017305421>. Acesso em: 10 nov. 2023.

FERREIRA, Cláudia Luísa Ribeiro; NICOLAU, Renata Amadei. Diabetes experimental em ratos- Revisão Sistemática. In: XV ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E XI ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO- UNIVERSIDADE DO VALE DA PARAÍBA- UNIVAP, 2011. **Anais [...]**. [S. l.: s. n.], 2011.

FERRI, Fred F. Philadelphia, PA, **Ferri's clinical advisor 2018: 5 books in 1**. Philadelphia, PA: Elsevier, 2018. (Ferri's medical solutions). Disponível em: <https://www.clinicalkey.com/dura/browse/bookChapter/3-s2.0-C20130127031>. Acesso em: 9 nov. 2023.

GOIS, Tailson da Silva *et al.* Fisiopatologia da cicatrização em pacientes portadores de diabetes mellitus/ Physiopathology of healing in patients with diabetes mellitus. **Brazilian Journal of Health Review**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 14438–14452, 2021. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BJHR/article/view/32304>. Acesso em: 19 fev. 2022.

HOME *et al.* IDF Diabetes Atlas | Tenth Edition. In: 2021. Disponível em: <https://diabetesatlas.org/>. Acesso em: 15 fev. 2022.

KATSAROU, Anastasia *et al.* Type 1 diabetes mellitus. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 1–17, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrdp201716>. Acesso em: 9 nov. 2023.

MARCONDES, Carlos Brisola. Terapia larval de lesões de pele causadas por diabetes e outras doenças. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s. l.], v. 48, p. 320–320, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rimtsp/a/tfYK4CmF8JDdSbr7PPfbsxR/>. Acesso em: 9 nov. 2023.

MARKOVA, Alina; MOSTOW, Eliot N. US Skin Disease Assessment: Ulcer and Wound Care. **Dermatologic Clinics**, [s. l.], v. 30, n. 1, United States Skin Disease Needs Assessment, p. 107–111, 2012. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733863511001410>. Acesso em: 10 nov. 2023.

MASIERO, FRANCIELE DE SOUZA. **Avaliação da cicatrização de lesões tegumentares em ratos Wistar com e sem Diabetes mellitus tipo 1 usando a terapia larval**. 2015. 82 f. DISSERTAÇÃO - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, Pelotas, 2015. Disponível em: https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=1883097. Acesso em: 19 fev. 2022.

MELO, Manuela Sobral Bentes de *et al.* Influência de fatores emocionais nas doenças crônicas de pele: O estresse como gatilho para o desenvolvimento, reincidência ou agravamento da psoríase / Influence of emotional factors on chronic skin diseases: Stress as a trigger for development, recurrence or worsening of psoriasis. **ID on line. Revista de psicologia**, [s. l.], v. 13, n. 46, p. 584–608, 2019. Disponível em: <https://idonline.emnuvens.com.br/id/article/view/1914>. Acesso em: 19 fev. 2022.

NOVO NORDISK FARMACÊUTICA DO BRASIL LTDA. **Novolin R frasco - Bula do paciente**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.novonordisk.com.br/content/dam/brazil/affiliate/www-novonordisk-br/Bulas/2020-07-07/Novolin%20R%20frasco%20-%20Bula%20do%20paciente.pdf>. Acesso em: 19 fev. 2022.

OLIVEIRA, Marina Ferreira de *et al.* Feridas em membros inferiores em diabéticos e não diabéticos: estudo de sobrevida. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, [s. l.], v. 40, p. e20180016, 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rgenf/a/CF4r7tFbDkNQtxWQcrpgPdK/?lang=pt>. Acesso em: 9 nov. 2023.

RODAKCI, Melanie *et al.* Classificação do diabetes. In: BERTOLUCI, Marcello Casaccia *et al.* **Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes**. 1. ed. [S. l.]: Conectando Pessoas, 2021. Disponível em: <https://diretriz.diabetes.org.br/classificacao-do-diabetes/>. Acesso em: 15 fev. 2022.

ROLIM, Luiz Clemente *et al.* Diagnóstico e tratamento da neuropatia periférica diabética. In: BERTOLUCI, Marcello Casaccia *et al.* **Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes**. 2022. ed. [S. l.]: Conectando Pessoas, 2022. Disponível em: <https://diretriz.diabetes.org.br/prevencao-diagnostico-e-tratamento-da-neuropatia-periferica-diabetica/>. Acesso em: 10 nov. 2023.

VIEIRA, Raquel *et al.* Sugar-Lowering Drugs for Type 2 Diabetes Mellitus and Metabolic Syndrome—Strategies for In Vivo Administration: Part-II. **Journal of Clinical Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 1332, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2077-0383/8/9/1332>. Acesso em: 22 dez. 2021.

ANEXOS

ANEXO 1 - Carta de aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÃO



INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA

PARECER TÉCNICO Nº 179/2023/SEI-INPA

PARECER CONSUBSTANCIADO E CERTIFICADO SOBRE PROTOCOLOS DE PESQUISAS NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "**Dípteras amazônicas (Calliphoridae) com potencial larvoterápico para tratamento de lesões crônicas**", registrada com o **SEI 01280.000034/2021-09**, sob a responsabilidade de **José Albertino Rafael** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA, em reunião de **30/11/2023**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização:	Início: 01/05/2024 a Final: 31/12 /2024

Raimunda Liege Souza de Abreu - Presidente CEUA-INPA - PO 230/2022



Documento assinado eletronicamente por **Raimunda Liege Souza de Abreu, Pesquisador(a) em Ciência e Tecnologia**, em 07/03/2024, às 11:22 (horário oficial de Brasília), com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.mcti.gov.br/verifica.html>, informando o código verificador **11572274** e o código CRC **959FCC15**.

Referência: Processo nº 01280.000034/2021-09

SEI-INPA nº 11572274