

**TERAPIA LARVAL CON *LUCILIA EXIMIA* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)
DE COSTA RICA EN UN MODELO EXPERIMENTAL****MAGGOT THERAPY WITH *LUCILIA EXIMIA* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)
OF COSTA RICA IN AN EXPERIMENTAL MODEL**Ólger Calderón-Arguedas^{1,2}, Kattia Belfort^{1,2}, Adriana Troyo^{1,2} y María del Mar Gamboa^{1,3}

RESUMEN

Con el fin de analizar la aceleración en la solución de heridas dérmicas mediante el tratamiento con larvas de *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae), se generaron úlceras en piel en parejas de ratas mediante inoculación subcutánea de veneno de *Bothrops asper* (4,7 mg/0,2 mL). En cada ensayo una rata fue sometida a terapia (rata de prueba) y la otra no (rata control). Se probaron larvas de segundo estadio (L2) y larvas de tercer estadio temprano (L3). Los recambios larvales se hicieron cada 3 a 5 días hasta la solución de la úlcera. Se documentó, en cada caso, cuál rata (prueba o control) resolvió primero. Se efectuaron 17 ensayos, 10 con L2 y 7 con L3. En 8 (47,0%), la rata de prueba solucionó la úlcera primero; en 7 (41,2%) hubo una solución simultánea y en 2 (11,8 %) la rata control solucionó primero. De acuerdo al estadio, al usar L2, el 50,0% de las ratas tratadas resolvió primero, mientras que cuando se emplearon L3, sólo un 42,0% lo hizo. El análisis estadístico no permitió evidenciar un efecto acelerador asociado con la terapia larval en el modelo implementado ($\chi^2=0,12$; $p=0,943$; $gf=2$). En varios experimentos se observaron abscesos miásicos. El tipo de úlcera generado, de carácter agudo, pudo constituir una limitante en la evaluación de la terapia. El hallazgo de abscesos miásicos supone la necesidad mayor investigación antes de promover la idoneidad de *L. eximia* como agente para terapia larval.

Palabras clave: Cicatrización de heridas, cuidados de la piel, desbridamiento, Diptera, larva, terapia biológica, úlcera.

ABSTRACT

In order to analyze the accelerating healing effect of the treatment of dermal wounds with maggots of *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae), skin ulcers were generated by subdermal inoculation of venom from *Bothrops asper* (4.7 mg/0.2 mL) on couples of rats. For each experiment one rat was treated (test rat) and the other was untreated (control rat). Second instar larvae (L2) and early third instar larvae (L3) were applied. The maggots were substituted each third to fifth day until the resolution of the ulcer. In each experiment, the rat that resolved the ulcer first (test or control) was documented. Seventeen experiments were performed, 10 utilizing L2 and 7 with L3. In 8 (47.0 %), the test rat resolved the ulcer first; in 7 (41.2 %) there was a simultaneous resolution, and in 2 assays (11.8 %) the control rat resolved first. According to the instar, when L2 were applied, 50.0 % of the treated rats resolved the ulcer before control, while only 42.0 % resolved the wound first when L3 were used. The statistical analysis did not demonstrate an accelerator effect of maggot therapy in the implemented model ($\chi^2=0.12$; $p=0.943$; $gf=2$). In several experiments, myiasic abscesses were observed. The type of ulcer generated, which is acute, could be a limitation for evaluating larval therapy. The finding of myiasic abscesses must be investigated prior to recommending *L. eximia* as a secure agent in maggot therapy.

Key words: Biological therapy, debridement, Diptera, larvae, skin care, ulcer, wound healing.

INTRODUCCIÓN

La terapia larval consiste en la aplicación tópica de larvas de moscas (Diptera: Muscomorpha) con características necrobiontófagas a procesos ulcerativos dérmicos de carácter crónico o que muestran abundante tejido necrótico (Sherman, 1998). Ésta surge como una estrategia terapéutica alternativa con respecto a terapias tradicionales que incluyen procesos de desbridamiento, uso de agentes tópicos, desinfectantes y apósitos especializados; también es una alternativa ante terapias novedosas como reemplazamientos de piel a través de sustitutos biológicos, aplicación de factores de crecimiento, láser, oxígeno hiperbárico, estimulación eléctrica o sistemas de presión negativa (Moreno-Giménez *et al.*, 2005). A diferencia de las anteriores, los costos por tratamiento en la terapia larval son mínimos lo que hace de ella una terapia de potencial aplicación en regiones rurales o tropicales donde no existen otras alternativas terapéuticas para el tratamiento de úlceras (Contreras-Ruiz *et al.*, 2005).

La aposición de larvas de mosca favorece la desbridación de las úlceras, debido a varias razones; dentro de éstas figuran la acción mecánica de las piezas bucales cuando las larvas se alimentan de tejido muerto, detritos celulares y exudados serosos (Sherman *et al.*, 2000), así como la secreción de enzimas tipo tripsina, quimiotripsina, metaloproteasas y colagenasas que propician la degradación de la matriz extracelular favoreciendo la oxigenación del área ulcerada (Figuroa *et al.*, 2006). Por otro lado se ha podido demostrar que las larvas de mosca tienen una importante actividad antimicrobiana, la cual está asociada con la secreción de compuestos alcalinizantes como amoníaco, alantoina, urea y bicarbonato

de amonio, los cuales inhiben el crecimiento bacteriano (Sherman *et al.*, 2000). Adicionalmente se ha podido identificar la presencia de péptidos antimicrobianos cuyas masas molares oscilan entre los 0,5 y 10 kDa y <500 Da los cuales han mostrado un efecto bactericida y bacteriostático en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA), *Bacillus cereus* y *Escherichia coli* (Bexfield *et al.*, 2008). En relación con el efecto proliferativo en el tejido dérmico se ha mencionado que las larvas generan sustancias de excreción y secreción con actividad promotora del crecimiento celular, hecho que se visualiza en la aparición de importante tejido de granulación como resultado de la terapia larval (Sherman *et al.*, 2000). En este sentido Honda *et al.* (2011), pudieron determinar que los productos de excreción y secreción derivados de *Lucilia sericata* promueven el incremento del factor de crecimiento de hepatocitos, HGF (hepatocyte growth factor), un importante factor envuelto en la solución de úlceras dérmicas. Dadas estas características, la efectividad de la terapia larval ha sido documentada en el tratamiento de diversos tipos de úlcera como las de los pies, las de presión, heridas quirúrgicas y traumáticas, úlceras por quemaduras y arteriovenosas (Sherman *et al.*, 2000; Muncuoglu *et al.*, 1999). En algunos casos la terapia larval se ha podido considerar como una alternativa exitosa para el tratamiento de úlceras en extremidades complicadas con gangrena próximas a ser amputadas (Sherman y Pechter, 1988).

Diversas especies productoras de miasis han sido ensayadas en este tipo de terapia biológica. Dentro de ellas destacan *Calliphora vicina*, *Chrysomya rufifacies*, *Lucilia cuprina*, *Lucilia illustris*, *Lucilia sericata*, *Phormia regina*, *Protophormia terraenovae* (Diptera: Calliphoridae), *Wohlfahrtia nuba* (Diptera: Sarcophagidae) y *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) (Sherman *et al.*, 2000). De éstas, las que se han usado de forma extensiva en países de Europa, Norteamérica y Suramérica son *L. sericata* y *L. illustris* (Sherman y Pechter, 1988). Recientemente se ha propuesto la utilización de

¹Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET). ²Dpto. de Parasitología, Fac. de Microbiología, Universidad de Costa Rica (UCR). ³Dpto. de Microbiología e Inmunología, Fac. de Microbiología (UCR). Correspondencia: Ólger Calderón-Arguedas. E-mail: olger.calderon@ucr.ac.cr

L. eximia (Diptera: Calliphoridae), mosca taxonómicamente conexas a las anteriores, como una candidata para su utilización en este tipo de terapia (Wolff-Echeverri *et al.*, 2010). *Lucilia eximia* es una especie común en la región Neotropical y una de las más frecuentes en Costa Rica (Jirón, 1979). Se le ubica primordialmente en áreas urbanas, donde se alimenta de carroña, frutas y desechos orgánicos diversos (Wolff-Echeverri *et al.*, 2010).

De acuerdo a Sherman *et al.* (2000), algunas características deben de cumplirse para poder avalar un determinado agente como candidato para su uso en terapia larval. Dentro de éstas se incluyen la incapacidad de las larvas de invadir estratos profundos u órganos internos del hospedador, la capacidad de las larvas de aglomerarse en tejido cutáneo, el desarrollo rápido, la facilidad de mantenimiento en condiciones de laboratorio, la facilidad de efectuar los procesos de esterilización de los huevos y la exclusividad de las larvas por alimentarse de tejido necrótico.

Desde un punto de vista bioético se debe contemplar, en la fase previa a un ensayo clínico en humanos, la implementación de ensayos preclínicos en animales, lo que garantiza la protección y seguridad de los sujetos en la ejecución de los ensayos clínicos (Giridharan *et al.*, 2013). Dada la necesidad de comprobar la idoneidad de las especies y variedades locales de moscas en la terapia larval, el presente estudio tuvo como propósito evaluar la efectividad y seguridad del tratamiento con larvas de *L. eximia* de Costa Rica en la solución de úlceras inducidas mediante veneno de serpiente en un modelo animal, como un paso previo a su eventual utilización en seres humanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento de colonias

Para el establecimiento de las colonias de *L. eximia*, se realizó la colecta de las moscas en un área boscosa del campus universitario “Rodrigo Facio” de la Universidad de Costa Rica (09°56,272'N - 084°02,990'O, altitud

1177 msnm). Para dicha colecta se utilizaron redes entomológicas y como cebo se emplearon cadáveres de ratas en estado de descomposición. La identificación de especie se llevó a cabo de acuerdo a los criterios establecidos por Aubertin (1933), Vargas-Fonseca (1999), Amat *et al.* (2008) y Barros de Carvalho y Antunes de Mello-Patiu (2007). Adicionalmente se efectuó la comprobación de la identidad larval de la progenie, utilizando las características propuestas por Vargas-Fonseca (1999) y Flores y Wolff (2009). El establecimiento y mantenimiento de las colonias se llevó a cabo mediante la metodología descrita por Figueroa *et al.* (2007) para el cultivo de *L. sericata*.

Obtención de larvas estériles

Se colectaron las masas de huevos a partir de las colonias. Posteriormente se suspendieron en solución salina al 0,85% por cinco minutos y luego se colocaron en hipoclorito de sodio al 0,1% como primer tratamiento microbicida y para completar la disgregación de dichas masas ovíferas. La esterilización de los huevos se llevó a cabo en formalina al 5,0% por cinco minutos. Una vez esterilizados, dichos huevos fueron lavados, en condiciones de asepsia, tres veces con solución salina estéril al 0,85% en una cámara de flujo laminar. Posteriormente se colocaron en placas de agar sangre donde tuvo lugar la eclosión de las larvas. Las placas fueron colocadas en una cámara de mantenimiento de insectos a una temperatura de 26°C, humedad relativa al 95% y un fotoperiodo de 12 horas. Muestras de los huevos estériles fueron colocadas en caldo tripticasa-soya y en caldo tioglicolato para verificar su condición de esterilidad 24 horas después de su procesamiento. Las larvas de segundo (L2) y tercer estadio temprano (L3) fueron colectadas 24 y 48 horas después de la colocación de los huevos en el agar bacteriológico.

Modelo *In vivo*

En ausencia de un sistema animal consensuado para el estudio la terapia larval, se

implementó un modelo de dermonecrosis en ratas en el cual se utilizó veneno completo de *Bothrops asper* como inductor (Jiménez *et al.*, 2008). Dicho veneno fue suministrado por el Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Costa Rica. Los animales empleados fueron ratas macho de la especie *Rattus norvegicus* cepa Wistar, con un peso entre 150 a 200 gr. en el momento de la ejecución de los experimentos. La valoración bioética de los protocolos fue aprobada por el Comité institucional para el cuidado y uso de los animales (CICUA) de la Universidad de Costa Rica.

Cada experimento implicó el manejo de una pareja de ratas, de las cuales una rata fue tratada con L2 o L3 de *L. eximia* (rata de prueba) y la otra no recibió ningún tipo de tratamiento (rata control). Cada rata fue anestesiada con Zoletil® 50 administrado por vía intramuscular en una dosis de 5,0 mg/0,1 ml por rata. Posteriormente se les inoculó por vía subcutánea 4,7 mg/0,2 ml de veneno completo de *Bothrops asper* en la región dorso torácica la cual fue previamente rasurada. Se escogió esta región, para poder garantizar que el apósito por colocar no fuera removido por los animales de experimentación. A las 48 horas se hizo remoción de la costra dérmica generada y la úlcera provocada fue tratada, en la rata de prueba, con las larvas de *L. eximia* en una dosis de 5-10 larvas/cm².

La aplicación de las larvas se efectuó utilizando la metodología descrita por Acton (2007) con modificaciones. Brevemente, las larvas se confinaron al área ulcerada mediante el uso de parches DouDERM CGF® cortados a manera de anillos que circundaron la superficie de la piel ulcerada (Fig. 1a). Estos parches fueron cubiertos con la ayuda de cinta Transpore® la cual se aplicó de forma concéntrica al cuerpo del animal para garantizar la sujeción (Fig. 1b). El recambio de las larvas tuvo lugar cada 3 a 5 días, como se establece en la práctica clínica (Muncuoglu *et al.*, 1999). Dicho recambio se llevó a cabo hasta que tuviese lugar la solución del proceso ulceroso determinado por una reepitelización mayor al 90%

del área ulcerada (Fig. 2a). A la rata control se le provocó una úlcera de acuerdo a la metodología descrita, se le colocó el parche DouDERM CGF®, pero no se le trató con larvas. Se registró, para cada experimento, cuál rata (rata de prueba o rata control) fue la que solucionó primero el proceso ulceroso o si hubo una solución simultánea de dicho proceso. Con el fin de valorar la relación entre la aplicación de L2 y L3 con las ratas prueba o control que solucionaron primero la úlcera, se realizó una prueba de Chi cuadrado de independencia (Daniel, 1988), utilizando un coeficiente de confiabilidad del 95% ($\alpha:0,05$). Dicha prueba fue realizada empleando el software Statistica versión 8.0 (Analytical Software).

RESULTADOS

El modelo implementado permitió la generación de úlceras de aproximadamente 1 cm de diámetro que mostraron una erosión manifiesta epidermis. La dermis presentó una coloración marrón, resultado de los procesos dermonecroticos y hemorrágicos inducidos por el veneno (Fig. 2b). El promedio de duración de los experimentos efectuados fue de 9 ± 3 días, período en el cual por lo menos una de las ratas experimentó la solución de la úlcera bajo los criterios establecidos.

Se realizaron 17 ensayos, de los cuales 10 emplearon L2 y 7 utilizaron L3 para las ratas de prueba. En 8 de los 17 experimentos (47,0%), las ratas tratadas exhibieron una solución más rápida del proceso ulceroso con respecto al control (Fig. 2a, Tabla 1). En 7 de 17 (41,2%), la solución de las úlceras se dio de manera simultánea (Tabla 1), y en 2 de los ensayos (11,8%) la rata control experimentó primero la solución de la úlcera con respecto a la rata de prueba. De acuerdo al tipo de larva utilizado, cuando se emplearon L2, el 50,0% de las ratas tratadas experimentó una solución más rápida del proceso ulceroso, mientras que cuando se utilizaron L3, sólo un 42,0% manifestó la solución de primero con respecto al control (Tabla 1).

El análisis de Chi cuadrado de independencia determinó que la distribución de las frecuencias ocurrió de forma independiente ($\chi^2=0,12$; $p=0,943$; $gl=2$), por lo que no se pudo demostrar estadísticamente, mediante el modelo utilizado, un efecto acelerador de la terapia larval en la resolución de las úlceras.

Uno de los hallazgos notables en el estudio fue la ocurrencia de abscesos miásicos (Fig.

2c), los cuales se presentaron con mayor frecuencia cuando se utilizaron las L2 (4/10 experimentos). Con las L3, sólo se dio un absceso en un único experimento. En estos abscesos se apreciaron las larvas formando furúnculos entre la dermis y la epidermis, en una localización por lo general cercana al borde de la úlcera (Fig. 2c). Cuando estas larvas fueron removidas para hacer el recambio respectivo, tuvo lugar la solución del furúnculo.

Tabla 1. Número de ensayos cuyas ratas experimentales solucionaron primero el proceso ulceroso de acuerdo al tipo de larva utilizada.

Condición de la rata (tratada/control)	Tipo de larva usada		Total
	L2	L3	
Rata tratada	5* (50,0)**	3 (42,0)	8 (47,0)
Rata control	1 (10,0)	1 (14,2)	2 (11,8)
Ambas	4 (40,0)	3 (42,8)	7 (41,2)
Total	10 (100,0)	7 (100,0)	17 (100,0)

* Frecuencia absoluta de ensayos, ** Porcentaje de ensayos

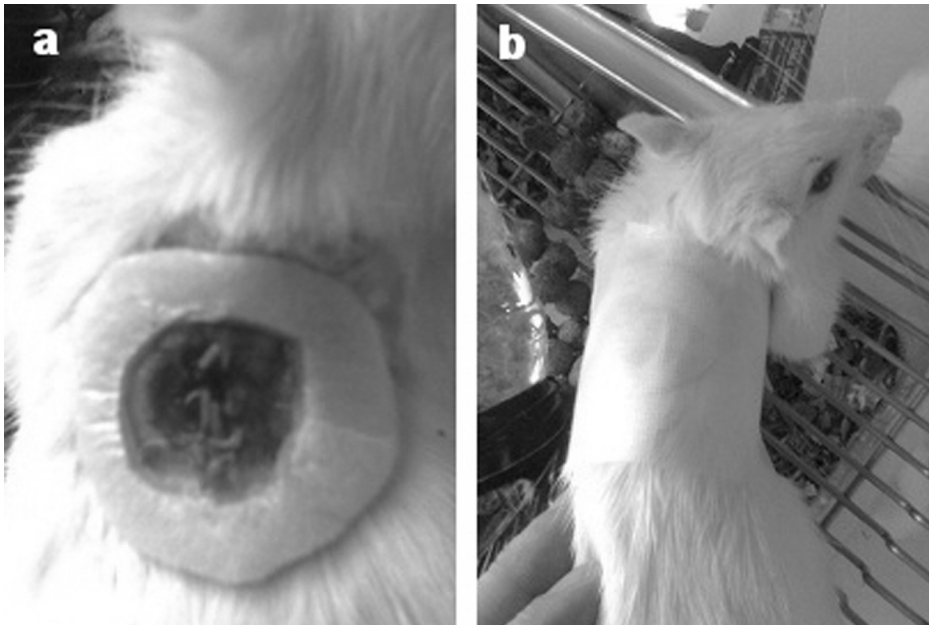


Figura 1. Sistema de aplicación de las larvas en las ratas de experimentación. a: Disposición de larvas circunscritas a un anillo concéntrico de DouDERM CGF®. b: Sujeción de parche con cinta Transpore®.

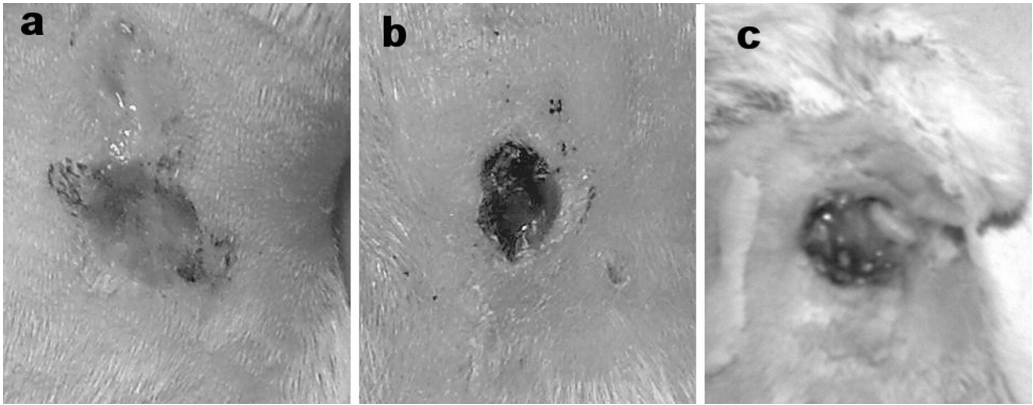


Figura 2. Evaluación macroscópica de las lesiones. a: proceso ulceroso solucionado donde se observa amplia reepitelización de la zona. b: úlcera sin tratamiento no solucionada en la cual se observa el material necrótico en el centro de la úlcera. c: absceso miásico que muestra una larva de *Lucilia eximia* emergiendo de un furúnculo.

DISCUSIÓN

La utilización de un nuevo agente terapéutico en cualquier tipo de terapia implica necesariamente, como paso previo a su aplicación en seres humanos, el ensayo en animales de experimentación. Esta fue la razón por la cual se implementó el modelo animal presentado como un primer paso para valorar el comportamiento de *L. eximia* de Costa Rica en el tratamiento de úlceras en un modelo “*in vivo*”.

Existen diferentes modelos animales para evaluar los procesos de resolución de úlceras dérmicas. Dentro de éstos figuran principalmente la generación de lesiones inducidas por quemadura en curieles, la inducción de heridas asépticas en cerdos mediante la inoculación de halotano, oxígeno y óxido nitroso y la generación de heridas asépticas en ratas mediante la utilización de biótomos cutáneos para la promoción de cicatrices de segunda intención (González-Escobar, 2002; Moreno-Giménez *et al.*, 2005). Dado que ninguno de estos modelos genera úlceras de tamaño y cantidad de tejido necrótico adecuado, se decidió emplear veneno de serpiente como inductor del proceso ulceroso como un primer intento para evaluar las posibilidades terapéuticas del

tratamiento con larvas de *L. eximia* en animales de experimentación. El establecimiento del procedimiento de generación de las úlceras, sitio anatómico, vía y dosis de inoculación del veneno así como el procedimiento de aplicación de las larvas, tuvo como propósito brindar parámetros para que este modelo pueda ser reproducible de cara a cualquier ensayo ulterior. El veneno de *B. asper* ha sido reconocido como un inductor importante de mionecrosis local, dermonecrosis, edema y hemorragia (Rucavado *et al.*, 2000), por lo que la aplicación controlada de dicho veneno permitió la fácil generación de úlceras dérmicas. Las características de las lesiones obtenidas fueron óptimas para ensayar los sistemas de tratamiento con larvas de mosca, dada su forma, tamaño y localización.

La aplicación de larvas de *L. eximia* en sus estadios L2 y L3 fue llevada a cabo, en la mayoría de los experimentos, sin contratiempos de carácter operativo. Prácticamente desde el primer recambio se pudo advertir un mejoramiento en la evolución del proceso ulceroso donde se dio paulatinamente la desaparición del tejido necrótico y su sustitución por tejido de granulación. A pesar de que en un número importante de experimentos la rata

tratada, ya sea con L2 o con L3, solucionó el proceso ulceroso primero que la rata control, el análisis global no permitió la observación de diferencias estadísticamente significativas en el efecto acelerador de la terapia. Estos resultados pueden ser inherentes al modelo de úlcera utilizado, ya que dichas úlceras fueron de carácter agudo, no infectadas y una vez removida la costra epidérmica superficial, la cantidad de tejido necrótico remanente fue limitada. Por otro lado no se puede descartar la ocurrencia de toxicidad residual sobre el tejido dérmico derivado del veneno en el sitio de la lesión (Saravia-Otten *et al.*, 2013), hecho que podría enmascarar el efecto regenerador de la terapia larval en las ratas tratadas. En este sentido diversos investigadores han sido enfáticos que si bien es cierto la terapia larval puede ser aplicada a cualquier tipo de úlcera, su eficacia real tiene lugar en las úlceras de carácter crónico, como las úlceras de presión, las úlceras en diabéticos y las arteriovenosas (Téllez *et al.*, 2012). Estas lesiones son inducidas por factores intrínsecos al paciente y el tipo de cicatrización concerniente a su resolución tiende a ser una cicatrización por segunda intención (Moreno-Giménez *et al.*, 2005). Para Téllez *et al.* (2012), el principal aporte de la aplicación de larvas a úlceras dérmicas radica en su papel desbridante, hecho que justifica su empleo en el tratamiento de las úlceras anteriormente citadas.

Uno de los hallazgos, no esperado en la presente investigación, fue la ocurrencia de abscesos miásicos con alojamiento de larvas bajo la epidermis. Aunque es posible que en el estrato subcutáneo se hubiese dado la concentración de tejido necrótico inducido por el veneno, y que esta condición favoreciera el alojamiento de las larvas bajo la epidermis, no se puede descartar que la cepa de *L. eximia* empleada exhiba cierto grado de invasividad. Varios hallazgos han vinculado a *L. eximia* con la ocurrencia de miasis. En este sentido Madeira *et al.* (1989) informaron sobre una miasis en el abdomen y región urogenital de un gato de 15 días de nacido cuyo agente etiológico fue

L. eximia. Por otro lado Azeredo-Espin y Madeira (1996) reportaron una miasis en el abdomen y región urogenital de un perro en la cual se determinó mediante análisis de ADN (mtDNA) y enzimas de restricción la identidad del agente etiológico, que correspondió a *L. eximia*. Moretti y Thyssen (2006) describieron una miasis primaria en el tejido subcutáneo de un conejo (*Oryctolagus cuniculus*) de Campinas, Sao Paulo, Brasil, cuyo agente causal también correspondió a *L. eximia*. Más recientemente Sanford *et al.* (2014) describieron el primer caso de una miasis humana donde coexistieron dos agentes etiológicos que resultaron ser *L. eximia* y *Chrysomya ruffifacies*. El análisis del tiempo de colonización mediante el método de horas grado acumuladas (ADH) determinó que la primera especie en ovipositar fue *L. eximia* (Sanford *et al.*, 2014).

Aunque Wolff-Echeverri *et al.* (2010) reportan la idoneidad en el tratamiento con este agente en Colombia, estudios en ese mismo país han podido determinar la presencia de varios haplotipos para esta misma especie (Giraldo *et al.*, 2011), hecho que refleja la variabilidad genética inherente a la especie. Los anteriores hallazgos junto con los resultados obtenidos en la presente investigación plantean la necesidad de realizar más experimentación que aborde tópicos histopatológicos, fisiológicos y bioquímicos con el fin de entender el potencial efecto de la terapia larval con *L. eximia* en las úlceras dérmicas. Además se debe investigar de forma exhaustiva las características biológicas de las cepas locales de *L. eximia* antes de promover su utilización masiva en biomedicina.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la Dra. Yamileth Angulo, Directora del Instituto Clodomiro Picado (ICP), Universidad de Costa Rica (UCR) por la donación del veneno de serpiente, a los Drs. José María Gutiérrez (ICP) y Andrés Moreira (CIET, UCR) por sus sugerencias y comentarios en el desarrollo de presente

estudio, a Iván Coronado y Katherine Salazar Zeledón, del Departamento de Parasitología en la Facultad de Microbiología, por su apoyo a la labor operativa y a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por su apoyo logístico y financiero a través del proyecto 803-B1-067.

LITERATURA CITADA

- ACTON, C. 2007. A know-how guide to using larval therapy for wound debridement. *Wound Essential*, 2: 156-159.
- AMAT, E., M. C. VÉLEZ Y M. WOLFF, 2008. Clave ilustrada para la identificación de los géneros y las especies de califóridos (Diptera: Calliphoridae) de Colombia. *Caldasia*, 23: 107-116.
- AUBERTIN, D. 1933. Revision of the genus *Lucilia* (Diptera, Calliphoridae). *Linnean Society's Journal*, 38: 28-536.
- AZARED-ESPIN, A. M. Y N. G. MADEIRA, 1996. Primary myiasis in dog caused by *Phaenicia eximia* (Diptera: Calliphoridae) and preliminary mitochondrial DNA analysis of the species in Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 33: 839-843.
- BARROS DE CAVALHO, C. J. Y C. ANTUNES DE MELLO-PATIU, 2007. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Revista Brasileira de Entomologia*, 3: 390-406.
- BEXFIELD, A., E. BOND, E. C. ROBERTS, E. DUDLEY, Y. NIGAM, S. THOMAS, R. P. NEWTON Y N. A. RATCLIFFE, 2008. The antibacterial activity against MRSA strains and other bacteria of a <500 Da fractions from maggot excretions/secretions of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Microbes and Infection*, 10: 325-333.
- CONTRERAS-RUIZ, J., A. FUENTES-SUÁREZ, M. KARMA-ORANTES, M. ESCAMILLA-MARES Y J. DOMÍNGUEZ-CHERIT, 2005. Larval debridement therapy in Mexico. *Wound Care Canada*, 3: 42-46.
- DANIEL, W. W. 1988. La distribución jicadrada y el análisis de frecuencias. In: Bioestadística: Base para el análisis de la salud. 3 ed. Limusa, México DF, pp.459-502.
- FIGUEROA, L., F. UHEREK, P. YUSEF, L. LÓPEZ Y J. FLORES, 2006. Experiencia de terapia larval en pacientes con úlceras crónicas. *Parasitología Latinoamericana*, 61: 160-164.
- FIGUEROA, L., J. FLORES Y S. RODRÍGUEZ, 2007. Método de cultivo para larvas de moscas *Lucilia sericata* para terapia larval. *Parasitología Latinoamericana*, 62: 79-82.
- FLÓREZ, E. Y M. WOLFF, 2009. Descripción y clave de los estadios inmaduros de las principales especies de Calliphoridae (Diptera) de importancia forense en Colombia. *Netropical Entomology*, 38: 418-429.
- GIRALDO, P. A., S. I. URIBE Y A. LÓPEZ, 2011. Análisis de secuencias de ADN mitocondrial (Cytb y ND1) en *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae). *Revista Colombiana de Entomología*, 31: 273-278.
- GIRIDHARAN, M. V., V. KUMAR Y V. MUTHUSWAMY, 2000. Use of animals in scientific research. <http://icmr.nic.in/bioethics/Animals_biomedical%20research.pdf> [Consultado: 20 de diciembre 2013].
- GONZÁLEZ-ESCOBAR, R. 2002. Modelos experimentales para la evaluación de la acción cicatrizante de medicamentos. *Revista Cubana de Farmacia*, 36: 189-196.
- HONDA, K., K. OKAMOTO, M. YASUHIRO, K. ISHIOKA, M. OKA, K. MAESATO, R. IKEE, H. MORIYA, S. HIDAKA, T. OHTAKE, K. DOI, T. FUJITA, S. KOBAYASHI Y E. NOIRI, 2011. A novel mechanism in maggot debridement therapy: protease in excretion/secretion promotes hepatocyte growth production. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 301: 1423-1430.
- JIMÉNEZ, N., T. ESCALANTE, J. M. GUTIÉRREZ Y A. RUCAVADO, 2008. Skin pathology induced by snake venom metalloproteinase: Acute damage revascularization, and re-epithelization in a mouse ear model. *Journal of Investigate Dermatology*, 128: 2421-2428.
- JIRÓN, L. F. 1979. Sobre moscas califóridas de Costa Rica (Diptera: Cyclorrhapha). *Brenesia*, 16: 221-223.

- MADEIRA, N. G., G. A. R. SILVEIRA Y C. PAVAN, 1989. The occurrence of primary myiasis in cats caused by *Phaenicia eximia* (Diptera: Calliphoridae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 84: 341.
- MORENO-GIMÉNEZ, J. C., M. GALÁN-GUTIÉRREZ Y R. JIMÉNEZ-PUYA, 2005. Tratamiento de las úlceras crónicas. *Actas Dermosifiliogra*, 96: 133-144.
- MORETTI, T. C. Y P. J. THYSSEN, 2006. Miíase primária em coelho doméstico causada por *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil: relato de caso. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58: 28-30.
- MUMCUOGLU, K. Y., A. INGBER, L. GILEAD, J. STESSMAN, R. FRIEDMANN, H. SCHULMAN, H. BICHUCHER, I. IOFFE-USPENSKY, J. MILLER, R. GALUN Y I. RAZ, 1999. Maggot therapy for the treatment of intractable wounds. *International Journal of Dermatology*, 38: 623-627.
- RUCAVADO A., T. ESCALANTE, A. FRANCESCHI, F. CHAVES, G. LEÓN, Y. CURY, M. OVADIA Y J. M. GUTIÉRREZ, 2000. Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by *Bothrops asper* snake venom: effectiveness of early *in situ* administration of the peptidomimetic metalloproteinase inhibitor batismatat and the chelating agent CaNa₂EDTA. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 63: 313-319.
- SANFORD M. R., T. L. WHITWORTH Y D. R. PHATAK, 2014. Human wound colonization by *Lucilia eximia* and *Chrysomya ruffiacies* (Diptera: Calliphoridae): myiasis, perimortem, or postmortem colonization? *Journal of Medical Entomology*, 51: 716-719.
- SARAVIA-OTTEN, P., B. ROBLEDO, T. ESCALANTE, L. BONILLA, A. RUCAVADO, B. LOMONTE, R. HERNÁNDEZ, J. I. FLOCK, J. M. GUTIÉRREZ Y S. GASTALDELLO, 2013. Homogenates of skeletal muscle injected with snake venom inhibit myogenic differentiation in cell culture. *Muscle Nerve*, 47: 202-212.
- SHERMAN, R. A. 1998. Maggot debridement in modern medicine. *Infections in Medicine*, 15: 651-656
- SHERMAN, R. A. Y E. A. PECHTER, 1988. Maggot therapy: a review of the therapeutic applications of fly larvae in human medicine, especially for treating osteomyelitis. *Medical Veterinary Entomology*, 2: 225-230.
- SHERMAN, R. A., M. J. R. HALL Y S. THOMAS, 2000. Medical maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions. *Annual Review of Entomology*, 45: 55-81.
- TÉLLEZ, G. A., M. A. ACERO, L. A. PINEDA Y J. C. CATAÑO, 2012. Larvaterapia aplicada a heridas con poca carga de tejido necrótico y caracterización enzimática de la excreción secreción y hemolinfa. *Biomédica*, 32: 312-320.
- VARGAS-FONSECA, J. F. 1999. Distribución y morfología de adultos e inmaduros de moscas califóridas (Diptera: Calliphoridae) de importancia forense en Costa Rica. [Tesis]. Costa Rica: Universidad de Costa Rica, San José.
- WOLFF-ECHEVERRI, M. I., C. RIVERA-ÁLVAREZ, S. E. HERRERA-HIGUITA, J. C. WOLFF-IDÁRRAGA Y M. M. ESCOBAR-FRANCO, 2010. *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae) una alternativa para la terapia larval y reporte de casos en Colombia. *Iatreia*, 2: 107-116.

