

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN**

**PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL-UNIDAD OAXACA**

---

---

**MAESTRIA EN CIENCIAS EN CONSERVACION Y  
APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

**(PRODUCCIÓN Y PROTECCIÓN VEGETAL)**

"Actividad antibacteriana de exudados de larvas de mosca *Lucilia sericata* y  
*Lucilia cuprina* contra bacterias causantes de infecciones en heridas *in vitro*"

**ALUMNO**

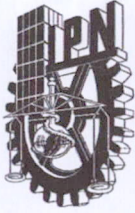
AGUSTÍN HERNÁNDEZ RAMOS

**DIRECTOR**

DR. RAFAEL PÉREZ PACHECO

DRA. ALICIA FONSECA MUÑOZ

Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca.



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS

Ciudad de México, a  de  de

El Colegio de Profesores de Posgrado de  en su Sesión  
(Unidad Académica)

No.  celebrada el día  del mes  de , conoció la solicitud presentada por el alumno:

Apellido Paterno:	Hernández	Apellido Materno:	Ramos	Nombre (s):	Agustín
-------------------	-----------	-------------------	-------	-------------	---------

Número de registro:

del Programa Académico de Posgrado:

Referente al registro de su tema de tesis; acordando lo siguiente:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

Objetivo general del trabajo de tesis:

2.- Se designa como Directores de Tesis a los profesores:

Director:  2° Directora:   
No aplica:

3.- El Trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

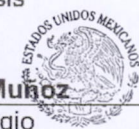
4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente, hasta la aprobación de la versión completa de la tesis por parte de la Comisión Revisora correspondiente.

Director de Tesis

Aspirante

2° Directora de Tesis

Presidente del Colegio



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACIÓN PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
UNIDAD OAXACA



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de  siendo las  horas del día  del mes de  del  se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado  para examinar la tesis titulada:

del alumno:

Apellido Paterno:	Hernández	Apellido Materno:	Ramos	Nombre (s):	Agustín
-------------------	-----------	-------------------	-------	-------------	---------

Número de registro:

Aspirante del Programa Académico de Posgrado:

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene 4% de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado.**

Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo **SI**  **NO**  **SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.**

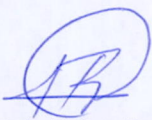


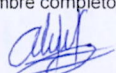
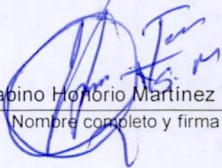
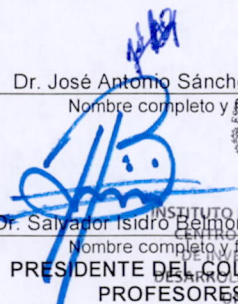
**JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN:** (Por ejemplo, el % de similitud se localiza en metodologías adecuadamente referidas a fuente original)

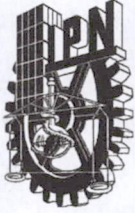
El 4 % de similitud se ha encontrado en algunas palabras del índice, términos de uso común y metodologías citadas correctamente.

**\*\*Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio, y del Director o Directores de tesis el análisis del % de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.**

Finalmente, y posterior a la lectura, revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR**  **SUSPENDER**  **NO APROBAR**  la tesis por **UNANIMIDAD**  o **MAYORÍA**  en virtud de los motivos siguientes:  
**La tesis del alumno es un documento original que se realizó a lo largo de 2 años.**

### COMISIÓN REVISORA DE TESIS

 _____ Dr. Rafael Pérez Pacheco Director de Tesis Nombre completo y firma	 _____ Dr. Jaime Ruiz Vega Nombre completo y firma	 _____ Dr. José Antonio Sánchez García Nombre completo y firma
 _____ Dra. Alicia Fonseca Muñoz Directora de Tesis Nombre completo y firma	 _____ Dr. Sabino Honorio Martínez Tomás Nombre completo y firma	 _____ Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez Nombre completo y firma <b>PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES</b>



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### CARTA DE AUTORIZACIÓN DE USO DE OBRA PARA DIFUSIÓN

En la Ciudad de México el día 13 del mes de diciembre del año 2022, el que suscribe **Hernández Ramos Agustín** alumno del programa **Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales** con número de registro **A210395**, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral de Oaxaca manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección del **Dr. Rafael Pérez Pacheco y Dra. Alicia Fonseca Muñoz** y cede los derechos del trabajo intitulado “**Actividad antibacteriana de exudados de larvas de mosca *Lucilia sericata* y *Lucilia cuprina* contra bacterias causantes de infecciones en heridas *in vitro*”**, al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expresado del autor y/o directores. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección de correo. **agustin\_hernandez3578@hotmail.com**. Si el permiso se otorga, al usuario deberá dar agradecimiento correspondiente y citar la fuente de este.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACIÓN PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
OAXACA

**Hernández Ramos Agustín**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi director de tesis Dr. Rafael Pérez Pacheco por todo el apoyo brindado en este proceso.

Al Dr. Carlos Eslava Campos por permitirme realizar la parte experimental en su laboratorio, los materiales utilizados y principalmente por la atención, ayuda y dedicación al proyecto, además de sus consejos y recomendaciones.

A la Dra. Alicia Fonseca Muñoz quien siempre me ha demostrado su apoyo e impulsado a seguir adelante, por sus enseñanzas, consejos y tiempo dedicado en todo este proceso y principalmente su amistad.

A Salvador Eduardo Acevedo Monroy y Maribel Alvarado Cabello quienes me brindaron todo su conocimiento, experiencias, enseñanzas y consejos para el desarrollo del proyecto, además de su amistad incondicional.

A mi comité revisor: Dr. Jaime Ruiz Vega, Dr. José Antonio Sánchez García y Dr. Sabino Honorio Martínez Tomas por sus observaciones y recomendaciones en la elaboración del proyecto.

Al equipo del laboratorio de patogenicidad bacteriana: Dr. Ulises, Dr. Ricardo, Dr. Gerardo, Sra. Yolanda, Alejandro y Jaqueline quienes siempre estuvieron apoyándome y alentándome a seguir adelante a pesar de las complicaciones que surgieron en el camino.

Al equipo del laboratorio de entomología: Jocelyn, Naomi, David, Ángel, Saúl y Alondra quienes siempre estuvieron apoyándome en el proceso.

## **DEDICATORIA**

A mis padres quienes siempre me han apoyado y animado en todas las decisiones que he tomado y que por ellos he logrado esto y muchas cosas más.

## INDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>12</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>15</b>
2.1 Heridas.....	15
2.2Larvaterapia.....	15
2.3 Resistencia de las bacterias a los antibióticos.....	16
2.4 Bacterias.....	17
2.5 Alternativa contra bacterias.....	18
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>20</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>22</b>
<b>6. OBJETIVO.....</b>	<b>23</b>
6.1 Objetivo general.....	23
6.2 Objetivos específicos.....	23
<b>7. MATERIALES Y MÉTODO.....</b>	<b>24</b>
7.1 Material biológico.....	24
7.2 Ubicación espacio temporal.....	24
7.3 Producción de moscas.....	24
7.4 Obtención de exudados de larvas.....	25
7.5 Identificación de bacterias.....	27
7.6 Concentración de proteínas.....	27
7.7 Prueba de sensibilidad.....	28
7.8 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE).....	29
7.9 Análisis de datos.....	30
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
8.1 Exudados de las larvas y concentración de proteínas.....	31
8.2 Prueba de sensibilidad.....	33

8.3 Análisis de los datos (Exudados de <i>L. sericata</i> ).....	43
8.4 Análisis de los datos (Exudados de <i>L. cuprina</i> ).....	45
8.5 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE).....	47
8.6 Sensibilidad con proteínas transferidas a membrana de nitrocelulosa.....	49
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>53</b>
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>57</b>
<b>11. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>58</b>



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de la mosca <i>L. sericata</i> , puede llegar a durar de 27 a 33 días en óptimas condiciones.....	14
<b>Figura 2.</b> Incubación de las larvas.....	24
<b>Figura 3.</b> S/E de 400 larvas de mosca <i>L. sericata</i> .....	24
<b>Figura 4.</b> S/E de 1,000 larvas de mosca <i>L. sericata</i> .....	24
<b>Figura 5.</b> Pasos detallados de la metodología utilizada para la obtención de los exudados de larvas de mosca <i>L. sericata</i> y <i>L. cuprina</i> .....	25
<b>Figura 6. A Y B:</b> Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias. <b>C:</b> Conservación de las cepas bacterianas previamente identificadas.....	26
<b>Figura 7.</b> Tiras de con fracciones proteínas sobre placas de agar con bacterias...29	29
<b>Figura 8.</b> Antibiograma con exudados impregnado en discos de papel filtro.....	33
<b>Figura 9.</b> Halos generados por los exudados de <i>L. sericata</i> contra bacterias presentes en heridas.....	36
<b>Figura 10.</b> Halos inhibitorios de exudados de larvas y antibióticos contra bacterias aisladas.....	38
<b>Figura 11.</b> Halos con actividad inhibitoria de las S/E de <i>L. sericata</i> .....	40
<b>Figura 12.</b> Halos con actividad inhibitoria de los exudados de <i>L. cuprina</i> .....	40
<b>Figura 13.</b> Electroforesis SDS-PAGE de las fracciones proteicas de los exudados ( <i>L. sericata</i> y <i>L. cuprina</i> ).....	45
<b>Figura 14.</b> Actividad inhibitoria de las fracciones proteicas presentes en los exudados de <i>L. sericata</i> .....	48
<b>Figura 15.</b> Actividad inhibitoria de las fracciones proteicas presentes en los exudados de <i>L. cuprina</i> .....	49

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Características generales de los diferentes lotes de exudados de larvas de segundo y tercer estadio de larvas <i>L. sericata</i> .....	31
<b>Cuadro 2.</b> Características generales de los diferentes lotes de exudados de larvas de segundo y tercer estadio de larvas <i>L. cuprina</i> .....	32
<b>Cuadro 3.</b> Sensibilidad de enjuagues.....	32
<b>Cuadro 4.</b> Actividad inhibitoria de los exudados de <i>L. sericata</i> y <i>L. cuprina</i> contra bacterias de referencia.....	35
<b>Cuadro 5.</b> Actividad inhibitoria de los exudados de <i>L. sericata</i> y <i>L. cuprina</i> contra bacterias de referencia.....	35
<b>Cuadro 6.</b> Actividad inhibitoria de exudados de <i>L. sericata</i> contra bacterias aisladas y resistencia a antimicrobianos.....	37
<b>Cuadro 7.</b> Actividad inhibitoria de exudados de <i>L. cuprina</i> contra bacterias aisladas y resistencia a antimicrobianos.....	37
<b>Cuadro 8.</b> Perfil de resistencia a antimicrobianos de bacterias aisladas.....	39
<b>Cuadro 9.</b> Prueba de un factor, aproximación de $X^2$ ( <i>L. sericata</i> 50 $\mu$ L).....	41
<b>Cuadro 10.</b> Comparaciones no paramétricas para todos los pares ( <i>L. sericata</i> 50 $\mu$ L).....	41
<b>Cuadro 11.</b> Prueba de un factor, aproximación de $X^2$ ( <i>L. sericata</i> 100 $\mu$ L).....	42
<b>Cuadro 12.</b> Comparaciones no paramétricas para todos los pares ( <i>L. sericata</i> 100 $\mu$ L).....	42
<b>Cuadro 13.</b> Prueba de un factor, aproximación de $X^2$ ( <i>L. cuprina</i> 50 $\mu$ L).....	43
<b>Cuadro 14.</b> Comparaciones no paramétricas para todos los pares ( <i>L. cuprina</i> 50 $\mu$ L).....	43
<b>Cuadro 15.</b> Prueba de un factor, aproximación de $X^2$ ( <i>L. cuprina</i> 100 $\mu$ L).....	44

<b>Cuadro 16.</b> Comparaciones no paramétricas para todos los pares ( <i>L. cuprina</i> 100 $\mu$ L).....	44
<b>Cuadro 17.</b> Fracciones proteicas presentes en la electroforesis SDS-PAGE de los exudados de <i>L. sericata</i> .....	46
<b>Cuadro 18.</b> Fracciones proteicas presentes en la electroforesis SDS-PAGE de los exudados de <i>L. cuprina</i> .....	47

## RESUMEN

En la actualidad el tratamiento de heridas es un problema de salud pública importante y se encuentra estrechamente relacionado con las bacterias que colonizan las heridas, produciendo infecciones y complicaciones graves para el paciente, un factor predominante es la resistencia que presentan las bacterias a diferentes antibióticos, catalogado como un problema a nivel mundial por la OMS planteando la necesidad de buscar alternativas para tratar este problema, es por ello que el presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto de la actividad antibacteriana de exudados de larvas de moscas *L. sericata* y *L. cuprina* contra bacterias causantes de infecciones en heridas *in vitro*, se obtuvieron exudados de las larvas de ambas especies de segundo y tercer estadio, *L. sericata* presentó actividad inhibitoria contra las principales bacterias colonizadoras de las heridas, los halos inhibitorios generados contra *S. pyogenes* ATCC 19615 presentaron diferencias estadísticamente significativas contra los halos de *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. agalactiae* y *E. coli* ATCC 23922, respecto a los halos de los exudados de *L. cuprina* generados contra *S. pyogenes* ATCC 19615 presentaron diferencias estadísticamente significativas contra el resto de las bacterias, se utilizaron los exudados de ambas especies contra 10 cepas de bacterias aisladas de importancia clínica con resistencia a diferentes antibióticos mostrando actividad inhibitoria contra todas, de igual manera se identificaron mediante una electroforesis de proteínas 11 fracciones proteicas en los exudados de *L. sericata* y 7 en los exudados de *L. cuprina*, los exudados de ambas especies de larvas presentaron actividad inhibitoria contra las bacterias comúnmente aisladas de heridas y aislados de pacientes, compartiendo fracciones proteicas de 22.2 a 78.7 kDa relacionados con la actividad inhibitoria de las larvas, sin embargo, los exudados de *L. sericata* fueron superiores en cuanto al tamaño de los halos y el número de bacterias contra las que presento actividad inhibitoria, los exudados de ambas especies de larvas demostraron ser una alternativa contra bacterias que provocan infecciones y complicaciones en las heridas y contra la resistencia bacteriana de aislados clínicos.

## ABSTRACT

Currently, wound treatment is an important public health problem and is closely related to the bacteria that colonize wounds, causing infections and serious complications for the patient, a predominant factor is the resistance that bacteria present to different antibiotics, cataloged as a problem worldwide by the WHO, raising the need to seek alternatives to treat this problem, which is why the present study aimed to determine the effect of the antibacterial activity of exudates of larvae of flies *L. sericata* and *L. cuprina* against bacteria that cause wound infections in vitro, exudates from the larvae of both second and third stage species were obtained, *L. sericata* presented inhibitory activity against the main wound colonizing bacteria, inhibitory halos generated against *S. pyogenes* ATCC 19615 presented statistically significant differences against the halos of *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. agalactiae* and *E. coli* ATCC 23922, with respect to the halos of the exudates of *L. cuprina* generated against *S. pyogenes* ATCC 19615 presented statistically significant differences against the rest of the bacteria used the exudates of both species against 10 strains of clinically important isolates with resistance to different antibiotics showing inhibitory activity against all of them, similarly, 11 protein fractions were identified by protein electrophoresis in the exudates of *L. sericata* and 7 in the exudates of *L. cuprina*, the exudates of both species of larvae presented inhibitory activity against the bacteria commonly isolated from wounds and isolates from patients, sharing protein fractions of 22.2 to 78.7 kDa related to the inhibitory activity of the larvae, however, the exudates of *L. sericata* were superior in terms of the size of the halos and the number of bacteria Against those that present inhibitory activity, the exudates of both species of larvae proved to be an alternative against bacteria that cause infections and complications in wounds and against bacterial resistance of clinical isolates.

## 1. INTRODUCCIÓN

El manejo de heridas es de suma importancia en el mundo y constituyen un problema de salud pública, en Latinoamérica el problema se agrava principalmente por el gran número de personas con obesidad y diabéticos quienes son más susceptibles a presentar lesiones (Contreras Ruíz, 2013). Tal motivo genera un importante gasto económico que puede percibirse por la información generada por 159 unidades médicas en México que reportan un total de 36,022 casos de heridas que ocasionan un gasto aproximado de \$46,563,070.73 en tratamientos ambulatorios y de \$1,864,124,436.89 en los pacientes que requieren ser hospitalizados (Vela *et al.*, 2018). Las heridas pueden ser generadas por algún agente físico o químico que provoca una lesión en la piel (Salem *et al.*, 2000), misma que puede ser colonizada por diferentes microorganismos como bacterias u hongos que por mala respuesta al tratamiento o por problemas del hospedero se agravan, lo que puede ocasionar problemas en la cicatrización y de manera consecuente en la recuperación de la herida, además de complicaciones en los pacientes (Castellanos *et al.*, 2014; Medina-Ochoa *et al.*, 2018). El empleo de antimicrobianos para el tratamiento de heridas es la practica más común, sin embargo, en los últimos años el empleo indiscriminados de estos compuestos ha ocasionado la selección de múltiples mutantes resistentes a diferentes antimicrobianos lo cual ha conducido a nivel mundial a que el manejo de los procesos infecciosos resulte complicado por lo que cada vez se requiere de compuestos más costosos y con mayores efectos colaterales en el paciente (Fernández *et al.*, 2003, Alós, 2015, Gonzáles *et al.*, 2019 y Giono-Cerezo *et al.*, 2020). Numerosas y diferentes especies de bacterias como *Staphylococcus aureus* (Zendejas *et al.*, 2014; Giono-Cerezo *et al.*, 2020), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* (Daza, 1998) y *Pseudomonas aeruginosa* son comúnmente aisladas de heridas clínicas infectadas y no infectadas (Lyczak *et al.*, 2000; Edwards y Harding, 2004; Luján, 2014; Giono-Cerezo *et al.*, 2020), *Escherichia coli* es principalmente aislada de infecciones intrahospitalarias (Pérez *et al.*, 2012), es importante señalar que todos estos microorganismos son resistentes a diferentes antimicrobianos, ante la dificultad para el manejo adecuado de las infecciones la Organización Mundial de la Salud (OMS) plantea la importancia

en cuanto a la utilización adecuada de los antibióticos para prevenir la problemática de la resistencia bacteriana y tratar las infecciones provocadas por los microorganismos, además de buscar nuevas alternativas para el tratamiento y control de las infecciones. A lo largo del tiempo y para el tratamiento de las heridas infectadas se han retomado algunos tratamientos alternativos que ayudan al control de la infección y a la cicatrización de las heridas (Rodríguez y González, 2011), entre estos la utilización de larvas de mosca (larvaterapia) de las familias *Calliphoridae*, *Lucilia sericata* han demostrado gran eficacia para el manejo de diversas lesiones de la piel (Sherman et al., 2000; Figueroa et al., 2007; Sherman, 2009; Téllez et al., 2012; Jimenez et al., 2013;), considerándola como una opción terapéutica muy valorada (Sánchez et al., 2004). El beneficio de la terapia se relaciona en parte con los exudados que genera la larva al estar en contacto con la herida. Si bien no todas las especies de larvas de mosca son aptas para esta terapia (Jimenez et al., 2013; Sherman, 2009), en años recientes el estudio de los exudados de las larvas de mosca han tomado gran importancia y se ha reportado que algunas especies como *Cochliomyia macellaria* (Masiero et al., 2017) y *Lucilia cuprina* (Arora et al., 2010) pueden presentar sustancias inhibidoras de bacterias (Chan et al., 2007).

Las infecciones en las heridas provocadas principalmente por bacterias y la resistencia a antibióticos que se genera constantemente en todo el mundo representan un grave problema en salud, el presente estudio tiene el objetivo de determinar el efecto de la actividad antibacteriana de exudados de larvas de moscas *L. sericata* y *L. cuprina* contra bacterias causantes de infecciones en heridas *in vitro*.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Heridas

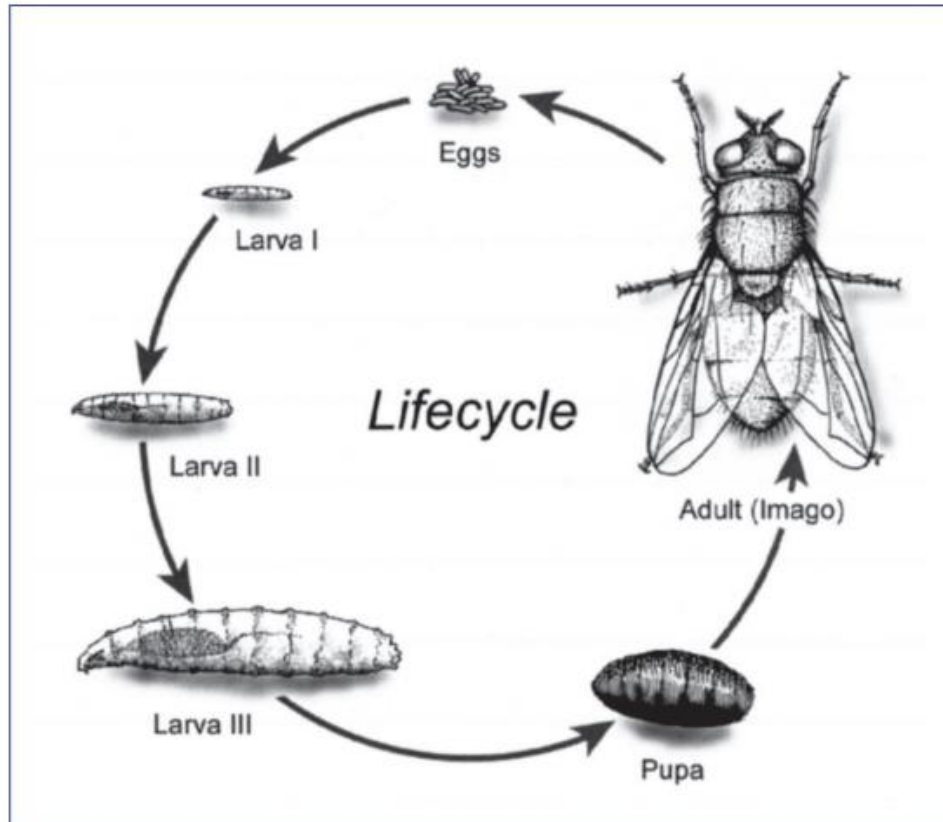
El manejo de heridas es de suma importancia en el mundo ya que constituyen un problema de salud pública, generando un importante gasto económico (Vela *et al.*, 2018). El conocimiento acerca del tema se ha ido incrementando, existiendo muchas clasificaciones de las heridas, una manera adecuada para distinguirlas es la clasificación de heridas agudas, las cuales presentan un tiempo de evolución de 30 días y las heridas crónicas que no siguen un proceso de cicatrización normal y que llegan a provocar úlceras (Jiménez, 2008), para llevarse a cabo pasa por una fase de inflamación que dura de 3 a 6 días, seguido de la fase de proliferación de 4 a 14 días y por último la fase de remodelación que comienza del día 8 hasta 1 año (Castellanos *et al.*, 2014), existen tres tipos de cicatrización: primaria o por primera intención; es la ideal, en la que no existe secreción, es muy breve y con una mínima formación de cicatriz, secundaria o por segunda intención; donde la herida no llevó un tratamiento pronto y adecuado en la cual ha pasado tiempo y se encuentra muy sucia, por último la terciaria o por tercera intención que es una herida muy contaminada o en tejidos muy traumatizados (Salem *et al.*, 2000).

### 2.2 Larvaterapia

En los últimos años se han buscado alternativas para el tratamiento de heridas, retomando algunos tratamientos como la larvaterapia (Sherman, 2009; Jiménez *et al.*, 2013) la cual utiliza larvas y las sustancias que generan al estar en contacto con la herida, resultando superior en el control de cargas bacterianas y ayudando a la cicatrización de la herida en comparación con antimicrobianos o técnicas como el desbridamiento quirúrgico (Contreras-Ruiz *et al.*, 2016), la larvaterapia se le atribuye al cirujano William S. Baer quien fue el primero en observar y estudiar las mejoras que presentaban las heridas en soldados que llegaban con lesiones del campo de batalla, colonizadas con larvas de moscas, los cuales presentaban resultados favorables en la cicatrización, a diferencia de aquellos que llevaban algún tratamiento (Baer, 2011). Las larvas de mosca *L. sericata* (Fig. 1) de la familia *Calliphoridae* son las utilizadas para este tratamiento, colocando de 5 a 8 larvas por



cm<sup>2</sup> de 2 a 4 mm sobre la herida (Fleischmann, *et al.*, 2004) ayudando de manera general con el desbridamiento, desinfección y muerte bacteriana, estimulación, granulación y reparación de la herida (Kerridge *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Ciclo de vida de la mosca *L. sericata*, puede llegar a durar de 27 a 33 días en óptimas condiciones (tomado de Fleischmann, 2004).

### 2.3 Resistencia de las bacterias a los antibióticos

Los antibióticos dentro del área de la medicina son de gran importancia para combatir bacterias ya que gracias a estos se han salvado millones de vidas, sin embargo, una de las causas de este problema es la resistencia bacteriana que se genera por el uso desmedido o masivo de los antibióticos, las bacterias han llegado a desarrollar una selección natural lo cual les ha permitido poder sobrevivir en esas condiciones (Arco, 2014; Alós, 2015). La resistencia bacteriana no es un problema únicamente para el ser humano, ya que los antibióticos también se implementan dentro de los programas de alimentación de ganado y aves de corral para evitar

enfermedades intestinales-infecciosas ocasionadas por bacterias presentes en los animales, previniendo así una alta mortalidad en las producciones de estos, ante esta situación se considera un problema a nivel mundial (Cromwell, 2002; Gonzáles *et al.*, 2019). Las bacterias han desarrollado dos tipos de resistencia a los antibióticos, de una manera natural o intrínseca que al presentarse ayuda a todas las bacterias pertenecientes a esa especie a soportar algún tipo de antibiótico y por resistencia adquirida que se genera a través de mutaciones (Fernández *et al.*, 2003).

## **2.4 Bacterias**

Las bacterias son microorganismos principalmente causantes de enfermedades infecciosas y agentes contaminantes (Berlanga y Guerrero, 2017), existe una gran diversidad de bacterias que podemos encontrar, sin embargo en la actualidad algunas en específico han presentado resistencia a antibióticos, como la penicilina con una resistencia incluso del 100% (Baquero *et al.*, 1995), las bacterias son una de las causas más importantes en problemas de pacientes con heridas crónicas (Edwards y Harding, 2004),ejemplos de ellos son *Streptococcus sp.* quienes destruyen los tejidos de una forma muy rápida, por otra parte podemos encontrar especies de bacterias como *S. aureus* cuando el tiempo de evolución de la herida es menor a cuatro semanas y cuando esta es mayor existe presencia de *Pseudomonas sp* (Contreras Ruiz, 2013).

El género *Staphylococcus* poseen una gran capacidad de adaptación, es asociada con enfermedades transmitidas por alimentos y resistente a la penicilina (Zendejas *et al.*, 2014). *S. aureus* es una especie gram positiva y de las más patógenas (Jaradat *et al.*, 2020) es una de las especies con mayor importancia en las heridas debido a que invaden tejidos cutáneos y colonizan las superficies, llegando a sobrevivir en condiciones adversas (Daza, 1998; Giono-Cerezo *et al.*, 2020).

*S. pyogenes* es una bacteria gram positiva que provoca infecciones de la piel y tejidos blandos (Bartolomé-álvarez *et al.*, 2014) y de la faringoamigdalitis, se adhiere ya sea a la piel o a la mucosa faríngea, es transmitido por contacto directo, secreciones respiratorias o saliva, presentan resistencia ante sulfamidas,

tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos y lincosamidas. (Rivera, 1998; Zendejas *et al.*, 2014)

*S. agalactiae* es una bacteria gram positiva presente en diferentes heridas infecciosas, como de pie diabético e infecciones subcutáneas (Martín *et al.*, 2006; Jaramillo *et al.*, 2018; Medina-Ochoa *et al.*, 2018) en neonatos y en mujeres durante el embarazo, puede ser agente causal de neumonías, meningitis, infecciones de heridas en la piel etc., se han descrito resistencias a la tetraciclina y resistencias leves contra penicilina, sin embargo, aún conserva su sensibilidad (Valls *et al.*, 2008; Zendejas *et al.*, 2014).

*P. aeuroginosa* es una bacteria gram negativa, una de las principales bacterias presentes en diversas heridas infecciosas del cuerpo humano (López *et al.*, 2013; Medina-Ochoa *et al.*, 2018), incluso en condiciones adversas en el medio ambiente, es la quinta causa más frecuente en infecciones en general a nivel mundial y presenta resistencia intrínseca a ampicilina, cefazolina, cefuroxima y ácido nalidíxico (Luján, 2014; Zendejas *et al.*, 2014; Paz *et al.*, 2019; Giono-Cerezo *et al.*, 2020).

## **2.5 Alternativas contra bacterias.**

Debido a la problemática con respecto a la resistencia bacteriana es importante buscar nuevas alternativas para encontrar una solución, que sea eficiente y de bajo costo para su producción, de igual manera existen diferentes tratamientos alternativos que se utilizan junto con los antibióticos para tratar las heridas (Castellanos *et al.*, 2014), como los exudados de larvas de mosca que en conjunto podrían presentar mejores resultados para el tratamiento de algunas bacterias y así evitar únicamente la utilización de los antibióticos (Cazander, *et al.*, 2010; Van der plas, *et al.*, 2010).

En la actualidad los insectos han tomado gran importancia siendo fundamentales en la búsqueda de diversos compuestos como péptidos antimicrobianos que se sintetizan principalmente en los cuerpos grasos y las células sanguíneas de los insectos (Huan, *et al.* 2020) y que puedan ser utilizados como alternativas contra la

proliferación de las bacterias que provocan diferentes enfermedades o infecciones, por ello se busca la utilización de los productos generados por los insectos, como la apitoxina que generan las abejas *Apis mellifera* y que presentan un gran potencial sobre bacterias presentes en la cavidad bucal de los seres humanos (Leandro *et al.*, 2015) o los exudados obtenidas de las larvas de moscas que presentan actividad inhibitoria contra algunas bacterias (Van der Plas *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2012).

Los Dípteros han sido de gran importancia en diferentes estudios debido a los compuestos que se encuentran o que generan en sus estadios larvarios, como la obtención de aceites de alta calidad (Saviane *et al.*, 2021), hemolinfa y exudados (Zhen, *et al.*, 2013, Giraldo., 2014 y Correa *et al.*, 2019), existiendo diferentes métodos para la estimulación de las larvas (Lee, *et al.*, 2020) tratando de obtener compuestos con mejores resultados en cuanto a la efectividad de los exudados (Arora, *et al.*, 2010).

La familia Calliphoridae es la más estudiada, principalmente los exudados de *L. sericata* debido a la relación de la especie con su utilización en la larvaterapia, se han identificado algunos compuestos con actividad inhibitoria contra bacterias gram positivas y gram negativas, utilizando principalmente exudados que contienen compuestos de bajos pesos moleculares (Bexfield, *et al.*, 2008, Zhen, *et al.*, 2013, y Novoa-Palomares, *et al.*, 2022), dentro de los cuales se han reportado péptidos relacionados con la inhibición de algunas bacterias existiendo diferencia entre la actividad inhibitoria de bacterias gram positivas y gram negativas (Kruglikova, *et al.*, 2011) y péptidos de bajos pesos moleculares ya caracterizados como la lucifensina (Cerovsky, *et al.*, 2010, Velachova, *et al.*, 2014) y lucifensina II (El Shazely, *et al.*, 2014).

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El tratamiento de heridas e infecciones nosocomiales constituye un problema de salud pública importante, principalmente por los microorganismos que pueden presentarse y colonizar las heridas complicando el tratamiento, además de otros factores como la desatención de la herida, enfermedades que pueden llegar a complicar aún más el problema, los altos costos económicos que genera su tratamiento en México y el mundo, y principalmente la resistencia a antibióticos, que presentan las bacterias al estar en contacto con estos compuestos y poder sobrevivir en estas condiciones, los antibióticos representan el tratamiento más utilizado para tratar heridas debido a la eficacia que tenían para eliminar bacterias, sin embargo, por el uso desmedido esto se ha convertido en un problema a nivel mundial y es necesario encontrar nuevas alternativas para tratar esta problemática, contra bacterias que provocan infecciones en heridas y que constantemente son resistentes a diferentes antibióticos.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Las complicaciones en las infecciones de heridas provocadas principalmente por bacterias con resistencia a antibióticos representa un problema grave en salud, el presente estudio tiene la finalidad de comparar el efecto que pueden presentar los exudados de las larvas de mosca *L. sericata* (especie utilizada principalmente en la larvaterapia), y larvas de *L. cuprina* contra bacterias infecciosas, si bien la primer especie cuenta con información al respecto, la segunda aún cuentan con poca información acerca del tema, es importante conocer el efecto de los exudados para tener alternativas contra el problema de resistencia bacteriana, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *E. coli* y *P. aeruginosa* son bacterias comúnmente aisladas de heridas y actualmente en muchos de los casos no logran ser controladas con antibióticos debido a la resistencia bacteriana que pueden llegar a presentar, por ello se han retomado tratamientos alternativos como la larvaterapia que ha demostrado ser una terapia con grandes resultados mejorando las condiciones de las heridas en los pacientes, los cuales en la mayoría de los casos no existía alternativa más que la amputación de alguna extremidad debido a la gravedad de la infección, sin embargo, se conoce poco acerca de los exudados que segregan las larvas y que están relacionados con el mejoramiento de la herida y la eliminación de la carga bacteriana con los diferentes compuestos que posee.

## 5. HIPÓTESIS

**HI:** Los exudados de las larvas de moscas *L. sericata* y *L. cuprina* presentarán actividad inhibitoria contra las cepas bacterianas que son relacionadas comúnmente con infecciones de heridas.

**H0:** Los exudados de las larvas de mosca *L. sericata* y *L. cuprina* no presentarán actividad inhibitoria contra las cepas bacterianas que son relacionadas comúnmente con infecciones de heridas.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo general**

Determinar el efecto de la actividad antibacteriana de exudados de larvas de moscas *L. sericata* y *L. cuprina* contra bacterias causantes de infecciones en heridas *in vitro*.

### **6.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar las propiedades físicas de los exudados generados por las larvas de moscas en condiciones no controlada para su producción.
- Conocer la concentración de proteínas de los exudados de las larvas de moscas.
- Conocer la actividad antibacteriana de los exudados y la susceptibilidad de las bacterias causantes de infecciones en heridas y aislados clínicos mediante la aplicación de antibiogramas.



## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 Material biológico**

La colonia de larvas de mosca *L. sericata* y *L. cuprina* fueron obtenidas del criadero del laboratorio de larvaterapia México, que sirvió para comenzar la producción. Las cepas bacterias ATCC (*S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. pyogenes* ATCC 19615, *E. coli* ATCC 25922) y aislados de importancia clínica (*P. aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *S. aureus*, 2 cepas de *Proteus mirabilis* y *Citrobacter freundii*) fueron obtenidas del cepario del laboratorio de patogenicidad bacteriana de la Unidad en Investigación Básica y Clínica en enfermedades Infecciosas del Hospital Infantil de México, Federico Gómez.

### **7.2 Ubicación espacio temporal**

La parte experimental se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de patogenicidad bacteriana de la Unidad en Investigación Básica y Clínica en enfermedades Infecciosas del Hospital Infantil de México, Federico Gómez, de la Ciudad de México, Calle Doctor Márquez 162 Delegación:, Doctores, Cuauhtémoc, 06720 Ciudad de México, CDMX, en un periodo de febrero a agosto del 2022.

### **7.3 Producción de moscas**

El mantenimiento de las crías de las diferentes especies se llevó a cabo de acuerdo a la metodología propuesta por Masiero *et al.*, (2019) con algunas modificaciones (tamaño de la jaula, alimento y temperatura), dentro de una jaula de acrílico (40 cm x 40 cm) a las moscas adultas se les proporcionó agua y azúcar constantemente para su alimentación y fueron mantenidas a temperatura ambiente de 20.2 °C. Para la ovoposición se colocaron dentro de las jaulas una porción de hígado de res (50 gr), una vez obtenido los huevos fueron colocados en vasos transparentes con capacidad de 1 litro con aserrín, una vez eclosionado los huevos, a las larvas se les

agregó 150 gr de hígado de res que sirvió como alimento para sus etapas larvales hasta llegar al estadio de pupa y posteriormente a adulto.

#### **7.4 Obtención de exudados de larvas**

Se realizaron ensayos para la obtención de los exudados (Fig. 3 y 4) utilizando diferentes cantidades de larvas de *L. sericata* (400 y 1,000) de segundo y tercer estadio para determinar el número adecuado de larvas en relación a la cantidad de exudados generados.

Las larvas fueron enjuagadas con diferentes soluciones, de acuerdo con lo descrito por Cruz-Saavedra *et al.*, (2016) primero con hipoclorito de sodio al 0.5% seguido de formaldehído al 5% y dos últimos enjuagues con solución de agua salina, una vez secas se utilizaron diferentes métodos para la obtención de los exudados (Bexfield *et al.*, 2004; Arora *et al.*, 2010; Cruz-Saavedra *et al.*, 2016) con ligeras modificaciones (Fig. 5), las larvas fueron colocadas dentro de un tubo de colección de 50 ml de capacidad, posteriormente se añadió agua estéril (200  $\mu$ l/ 25 larvas) e incubadas dentro de una estufa (Riossa) durante 1 hora y media a 37 °C en oscuridad, con la finalidad de inducir estrés y producir exudados (Fig. 2), posteriormente las larvas fueron retiradas del tubo, el líquido fue extraído con la ayuda de una jeringa estéril, distribuido en tubos eppendorf y centrifugados (Centrífuga refrigerada velocity 14 R) a 13,000 g a 4 °C durante 10 minutos para remover las partículas de materia contaminantes que pudieran estar presentes en el líquido, se tomó únicamente el sobrenadante sin remover la pastilla formada en el fondo y esterilizada con la ayuda de un filtro (FILTROPUR S 0.2  $\mu$ m, MBS/PES) y posteriormente distribuido en tubos de colección de 1.5 ml estériles, los cuales fueron mantenidos a -70° C hasta su utilización.



**Figura 2.** Incubación de las larvas.



**Figura 3.** S/E de 400 larvas de mosca *L. sericata*.



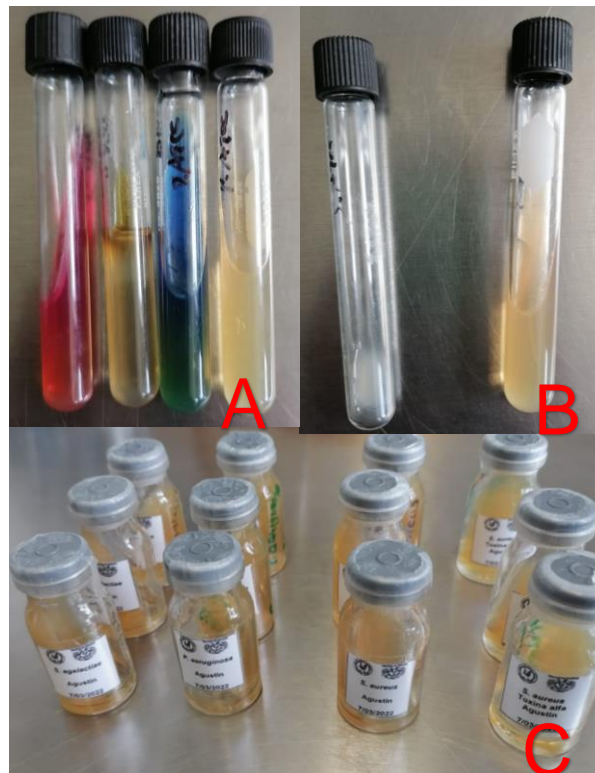
**Figura 4.** S/E de 1,000 larvas de mosca *L. sericata*.

- 1 1000 larvas de *L. sericata* (segundo y tercer estadio) en frascos de plástico transparente alimentadas previamente 150 g de hígado .
- 2 Se colocaron en un colador de plástico y se realizaron enjuagues abundantes con agua destilada para remover los restos de hígado y aserrín.
- 3 Las larvas se colocaron dentro de un vaso de precipitado con 45.9 ml de agua destilada y 4.1 ml de hipoclorito, con algunos ligeros movimientos por 10 minutos.
- 4 Las larvas se drenan con el colador y se colocan en un vaso de precipitado con 43.3 ml de agua destilada y 6.7 ml de formaldehído, con algunos ligeros movimientos por 10 minutos.
- 5 Las larvas se drenan con el colador y se colocan en un vaso de precipitado con 50 ml de solución salina estéril (0.9%), con algunos ligeros movimientos por 10 minutos, en zona de esterilidad.
- 6 Repetimos paso 5 (estos pasos con la finalidad de eliminar restos del hipoclorito y formaldehído).
- 7 Las larvas se drenan con el colador, y se coloca una toalla de papel para absorber el excedente de agua.
- 8 Las larvas se colocan en un tubo de colección de 50 ml con 8 ml de agua estéril, realizando perforaciones en la tapa y colocando una tela de organza para evitar la salida de las larvas.
- 9 El tubo junto con las larvas se incuban en una estufa a 37 ° C por una hora.
- 10 Unas vez terminada la incubación, en zona de esterilidad se retiran algunas larvas, con la ayuda de una jeringa se toman las S/E y se dispensan en tubos de colecta de 1.5 ml.
- 11 Las S/E colectadas se centrifugan a 13,000 rpm, 4°C por 10 minutos.
- 12 En zona de esterilidad y con la ayuda de una jeringa se obtiene el sobrenadante sin remover la pastilla, y se esteriliza por filtración (0.22 µm).
- 13 Se dispensan en tubos de colección de 1.5 ml y se conservan a -70°C hasta su utilización.

**Figura 5.** Pasos detallados de la metodología utilizada para la obtención de los exudados de larvas de mosca *L. sericata* y *L. cuprina*

## 7.5 Identificación de bacterias

Para la identificación las bacterias de referencia fueron aisladas en medios selectivos y diferenciales, se realizaron descripciones de las formas vegetativas y pruebas bioquímicas (Fig. 6 A,B) de acuerdo con el manual de MacFaddin, (2003) para cada una de las especies, *S. aureus* (cocos, gram +, agrupado en racimos, urea + y coagulasa +), *P. aeruginosa* ( bacilos gram –, catalasa +, oxidasa -, citrato +, H<sub>2</sub>S -, Indol – Movilidad +, TSI alcalino/alcalino), *E. coli* (Bacilos gram -, oxidasa -, citrato -, gas + H<sub>2</sub>S -, Indol +, lactosa + urea -) y *S. pyogenes* ( cocos gram + agrupados en cadena, resistente a sulfametaxazol, sensible a bacitracina, KOH –, peróxido de hidrógeno –, Sorbitol –, threalosa +, lactosa +) posteriormente cada una de las especies se conservaron en gelosa especial (Fig. 6 C) y resembradas en agar sangre al momento de su utilización en la prueba de sensibilidad.



**Figura 6. A Y B:** Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias. **C:** Conservación de las cepas bacterianas previamente identificadas.

## 7.6 Concentración de proteínas

La concentración de proteínas de los exudados de cada una de las especies se determinó mediante el método de Bradford (1976), se realizaron curvas de calibración de albumina de suero bovino (Kit II, número de catálogo 500-0002) con rangos de concentración de 8 µg/ml a 80 µg/ml, de igual manera se realizaron diluciones (1/10, 1/20, 1/40, 1/80 y 1/160) con agua estéril de los exudados, posteriormente se colocaron 160 µl de cada dilución en placas de 96 pocillos y 40 µl de reactivo de Bradfor (Bio-Rad Protein Assay), con una lectura a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro (epoch biotek).

## 7.7 Prueba de sensibilidad

Se utilizaron dos técnicas para observar actividad inhibitoria de los exudados de *L. sericata*, la primera consistió en la impregnación de discos de papel filtro previamente esterilizados de 8 mm de diámetro, colocando 40 µl de los exudados sin diluir y con diferentes diluciones (1/10, 1/100, 1/1,000, 1/10,000, 1/100,000, 1/1,000,000), la segunda técnica consistió en la perforación de pequeños pozos en el agar con la ayuda de un sacabocados estéril y la colocación de los exudados directamente en ellos.

La sensibilidad antimicrobiana se determinó mediante el método de Kirby Bauer, tomando muestras de las cepas bacterianas e inoculando por separado cada una en tubos de ensayo con caldo triptona soja (Oxoid), ajustado a 0.5 en la escala de McFarland para controlar la concentración bacteriana del inóculo, con la ayuda de un isopo estéril se tomó una muestra y se realizó un sembrando en forma de césped sobre las placas de agar Mueller Hinton (Dibico, México) y agar Infusión Cerebro Corazón (Dibico, México).

Los discos impregnados con los exudados y las diferentes diluciones fueron colocados sobre las placas inoculadas con las bacterias, para la segunda técnica una vez sembrada las bacterias se realizaron perforaciones de 8 mm de diámetro sobre las placas de agar con la ayuda de un sacabocados en condiciones estériles

y colocando 50 µl y 100 µl dentro de los pozos para cada placa, una vez absorbida las S/E las placas fueron colocadas dentro de una estufa (Riossa) a 37 °C, durante 24 horas y posteriormente fueron tomadas las medidas de los halos generados en las diferentes placas. Todo se realizó con cuatro repeticiones y como control se utilizaron muestras de los enjuagues de las larvas para descartar la posibilidad de que la actividad bacteriana estuviera influenciada por restos de hipoclorito y formaldehído.

### **7.8 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)**

La electroforesis en gel de poliacrilamida se realizó por el método de Laemmli (Laemmli and Favre, 1973) usando un gel de gradiente 15% con 10 pozos, colocando 6.24 µg de proteínas de los exudados de *L. sericata*, *L. cuprina* y dos primeros enjuagues antes de obtener los exudados, con un marcador de peso molecular (MPM= Estándar de proteínas preteñidas PageRuler™ Plus, de 10 a 250 kDa), los geles se corrieron dentro de una cámara de electroforesis a 100 volts hasta pasar el gel revelador y posteriormente se corrió a 150 volts por 60 minutos. Posteriormente el gel se colocó toda la noche en un recipiente con azul de coomassie y para desteñir el excedente se utilizó una solución desteñidora, posteriormente el gel fue fotografiado con un fotodocumentador (BIO-RAD ChemiDoc XRS+) y analizado con el software Image Lab de BIO-RAD.

### **7.9 Transferencia de proteínas Western Blot (WB)**

Una vez identificadas las bandas proteicas de los exudados de las larvas se volvieron a preparar geles de poliacrilamida con el fin de transferir las bandas de proteínas a una membrana de transferencia de nitrocelulosa (Amersham™ Protran™ 0.45 µm NC) con la técnica Western Blot, colocando los geles entre membranas porosas realizando un sándwich el cual fue colocado en una cámara de electroforesis y corrido a 18 volts por 16 horas, una vez terminada, las membranas de nitrocelulosa para verificar que las proteínas hayan sido transferidas.

### 7.10 Prueba de sensibilidad con proteínas transferidas

Una vez concluida la transferencia de proteínas a la membrana de nitrocelulosa se recortaron en tiras cada una de las filas de proteínas de las muestras de exudados con la ayuda de un bisturí estéril, una vez recortadas se utilizó el método de Kirby Bauer para evaluar la sensibilidad contra las bacterias, con la ayuda de pinzas estériles se colocaron las tiras con las diferentes bandas de proteínas transferidas sobre placas de agar previamente inoculadas con bacterias (Fig. 7), se colocaron un total de 10 tiras de proteínas con diferentes fracciones proteicas de *L. sericata* contra 10 bacterias (*S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 23922, *S. pyogenes* ATCC 19615, *S. agalactiae*, *K. aerogenes*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *P. mirabilis*\* y *E. coli*), 4 tiras de proteínas con diferentes fracciones proteicas de *L. cuprina* contra 4 bacterias (*S. pyogenes* ATCC 19615, *P. mirabilis*\* *Kb. aerogenes* y *S. aureus*), las placas fueron colocadas dentro de una estufa (Riossa) a 37 °C, durante 24 horas. Se asoció como actividad inhibitoria de las proteínas cuando no se presentó crecimiento debajo de las tiras colocadas y sin actividad inhibitoria cuando se presentó crecimiento debajo de las tiras.



**Figura 7.** Tiras con fracciones de proteínas sobre placas de agar con bacterias.



### **7.11 Análisis de datos**

Los datos colectados fueron los halos inhibitorios que generaron los exudados de las larvas contra las bacterias de referencia, con cuatro repeticiones, una vez recabado los datos se realizaron estadísticas descriptivas y evaluaciones de las variables para la identificación de la distribución de los datos y determinar mediante esta la utilización de la prueba a utilizar, los datos mostraron una distribución no normal y se utilizaron pruebas no paramétricas para el análisis de los datos, la prueba de la mediana y la prueba de Dunn.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Exudados de las larvas y concentración de proteínas.

Los primeros ensayos que se realizaron para la obtención de los exudados de las larvas se utilizaron 400 y 1,000 larvas de segundo y tercer estadio, de las cuales se generó un total de 2.2 ml y 9 ml respectivamente, se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford (1976) para los exudados obtenidos, los cuales presentaron 849.25 µg/ml de proteína utilizando 400 larvas y 545 µg/ml de proteína utilizando 1,000 larvas.

Posteriormente y de acuerdo con los resultados de los primeros ensayos se optó por la utilización de 1,000 larvas debido a la cantidad de exudados obtenidos, de igual manera se optó por el aumento en el tiempo y número de enjuagues debido a la coloración presente en los exudados con 400 larvas y que se asoció a restos de hígado que se utilizó para su alimentación los cuales podrían estar adheridos a su cuerpo. Para verificar que la actividad inhibitoria que se pudiera presentar al momento de realizar la sensibilidad fuera por los exudados y no por restos del formaldehído e hipoclorito de sodio que pudieran estar presente en los lavados, en el cuerpo de las larvas y en los exudados generando la actividad inhibitoria se optó por utilizar muestras de los lavados realizando ensayos de sensibilidad contra las bacterias.

**Cuadro 1.** Características generales de los diferentes lotes de exudados de larvas de segundo y tercer estadio de larvas *L. sericata*.

Características	L 1*	L 2*	L 3**	L 4***	L 5****
Coloración	Trasparente	Transparente	Verde	Verde	Verde
Viscosidad	+	+	-	-	-
Proteínas µg/ml	545	1148	854.56	442.33	825.55

L=Lote. \* Lavados con hipoclorito de sodio (0.5 %), formaldehído (5%) y dos con solución salina. \*\* Lavados con solución salina. \*\*\* Lavados con hipoclorito de sodio (0.5%) y tres con solución salina. \*\*\*\*Lavados con formaldehído (5%) y tres con solución salina.

**Cuadro 2.** Características generales de los diferentes lotes de exudados de larvas de segundo y tercer estadio de larvas *L. cuprina*.

Características	L 1*	L 2*	L 3**	L 4***	L 5****
Coloración	Trasparente	Transparente	Transparente	Verde	Transparente
Viscosidad	+	+	-	-	-
Proteínas µg/ml	446.7	427.7	590.5	768.53	424.44

L=Lote. \* Lavados con hipoclorito de sodio (0.5 %), formaldehído (5%) y dos con solución salina. \*\* Lavados con solución salina. \*\*\* Lavados con hipoclorito de sodio (0.5%) y tres con solución salina. \*\*\*\*Lavados con formaldehído (5%) y tres con solución salina.

**Cuadro 3.** Sensibilidad de enjuagues.

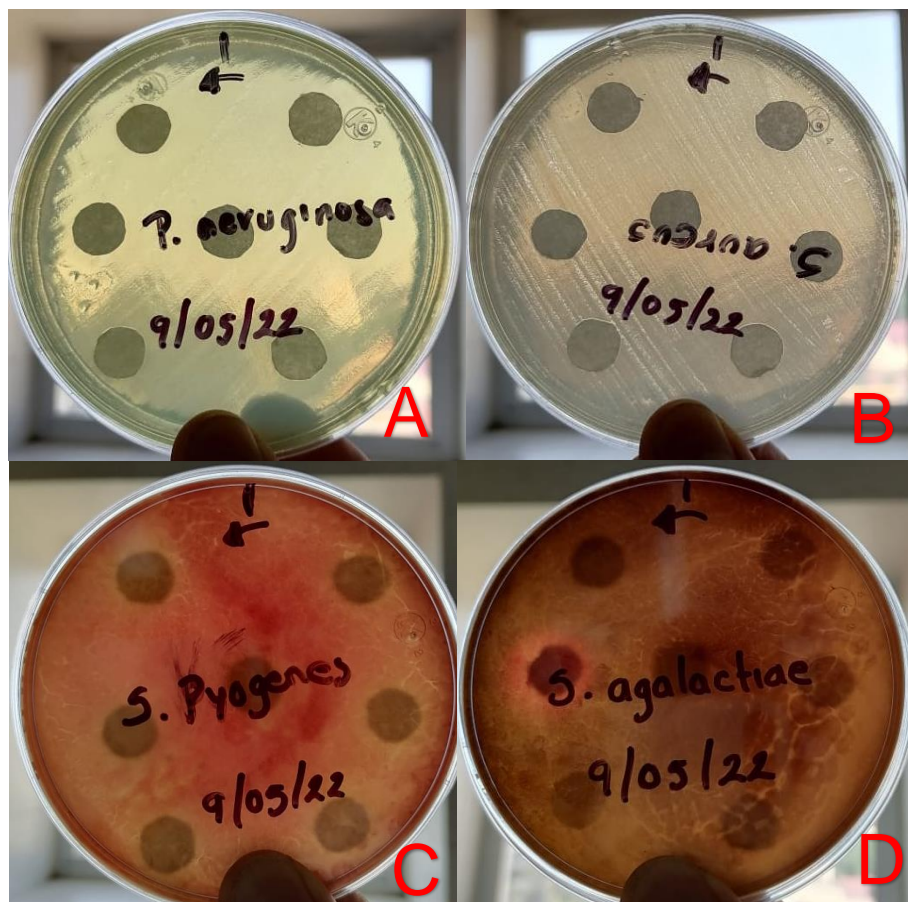
Enjuague	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615
1	26.75	24.25	32.5	26
2	12.75	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0

Resultados expresados en milímetros de los diferentes enjuagues realizados previo a la obtención de las S/E de las larvas de moscas.

Se obtuvieron un total de 5 lotes de exudados de ambas especies (Cuadro 1 y 2), con diferentes características y concentraciones de proteínas con rangos de 442.33 a 854.56 y 424.44 a 768.53 µg/ml para las S/E de larvas de *L. sericata* y *L. cuprina* respectivamente. De acuerdo con los resultados de la sensibilidad con los enjuagues (Cuadro 3) contra las bacterias ATCC se observó que los restos de formaldehído y de hipoclorito de sodio se presentan en los enjuagues previos a la obtención de los exudados, sin embargo, estos solo se presentan en el primer y segundo lavado para *E. coli*, y para el resto de las bacterias únicamente en el primer lavado lo cual sugiere que a partir del segundo lavado ya no se presentan restos de los solventes que pudieran generar un falso positivo al momento de utilizar los exudados de las larvas.

## 8.2 Prueba de sensibilidad

Para la prueba de sensibilidad de los exudados se realizó un primer ensayo utilizando discos de papel filtro previamente esterilizados e impregnados con 40  $\mu$ l de los exudados de las larvas y diferentes diluciones contra las bacterias *P. aeruginosa* ATTC 27853, *S. aureus* ATCC 29213, *S. pyogenes* ATCC 19615 y *S. agalactiae* (Fig. 8), los cuales no presentaron halos con actividad inhibitoria en ninguna de los discos, sin embargo, se observó un tipo de hemolisis alrededor de los discos de algunas placas, lo cual se relacionó con la posibilidad de existir actividad inhibitoria, ante esto y debido a que los discos de papel filtro absorbían poca cantidad de los exudados se optó por la opción de realizar perforaciones en el agar y colocar mayor cantidad de los exudados.



**Figura 8.** Antibiograma con exudados impregnado en discos de papel filtro contra bacterias. **A:** *P. aeruginosa*. **B:** *S. aureus*. **C:** *S. pyogenes*. **D:** *S. agalactiae*.

A diferencia de los discos impregnados con los exudados, la perforación del agar y los exudados colocados directamente con cantidades de 50 y 100 µl presentaron halos con actividad inhibitoria (Cuadro 4 y 5), sin embargo, de los cinco lotes de exudados obtenidas de cada especie de larva únicamente presentaron actividad inhibitoria dos lotes, los cuales presentaban características físicas como una coloración transparente y con viscosidad, a diferencia de los lotes restantes que presentaron una coloración verde-oscuro y sin viscosidad las cuales no presentaron actividad inhibitoria contra ninguna de las cepas utilizadas.

Los exudados de *L. sericata* presentaron halos con actividad inhibitoria para 50 y 100 µl de exudados con 27.265 y 54.531 µg/ml de proteínas respectivamente para el lote 1 (Cuadro 4), 57.42 y 114.841 µg/ml de proteínas para el lote 2 (Cuadro 5), los halos presentes en las placas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Fig. 9-D) y *S. pyogenes* ATCC 19615 (Fig. 9-C) se observaron limpios sin crecimiento bacteriano lo cual sugiere una actividad bactericida, a diferencia de la placa de *S. aureus* ATCC 29213 (Fig. 9-E) y *E. coli* ATCC 23922 (Fig. 9-A) el cual se observaron halos inhibitorios pero con crecimiento bacteriano dentro de ellos lo que sugiere una actividad bacteriostática generada por los exudados.

Con respecto a los exudados de *L. cuprina* de igual manera el lote 1 presentó halos para 50 y 100 µl de exudados con 22.33 y 44.67 µg/ml de proteínas respectivamente (Cuadro 4), 21.38 y 42.77 µg/ml de proteínas para el lote 2 (Cuadro 5), sin embargo, los halos se presentaron únicamente en las placas de *S. pyogenes* ATCC 19615, sin crecimiento bacteriano dentro de ellos sugiriendo una actividad bactericida, sin embargo, no produjeron halos de inhibición para las placas de *E. coli* ATCC 23922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 29213.

**Cuadro 4.** Actividad inhibitoria de los exudados de *L. sericata* y *L. cuprina* contra bacterias de referencia

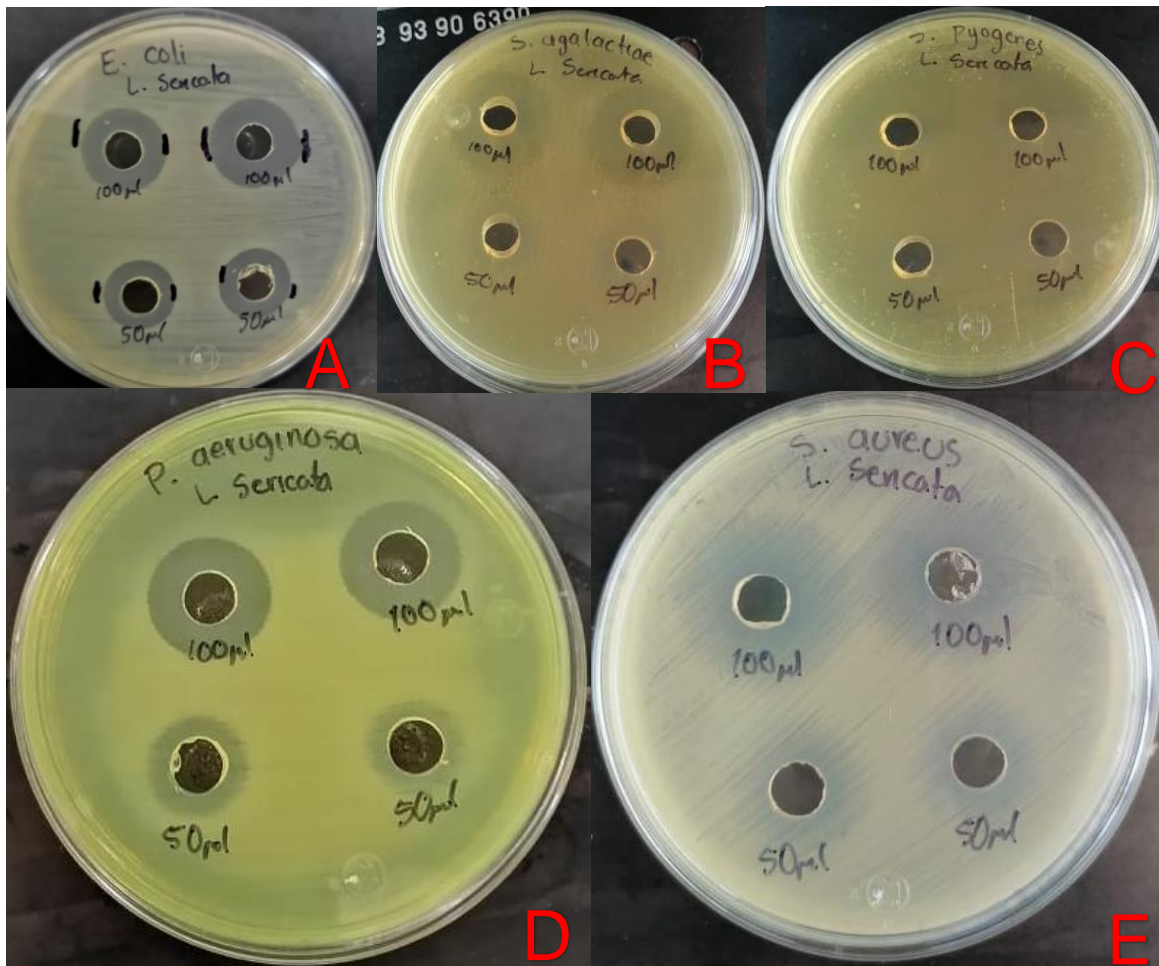
Larvas	Bacteria	Halos *	Halos **
<i>L. sericata</i>	<i>S. aureus</i> ATCC29213	23	16.5
<i>L. sericata</i>	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	18.5	13.5
<i>L. sericata</i>	<i>E. coli</i> ATCC 23922	19	16.5
<i>L. sericata</i>	<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	30.5	21.5
<i>L. sericata</i>	<i>S. agalactiae</i>	23.2	14.7
<i>L. cuprina</i>	<i>S. aureus</i> ATCC29213	0	0
<i>L. cuprina</i>	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0
<i>L. cuprina</i>	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	0
<i>L. cuprina</i>	<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	14.7	11.8
<i>L. cuprina</i>	<i>S. agalactiae</i>	0	0

Promedio de 4 ensayos utilizando 50 (\*\*) y 100 (\*) µl de exudados de larvas de mosca *L. sericata* y *L. cuprina* del lote 1. Halos inhibitorios expresados en milímetros.

**Cuadro 5.** Actividad inhibitoria de los exudados de *L. sericata* y *L. cuprina* contra bacterias de referencia

Larva	Bacteria	Halos *	Halos **
<i>L. sericata</i>	<i>S. aureus</i> ATCC29213	16	14
<i>L. sericata</i>	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	14	11.5
<i>L. sericata</i>	<i>E. coli</i> ATCC 25922	15.7	13.2
<i>L. sericata</i>	<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	16.5	14.5
<i>L. sericata</i>	<i>S. agalactia</i>	20.5	14
<i>L. cuprina</i>	<i>S. aureus</i> ATCC29213	0	0
<i>L. cuprina</i>	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0
<i>L. cuprina</i>	<i>E. coli</i> ATCC 23922	0	0
<i>L. cuprina</i>	<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	15	12.3
<i>L. cuprina</i>	<i>S. agalactiae</i>	0	0

Promedio de 4 ensayos utilizando 50 (\*\*) y 100 (\*) µl de exudados de larvas de mosca *L. sericata* y *L. cuprina* del lote 2. Halos inhibitorios expresados en milímetros.



**Figura 9.** Halos generados por los exudados de *L. sericata* contra bacterias presentes en heridas. **A.** *E. coli* ATCC 25922. **B.** *S. agalactiae*. **C.** *S. pyogenes* ATTC 19615. **D.** *P. aeruginosa* ATCC 27853. **E.** *S. aureus* ATCC 29213.

Al concluir con los ensayos de sensibilidad con las cepas bacterianas ATCC se obtuvieron 10 cepas bacterianas aislados de pacientes (*P. aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *S. aureus*, 2 cepas de *Proteus mirabilis* y *Citrobacter freundii*) con resistencia a diferentes antimicrobianos (Cuadro 8) (Fig. 10) a los cuales de igual manera se les realizaron las pruebas de identificación correspondientes y sensibilidad con los lotes de los exudados que previamente habían presentado actividad inhibitoria contra las cepas bacterianas ATCC, para estos ensayos únicamente se utilizaron concentraciones de 100 µl de S/E debido a que no se contaba con la cantidad suficiente y debido a la poca diferencia que existen en relación del tamaño de los

halos inhibitorios generados con 50 µl en los ensayos previos con las cepas de referencia.

**Cuadro 6.** Actividad inhibitoria de exudados de *L. sericata* contra bacterias aisladas y resistencia a antimicrobianos

Larvas	Bacteria	Halos inhibitorios contra exudados	Halos inhibitorios contra antibióticos
<i>L. sericata</i>	<i>P. aeruginosa</i>	16.5	25
<i>L. sericata</i>	<i>K. oxytoca</i>	25	0
<i>L. sericata</i>	<i>K. aerogenes</i>	25	0
<i>L. sericata</i>	<i>K. pneumoniae</i>	25	0
<i>L. sericata</i>	<i>E. faecalis</i>	15.75	17
<i>L. sericata</i>	<i>E. coli</i>	18	0
<i>L. sericata</i>	<i>S. aureus</i>	21	0
<i>L. sericata</i>	<i>P. mirabillis</i>	29	13
<i>L. sericata</i>	<i>P. mirabillis</i> *	27.5	13
<i>L. sericata</i>	<i>C. freundii</i>	26.5	0

Ensayo utilizando 100 µl de exudados de larvas de mosca *L. sericata*. Halos inhibitorios expresados en milímetros. Antibióticos utilizados contra las bacterias: *P. aeruginosa*/Ciprofloxacina, *K. oxytoca*, *K. aerogenes* y *K. pneumoniae*/Piperacilina-Tazobactam, *E. faecalis*/Ampicilina, *E. coli*/Nitrofurantoin, *S. aureus*/Gentamicina, *P. mirabillis* y *P. mirabillis*\*/Tetraciclina y *C. freundii*/Ciprofloxacina.

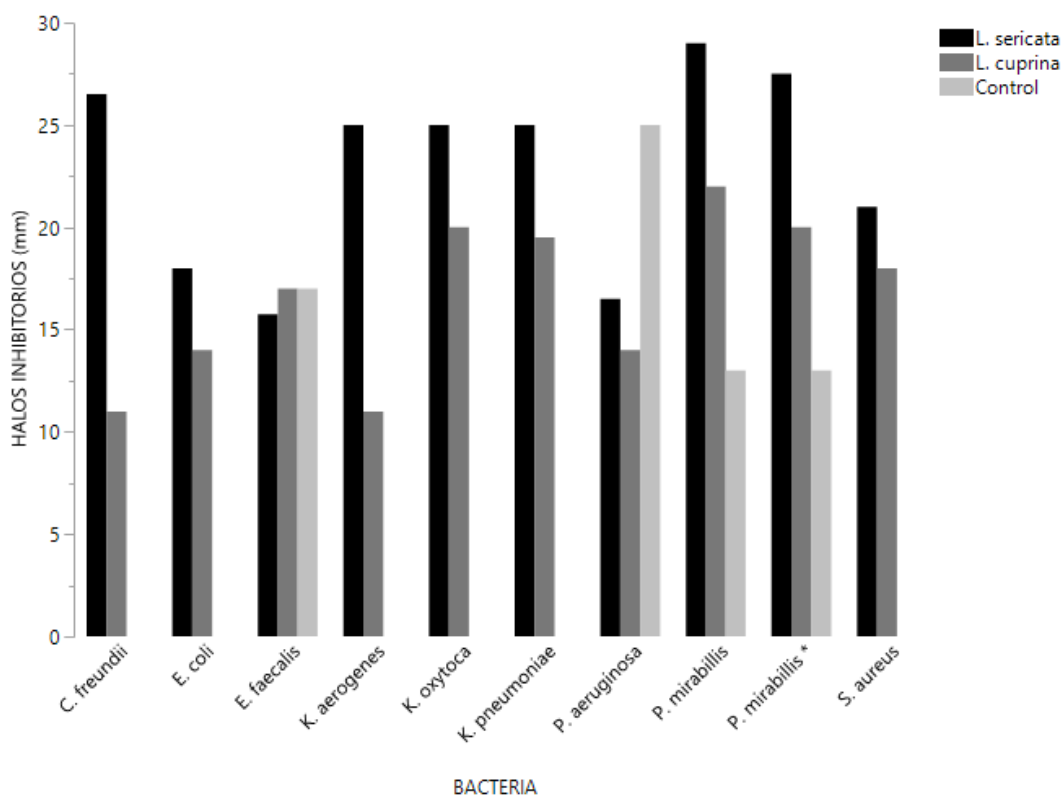
**Cuadro 7.** Actividad inhibitoria de exudados de *L. cuprina* contra bacterias aisladas y resistencia a antimicrobianos.

Larvas	Bacteria	Halos inhibitorios contra exudados	Halos inhibitorios contra antibióticos
<i>L. cuprina</i>	<i>P. aeruginosa</i>	14	25
<i>L. cuprina</i>	<i>K. oxytoca</i>	20	0
<i>L. cuprina</i>	<i>K. aerogenes</i>	11	0
<i>L. cuprina</i>	<i>K. pneumoniae</i>	19.5	0
<i>L. cuprina</i>	<i>E. faecalis</i>	17	17
<i>L. cuprina</i>	<i>E. coli</i>	14	0
<i>L. cuprina</i>	<i>S. aureus</i>	18	0
<i>L. cuprina</i>	<i>P. mirabillis</i>	22	13
<i>L. cuprina</i>	<i>P. mirabillis</i> *	20	13
<i>L. cuprina</i>	<i>C. freundii</i>	11	0

Ensayo utilizando 100 µl de exudados de larvas de mosca *L. cuprina*. Halos inhibitorios expresados en milímetros. Antibióticos utilizados contra las bacterias: *P. aeruginosa*/Ciprofloxacina, *K. oxytoca*, *K. aerogenes* y *K. pneumoniae*/Piperacilina-Tazobactam, *E. faecalis*/Ampicilina, *E. coli*/Nitrofurantoin, *S. aureus*/Gentamicina, *P. mirabillis* y *P. mirabillis*\*/Tetraciclina y *C. freundii*/Ciprofloxacina. Los halos reportados en 0 hace referencia a las bacterias presentaron resistencia.



Los exudados de *L. sericata* presentaron halos inhibitorios contra todas las bacterias aisladas (Cuadro 6) (Figura 11), sin embargo, presentaron crecimiento dentro de ellos, por lo que existe una actividad bacteriostática por parte de los exudados a excepción de los halos de las cepas de *P. aeruginosa* los cuales no presentaron crecimiento bacteriano y se considera como una actividad bactericida, de igual manera en los halos presentes por los exudados de *L. cuprina* (Cuadro 7) (Fig. 12), aunque en este caso los halos presentes en las placas de *P. aeruginosa* presentaron crecimiento bacteriano con una actividad bacteriostática, los exudados de *L. cuprina* presentaron actividad inhibitoria contra todas las bacterias.

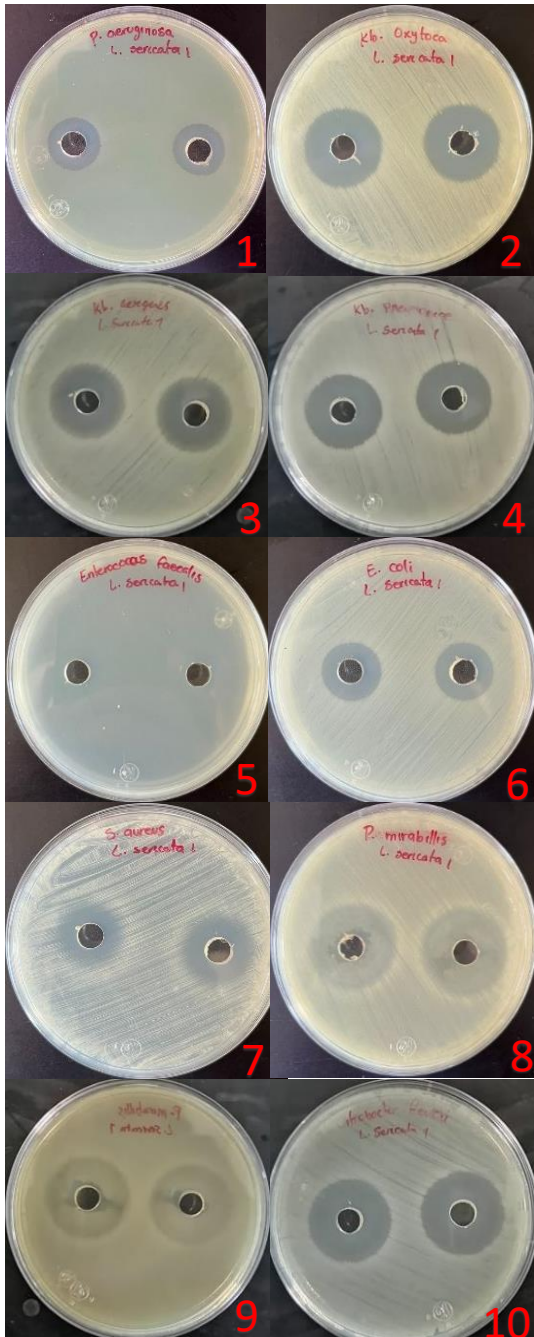


**Figura 10.** Halos inhibitorios de exudados de larvas y antibióticos contra bacterias aisladas. Control=Antibiótico. *C. freundii*-Ciprofloxacina, *E. coli*-Nitrofurantoin, *E. faecalis*-Ampicillin, *K. aerogenes*, *K. oxytoca* y *K. pneumoniae*-Piperacillin/Tazobactam, *P. aeruginosa*-Ciprofloxacina, *P. mirabilis* y *P. mirabilis*\*-Tetracycline y *S. aureus*-Gentamicin.

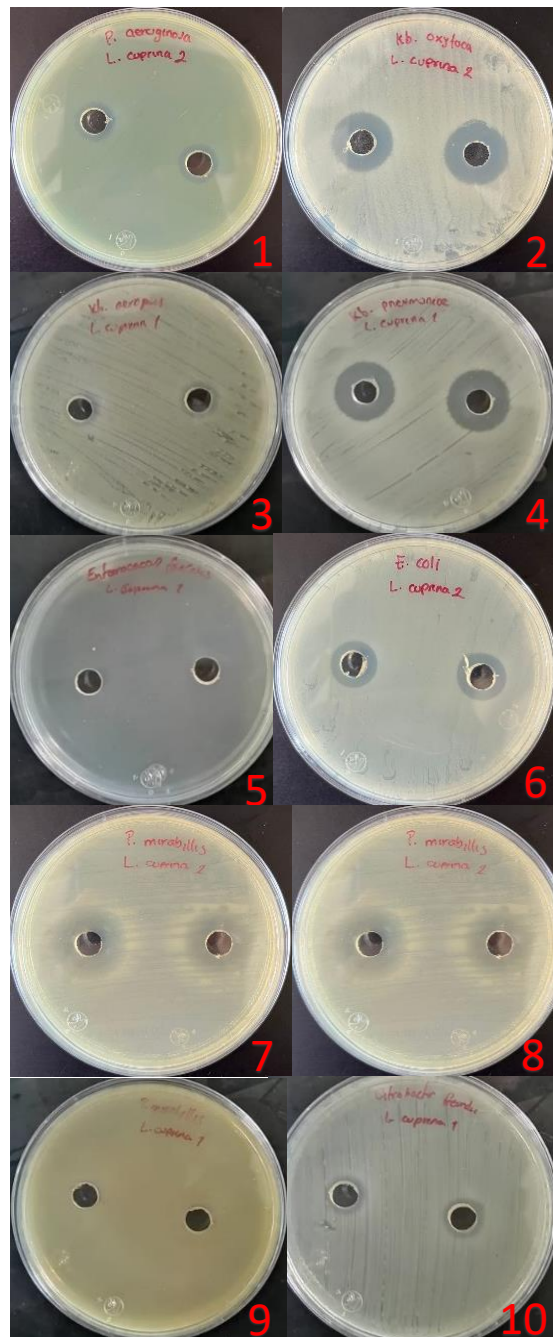
**Cuadro 8.** Perfil de resistencia a antimicrobianos de bacterias aisladas

ANTIBIOTICO / BACTERIA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AMPICILLIN	N/A	R	I	I	S	R	R	R	S	I
PIPERACILLIN	N/A	R	R	R	S	S	I	S*	S	R
MECILLANAM	N/A	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AMOXAXILLIN/ACID										
CLAVULANIC	N/A	R	I	S	S	R	R	R	S	I
PIPERACILLIN/TAZOBACTAM	R	R	R	R	S	S	I	S*	S	R
CEPHAZOLIN	N/A	R	I	R	I	I	S	R	R	I
CEPHALOTHIN	N/A	R	I	R	I	S	S	R	R	I
CEFAMANDOLE	N/A	R	R	S	I	S	S	R	R	R
CEFEPIME	R	R	R	S	I	S	R	S	R	R
CEFOPERAZONE	N/A	R	S	S	I	S	R	S	S	R
CEFOXITIN	N/A	S	I	R	I	R	S	S	R	I
CEFTRIAZONE	N/A	I	R	R	I	S	S	S*	R	R
CEFTAZIDIME	N/A	S*	R	R	I	S	R	S	R	R
CEFUROXIME	N/A	R	R	R	I	R	S	S*	R	I
MEROPENEM	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R
NITROFORANTOIN	N/A	S	R	R	S	R	S	R	I	R
AZTREONAM	R	R	S	S	NA	S	R	S	R	R
GENTAMICIN	R	S	S	S	I	S	R	S	S	S
AMIKACIN	S	S	R	S	I	S	I	S	R	S
KANAMYCIN	N/A	S	R	R	I	S	R	S	R	R
TOBRAMICIN	S	S	R	S	I	S	R	S	S	S
STREPTOMYCIN	N/A	S	R	R	I	R	S	S	R	R
TETRACICLINE	N/A	S	R	S	R	S	S	R	I	S
CIPROFLOXACIN	S	S	S	R	R	S	S	I	S	R
NORFLOXACIN	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
ACID NALIDIXICO	N/A	S	R	R	R	S	R	R	R	R
SULPHONAM/TRIME	N/A	S	S	R	I	S	S	S	R	R
SULPHONAMIDES	N/A	R	R	R	I	R	S	S*	R	R
TRIMETHOPRIM	N/A	S	R	S	I	S	R	S*	R	R
CHLORAMPHENICOL	N/A	S	S	R	R	S	S	R	R	R
FOSFOMYCIN	N/A	S	R	R	S	R	S*	R	R	R
FOSFOMYCIN/TROMETANOL	N/A	S	R	R	S	R	S*	R	R	R
OFLOXACINO	N/A		S	S	R	N/A	N/A	N/A	S	R
<b>TOTAL RESISTENCIAS</b>	<b>5</b>	<b>13</b>	<b>21</b>	<b>20</b>	<b>7</b>	<b>10</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>21</b>	<b>22</b>

1 P. aeruginosa. 2 K. Oxytoca. 3 K. aerogenes. 4 K. pneumoniae. 5 E. faecalis. 6 E. coli. 7 S. aureus. 8 P. mirabilis. 9 P. mirabilis\*. 10 C. freundii. R resistente. S susceptible. S\* susceptible con clones resistentes. I intermedio. N/A no aplica.



**Figura 11.** Halos con actividad inhibitoria de las S/E de *L. sericata*. 1 *P. aeruginosa*. 2 *K. oxytoca*. 3 *K. aerogenes*. 4 *K. Pneumoniae*. 5 *E. faecalis*. 6 *E. coli*. 7 *S. aureus*. 8 *P. mirabillis*. 9 *P. mirabillis* \*. 10 *C. freundii*.



**Figura 12.** Halos con actividad inhibitoria de los exudados de *L. cuprina*. 1 *P. aeruginosa*. 2 *K. oxytoca*. 3 *K. aerogenes*. 4 *K. Pneumoniae*. 5 *E. faecalis*. 6 *E. coli*. 7 *S. aureus*. 8 *P. mirabillis*. 9 *P. mirabillis* \*. 10 *C. freundii*.

### 8.3 Análisis de los datos (Exudados de *L. sericata*)

**Cuadro 9.** Prueba de un factor, aproximación de  $X^2$  (*L. sericata* 50  $\mu$ L)

$X^2$	Grados de libertad	Prob > $X^2$
13.8182	4	0.0079

**Cuadro 10.** Comparaciones no paramétricas para todos los pares (*L. sericata* 50  $\mu$ L)

Bacteria	Bacteria	Z	Valor p
S. pyogenes ATCC 19615	P. aeruginosa ATCC 27853	3.59273	0.0033
S. pyogenes ATCC 19615	S. agalactiae	2.86200	0.0421
S.aureus ATCC 29213	P. aeruginosa ATCC 27853	2.00949	0.4449
S. pyogenes ATCC 19615	E. coli ATCC 25922	1.52234	1.0000
S.aureus ATCC 29213	S. agalactiae	1.27877	1.0000
S. agalactiae	P. aeruginosa ATCC 27853	0.66983	1.0000
S.aureus ATCC 29213	E. coli ATCC 25922	0.00000	1.0000
S. agalactiae	E. coli ATCC 25922	-1.27877	1.0000
S.aureus ATCC 29213	S. pyogenes ATCC 19615	-1.52234	1.0000
P. aeruginosa ATCC 27853	E. coli ATCC 25922	-2.00949	0.4449

Los datos obtenidos demostraron una distribución no normal, el análisis de la prueba de la mediana (Cuadro 9) calculó un valor de  $X^2 = 13.8182$  y un valor de  $p=0.0079$ , lo cual demuestra que existe diferencia estadísticamente significativa entre las bacterias en relación a la mediana de los halos de inhibición que presentaron, utilizando 50  $\mu$ L de exudados de larvas de mosca *L. sericata*.

Con base en los resultados obtenidos de la prueba de Dunn (Cuadro 10) se observó que existe diferencia estadísticamente significativa únicamente en dos de las diez combinaciones de bacterias relacionados con los halos inhibitorios generados por los exudados, la primer combinación (*S. pyogenes* ATCC 19615 y *P. aeruginosa* ATCC 27853) con un valor  $p= 0.0033$  y la segunda combinación (*S. pyogenes* ATCC

19615 y *S. agalactiae*) con un valor  $p=0.0421$ , entre el resto de combinaciones de bacterias no se detectaron diferencias estadísticamente significativas (valor  $p>0.4$ ).

**Cuadro 11.** Prueba de un factor, aproximación de  $X^2$  (*L. sericata* 100  $\mu$ L)

$X^2$	Grados de libertad	Prob > $X^2$
16.6250	4	0.0023

**Cuadro 12.** Comparaciones no paramétricas para todos los pares (*L. sericata* 100  $\mu$ L)

Bacteria	Bacteria	Z	Valor p
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	3.69438	0.0022
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	<i>E. coli</i> ATCC 25922	2.96762	0.0300
<i>S. agalactiae</i>	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	2.24085	0.2504
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	2.24085	0.2504
<i>S. agalactiae</i>	<i>E. coli</i> ATCC 25922	1.51409	1.0000
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. coli</i> ATCC 25922	1.51409	1.0000
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	<i>S. agalactiae</i>	1.39296	1.0000
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. agalactiae</i>	0.00000	1.0000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. coli</i> ATCC 25922	-0.66620	1.0000
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	-1.39296	1.0000

Los datos obtenidos demostraron una distribución no normal, el análisis de la prueba de la mediana (Cuadro 11) calculó un valor de  $X^2 = 16.6250$  y un valor de  $p=0.0023$ , lo cual demuestra que existe diferencia estadísticamente significativa entre las bacterias en relación a la mediana de los halos de inhibición que presentaron, utilizando 100  $\mu$ L exudados de larvas de mosca *L. sericata*.

Con base en los resultados obtenidos de la prueba de Dunn (Cuadro 12) calculó que existe diferencia estadísticamente significativa únicamente en dos de las diez combinaciones de bacterias relacionados con los halos inhibitorios generados por las secreciones, la primer combinación (*S. pyogenes* ATCC 19615 y *P. aeruginosa* ATCC 27853) con un valor  $p= 0.0022$  y la segunda combinación (*S. pyogenes* ATCC 19615 y *E. coli* ATCC 25922) con un valor  $p=0.0300$ , entre el resto de

combinaciones de bacterias no se detectaron diferencias estadísticamente significativas (valor  $p > 0.2$ ).

#### 8.4 Análisis de los datos (Exudados de *L. cuprina*)

**Cuadro 13.** Prueba de un factor, aproximación de  $X^2$  (*L. cuprina* 50  $\mu$ L)

$X^2$	Grados de libertad	Prob > $X^2$
19.0000	4	0.0008

**Cuadro 14.** Comparaciones no paramétricas para todos los pares (*L. cuprina* 50  $\mu$ L)

Bacteria	Bacteria	Z	Valor p
S. pyogenes ATCC 19615	E. coli ATCC 25922	3.33648	0.0085
S. pyogenes ATCC 19615	P. aeruginosa ATCC 27853	3.33648	0.0085
S. pyogenes ATCC 19615	S. agalactiae	3.33648	0.0085
P. aeruginosa ATCC 27853	E. coli ATCC 25922	0.00000	1.0000
S. agalactiae	E. coli ATCC 25922	0.00000	1.0000
S. agalactiae	P. aeruginosa ATCC 27853	0.00000	1.0000
S.aureus ATCC 29213	E. coli ATCC 25922	0.00000	1.0000
S.aureus ATCC 29213	P. aeruginosa ATCC 27853	0.00000	1.0000
S.aureus ATCC 29213	S. agalactiae	0.00000	1.0000
S.aureus ATCC 29213	S. pyogenes ATCC 19615	-3.33648	0.0085

Los datos obtenidos demostraron una distribución no normal, el análisis de la prueba de la mediana (Cuadro 13) calculó un valor de  $X^2 = 19$  y un valor de  $p = 0.0008$ , lo cual demuestra que existe diferencia estadísticamente significativa entre las bacterias en relación a la mediana de los halos de inhibición que presentaron, utilizando 50  $\mu$ L exudados de larvas de mosca *L. cuprina*.

Con base en los resultados obtenidos de la prueba de Dunn (Cuadro 14) demostró que existe diferencia estadísticamente significativa únicamente en cuatro de las diez combinaciones de bacterias relacionados con los halos inhibitorios generados por las secreciones, la primer combinación (*S. pyogenes* ATCC 19615 y *E. coli* ATCC

25922) con un valor  $p= 0.0085$ , la segunda combinación (*S. pyogenes* ATCC 19615 y *P. aeruginosa* ATCC 27853) con un valor  $p=0.0085$ , la tercera combinación (*S. pyogenes* ATCC 19615 y *S. agalactiae*) con un valor de  $p=0.0085$  y la última combinación (*S. aureus* ATCC 29213 y *S. pyogenes* ATCC 19615) con un valor de  $p=0.0085$ , entre el resto de combinaciones de bacterias no se detectaron diferencias estadísticamente significativas (valor  $p>1$ ).

**Cuadro 15.** Prueba de un factor, aproximación de  $X^2$  (*L. cuprina* 100  $\mu$ L)

$X^2$	Grados de libertad	Prob > $X^2$
19.0000	4	0.0008

**Cuadro 16.** Comparaciones no paramétricas para todos los pares (*L. cuprina* 100  $\mu$ L)

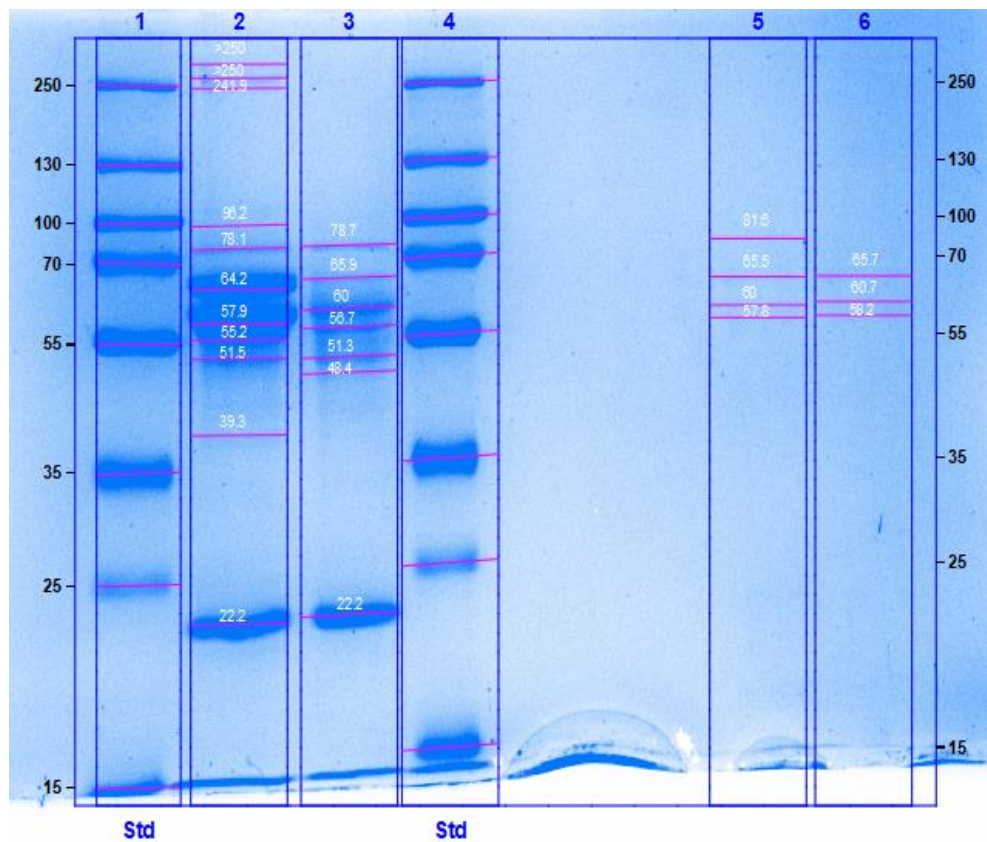
Bacteria	Bacteria	Z	Valor p
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	<i>E. coli</i> ATCC 25922	3.34422	0.0083
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	3.34422	0.0083
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	<i>S. agalactiae</i>	3.34422	0.0083
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.00000	1.0000
<i>S. agalactiae</i>	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.00000	1.0000
<i>S. agalactiae</i>	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0.00000	1.0000
<i>S.aureus</i> ATCC 29213	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.00000	1.0000
<i>S.aureus</i> ATCC 29213	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0.00000	1.0000
<i>S.aureus</i> ATCC 29213	<i>S. agalactiae</i>	0.00000	1.0000
<i>S.aureus</i> ATCC 29213	<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	-3.34422	0.0083

Los datos obtenidos demostraron una distribución no normal, el análisis de la prueba de la mediana (Cuadro 15) calculó un valor de  $X^2 = 19$  y un valor de  $p=0.0008$ , lo cual demuestra que existe diferencia estadísticamente significativa entre las bacterias en relación a la mediana de los halos de inhibición que presentaron, utilizando 100  $\mu$ L exudados de larvas de mosca *L. cuprina*.

Con base en los resultados obtenidos de la prueba de Dunn (Cuadro 16) demostró que existe diferencia estadísticamente significativa únicamente en cuatro de las diez

combinaciones de bacterias relacionados con los halos inhibitorios generados por las secreciones, la primer combinación (*S. pyogenes* ATCC 19615 y *E. coli* ATCC 25922) con un valor  $p=0.0083$ , la segunda combinación (*S. pyogenes* ATCC 19615 y *P. aeruginosa* ATCC 27853) con un valor  $p=0.0083$ , la tercera combinación (*S. pyogenes* ATCC 19615 y *S. agalactiae*) con un valor de  $p=0.0083$  y la última combinación (*S. aureus* ATCC 29213 y *S. pyogenes* ATCC 19615) con un valor de  $p=0.0083$ , entre el resto de combinaciones de bacterias no se detectaron diferencias estadísticamente significativas (valor  $p>1$ ).

### 8.5 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)



**Figura 13.** Electroforesis SDS-PAGE de las fracciones proteicas de los exudados (*L. sericata* y *L. cuprina*). Líneas: 1, Marcador de peso molecular; 2, exudados *L. sericata*; 3, exudados *L. cuprina*; 4, Marcador de peso molecular; 5, segundo enjuague con solución salina de las larvas *L. sericata*; 6, Segundo enjuague con solución salina de las larvas *L. cuprina*.



Con el propósito de caracterizar la composición proteica se realizó una electroforesis de proteínas con un marcador de peso molecular de 10 a 250 Kilodalton (kDa) (Fig. 20) utilizando muestras de los exudados de *L. sericata* y *L. cuprina* que presentaron actividad inhibitoria contra las diferentes cepas utilizadas, los resultados obtenidos mostraron la identificación de 11 fracciones proteicas con diferentes pesos moleculares de 22.2 a 241.9 kDa y bandas >250 kDa (Cuadro 17) en los exudados de *L. sericata*, respecto a los exudados de *L. cuprina* mostraron 7 fracciones proteicas con pesos de 22.2 a 78.7 kDa (Cuadro 18), sin embargo, se observan bandas que se presentan en ambas muestras compartiendo fracciones proteicas con pesos similares ( $22 \pm 1$ ,  $55 \pm 1$  Y  $78 \pm 1$  kDa).

Por otra parte de igual manera se colocaron muestras del segundo lavado en los cuales ya no existen restos de los solventes utilizados con la finalidad de identificar fracciones proteicas y determinar si las larvas comienzan a generar los exudados antes de la incubación, se logró identificar que a partir del segundo enjuague comienzan a presentarse algunas fracciones de proteínas con pesos de 57.8 a 81.6 kDa aunque en menores cantidades, sin embargo, con estos resultados podemos saber que las larvas comienzan a segregar estos compuestos a partir del segundo lavado.

**Cuadro 17.** Fracciones proteicas presentes en la electroforesis SDS-PAGE de los exudados de *L. sericata*

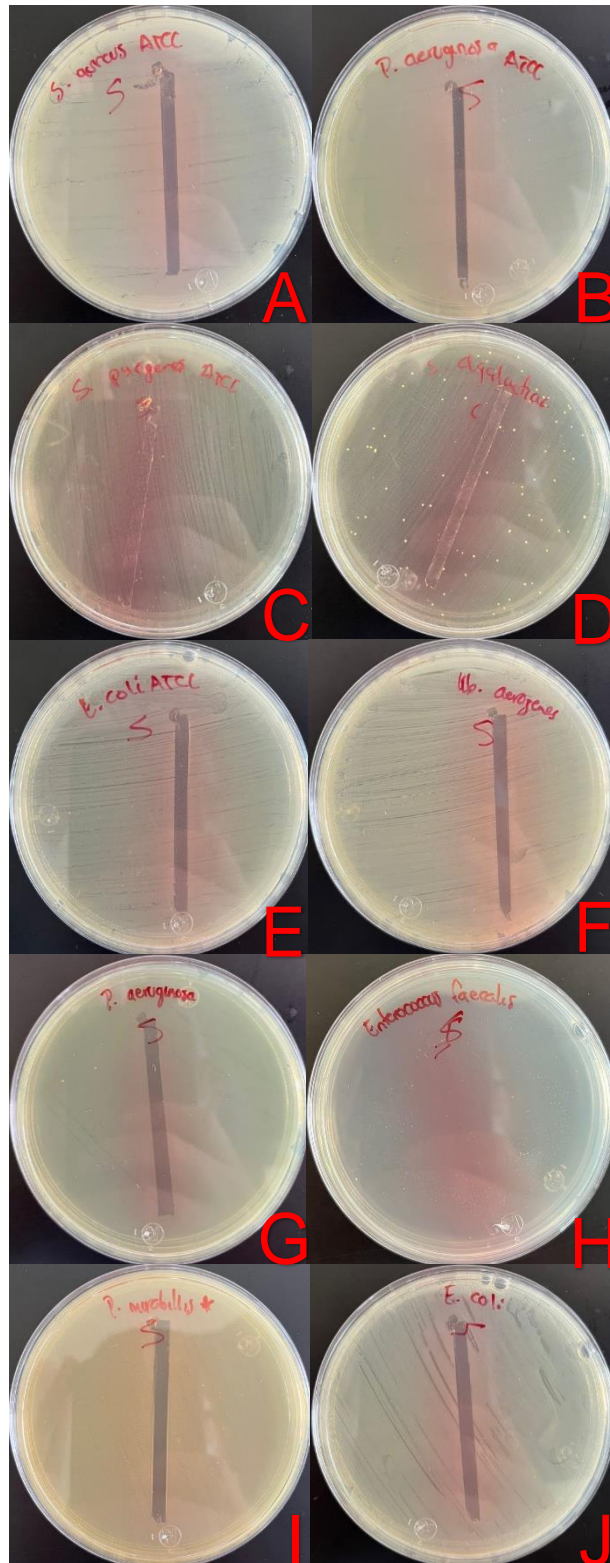
N° Banda	Peso molecular (KDa)	% Banda
1	>250	0.6
2	>250	1.5
3	241.9	0.3
4	96.2	2.5
5	78.1	5.7
6	64.2	23.6
7	57.9	25.6
8	55.2	6.4
9	51.5	9.5
10	39.3	1.9
11	22.2	22.6

**Cuadro 18.** Fracciones proteicas presentes en la electroforesis SDS-PAGE de los exudados de *L. cuprina*

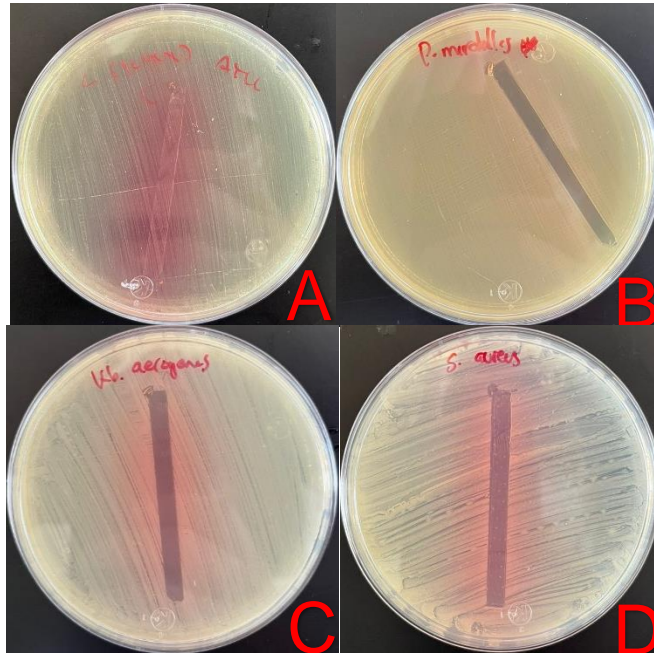
N° Banda	Peso molecular (kDa)	% Banda
1	78.7	6.2
2	65.9	7.1
3	60	25
4	56.7	10.7
5	51.3	9.3
6	48.4	5.2
7	22.2	36.4

### 8.6 Sensibilidad con fracciones proteicas transferidas a membrana de nitrocelulosa

Las fracciones proteicas presentes en los exudados de *L. sericata* presentaron actividad inhibitoria contra *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 23922, *K. aerogenes*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *P. mirabillis*\* y *E. coli*, (Fig. 14) las fracciones proteicas de los exudados de *L. cuprina* presentaron actividad inhibitoria contra *P. mirabillis*\* *Kb. aerogenes* y *S. aureus* (Fig. 15).



**Figura 14.** Actividad inhibitoria de las fracciones proteicas presentes en los exudados de *L. sericata*. **A.** *S.aureus* ATCC 29213. **B.** *P. aeruginosa* ATCC 27853. **C.** *S. pyogenes* ATCC 19615. **D.** *S. agalactiae*. **E.** *E. coli* ATCC 23922. **F.** *K. aerogenes*. **G.** *P. aeruginosa*. **H.** *E. faecalis*. **I.** *P. mirabilis*. **J.** *E. coli*.



**Figura 15.** Actividad inhibitoria de las fracciones proteicas presentes en los exudados de *L. cuprina*. **A.** *S.aureus* ATCC 29213. **B.** *P. aeruginosa* ATCC 27853. **C.** *S. pyogenes* ATCC 19615. **D.** *S. agalactiae*. **E.** *E. coli* ATCC 23922. **F.** *K. aerogenes*. **G.** *P. aeruginosa*. **H.** *E. faecalis*. **I.** *P. mirabillis*. **J.** *E. coli*.

## 9. DISCUSIÓN

Algunos estudios relacionados con la obtención de los exudados de larvas de moscas son muy variados en relación a la metodología utilizada para obtenerlos (Bexfield *et al.*, 2004; Arora *et al.*, 2010; Cruz-Saavedra *et al.*, 2016), además del nulo reporte de las características físicas que presentan los exudados los cuales podrían ser considerados como un factor relacionado con la actividad inhibitoria contra las bacterias, es por ello que en este estudio se determinó que 1,000 larvas de segundo y tercer estadio es el número adecuado para la obtención de los exudados a utilizar para su evaluación, además que no todos los lotes de exudados presentaron las mismas características y actividad inhibitoria contra las bacterias, los lotes de exudados que presentaron actividad inhibitoria compartieron características como la coloración transparente y viscosidad, los lotes sin actividad inhibitoria presentaron una coloración verde-oscuro y sin viscosidad, en la mayoría de los trabajos realizados esto no es tomado en cuenta y por ello no están reportados, además se identificaron en las muestras de los lavados analizados que las larvas comienzan a producir algunos de estos compuestos desde un inicio y no precisamente al ser incubadas a cierta temperatura, dada esta situación es importante conocer, determinar los medios y condiciones adecuadas donde las larvas generen los exudados con capacidad inhibitoria.

La cantidad de proteínas de los exudados de ambas especies que presentaron actividad inhibitoria contra las bacterias fueron superiores a lo reportado por Zhen, *et al.*, (2013) de extractos obtenidos de larvas de *L. sericata* quien mencionan una concentración final de 50 µg/ml de proteínas, aunque inferiores con los reportados por Sherafati, *et al.*, (2022) con una cantidad de 885.92 µg/ml, sin embargo, Diaz-Roa, *et al.*, (2014) mencionan diferentes cantidades de proteínas de los exudados de la misma especie con un promedio de 1,369.24 (± 18) µg/ml de proteína, por otra parte, Novoa-Palomares, *et al.*, (2022) reportan concentraciones de proteínas más altas a las obtenidas en este trabajo, de larvas de mosca *Calliphora vicina* y *Sarconesiopsis magellanica*, las cuales varían de 4,050 µg/ml a los 6,764 µg/ml de proteínas, sin embargo, estas variaciones tan altas podrían estar relacionadas con

la especie de larva utilizada, el método para la cuantificación y la metodología para la obtención de los extractos.

Los antibiogramas realizados para observar la sensibilidad de las bacterias utilizando 50 y 100  $\mu$ l de exudados de larvas, mostraron capacidad de difusión en el agar, generando zonas de inhibición contra las bacterias utilizadas (*S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853 *E. coli* ATCC 23922 y *S. pyogenes* ATCC 19615 y *S. agalactiae*) a diferencia de lo reportado por Bexfield *et al.*, (2004) donde realizaron ensayos similares y mencionan que no es el ensayo correcto, debido a la nula presencia de halos inhibitorios, sin embargo, es importante mencionar que las cantidades de exudados utilizados en este trabajo fueron mayores, lo cual podría estar relacionado con los resultados obtenidos. Los exudados de las larvas de *L. sericata* presentan actividad inhibitoria con 50  $\mu$ L y 100  $\mu$ L contra bacterias gram positivas y gram negativas (Bexfield *et al.*, 2008), se presentó diferencia estadísticamente significativa entre los halos generados de *S. pyogenes* ATCC contra los generados de *P. aeruginosa* ATCC 27853 ( $p= 0.0022$ ) y *S. agalactiae* ( $p= 0.0033$ ) para 50  $\mu$ L, para 100  $\mu$ L de igual manera *S. pyogenes* ATCC 19615 contra *P. aeruginosa* ATCC 27853 ( $p= 0.0022$ ) y contra *E. coli* ATCC 25922 ( $p=0.0300$ ). Los exudados de *L. cuprina* mostraron actividad inhibitoria con 50  $\mu$ L y 100  $\mu$ L contra una de la cepas utilizadas (*S. pyogenes*), la cual obtuvo diferencia estadísticamente significativa contra los halos generados del resto de las bacterias ( $p= 0.0085$ ). Es importante mencionar que los halos generados por los exudados de *L. cuprina* no igualaron a los generados por los exudados de *L. sericata*. Diaz-Roa *et al.*, (2014) menciona el efecto inhibitorio presente al utilizar la misma técnica, lo cual concuerda con este trabajo, sin embargo, menciona que esto sucede a partir de una concentración de 100  $\mu$ g/ml de proteínas presente en los exudados a diferencia de este trabajo en el cual contenían menores cantidades de proteínas, 27.265  $\mu$ g/ml en 50  $\mu$ L, 54.531  $\mu$ g/ml en 100  $\mu$ L (Exudados de *L. sericata*), 22.33  $\mu$ g/ml en 50  $\mu$ L y 44.67 en 100  $\mu$ L (Exudados de *L. cuprina*) generando halos inhibitorios contra las especies de bacterias utilizadas, de las cuales dos son las mismas que utilizaron los autores (*S. aureus* ATCC 29213 y *P. aeruginosa* ATCC 27853).

Existen reportes que no concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo, en los cuales se mencionan crecimiento de bacterias como *E. coli* y *P. aeruginosa* en presencia de exudados de larvas de *L. sericata* (Thomas, *et al.*, 1999), así como de otras especies bacterianas que de igual manera no presentan actividad inhibitoria con exudados de esta especie de larva de mosca (Bexfield *et al.*, 2008; Kruglikova y Chernysh, 2011) y otras especies como *Calliphora vicina* y *Sarconesiopsis magellanica* (Novoa-Palomares *et al.* 2022), estos resultados podrían estar relacionados principalmente con el proceso de obtención de los exudados, estadio de las larvas que se utiliza y principalmente el método empleado para la sensibilidad de las bacterias. La actividad inhibitoria de los exudados de *L. sericata* contra algunas bacterias como *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. pyogenes* ATCC 19615 presentaron actividad bactericida, contra *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 23922 presentaron actividad bacteriostática al igual que lo reportado por Giraldo (2014), la actividad inhibitoria de los exudados de *L. cuprina* presento una actividad bactericida contra *S. pyogenes* ATCC 19615. Posteriormente al observar que los exudados de las larvas presentaron actividad inhibitoria contra las bacterias de referencia se utilizaron contra 10 cepas de aislados clínicos con resistencia a diferentes antibióticos (*P. aeruginosa*, *K. oxytoca*, *K. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, *E. coli*, *S. aureus*, 2 cepas de *P. mirabillis*, *C. freundii*), presentando actividad inhibitoria contra todas las bacterias, utilizando exudados de larvas de *L. sericata* y *cuprina*, a pesar de que se han reportado una nula actividad inhibitoria contra especies de *Proteus* y *E. faecalis* (Thomas, *et al.*, 1999; Bexfield *et al.*, 2008), lo que podría estar relacionado con los diferentes compuestos presentes en los exudados, como lo son algunos péptidos con diferentes pesos moleculares (Kruglikova y Chernysh, 2011), algunos ya caracterizados como la lucifensina (Cerovzky, *et al.*, 2010; El Shazely, *et al.*, 2014; Velachova, *et al.*, 2014), además de los mecanismos de acción de los compuestos para degradar múltiples proteínas (Tamura, *et al.*, 2017), la mayoría de los trabajos realizados se han enfocado principalmente en compuestos de bajos pesos moleculares menores a 10 kDa (Bexfield *et al.*, 2008; Paula, 2014; Novoa-Palomares *et al.* 2022), sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo relacionado con la

caracterización proteica de los exudados de ambas especies, se lograron aislar compuestos con altos pesos moleculares de 22.2 kDa a compuestos mayores de 250 kDa, los cuales están relacionados con la actividad inhibitoria que presentaron los exudados en ambas especies, a pesar de encontrar un mayor número de compuestos en los exudados de *L. sericata* algunos de estos se encuentran presentes en ambos exudados de larvas, y podrían ser principalmente péptidos, ya que estos se sintetizan principalmente en los cuerpos grasos y las células sanguíneas de insectos (Huan, *et al.*, 2020). Si bien no todas las bacterias fueron sensibles a la utilización de las diferentes fracciones proteicas en nitrocelulosa de los exudados de las larvas esto podría estar influenciado por la cantidad de exudados que se utilizó la cual fue menor en comparación con la utilización de los exudados directamente.

Los exudados de las larvas de ambas especies tienen efecto inhibitorio contra las bacterias comúnmente aisladas de las heridas y que provocan las complicaciones en ellas, además de presentar el mismo efecto contra bacterias resistentes a diferentes antibióticos, por ello, los exudados de ambas especies podrían ser consideradas como una alternativa en la utilización de antibióticos contra las bacterias causantes de infecciones en heridas y la problemática de la resistencia bacteriana. Sin embargo es recomendable aislar las diferentes fracciones proteicas para identificar cuáles son las responsables de la actividad inhibitoria contra las bacterias o si bien son el conjunto de ellas las que producen el efecto, de igual manera a futuro es importante la caracterización de estos compuestos para su correcta identificación.



## 10. CONCLUSIONES

Los exudados de las larvas que presentaron actividad inhibitoria comparten características físicas como la coloración transparente y viscosidad.

Los exudados de larvas de mosca *L. sericata* demostraron actividad inhibitoria contra cepas bacterianas de referencia, principales causantes de infecciones en las heridas (*S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 23922 y *S. pyogenes* ATCC 19615 y *S. agalactiae*), presentando una actividad bactericida contra las cepas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. pyogenes* ATCC 19615 y una actividad bacteriostática contra *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 23922 y *S. agalactiae*.

Los exudados de larvas de mosca *L. cuprina* demostraron actividad inhibitoria únicamente contra *S. pyogenes* ATCC 19615 y una actividad bactericida.

Los exudados de *L. sericata* presentaron mayor efectividad que los exudados de *L. cuprina* contra las bacterias comúnmente aisladas de heridas.

Los exudados de ambas especies de larvas presentaron actividad inhibitoria contra las 10 cepas bacterianas aisladas de pacientes con resistencia a antimicrobianos (*P. aeruginosa*, *K. oxytoca*, *K. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, *E. coli*, *S. aureus*, 2 cepas de *P. mirabilis*, *C. freundii*).

Los exudados de larvas de *L. sericata* y *L. cuprina* compartieron algunos compuestos con pesos similares (22.2 a 78.7 kDa) los cuales están relacionados con el efecto inhibitorio contra las bacterias.

## 9. LITERATURA CITADA

- Alós, J. I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692–699.
- Arco, J. D. E. L. (2014). *Farmacia Abierta Antibióticos: situación actual*. 28, 29–33.
- Arora, S., Sing, L. C., y Baptista, C. (2010). Antibacterial activity of *Lucilia cuprina* maggot extracts and its extraction techniques. *International Journal of Integrative Biology*, 9(1), 43–48.
- Baer, W. (2011). *The Treatment of Chronic Osteomyelitis With the Maggot ( Larva of the Blow Fly )*. 920–944.
- Bartolomé-álvarez, J., Galán-ros, J., Ferrer-amate, F., y Garaizábal, E. E. (2014). Infecciones invasivas de tejidos blandos por *Streptococcus pyogenes* adquiridas en la comunidad. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32 (10), 691-692.
- Baquero, F., Baraibar, R., Campos, J., Domínguez, L., Garau, X., García, J. A., Pérez, E., Prats, G., Rey, R., Ruíz, A., Del Río, A., y Guerra, L. (1995). Antibiotic Resistance in Spain: What to do? *Rev Esp Salud Pública*, 69(6), 445–461.
- Berlanga, M., y Guerrero, R. (2017). La complejidad de lo simple: la célula bacteriana. *Química Viva*, 16(2), 11–19.
- Bexfield, A., Nigam, Y., Thomas, S., y Ratcliffe, N. A. (2004). Detection and partial characterisation of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbes and Infection*, 6(14), 1297–1304.
- Bexfield, A., Bond, A., Roberts, E., Dudley, E., Nigam, Y., Thomas, S., Newton, R., y Ratcliffe, N. (2008). The antibacterial activity against MRSA strains and other bacteria of a <500 Da fraction from maggot excretions/secretions of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Microbes and Infection* 10, 325-333.
- Bradford, M. M. (1976). Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of *Thymus daenensis* Celak. *Crop Journal*, 5(5), 407–415.
- Castellanos, D. K., Gonzales, D. y Gracia, L. (2014). Manejo de Heridas. *Rev. Chil. Cir*, 3(2), 471–472.
- Cazander, G., Pawiroedjo, J., Vandenbroucke-Grauls, C., Schereurs, M. y Jukema, G. N. (2010). Synergism between maggot excretions and antibiotics. *Wound Repair and Regeneration* 18, 637-642.
- Cerovzky, V., Zdarek, J., Fucik, V., Monincova, L., Voburka, Z. y Bém, R. (2010). Lusifensin, the long-sought antimicrobial factor of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia sericata*. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67, 455-466.
- Cerovzky, V., Slaninová, J., Fucik, V., Monincová, L., Bednárová, L., Malon y P.,

- Stockrová, J. Lucifensin, a Novel Insect Defensin of Medicinal Maggots: Synthesis and Structural Study. *ChemBioChem*, 12, 1352-1361.
- Chan, D. C., Fong, D. H., Leung, J. Y., Patil, N. G., y Leung, G. K. (2007). Maggot debridement therapy in chronic wound care. *Hong Kong Medical Journal*, 13(5), 382–386.
- Choi, W. H., Yun, J. H., Chu, J. P., y Chu, K. B. (2012). Antibacterial effect of extracts of hermetia illucens (diptera: Stratiomyidae) larvae against gram-negative bacteria. *Entomological Research*, 42(5), 219–226.
- Contreras-Ruiz, J., Fuentes-Suárez, A., Arroyo-Escalante, S., Moncada-Barron, D., Sosa-De-Martínez, C., Maravilla-Franco, E., y Guadalupe Domínguez-Cherit, J. (2016). Estudio comparativo de la eficacia de la terapia de larvas para el desbridamiento y el control de la carga bacteriana en comparación con el desbridamiento quirúrgico y la aplicación tópica de un antimicrobiano. *GACETA MÉDICA DE MÉXICO*, 152, 78–87.
- Correa, Y., Cabanillas, B., Jullian, V., Álvarez, D., Castillo, D., Dufloer, C., Bustamante, B., Roncal, E., Neyra, E., Sheen, P., y Sauvain, M. (2019). Bioactive compounds from Chrysosporium multifidum, a fungus isolated from Hermetia illucens gut microbiota. *BioRxiv*, 1–10.
- Cromwell, G. L. (2002). Why and how antibiotics are used in swine production. *Animal Biotechnology*, 13(1), 7–27.
- Cruz-Saavedra, L., Díaz-Roa, A., Gaona, M. A., Cruz, M. L., Ayala, M., Cortés-Vecino, J. A., Patarroyo, M. A., y Bello, F. J. (2016). The effect of Lucilia sericata- and Sarconesiopsis magellanica-derived larval therapy on Leishmania panamensis. *Acta Tropica*, 164, 280–289.
- Daza, R. M. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf OrmaciónTerapeutica Del Sistema Nacional de Salud*, 22(3), 57–67.
- Díaz-Roa, A., Gaona, M. A., Segura, N. A., Suárez, D., Patarroyo, M. A., y Bello, F. J. (2014). Sarconesiopsis magellanica (Diptera: Calliphoridae) excretions and secretions have potent antibacterial activity. *Acta Tropica*, 136(1), 37–43.
- Edwards, R., y Harding, K. G. (2004). Bacteria and wound healing. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 17(2), 91–96.
- El Shazely, B., Veverka, V., Fucik, V., Voburka, Z., Zdarek, J. y Cerovsky, V. (2013). Lucifensin II, a defensin of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology*. 50(3), 571-578.
- Fernández, F., López, J., M., P. L., y Machado, C. (2003). Resistencia bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 57(10), 1129–1140.
- Fleischmann, W., Grassberger, M. y Sherman, R. (2004). *Maggot Therapy A Handbook of Maggot- Assisted Wound Healing*. Thieme.

- Figueroa, L., Flores, J., y Rodríguez, S. (2007). Método de cultivo de larvas de moscas *Lucilia sericata* para terapia larval. *Parasitología Latinoamericana*, 62(1–2), 79–82.
- Giono-Cerezo, S., Santos-Preciado, J. I., Morfín-Otero, M. de R., Torres-López, F. J., y Alcántar-Curiel, M. D. (2020). Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta de México*, 156(2), 172–180.
- Giraldo, P. A. (2014). Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos y hemolinfa de larvas de *Lucilia eximia* (Diptera: calliphoridae). (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias.
- González, J., Maguiña, C., y González, F. de M. (2019). La resistencia a los antibióticos: un problema muy serio. *Acta Médica Peruana*, 36(2), 145–151.
- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., y Yi H. (2020). Antimicrobial Peptides: classification, Desing, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front. Microbiol.* 11, 582779.
- Jaradat, Z. W., Ababneh, Q. O., Sha'aban, S. T., Alkofahi, A. A., Assaleh, D., y Al Shara, A. (2020). Methicillin Resistant Staphylococcus aureus and public fomites: a review. *Pathogens and Global Health*, 114(8), 426–450.
- Jaramillo Jaramillo, A. S., Cobo Ángel, C. G., Moreno Tolosa, Y., y Ceballos Márquez, A. (2018). Antimicrobial resistance of *Streptococcus agalactiae* of human and bovine origin Resistencia antimicrobiana de *Streptococcus agalactiae* de origen humano y bovino Resistência antimicrobiana de *Streptococcus agalactiae* de ori. *CES Med. Zootec*, 13(1), 62–79.
- Jiménez, C. E. (2008). Curación avanzada de heridas. *Revista Colombiana de Cirugía*, 23(3), 146–155.
- Jimenez, F., Douriet, F. A., y Salgado, M. (2013). Larvaterapia. *Rev Cent Dermatol Pascua*, 22(3), 100–105.
- Kerridge, A., Lappin-Scott, H., y Stevens J. R. (2005). Antibacterial properties of larval secretions of the blowfly, *Lucilia sericata*. 333–337.
- Kruglikova, A. A., y Chernysh, S. I. (2011). Antimicrobial compounds from the excretions of surgical maggots, *Lucilia sericta* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae). *Entomological review*. Vol. 91. No. 7.
- Leandro, L. F., Mendes, C. A., Casemiro, L. A., Vinholis, A. H. C., Cunha, W. R., De Almeida, R., y Martins, C. H. G. (2015). Antimicrobial activity of apitoxin, melittin and phospholipase A2 of honey bee (*Apis mellifera*) venom against oral pathogens. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 87(1), 147–155.
- Laemmli, U. K., y Favre, M. (1973). Maturation of the head of bacteriophage T4: I. DNA packagimng events. *Journal of molecular neology*, 80(4), 575-99.
- Lee, K. S., Yun, E. Y., & Goo, T. W. (2020). Antimicrobial activity of an extract of

- hermetia illucens larvae immunized with lactobacillus casei against salmonella species. *Insects*, 11(10), 1–11.
- López, P. M., Capafons, S. R., Guerrero, D. C., y Biosca, R. G. (2013). Tratamiento de úlceras infectadas por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente con crema de colistina 0,1%. *Farmacia Hospitalaria*, 37(4), 339–340.
- Luján, D. A. (2014). *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 48(4), 465–474.
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L., y Pier, G. B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: Lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection*, 2(9), 1051–1060.
- MacFaddin, J. F. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Ed. Médica Panamericana.
- Martín, J. M., Molina, I., Ramón, D., Monteagudo, C., Alonso, V., y Jordá, E. (2006). Infección subcutánea necrotizante por *Streptococcus agalactiae*. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 97(10), 644–646.
- Masiero, F. S., Aquino, M. F. K., Nassu, M. P., Pereira, D. I. B., Leite, D. S., y Thyssen, P. J. (2017). First Record of Larval Secretions of *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) (Diptera: Calliphoridae) Inhibiting the Growth of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Neotropical Entomology*, 46(1), 125–129.
- Masiero, F. S., Silva, D. G., Luchese, M., Estércio, T., Pérsio, N. V., y Thyssen, P. J. (2019). In vitro evaluation of the association of medicinal larvae (Insecta, Diptera, Calliphoridae) and topical agents conventionally used for the treatment of wounds. *Acta Tropica*, 190, 68–72.
- Medina-Ochoa, E., García-González, E. L., López-Ascencio, R., y Vásquez, C. (2018). Tipos de Bacterias en Cultivos de Secreción de Pie Diabético en Pacientes de Manzanillo, Colima, México. *Archivos de Medicina*, 14(2), 10.
- Novoa-Palomares, F., Salas-Díaz, L., Pérez-Téllez, C., Pinillos-Medina, I., Torres-García, O. & Bello, F. J. (2022). Análisis comparativo de la actividad antimicrobiana de secreciones y excreciones larvianas de *Calliphora vicina* y *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae). *Biomédica* 42:54-66.
- Paz, V. M., Mangwani, S., Martínez, A., Álvarez, D., Sandra, S. G., y Vázquez, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista Chilena de Infectología*, 36(2), 180–189.
- Pérez, A. G., Sanches, M., Bautista, D. C., Méndosa, R., Fragoso, L. E., Velarde, L. T., y López, S. (2012). Prevalencia de infección de herida quirúrgica, causas y resistencia a los fármacos en el Hospital General de Zona núm. 2 del IMSS, San Luis Potosí. *Rev Esp Méd Quir*, 4, 261–265.
- Rivera, M. (1998). Estreptococo Beta Hemolítico grupo A (*Streptococcus pyogenes*). *Honduras Pediátrica*, 19, 47–50.

- Rodríguez, R. y González, J. H. (2011). Métodos alternativos para el tratamiento de pacientes con heridas infectadas. *Medisan*, 15(4), 503–514.
- Salem, C., Pérez, P., Hennin, E., Uherek, F., Schultz, C., Butte, J. M. y González, P. (2000). Heridas: Conceptos generales. *Cuadernos de Cirugía*, 14(1), 90–99.
- Sánchez, M., Chuaire, L., Narváez, R., y Segura, N. (2004). Biocirugía: utilización de larvas de insectos necrófagos en la curación de heridas. La terapia larval. *Revista Ciencias de La Salud*, 2(2), 156–164.
- Saviane, A., Tassoni, L., Naviglio, D., Lupi, D., Savoldelli, S., Bianchi, G., Cortellino, G., Bondioli, P., Folegatti, L., Casartelli, M., Orlandi, V. T., Tettamanti, G., y Cappelozza, S. (2021). Mechanical processing of *hermetia illucens* larvae and bombyx mori pupae produces oils with antimicrobial activity. *Animals*, 11(3), 1–17.
- Sherafati, J., Saaid Dayer, M. y Ghaffarifar, F. 2022. Therapeutic effects of *Lucilia sericata* larval excretion/secretion products on Leishmania major under in vitro and in vivo conditions. *Parasites & Vectors*. 15:2 12.
- Sherman, R. A. (2009). Maggot therapy takes us back to the future of wound care: New and improved maggot therapy for the 21st century. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 3(2), 336–344.
- Sherman, R. A., Hall, M. J. R., y Thomas, S. (2000). Medicinal maggots: An ancient remedy for some contemporary afflictions. *Annual Review of Entomology*, 45, 55–81.
- Tamura, T., Cazander, W., Rooijackers, S. H. M., Trouw, L. A. y Nibbering, P. H. (2017) Excretions/secretions from medicinal larvae (*Lucilia sericata*) inhibit complement activation by two mechanisms. *Wound Repair Regen* 25(1):41-50
- Téllez, G. A., Acero, M. a., Pineda, L. A., y Castaño, J. C. (2012). Larvaterapia aplicada a heridas con poca carga de tejido necrótico y caracterización enzimática de la excreción, secreción y hemolinfa de larvas. *Biomedica*, 32(3), 312–320.
- Thomas, S., Andrews, A. M., Hay, N. P. y Bourgoise, S. (1999). The anti-microbial activity of maggot secretions: results of a preliminary study. *Journal of Tissue Viability*, Vol 9, No 4.
- Valls, E., Alegre, J. J., Ivorra, J., Román, J. A., Fernández, N., Chalmeta, I., Muñoz, S., y Senabre, J. M. (2008). Infección articular por *Streptococcus agalactiae* en adultos inmunocompetentes: Presentación de dos casos. *Reumatología Clínica*, 4(4), 155–158.
- Van der Plas, M. J. A., Jukema, G. N., Wai, S. W., Dogterom-Ballering, H. C., Lagendijk, E. L., Van Gulpen., *et al.* (2008). Maggot excretions/secretions are differentially effective against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61: 117–122.

- Van der plas, M. J. A., Dambrot, C., Dogterom-Ballering, H. C. M., Kruithof, S., Van Dissel, J. y Nibbering, P. (2010) Combination of maggot excretion/secretions and antibiotics are effective against *Staphylococcus aureus* biofilms and the bacteria derived therefrom. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 65: 917-923.
- Vela, G., Stegensek, E., y Lejia, C. (2018). Características epidemiológicas y costos de la atención de las heridas en unidades médicas de la Secretaría de Salud. *Rev Enferm Inst Mex Seguro Soc.*, 26(2), 105–114.
- Velachova, I., Prochazka, E., Bohova, J., Novak, P., Takac, P. y Majtan, J. (2014). Antibacterial properties of Lucifensin in *Lucilia sericata* maggot after septic injury. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 4(5): 358-361.
- Valachová, I., Majtan, T., Takáč, P., y Majtán, J. (2014). Identification and characterisation of different proteases in *Lucilia sericata* medicinal maggots involved in maggot debridement therapy. *Journal of Applied Biomedicine*, 12, 171-177.
- Zendejas, G. S., Avalos, H., y Soto, M. Y. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades de patogenicidad, métodos de identificación. *Revista Biomedica*, 25(3), 129–143.
- Zhen, Z., Jiangning, W., Bo, Z., Huanran, L., Wei, S., Jiao, H., Decheng, L., Shouyu, W. y Xiaoguang, X. (2013). Activity of antibacterial protein from maggot against *Staphylococcus aureus* *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Molecular Medicine* 31, 1159-1165.