

## Tesis de Posgrado

# Caracterización de la resistencia a insecticidas piretroides en *Pediculus humanus capitis* De Geer 1778 : estudio comparativo entre estados embrionarios y postembionarios

Mougabure Cueto, Gastón Adolfo

Tesis presentada para obtener el grado de de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

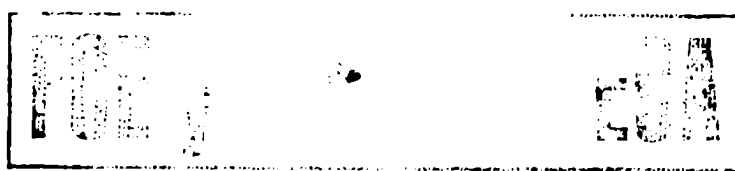
This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Mougabure Cueto, Gastón Adolfo. (). Caracterización de la resistencia a insecticidas piretroides en *Pediculus humanus capitis* De Geer 1778 : estudio comparativo entre estados embrionarios y postembionarios. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3747\\_MougabureCueto.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3747_MougabureCueto.pdf)

#### Cita tipo Chicago:

Mougabure Cueto, Gastón Adolfo. "Caracterización de la resistencia a insecticidas piretroides en *Pediculus humanus capitis* De Geer 1778 : estudio comparativo entre estados embrionarios y postembionarios". Tesis de . Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. . [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3747\\_MougabureCueto.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3747_MougabureCueto.pdf)



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*

Caracterización de la resistencia a insecticidas piretroides en  
*Pediculus humanus capitis* De Geer 1778: estudio  
comparativo entre estados embrionarios y post-embrionarios

Characterization of the resistance to pyrethroids insecticide on *Pediculus humanus capitis* De Geer 1778: Comparative study between embryonic and post-embryonic stages.

*Autor: Lic. MSc. Gastón Adolfo Mougabure Cueto*

*Directora: Dra. María Inés Picollo*

*Lugar de Trabajo: Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas  
(CITEFA-CONICET)*

UBA  
3747

3747

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

## RESUMEN

Los objetivos de este trabajo de tesis están relacionados a la evolución de la resistencia a insecticidas piretroides en los estados embrionarios y postembrionarios de poblaciones de *Pediculus humanus capitis* de Buenos Aires resistentes a permetrina. Durante el desarrollo de la tesis fueron planteados objetivos *a posteriori* necesarios para el desarrollo de los objetivos originales.

Los objetivos originales fueron:

- Observar la posible expresión de resistencia a insecticidas en embriones en poblaciones de *P. humanus capitis* con resistencia detectada en estadios postembrionarios.
- Estudiar los mecanismos de resistencia a insecticidas expresados en embriones y estados postembrionarios de *P. humanus capitis*.

Los objetivos *a posteriores* fueron:

- Caracterizar morfológicamente el desarrollo embrionario de *P. humanus capitis* y *P. humanus humanus* a fin de trabajar con homogéneo en cuanto al tiempo de desarrollo
- Determinar las condiciones ambientales óptimas (T°C y HR%) para el desarrollo de *P. humanus capitis* en laboratorio
- Puesta punto de los métodos de medición de actividad enzimática en los embriones.

De acuerdo a estos objetivos se obtuvieron los siguientes resultados y conclusiones:

Se caracterizó el desarrollo embrionario según caracteres morfológicos vistos a través de la transparencia del corion. Los caracteres morfológicos fueron: apéndices y manchas oculares. La combinación de los distintos estados de desarrollo de estos caracteres permitieron determinar tres etapas en la embriogénesis: etapa temprana, etapa media, y etapa tardía (anchas oculares negras).

Se determinaron las condiciones ambientales óptimas (temperatura y humedad relativa) en laboratorio para la embriogénesis de *P. humanus capitis*: 27-31°C de temperatura y 45-75% humedad relativa.

Se observó que en poblaciones con resistencia a piretroides y DDT expresada en los estados postembrionarios los embriones también expresan resistencia a los mismos insecticidas.

En estados postembrionarios, no se observó resistencia a carbaril ni a spinosad. En embriones no se observó resistencia a spinosad pero se determinó una incipiente resistencia a carbaril.

Se midió actividad esterasa en embriones por las tres metodologías utilizadas (Gomori, Ellman y Fluorométrico), por el contrario no fue posible determinar actividad del complejo P450 por el método fluorométrico utilizado.

Según los resultados de inhibición enzimática *in vivo* y la determinación de las actividades enzimáticas una mayor actividad esterasa no parece estar involucrada en la resistencia observada en adultos y en embriones.

Según el análisis global de los resultados, la resistencia en las poblaciones de *P. humanus capitis* utilizadas en este trabajo se debería: 1) modificación de sitio de acción de piretroides y DDT (*tipo-kdr*) (estados embrionarios y postembrionarios), 2) aumento metabolismo oxidativo (estados postembrionarios).

Se plantea al insecticida spinosad como posible activo en formulaciones pediculicidas.

**Palabras claves:** *Pediculus humanus capitis*, resistencia, insecticidas, piretroides, desarrollo embrionario, P450, esterasas, canal de sodio.

## ABSTRACT

The aims of this thesis are related to the evolution of the pyrethroids insecticide resistance in embryonic and postembryonic stages of *Pediculus humanus capitis* populations from Buenos Aires resistant to permethrin. During the development of the thesis *a posteriori* objectives were settled necessary for the development of the original aims.

The original aims were:

- To observe the possible expression of insecticide resistance in embryos in *P. humanus capitis* populations with detected resistance in postembryonic stages.
- To study the insecticide resistance mechanism expressed in *P. humanus capitis* embryos and postembryonic stages.

The *a posteriori* aims were:

- To characterize morphologically the embryonic development of *P. humanus capitis* and *P. humanus humanus* in order to work with homogeneous material as regards development time.
- To determinate the optimal environmental conditions (T°C and HR%) for the *P. humanus capitis* in laboratory.
- To determinate the measure methods of enzymatic activity in embryos.

According to these aims the following results and conclusions were drawn:

The embryonic development according to morphological characters seen through the corion transparence were characterized. The morphological characters were: appendages and ocular spots. The combinations of different development stages of these characters allowed to determinate three periods of time in the embryogenesis: early period, middle period and late period.

Optimal environmental conditions were determined (T°C and HR %) in the laboratory for *P. humanus capitis*: 27-31°C temperature and 45-75 relative humidity.

It was observed that in populations with resistance to pyrethroids and DDT expressed in postembryonic stages, the embryos also express resistance to the same insecticides.

In postembryonic stages, carbaryl and spinosad resistance was not observed. Resistance to spinosad was not observed in embryos but an incipient carbaryl resistance was determined.

Esterase activity embryos was measured by the three used methods (Gomori, Ellman and fluorometric) on the contrary it was not possible to determinate P450 complex activity by the used fluorometric method.

According to *in vivo* enzymatic inhibition results and the enzymatic activities determination, an increased in esterase activity is not involved in the resistance observed in adults and embryos.

According to the global analysis of results, the resistance in *P. humanus capitis* populations used in this research would be due to: 1) pyrethroids and DDT site of action modification (*kdr*-like) (embryonic and postembryonic stages), 2) oxidative metabolism increase (postembryonic stage).

Spinosad insecticide as a possible active in pediculicide formulations is questioned.

**Key words:** *Pediculus humanus capitis*, resistance, insecticides, pyrethroids, embryonic development, P450, esterases, sodium channel.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*

Caracterización de la resistencia a insecticidas piretroides en  
*Pediculus humanus capitis* De Geer 1778: estudio  
comparativo entre estados embrionarios y post-embrionarios

*Autor: Lic. MSc. Gastón Adolfo Mougabure Cueto*

*Directora: Dra. María Inés Picollo*

*Lugar de Trabajo: Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas  
(CITEFA-CONICET)*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

-2004-

3747

*"Compañeros del ejército de los Andes: La guerra se la tenemos que hacer del modo que podamos. Si no tenemos dinero, carne y tabaco no nos tienen que faltar. Cuando se acaben los vestuarios, nos vestiremos con la bayetilla que nos trabajen nuestras mujeres. Y si no, andaremos en pelotas como nuestros paisanos los indios. Seamos libres y lo demás no importa. Compañeros, juremos no dejar las armas de la mano hasta ver el país enteramente libre, o morir con ellas como hombres de coraje"*

*Gral. José de San Martín*

*27 de junio 1819*

*"Escribo sólo para aquellos en quienes mora un sentido interno para la certeza o la dubitabilidad, para la claridad o la confusión de su propio conocimiento, para quienes la ciencia y la convicción valen algo y se sienten impulsados por un vivo afán de buscarla. Con aquellos que por obra de una larga servidumbre de espíritu se han perdido a sí mismos y consigo mismos han perdido su sentido para la propia convicción y su fe en la convicción de los demás; con aquellos para los que es locura que alguien busque independientemente la verdad, que en las ciencias no ven nada más que un modo de ganarse el pan y que ante cada ensanchamiento de ellas se espantan como ante un nuevo trabajo; con aquellos para quienes ningún medio es vergonzoso si se tratara de someter al que echa a perder el negocio, con ninguno de ellos tengo nada que hacer".*

*Johann Gottlieb Fichte, 1797*

*A Virginia*

*A Mis Padres, Mirta y José Luis*

*A Mi Hermano, José Luis*

## ***Agradecimientos***

*A María Inés (Dra. Picollo) por todo lo que se puede esperar académica y humanamente de un director y una amiga.*

*Al Dr. Eduardo Zerba, director del CIPEIN, por haberme brindado su generoso apoyo y vasto conocimiento durante la realización de este trabajo de investigación.*

*A Paola y Héctor por su amistad y sus invalorable aportes químicos y en otras áreas del conocimiento.*

*A Valeria, Guillermo y Pablo, mis hermanos becarios, por su amistad y por crecer juntos en esta maravillosa profesión.*

*A Raúl, por su generosa predisposición y mas que confiables respuestas hacia mis variadas consultas.*

*A Germán por haber compartido, entre sus deliciosos cafés, excelentes momentos de humor y análisis de diversos temas.*

*A la Dra. Susana Licastro por sus consejos y experiencia siempre a disposición.  
(A todas estas personas agradezco haber generado un espacio donde el conocimiento, el humor y la responsabilidad se integraron conformando un óptimo ambiente de trabajo).*

*A mis amigos y compañeros en este "largo y sinuoso camino" en la ciencia (recién comenzado): Juan (el Persa), Octavio, Sebastián, Romina, Rodrigo y Mariano.*

*A mi amigo y primer director en investigación Carlos (Dr. Luquet) quién me guió en los primeros y fundamentales pasos en la investigación científica.*

*A mis amigos de siempre: Mariano Agustín, Marcio, Milva, Martín, Miguel, Willy, Ezequiel, Santiago y Armando.*

*A las siguientes instituciones:*

*Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por concederme la beca que me permitió realizar este trabajo de investigación.*

*Al Instituto de Investigaciones Científicas y Técnicas de las Fuerzas Armadas (CITEFA) que junto con el CONICET son las instituciones a las que pertenece el CIPEIN, laboratorio donde realicé el presente trabajo.*

*A las instituciones y escuelas donde fue recolectado el material de estudio por haberme permitido realizar los muestreos, y especialmente a los eventuales criadores y donantes de piojos, los niños cuyas cabezas he "rastrillado" innumerables veces.*



*A la Universidad de Buenos Aires, por haberme permitido acceder a la educación superior y a esta etapa profesional; espacios lamentablemente convertidos, en el actual contexto social-educativo de Argentina, en lugares de privilegio.*

*A la República Argentina y su pueblo por conformar un tremendo país, empeñados en resistir el egoísmo y estupidez de algunos hombres.*

*Finalmente y muy especialmente:*

*A Virginia por su amor, su apoyo, su inteligencia, su belleza, su comprensión y por hacerme feliz.*

*A mis Padres, José Luis y Mirta, por permitir, no con pocos sacrificios, poder desarrollarme en esta amada profesión, por su amor y apoyo incondicional*

*A mi hermano, José Luis, por su apoyo eterno, su incondicionalidad, su generosidad y sus consejos.*

*A Kiwi y Niki, pueden dos perras (?) ser tan imprescindibles?.*

## INDICE

<b>Resumen</b>	<b>I</b>
<b>Abstract</b>	<b>II</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>Resistencia a insecticidas</b>	<b>3</b>
I-La resistencia a Insecticidas y el Proceso Evolutivo	3
II-Bases Bioquímicas y Moleculares de la Resistencia	5
a)Aumento de la tasa de detoxificación	6
1)Oxidasas	6
2)Hidrolasas	8
3)Glutación-S-transferasas	10
b)Modificación en el sitio de acción	10
1)Acetilcolinesterasa	10
2)Canal de sodio dependiente de voltaje	11
3)Receptores GABA	13
<b>Insecticidas Piretroides</b>	<b>14</b>
I-Descripción	14
II-Modo de acción	15
III-Metabolismo	18
a)Piretrinas I y II, y Alletrina	19
b)Piretroides	19
IV-Resistencia a Piretroides	20
<b><i>Pediculus humanus capitis</i> y la Pediculosis</b>	<b>22</b>
I-Ubicación Taxonómica	22
II-Breve Descripción de <i>P. humanus capitis</i>	23
a)Morfología y biología	23
b)Descripción externa del huevo de <i>P. humanus</i>	24
III-Importancia Sanitaria del <i>P. humanus capitis</i> y <i>P. humanus humanus</i>	26
IV-Antecedentes de Control y Resistencia a Insecticidas	27
V-El Desarrollo Embrionario y la Resistencia a Insecticidas	31
a)Breve descripción del huevo de insectos y del desarrollo embrionario	31
b)Variaciones toxicológicas y antecedentes de resistencia durante	

el desarrollo embrionario	33
<b>OBJETIVOS</b>	<b>36</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>38</b>
I-Material biológico	38
II-Químico	39
III-Embriogénesis	39
a)Caracterización morfológica de la embriogénesis	39
b)Condiciones ambientales óptimas de laboratorio para el desarrollo embrionario	40
IV-Bioensayos	41
a)Huevos	41
b)Estados Postembrionarios	42
V-Determinación del Nivel de Resistencia (huevo y formas eclosionadas)	43
a)Resistencia a permetrina	43
VI-Estudios de Mecanismos de Resistencia	43
a)Toxicología	43
1)Resistencia a otros insecticidas	43
2)Inhibición de complejos enzimáticos (in vivo)	44
b)Bioquímica	44
1)Actividad oxidasa (enzimas P450)	45
2)Actividad esterasa	46
Método de Gomori	46
Método de Ellman	47
Método Fluorométrico	47
VII-Análisis Estadístico	48
<b>RESULTADOS</b>	<b>49</b>
I-Embriogénesis	49
a)Caracterización morfológica de la embriogénesis	49
b)Condiciones óptima de laboratorio para el desarrollo embrionario	53
II-Resistencia a Insecticidas y Mecanismos de Resistencia	57
a)Toxicología I: Resistencia a permetrina y a otros insecticidas	57
1)Resistencia a permetrina	57
2)Resistencia a d-fenotrina	60

3) Resistencia a carbaril	62
4) Resistencia a spinosad	65
5) Resistencia a DDT	68
b) Toxicología 2: Inhibición de complejos enzimáticos (in vivo)	71
c) Bioquímica	72
1) Actividad del complejo enzimático P450	72
2) Actividad hidrolasa (esterasa)	73
Método Gomori	73
Método Ellman	77
Método Fluorométrico	79
<b><i>DISCUSIÓN</i></b>	<b>83</b>
Desarrollo embrionario: objetivos a posteriori	84
a) Marcadores morfológicos: solución al problema del desarrollo continuo del embrión	84
b) El laboratorio como incubador de embriones de piojos	85
La verdadera población susceptible	87
De adultos resistentes, embriones resistentes	91
Desentrañando los mecanismos de resistencia	92
a) Resistencia cruzada y resistencia múltiple	92
b) Interpretación de la resistencia a piretroides	93
c) Interpretación de la resistencia a DDT	94
d) Interpretación de los bioensayos con carbaril	95
e) Interpretación de la susceptibilidad a spinosad	96
f) ¿Cómo están las cosas hasta este momento de la discusión?	97
g) Inhibiendo los complejos enzimáticos	97
h) ¿Qué evidencias aportan las actividades de los complejos enzimáticos?	98
i) Análisis final de la resistencia	101
Spinosad: un candidato a pediculicida	104
<b><i>CONCLUSIONES FINALES</i></b>	<b>106</b>
<b><i>HIPÓTESIS DERIVADAS Y FUTURAS INVESTIGACIONES</i></b>	<b>107</b>
<b><i>BIBLIOGRAFÍA</i></b>	<b>108</b>

## RESUMEN

Los objetivos de este trabajo de tesis están relacionados a la evolución de la resistencia a insecticidas piretroides en los estados embrionarios y postembrionarios de poblaciones de *Pediculus humanus capitis* de Buenos Aires resistentes a permetrina. Durante el desarrollo de la tesis fueron planteados objetivos *a posteriori* necesarios para el desarrollo de los objetivos originales.

Los objetivos originales fueron:

- Observar la posible expresión de resistencia a insecticidas en embriones en poblaciones de *P. humanus capitis* con resistencia detectada en estadios postembrionarios.
- Estudiar los mecanismos de resistencia a insecticidas expresados en embriones y estados postembrionarios de *P. humanus capitis*.

Los objetivos *a posteriores* fueron:

- Caracterizar morfológicamente el desarrollo embrionario de *P. humanus capitis* y *P. humanus humanus* a fin de trabajar con homogéneo en cuanto al tiempo de desarrollo
- Determinar las condiciones ambientales óptimas (T°C y HR%) para el desarrollo de *P. humanus capitis* en laboratorio
- Puesta punto de los métodos de medición de actividad enzimática en los embriones.

De acuerdo a estos objetivos se obtuvieron los siguientes resultados y conclusiones:

Se caracterizó el desarrollo embrionario según caracteres morfológicos vistos a través de la transparencia del corion. Los caracteres morfológicos fueron: apéndices y manchas oculares. La combinación de los distintos estados de desarrollo de estos caracteres permitieron determinar tres etapas en la embriogénesis: etapa temprana, etapa media, y etapa tardía (anchas oculares negras).

Se determinaron las condiciones ambientales óptimas (temperatura y humedad relativa) en laboratorio para la embriogénesis de *P. humanus capitis*: 27-31°C de temperatura y 45-75% humedad relativa.

Se observó que en poblaciones con resistencia a piretroides y DDT expresada en los estados postembrionarios los embriones también expresan resistencia a los mismos insecticidas.

En estados postembrionarios, no se observó resistencia a carbaril ni a spinosad. En embriones no se observó resistencia a spinosad pero se determinó una incipiente resistencia a carbaril.

Se midió actividad esterasa en embriones por las tres metodologías utilizadas (Gomori, Ellman y Fluorométrico), por el contrario no fue posible determinar actividad del complejo P450 por el método fluorométrico utilizado.

Según los resultados de inhibición enzimática *in vivo* y la determinación de las actividades enzimáticas una mayor actividad esterasa no parece estar involucrada en la resistencia observada en adultos y en embriones.

Según el análisis global de los resultados, la resistencia en las poblaciones de *P. humanus capitis* utilizadas en este trabajo se debería: 1) modificación de sitio de acción de piretroides y DDT (*tipo-kdr*) (estados embrionarios y postembrionarios), 2) aumento metabolismo oxidativo (estados postembrionarios).

Se plantea al insecticida spinosad como posible activo en formulaciones pediculicidas.

## ABSTRACT

The aims of this thesis are related to the evolution of the pyrethroids insecticide resistance in embryonic and postembryonic stages of *Pediculus humanus capitis* populations from Buenos Aires resistant to permethrin. During the development of the thesis *a posteriori* objectives were settled necessary for the development of the original aims.

The original aims were:

- To observe the possible expression of insecticide resistance in embryos in *P. humanus capitis* populations with detected resistance in postembryonic stages.
- To study the insecticide resistance mechanism expressed in *P. humanus capitis* embryos and postembryonic stages.

The *a posteriori* aims were:

- To characterize morphologically the embryonic development of *P. humanus capitis* and *P. humanus humanus* in order to work with homogeneous material as regards development time.
- To determinate the optimal environmental conditions (T°C and HR%) for the *P. humanus capitis* in laboratory.
- To determinate the measure methods of enzymatic activity in embryos.

According to these aims the following results and conclusions were drawn:

The embryonic development according to morphological characters seen through the corion transparence were characterized. The morphological characters were: appendages and ocular spots. The combinations of different development stages of these characters allowed to determinate three periods of time in the embryogenesis: early period, middle period and late period.

Optimal environmental conditions were determined (T°C and HR %) in the laboratory for *P. humanus capitis*: 27-31°C temperature and 45-75 relative humidity.

It was observed that in populations with resistance to pyrethroids and DDT expressed in postembryonic stages, the embryos also express resistance to the same insecticides.

In postembryonic stages, carbaryl and spinosad resistance was not observed. Resistance to spinosad was not observed in embryos but an incipient carbaryl resistance was determined.

Esterase activity embryos was measured by the three used methods (Gomori, Ellman and fluorometric) on the contrary it was not possible to determinate P450 complex activity by the used fluorometric method.

According to *in vivo* enzymatic inhibition results and the enzymatic activities determination, an increased in esterase activity is not involved in the resistance observed in adults and embryos.

According to the global analysis of results, the resistance in *P. humanus capitis* populations used in this research would be due to: 1) pyrethroids and DDT site of action modification (*kdr*-like) (embryonic and postembryonic stages), 2) oxidative metabolism increase (postembryonic stage).

Spinosad insecticide as a possible active in pediculicide formulations is questioned.



## *Introducción*

## INTRODUCCIÓN

Las plagas se definen como organismos que afectan directa o indirectamente al hombre en aspectos tales como la economía, la salud o el bienestar. Sin entrar en discusiones filosófico-biológicas sobre el derecho del hombre a definir cuáles organismos son plagas, y por tal motivo combatirlos o controlarlos, lo cierto es que cuando un organismo comienza a competir con el *Homo sapiens sapiens* por alguno de sus intereses, éste no deja de defender tal interés. En el caso de que la salud humana esté comprometida, hasta el más radicalizado defensor de la naturaleza y del medio ambiente no deja de defenderse, es decir “combatir” o controlar al “oponente”, la plaga.

Las herramientas, las estrategias y la filosofía de cómo actuar ante las plagas fue cambiando a lo largo de la historia de la humanidad. En la actualidad el control de los organismos plagas se basa en el concepto de Manejo Integrado de Plagas (MIP). El MIP se refiere al uso interrelacionado y complementario de todas las herramientas y estrategias de control eficientes que el hombre ha desarrollado y tiene a su alcance, pero a su vez compatibles con el ambiente.

A pesar de las diversas estrategias de control que se han desarrollado en los últimos años, el control químico sigue desempeñando un rol central en el control de plagas y por lo tanto es una de las herramientas fundamentales dentro del MIP. Sin embargo, no está exento de debate y dicho debate se centra en el análisis de los riesgos y beneficios del control químico. Muchas veces el análisis ha degenerado en posiciones radicalizadas, tanto en denunciar riesgos apocalípticos como en justificar el uso indiscriminado de plaguicidas por inmorales beneficios económicos.

Mientras muchas de las críticas que recibe (y ha recibido) el control químico son exageradas y carecen de verdaderos argumentos científicos, otro grupo de críticas generadas en el ámbito académico-científico evidencian los verdaderos problemas que se observarían como consecuencia del inapropiado uso de plaguicidas. Tales críticas provienen de disciplinas que estudian los diversos riesgos involucrados en irresponsables o desmedidas estrategias de control como ser la ecotoxicología, la toxicología, la genética y la ecología. Este tipo de investigaciones tienen un rol fundamental en el avance de la eficiencia y seguridad del control químico de plagas, generando un implícito marco regulatorio dentro del cual se desarrollan los avances científicos-tecnológicos del control químico.



De esta manera, los problemas asociados al uso de plaguicidas se pueden agrupar en forma resumida en :

- **Problemas ambientales:** Riesgos para la salud del hombre, de organismos no blanco y contaminación abiótica (suelo, aire y agua)

**Desarrollo de resistencia a los plaguicidas en las poblaciones de los organismos plaga.**

El desarrollo de resistencia a plaguicidas es el único de estos problemas que está relacionado directamente a las fallas de control químico. Esto es, una vez que la resistencia se ha desarrollado, una exitosa estrategia de control químico deja de controlar a la plaga, deja de ser exitosa. Justamente este trabajo de tesis se centra en el análisis de este problema: la resistencia a insecticidas piretroides en una importante plaga sanitaria en nuestro país y a nivel mundial, el *Pediculus humanus capitis* De Geer 1778 (piojo de la cabeza), insecto causal de la pediculosis.

Para un correcto estudio del desarrollo de la resistencia a un insecticida en una plaga determinada es necesario conocer:

1. Qué es la resistencia a insecticidas, cuáles son las causas de su desarrollo y cuáles son las bases biológicas del fenotipo resistente.
2. Los dos principales “actores” que interactúan generando la resistencia son:
  - ✓ El insecticida a la cual la plaga desarrolla resistencia. Identidad química, metabolismo y modo de acción
  - ✓ El insecto plaga. La especie, su biología y su importancia sanitaria

## **RESISTENCIA A INSECTICIDAS**

La resistencia a insecticidas es definida desde el punto de vista toxicológico como "el desarrollo de una capacidad, en una población de insectos, de tolerar dosis de un insecticida letales para la mayoría de los individuos de una población normal de la misma especie" (Brown, 1958). El desarrollo de tal capacidad es el resultado de la selección de individuos con una heredable habilidad de resistir altas dosis del tóxico (individuos resistentes) (Oppenoorth, 1985). Esta heredable habilidad individual no es causada por la acción directa del tóxico sobre el material genético de los insectos, sino que es parte de la variabilidad genética que existe en la población antes de la interacción del tóxico con los individuos.

### **I-LA RESISTENCIA A INSECTICIDAS Y EL PROCESO EVOLUTIVO.**

El análisis de los estudios biológicos (y el pensamiento de la humanidad en general) cambió radicalmente a partir que Charles Darwin publica El Origen de las Especies en 1859. Allí Darwin presenta su teoría de cómo opera la evolución biológica y dispara un proceso intelectual que llega hasta nuestros días en forma de moderna teoría evolutiva. A partir del nuevo contexto teórico, las investigaciones en biología evolutiva toman una importancia sin precedentes y se encuadran en dos grandes grupos de estudios: aquellos en los cuales se intenta dilucidar la historia evolutiva de los sistemas biológicos, y aquellos que intentan continuar en la comprensión del proceso evolutivo. Estos últimos permitieron ir perfeccionando la teoría Darwiniana a la luz de los nuevos conocimientos adquiridos a lo largo del siglo XX. A pesar de ciertos aspectos en discusión (siempre en contexto evolutivo), la moderna concepción evolucionista sentó las características básicas del proceso evolutivo:

En una población existe variabilidad genética (varios alelos, distintos genotipos). Esta variabilidad ocurre en forma azarosa y puede generarse por mutación, cambios en la estructura y número de cromosomas, recombinación genética y/o flujo génico. Estos procesos con la influencia del ambiente generan variabilidad fenotípica. Sobre la variación fenotípica actúa la selección natural, flujo génico y deriva génica, resultando, a través de las generaciones, en cambios en la estructura genética de la población (variación en las frecuencias alélicas y genotípicas). Este proceso se conoce como microevolución. Suficiente diferenciación genética generada por microevolución entre dos poblaciones provenientes de una misma población ancestral, resulta en aislamiento reproductivo y formación de dos especies. Este

proceso, junto con otros no nombrados, se conoce como macroevolución (McKenzie, 1996).

En este contexto ecológico-genético-evolutivo, el desarrollo de resistencia es un proceso microevolutivo donde el principal factor de cambio en la estructura génica poblacional es la selección (Roush & McKenzie, 1987; Roush & Tabashnik, 1990; McKenzie, 1996). De esta manera, en una población de insectos parte de la variabilidad genética existente (y azarosa) genera individuos fenotípicamente resistentes a un insecticida. Estos individuos son seleccionados por este insecticida resultando, a través de las generaciones, en un aumento del número de los individuos resistentes en relación a los individuos susceptibles a tal insecticida (aumento de la frecuencia del alelo resistente).

De acuerdo a lo expuesto, la magnitud de un problema de resistencia poblacional es una función de dos factores: la frecuencia de los genotipos resistentes (proporción de individuos resistentes en la población) y la intensidad de la resistencia (fenotipo) asociada a tales genotipos resistentes (“fuerza” de la resistencia individual) (French-Constant & Roush, 1990). Es interesante notar que si bien el fenotipo resistente tiene ventaja selectiva respecto al susceptible bajo presión con un insecticida (genotipo resistente tiene mayor *fitness*), en general se asume que en ausencia de un insecticida, los fenotipos resistentes tienen desventaja selectiva en relación a los fenotipos susceptibles (genotipo resistente tiene menor *fitness*) manteniéndose los alelos resistentes en baja frecuencia (Roush & Daly, 1990; Roush & McKenzie, 1986; McKenzie, 1996).

Debido a que la aparición de individuos resistentes no es predecible (dado al carácter azaroso de la generación de variabilidad genética), el desarrollo de la resistencia a plaguicidas es un problema en el que su solución comienza una vez que la resistencia individual ya se ha generado en la población natural. Así la aparición de la resistencia no se impide sino que generalmente se implementa una estrategia de manejo de la resistencia ya existente, donde lo ideal es detectarla en el nivel más bajo como sea posible (bajas frecuencias de genotipos resistentes). En este contexto podemos imaginar que la resistencia es un problema que tarde o temprano se va hacer presente. Los datos de números especies de artrópodos resistentes a casi todas las clases de insecticidas utilizados confirma nuestra imaginación (Forgash, 1984). Dentro de esta dinámica de manejo de la resistencia, la gran cantidad de datos genéticos, toxicológicos, bioquímicos y de *fitness* relativo de las variantes génicas maximizan la posibilidad de generar estrategias que minimicen la evolución de resistencia (McKenzie, 1996). Una estrategia alternativa, y poco explotada, al manejo de la resistencia ya presente, es la predicción de la resistencia antes de que un nuevo insecticida sea introducido en el campo.

En esta estrategia, estudios de mutagénesis y selección para respuestas monogénicas en laboratorio tienen como objetivo simular y predecir la evolución de resistencia que sucedería en campo (McKenzie, 1996; McKenzie & Batterham, 1998).

Como se desprende de lo expuesto en los párrafos anteriores el fenómeno toxicológico-evolutivo conocido como resistencia a insecticidas es un potencial problema en todo plan de control químico y como tal una de las principales causas en la falla de exitosos planes de control de plagas.

## **II-BASES BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES DE RESISTENCIA.**

El primer paso en el proceso de intoxicación de un insecto con una molécula es la exposición, en este sentido el tipo y tiempo de exposición a la molécula por parte del insecto va a ser determinante en la toxicidad del insecticida. Una vez dada la exposición, la interacción del insecto con la molécula insecticida involucra tres niveles de interacciones farmacocinéticas (Soderlund & Bloomquist, 1990):

- Penetración del insecticida;
- distribución, almacenamiento, metabolismo (detoxificación, activación) y posible excreción del insecticida;
- interacción molecular del insecticida con el último sitio de acción desencadenando la respuesta tóxica.

Las modificaciones genéticas que afecten cuantitativa o cualitativamente a algunos de estos procesos podrían reducir la toxicidad de la molécula insecticida confiriendo al insecto resistencia a tal compuesto.

De esta manera las bases bioquímicas (fenotipo) de la resistencia incluirían (Oppenoorth, 1985; Soderlund & Bloomquist, 1990; Mc Kenzie, 1996):

- Cambios en el comportamiento que disminuyan el tiempo de exposición.
- Penetración epitelial reducida.
- Aumento de la tasa de detoxificación del insecticida.
- Modificaciones del sitio de acción que reducen su interacción con el insecticida.
- Aumento en la tasa de excreción o de almacenamiento del tóxico.

Los mecanismos bioquímicos que desarrollan los más altos niveles de resistencia y los más estudiados son el aumento de la detoxificación y la modificación en el sitio de acción (Oppenoorth, 1985; Roush & Tabashnik, 1990; Mc Kenzie, 1996). Penetración epitelial reducida, aumento de la excreción o almacenamiento y cambios comportamentales producen

bajos niveles de resistencia y son poco comunes (Cochran, 1995) o poco estudiados (Oppenoorth, 1985; Sparks *et al*, 1989).

Los eventos a nivel genético que subyacen a estos mecanismos bioquímicos de resistencia (genotipo) involucran (Oppenoorth, 1985; Roush and Tabashnik, 1990; Mc Kenzie, 1996):

- **Modificaciones en genes estructurales:** Los productos de expresión serían enzimas detoxificantes con mayor afinidad por el tóxico o sitios de acción con menor afinidad por el tóxico.
- **Amplificación génica.** En genes que codifican enzimas detoxificantes habría una sobreexpresión del gen y un aumento en la cantidad de estas enzimas.
- **Cambios en patrones de expresión (regulación transcripcional):** Modificaciones en regiones promotoras o genes reguladores resultando en mayor cantidad de enzimas detoxificantes o cambios en la cantidad de sitios de acción.
- **Procesos regulatorios post-transcripcionales,** como estabilización de ARN mensajero, resultando en una mayor síntesis de proteínas detoxificantes

#### **a) Aumento de la tasa de detoxificación.**

Tasas de detoxificación superiores a las ocurridas en las poblaciones susceptibles pueden deberse a cambios cualitativos o cuantitativos en el conjunto de enzimas que detoxifican insecticidas. Esto es, modificaciones que aumenten la afinidad de las enzimas por el tóxico (cambio cualitativo) y modificaciones que aumenten el número de las enzimas involucradas en el proceso de detoxificación (cambio cuantitativo). En el primer caso estarían involucradas mutaciones en los genes estructurales de las enzimas y en el segundo caso estarían involucradas mutaciones que afectan los patrones de expresión génica de las enzimas detoxificantes o eventos de amplificación génica (Oppenoorth, 1985; Soderlund & Bloomquist, 1990; Mc Kenzie, 1996).

##### **1) Oxidasas.**

El metabolismo oxidativo de xenobióticos es llevado a cabo mayormente por las enzimas P450, también conocidas en la literatura como oxidasas de función mixta (OFM), citocromo P450 monooxygenasas, oxidasas microsomales, etc. El complejo enzimático P450 metaboliza preferencialmente sustratos lipofílicos transformándolos en productos con mayor solubilidad en agua o agregándoles grupos funcionales que permitan las reacciones de conjugación, facilitando su posible excreción. Además del metabolismo de compuestos

foráneos estas enzimas también están involucradas en el metabolismo de ecdisteroides, hormonas juveniles y otros compuestos endógenos. El complejo P450 esta compuesto por una hemo proteína, el citocromo P450, la enzima NADPH-citocromo P450 reductasa y ocasionalmente el citocromo b<sub>5</sub> (Agosin, 1985; Hodgson, 1985; Feyereisen, 1999).

El ciclo catalítico que lleva a la oxidación de un xenobiótico comienza cuando la forma oxidada del citocromo P450 se une al sustrato. Este complejo, citocromo P450-sustrato, recibe un primer electrón y se une a una molécula de oxígeno. Luego de recibir un segundo electrón uno de los átomos de la molécula de oxígeno se inserta en el sustrato, oxidándolo, y el otro átomo de oxígeno se reduce a una molécula de agua. En este ciclo de óxido-reducción la molécula dadora de electrones es el NADPH y la enzima que cataliza la transferencia de electrones desde el NADPH al complejo citocromo P450-sustrato es la NADPH-citocromo P450 reductasa. Además del NADPH, un ocasional dador de electrones en la reducción del citocromo P450 es el citocromo b<sub>5</sub> (Agosin, 1985; Hodgson, 1985; Soderlund & Bloomquist, 1990; Feyereisen, 1999) (Fig. 1).

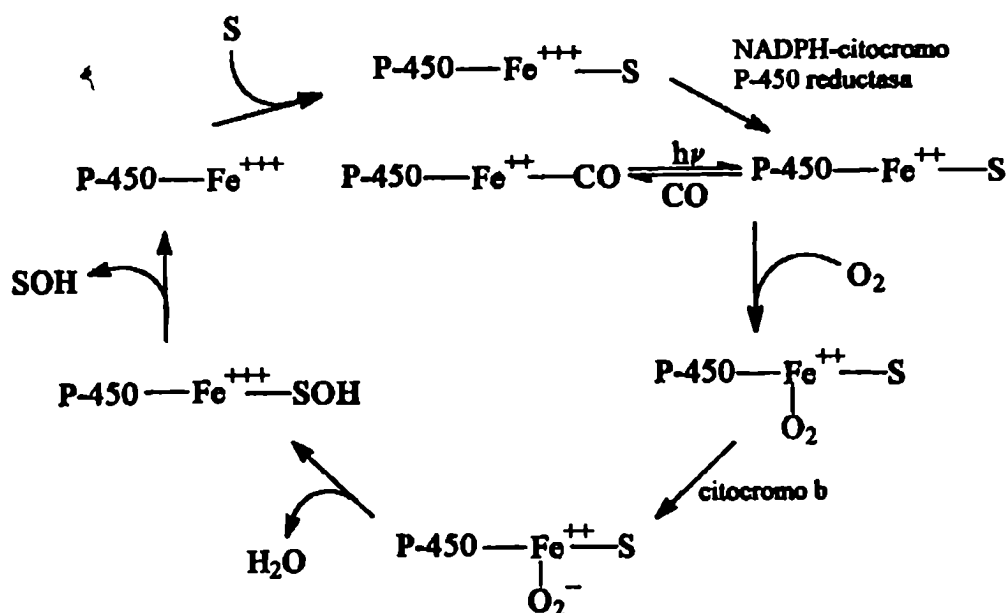


Figura 1. Ciclo catalítico del complejo citocromo P450

Las enzimas P450 tienen un amplio rango de especificidad de sustrato catalizando, entre otras reacciones, hidroxilación de carbonos alifáticos y aromáticos, epoxidación aromática y alifática, *O*-, *N*-, y *S*- dealquilación, *S*-, *P*-, y *N*-oxidación, desulfuración, dehidriclorinación oxidativa, etc. (Agosin, 1985; Hodgson, 1985; Miliburn, 1995, Chambers *et al*, 1995; Feyereisen, 1999). Esta amplitud en el reconocimiento de sustratos se debe

principalmente a la coexistencia de múltiples formas de citocromo P450, donde además cada uno cataliza diferentes reacciones pero con un único patrón de especificidad de sustrato (Agosin, 1985; Soderland & Bloomquist, 1990; Feyereisen, 1999). Teniendo en cuenta esto no sorprende que las enzimas P450 estén involucradas en el metabolismo oxidativo de la mayoría de los insecticidas conocidos (Agosin, 1985; Hogdson, 1985). De esta manera el aumento en la tasa de detoxificación por metabolismo oxidativo dependiente del complejo P450 es uno de los más importantes mecanismos de resistencia a todas las clases de insecticidas (exceptuando, según algunos autores, a los insecticidas clorados ciclodienos (Soderland & Bloomquist, 1990)) en una gran variedad de especies de insectos principalmente dípteros, lepidópteros, ortópteros, coleópteros y hemípteros (Oppenoorth, 1985; Soderland & Bloomquist 1990; McKenzie, 1996; Feyereisen, 1999). A pesar de la importancia destacada en estos párrafos a la capacidad de detoxificación del complejo P450 (y como tal su importancia en la resistencia insecticidas), es importante notar que éstas enzimas metabolizarán un xenobiótico independientemente del destino final del metabolito producido. Esto es, según el xenobiótico, el metabolismo oxidativo puede producir metabolitos menos tóxicos (detoxificación) como así también metabolitos más tóxicos (bioactivación) que el compuesto original. Esto último es la base de la eficiencia de los insecticidas fosforotioatos (activación P=S a P=O) y ciclodienos (activación a epóxidos) (Feyereisen, 1999).

El evento molecular para la resistencia basada en OFM en *Musca doméstica* es una sobre-expresión constitutiva del gen *CYP6A1* (gen del citocromo P450) (Cariño *et al*, 1994; Feyereisen, 1999). Esta sobre-expresión no es causada por eventos de amplificación génica (posiblemente regulación transcripcional o post-transcripcional), y está ligada al cromosoma 2 (Plapp & Wang, 1980; Cariño *et al*, 1994; Feyereisen, 1999). Dado que el gen *CYP6A1* está ubicado en el cromosoma 5 se evidencia la presencia de un factor actuando en *trans* ubicado en el cromosoma 2 que regula la expresión de *CYP6A1* (Feyereisen, 1999). Mutaciones afectando la estructura o expresión de este factor actuando en *trans* modificarán la expresión del gen P450 y en consecuencia la cantidad de citocromo P450 (Cariño *et al*, 1994; Hemingway *et al*, 1998; Feyereisen, 1999).

## 2) Hidrolasas - Esterasas.

Las esterazas o hidrolasas son un grupo heterogéneo de enzimas para las cuales es difícil tener una clasificación única. Principalmente catalizan la hidrólisis de grupos carboxilesteres, fosfoésteres y otros ésteres por lo que están directamente involucradas en la detoxificación de moléculas que presentan tales grupos como los insecticidas

organofosforados, carbamatos y piretroides (Fig. 2) (Deuterman, 1976 y 1985; Oppenoorth, 1985; Soderlund & Bloomquist, 1990). El aumento en la tasa de hidrólisis catalizada por estas enzimas es una de las principales bases bioquímicas que subyace al desarrollo de poblaciones de insectos resistentes a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides (Oppenoorth, 1985; Soderlund & Bloomquist, 1990). Las hidrolasas en insectos existen en múltiples formas y es probable que unas pocas de estas enzimas participen en la degradación de insecticidas (Soderlund y Bloomquist, 1990).

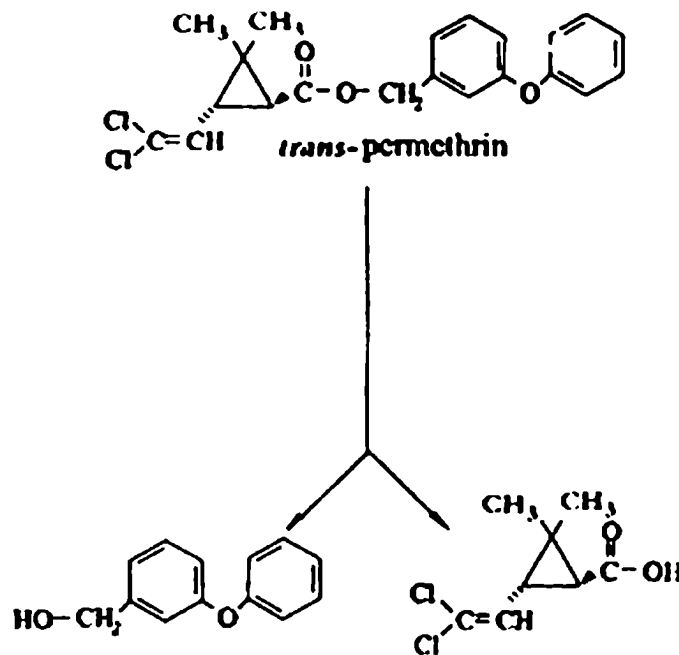


Figura 2. Hidrólisis del grupo éster del piretroide *trans*-permethrina.

Modificaciones estructurales de las esterasas han sido propuestas como mecanismo molecular para este tipo de resistencia. Tal es el caso de la enzima malatión carboxilesterasa en el contexto de la hipótesis "alíesterasa mutante". Según esta hipótesis, mutaciones en el gen estructural de una esterasa no específica produce una enzima alterada con alta actividad malatión-carboxilesterasa y una concomitante pérdida de actividad hacia  $\alpha$ -naftol (actividad no específica), resultando en un incremento en la hidrólisis del insecticida (Oppenoorth, 1985; Roush & Tabashnik, 1990; McKenzie, 1996). Como evidencia a favor de la teoría "alíesterasa mutante", se ha reportado la existencia de una sustitución aminoacídica (Gli-137-Asp) en el producto del gen de esterasa  $\alpha$ -E7. Esta sustitución está asociada a una pérdida de actividad alíesterasa y es responsable de una ganancia de función (organofosforo-hidrolasa) de la enzima mutante (Feyereisen, 1999).



Se ha demostrado también la existencia de sobreexpresión de esterasas en varias especies de insectos. Dos mecanismos no exclusivos explican tal sobreexpresión. El primer mecanismo involucra eventos de amplificación en *Myzus persicae*, *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus*, etc (Devonshire, 1991; Devonshire *et al.*, 1998; Raymond & Pasteur, 1996; Raymond *et al.*, 1998; Hemingway *et al.*, 1998). El segundo mecanismo involucra modificaciones en los patrones de expresión génica de estas enzimas (Hemingway *et al.*, 1998; Raymond *et al.*, 1998).

### **3) Glutación-S-Transferasas.**

Glutación-S-transferasa cataliza el ataque nucleofílico del tripéptido glutatión sobre una variedad de sustratos reactivos. Estas enzimas son de particular importancia en el metabolismo de insecticidas organofosforados en los cuales el grupo alquil o aril de la molécula insecticida puede ser separado. En el caso de este grupo de insecticidas los datos sugieren que existen varios tipos de glutatión-S-transferasa y que los altos niveles de actividad enzimática en insectos resistentes resulta de una sobre-expresión de una o más formas de estas enzimas (Oppenoorth, 1985; Soderlund & Bloomquist, 1990). En este contexto se ha encontrado en *Musca domestica* secuencias de ADN amplificadas no encontradas en las cepas susceptibles (Mouches, 1985; Roush y Tabashnik, 1990). Por otro lado, y no excluyente, se documentó la presencia de un factor en el cromosoma 2 de *M. domestica* actuando en *trans* que regula la expresión de genes de esta familia de enzimas glutatión-S-transferasas (genes *Md-GST-1* y *Md-GST-3*). Inclusive se especula que sea el mismo factor regulador de las OFM (ver más arriba en esta introducción) que tendría un efecto pleiotrópico involucrando la sobre-expresión de OFM y GSTs (Plapp & Wang, 1980; Hemingway *et al.*, 1998; Feyereisen, 1999).

Datos de actividad DDT-dehidroclorinasa asociada picos de actividad GSTs parcialmente purificadas en *M. domestica* y *Anopheles gambiae* sugieren que la DDT-asa (DDT-dehidroclorinasa) es una de varias GSH-transferasas (Roush & Tabashnik, 1990; McKenzie, 1996; Hemingway *et al.*, 1998).

## **b) Modificación en el sitio de acción**

### **1) Acetilcolinesterasa**

Los insecticidas organofosforados y carbamatos ejercen su acción neurotóxica inhibiendo a la enzima acetilcolinesterasa. La función de esta enzima es la rápida hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina luego de la transmisión del impulso nervioso en la sinapsis

colinérgica. De esta forma estos insecticidas prolongan el tiempo de acción de la acetilcolina sobre sus receptores en la membrana post-sináptica produciendo una hiperexcitación seguida de un bloqueo de la transmisión del impulso nervioso. En los insectos, el sistema colinérgico se encuentra presente sólo en el sistema nervioso central (Eldefrawi, 1985).

La presencia de acetilcolinesterasa menos sensible a la inhibición por organofosforados y carbamatos ha sido descrita en varias cepas resistentes de insectos y ácaros (Oppenoorth, 1985; Roush & Tabashnik, 1990; McKenzie, 1996; Devonshire *et al.*, 1998; Nomura *et al.*, 2000).

## 2) Canal de Sodio dependiente de Voltaje

Insecticidas como el DDT y sus análogos, piretrinas naturales y piretroides, ejercen su modo de acción tóxica sobre el canal de sodio dependiente de voltaje responsable de generar el impulso nervioso a través del potencial de acción (otros sitios pueden ser afectados pero su relación con el efecto letal permanece oscura) (Osborne & Pepper, 1992; Soderlund, 1995).

El canal de sodio dependiente de voltaje es una proteína de membrana de las neuronas. Todos los canales de sodio estudiados presentan una subunidad glicoproteica  $\alpha$  (240 - 280 KDa) (puede haber en algunos casos dos subunidades mas  $\beta 1$  y  $\beta 2$ ). Esta subunidad  $\alpha$  tiene cuatro dominios homólogos repetidos con un arreglo radial formando el poro para el ión. Cada dominio consiste en 6 segmentos transmembranas (Zlotkin, 1999; Bloomquist, 1996) (Figura 3)

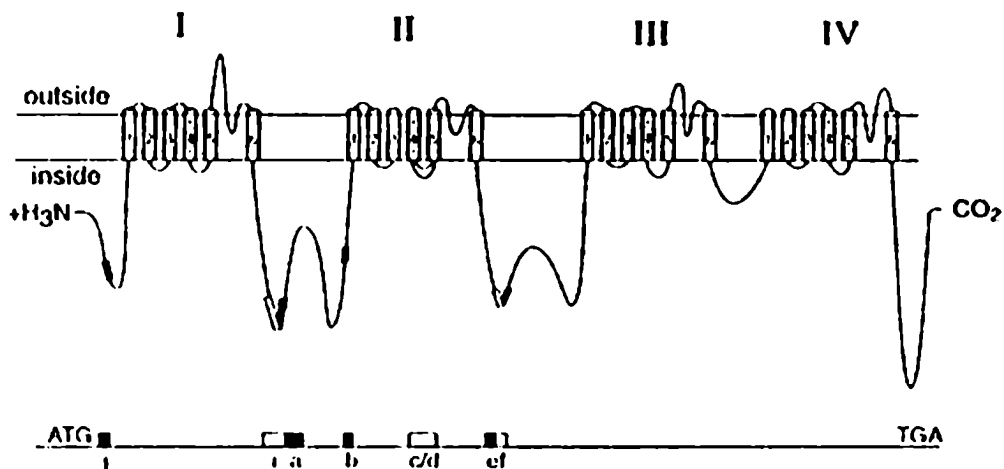


Figura 3. Representación esquemática del arreglo transmembrana de la subunidad  $\alpha$  del *para* canal de sodio dependiente de voltaje de *Drosophila melanogaster*.

Los cambios en la permeabilidad del ión sodio durante la generación de un potencial de acción implican dos procesos dependiente de voltaje: Activación (incremento inicial en la permeabilidad del sodio) e inactivación (regreso de la permeabilidad del sodio a su nivel inicial). Durante estos procesos el canal de sodio se encuentra en una de tres formas: cerrado (susceptible de ser activado por el voltaje), abierto o inactivado (cerrado y resistente a ser activado por el voltaje) (Bloomquist, 1996; Zlotkin, 1999). Modificaciones en algunos de estos tres estados harían perder la funcionalidad al canal de sodio voltaje dependiente y por consiguiente alterarían la propagación del impulso nervioso en el organismo. El insecticida DDT y sus análogos y todos los piretroides actúan afectando la cinética de inactivación del canal de sodio dependiente de voltaje (Soderlund, 1995; Bloomquist, 1996; Zlotkin, 1999).

En 1951, se observó resistencia a la rápida acción de volteo y al efecto letal de DDT y piretroides en *M. doméstica* y el fenómeno fue denominado en inglés como knockdown resistance (resistencia al efecto de volteo). El gen asociado a este tipo de resistencia en *M. doméstica* es un alelo recesivo denominado *kdr* (knockdown resistance) localizado en el cromosoma 3. En 1978 en otra cepa de *M. doméstica* fue identificado un factor con las mismas características que el *kdr* (resistencia al volteo, recesivo, en el cromosoma 3 y resistencia cruzada entre DDT y piretroides) pero que confiere un mayor nivel de resistencia que el *kdr*, y fue denominado *super-kdr*. Resistencia similar al *kdr* (*kdr-like*) fue encontrada en dípteros, lepidópteros y dictiópteros (Oppenoorth, 1985; Soderlund & Bloomquist, 1990; Osborne & Pepper, 1992).

Según los estudios de caracterización fisiológica utilizando preparaciones de diferentes estructuras del sistema nervioso de adultos y larvas de cepas *kdr* y *super kdr*, estos tipos de resistencia se encuentran asociados a una reducida sensibilidad del sistema nervioso de los insectos a los efectos neuroexcitatorios del DDT y de los piretroides (Oppenoorth, 1985; Soderlund & Bloomquist, 1990; Bloomquist, 1996).

Existen tres hipótesis que explican la reducción en la sensibilidad del sistema nervioso a estos insecticidas: Menor densidad de canales de sodio dependiente de voltaje en las membranas de las células nerviosas, alteraciones en la fluidez de las membranas plasmáticas de las neuronas, y mutaciones que ocasionan cambios estructurales en los canales de sodio dependiente de voltaje. Se han encontrado fuertes evidencias a favor de la tercera hipótesis (Soderlund & Bloomquist, 1990; Bloomquist, 1996; Zlotkin, 1999).

Los análisis genéticos demostraron que este tipo de resistencia está ligada al gen *para*-tipo canal de sodio dependiente de voltaje, subunidad  $\alpha$ . Los estudios comparativos de secuencias de este gen en *M. doméstica* y genes homólogos en otros insectos entre cepas

susceptibles y cepas tipo-*kdr* han descrito mutaciones puntuales y una serie de sustituciones de aminoácidos asociadas los fenotipos *kdr* (tipo *kdr*) y *super kdr* (tipo *super-kdr*). (Zlotkin, 1999; Lcc *et al.*, 2000; Valles *et al.*, 2003; Tomita, 2003).

### 3) Receptores GABA

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es el mayor neurotransmisor inhibitorio tanto en insectos como en mamíferos. Existe amplia evidencia bioquímica y fisiológica que sugiere que los insecticidas organoclorados ciclodienos y lindano ejercen su efecto neurotóxico interactuando con el componente canal de cloro del receptor GABA. De esta manera bloquean el flujo de iones cloruro dependiente de GABA y la consiguiente función inhibitoria del neurotransmisor (Soderland & Bloomquist, 1990; Bloomquist, 1999; ffrench-Constant *et al.*, 2000).

La resistencia a insecticidas ciclodienos y lindano asociada a reducida sensibilidad neuronal ha sido descrita en varios insectos (Soderlund & Bloomquist, 1990; McKenzie *et al.*, 1998, Bloomquist, 1999; ffrench-Constant *et al.*, 1996; ffrench-Constant *et al.*, 2000). Estudios bioquímicos, fisiológicos y moleculares relacionan la reducida sensibilidad neuronal a alteraciones estructurales en el sitio de reconocimiento a insecticidas ciclodienos en el canal de cloruro del receptor GABA (Bloomquist, 1999; ffrench-Constant *et al.*, 1998; ffrench-Constant *et al.*, 2000). En *Drosophila melanogaster* la resistencia a dieldrin ha sido asociada al locus *rdd* (resistance to dieldrin) mapeado en cromosoma 3. Este gen codifica una subunidad del receptor GABA de insectos. Estudios de secuenciación sobre el gen *rdd* en *D. melanogaster* y regiones homólogas en varias especies de insectos han descrito el reemplazo de alanina 302 (posición en *D. melanogaster*) por serina o glicina (ffrench-Constant *et al.*, 1996; ffrench-Constant, 1998; ffrench-Constant *et al.*, 2000).

## INSECTICIDAS PIRETROIDES

### I-DESCRIPCIÓN

Los insecticidas piretroides son variantes sintéticas y más estables de las piretrinas naturales. Las piretrinas son los constituyentes tóxicos que se encuentran en el extracto de Piretro, el cual se obtiene de las flores de *Chrysanthemum* spp. Las piretrinas son seis ésteres formados por la combinación de dos ácidos, el ácido crisantémico y el ácido pirétrico, con tres alcoholes (rotrelonas): piretrolona, cinerolona y jasmolona (Fig. 3). Los ésteres del ácido crisantémico (piretrinas I) son piretrina I, cinerina I y jasmolina I, y los ésteres del ácido pirétrico (piretrinas II) son piretrina II, cinerina II y jasmolina II (Elliot, 1995; Casida & Quistad, 1995; Perry *et al.*, 1998) (Fig. 4).

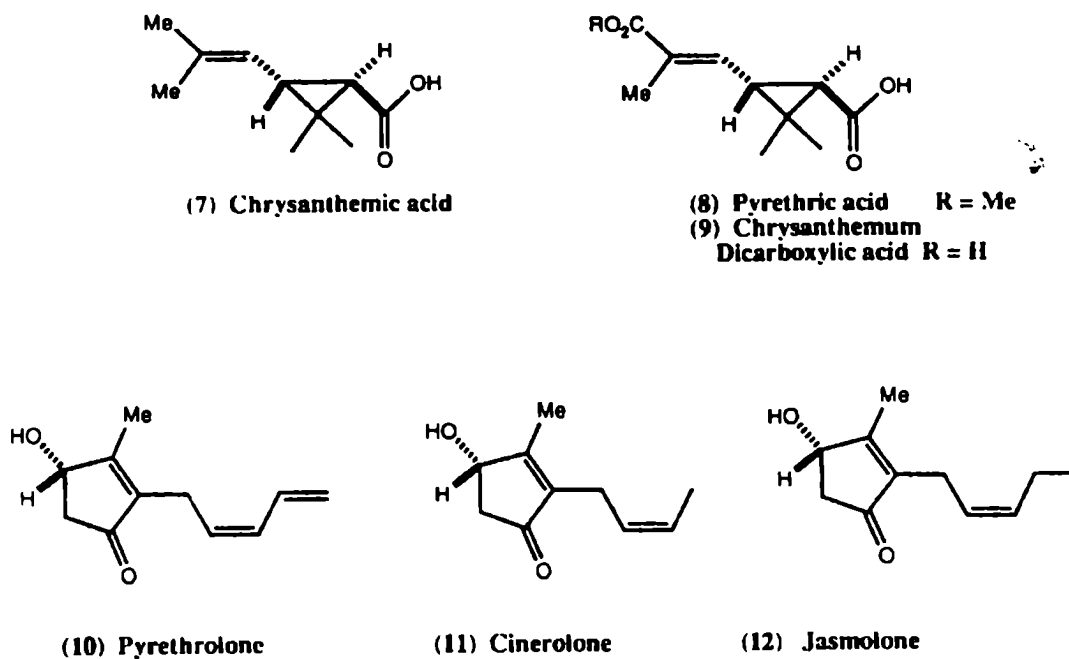


Figura 3. Ácidos y alcoholes componentes de las piretrinas naturales

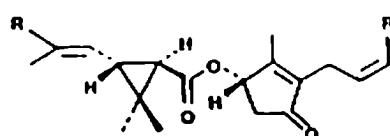
Modificaciones en los componentes alcohol y ácido de las piretrinas llevó al desarrollo de piretroides sintéticos con mayor fotoestabilidad, más activos contra insectos y menos tóxicos para mamíferos (Elliot, 1995; Perry *et al.*, 1998). Halogenaciones en el grupo isobutenil y el desarrollo de  $\alpha$ -isopropilfenilacetatos en el componente ácido; y el desarrollo de 3-fenoxibencil alcohol y el agregado de un sustituyente  $\alpha$ -ciano en el componente alcohol permitieron el desarrollo de efectivos piretroides como permetrina, cipermetrina, deltametrina y fenvalerato (Elliot, 1995). Generalizando, los piretroides són ésteres de ácidos 3-sustituidos-

2,2-dimetilciclopropanocarboxílico (o ácidos isoestéricos careciendo del ciclopropano) y un alcohol apropiado conteniendo una o más insaturaciones (Fig. 5) (Soderlund *et al.*, 1983, Elliot, 1995).

Mas tarde, la combinación de estructuras activas comunes de algunos piretroides ésteres llevó al desarrollo de los piretroides no ésteres (Elliot, 1995).

"pyrethrins I" — esters of chrysanthemic acid (chrysanthemates)

pyrethrin I	CH <sub>3</sub>	CH=CH <sub>2</sub>
cinerin I	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
jasmolin I	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>



"pyrethrins II" — esters of pyrethric acid (pyrethrates)

pyrethrin II	CH <sub>3</sub> OC(O)	CH=CH <sub>2</sub>
cinerin II	CH <sub>3</sub> OC(O)	CH <sub>3</sub>
jasmolin II	CH <sub>3</sub> OC(O)	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>

Figura 4. Piretrinas I y II

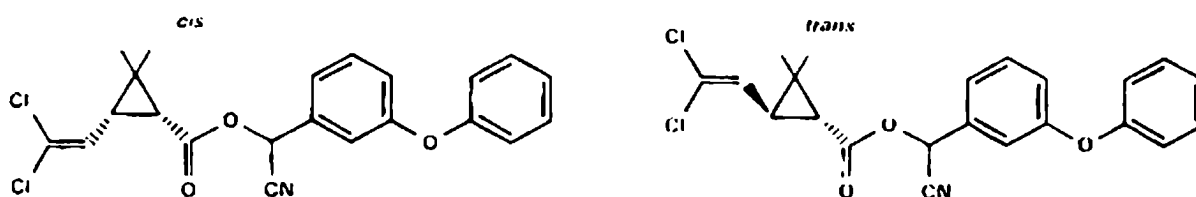


Figura 5. Piretroide estable cipermetrina

## II-MODO DE ACCIÓN

La caracterización química, farmacológica y toxicológica de las piretrinas y piretroides ha permitido clasificarlos en piretroides tipo I y tipo II. Esta distinción fue originalmente basada en los diferentes síntomas en intoxicación aguda en mamíferos (Soderlund, 1995). Los compuestos tipo I incluyen piretrinas naturales y piretroides que contienen desciano-3-fenoxibencil alcohol u otro alcohol y causan temblor o síndrome T. Los piretroides tipo II son compuestos que son ésteres del  $\alpha$ -ciano-3-fenoxibencil alcohol y producen coreoatetosis con intensa salivación o síndrome CS (fig. 6) (Soderlund, 1995; Bloomquist, 1996; Zlotkin, 1999). Compuestos tipo I y tipo II también producen diferentes signos de intoxicación en insectos, pero menos distinguibles que aquellos observados en mamíferos. Esta clasificación

de los piretroides no es absoluta y existen compuestos que muestran efectos intermedios entre las dos clases (Soderlund, 1995; Bloomquist, 1996; Zlotkin, 1999).

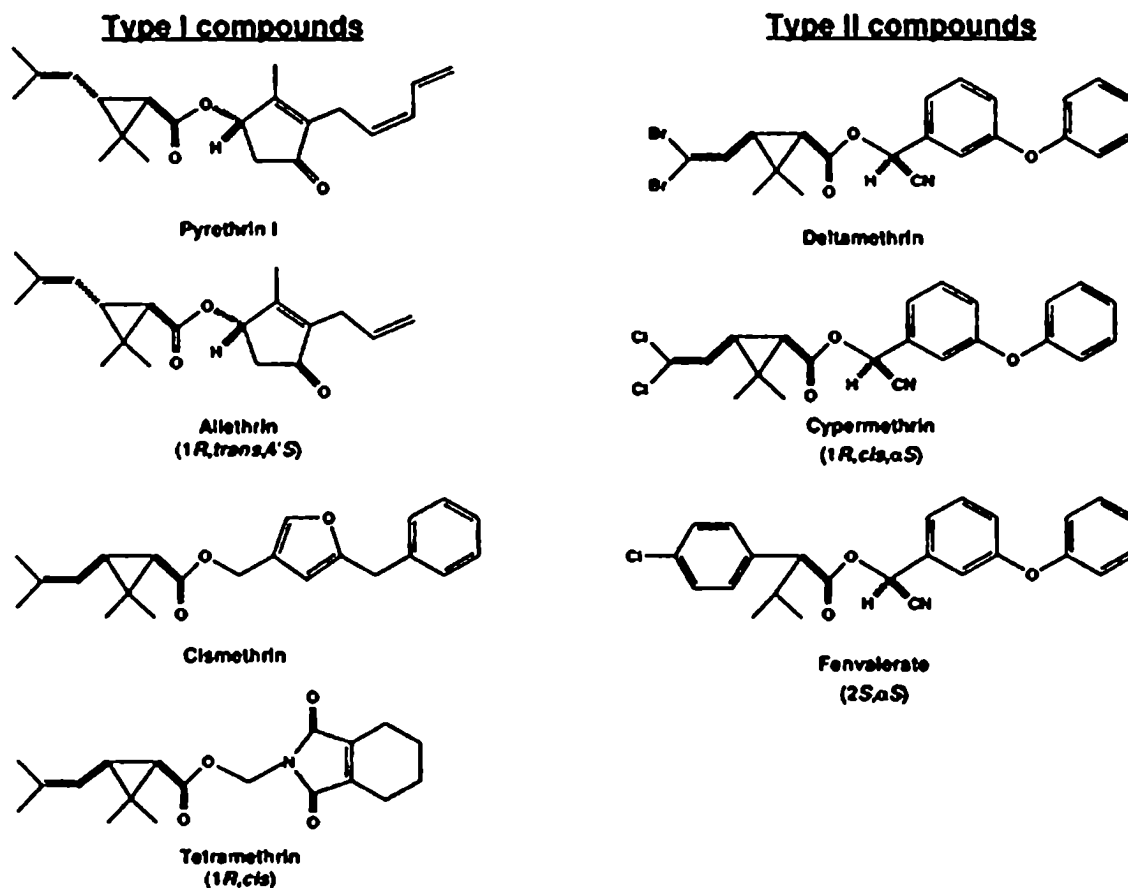


Figura 6. Piretroides tipo I y tipo II

Los estudios neurofisiológicos evidencian que la intoxicación por los piretroides se debe a potentes efectos sobre el sistema nervioso central y periférico (Soderlund, 1995; Bloomquist, 1996; Perry *et al.*, 1998; Zlotkin, 1999). Registros intracelulares en axones de invertebrados y vertebrados mostraron distintos efectos de los piretroides sobre la propagación de potenciales de acción. Los piretroides tipo I producen un negativo “after-potencial” (un período de depolarización al final del potencial de acción) causando descargas repetitivas de potenciales de acción con un solo estímulo. Los piretroides tipo II causan una depolarización del potencial de membrana de reposo (dependiente del estímulo), reducción de la amplitud del potencial de acción y pérdida de la excitabilidad eléctrica. Los efectos de los piretroides tipo I a altas concentraciones son similares a los tipo II. (Soderlund, 1995; Bloomquist, 1996). Algunos pocos compuestos mostraron acciones intermedias o combinadas entre estos dos tipos. Estos efectos también se evidencian en los terminales motores donde los piretroides tipo I causan descargas repetitivas presinápticas y los piretroides tipo II causan una

liberación tónica de neurotransmisores indicativo de la depolarización estímulo dependiente (Bloomquist, 1996). La acción directa sobre las células musculares esqueléticas y cardíacas de mamíferos e incremento en la actividad eléctrica en algunas estructuras sensoriales estaría inducida por ambos tipos de piretroides, siendo los más potentes los piretroides tipo II (Bloomquist, 1996).

Los estudios de “voltage clamp” y “patch clamp” demostraron los mecanismos subyacentes a los efectos de los piretroides sobre la excitabilidad de las membranas y sugieren que estos efectos resultan de la acción de los piretroides sobre al canal de sodio voltaje dependiente (Soderlund, 1995; Bloomquist, 1996; Zlotkin, 1999). La corriente de sodio es el componente del potencial de acción que es afectado por piretroides. Estos compuestos prolongan en el tiempo la corriente de entrada de iones sodio como consecuencia de que alteran la cinética de inactivación del canal de sodio. Los canales afectados por piretroides no muestran alteraciones en la conductancia ni en la activación dependiente de voltaje. El prolongado estado abierto del canal de sodio genera una persistente corriente de entrada de iones sodio (tail current), aún cuando la membrana se haya repolarizado, afectando el normal comportamiento de la membrana nerviosa (fig. 7) (Soderlund, 1995; Bloomquist, 1996, Perry *et al.*, 1998).

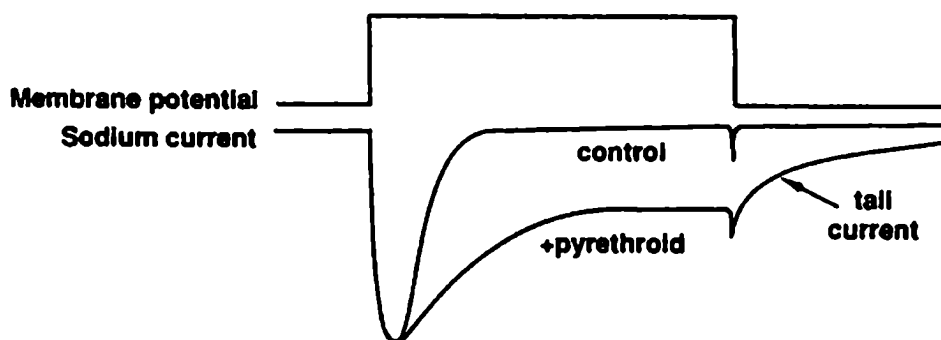


Figura 7. Efecto de los piretroides sobre la corriente de sodio. El insecticida genera una persistente corriente de entrada de sodio.

La tasa de inactivación del canal de sodio y la duración de la corriente de sodio asociada es menor en los piretroides tipo I que en los tipo II, esto explicaría las diferencias electrofisiológicas y de síntomas de intoxicación entre estos piretroides (Soderlund, 1995). El tiempo que permanece abierto el canal de sodio en los piretroides tipo I produce el negativo “after potential” y las consecuentes descargas repetitivas pero no compromete el potencial de reposo de la membrana. La mayor duración del canal en estado abierto en los piretroides tipo II compromete el potencial de reposo de la membrana axonal: la estimulación repetitiva



incrementa el número de canales en alterado estado abierto que resulta en una depolarización dependiente del estímulo y el bloqueo de la conducción (Soderlund, 1995; Bloomquist, 1996).

Estudios sobre la bioquímica y farmacología del canal de sodio dependiente de voltaje mostraron fuertes evidencias a favor de este canal como el sitio de acción de los piretroides y sugieren la existencia de un sitio de unión a la proteína canal único para pirterinas, piretroides y DDT (punto I b) 2) en esta introducción; Soderlund, 1994; Bloomquist, 1996; Zlotkin, 1999).

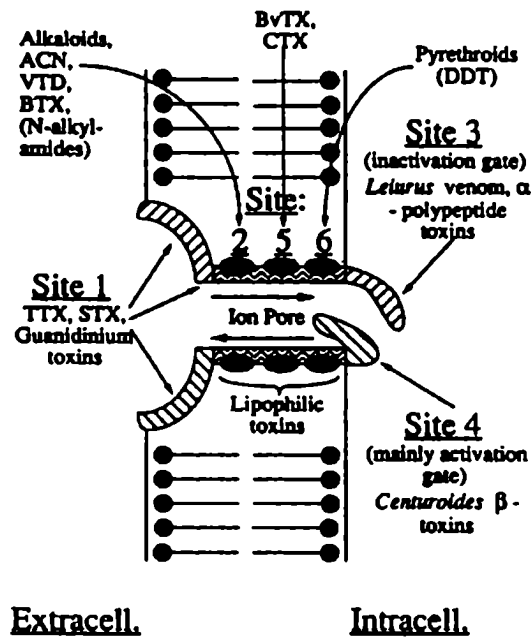


Figura 8. Esquema del canal de sodio dependiente de voltaje mostrando los sitios de unión para distintos tóxicos. Se muestra la existencia de un sitio de unión único para piretroides y DDT.

Finalmente se debe destacar que varias investigaciones han sugerido adicionales sitios de acción de piretroides tales como canales de calcio dependiente de voltaje, receptores GABA, receptores de acetilcolina, ATP-asas dependientes de sodio y calcio y reacciones presinápticas de fosforilación dependientes de calcio (Osborne & Pepper, 1992; Osborne *et al.*, 1995).

### III-METABOLISMO

Numerosos estudios de metabolismo *in vivo* (utilizando piretroides marcados radioactivamente) e *in vitro* (utilizando homogenatos o subfracciones de homogenatos) han permitido conocer las vías metabólicas y los sistemas enzimáticos degradativos para varios insecticidas piretroides en insectos. En general, el patrón metabólico de piretroides en insectos

es similar al estudiado en mamíferos pero con tasas metabólicas más bajas, lo cual explica en parte la mayor toxicidad de los piretroides en insectos comparado con mamíferos (Figs. 8 y 9) (Soderlund *et al.*, 1983; Chambers *et al.*, 1995; Millburn, 1995; Casida & Quistad, 1995; Perry *et al.*, 1998).

Las reacciones de Fase I y Fase II encontradas en diferentes especies de insectos y para diferentes piretroides serían:

**a) Piretrinas I y II, y Alletrina:**

*Hidroxilaciones alifáticas:* hidroxilaciones en los grupos metilos del sustituyente isobutenilo del ester intacto. No hay hidrólisis del éster (Soderlund *et al.*, 1983; Chambers *et al.*, 1995; Perry *et al.*, 1998)

**b) Piretroides** (Soderlund *et al.*, 1983 ; Chambers *et al.*, 1995; Millburn, 1995; Perry *et al.*, 1998):

*Hidrólisis:* Hidrólisis del ester dando el ácido y el alcohol correspondiente

*Hidroxilaciones alifáticas:* hidroxilación de los grupos metilos del sustituyente isobutenilo y/o hidroxilación de los grupos metilos del anillo ciclopropano. Ocurren tanto en el ester intacto como en el ácido derivado de la hidrólisis del éster.

*Hidroxilaciones aromáticas:* hidroxilación de los anillos aromáticos, ocurren tanto en el éster intacto como en el alcohol liberado de la hidrólisis del éster.

*Conjugación:* Conjugación del éster intacto (luego de hidroxilación) o del alcohol y el ácido provenientes de la hidrólisis del éster (luego de hidroxilación) con aminoácidos o glucosa.

En general los isómeros *trans* son metabolizados más rápidamente que los isómeros *cis*. Relacionado a esto último la hidrólisis del éster ocurre, en general, a una tasa mayor en los isómeros *trans* que en los isómeros *cis* (Soderlund *et al.*, 1983; Perry *et al.*, 1998).

Los principales sistemas enzimáticos que metabolizan piretroides en insectos son *hidrolasas* (también llamadas piretroides esterasas) involucradas en la hidrólisis del éster, y *oxidadasas* (referidas como complejo P450, monooxigenasas, oxidadasas de función mixta) involucradas en las distintas hidroxilaciones y también en la hidrólisis del éster (Dauterman, 1976; Soderland *et al.*, 1983; Chambers *et al.*, 1995; Millburn, 1995; Perry *et al.*, 1998).

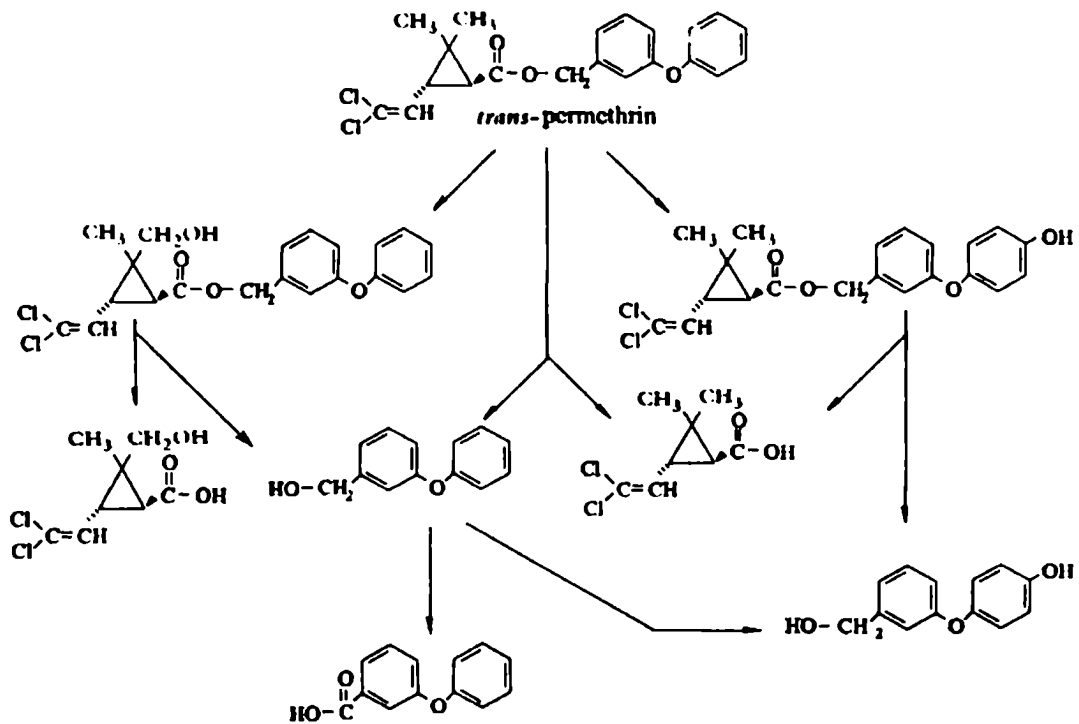


Figura 9. Metabolismo de *trans*-permethrina en mamíferos.

#### IV-RESISTENCIA A PIRETROIDES

De acuerdo a lo visto en la sección sobre resistencia, los mecanismos bioquímico-fisiológicos más importantes en el desarrollo de resistencia a insecticidas son: aumento de la tasa de detoxificación (metabolismo) o modificación en el sitio de acción. Teniendo en cuenta estos mecanismos y teniendo en cuenta lo referido sobre el modo de acción y el metabolismo de piretroides, se podría esperar que la resistencia a insecticidas piretroides esté basada en el aumento de la actividad de enzimas P450, aumento de la actividad de hidrolasas o modificaciones en el canal de sodio dependiente de voltaje. Cada uno de estos mecanismos por separado o la combinación de más de uno.

Efectivamente, las bases bioquímicas esperadas se corresponden con las observadas en la extensa bibliografía en resistencia a los diversos insecticidas piretroides en una gran variedad de especies de artrópodos (Dauterman, 1976; Oppenoorth, 1985; Roush & Tabashnik, 1990; Soderlund & Bloomquist, 1990; Cochran, 1995; Soderlund, 1995; Bloomquist, 1996; McKenzie, 1996; Feyersen, 1999; Lee *et al.*, 2000).

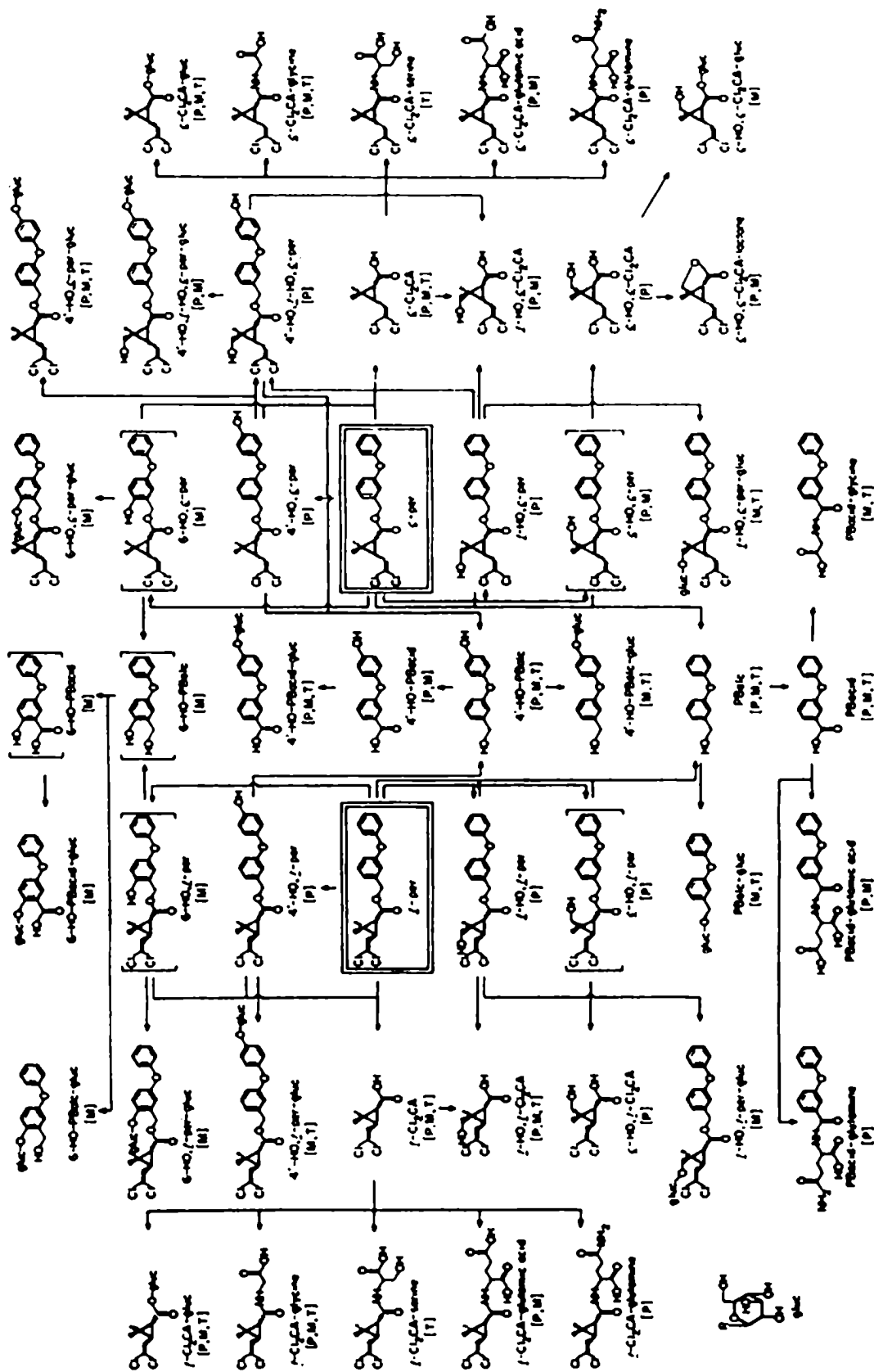


Figura 9. Metabolismo de permtrina en insectos.

### ***Pediculus humanus capitis* Y LA PEDICULOSIS.**

El *Homo sapiens sapiens* es parasitado por tres tipos de piojos: el piojo del cuerpo, el piojo de la cabeza y el piojo del pubis. El último es la especie *Phthirus pubis* (familia Pthiridae) el cual no es considerado en este estudio. Los dos primeros pertenecen a la familia Pediculidae, pero existe una histórica controversia (Buxton, 1948; Kim & Ludwig, 1978; Retana Salazar, 1994; Leo et al, 2002) en ser considerados subespecies hermanas o especies distintas. Los últimos estudios muestran evidencias fuertes para considerar al piojo del cuerpo y al piojo de la cabeza como dos subespecies dentro de la misma especie *Pediculus humanus*, considerándolos como *Pediculus humanus capitis* De Geer 1778 (piojo de la cabeza) (fig. 10) y *Pediculus humanus humanus* Linneo 1758 (piojo del cuerpo) (fig. 11) (2<sup>nd</sup> International Congress on Phthiraptera, 2002, Leo et al, 2002; Salazar, 1994; Barker, 1994).



Figura 10. *P. humanus capitis* hembra



Figura 11. *P. humanus humanus*. hembra

### **I-UBICACIÓN TAXONÓMICA**

*P. humanus* pertenece al Orden Phthiraptera, suborden Anoplura, familia Pediculidae (Kim & Ludwin, 1978). Los Anoplura son ectoparásitos obligados exclusivos de mamíferos euterios (excepto Cetácea, Quiróptera, Edentata, Pholidota y Proboscidea), hematófagos, pasando todos los estadios ontogenéticos sobre el hospedador (Buxton, 1948; Kim & Ludwin, 1978; Barker, 1994). La familia Pediculidae es exclusiva de Primates, y dentro del orden se

encuentra solamente en cébidos, chimpancé y hombre. La familia contiene tres especies, siendo la especie *P. humanus* exclusiva de *H. sapiens sapiens* (Salazar, 1994; Barker, 1994).

## II- BREVE DESCRIPCIÓN DE *P. humanus capitis*

### a) Morfología y biología

Insectos ápteros, deprimidos dorso-ventralmente con clara distinción de cabeza, tórax y abdomen. *Cabeza*: Antenas con 5 segmentos, ojos compuestos reducidos, ocelos ausentes, aparato bucal altamente adaptado al hábito hematófago y retraído dentro de la cabeza. *Tórax*: Pocos signos de segmentación externa, sin rudimentos de alas, un espiráculo torácico. Los tres pares de patas similares, tibia con un apéndice interno tipo “pulgar”, tarso con un solo segmento que termina en una conspicua uña. La morfología y función combinadas de la tibia y el tarso permite al insecto desplazarse por el pelo del hospedador. *Abdomen*: Nueve segmentos visibles. Los machos presentan bandas pigmentadas transversas dorsales. Seis pares de espiráculos (segmentos 3-8). Los últimos segmentos forman la genitalia externa. El abdomen del macho termina redondeado, y el ano y el orificio sexual abren sobre la superficie dorsal. La hembra presenta dos pares de gonopodos en los segmentos 8 y 9 (fig. 12) (Kim & Ludwig, 1978; Buxton, 1948).

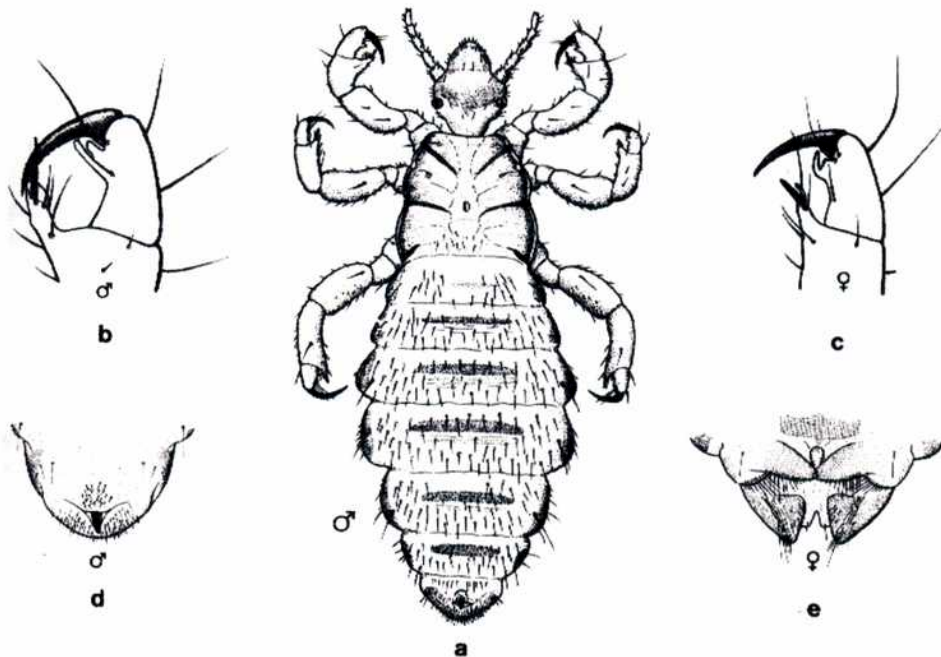


Figura 12. *P. humanus humanus*. a) Macho, visión dorsal. b) y c) tibia y tarso del primer par de patas de macho y hembra respectivamente mostrando dimorfismo sexual. Se observa el “pulgar” de la tibia y la conspicua uña tarsal. d) y e) genitalia externa del macho y la hembra respectivamente.



El *P. humanus capitis* presenta metamorfosis incompleta (estadios inmaduros morfológicamente similares a los adultos) (fig 13). Tres ninfas con un tiempo de desarrollo de entre 10 y 15 días. El tiempo de vida de los adultos es de 30 días. Las hembras ponen entre 5 y 10 huevos por día, oviponiendo 150 a 300 huevos durante su vida reproductiva (Ibarra, 1993; Kettle, 1995). Su hábitat es la cabeza del hombre. Los huevos son pegados a los pelos de la cabeza, cerca del cuero cabelludo, con un cemento secretado por una glándula accesoria de la hembra. (Buxton, 1946; Ibarra, 1993). El huevo queda ubicado paralelo al pelo, con el opérculo opuesto a la raíz del pelo (fig. 14) (Buxton, 1946; Hinton, 1981).

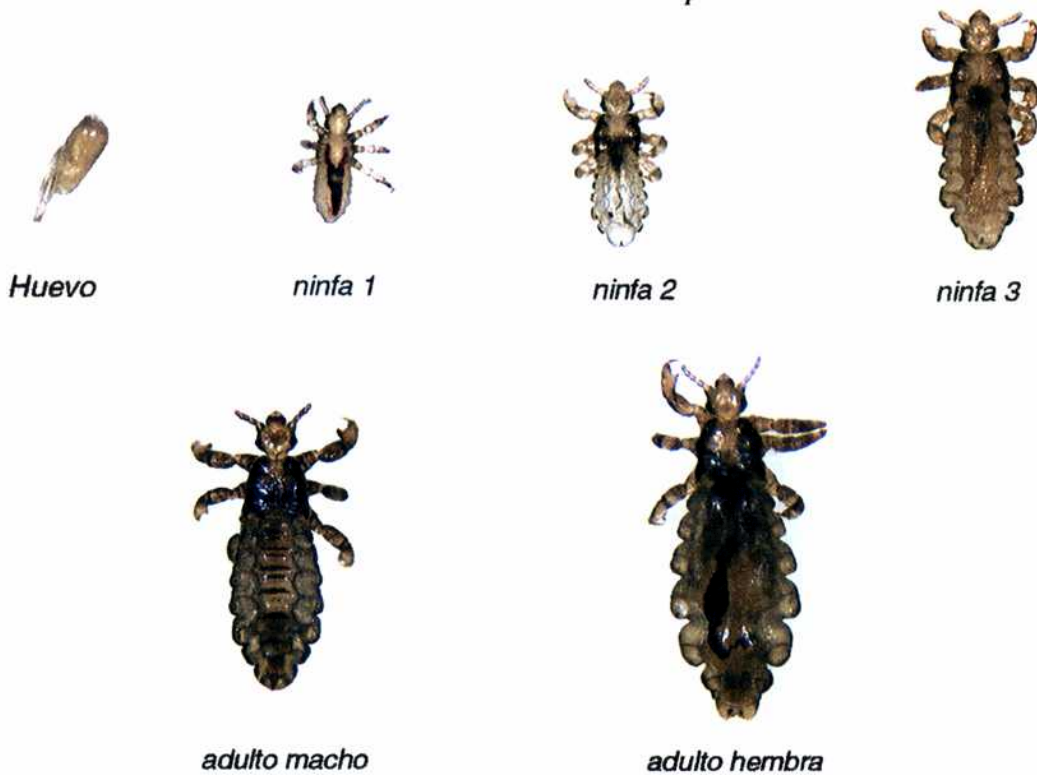


Figura 13. desarrollo ontogenético de *P. humanus capitis*

#### b) Descripción externa del huevo de *P. humanus*

Los huevos de *P. humanus humanus* y *P. humanus capitis* son similares y debido a que las sutiles diferencias son irrelevantes para el presente trabajo, se hará una descripción conjunta. Los huevos de estos piojos son aproximadamente ovales y son bastante grandes en comparación con el tamaño del piojo adulto, cerca de 0,8 mm de largo y 0,3 mm de ancho. Son de color blanco-amarillento y debido a que la cubierta del huevo (*corion*) es transparente, se puede observar el embrión en desarrollo (Buxton, 1946; Kettler, 1995). En el extremo anterior, la cubierta del huevo forma un opérculo, el cual se une al resto del corion en un

borde circular. Cuando la primer ninfa sale del huevo, abre el opérculo el cual, a modo de tapa, se separa del resto del corion a través de la línea de eclosión ubicada a nivel del borde circular mencionado (Buxton, 1946; Hinton, 1981). En general el opérculo no se desprende completamente sino que queda unido en algún punto al resto del huevo. El opérculo contiene grandes cámaras llenas de aire con poros que comunican el medio externo con el espacio subcoriónico en contacto con el embrión. Esto permite el acceso de oxígeno atmosférico al embrión funcionando como un sistema respiratorio (Hinton, 1981). Según algunos autores estas cámaras son verdaderos *aeropilos* (poros a través del corion que permiten el acceso de oxígeno al interior del huevo) (Berman *et al.*, 1979; Hatsushika *et al.*, 1983; Burkhart *et al.*, 1999). Según Hinton (1981) en el fondo de estas cámaras se encuentran los *micropilos* (poros por donde entra el espermatozoide). El número de cámaras es variable, entre 6 y 11 por opérculo (Buxton, 1946; Hinton, 1981; Burkhart *et al.*, 1999). En el resto del corion no hay poros (aeropilos) aparentes (Berman, *et al.*, 1979). Todo el huevo, menos el opérculo, está cubierto por el cemento de fijación al pelo secretado por la hembra (Buxton, 1946; Burkhart *et al.*, 1999).



Figura 14. Huevo de *P. humanus capitis*.



### III-IMPORTANCIA SANITARIA DEL *P. humanus capitis* y *P. humanus humanus*

El *P. humanus capitis* es el agente causal de la ectoparasitosis de la cabeza o pediculosis. La pediculosis es una enfermedad endémica con distribución mundial que ha crecido significativamente desde los años 60 (Gratz, 1997). Según Ibarra (1993) el Center for Disease Control (CDC, EEUU) encontró más casos de pediculosis entre chicos de edad escolar que de todas las otras enfermedades transmisibles combinadas, exceptuando al resfrío común y en Gran Bretaña se ha reportado una incidencia de entre 21 % y 63 % en las escuelas. En Argentina Abrahamovich *et al.* (1995) encontraron en Buenos Aires que el 46 % de las niñas de 2 a 12 años estaban infestadas con *P. humanus capitis* mientras que en escuelas públicas de la ciudad de Córdoba Doucet *et al.* (1997) encontraron una tasa de infestación de 45,32 % en niños de 5 a 14 años.

Las infestaciones con *P. humanus capitis* (también con *P. humanus humanus*) causan picazón y diversos tipos de reacciones en la piel. Esto es debido principalmente a los componentes de la saliva del piojo que es introducida en los tejidos del huésped, particularmente la secreción de la glándula salival anterior o glándula reiforme (Buxton, 1946). Sin embargo antes de que estos signos se hagan presentes se evidencia la irritación causada por las heces de los piojos (Ibarra, 1993). La exposición continua a las picaduras produce sensibilización con aparición de pápulas, vesículas y otro tipo de reacciones; aunque existe considerable variación individual en este tipo de manifestaciones (Buxton, 1946; Ibarra, 1993; Kislansky, 1999). Infecciones secundarias pueden ocurrir debidas principalmente a las heridas producidas por el intenso rascado de los infestados (Buxton, 1946).

La exclusión social de individuos o familias infestadas con *P. humanus capitis*, “los piojosos”, representa un problema social adicional a aquellos problemas estrictamente de salud. Tener piojos está asociado al viejo mito según el cual los piojos proliferan en la suciedad, siendo entonces “el piojoso” una persona que descuida el aseo personal (Ibarra, 1993).

Tres agentes causales de enfermedades en humanos son transmitidos por *P. humanus humanus*: *Rickettsia prowazeki* (multiplicación intracelular en células del intestino del piojo), agente causal del tifus epidémico; *Rickettsia quintana* (*Bartonella quintana*, *Rochamili-maea quintana*) (multiplicación extracelular en lumen del intestino del piojo) agente causal de la fiebre de las trincheras y *Borrelia recurrentis* (multiplicación en hemolinfa del piojo) agente causal de la fiebre recurrente epidémica (Buxton, 1946; Joklik, *et al.*, 1987; Ibarra, 1993; Dash, 2002). Es particularmente interesante conocer el rol que ha tenido el tifus epidémico en

ciertos momentos de la historia de la humanidad. El tifus epidémico fue decisivo en la derrota de las armas de Napoleón que invadieron Rusia. Las enfermedades, de las cuales el tifus epidémico fue la de mayor importancia, más que la oposición militar rusa derrotaron a Napoleón durante su marcha hacia el este europeo. La hambruna de la papa en Irlanda en la década del 40 del siglo XIX produjo una importante migración de la población hacia América. De los 75.000 irlandeses que migraron en el año 1847, 30.000 contrajeron tifus, de los cuales 20.000 murieron de la enfermedad. En el siglo XX, en el período 1917-1923 (fin de la segunda guerra mundial y el período inmediatamente después) se cree que hubo 30 millones de casos de tifus epidémico en Rusia y Europa con más de 300.000 muertes. Según estadísticas soviéticas oficiales, el 10% de la población fue afectada con esta enfermedad en ese período (Buxton, 1946; Joklik. *et al.*, 1987; Kettle, 1995).. En la segunda mitad del siglo XX la incidencia de las enfermedades transmitidas por *P. humanus humanus* ha ido declinando (Kettle, 1995). Aunque *P. humanus humanus* es el único vector reconocido para este tipo de enfermedades, y sobre todo teniendo en cuenta el estatus coespecífico de los dos *P. humanus*, se sigue estudiando el potencial vectorial de *P. humanus capitis* para alguna de estas enfermedades (Buxton, 1946; Zinsser, 1987; Robinson, 2002).

#### **IV-ANTECEDENTES DE CONTROL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS.**

En el control del *P. humanus capitis* existen dos estrategias básicas, el uso del llamado “peine fino” (control cultural) y el uso de productos pediculicidas (control químico). En bajas infestaciones el uso del peine fino es una buena estrategia, pero en altas infestaciones el uso de insecticidas se convierte en una herramienta imprescindible (Ibarra, 1993; Picollo, 1999 a y b).

Son numerosos los insecticidas que han sido utilizados en distintos países para el control químico de *P. humanus capitis*. Los primeros productos pediculicidas comerciales se formularon a base de DDT y de lindane (insecticidas clorados) (Busvine *et al.*, 1948). El desarrollo de resistencia a estos insecticidas fue determinada por Maunder (1971) lo cual llevó al uso de insecticidas con distinto modo de acción: carbaril (carbamato) y malatión (fosforado). Miller *et al.* en 1972 encontraron resistencia a malatión. En los últimos 15 años los insecticidas piretroides, principalmente permetrina y d-fenotrina, han sido los ingredientes activos en la mayoría de las formulaciones pediculicidas (Ibarra, 1993; Coz *et al.*, 1993; Tomita *et al.*, 2003). Como era de esperar, luego de un largo tiempo de uso de insecticidas piretroides, resistencia a permetrina y otros piretroides ha sido reportado en varios países: Francia (Coz *et al.*, 1993), República Checa (Rupes *et al.*, 1995), Israel (Mumcuoglu *et al.*,

1995), Gran Bretaña (Burgess, 1995; Downs *et al.*, 1999), Argentina (Picollo *et al.*, 1999) y Estados Unidos de América (Pollack *et al.*, 1999).

Nuestro país presenta una historia similar. Los insecticidas DDT y lindane han sido utilizados en el pasado. El insecticida malatión también ha sido y es utilizado. Actualmente los insecticidas piretroides son los principios activos que se encuentran en la mayoría de los productos comerciales. El piretroide más utilizado ha sido permetrina, y en menor medida los piretroides deltametrina, d-fenotrina, transaletrina y bioaletrina (Picollo, 1999; Picollo *et al.*, 1998 y 2000).

Como ha sido reportado para otros países, el uso creciente de los productos pediculicidas en nuestro país podría relacionarse con la menor efectividad de esos mismos productos (Mumcuoglu *et al.*, 1995). Teniendo en cuenta los aspectos que hemos visto sobre el desarrollo de la resistencia a insecticidas y los ejemplos que hemos citado sobre la situación de los pediculicidas en otros países, la causa más probable (y esperada) de la menor efectividad de los insecticidas utilizados, es el desarrollo de resistencia a esos insecticidas.

Sobre la base de estos conceptos y de algunos de los antecedentes, el CIPEIN comenzó en el año 1996, estudios de laboratorio para determinar la susceptibilidad y resistencia en poblaciones de piojos recolectados en Buenos Aires. Los primeros estudios demostraron resistencia al insecticida permetrina en 5 poblaciones, con niveles de resistencia que variaron entre 11,3 y > 90 (Picollo *et al.*, 1998 y 2000). Durante los siguientes dos años se realizó un monitoreo de resistencia en poblaciones de la ciudad de Buenos Aires y del Gran Buenos Aires donde se determinó que el 92,3 % de las poblaciones muestreadas fueron resistentes a permetrina, con grados de resistencia que variaron entre 1,86 y >90, determinados según el método de exposición a papel impregnado con insecticida recomendado por la OMS (Vassena *et al.*, 2003). En el mismo trabajo se determinó el nivel de resistencia de algunas de esas poblaciones con el método de aplicación tópica de insecticida y se obtuvieron grados de resistencia entre 108,1 y 655,2.

Estudios realizados en la provincia de La Rioja han detectado poblaciones de piojos resistentes a permetrina, mostrando algunas de ellas grados de resistentes comparables a las poblaciones de Buenos Aires (Catalá, datos sin publicar)

Para determinar la estrategia de manejo de la resistencia más apropiada es imprescindible conocer los mecanismos bioquímicos-fisiológicos involucrados en la resistencia observada, ya sea para revertirla (por ejemplo mediante el uso de sinergistas) como para seleccionar compuestos alternativos que sean efectivos en las poblaciones de alta resistencia. En este contexto se ha encontrado en poblaciones de *P. humanus capitis* de Israel

resistentes a permetrina y a d-fenotrina, aumento del metabolismo degradativo, particularmente de glutatión transferasas y en menor medida del metabolismo oxidativo, como mecanismos bioquímicos de resistencia (Hemingway *et al.*, 1999). Lee *et al.* (2000) reportaron resistencia a nivel de sitio de acción tipo *kdr* y aumento del metabolismo oxidativo como mecanismos contribuyentes a la resistencia a piretroides en poblaciones de piojos de USA, y determinó que los reemplazos aminoacídicos (T929I y L932F) en el canal de sodio dependiente de voltaje estarían involucrados en la menor afinidad del canal por el insecticida. En poblaciones de *P. humanus capitis* de Japón con resistencia tipo *kdr* a d-fenotrina, se encontraron 4 reemplazos aminoacídicos, D11E, M850T, T952I y L955F, de los cuales las dos últimas parecen estar involucradas con el fenotipo resistente (Tomita *et al.*, 2003)

En Argentina, los trabajos de Picollo *et al.* (1998 y 2000) demostraron que las poblaciones de Buenos Aires resistentes a permetrina eran además resistentes a otros piretroides (pero con menores niveles de resistencia), principalmente deltametrina, d-fenotrina y  $\beta$ -cipermetrina. En estos estudios los ensayos de inhibición *in vivo* de enzimas detoxificantes mostraron que el incremento del metabolismo oxidativo en mayor medida, y del metabolismo hidrolítico en menor medida, están involucrados como mecanismos de resistencia. Sin embargo, la reversión de la resistencia debido a la inhibición enzimática no fue completa sugiriendo modificación del sitio de acción como factor contribuyente a la resistencia observada. En estudios posteriores se demostró correlación positiva significativa entre los niveles de resistencia y la actividad del complejo enzimático P450 para algunas poblaciones de *P. humanus capitis* de Buenos Aires (monooxigenasas) (González Audino *et al.*, 2004).

Teniendo en cuenta por un lado, los estudios realizados sobre los mecanismos de resistencia en poblaciones de Buenos Aires, y por otro lado los particulares y lógicos requisitos de cosmética y seguridad toxicológica que impone la regulación de productos pediculicidas (que no hace fácil el reemplazo de los toxicológicamente seguros piretroides), a partir de fines de los 90's comenzó la estrategia de manejo de la resistencia al ubicuo piretroide permetrina. Se sugirió el reemplazo de la permetrina por d-fenotrina (utilizado en varios países y pero no en Argentina hasta 1999) en las formulaciones pediculicidas comerciales, que si bien era un piretroide con resistencia detectada, el grado de resistencia era menor al detectado para permetrina (Picollo *et al.*, 2000) y la seguridad toxicológica era mayor.

En el mismo contexto de manejo de la resistencia se determinó la actividad del alcohol 1-dodecanol como sinergista de piretroides en poblaciones de *P. humanus capitis* resistentes a

permetrina (Mougabure Cueto *et al.*, 2000 y 2002). Como consecuencia de tales estudios se presentó una patente que describe al 1-doddecanol, y otros alcoholes de cadena larga, como compuesto activo de formulaciones pediculicidas que contienen insecticidas piretroides (Elea *et al.*, 1999). El modo de acción del dodecanol parece estar a nivel de cutícula, alterando las propiedades de permeabilidad cuticular y de esta manera aumentando la penetración del insecticida (Mougabure Cueto, 2001).

A pesar de los estudios realizados y las estrategias utilizadas, el alto nivel de resistencia a permetrina y otros insecticidas piretroides representa una señal de alarma en la continuación del uso de estos compuestos para controlar las poblaciones de piojos con resistencia detectada. Es lógico pensar que con el continuo uso de insecticidas piretroides, la resistencia a d-fenotrina no tardará en aumentar su nivel, transformando en ineficientes los pediculicidas actualmente más eficaces.

Además del problema de la resistencia a insecticidas en los estados de adulto y larva, otro elemento crítico en las fallas de control de *P. humanus capitis* es el escaso efecto ovicida de los productos comerciales. Según Smith and Salkeld (1965), los requisitos para una efectiva actividad ovicida son:

- a) una proporción suficiente de la población debe estar expuesta en el estado huevo para justificar el tratamiento,
- b) el huevo debe ser susceptible al efecto tóxico del insecticida,
- c) el huevo debe estar en un lugar donde las concentraciones letales del insecticida puedan ser aplicadas.

Teniendo en cuenta que la hembra deposita de 7 a 10 huevos por día (Buxton, 1946; Ibarra, 1993; Kettle, 1995), que el desarrollo embrionario se completa en 7 –10 días, que los huevos se encuentran en el mismo hábitat que las formas postembrionarias, y que los piojos presentan generaciones continuas, el primer y el tercer requisito (dependiendo de la dosis letal) son cumplidos y la posibilidad de interrumpir la embriogénesis representa un paso promisorio en el control exitoso de la plaga. Una posible causa de este escaso efecto ovicida, además de las particulares propiedades del sistema-huevo con respecto la relación medio interno-medio externo (se verá mas adelante), es la posible expresión de la resistencia durante el desarrollo embrionario, problema relacionado al segundo de los requisitos expuestos anteriormente.

## V-EL DESARROLLO EMBRIONARIO Y LA RESISTENCIA A INSECTICIDAS

Existen numerosos estudios que describen niveles y mecanismos de resistencia a los distintos grupos de insecticidas en plagas sanitarias, agropecuarias y urbanas. La gran mayoría de los estudios de este tipo están dirigidos al análisis de resistencia en estados postembrionarios (adultos y larvas). A pesar que la mayoría de los insecticidas están dirigidos a los estados directamente involucrados en los daños económicos y/o en salud (adultos y larvas), los huevos pueden, según la especie, estar igualmente expuestos al insecticida. Si el insecticida en cuestión puede alcanzar al embrión y ejercer algún efecto tóxico, entonces los embriones estarán inadvertidamente bajo presión de selección por parte del insecticida y por lo tanto serán capaces de desarrollar propios mecanismos de resistencia a tal insecticida. Por otro lado, los mecanismos de resistencia evolucionados en los estados postembrionarios pueden llegar a expresarse en los embriones en desarrollo sin que éstos hayan tenido contacto con el insecticida. De esta manera y fuera de nuestras expectativas, quedará inutilizada paradójicamente antes de su utilización, una posible estrategia de control: la interrupción del desarrollo embrionario. Si el insecticida está dirigido deliberadamente hacia el estado embrionario, la relación con el desarrollo de resistencia es más directa y esperable. A pesar del problema planteado son escasos los trabajos publicados sobre resistencia a insecticidas en embriones de poblaciones con resistencia detectada para las formas postembrionarias y ninguno de ellos es en *P. humanus*.

### a) Breve descripción del huevo de insectos y del desarrollo embrionario.

El huevo de insectos es *centrolecítico*, es decir que tiene el *vitelo* en posición central y el citoplasma en posición periférica (*periplasma*). En el huevo recién depositado, el embrión en desarrollo está cubierto de varias capas o membranas. Adyacente al oocito se encuentra la *membrana vitelina*, siendo la primer capa depositada luego que la vitelogénesis (acumulación de vitelo) ha terminado. Sobre la membrana vitelina se encuentra la cubierta del huevo propiamente dicha, el *corion*, compuesta por diversas proteínas esclerotizadas, no contiene quitina y depositada por las células foliculares luego de la formación de membrana vitelina. Generalmente el corion está compuesto de un endocorion (adyacente a la membrana vitelina) y un exocorion más externo. Entre la membrana vitelina y el corion, y formada después que éste, se encuentra una *capa de cera*. Estas capas están discontinuadas por diversas estructuras como micropilos (entrada del esperma), aeropilos (intercambio gaseoso), hidropilos (intercambio acuoso) (fig. 15). Mientras el desarrollo embrionario ocurre otras dos capas pueden formarse, una *cutícula serosal* formada por la serosa (una de las membranas

extraembrionarias) y una *cutícula embrionaria* formada por la células epidérmicas del embrión, la cual es mudada en el momento de la eclosión para dar el primer estadio larval (Wigglesworth, 1976; Gillott, 1980; Nation, 2002). Además de esta descripción general de las capas que cubren al embrión en desarrollo de insectos, en el caso de las especies que adhieren sus huevos al sustrato, como en el caso de las especies de Phthiraptera, existe un capa extra (cemento) por fuera del corion que permite tal adhesión. En el caso particular de *P. humanus capitis*, como hemos visto, los huevos son pegados al pelo de la cabeza de las personas con un cemento que sintetiza la hembra y que cubre todo el huevo menos el opérculo. Como se observa, el sistema huevo presenta particulares propiedades con respecto a la interacción del medio interno del individuo (el embrión) con el medio externo. Estas propiedades son bien diferentes, tanto en la cantidad de capas que separan ambos medios como en la composición de tales capas, en comparación con las formas eclosionadas, las cuales los medios interno y externo se encuentran separados por una única, aunque compleja, *cutícula* con alto contenido de quitina, proteínas esclerotizadas y ceras (Gillott, 1980).

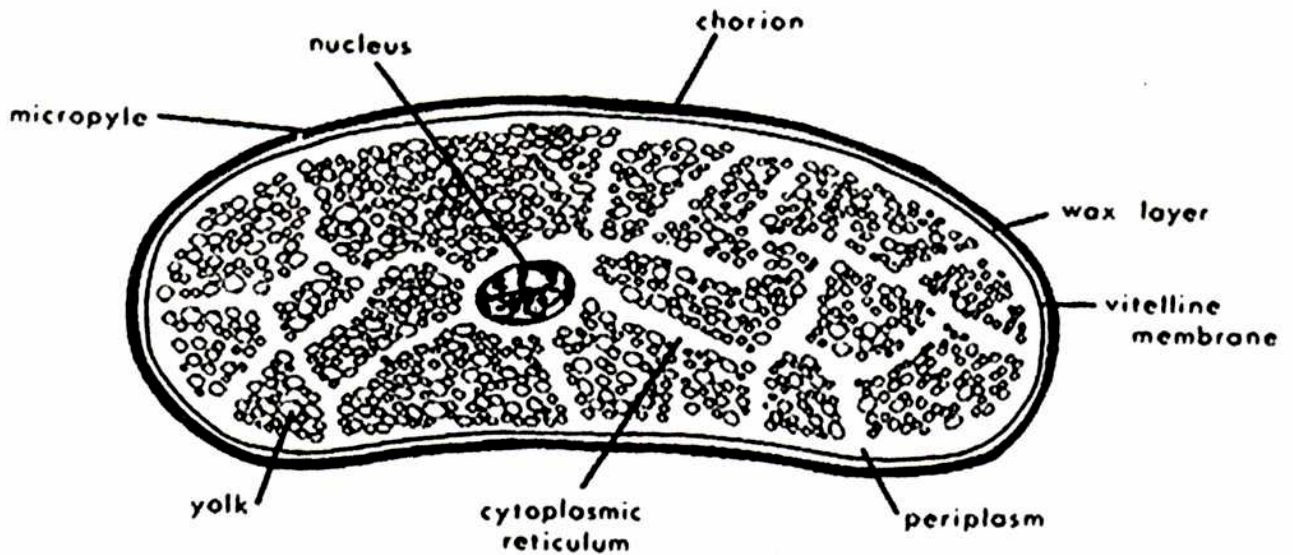


Figura 14. Sección sagital de un huevo de insecto en el momento de la oviposición. Se observan las capas que recubren al huevo (corion, capa de cera y membrana vitelina).

Aún más particulares son los cambios que ocurren dentro del huevo a lo largo del desarrollo del embrión. El sistema huevo encierra espacialmente el extraordinario proceso en el cual una sola célula se desarrolla en un complejo organismo multicelular, que en el caso de los insectos es el primer estadio (en realidad ocurre con bastante frecuencia en la naturaleza como para ser llamado extraordinario, pero tal palabra refleja mi repetida admiración por tal proceso). Las consecutivos etapas de desarrollo que ocurren en este tiempo (blástula, gástrula,



organogénesis, etc) son colectivamente llamados embriogénesis (Gilbert, 1997). Este período de desarrollo progresivo y continuo involucra una serie de eventos bioquímicos, genéticos, fisiológicos y morfológicos relacionados a tres grandes procesos del desarrollo de un organismo: diferenciación celular, crecimiento y morfogénesis (Gilbert, 1997).

Considerando lo expresado en los párrafos anteriores se deduce que los huevos y las formas postembrionarias presentarán marcadas diferencias en, al menos, algunos de los procesos toxicológicos que quisiéramos estudiar (penetración, detoxificación, resistencia, etc), y que a su vez estos mismos procesos variarán radicalmente a lo largo del desarrollo embrionario.

#### **b) Variaciones toxicológicas y antecedentes de resistencia durante el desarrollo embrionario**

Como se anticipó en la sección anterior, los escasos trabajos publicados hasta la actualidad (ninguno en piojos que afectan al hombre) sugieren que existen diferencias en los procesos toxicológicos y en los niveles de resistencia entre los embriones y los estados postembrionarios, y entre las distintas fases del desarrollo embrionario. Estas diferencias tienen su explicación en:

- Las diferentes estructuras que recubren al embrión y las formas postembrionarias y lo separan del medio externo, y los cambios que van sufriendo estas estructuras durante la embriogénesis (Wigglesworth, 1976; Gillott, 1980; Nation, 2002).
- Variaciones en el nivel y los momentos de síntesis de ciertas proteínas y enzimas, tanto de aquellas que son sitio de acción de los insecticidas, como de aquellas que están involucradas en la degradación de los insecticidas. En este punto es interesante notar la existencia en embriones de procesos toxicológicos comunes con los estados postembrionarios o exclusivos del desarrollo embrionario (Smith & Wagenknecht, 1959). En este sentido, embriones tardíos tendrán sistemas fisiológicos y estructuras funcionales en larvas y adultos (sistema nervioso, respiratorio, etc) y por lo tanto estarán presentes los mismos sitios de acción o enzimas degradativas presentes en las formas postembrionarias. (en el caso de las enzimas degradativas no necesariamente se debe considerar los estadios tardíos). Por otro lado, embriones en estadios tempranos presentarán los procesos propios del desarrollo (diferenciación, morfogénesis, etc) y estarán ausentes los sistemas diferenciados de los estados postembrionario, esto dará lugar a posibles interacciones toxicológicas (modo de acción o metabolismo degradativo) con aquellos componentes proteicos primariamente asociados a los procesos de desarrollo



y por lo tanto siendo, estas interacciones, exclusivas de embriones. Finalmente se debería considerar las posibles enzimas detoxificantes exclusivas de embriones, no primariamente asociadas al desarrollo, presentes en cualquier momento del desarrollo embrionario. Siendo la resistencia a insecticidas la expresión de procesos toxicológicos, el análisis comparativo de las interacciones toxicológicas entre distintos estados de la ontogenia recién descrito, es aplicable del mismo modo a la expresión y mecanismos de resistencia.

Clásicos trabajos han estudiado el desarrollo del sistema colinérgico en embriones de insectos y su relación a la intoxicación con insecticidas organofosforados (Tahmisian, 1943; Smith & Wagenknecht, 1959; Zschintzsch *et al.*, 1965; Smallman & Mansingh, 1969). En el mismo sentido el CIPEIN estudió la variación de susceptibilidad a insecticidas organofosforados durante el desarrollo embrionario de *Triatoma infestans* (Hemiptera) (Picollo de Villar, 1979 y 1980). En estos trabajos se demostró que los huevos en desarrollo temprano, los cuales carecen de acetilcolinesterasa (sitio de acción de fosforados) y que poseen esterases (enzimas degradativas), son menos sensibles a la intoxicación con estos insecticidas que los huevos de desarrollo intermedio. Michaelides and Wright (1997) encontraron mayor actividad de insecticidas inhibidores de acetilcolinesterasa en embriones tempranos y mayor actividad de teflutrin (piretroide) en embriones tardíos. Estos resultados fueron explicados por una mayor penetración de los insecticidas anticolinesterásicos en estadios tempranos de la embriogénesis debido a posteriores cambios en membranas embrionarias que impiden la penetración de los tóxicos en estados más tardíos, y a la posible presencia de un sitio de acción exclusivo de los embriones, actividad sobre lipasas asociadas a la degradación de lípidos del vitelo. Shobha Rani and Lakshmi pathi (1995) encontraron variación cualitativa y cuantitativa de esterases a lo largo del desarrollo embrionario de *Chrysochoris purpureus*. En este trabajo asocian estas esterases a dos principales funciones, hidrólisis de lípidos del vitelo (lipasas) e hidrólisis de hormonas juvenil facilitando eventos morfogenéticos en el desarrollo embrionario. Gangadhar Rao and Shetty (1996) mostraron diferencias en el patrón de proteínas totales y no diferencias en el patrón de isozimas de esterases entre huevos de cepas susceptibles y resistentes a organofosforados del mosquito *Anopheles stephensi*.

Considerando específicamente el proceso de resistencia en el desarrollo embrionario, en *Heliothis virescens* (Lepidoptera) se encontró huevos resistentes a piretroides en dos cepas, una de campo y una seleccionada artificialmente en laboratorio, con resistencia a piretroides detectada en el tercer estadio larval (Leonard *et al.*, 1991). Interesantemente en este trabajo la

cepa de laboratorio mostró mayor nivel de resistencia en larvas que en huevos y la cepa de campo mostró mayor nivel de resistencia en huevos que en larvas. Ito and Goh (1984) demostraron que huevos y larvas recién eclosionadas de *Plutella xylostella* (Lepidoptera) pertenecientes a una población resistente a piretroides fueron mas resistentes a deltametrina que huevos y larvas pertenecientes a una población susceptible. Grosscurt (1980) obtuvo resistencia en huevos después de selección artificial con diflubenzuron (inhibidor de la síntesis de quitina) incorporado al medio de cultivo larval en dos cepas de *M. domestica* (Diptera).

Teniendo en cuenta por un lado lo expresado sobre los antecedentes y la actualidad sobre el control químico y la resistencia de *P. humanus capitis* a insecticidas piretroides y por otro lado el interés que genera conocer la baja actividad ovicida de los productos utilizados tenemos el contexto teórico en el que se enmarcan las preguntas y los objetivos de este trabajo de tesis.

## OBJETIVOS

- Determinar si las poblaciones con resistencia a un insecticida expresada en los estados postembrionarios, también expresan resistencia a tal insecticida en embriones.

La pregunta asociada a este objetivo es: ¿Se expresa la resistencia observada en estados postembrionarios durante el desarrollo embrionario?

- Estudiar los mecanismos fisiológico-bioquímicos de resistencia a insecticidas presentes en embriones y estados postembrionarios en poblaciones de *P. humanus capitis* de Buenos Aires resistentes a permetrina.

La pregunta asociada a este objetivo es: ¿Qué mecanismos de resistencia han evolucionado en las poblaciones de *P. humanus capitis* resistentes a permetrina?

- Si los embriones expresan resistencia (primer objetivo planteado), estudiar si los mecanismos expresados en embriones son los mismos de aquellos expresados en estados postembrionarios

La pregunta asociada es: ¿Los mecanismos de resistencia que evolucionaron en los embriones son los mismos que los que evolucionaron en los estados postembrionarios?.

## HIPÓTESIS

- Si los procesos bioquímicos involucrados en la resistencia en adultos son funcionales en el desarrollo embrionario, posiblemente la resistencia también se exprese en los embriones. En este caso el mecanismo evolucionado es el mismo en ambos estados de desarrollo
- Si los huevos están expuestos al insecticida ocurrirá un proceso de selección de embriones resistentes con independencia del mismo proceso ocurrido en los estados postembrionarios. En este caso, los procesos bioquímicos involucrados en la resistencia en embriones pueden ser distintos de aquellos involucrados en la resistencia evolucionada en los adultos. Esta hipótesis no es excluyente de la primer hipótesis planteada.

- Dado que las dos hipótesis antes planteadas son independientes, es muy probable que los embriones provenientes de adultos resistentes a permetrina también sean resistentes a permetrina.



***Materiales y métodos***

## MATERIALES Y METODOS

### I-MATERIAL BIOLÓGICO

Los huevos y los estados postembriones (adultos y ninfas) de *P. humanus capitis* usados en el presente trabajo, fueron recolectados de cabezas de niños infestados de 6-12 años de edad concurrentes a escuelas primarias y hogares de menores de la ciudad de Buenos Aires y alrededores. El método de recolección consistió en el pasaje, por la cabellera de los niños, de un peine fino de metal marca Assy, peine que permite una óptima extracción de adultos, ninfas y huevos.

Los insectos habitando en las cabezas de chicos de un mismo establecimiento fueron considerados una población, ya que estudios previos demostraron que tenían similar susceptibilidad a insecticidas, y las muestras obtenidas en cada establecimiento fueron muestras representativas de cada población (Picollo *et al.* 1998).

Para este trabajo, se seleccionaron las poblaciones según el nivel de resistencia al insecticida piretroide permetrina determinado en estudios previos del CIPEIN (Picollo *et al.*, 1998 y 2000; Vassena *et al.* 2003 ). Se seleccionó una población de referencia, y dos poblaciones resistentes: una con un nivel de resistencia medio y la otra con un nivel de resistencia alto.

Insectos provenientes de cabezas de chicos sin previo tratamiento con pediculicidas o con poca historia de tratamiento químico fueron representativos de la población utilizada como referencia. Estos piojos, población BA, fueron extraídos de niños que concurrían a la escuela Bandera Argentina, escuela número 25 distrito escolar número 1, barrio de Retiro, Ciudad de Buenos Aires. La población GH, colectada de la escuela Guardia de Honor del barrio de Flores, Ciudad de Buenos Aires, fue seleccionada como población de alta resistencia a permetrina. La población HB colectada en el Hogar Belgrano, Partido de San Martín, Provincia de Buenos Aires, fue seleccionada como población de resistencia media. La tabla 1 muestra el nivel de resistencia a permetrina de las poblaciones utilizadas en este trabajo.

Tabla 1. CL<sub>50</sub> y nivel de resistencia a permetrina de las poblaciones utilizadas en este trabajo. Estos valores se determinaron según el bioensayo de exposición a papel recomendado por la Organización Mundial de la Salud.

Población	CL <sub>50</sub> (%) (I.C. 95%)	Nivel de Resistencia (I.C. 95%)
BA	5,5 (3,74-8,67)	5,4 (3,5-8,3)
HB	23,0 (9,94-48,92)	22,7 (14,3-36,0)
GH	>90	>88,7

Una vez en el laboratorio el material biológico fue usado inmediatamente para los diversos estudios que se realizaron en esta tesis.

Se utilizó como población susceptible de referencia una colonia de *P. humanus humanus* (piojo del cuerpo) criada en nuestro laboratorio desde el año 2001, proveniente de una colonia del laboratorio del Dr. Steve Barker, Department of Parasitology, Universidad de Queensland, Australia. Debido a la imposibilidad de criar al piojo de la cabeza y considerando el actualmente supuesto status coespecífico de *P. humanus capitits* y *P. humanus humanus*, es posible utilizar como población referencia a este último en los estudios de resistencia a insecticidas en el piojo de la cabeza (Heminguay *et al*, 1998; Lee *et al*, 2000). La colonia de *P. humanus humanus* fue alimentada sobre conejos, una vez por día durante durante 20-30 minutos, seis días a la semana. Una vez alimentados, los insectos se colocan en trozos de tela de corderoy azul dentro de un recipiente plástico con humedad relativa 50% y mantenidos a temperatura de 28°C y fotoperíodo 12:12 luz-oscuridad en una cámara ambiental de temperatura, humedad y luz controlada Model 818, Precision Scientific.

## II-QUÍMICOS.

d-fenotrín (94,4% [AI]) (Sumitomo Chemical, Osaka, Japón); carbaril (98 % [AI]) (Rhone Poulenc, Lyon, Francia); spinosad; DDT. El 5,5'ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), 7-ctoxicumarina (7-EC), 7-hidroxycumarina, escrina,  $\alpha$ -naftilacetato y fast blue de Sigma (St. Louis, MO). Feniltioacetato (PTA) de Aldrich (Milwaukee, WI). Permatrato de cumarina (CIPEIN). Acetona grado analítico (Merk, Buenos Aires, Argentina)

## III-EMBRIOGÉNESIS

### a) Caracterización Morfológica de la Embriogénesis

Se observaron y registraron las variaciones morfológicas del embrión observables a través de la transparencia del corion durante el desarrollo embrionario. En el caso de *P. humanus capitits* se utilizaron huevos recolectados en campo y huevos puestos en laboratorio por hembras alimentadas sobre humanos inmediatamente después de su arribo al laboratorio. En el caso de *P. humanus humanus* se utilizaron huevos obtenidos de la cría de laboratorio alimentados sobre conejos.

Dado la imposibilidad de cría de *P. humanus capitits* y la dificultad de que ovipongan en laboratorio se observó el conjunto de huevos obtenidos de cada muestreo y se determinaron aquellos caracteres morfológicos, vistos externamente, posibles de ser marcadores del desarrollo embrionario. Se separaron los huevos con los caracteres

morfológicos supuestos más temprano y se los observó a lo largo de su desarrollo de manera de comprobar la secuencia supuesta de aparición de aquellos caracteres. Los huevos fueron mantenidos a 29-32°C y 75 % de humedad relativa durante su desarrollo (Kettle, 1995).

Una vez determinadas las condiciones óptimas de temperatura y humedad para el desarrollo y eclosión de los embriones en laboratorio, se registraron las mismas variaciones morfológicas a lo largo del desarrollo embrionario, pero esta vez en los pocos huevos ovipuestos en laboratorio.

En el caso de *P. humanus humanus*, directamente se observó el desarrollo de los huevos depositados en laboratorio de manera de determinar los caracteres morfológicos de importancia y registrar tales caracteres a lo largo del desarrollo.

En todos los casos los huevos fueron observados y fotografiadas sus variaciones morfológicas diariamente. Se utilizó un microscopio estereoscópico OLYMPUS modelo SZ40 y una máquina fotográfica digital y digitalizador SONY modelo DKC-5000 (3CCD).

#### **b) Condiciones óptimas de laboratorio para el desarrollo embrionario**

Huevos de *P. humanus capitis* seleccionados según desarrollo temprano, desarrollo medio y desarrollo tardío, de acuerdo a la clasificación realizada por las características externas, fueron utilizados para determinar las condiciones óptimas de temperatura y humedad relativa para el desarrollo y eclosión de los embriones en laboratorio.

Se registró el nivel de eclosión para cuatro temperaturas: 18, 23, 28, 31°C. Se utilizaron cámaras ambientales, AMBI-HI-LOW CHAMBER, Lab-Line Instruments y MICROPROCESOR CONTROLLED LOW TEMPERATURE ILLUMINATED INCUBATOR Model 818, Precision Scientific.

Los distintos valores de porcentaje de humedad relativa se obtuvieron dentro de un espacio cerrado donde un exceso de una sustancia determinada (fase sólida) está en contacto con una solución acuosa saturada de la fase sólida (Weast y Astle, 1982). Se utilizaron recipientes plásticos cerrados herméticamente conteniendo las soluciones saturadas y la fase sólida en exceso. Las sustancias utilizadas fueron: H<sub>2</sub>O (agua), NaCl (cloruro de sodio), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (carbonato de potasio), CaCl<sub>2</sub> (cloruro de calcio), LiCl (cloruro de litio) y Silica gel.

Los porcentajes de humedad relativa obtenidos para cada sustancia y para cada temperatura se muestran en la tabla 2.



Tabla 2 Valores de porcentaje de humedad relativa obtenidos con cada sustancia utilizada a 27°C y a 18°C

Sal	%HR ± ES	% HR ± ES
	27°C	18°C
H <sub>2</sub> O	99	99
NaCl	77 ± 0,3	82 ± 0,3
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	45 ± 0,2	49 ± 0,2
CaCl <sub>2</sub>	26 ± 0,3	-
LiCl	20 ± 0,3	28 ± 0,6
Silica gel	17 ± 0,3	-

En el caso de *P. humanus humanus*, no se determinaron las condiciones óptimas ambientales ya que se utilizaron las condiciones ambientales óptimas para la cría (Barker, S. com. pers).

#### IV- BIOENSAYOS

##### a) Huevos

La actividad ovicida y el nivel de resistencia en huevos se determinaron utilizando la técnica de inmersión desarrollada durante este trabajo. Todos los bioensayos se realizaron sobre embriones en estadio de desarrollo tardío según la caracterización morfológica obtenida.

Grupos de 10 huevos en el mismo estadio de desarrollo (tardío) se adhirieron a un portaobjetos por medio de una cinta adhesiva doble faz. Cada portaobjetos con los huevos se sumergió durante diez minutos en 10 ml de distintas concentraciones de insecticida en acetona (un grupo de 10 huevos por cada concentración de insecticida utilizada en cada réplica). Como control un grupo de 10 huevos se sumergió el mismo tiempo en 10 ml de acetona. Pasados el tiempo de exposición se realizó un doble lavado donde los portaobjetos con los huevos se sumergieron en agua corriente dos veces por el tiempo de un minuto cada inmersión. Como recipientes de inmersión se utilizaron frascos de tinción histológica. Una vez lavados, los huevos y los portaobjetos se secaron con papel de filtro y se mantuvieron en las condiciones óptimas de temperatura y humedad determinadas en la sección anterior hasta la eclosión de los controles.

Para determinar la relación dosis-respuesta (mortalidad) se utilizaron al menos tres

concentraciones de insecticida (permetrina, d-fenotrina, carbaril, spinosad ó DDT) en acetona causando mortalidad entre 10 y 90 % y al menos tres réplicas de cada concentración. Los datos fueron corregidos según la formula de Abbott (Abbott, 1925). Se consideró mortalidad a aquellos huevos con el opérculo cerrado y con el embrión muerto dentro del huevo, aquellos huevos con el opérculo abierto y con el embrión muerto dentro del huevo, y aquellos donde la ninfa I muerta quedó sólo con la cabeza fuera de la cavidad del huevo pero con todas sus patas dentro de la misma. Sobre la base de esta dosificación, la mortalidad de controles varió entre 0 y 19 %.

Los datos de mortalidad observada para cada dosis fueron utilizados para determinar la curva dosis (concentración)-respuesta y la concentración letal 50 para cada población y para cada insecticida. La concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) es la concentración de insecticida a la cual responde (en este caso muere) la mitad de la población expuesta (Litchfield y Wilcoxon, 1949).

#### **b) Estados postembrionarios**

Para la determinación de la relación dosis respuesta y el nivel de resistencia en los estados postembrionarios se utilizó la metodología de aplicación tópica desarrollada en el CIPEIN (Vassena *et al*, 2003). Para el bioensayo se seleccionaron adultos y ninfas III sabiendo que estos dos estadios presentan niveles de respuesta tóxica similares (Mumcuoglu *et al*, 1990). Grupos de al 5 ó 10 individuos fueron expuestos por tópico a distintas concentraciones de insecticidas en acetona, un grupo de individuos por cada concentración utilizada. El tópico consistió en la aplicación de 0,1 µl de la solución del insecticida en la parte dorsal del abdomen de cada piojo. El tópico se realizó con una jeringa Hamilton de 5,0 µl acoplada a un sistema de 50 descargas repetidas, siendo cada descarga de 0,1 µl.

Para determinar la relación dosis-mortalidad se utilizaron al menos tres concentraciones de cada insecticida (permetrina, d-fenotrina, carbaril, spinosad o DDT) en acetona causando mortalidad parcial, y al menos tres réplicas de cada concentración. Luego del bioensayo los insectos se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura ( $18\pm 1^{\circ}\text{C}$  para *P. humanus capitis* y  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$  para *P. humanus humanus*) y humedad relativa (70-80% *P. humanus capitis* y 50-60% *P. humanus humanus*) en una cámara ambiental model 818, Precision Scientific. Se consideró muerto al insecto que cuando es colocado en el centro de un disco de papel de filtro de 7cm de diámetro, no se moviliza sólo ni cuando es estimulado con un pincel. Los datos fueron corregidos según la formula de Abbott (Abbott, 1929).

Los datos de mortalidad para cada dosis fueron utilizados para determinar la curva dosis-respuesta y la dosis letal 50 para cada población y para cada insecticida. La dosis letal 50 ( $DL_{50}$ ) es la dosis de insecticida a la cual muere la mitad de la población expuesta.

## **V–DETERMINACION DEL NIVEL DE RESISTENCIA (huevos y formas eclosionadas)**

El nivel de resistencia cuantifica la mayor tolerancia de las poblaciones resistentes a un cierto insecticida en comparación a la población susceptible, es decir cuánto más insecticida se tendría que aplicar a las poblaciones resistentes para obtener el mismo nivel de mortalidad que se obtiene en la población susceptible.

Para determinar el nivel de resistencia a un insecticida se comparó la curva dosis-respuesta calculada (según los bioensayos explicados) para ese insecticida en las poblaciones resistentes a permetrina (GH y HB) con la curva dosis-respuesta calculada para el mismo insecticida en las poblaciones utilizadas como referencia (BA) y *P. humanus capitis*. Para la comparación de las curvas dosis-respuesta y el cálculo del nivel de resistencia y su intervalo de confianza (95%) se utilizó el cociente de dosis letal a nivel de respuesta mortalidad 50% (la comparación es a nivel de las dosis o concentraciones letales 50) (Robertson y Preisler, 1992). Si el intervalo de confianza del nivel de resistencia no incluye el número 1, las  $DL_{50}$  o  $CL_{50}$  difieren significativamente (Robertson y Preisler, 1992).

### **a) Resistencia a permetrina**

Se calculó el nivel de resistencia al insecticida piretroide permetrina para cada población según los bioensayos explicados en el punto IV y según el proceso explicado en el párrafo anterior.

## **VI–ESTUDIO DE MECANISMOS DE RESISTENCIA (huevos y formas eclosionadas).**

### **a) Toxicología**

#### **1) Resistencia a otros insecticidas**

La resistencia a dos o más insecticidas puede deberse a un mismo mecanismo de resistencia (resistencia cruzada) o a mecanismos específicos para cada insecticida desarrollados en forma independiente (resistencia múltiple). Conociendo que la resistencia cruzada implica resistencia, en una misma población, a insecticidas distintos por un mismo mecanismo bioquímico-fisiológico (por ejemplo: aumento de la misma vía degradativa o modificación del mismo sitio de acción), la estrategia de detectar resistencia cruzada, o no

detectarla, ofrece indicios del tipo de mecanismo de resistencia que ha evolucionado en las poblaciones.

Teniendo en cuenta esto último y siguiendo la metodología para los bioensayos explicadas en el punto IV, se expusieron a los individuos a insecticidas con el mismo modo de acción que el piretroide permetrina (d-fenotrina y DDT) y con distinto modo de acción pero con vías degradativas comunes (carbaril y spinosad). Para cada insecticida se determinó el nivel de resistencia según fue descrito en el punto V.

Los niveles de resistencia para todos los insecticidas permiten visualizar el posible patrón de resistencia cruzada para cada población.

## **2) Inhibición de complejos enzimáticos (in vivo)**

Se estableció el efecto de compuestos que inhiben distintos complejos enzimáticos involucrados en la detoxificación de insecticidas piretroides. Se utilizó butóxido de piperonilo, inhibidor del complejo enzimático P450 (metabolismo oxidativo) y trifenilfosfato, inhibidor de hidrolasas o esterasas (metabolismo hidrolítico).

En el caso de los huevos se utilizó la metodología de inmersión detallada en el punto IV en soluciones acéticas del insecticida y del inhibidor (co-exposición del insecticida y del inhibidor).

En el caso de las formas eclosionadas se utilizó la metodología de pretratamiento del inhibidor y luego la aplicación del insecticida. Para el pretratamiento con el inhibidor fue utilizada la metodología de exposición a papel tratado recomendada por la Organización Mundial de la Salud (Blommers, 1978; Busvine, 1948). Ésta se basa en la exposición de los insectos a papel de filtro impregnado con la solución del inhibidor disuelto en ftalato de dioctilo (DOF) y luego en cloroformo (1 + 3). La solución final se usó para impregnar el disco de papel de filtro (0,4 ml para un papel Whatman Nro. 1 de 7 cm. de diámetro). Después de dejar evaporar el solvente 24 horas, se expusieron los insectos durante 1 hora. Luego de esta exposición se aplicó el insecticida en forma tópica según la metodología descrita en el punto IV

La comparación de los grados de inhibición enzimática entre las poblaciones resistentes y las susceptibles indica la importancia de las distintas vías de detoxificación de insecticidas piretroides en la resistencia observada.

## **b) Bioquímica**

Se midió, en huevos y formas eclosionadas, la actividad de los complejos enzimáticos involucrados en la detoxificación de insecticidas piretroides: complejo P450 (OFM) y

esterasas (hidrolasas). En el caso de huevos se utilizaron embriones en estadio tardío de desarrollo según las características morfológicas detalladas en el punto III a) En el caso de formas eclosionadas se utilizaron insectos adultos.

### **1-Actividad Oxidasa (enzimas P450).**

La actividad oxidasa fue medida a través de la actividad etoxicumarina-*O*-deetilasa (actividad ECOD) del complejo P450 según el método fluorométrico descrito por Ullrich y Weber (1972) con una metodología adaptada para análisis ex-vivo (De Sousa *et al* 1995 y González Audino *et al* 2004).

La *O*-deetilación de la 7-etoxicumarina (sustrato) por el complejo P450 da como productos acetaldehído y 7-hidroxycumarina, producto, este último, que emite fluorescencia. El método se basa en la medición de la fluorescencia emitida por la 7-hidroxycumarina. De Sousa *et al* (1995) desarrolló una metodología para la medición individual de la actividad *O*-deetilasa en tejidos intactos (ex-vivo), originalmente en abdómenes intactos de *Musca domestica*. González Audino *et al* (2004) adaptaron esta metodología a la medición individual de la actividad oxidasa en abdómenes intactos de *P. humanus capitis*. En este trabajo de tesis se midió la actividad oxidasa en adultos según el método utilizado por González Audino *et al* y se desarrollaron las condiciones para la medición ex-vivo de la actividad oxidasa en huevos.

Abdómenes intactos de piojos adultos fueron obtenidos por corte con tijera entomológica y bajo lupa, en la zona de unión del tórax con el abdomen, cada abdomen fue una muestra individual. En el caso de huevos, éstos fueron cortados transversalmente con tijera entomológica y bajo lupa, y ambas mitades juntas fueron utilizadas como una muestra individual. En todos los casos el corte transversal se realizó a la mitad del eje antero-posterior del huevo de manera que todos los embriones sean cortados en la misma zona. Pero dado el pequeño tamaño y la forma ovalada de los huevos y la relativamente dura consistencia de la cubierta de los huevos (corion + cemento) es necesario considerar alguna variación en los cortes.

Cada muestra individual (abdomen o huevo) fue colocado en una celda de microplacas (una muestra por celda) con 0,1ml de 7-etoxicumarina 0,4mM en buffer fosfato 0,05mM, pH 7,2. Las microplacas fueron centrifugadas a 2000 rpm durante 30 segundos en una centrifuga refrigerada para microplacas ALC 4237R y luego incubadas durante 4 hs a 30°. La reacción fue detenida agregando a cada celda 0,1ml de una mezcla de buffer glicina 10<sup>-4</sup>M, pH 10,4/Etanol (v/v). Luego las microplacas fueron centrifugadas a 2000 rpm, 30s antes de la medición. En las celdas blanco la muestra es incubada las 4 hs con 0,1ml de sustrato y con 0,1ml del buffer de detención de reacción glicina-etanol, de manera que la

reacción no comience.

La fluorescencia fue medida con un lector de fluorescencia de microplacas Packard Fluorocount, con filtros de 450nm (emisión) y 400nm (excitación).

Para la medición en huevos se analizó la actividad de oxidasas en función de la cantidad de muestra (números de huevo por celda) y en función de la concentración de sustrato a fin de encontrar las condiciones de medición óptimas. En el caso de la cantidad de muestra se midió la actividad de 1, 5 y 15 huevos por celda. En el caso de concentración de sustrato se trabajó con 0,004; 0,01; 0,04; 0,1 y 0,4mM de 7-etoxicumarina.

## **2-Actividad Esterasa**

La actividad de esterases (hidrolasas) se midió por 3 métodos.

**Método de Gomori.** Es un método espectrofotométrico que utiliza como sustrato a ésteres de naftilo. El  $\alpha$ -naftilacetato (éster de naftilo) es hidrolizado generándose ácido acético y  $\alpha$ -naftol. El  $\alpha$ -naftol reacciona con O-dianisidina (reactivo color) y forma un complejo azul ( $\lambda=600\text{nm}$ ). No es una técnica cinética, la actividad esterásica se determina por el total de  $\alpha$ -naftol generado en un tiempo determinado.

Se homogeneizó la muestra (1 adulto macho o número variable de huevos) en 220  $\mu\text{l}$  de buffer fosfato 50mM, pH 7,1. En una celda de medición de paso óptico de 10 mm se colocó 200 $\mu\text{l}$  de homogenato y 200 $\mu\text{l}$  de solución de  $\alpha$ -naftilacetato (concentración variable) en acetona y buffer fosfato 50mM, pH 7,1. Se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se agregó 200 $\mu\text{l}$  de Diansidina 1mg/ml en agua destilada. Luego de 2 minutos se midió absorbancia a 600nm. En la celda blanco se colocó 200 $\mu\text{l}$  de buffer fosfato (en reemplazo del homogenato muestra), 200 $\mu\text{l}$  de la solución sustrato y 200 $\mu\text{l}$  de la solución del reactivo color. Todas las soluciones fueron agregadas en paralelo en ambas celdas (blanco y muestra), de manera de mantener los mismos tiempos de incubación (10 primero y 2 minutos después) para cada celda. La absorbancia se midió con un espectrofotómetro Shimadzu UV-160.

La concentración de  $\alpha$ -naftilacetato utilizada se obtuvo del análisis de la actividad esterasa en función de la concentración de sustrato realizado en adultos y en huevos. Las concentraciones de sustrato utilizadas para tal análisis fueron 0,56; 0,056; 0,0056 y 0,00056 mg/ml en acetona y buffer fosfato, en relación 1 de acetona y 4 de buffer fosfato. En el caso de huevos se analizó la actividad esterasa en función de la cantidad de muestra (número de huevos en el homogenato). Se utilizó homogenato de 1, 5, 10 y 15 huevos en 220  $\mu\text{l}$  de buffer fosfato.

**Método de Ellman.** Es un método espectrofotométrico y cinético que utiliza como sustrato acetato de tiofenol (PTA). El tiofenol producido por la hidrólisis enzimática del PTA reacciona con el 5,5-ditiobis 2-nitrobenzoato de sodio (DTNB, reactivo color) generándose el anión 5-tio 2-nitrobenzoato que da color amarillo ( $\lambda=412\text{nm}$ ). Se trata de un método cinético, la actividad esterasa es determinada por el aumento del tiofenol a lo largo del tiempo de lectura.

Se homogeneizó la muestra (adultos o huevos) en 200 $\mu\text{l}$  de buffer fosfato 0,2mM, pH 7,2. En una celda de medición de paso óptico de 10 mm se colocó 150 $\mu\text{l}$  de homogenato y 250 $\mu\text{l}$  de solución de DTNB 0,1mg/ml en buffer fosfato 0,2mM, pH 7,2. Luego se adicionó 50 $\mu\text{l}$  de solución de PTA en etanol absoluto, concentración variable. Se midió absorbancia a 412nm durante 5 minutos. En la celda blanco se colocó 150 $\mu\text{l}$  de buffer fosfato, 250 $\mu\text{l}$  de solución DTNB y 50 $\mu\text{l}$  de solución PTA, en paralelo con la celda muestra. La absorbancia se midió con un espectrofotómetro Shimadzu UV-160.

En el caso de los huevos se analizó la actividad enzimática en función de la cantidad de muestra (número de huevos en el homogenato) y en función de la concentración de sustrato (concentración de PTA) a fin de obtener las condiciones óptimas de medición. Para la cantidad de muestra se trabajó con homogenatos de 1, 5, 10 y 15 huevos en los 150 $\mu\text{l}$  de buffer fosfato en la celda de medición. Para la concentración de sustrato se utilizaron 7, 20, 60, 100 y 180mM de PTA en etanol absoluto.

*Inhibición con eserina:* antes de agregar la solución de PTA, se incubó durante 15 minutos con 50 $\mu\text{l}$  de sulfato de eserina 0,1mM en etanol absoluto.

**Método Fluorométrico.** Es una técnica fluorométrica desarrollada en el CIPEIN, para lo cual fue sintetizado el compuesto utilizado como sustrato pemetrato de cumarina. La hidrólisis enzimática del pemetrato de cumarina produce ácido pemetrínico y 7-hidroxycumarina, este último producto emite fluorescencia. Al igual que en el método de medición de actividad oxidasa, la actividad esterasa se determina midiendo la fluorescencia emitida por la 7-hidroxycumarina, pero en este caso se trata de un método cinético.

Se homogeneizó la muestra (adultos o huevos) en 200 $\mu\text{l}$  de buffer fosfato, 50mM, pH 7,2. En cada celda de micro placa fue colocado 150 $\mu\text{l}$  de homogenato y 10 $\mu\text{l}$  de solución de pemetrato de de cumarina en metilcelosolve, concentración variable. Se midió fluorescencia durante 30 minutos cada 3 minutos. En las celdas blanco se colocó 190 $\mu\text{l}$  de buffer fosfato y 10 $\mu\text{l}$  de pemetrato de cumarina. La fluorescencia fue medida con un lector de fluorescencia de microplacas Packard Fluorocount, con filtros de 450nm (emisión) y 400nm (excitación).

La concentración de sustrato utilizada, tanto en adultos como en huevos, se obtuvo del análisis de actividad enzimática en función de la concentración de sustrato. Se trabajó con 3,5; 1,17; 0,6; 0,4; 0,13; 0,06 y 0,04 mM de permetrato de cumarina. Para huevos se analizó la actividad enzimática en función de la cantidad de muestra en el homogenato, para ello se trabajó con 1, 5, 10 y 15 huevos para el homogenato con 200µl de buffer fosfato.

## VII-ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de mortalidad para cada concentración de insecticida fueron utilizados para determinar la curva dosis respuesta, y la concentración letal 50% ( $CL_{50}$ ) en huevos y la dosis letal 50% ( $DL_{50}$ ) en estadios móviles para cada insecticida utilizado. La  $CL_{50}$  y la  $DL_{50}$  son estimadores de los parámetros poblaciones que indican la concentración y dosis de principio activo que mata al 50 % de la población. Estos valores fueron calculados mediante el análisis Probit (Litchfield y Wilcoxon 1949).

El grado de resistencia (GR), su intervalo de confianza al 95% y el nivel de significancia fueron obtenidos según el cálculo del cociente de dosis letal de Robertson y Preisler (1992) utilizando un nivel de respuesta probit ( $\pi$ ) igual a 5 (50% mortalidad, se comparan las  $CL_{50}$  o  $DL_{50}$ ). Si el intervalo de confianza del nivel de resistencia no incluye el número 1, las  $DL_{50}$  o  $CL_{50}$  difieren significativamente (Robertson y Preisler, 1992).

El análisis estadístico de las actividades enzimáticas entre las poblaciones se realizó a través de los test no paramétricos Kruskal-Wallis ANOVA y Mann-Whitney *U* test.





## *Resultados*

## RESULTADOS

### I-EMBRIOGÉNESIS

#### a) Caracterización morfológica de la embriogénesis

La observación de los huevos de *P. humanus capitis* recolectados en cabezas de chicos en edad escolar, y la observación del desarrollo en laboratorio de *P. humanus humanus*, permitió determinar caracteres morfológicos potencialmente marcadores de las etapas de la embriogénesis. Las figuras 15 y 16 muestran los caracteres morfológicos observados y tomados como marcadores de las etapas del desarrollo embrionario para ambas sub-especies: manchas oculares y apéndices torácicos.



Figura 15. Huevo de *P. humanus capitis*. Se muestran los caracteres morfológicos observados



Figura 16. Huevo de *P. humanus humanus*. Se muestran los caracteres morfológicos observados

Estos caracteres mostraron diferencias a lo largo del desarrollo (variación continua) en relación a la visualización de las formas y a la pigmentación. Para cada carácter se definieron estados de desarrollo de manera de transformar la variación continua en variación discreta (estados). Basándose en que la variación de los caracteres para *P. humanus capitis* y para *P. humanus humanus* fue muy similar, se definieron los mismos estados para carácter en los dos organismos. De esta manera, para las manchas oculares se definieron tres estados: ausencia, pigmentación roja y pigmentación negra, y para los apéndices también se definieron tres estados: ausencia, esbozo de apéndices (leve definición de las formas) y apéndices desarrollados (fig 17).

La combinación de los estados de los dos caracteres permitió determinar tres etapas del desarrollo de los embriones de *P. humanus capitis* y *P. humanus humanus*: embriones tempranos (ausencia de ambos caracteres), embriones en desarrollo medio (manchas oculares

rojas y esbozos de apéndices) y embriones en desarrollo tardío (manchas oculares negras y apéndices desarrollados) (figura 17).

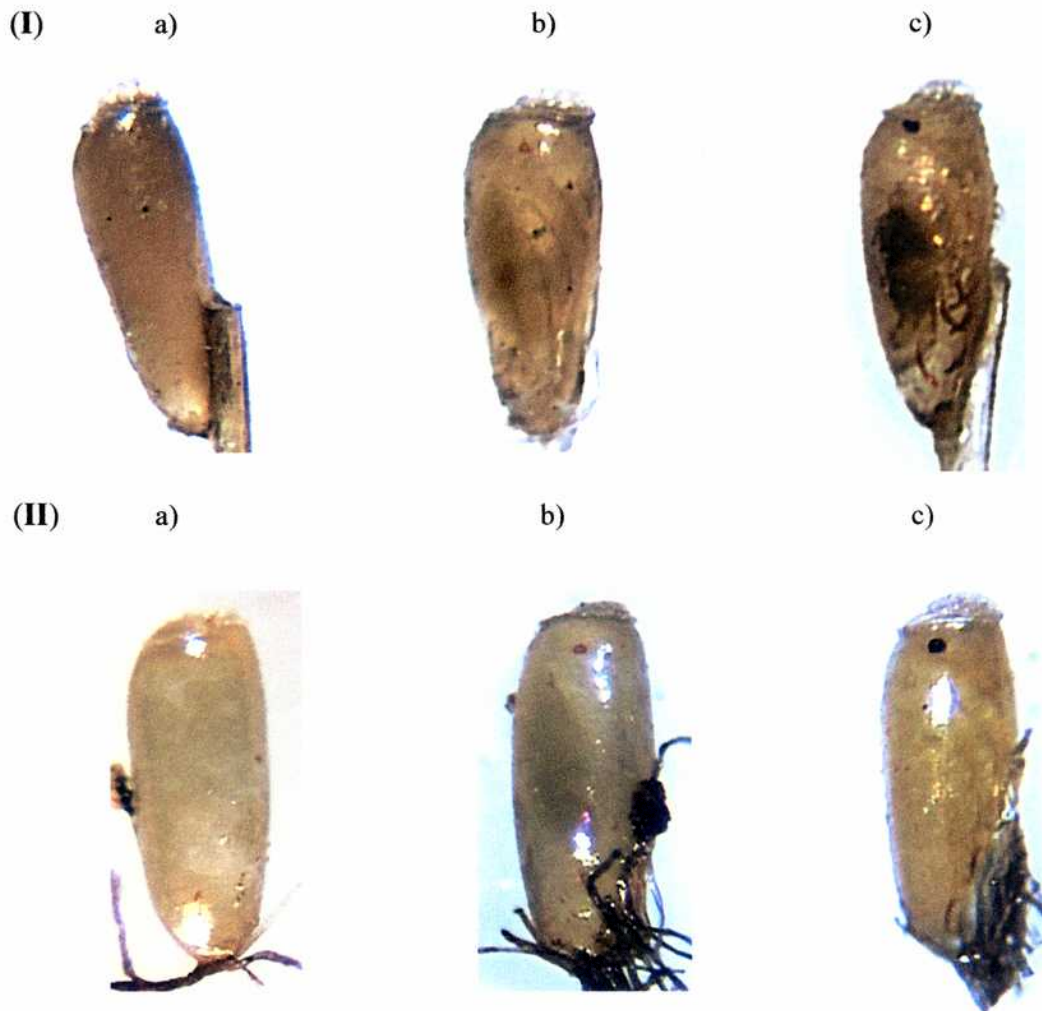


Figura 17. Variaciones de cada carácter en *P. humanus capitis* (I) y *P. humanus humanus* (II). Manchas oculares: ausencia, pigmentación roja, pigmentación oscura. Apéndices: ausentes, esbozos de apéndices y apéndices formados. También se muestra las tres etapas de desarrollo determinados por la combinación de los estados da cada caracter: a) estadio temprano (ausencia de ambos caracteres) (0-2 días I; 0-4 días II), b) estadio medio (pigmentación ocular roja y esbozos de apéndices) (4-6 días I; 6-8 días II), y c) estadio tardío (pigmentación ocular oscura y apéndices formados) (7-9 días I; 9-11 días II).

En el caso de *P. humanus capitis* se utilizaron huevos en etapas de desarrollo temprano, medio y tardío para determinar la temperatura y humedad relativa óptima para el desarrollo en laboratorio (siguiente sección). Con los valores determinados para el desarrollo temprano, se documentó el desarrollo embrionario completo de *P. humanus capitis*. La figura 18 muestra la secuencia del desarrollo embrionario de un huevo puesto en laboratorio por hembras alimentadas sobre humanos. En esta figura se observa el desarrollo progresivo de los



caracteres morfológicos mostrados en la figura 15 y, dentro de la variación continua observada, las etapas del desarrollo embrionario mostradas en la figura 17

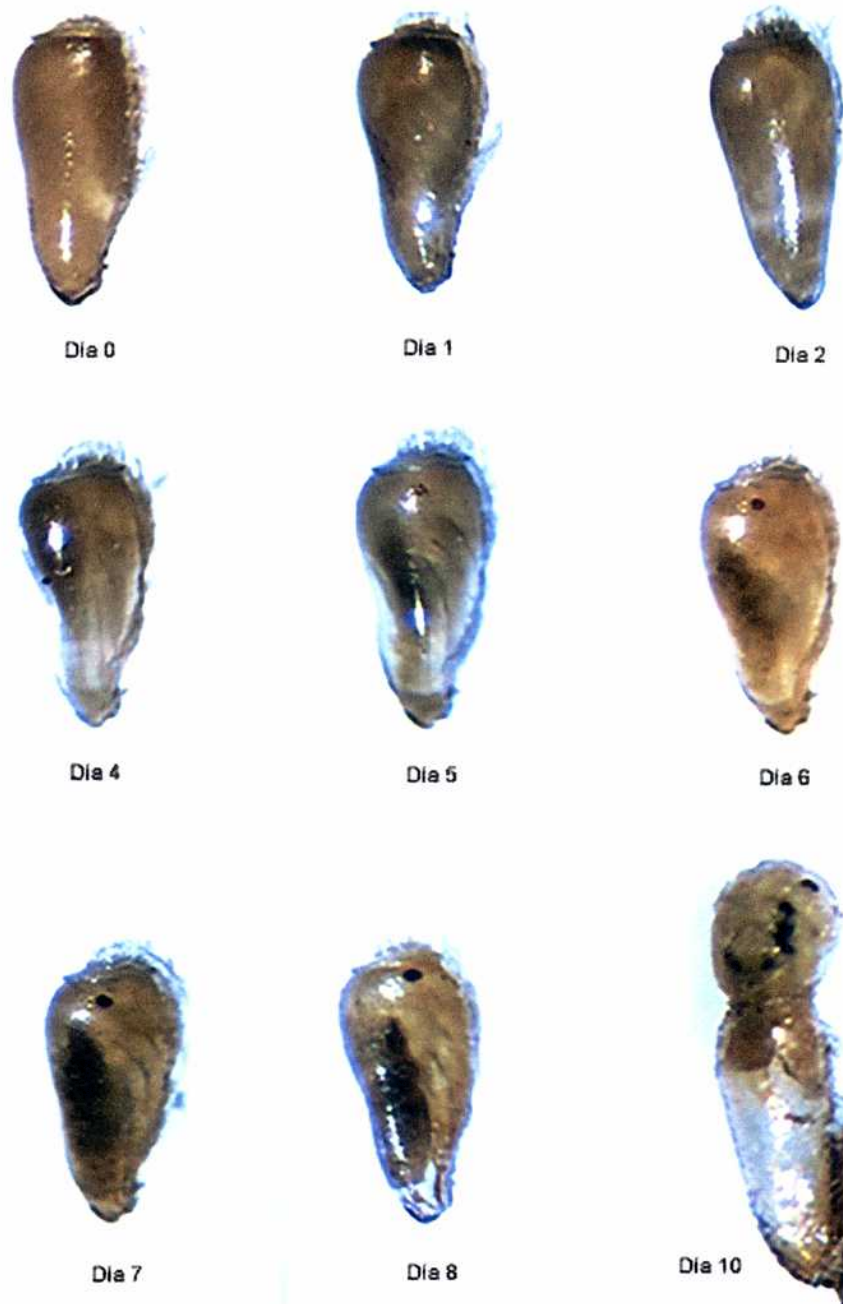


Figura 18. Secuencia del desarrollo embrionario de *P. humanus capitis*. Se observa el progresivo desarrollo de los caracteres morfológicos marcadores de la embriogénesis: manchas oculares y apéndices.

En el caso de *P. humanus humanus* no fue necesario determinar las condiciones óptimas de desarrollo ya que éstas son las condiciones de cría. Por lo tanto, la documentación

de la secuencia del desarrollo se realizó en simultáneo con la observación y registro de los caracteres morfológicos marcadores del desarrollo embrionario. La figura 19 muestra la secuencia del desarrollo embrionario.

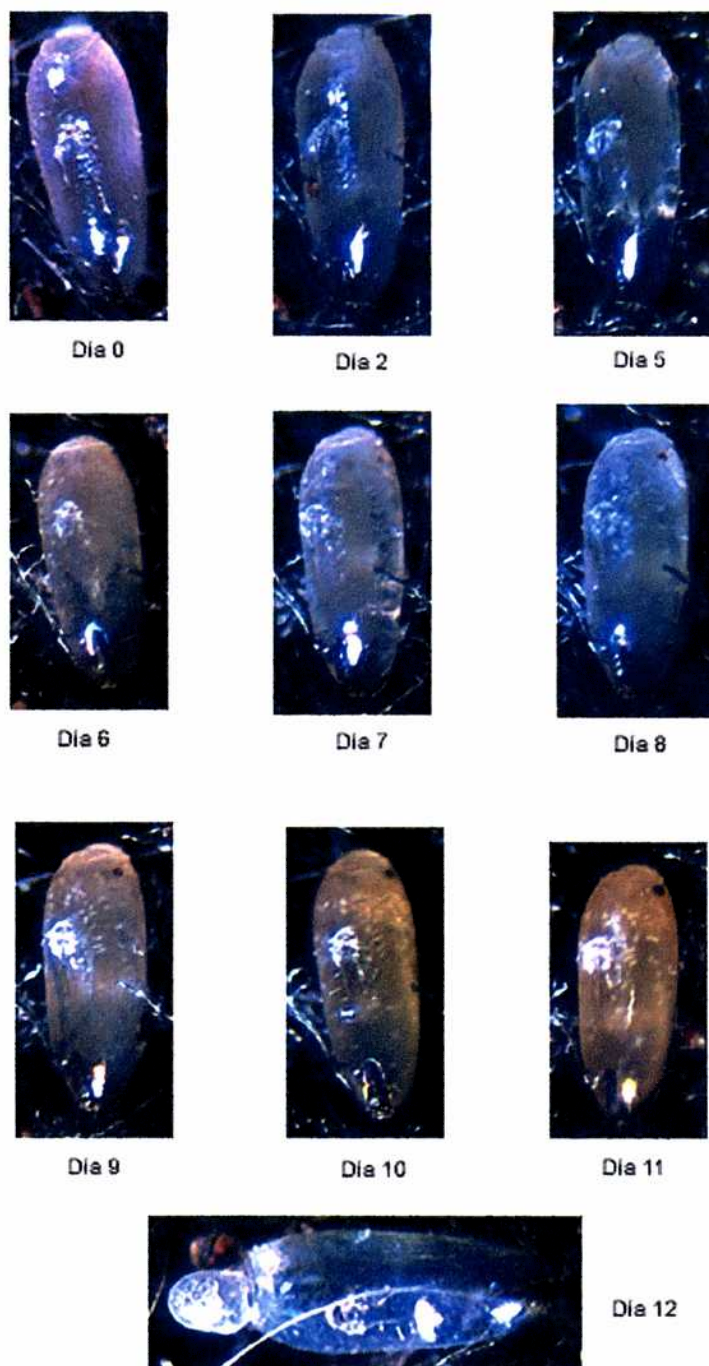


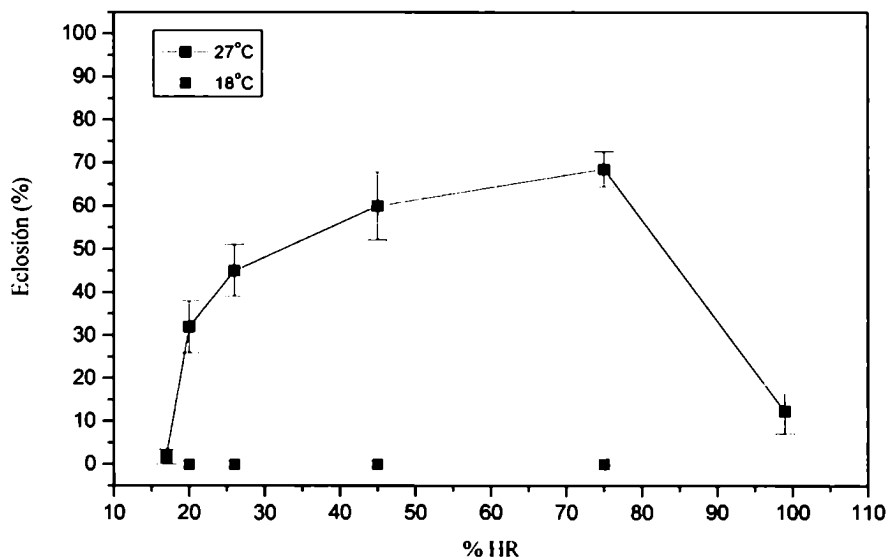
Figura 19. Secuencia completa del desarrollo embrionario de *P. humanus humanus*. Se observa el progresivo desarrollo de los caracteres morfológicos marcadores de la embriogénesis: manchas oculares y apéndices. La secuencia de fotos no indica días correlativos

### b) Condiciones óptimas de laboratorio para el desarrollo embrionario

Para cada etapa de desarrollo embrionario de *P. humanus capitis* determinada sobre la base de la morfología externa del embrión, se establecieron las condiciones óptimas de temperatura y humedad relativa para el desarrollo embrionario y la eclosión.

Las figuras 20, 21 y 22 muestran el porcentaje de eclosión de huevos incubados a cinco valores de humedad relativa (tabla 2) y a dos temperaturas distintas (tabla 1), para embriones de desarrollo temprano, medio y tardío respectivamente. La figura 23 muestra el porcentaje de eclosión de embriones incubados a distintas temperaturas en las distintas etapas de desarrollo. Las cuatro figuras muestran que tanto la temperatura como la humedad relativa influyen en el porcentaje de eclosión de embriones de *P. humanus capitis*.

Fig. 20: Eclosión de embriones incubados a distinta temperatura y humedad desde el desarrollo temprano



Las figuras 20, 21 y 22 muestran que no hay eclosión a  $18 \pm 1^\circ\text{C}$  para ningún valor de humedad relativa utilizado en ninguno de los tres estadios a partir de los cuales se comenzó la incubación.

Fig. 21: Eclosión de embriones incubados a distinta temperatura y humedad desde el desarrollo medio

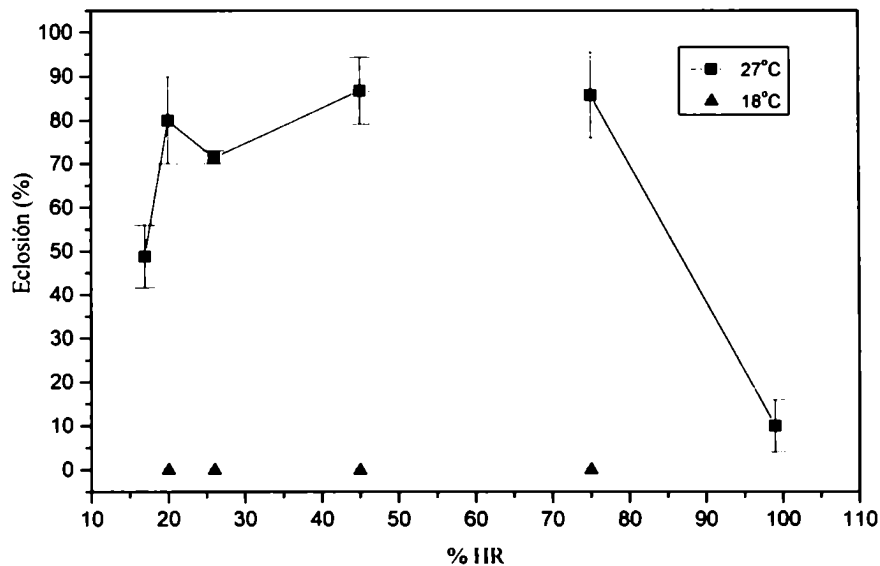
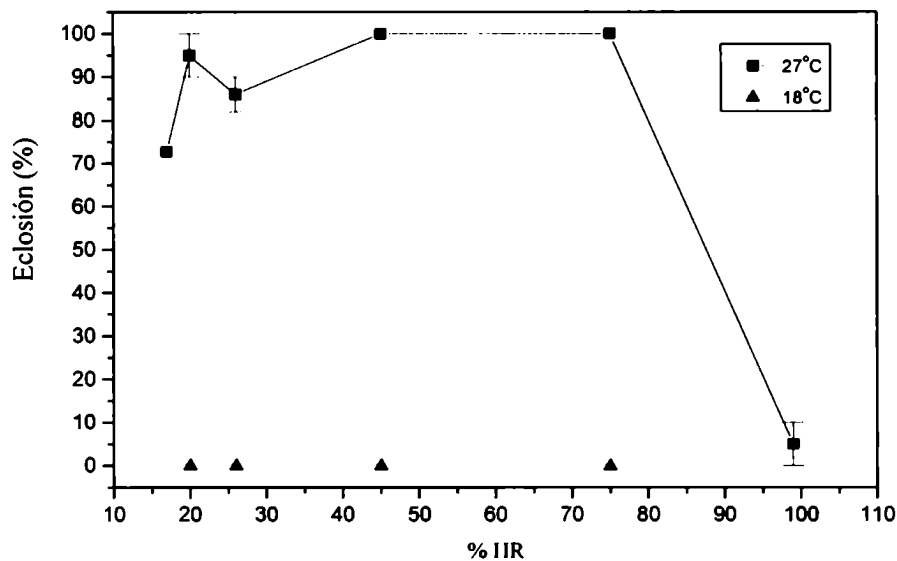


Fig.22: Eclosión de embriones incubados a distinta temperatura y humedad desde el desarrollo tardío.



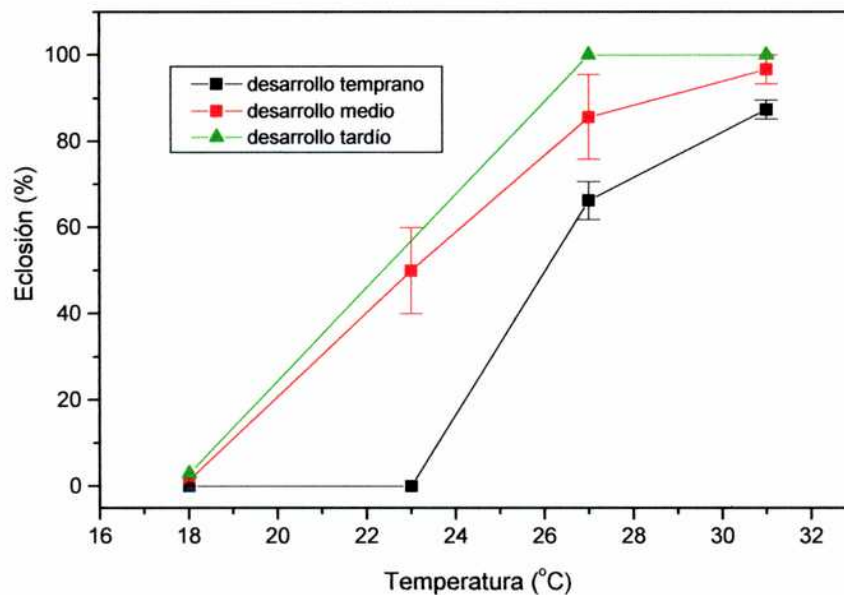
A la temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , se observa un patrón de eclosión similar en función de la humedad relativa (HR) para las tres etapas de desarrollo, el cual muestra relativamente baja eclosión a 17% HR, aumenta marcadamente en el valor de 75% y luego disminuye marcadamente el porcentaje de eclosión en el valor de 100%. Para 17% de HR, en embriones tempranos se observa un porcentaje de eclosión menor que 5% y menor que el porcentaje de

eclosión a 100% de HR (fig. 20). Por el contrario en embriones medios y tardíos, el porcentaje de eclosión para 17% de HR es marcadamente mayor que el porcentaje de eclosión en 100% de humedad relativa (figs. 21 y 22).

Para las etapas de desarrollo media y tardía, en el intervalo de humedad relativa que incluye los valores de 20, 26, 45 y 75% se observa un aumento en la eclosión de los embriones en función de la HR. Para los cuatro valores de HR los porcentajes de eclosión son mayores que 70%. Los máximos porcentajes de eclosión ocurrieron en 45% y 75% de humedad relativa (figs. 21 y 22). En el mismo intervalo de valores de humedad relativa en embriones tempranos se observa un aumento en la eclosión de los embriones superior al aumento observado para las etapas media y tardía. El mayor porcentaje de eclosión se observa a 75% de humedad relativa (fig. 20).

La figura 23 muestra porcentajes de eclosión mayores que 75% en las temperaturas de 27 y 31 °C para las tres etapas de desarrollo. No se observa eclosión de embriones en las temperaturas más bajas (18 y 23°C), excepto en huevos en desarrollo medio (50% de eclosión) y en huevos de desarrollo tardío que no hay datos.

Figura 23. Eclosión de embriones a diferentes temperaturas



Los resultados recién descritos permitieron determinar las condiciones ambientales óptimas para el desarrollo en laboratorio de los embriones de *P. humanus capitis*: temperatura óptima en el intervalo de 27-31°C y humedad relativa óptima de 75%. Con estas condiciones ambientales se trabajó en los bioensayos con huevos realizados en esta tesis. Si bien la



descripción de los resultados realizada permite determinar las condiciones ambientales óptimas, el análisis y la discusión por la cual se llega a estos valores serán expuestos en la de la discusión general.

## II-RESISTENCIA A INSECTICIDAS Y MECANISMOS DE RESISTENCIA

### a) TOXICOLOGÍA 1: Resistencia a permetrina y a otros insecticidas

La aplicación tópica de soluciones de los distintos insecticidas en acetona permitió determinar, para estadios eclosionados, la relación dosis-respuesta, el parámetro dosis letal cincuenta ( $DL_{50}$ ) y los niveles de resistencia para cada insecticida en cada una de las poblaciones utilizadas.

La metodología de inmersión en soluciones acetónicas de los distintos insecticidas permitió determinar, para embriones tardíos, la relación concentración-respuesta, el parámetro concentración letal cincuenta ( $DL_{50}$ ) y los niveles de resistencia, para cada insecticida en embriones en cada una de las poblaciones utilizadas.

En todos los casos fueron calculados los niveles de resistencia respecto a las dos poblaciones utilizadas como referencia, BA (*P. humanus capitis*, de mayor susceptibilidad) y *P. humanus humanus*.

#### 1) Resistencia a Permetrina

##### *Estados postembrionarios*

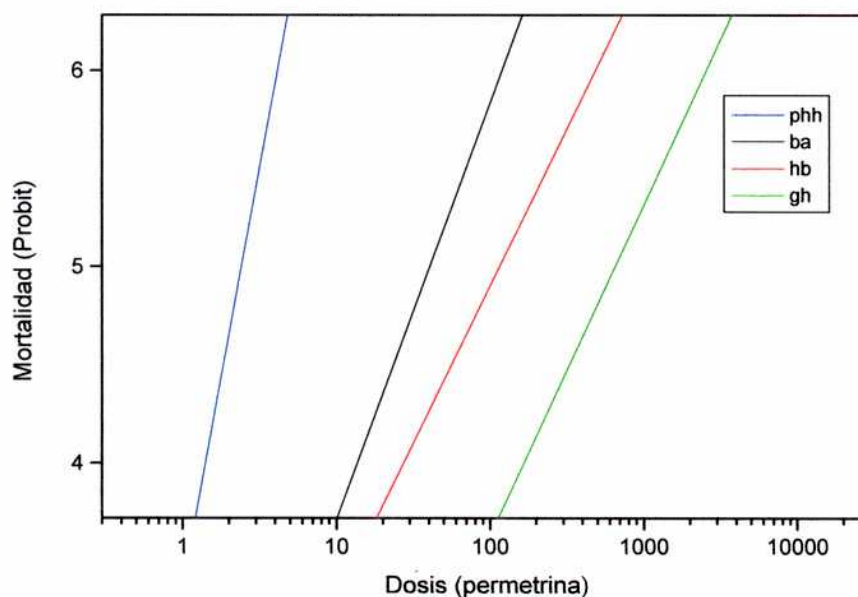
La tabla 3 muestra los valores de  $DL_{50}$ , los niveles de resistencia y los correspondientes intervalos de confianza al 95% para el insecticida permetrina en cada población. Las curvas dosis respuesta (regresión probit) de cada población se grafican en la figura 24. Las pendientes de las curvas dosis respuesta y sus intervalos de confianza se muestran en la tabla 3.

Las  $DL_{50}$  obtenidas fueron 2,4; 40,2; 114,1; 642,6 ng/insecto para las poblaciones *P. humanus humanus*, BA, HB y GH respectivamente. Utilizando la población BA como referencia de población de campo se obtuvieron niveles de resistencia de 2,8 (2,28-3,55) y 16,0 (13,01-19,67) para HB y GH respectivamente. Los intervalos de confianza de los niveles de resistencia muestran que en todos los casos las curvas dosis respuesta comparadas al nivel de respuesta 50% difieren significativamente. Utilizando la población *P. humanus humanus* como referencia se obtuvieron 16,6 (11,76-23,42), 47,2 (33,79-65,81), 265,6(192,20-367,06) para BA, HB y GH respectivamente. Los intervalos de confianza muestran que hay diferencias significativas entre las  $DL_{50}$  comparadas (a partir de este momento cuando se refiera a la comparación de curvas dosis-respuesta al nivel de respuesta 50% se dirá que se comparan las  $DL_{50}$  o  $CL_{50}$ ).

Tabla 3. Estados postembrionarios de *P. humanus capititis* y *P. humanus humanus*. Pendiente de curva dosis-respuesta, DL<sub>50</sub> y niveles de resistencia a permetrina.

Población	n	Pendiente ± ES	Dosis Letal 50 (ng/insecto) (95% CL)	Nivel de Resistencia (95%CL) Referencia BA	Nivel de Resistencia (95% CL). Referencia <i>P. humanus humanus</i>
<i>P. humanus humanus</i> .	120	4,28 ± 1,099	2,4 (1,86-3,77)	-	-
BA	60	2,12 ± 0,16	40,2 (34,05-47,47)	-	16,6 (11,78-23,42)
HB	80	1,60 ± 0,91	114,1 (55,50-221,04)	2,8 (2,28-3,55)	47,2 (33,79-65,81)
GH	80	1,69 ± 0,10	642,6 (321,39-1033,25)	16,0 (13,01-19,67)	265,6 (192,20-367,06)

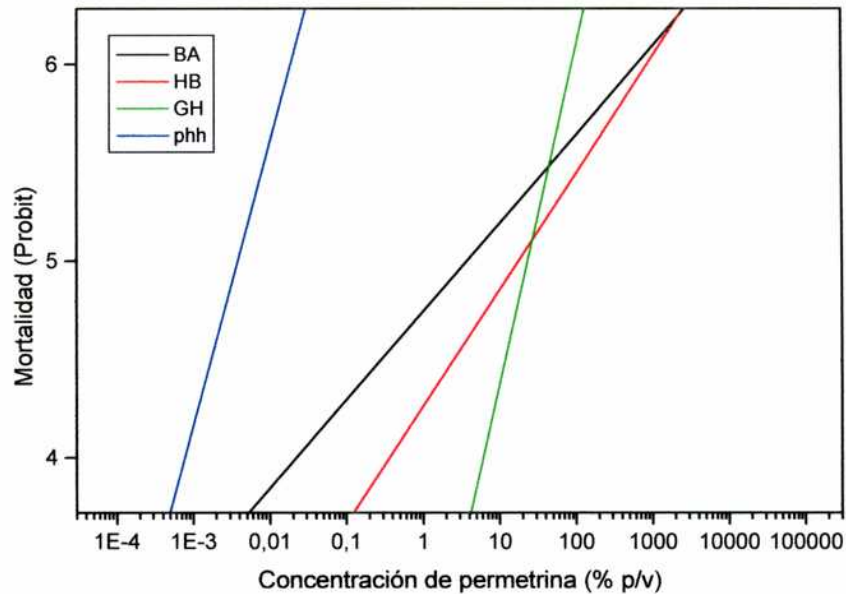
Figura 24. Curvas dosis-respuesta para permetrina en piojos adultos



### Embriones

La tabla 4 muestra los valores de CL<sub>50</sub>, los niveles de resistencia y los correspondientes intervalos de confianza al 95% obtenidos para el insecticida permetrina en cada población. Las curvas dosis respuesta (regresión probit) de cada población se grafican en la figura 25. También se muestran los valores de las pendientes de las curvas concentración-respuesta con sus errores estándar (tabla 4).

Figura 25. Curvas concentración respuesta para permetrina en huevos de piojos

Tabla 4. Huevos *P. humanus capitis* y *P. humanus humanus*. Pendientes de curva concentración-respuesta. CL50 y niveles de resistencia para el insecticida permetrina

Población	n	Pendiente $\pm$ ES	Concentración Letal 50 (%p/v) (95% CL)	Nivel de Resistencia (95% CL) referencia BA	Nivel de Resistencia (95% CL) referencia <i>P. humanus humanus</i>
<i>P. humanus humanus</i>	180	1,44 $\pm$ 0,070	0,004 (0,0026-0,0053)	-	-
BA	80	0,45 $\pm$ 0,051	3,7 (2,31-5,92)	-	981 (599,3-1604,2)
HB	120	0,59 $\pm$ 0,096	17,3 (-)	4,7 (2,05-10,79)	4609 (2285,7-9294,9)
GH	120	1,72 $\pm$ 0,10	22,9 (10,97-64,35)	6,2 (3,53-11,04)	6101 (4996,7-7449,8)

Las CL<sub>50</sub> obtenidas fueron 0,004; 3,68; 17,3 y 22,94 % p/v para las poblaciones *P. humanus humanus*, BA, HB y GH respectivamente. Con BA como población referencia, se obtuvieron niveles de resistencia de 4,7 (2,05-10,79) y 6,2 (3,53-11,04) para HB y GH respectivamente. En ambos casos los intervalos de confianza muestran que las CL<sub>50</sub> difieren significativamente. Tomando *P. humanus humanus* como referencia, se obtuvieron niveles de

resistencia de 981 (599,3-1604,2); 4609 (2285,7-9294,9) y 6101 (4996,7-7449,8) para BA, HB y GH respectivamente. En todos las tres poblaciones hay diferencias significativas entre las  $CL_{50}$ .

## 2) Resistencia a d-fenotrina

### *Estados postembrionarios*

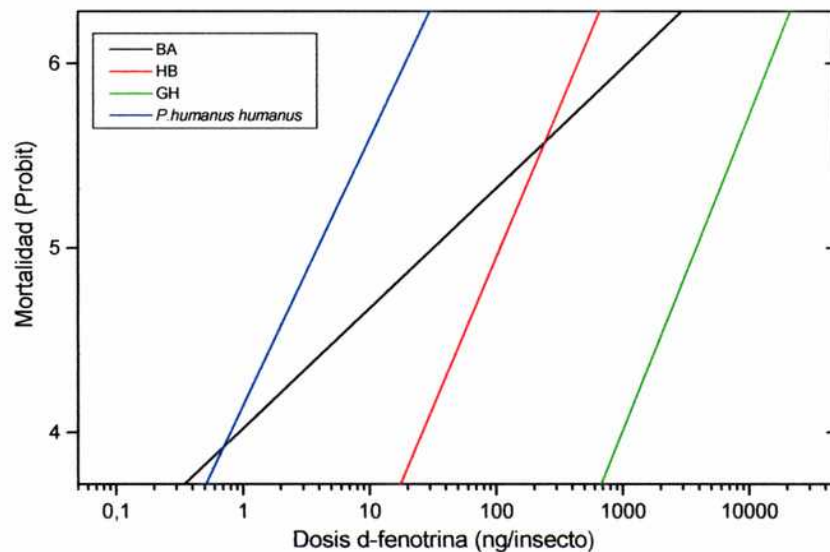
La tabla 5 muestra los valores de  $DL_{50}$ , los niveles de resistencia y los correspondientes intervalos de confianza al 95% para el insecticida d-fenotrina en cada población. Las curvas dosis respuesta (regresión probit) de cada población se grafican en la figura 26. Las pendientes de las curvas dosis respuesta y sus intervalos de confianza se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Estados postembrionarios *P. humanus capitis* y *P. humanus humanus*. Pendiente de curva dosis-respuesta,  $DL_{50}$  y niveles de resistencia a d-fenotrina.

Población	n	Pendiente $\pm$ ES	Dosis Letal 50 (ng/insecto) (95% CL)	Nivel de Resistencia (95%CL) Referencia BA	Nivel de Resistencia (95% CL). Referencia <i>P. humanus humanus</i>
<i>P. humanus humanus</i> .	110	1,45 $\pm$ 0,070	3,88 (2,07-8,46)		
BA	150	0,65 $\pm$ 0,037	31,73 (12,98-69,65)		8,2 (6,37-10,51)
HB	180	1,62 $\pm$ 0,060	106,97 (44,98-256,01)	3,4 (2,66-4,27)	27,6 (23,69-32,11)
GH	80	1,70 $\pm$ 0,131	3779,96 (2232,16-16021,47)	119,1 (91,37-155,29)	974,7 (802,11-1184,4)

Las  $DL_{50}$  obtenidas fueron 3,88; 31,73; 106, 97 y 3779,96 ng/insecto para las poblaciones *P. humanus humanus*, BA, HB y GH respectivamente. Utilizando la población BA como referencia de población de campo se obtuvieron niveles de resistencia de 3,4 (2,66-4,27) y 119,1 (91,37-155,29) para HB y GH respectivamente. Los intervalos de confianza de los niveles de resistencia muestran que en todos los casos las  $DL_{50}$  difieren significativamente. Utilizando la población *P. humanus humanus* como referencia se obtuvieron 8,2 (6,37-10,51), 27,6 (23,69-32,11) y 974,7 (802,11-1184,4) para BA, HB y GH respectivamente. Los intervalos de confianza muestran que hay diferencias significativas entre las  $DL_{50}$  comparadas.

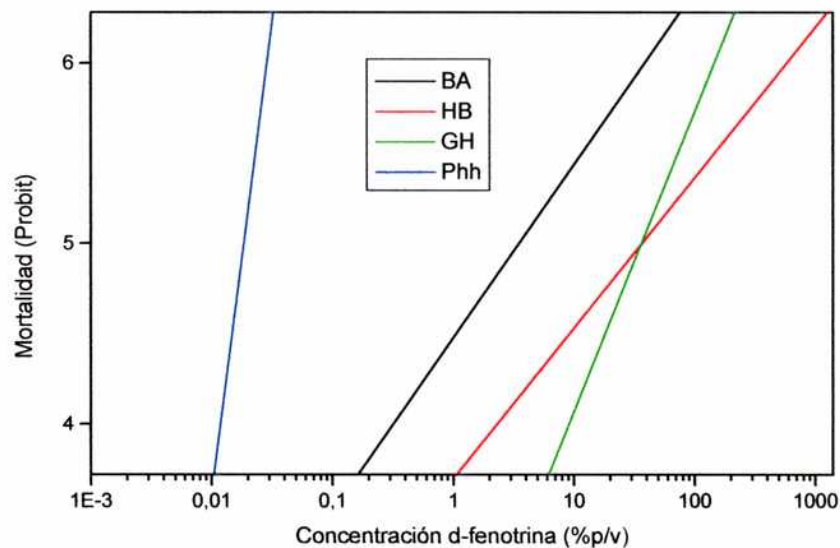
Figura 26. Curvas concentración-respuesta para d-fenotrina en estados postembrionarios de piojos



### Embriones

La tabla 6 muestra los valores de  $CL_{50}$ , los niveles de resistencia y los correspondientes intervalos de confianza al 95% obtenidos para el insecticida d-fenotrina en huevos de cada población. En la figura 27 se grafican las curvas concentración-respuesta para cada población. Los valores de las pendientes de las curvas con sus errores estándar se muestran en la tabla 6.

Figura 27. Curvas concentración-respuesta para d-fenotrina en huevos de piojos



Las  $CL_{50}$  obtenidas fueron 0,018; 3,48; 36,07 y 35,95 %p/v para las poblaciones *P. humanus humanus*, BA, HB y GH respectivamente. Utilizando BA como referencia se obtuvieron niveles de resistencia de 10,4 (7,97-13,48) y 10,3 (8,57-12,45) para HB y GH respectivamente. Los intervalos de confianza de los niveles de resistencia muestran que en todos los casos las  $CL_{50}$  comparadas difieren significativamente. Utilizando la población *P. humanus humanus* como referencia se obtuvieron niveles de resistencia de 190,1 (165,89-217,82); 1969,7 (1545,41-2510,36) y 1963,1 (1678,67-2296,10) para BA, HB y GH respectivamente. Los intervalos de confianza muestran que hay diferencias significativas entre las  $CL_{50}$  comparadas.

Tabla 6. Huevos *P. humanus capitis* y *P. humanus humanus*. Pendientes de curva concentración-respuesta.  $CL_{50}$  y niveles de resistencia para el insecticida d-fenotrina.

Población	n	Pendiente $\pm$ ES	Concentración Letal 50 (%p/v) (95% CL)	Nivel de Resistencia (95% CL) referencia BA	Nivel de Resistencia (95% CL) referencia <i>P. humanus humanus</i>
<i>P. humanus humanus</i>	120	5,18 $\pm$ 0,287	0,018 (0,017-0,019)		
BA	410	0,96 $\pm$ 0,031	3,48 (1,94-5,92)		190,1 (165,89-217,82)
HB	200	0,83 $\pm$ 0,055	36,07 (19,15-107,69)	10,4 (7,97-13,48)	1969,7 (1545,41-2510,36)
GH	140	1,66 $\pm$ 0,14	35,95 (31,53-41,95)	10,3 (8,57-12,45)	1963,1 (1678,67-2296,10)

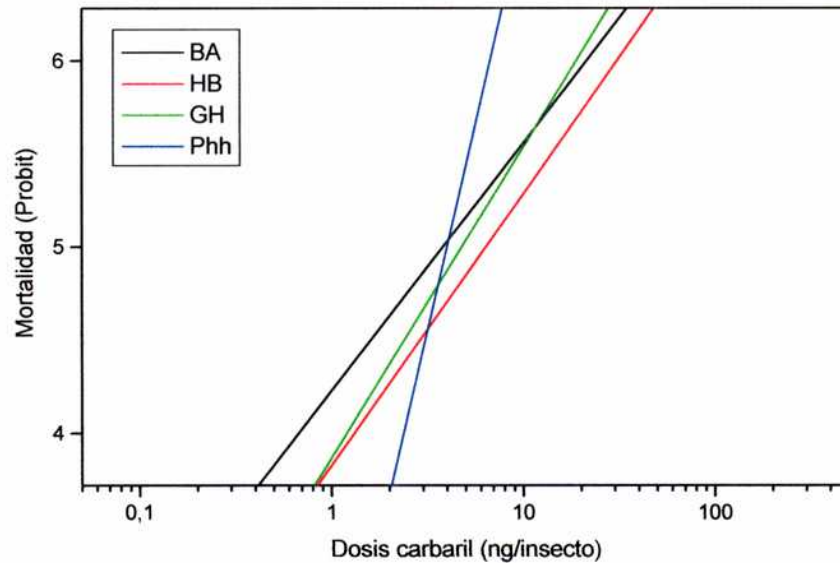
### 3) Resistencia a carbaril

#### *Estados postembrionarios*

La tabla 7 muestra los valores de  $DI_{50}$ , los niveles de resistencia y los correspondientes intervalos de confianza al 95% obtenidos para el insecticida carbaril en cada población. En la figura 28 se grafican las curvas dosis-respuesta para cada población. Los valores de las pendientes de las curvas dosis-respuesta y sus errores estándar se muestran en la tabla 7.



Figura 28. Curvas dosis-respuesta para carbaril en formas eclosionadas de piojos.

Tabla 7. Estados postembrionarios de piojos. Pendientes de las curvas dosis-respuesta, DL<sub>50</sub> y niveles de resistencia al insecticida carbaril.

Población	n	Pendiente ± ES	Dosis Letal 50 (ng/insecto) (95% CL)	Nivel de Resistencia (95% CL) referencia BA	Nivel de Resistencia (95% CL) referencia <i>P.humanus humanus</i>
<i>P. humanus humanus.</i>	90	4,41 ± 0,225	3,98 (3,76-4,21)	-	-
BA	100	1,33 ± 0,069	3,79 (1,7-6,68)	-	1,0 (0,82-1,1)
HB	110	1,46 ± 0,072	6,34 (2,32-11,53)	1,7 (1,39-2,01)	1,6 (1,38-1,83)
GH	100	1,67 ± 0,088	4,75 (2,47-10,62)	1,3 (1,06-1,49)	1,2 (1,06-1,34)

Las DL<sub>50</sub> obtenidas fueron 3,98; 3,79; 6,34 y 4,75 ng/insecto para las poblaciones *P. humanus humanus*, BA, HB y GH respectivamente. Utilizado la población BA como referencia, se obtuvieron niveles de resistencia de 1,7 (1,39-2,012) y 1,3 (1,06-1,49) para HB y GH respectivamente. Los intervalos de confianza de los niveles de resistencia muestran que las DL<sub>50</sub> difieren significativamente. Utilizando la población *P. humanus humanus* como referencia se obtuvieron 1,0 (0,82-1,1); 1,6 (1,38-1,83) y 1,2 (1,06- 1,34) para BA, HB y GH



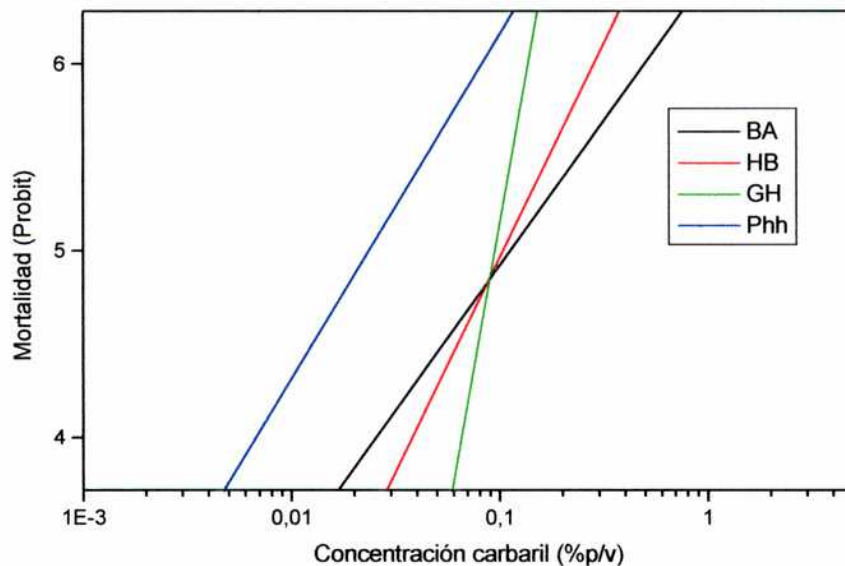
respectivamente. Los intervalos de confianza de las poblaciones HB y GH muestran que hay diferencias significativas entre las  $DL_{50}$ , por el contrario no hay diferencias significativas en la población BA.

En todos los casos (con BA y *P. humanus humanus* como referencias) donde existen diferencias significativas entre las  $DL_{50}$ , los niveles de resistencia son cercanos a 1 ng/insecto y los intervalos de confianza están cercanos a incluir el 1.

### **Embriones**

La tabla 8 muestra los valores de  $CL_{50}$ , los niveles de resistencia y los correspondientes intervalos de confianza al 95% obtenidos para el insecticida carbaril en cada población. En la figura 29 se grafican las curvas concentración-respuesta para cada población. Los valores de las pendientes de las curvas concentración-respuesta y cada error estándar se muestran en la tabla 8.

Figura 29. Curvas concentración-respuesta para carbaril en huevos de piojos



Las  $CL_{50}$  obtenidas fueron 0,02; 0,11; 0,10 y 0,09 %p/v para las poblaciones *P. h. humanus*, BA, HB y GH respectivamente. Utilizando la población BA como susceptible se obtuvieron niveles de resistencia de 0,9 (0,82-1,04) y 0,8 (0,75-0,94) para HB y GH respectivamente. Para las poblaciones *P. humanus humanus* y GH las  $CL_{50}$  comparadas difieren significativamente, pero en el caso de GH el intervalo de confianza está cercano a incluir el 1. En el caso de HB las  $CL_{50}$  no difieren significativamente. Utilizando la población *P. humanus humanus* como referencia se obtuvieron niveles de resistencia de 4,8 (3,9-5,91);

4,4 (3,6-5,43) y 4,9 (3,3-4,93) para BA, HB y GH respectivamente. En todos los casos hay diferencias significativas entre las CL<sub>50</sub> comparadas.

Tabla 8. Huevos *P. humanus capitis* y *P. humanus humanus*. Pendientes de curva concentración-respuesta. CL<sub>50</sub> y niveles de resistencia para el insecticida carbaril.

Población	n	Pendiente ± ES	Concentración Letal 50 (%p/v) (95% CL)	Grado de Resistencia (95% CL) referencia BA	Grado de Resistencia (95% CL) referencia <i>P. humanus humanus</i>
<i>P. humanus humanus</i>	120	1,84 ± 0,144	0,02 (0,019-0,027)		
BA	420	1,55 ± 0,054	0,11 (0,06-0,32)		4,8 (3,90-5,91)
HB	190	2,29 ± 0,104	0,10 (0,07-0,16)	0,9 (0,82-1,04)	4,4 (3,60-5,43)
GH	100	6,22 ± 0,631	0,09 (0,088-0,100)	0,8 (0,75-0,94)	4,9 (3,30-4,932)

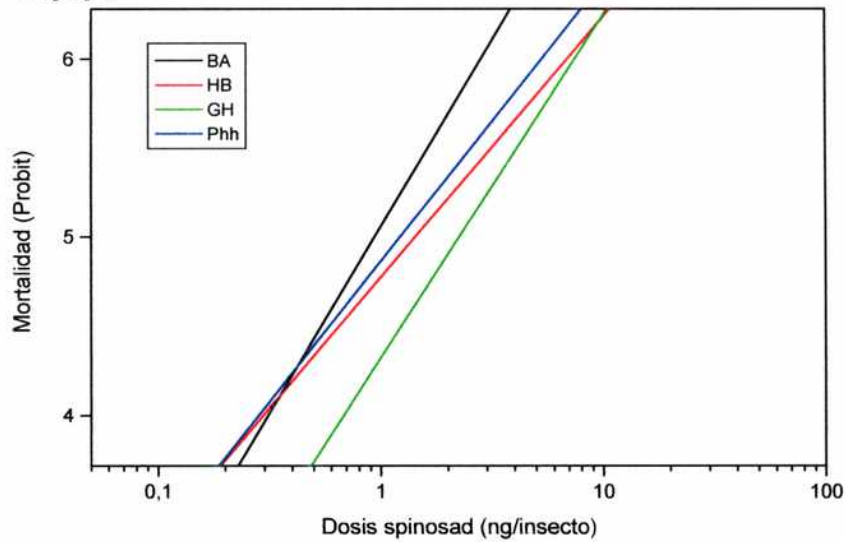
#### 4) Resistencia a spinosad

##### *Estados postembrionarios*

La tabla 9 muestra los valores de DL<sub>50</sub>, los niveles de resistencia y los correspondientes intervalos de confianza al 95% obtenidos para el insecticida spinosad en cada población. Las curvas dosis-respuesta se grafican en la figura 30. En la tabla 9 se muestran los valores de las pendientes de las curvas y sus errores estándar.

Las DL<sub>50</sub> obtenidas fueron 1,22; 0,93; 1,42 y 2,23 ng/insecto para las poblaciones *P. humanus humanus*, BA, HB y GH respectivamente. Utilizando la población BA como referencia, se obtuvieron niveles de resistencia de 1,5 (1,34-1,72) y 2,4 (2,09-2,74) para HB y GH respectivamente. Los intervalos de confianza de los niveles de resistencia muestran que las DL<sub>50</sub> difieren significativamente. Utilizando la población *P. humanus humanus* como referencia se obtuvieron 0,8 (0,65-0,91); 1,2 (0,98-1,39) y 1,8 (1,54-2,2) para BA, HB y GH respectivamente. Los intervalos de confianza de las poblaciones BA y GH muestran que las DL<sub>50</sub> difieren significativamente. Para la población HB no se observa diferencias significativas entre las DL<sub>50</sub>.

Figura 30. Curvas dosis-respuesta para spinosad en estados postembrionarios de piojos



En los casos donde existen diferencias significativas entre las  $DL_{50}$ , los niveles de resistencia son cercanos a 1 ng/insecto y los intervalos de confianza están cercanos a incluir el 1. Esto no es así en el caso de la población GH en referencia a BA, aquí se observa un nivel de resistencia en el orden de 2 ng/insecto y el intervalo de confianza cercano a 2.

Tabla 9. Estados postembrionarios. Pendientes de las curvas dosis respuesta,  $DL_{50}$  y niveles de resistencia para el insecticida spinosad.

Población	n	Pendiente $\pm$ ES	Dosis Letal 50 (ng/insecto) (95% CL)	Nivel de Resistencia (95% CL) referencia BA	Nivel de Resistencia (95% CL) referencia <i>P.humanus humanus</i>
<i>P. humanus humanus.</i>	90	$1,57 \pm 0,094$	1,22 (0,74-2,41)	-	-
BA	140	$2,09 \pm 0,084$	0,93 (0,74-1,18)	-	0,8 (0,65-0,91)
HB	210	$1,46 \pm 0,055$	1,42 (0,86-2,36)	1,5 (1,34-1,72)	1,2 (0,98-1,39)
GH	100	$1,93 \pm 0,094$	2,23 (1,46-3,29)	2,4 (2,09-2,74)	1,8 (1,54-2,2)

### Embriones

La tabla 10 muestra los valores de  $CL_{50}$ , los niveles de resistencia y los correspondientes intervalos de confianza al 95% obtenidos para el insecticida spinosad en cada población. En la figura 31 se grafican las curvas concentración-respuesta para cada población. Los valores de las pendientes de las curvas y cada error estándar se muestran en la tabla 10.

Figura 31. Curvas concentración-respuesta para spinosad en huevos de piojos

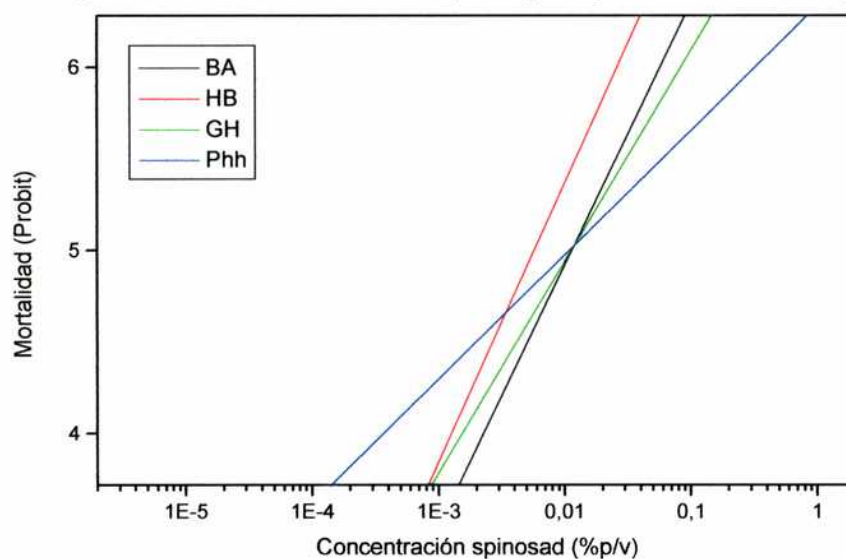


Tabla 10. Huevos *P. humanus capitis* y *P. humanus humanus*. Pendientes de curva concentración-respuesta.  $CL_{50}$  y niveles de resistencia para el insecticida spinosad.

Población	n	Pendiente $\pm$ ES	Concentración Letal 50 (%p/v) (95% CL)	Nivel de Resistencia (95% CL) referencia BA	Nivel de Resistencia (95% CL) referencia <i>P. humanus humanus</i>
<i>P. humanus humanus</i>	120	0,68 $\pm$ 0,046	0,01 (0,004-0,045)	-	-
BA	300	1,42 $\pm$ 0,054	0,01 (0,008-0,015)	-	1,1 (0,78-1,42)
HB	150	1,51 $\pm$ 0,116	0,006 (0,003-0,009)	0,5 (0,41-0,62)	0,5 (0,38-0,73)
GH	180	1,15 $\pm$ 0,064	0,01 (0,003-0,03)	1,0 (0,82-1,19)	1,0 (0,76-1,42)



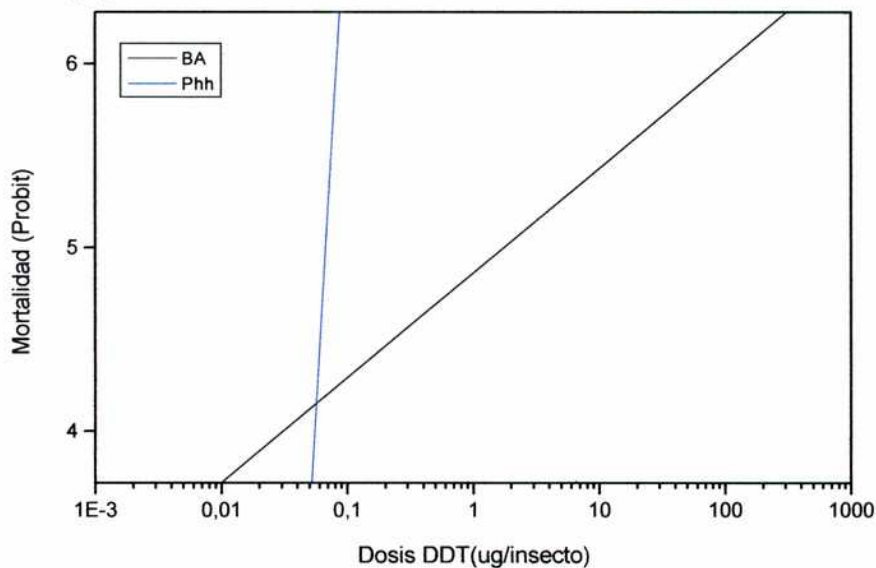
Las  $CL_{50}$  obtenidas fueron 0,01; 0,01; 0,006 y 0,01 %p/v para las poblaciones *P. h. humanus*, BA, HB y GH respectivamente. Utilizando la población BA como susceptible se obtuvieron niveles de resistencia de 0,5 (0,41-0,62) y 1,0 (0,82-1,19) para HB y GH respectivamente. El intervalo de confianza del nivel de resistencia muestra que para HB las  $CL_{50}$  comparadas difieren significativamente. En el caso de GH las  $CL_{50}$  no difieren significativamente. Utilizando la población *P. humanus humanus* como referencia se obtuvieron niveles de resistencia de 1,1 (0,78-1,42); 0,5 (0,38-0,73) y 1,0 (0,76-1,42) para BA, HB y GH respectivamente. BA y GH muestran diferencias significativas en las  $CL_{50}$  comparadas. La población HB no muestra diferencia significativa.

## 5) Resistencia a DDT

### *Estados postembrionarios*

La tabla 11 muestra los valores de  $DL_{50}$ , los niveles de resistencia y los correspondientes intervalos de confianza al 95% obtenidos para el insecticida DDT en cada población. En la figura 32 se grafican las curvas dosis-respuesta para *P. humanus humanus* y BA. Los valores de las pendientes de las curvas y sus errores estándar se muestran en la tabla 11.

Figura 32. Curvas dosis-respuesta para DDT en estados postembrionarios de piojos



Las  $DL_{50}$  obtenidas fueron 0,067; 1,73; >5 y >5  $\mu\text{g/insecto}$  para las poblaciones *P. humanus humanus*, BA, HB y GH respectivamente. Utilizando la población BA como referencia, se obtuvieron niveles de resistencia de >2,8 y >2,8 para HB y GH respectivamente.

Para la población *P. humanus humanus* las DL<sub>50</sub> difieren significativamente. Para las poblaciones HB y GH no hay intervalos de confianza. Utilizando la población *P. humanus humanus* como referencia se obtuvieron 25,8 (17,18-38,76); >74 y >74 para las poblaciones BA, HB y GH respectivamente. La población BA muestra que las DL<sub>50</sub> difieren significativamente. Para las poblaciones HB y GH no hay intervalos de confianza.

Tabla 11. Estados postembrionarios de piojos. Pendientes de las curvas dosis respuesta, DL<sub>50</sub> y niveles de resistencia para el insecticida DDT.

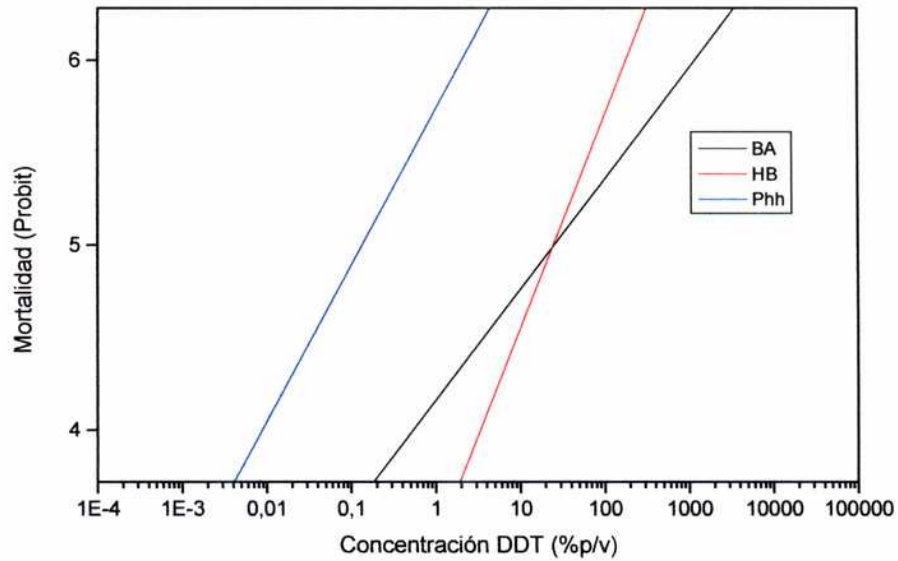
Población	n	Pendiente ± ES	Dosis Letal 50 (µg/insecto) (95% CL)	Nivel de Resistencia (95% CL) referencia BA	Nivel de Resistencia (95% CL) referencia <i>P. humanus humanus</i>
<i>P. humanus humanus.</i>	60	11,50 ± 0,731	0,07 (0,066-0,071)		
BA	80	0,57 ± 0,048	1,73 (1,25-2,53)		25,8 (17,18-38,76)
HB	80		>5	>2,8	>74,6
GH	80		>5	>2,8	>74,6

### ***Embriones***

La tabla 12 muestra los valores de CL<sub>50</sub>, los niveles de resistencia y los correspondientes intervalos de confianza al 95% obtenidos para el insecticida DDT en cada población. En la figura 33 se grafican las curvas concentración-respuesta para *P. humanus humanus*, BA y HB. Los valores de las pendientes de las curvas y sus errores estándar se muestran en la tabla 12.

Las CL<sub>50</sub> obtenidas fueron 0,13; 24,84; 24,24 y >50 %p/v para las poblaciones *P. h. humanus*, BA, HB y GH respectivamente. Utilizando BA como población susceptible se obtuvieron niveles de resistencia de 1,0 (0,65-1,48) y >2 para *P. humanus humanus*, HB y GH respectivamente. En el caso de HB las CL<sub>50</sub> no difieren significativamente. Utilizando la población *P. humanus humanus* como referencia se obtuvieron niveles de resistencia de 188,6 (117,22-303,59); 184,5 (124,11-272,99); >400 para BA, HB y GH respectivamente. En las tres poblaciones hay diferencias significativas entre las CL<sub>50</sub> comparadas.

Figura 33. Curvas concentración-respuesta para DDT en huevos de piojos

Tabla 12. Huevos *P. humanus capitis* y *P. humanus humanus*. Pendientes de curva concentración-respuesta.  $CL_{50}$  y niveles de resistencia para el insecticida DDT.

Población	n	Pendiente $\pm$ ES	Concentración Letal 50 (%p/v) (95% CL)	Grado de Resistencia (95% CL) referencia BA	Grado de Resistencia (95% CL) referencia <i>P. humanus humanus</i>
<i>P. humanus humanus</i> .	80	$0,85 \pm 0,089$	0,13 (0,10-0,19)	0,005 (0,003-0,009)	-
BA	120	$0,60 \pm 0,057$	24,8 (11,91-75,09)	-	188,6 (117,22-303,59)
HB	120	$1,15 \pm 0,072$	24,2 (11,75-59,70)	1,0 (0,65-1,48)	184,1 (124,11-272,99)
GH	120	$1,66 \pm 0,14$	> 50	> 2	> 400

**b) TOXICOLOGÍA 2: inhibición de complejos enzimáticos (in vivo)**

La tabla 13 muestra los porcentajes de mortalidad para dosis única de d-fenotrina, y coexposición de d-fenotrina y los inhibidores (butóxido de piperonilo y trifenilfosfato). Se observó un mayor porcentaje de mortalidad con el butóxido de piperonilo tanto en embriones como en estados postembrionarios. En el caso de inhibición con trifenilfosfato, sólo se observó aumento de mortalidad en el caso de estados postembrionarios. La dispersión de los resultados obtenidos por el doble tratamiento tanto en adultos como en embriones no permitieron realizar prueba de significación.

Tabla 13. Inhibición *in vivo*. Porcentaje de mortalidad con d-fenotrina, Butóxido de piperonilo y trifenilfosfato

Pretratamiento	Estados Postembrionarios			Embriones		
		BP <sup>2</sup>	TPP <sup>3</sup>		BP <sup>2</sup>	TPP <sup>3</sup>
P. huamnus humanus*	44 ± 20	100	46 ± 30	14,6 ± 3,2	47 ± 14,5	-
BA**	65 ± 13	84 ± 23	75	22 ± 18	26 ± 4	22,5 ± 4
HB**	44 ± 16	53 ± 23	64 ± 26	18 ± 16	44 ± 14	22,5 ± 18
GH**	10 ± 9	42 ± 25	43 ± 40	12 ± 5	33 ± 15	17 ± 3,5

\*Estados postembrionarios d-fenotrina 0,1 µg/µl, embriones d-fenotrina 0,01% p/v

\*\**P. humanus capitis*. Estados postembrionarios d-fenotrina 1 µg/µl. Embriones d-fenotrina 10% p/v.

<sup>2</sup> Estados postembrionarios 150%. Embriones 10% p/v.

<sup>3</sup> Estados postembrionarios 150%. Embriones 10% p/v



## e) BIOQUÍMICA

### 1) Actividad del complejo enzimático P450 (actividad oxidasa)

#### *Estados postembrionarios*

En este trabajo sólo se determinó la actividad ECOD (actividad oxidasa) de la población HB. La actividad oxidasa de la población BA y de la población GH fueron determinadas en el trabajo de González Audino et al (2004) y tales valores son utilizados en este trabajo. La actividad es expresada en nanogramos de hidroxycumarina (producto de la reacción de deetilación) en las 4 horas de incubación.

La tabla 14 muestra los valores de actividad etoxicumarina-deetilasa para la población susceptible BA y las dos poblaciones resistentes HB y GH. La población susceptible mostró el nivel más bajo de actividad ( $4,5 \pm 0,39 \text{ ng} \times 200 \mu\text{l}^{-1} \times 4 \text{hs}^{-1}$ ). La población de alta resistencia (según resistencia a permetrina, ver materiales y métodos) mostró el nivel más alto de actividad ( $15,6 \pm 1,85 \text{ ng} \times 200 \mu\text{l}^{-1} \times 4 \text{hs}^{-1}$ ). La población de resistencia media (según resistencia a permetrina) mostró un nivel de actividad intermedio BA y GH ( $10,56 \pm 1,32 \text{ ng} \times 200 \mu\text{l}^{-1} \times 4 \text{hs}^{-1}$ ).

Tabla 14. Actividad oxidasa (etoxicumarina-O-deetilasa) en adultos de piojos

Población	Actividad etoxicumarina-O-deetilasa (ng $\times 200 \mu\text{l}^{-1} \times 4 \text{hs}^{-1}$ )
<i>P humanus humanus</i>	$3,2 \pm 0,5$
BA*	$4,7 \pm 0,39$
HB	$10,6 \pm 1,32$
GH*	$12,3 \pm 1,85$

\*Datos extraídos de González Audino et al (2004)

#### *Embriones*

Se intentó determinar las condiciones óptimas de medición de actividad oxidasa (actividad etoxicumarina-O-deetilasa ó ECOD) en huevos tardíos. Para ello se estudió la actividad oxidasa en función del número de huevos y en función de la concentración de sustrato (7-etoxicumarina) (figs. 34 y 35). En ambos casos no se obtuvo relación entre la variable dependiente (actividad oxidasa-fluorescencia) y las variables independientes (concentración de sustrato y número de huevos), indicando que éste metodología no permite medir actividad oxidasa en huevos de *P. humanus capitis*.

Figura 34. Actividad oxidasa vs concentración de sustrato en huevos de piojos.

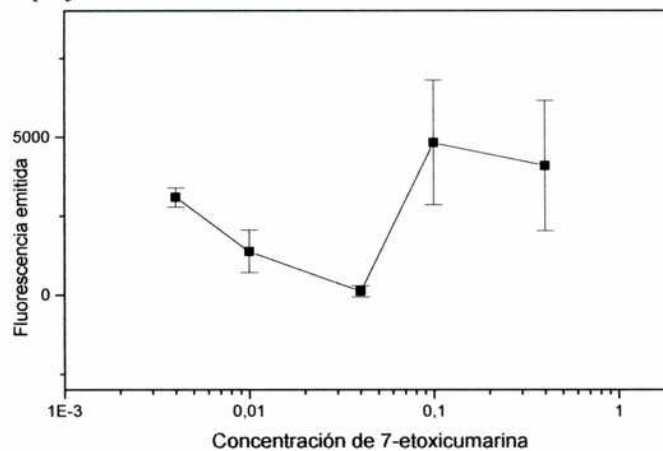
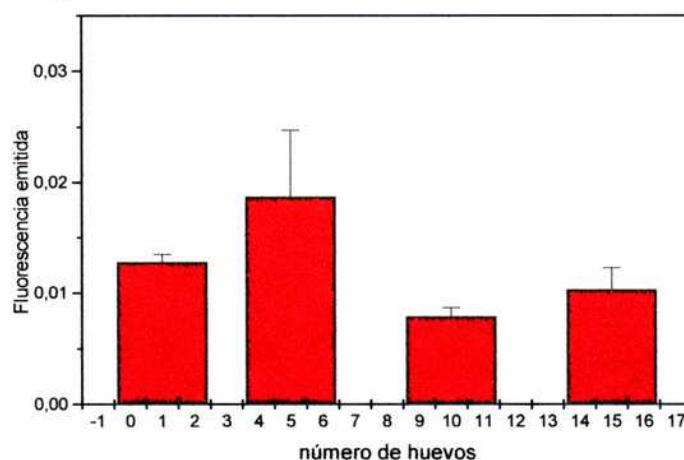


Figura 35. Actividad oxidasa en función del número de huevos.



## 2) Actividad Hidrolasa (Esterasa)

### • Método de Gomori

#### *Estados postembrionarios*

Se determinó la concentración de sustrato óptima para la determinación de actividad. La figura 36 muestra el aumento de la actividad (absorbancia) a medida que aumenta la concentración de sustrato. Se determinó como la concentración óptima de sustrato aquella que mostró mayor actividad. La concentración  $\alpha$ -naftilacetato que mostró la mayor actividad elegida fue la mayor concentración utilizada, 0,56 mg/ml. No se pudo aumentar la concentración de sustrato debido al límite de solubilidad de éste en el medio de incubación (acetona y buffer fosfato).

Figura 36. Actividad vs Concentración sustrato. Adultos

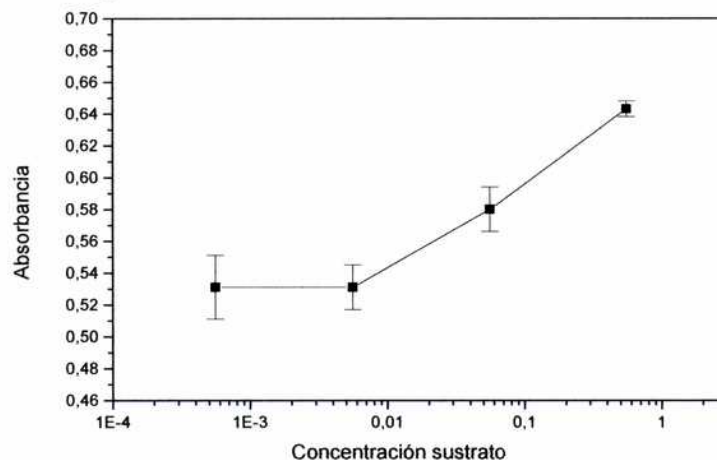
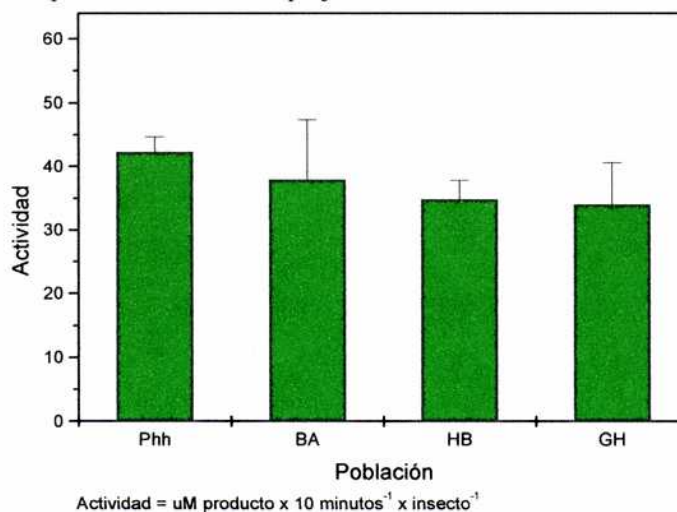


Figura 37. Actividad alfa naftil acetato esterasa en estados postembrionarios en piojos



La figura 37.y la tabla 15 muestra la actividad  $\alpha$ -naftilacetato esterasa en adultos de *P. humanus capitis*. La población *P humanus humanus* difiere significativamente de la actividad observada en HB y GH ( $p < 0,05$ ), sin embargo no hay diferencias significativas entre las poblaciones de *P. humanus capitis* ( $p > 0,05$ ).

### **Embriones**

Se determinó la concentración de sustrato ( $\alpha$ -naftilacetato) óptima para la medición en huevos. La figura 38 muestra el aumento de actividad (absorbancia) en función de la concentración de  $\alpha$ .naftilacetato. Se determinó como óptima la mayor concentración de  $\alpha$ -naftilacetato utilizada en el análisis, 0,56 mg/ml, ya que es la concentración que mostró mayor

actividad. Por razones de solubilidad del  $\alpha$ -naftilacetato en acetona y buffer fosfato (1:4) no se pudo analizar concentraciones mayores.

También se determinó el número de huevos óptimo para utilizar en el homogenato muestra. La figura 39 muestra el aumento de actividad en función de la cantidad de huevos utilizada en el homogenato. La figura muestra el aumento en la actividad esterasa con aumento en la cantidad de muestra utilizada, y también que fue posible medir actividad en todos los homogenatos utilizados. La determinación del número de huevos óptimo fue un compromiso entre la actividad medida, la cantidad de huevos disponibles para la experiencia y la practicidad en el manejo de tal cantidad de huevos, siendo el último factor criterio subjetivo del investigador. Teniendo en cuenta tal compromiso se determinó el número de 5 huevos por homogenato como número óptimo.

Figura 38. Actividad esterasa vs sustrato (alfa-naftilacetato). Huevos

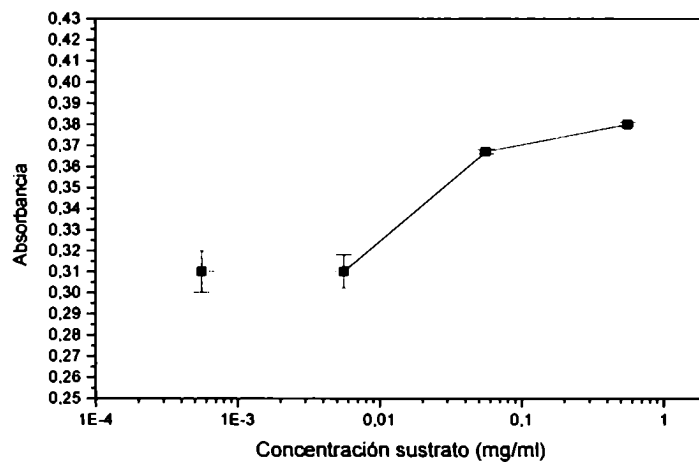
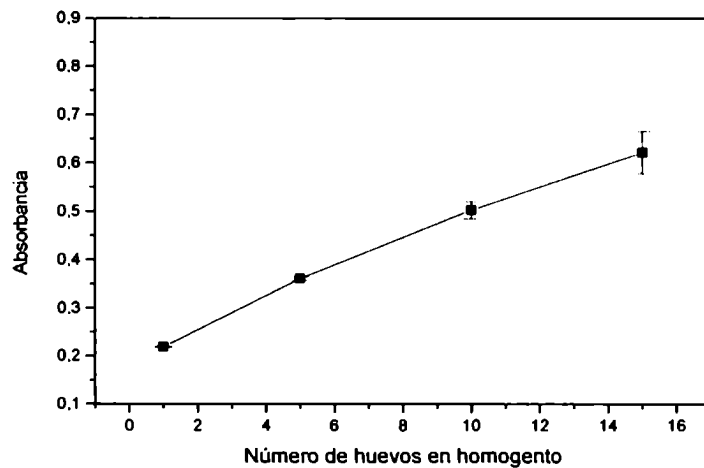


Figura 39. Actividad alfa-naftilacetato esterasa vs número de huevos.



El aumento de la actividad  $\alpha$ -naftilacetato esterasa en función del aumento de la concentración de sustrato y de la cantidad de muestra (figs. 38 y 39) permitió considerar el método de Gomori como un método viable para la medición de actividad esterasa en huevos de *P. humanus capitis*, y como posible método para observar diferencias en la actividad enzimática entre poblaciones resistentes y susceptibles.

Figura 40. Actividad alfa-naftil acetato esterasa en embriones de piojos

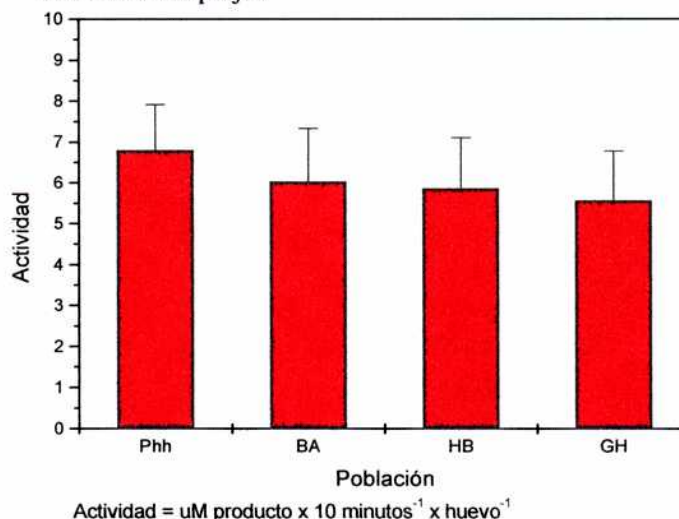


Tabla 15. Actividad  $\alpha$ -naftilacetato esterasa en huevos y adultos de piojos.

Población	Embriones $\mu\text{M } \alpha\text{-naftol (huevo)}^{-1}(10\text{min})^{-1}$	Estados postembrionarios $\mu\text{M } \alpha\text{-naftol (insecto)}^{-1}(10\text{min})^{-1}$
Phh	$6,8 \pm 1,11$	$42,2 \pm 2,4^*$
BA	$6,0 \pm 1,30$	$37,9 \pm 9,41$
HB	$5,9 \pm 1,3$	$34,8 \pm 3,10$
GH	$5,6 \pm 1,2$	$34,0 \pm 6,62$

\*Muestra diferencias significativas con las poblaciones HB y GH

La figura 40 y la tabla 15 muestran la actividad  $\alpha$ -naftilacetato esterasa en embriones para cada población utilizada. Si bien fue posible medir actividad esterásica en huevos por este método, el tipo de esterases determinadas con la hidrólisis enzimática del  $\alpha$ -naftilacetato no muestra diferencias en actividad entre las poblaciones estudiadas ( $p > 0,05$ ).

Aunque no se observan diferencias significativas entre las poblaciones es interesante notar que la relación de actividad de  $\alpha$ -naftil acetato esterasa entre las poblaciones muestra un perfil similar en embriones y estados postembrionarios. Esto es, el nivel de actividad



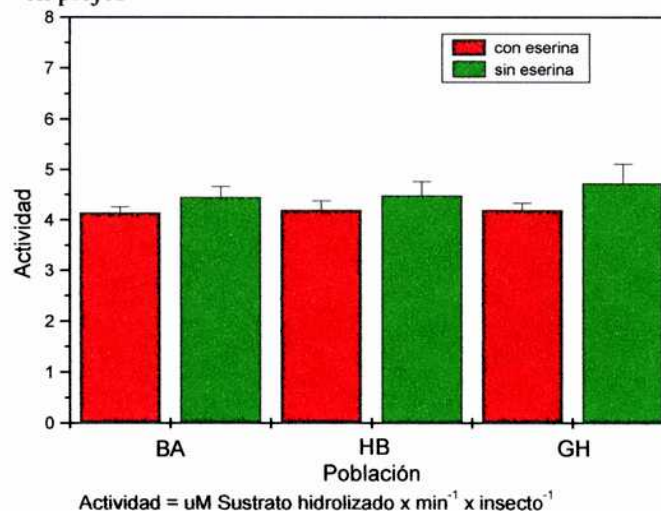
desciende desde *P. humanus humanus* (población susceptible) hasta GH (población con mayor resistencia detectada). Teniendo en cuenta esto se realizaron correlaciones no paramétricas (correlación de Spearman) para embriones y estados postembrionarios entre actividad y nivel de resistencia a permetrina. Cuando se consideraron todos los valores de actividad la correlación resultó no significativa, sin embargo cuando sólo se utilizaron los valores de actividad media la correlación fue significativa en embriones y estados postembriones ( $p < 0,005$ )

### Método de Ellman

#### *Estados postembrionarios*

Se utilizó para la medición de PTA esterases en estados postembrionarios la concentración de 60 mM ya probada en el CIPEIN. La figura 41 y la tabla 15 muestran la actividad esterasa en formas eclosionadas. También se muestran la actividad esterasa en presencia del inhibidor eserina. No se observaron diferencias significativas en las actividades enzimáticas entre las poblaciones con o sin eserina ( $p > 0,05$ ). No fue posible la medición de actividad en *P. humanus humanus* debido a que hubo interferencia del homogenato con la técnica de medición.

Figura 41. Actividad PTA esterasa en estados postembrionarios en piojos



#### *Embriones*

Se determinó la concentración de sustrato (acetato de tiofenol) óptima y el número de huevos óptimo para la medición de actividad esterasa por este método. La figura 42 muestra la actividad esterasa en función del número de huevos en homogenato. Se observa que fue

posible medir actividad esterasa en el rango de cantidad de huevos utilizados (1, 5, 10 y 15 huevos en 150 $\mu$ l de homogenato). La cantidad de huevos elegida fue de 5 huevos en 150 $\mu$ l de homogenato. La figura 43 muestra la actividad esterasa en función de la concentración de sustrato. Debido a la saturación en la medición de absorbancia en las concentraciones más altas utilizadas (90 y 180mM) se eligió la siguiente concentración más alta, 60 mM. El aumento de la actividad esterasa hacia el sustrato PTA en función con el aumento de la concentración de sustrato y de la cantidad de muestra (figs. 42 y 43) permitió considerar el método de Ellman como un método viable para la medición de actividad esterasa en embriones de *P. humanus capitis*, y como posible método para observar diferencias en la actividad enzimática entre poblaciones resistentes y susceptibles.

Figura 42. Actividad esterasa sobre PTA vs número de huevos

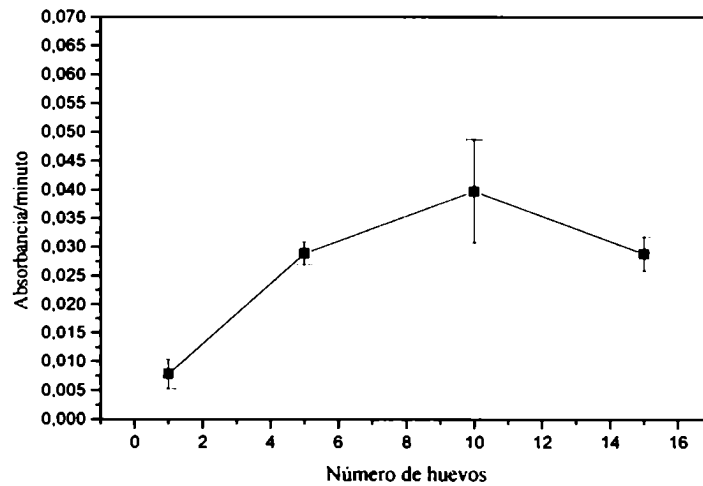
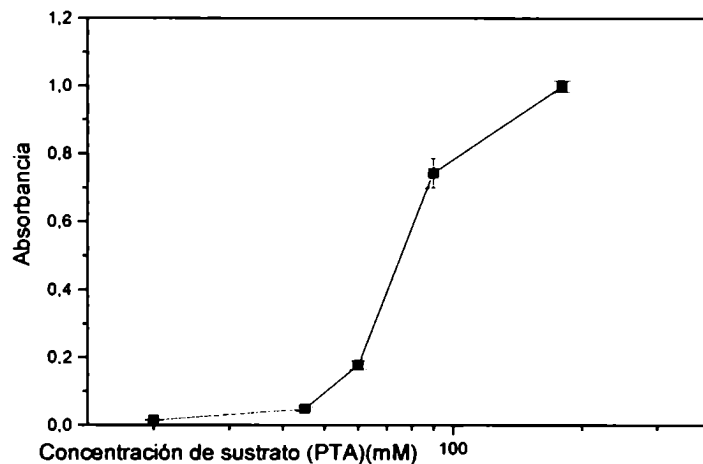


Figura 43. Actividad esterasa vs sustrato (PTA) en huevos.



Absorbancia al minuto de medición debido a saturación a mas tiempo en las concentraciones 90 y 180 mM.)

La Figura 44 y la tabla 16 muestra la actividad PTA esterasa en embriones en las poblaciones utilizadas. También se muestra la actividad esterasa en presencia del inhibidor de colinesterasas eserina. No se observó aumento o disminución de la actividad PTA esterasa en relación a las poblaciones con distintos niveles de resistencia a piretroides. Sin embargo la población *P. humanus humanus* mostró diferencias significativas con las poblaciones BA y HB cuando la actividad PTA esterasa fue medida sin el inhibidor de colinesterasas eserina ( $p < 0,05$ ).

Figura 44. Actividad PTA esterasa en embriones de piojos

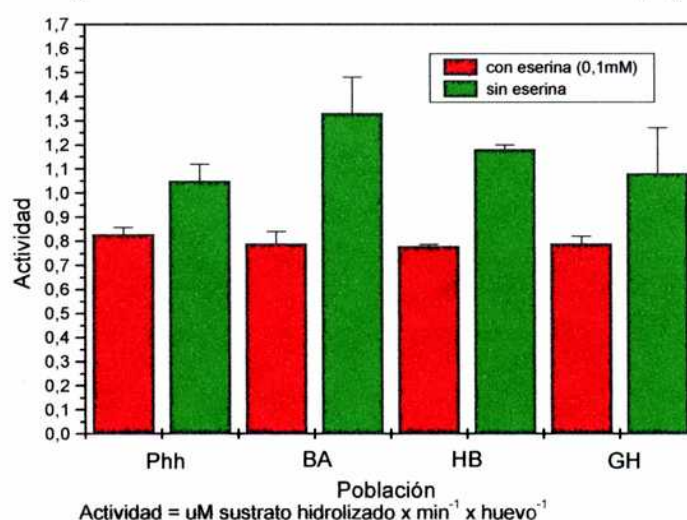


Tabla 16. Actividad PTA esterasa en adultos y embriones de piojos

Población	Embriones		Estados postembrionarios	
	$\mu\text{M}$ tiofenol ( $\text{huevo}^{-1}(\text{min})^{-1}$ )		$\mu\text{M}$ tiofenol ( $\text{insecto}^{-1}(\text{min})^{-1}$ )	
	-	eserina	-	eserina
<i>P. humanus humanus</i>	$1,05 \pm 0,071$	$0,83 \pm 0,031$	-	-
BA	$1,33 \pm 0,149$	$0,79 \pm 0,049$	$4,45 \pm 0,210$	$4,14 \pm 0,119$
HB	$1,18 \pm 0,022$	$0,78 \pm 0,006$	$4,48 \pm 0,276$	$4,19 \pm 0,192$
GH	$1,08 \pm 0,190$	$0,79 \pm 0,028$	$4,73 \pm 0,373$	$4,19 \pm 0,137$

### Método fluorométrico

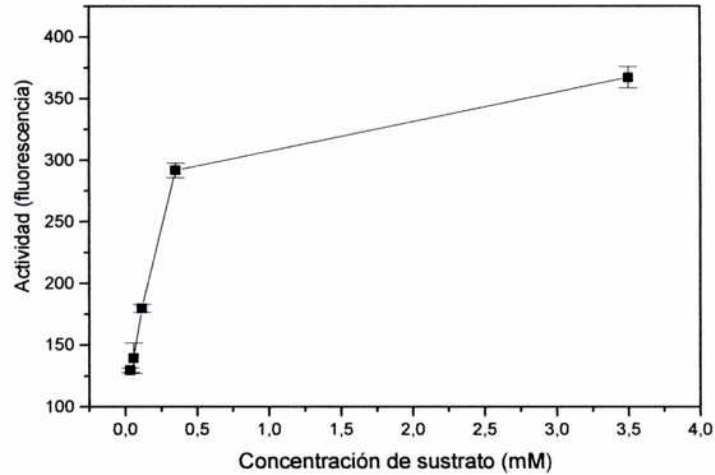
#### Estados postembriones

Se determinó la concentración de sustrato óptima para la medición de actividad permetrato esterasa en estados postembrionarios. La figura 45 muestra el incremento de la



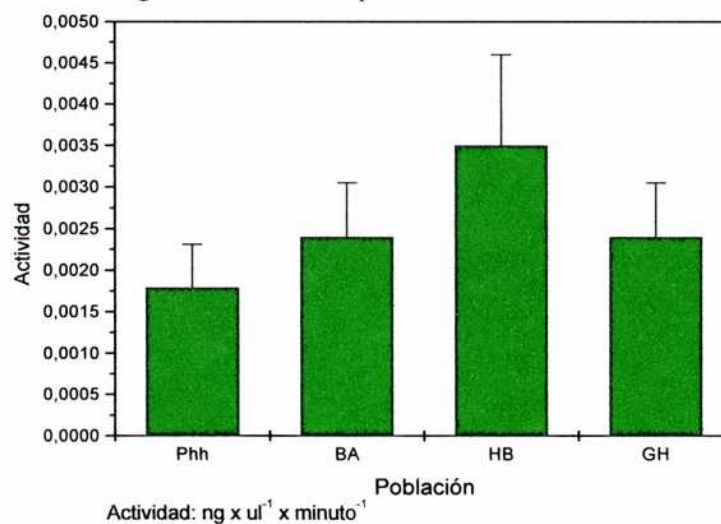
actividad detectada en función del incremento de concentración de sustrato. Se decidió utilizar 3,5 mM de permetrato de cumarina ya que fue la concentración en que más actividad fue detectada.

Figura 45. Actividad permetrato esterasa vs concentración de sustrato en estados postembrionarios de piojos.



La figura 46 y la tabla 16 muestra la actividad permetrato esterasa en las poblaciones estudiadas para los estados embrionarios. La actividad permetrato esterasa de la población *P. humanus humanus* mostró diferencias significativas con las tres poblaciones de *P. humanus capitis* (BA, HB y GH) ( $p < 0,05$ ). No se observan diferencias en la actividad permetrato esterasa en relación a los distintos niveles de resistencia a piretroides demostrados en cada población estudiada.

Figura 46. Actividad permetrato esterasa en adultos



### Embriones

Se determinó la concentración de sustrato (permetrato de cumarina) óptima y el número de huevos óptimo para la medición de actividad permetrato esterasa en embriones. La figura 47 muestra la actividad esterasa en función de la concentración de sustrato. Teniendo en cuenta que a partir de la concentración de 0,35mM la actividad esterasa no varía hacia las concentraciones mas altas, se decidió utilizar la concentración de sustrato de 0,35mM. La figura 48 muestra la actividad esterasa en función de la cantidad de huevos en el homogenato. No se pudo medir actividad utilizando 1 huevo por homogenato, pero se ha obtenido buena actividad con homogenatos de 5, 10 y 15 huevos. Considerando, la actividad obtenida, la practicidad en el manejo del material y la cantidad del material disponible se decidió utilizar 5 huevos por homogenato.

Figura 47. Actividad permetrato esterasa vs concentración de sustrato

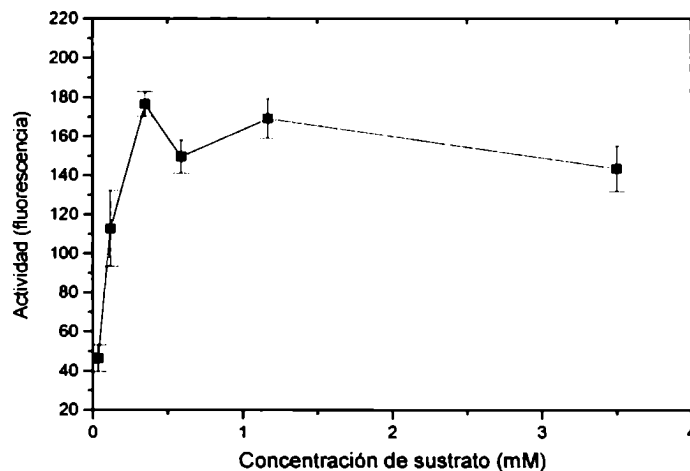


Figura 48. Actividad permetrato esterasa vs número de huevos de piojos

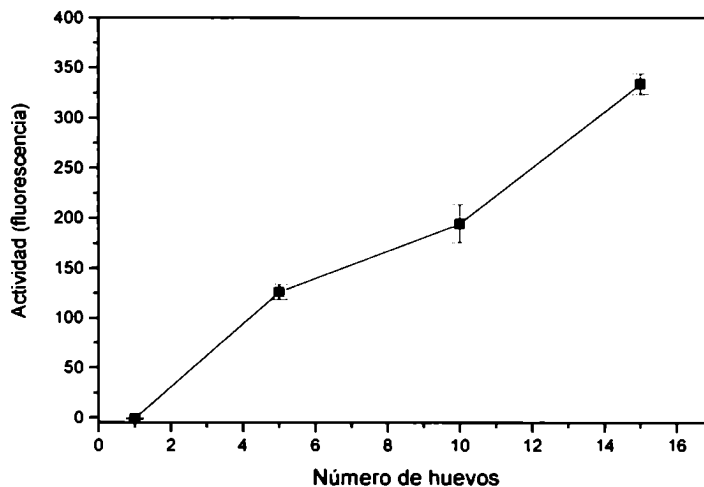
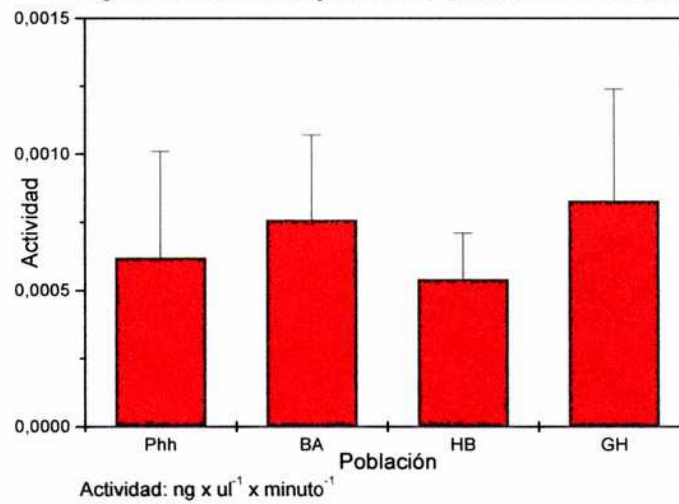


Figura 49. Actividad permetrato esterasa en embriones.



La figura 49 y la tabla 17 muestra la actividad permetrato esterasa en huevos para cada población de piojos. No se observaron diferencias significativas en la actividad permetrato esterasa entre las poblaciones estudiadas ( $p > 0,05$ ).

Tabla 17. Actividad permetrato esterasa en embriones y adultos

Población	Huevos <sup>a</sup> ng x $\mu\text{l}^{-1}$ x min $^{-1}$ 7-hidroxicumarina	Adultos <sup>b</sup> ng x $\mu\text{l}^{-1}$ x min $^{-1}$ 7-hidroxicumarina
<i>P. humanus humanus</i>	$6,2 \times 10^{-4} \pm 3,9 \times 10^{-4}$	$0,00179 \pm 5,2 \times 10^{-4} *$
BA	$7,6 \times 10^{-4} \pm 3,1 \times 10^{-4}$	$0,0024 \pm 6,5 \times 10^{-4}$
HB	$5,4 \times 10^{-4} \pm 1,7 \times 10^{-4}$	$0,0035 \pm 1,1 \times 10^{-3}$
GH	$8,3 \times 10^{-4} \pm 4,1 \times 10^{-4}$	$0,0024 \pm 6,5 \times 10^{-4}$

<sup>a</sup> homogenato = 5 huevos en 200 $\mu\text{l}$

<sup>b</sup> homogenato = 1 adulto en 200 $\mu\text{l}$

\* diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) con BA, HB y GH



## *Discusión*

## DISCUSIÓN

Gran parte de la actividad intelectual del hombre se centra en generar nuevos conocimientos y explicar los fenómenos naturales. Este objetivo ha sido y es, no siempre pero sí muchas veces, exitosamente alcanzado. El desarrollo de una rigurosa metodología de observación y documentación, posible explicación (hipótesis), experimentación y análisis, y confrontación (refutación o no), fue responsable en gran medida de los innumerables conocimientos obtenidos. En este sentido no es difícil vislumbrar el tremendo impacto de esta metodología, *el método científico*, en la evolución cultural humana.

La particular dinámica del método científico puede permitir y/o requerir el planteo y cumplimiento de objetivos *a posteriori* que no estaban dentro de los objetivos originales de un determinado proyecto de investigación. En algunos casos, se plantean nuevos objetivos desprendidos del cuerpo principal de la investigación, según el interés y gusto del investigador, que amplían el proyecto original pero que no están involucrados necesariamente en el desarrollo de los objetivos originales. En otros casos en el desarrollo de una investigación resulta necesario, a fin de alcanzar los objetivos originales, el desarrollo de una técnica o la adquisición de un conocimiento, y esa actividad por sí misma se convierte en parte de los objetivos a cumplir en tal investigación (hasta puede convertirse en un proyecto independiente). En este contexto, el desarrollo del presente trabajo de tesis requirió el planteo de objetivos *a posteriori* necesarios para poder alcanzar los objetivos originales. Teniendo en cuenta esto último, durante el desarrollo de esta discusión, no sólo se analizarán y discutirán los objetivos originales, sino que también se referirán y discutirán aquellos objetivos *a posteriori* y que, como tales, no fueron enunciados en la introducción.

El estudio de procesos toxicológicos en general, y de resistencia a insecticidas en particular, en huevos de piojos afectando al hombre es prácticamente inexistente. Por lo tanto, y a pesar de la medianamente extensa bibliografía sobre biología general de los piojos del hombre y de los más escasos trabajos sobre sus huevos (Buxton, 1946; Wigglesworth, 1972; Kim & Ludwig, 1978; Berman, 1979; Hinton, 1981; Hatsushika *et al*, 1983; Kettle, 1995, Burkhardt *et al*, 1999 a), b) y c); Ibarra, 1993; Picollo, 1999b)), ciertos aspectos del desarrollo embrionario de *P. humanus capitis* y *P. humanus humanus* relevantes para un estudio toxicológico son desconocidos. Estos aspectos fueron algunos de los mencionados objetivos *a posteriori* de la presente tesis.

### ***Desarrollo embrionario: objetivos “a posteriori”***

#### **a) Marcadores morfológicos: solución al problema del desarrollo continuo del embrión.**

El objetivo de estudiar la embriogénesis de *P. humanus capitis* y *P. humanus humanus* fue conocer el material a utilizar en el trabajo (huevos) a fin de homogeneizar las variables morfológicas-fisiológicas y la influencia sobre los aspectos toxicológicos a estudiar. Cuando se trabaja con los estadios post-embrionarios discretos (el crecimiento postembrionario de los artrópodos no es continuo), y si la cría en laboratorio está puesta a punto, es relativamente fácil homogeneizar la muestra experimental en cuanto a edad y tamaño de los individuos. Si esto no es posible, como cuando se trabaja en campo o con especies que no se crían en laboratorio, se toman individuos del mismo estadio, minimizando la variabilidad debido a la edad dentro de cada estadio con un mayor número de individuos utilizados en el bioensayo. La existencia de estadios discretos permite al investigador acotar en gran medida las edades desconocidas de los individuos recolectados y como consecuencia, disminuir en la muestra la variación fisiológica y morfológica experimentada por cada individuo a lo largo de su vida. De esta manera se logra minimizar la variación en los procesos toxicocinéticos y toxicodinámicos debido a la edad. Se debe tener en cuenta sin embargo, que la homogenización de la variabilidad fisiológica no es total ya que ciertos procesos fisiológicos varían significativamente a lo largo de cada estadio (control endócrino del proceso de muda, biorritmos, etc) afectando los procesos toxicológicos durante ese período.

Cuando se trabaja con huevos, se está trabajando con embriones en desarrollo en los cuales los cambios morfológicos-fisiológicos son continuos (no discretos) y extremadamente importantes. Como vimos en la introducción, la embriogénesis se trata de un período de desarrollo progresivo y continuo que involucra eventos bioquímicos, genéticos, fisiológicos y morfológicos relacionados a los procesos de diferenciación celular, crecimiento y morfogénesis (Gilbert, 1997). En resumen, un huevo recién fecundado es radicalmente diferente de un huevo a mitad del desarrollo y éste a su vez diferente de uno que esté por eclosionar.

Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente, los procesos toxicocinéticos y toxicodinámicos variarán significativamente en el transcurso del desarrollo embrionario. En este sentido se hace indispensable trabajar con embriones en el mismo estado temporal de la embriogénesis. A fin de homogeneizar el material de estudio (trabajar con embriones de la misma edad) es importante contar con marcadores, relativamente fáciles de reconocer, de las distintas fases del desarrollo del embrión de manera de transformar la variación continua en

variación discreta. En este sentido, la detallada observación a lupa y el consiguiente conocimiento adquirido sobre los huevos y embriones de piojos en desarrollo, permitió alcanzar este objetivo *a posteriori*.

Este trabajo de tesis permitió definir etapas en el desarrollo embrionario de *P. humanus capitis* y *P. humanus humanus* a partir de la morfogénesis de caracteres (marcadores) observados a través del corion: manchas oculares y apéndices. El paso clave en la transformación de la variación continua a una variación discreta fue definir estados a partir del desarrollo continuo de cada carácter morfológico elegido. Finalmente, la combinación de los estados de cada carácter permitió identificar tres etapas de la embriogénesis: embriones en desarrollo temprano, embriones en desarrollo medio y embriones en desarrollo tardío.

#### **b) El laboratorio como incubador de embriones de piojos**

Otro aspecto que fue necesario conocer para el desarrollo de los objetivos de este trabajo fue el de las condiciones óptimas ambientales para el desarrollo y eclosión de los huevos en laboratorio. Como es conocido, las condiciones de temperatura y humedad relativa influyen drásticamente en el desarrollo embrionario de los insectos (Wigglesworth, 1972; Hinton, 1981; Gillott, 1981). Existen combinaciones de temperatura y humedad que originan altos porcentajes de eclosión y otras combinaciones donde el porcentaje de interrupción del desarrollo embrionario y muerte del embrión será elevado (Hinton, 1981). Para el caso de *P. humanus* el conocimiento de las condiciones óptimas de temperatura y humedad relativa para el desarrollo embrionario y eclosión en laboratorio fue fundamental en los bioensayos donde se observaron y analizaron datos de acción ovicida. Las condiciones óptimas aseguraron un alto porcentaje de eclosión en los huevos control, hecho que permite estimar que la mortalidad (interrupción del desarrollo y/o no eclosión) observada en los grupos tratados se debió justamente al tratamiento, en este caso al insecticida. Los ensayos de temperatura y humedad relativa fueron realizados sólo para los embriones de *P. humanus capitis* ya que existen estudios previos sobre las condiciones óptimas de desarrollo en laboratorio para *P. humanus humanus*, con cepas criadas desde hace muchos años en varios laboratorios del mundo (Buxton, 1946; Mumcuoglu *et al*, 1990).

La temperatura de incubación de huevos de *P. humanus capitis* demostró ser un requerimiento crítico para la eclosión de embriones, resultando óptimas temperaturas de 27 y 31°C, e inhibitoras del desarrollo temperaturas de 18 y 23°C. La humedad relativa también influyó en los porcentajes de eclosión. En las tres etapas del desarrollo embrionario estudiadas las humedades óptimas de incubación fueron 45 y 75% de humedad relativa. A diferencia de

lo observado para bajas temperaturas, la baja humedad relativa (17, 20 y 26%) no alteró el desarrollo, particularmente en embriones en desarrollo medio y tardío (niveles de eclosión superiores al 70%). Los rangos de temperatura y humedad relativa establecidos para *P. humanus capitis* (45-75 % de HR y 27-31°C) son comparables a aquellos obtenidos para *P. humanus humanus* (50-60% HR y 28-31°C). Dentro de estos rangos óptimos, los valores de temperatura y humedad relativa utilizados en los bioensayos con embriones fueron elegidos según criterio de practicidad.

El análisis de los resultados obtenidos para *P. humanus capitis* acrecienta el valor de los ensayos realizados. Esto es, la búsqueda de las condiciones ambientales óptimas resultan aún más decisivas en el éxito del bioensayo cuando se trabaja con especies donde los embriones toleran un estrecho rango de temperatura y/o humedad relativa como se observa para *P. humanus capitis*.

Esta característica ha sido reportada para otros huevos del orden Phthiraptera (orden que agrupa a los piojos “mordedores” y “chupadores”) los cuales toleran solamente un estrecho rango de temperatura y humedad relativa (Hinton, 1981). Esto parece estar relacionado a la escasa variación ambiental al que son expuestos los piojos en su hábitat natural (la superficie de la piel y debajo del pelaje) mientras las condiciones externas no afecten la temperatura o humedad de la piel. Entre otros ejemplos los embriones de *Damalinia equi* (Denny) desarrollan sólo entre 31 y 39°C y los huevos de *Linognathus pedalis* (Osborne) eclosionan entre 33 y 38°C (Hinton, 1981). Con respecto a la humedad relativa, los huevos de *Damalinia ovis* (Schr.) siguen desarrollando luego de la inmersión en agua observándose una apreciable mortalidad después de los 7 días de inmersión. En esta misma especie, la exposición a una humedad relativa superior a 90% durante las 24 horas previas a la eclosión evita la emergencia de la primera ninfa, y la eclosión cesa inmediatamente con la exposición a 100% de HR (Hinton, 1981). En el caso de los piojos parásitos del hombre, el más estudiado fue *P. humanus humanus*. Huevos menores a 5 días de desarrollo mostraron temperaturas letales de 53,5; 52 y 50°C con 5, 10 y 30 minutos de exposición, y huevos de 8 ó más días de desarrollo no eclosionaron con temperaturas de 46-47°C (Buxton, 1946). Huevos mantenidos a una temperatura constante eclosionan entre los 24 y 37°C con tasas de eclosión de 70-90% entre los 29 y 31°C, disminuyendo el tiempo de desarrollo con las temperaturas más altas (Buxton, 1946; Hinton, 1981; Ibarra, 1993; Kettle, 1995). Algunos huevos mantenidos a temperaturas por debajo del rango favorable (<24°C) pueden eclosionar si son transferidos a temperaturas favorables, existiendo un límite en el número de días en que fueron mantenidos a baja temperatura (11 días a 23°C, 7 días a 19°C y 6 días a 8°C) (Buxton, 1946). La humedad



relativa no afecta el tiempo de eclosión, pero la alta o baja humedad aumenta la mortalidad (Buxton, 1946; Kettle, 1995). Las mayores tasas de eclosión fueron observadas entre 40 y 90% de humedad relativa (según la temperatura de incubación) (Buxton, 1946; Hinton, 1981). De esta manera el estrecho rango de condiciones ambientales tolerado por el desarrollo embrionario de *P. humanus capitis* está en concordancia con lo que parece ser una característica del orden Phthiraptera.

Una vez discutido los objetivos que han permitido realizar exitosamente los bioensayos con huevos, pasaremos a discutir los resultados de tales experiencias y aquellas realizadas en paralelo con adultos y centrarnos en los objetivos originales de la tesis.

### ***La verdadera población susceptible***

Una cuestión prioritaria para el análisis de la resistencia es la relacionada con la población susceptible o la población sobre la cual se cuantifican los niveles de resistencia de las restantes poblaciones analizadas. En materiales y métodos se describieron dos poblaciones de referencia: BA (*P. humanus capitis*) y *P. humanus humanus*. En primera instancia se debe considerar que una población de referencia no es lo mismo que una población susceptible. Una población susceptible no presenta individuos resistentes o, si los hay, están en una frecuencia muy baja. En términos genéticos esto significa que en la población no hay presencia de algún alelo resistente (mutación que origina la resistencia individual) o que la frecuencia de algún alelo resistente es muy baja. Generalmente estas poblaciones susceptibles son aquellas que nunca han tenido contacto con insecticidas, pudiendo ser poblaciones de campo aisladas del control químico o poblaciones criadas por varias generaciones en laboratorio. Sobre esta población se comparan los parámetros toxicológicos estimados de las restantes poblaciones en estudio a fin de cuantificar la resistencia (niveles de resistencia), por lo que se la puede denominar también población de referencia. En algunas situaciones es imposible contar con alguna población verdaderamente susceptible. En estos casos se puede utilizar aquella población de campo más susceptible (o mejor dicho menos resistente) con respecto al resto de las poblaciones estudiadas, sobre la cual no es posible asegurar que la frecuencia de alelos que confieren resistencia no fue alterada por la selección con insecticidas. Esta población es tomada también como población de referencia (ya que las otras poblaciones se comparan con ella); pero se debe tener presente en todo el análisis posterior que probablemente no sea una población verdaderamente susceptible (podría serlo, pero es menos probable) y que, en consecuencia, los niveles de resistencia obtenidos muy posiblemente sean

subestimados. Un problema adicional es que esta población de referencia, muy probablemente no susceptible, va cambiando en el tiempo su estructura génica (su propio “nivel de resistencia”), consecuencia de la selección con insecticidas, imposibilitando el seguimiento temporal de la resistencia de las demás poblaciones.

En el caso de *P. humanus capititis*, como ya hemos explicado en materiales y métodos, es imposible la cría en laboratorio de este insecto. Por otra parte, es muy dificultoso encontrar poblaciones de campo que no hayan tenido contacto con productos pediculicidas. Es necesario entonces recurrir a la estrategia de utilizar la población menos resistente como referencia. Este es el caso de la elección de BA como población de referencia. Por otro lado varios autores avalan el uso de *P. humanus humanus* como población de referencia y realmente susceptible (Mumcuoglu *et al.* 1990; Hemingway *et al.* 1999; Downs *et al.* 2000; Amevigbe *et al.* 2000) aprovechando la estrecha proximidad filogenética de estos dos organismos (unas veces considerados especies hermanas, otras subespecies de una misma especie) en combinación con la posibilidad de su cría en laboratorio. Sobre la base de estos antecedentes, en julio de 2002 el CIPEIN comenzó la cría en laboratorio de *P. humanus humanus* a partir de una cepa proveniente de University of Queensland, Brisbane, Australia (gentileza del Dr. Barker). Ésto permitió replanificar este trabajo de tesis tomando dos poblaciones de referencia: la población BA y, por primera vez en estudios de resistencia a insecticidas en piojos en Argentina, la población de cría en laboratorio de *P. humanus humanus*. Teniendo en cuenta el razonamiento expresado hasta este momento, la población BA probablemente no sea una verdadera población susceptible y por lo tanto la respuesta toxicológica de esta población no será comparable a una población de laboratorio como *P. humanus humanus*. Esta apreciación se encuentra apoyada por tres aspectos evidenciados en este trabajo de tesis:

Lo primero que se observa es que la población BA muestra mayores  $CL_{50}$  o  $DL_{50}$  para los insecticidas donde se observa resistencia (DDT y piretroides) que *P. humanus humanus*. Si bien este hecho por sí mismo no es indicativo de la resistencia de BA (ya que estamos comparando dos organismos distintos, *P. humanus capititis* vs *P. humanus humanus*, y la mayor  $CL_{50}$  puede también ser indicativo de una mayor tolerancia o respuesta natural al insecticida en BA), al existir otras evidencias en el mismo sentido (siguiente párrafo) su valor como evidencia de resistencia en BA se ve aumentado .

En segundo lugar se observa que las curvas dosis-respuesta de la población BA en general se solapan, y hasta se cruzan con aquellas de las poblaciones consideradas más resistentes. El solapamiento de curvas dosis-respuesta entre dos poblaciones evidencia que una de las poblaciones contiene individuos con respuesta toxicológica similar a individuos

pertenecientes a la otra población (French-Constant, 1990). Según este razonamiento, la población BA contiene individuos con respuesta toxicológica comparable a la de individuos pertenecientes a las poblaciones más resistentes (HB y GH). Esto se observa claramente en las curvas de la población BA para d-fenotrina, tanto para adultos como para huevos. También se observa solapamiento de BA con *P. humanus humanus*, mostrando la existencia de individuos con respuesta comparable a la de aquella población. La existencia de estos últimos individuos nos indica que la tolerancia basal de la población BA es comparable a la población *P. humanus humanus* y por lo tanto la mayor  $CL_{50}$  observada en BA (párrafo anterior) evidencia el desarrollo de resistencia en esta población.

En tercer lugar, y quizás la evidencia más especulativa, se observa que la población BA muestra en general curvas dosis respuesta con valores de pendientes comparables, o en algunos casos menor, al del resto de las poblaciones, sobre todo para aquellos insecticidas a los cuales se observa resistencia. La pendiente de una curva dosis-respuesta es la inversa de la desviación estándar de la distribución fenotípica de la tolerancia a un insecticida en la población, por lo tanto un indicador directo de la variación fenotípica (respuesta toxicológica) poblacional (la cual incluye variación ambiental y variación genética) (Chilcutt y Tabashnik, 1995). De esta manera, pendientes altas indican reducida variación fenotípica en respuesta al insecticida en la población y pendientes bajas indican mayor variación fenotípica poblacional (Chilcutt y Tabashnik, 1995). Si la variación ambiental fuera constante entre los bioensayos y las pendientes fueran estimadas con poco error, la pendiente de la curva dosis respuesta sería un buen indicador de la variabilidad genética subyacente a la variación fenotípica presente en las poblaciones (Roush & Tabashnik, 1990). Bajo estas condiciones, una pendiente alta está relacionada a una menor variación genética poblacional, en lo que tiene que ver con los procesos toxicológicos, respecto a curvas con menores pendientes. En este sentido las poblaciones totalmente susceptibles serían relativamente homogéneas en su constitución genética ya que sólo habría individuos susceptibles (sólo genotipo susceptible) y por lo tanto tendrán curvas dosis-respuesta con pendientes mayores. Las poblaciones totalmente resistentes también tendrían relativa homogeneidad genética ya que sólo habría individuos resistentes (sólo genotipo resistente) y también presentarían curvas con altos valores de pendientes. Poblaciones en proceso de selección estarán constituidas por individuos susceptibles, moderadamente resistentes y resistentes, por lo tanto una mayor heterogeneidad genética (todos los genotipos estarían presentes) y en consecuencia curvas con pendientes menores en comparación a los extremos susceptibles y resistentes (Roush and Tabashnik, 1990; Chilcutt and Tabashnik, 1995). Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente, el bajo valor

de las pendientes de la población BA evidencia la heterogeneidad genética de esta población y su condición de no susceptible. Es importante tener en cuenta que el razonamiento seguido hasta este momento sólo tiene valor bajo condiciones de variación ambiental constante. Considerando que las poblaciones son de campo y que pueden ocurrir pequeñas variaciones entre los bioensayos (edad y tiempo de ayuno de los individuos, pequeñas variaciones de la técnica, etc) las variaciones ambientales pueden no ser constantes. Recordando que la variación fenotípica incluye variación ambiental y variación genética, las variaciones ambientales recién descritas pueden oscurecer la relación entre pendiente (fenotipo) y variabilidad genética en la respuesta a insecticidas (Chilcutt & Tabashnik, 1995). Si bien cierta variabilidad ambiental no controlada puede invalidar nuestro razonamiento, las condiciones controladas en la que se realizaron los bioensayos, la similitud ambiental entre poblaciones de piojos debido a su condición de ectoparásito altamente asociado a su hospedador y sobre todo la existencia de otros hechos que evidencian la evolución de resistencia en BA permiten utilizar la relación pendiente-variabilidad genética para evaluar la verdadera susceptibilidad de BA y *P. humanus humanus*

Considerando las tres evidencias planteadas en los párrafos anteriores se entiende que la población BA, si bien es menos resistente que HB y GH, se aleja considerablemente de lo que se espera para una población susceptible. Si bien era esperable cierta heterogeneidad en respuesta por tratarse de una población de campo, lo observado en este trabajo hace que se considere como una población en pleno proceso de selección y no una verdadera población susceptible. Por el contrario la población *P. humanus humanus* muestra curvas dosis-respuesta con pendientes mayores al resto de las poblaciones y sin solapamiento con el resto de las poblaciones (excepto con la población BA donde hay cierto solapamiento esperado por las ya analizadas características propias de BA). Teniendo en cuenta esta descripción de las curvas, *P. humanus humanus* mostraría la mayor homogeneidad genética entre las poblaciones estudiadas y parece no contener individuos con respuestas comparables a las poblaciones más resistentes. De esta manera, la población de laboratorio presenta las características propias de una verdadera población susceptible.

En varios trabajos sobre resistencia a insecticidas en piojos se utilizó una población de laboratorio de *P. humanus humanus* como población susceptible. En el trabajo de Mumcuoglu *et al* (1990) la respuesta al insecticida organoclorado dieldrin (insecticida no utilizado en el control de piojos en Israel), fue muy similar entre *P. humanus humanus* y la población de *P. humanus capitis* resistente a malatión y piretroides. Downs *et al* (2000) estableció que ambos piojos muestran respuestas toxicológicas similares al insecticida imidacloprid, nunca utilizado

en el control de *P. humanus capitis*. Lee *et al* (2000) estudió resistencia a permetrina en piojos, utilizando como poblaciones susceptibles una cepa de laboratorio de *P. humanus humanus* y a una población de *P. humanus capitis* nunca tratada con insecticidas y recolectados de una población de aborígenes de la cultura Kuna, en el territorio de Panamá. Encontró que las curvas tiempo-respuesta (equivalente a dosis-respuesta) a permetrina eran muy similares entre estas dos poblaciones de piojos utilizadas como susceptibles. En los trabajos mencionados se observa que la respuesta toxicológica de *P. humanus humanus* es similar a *P. humanus capitis* para insecticidas que no fueron utilizados en el control de pediculosis. Estos antecedentes toxicológicos fundamentan el uso de *P. humanus humanus* como población de referencia en estudios de resistencia a insecticidas en *P. humanus capitis*. La decisión de utilizar a *P. humanus humanus* como población de referencia en estudios de resistencia a insecticidas en *P. humanus capitis* está aún más fundamentada considerando la muy estrecha relación filogenética que tienen estos dos organismos. Actualmente se considera el estatus coespecífico de estos dos piojos del hombre. Tanto estudios ecológico-evolutivos como genéticos y de evolución molecular coinciden en considerar a *P. humanus humanus* y a *P. humanus capitis* como subespecies (2<sup>nd</sup> International Congress on Phthiraptera, 2002; Leo *et al*, 2002).

#### ***De adultos resistentes, embriones resistentes***

En este momento de la discusión sobre resistencia se analizará en forma comparativa entre huevos y adultos lo observado para cada uno de los distintos insecticidas. Lo primero que claramente se desprende de lo observado involucra directa y concretamente uno de los objetivos originales planteados. Las formas eclosionadas de las poblaciones BA, IIB y GII expresaron resistencia a los dos piretroides utilizados (permetrina y d-fenotrina) y a DDT. En estas mismas poblaciones los embriones expresaron resistencia a los mismos insecticidas a los cuales los estados postembrionarios fueron resistentes (permetrina, d-fenotrina y DDT). Por lo tanto, las poblaciones de *P. humanus capitis* evaluadas en el presente trabajo de tesis, muestran que cuando la resistencia a un insecticida es expresada en las formas eclosionadas, los embriones de tales poblaciones manifiestan el fenotipo resistente al mismo insecticida. Además de la expresión en embriones de la resistencia expresada en adultos de la misma población, el patrón de comparaciones de los niveles de resistencia entre las poblaciones es similar entre los estados postembrionarios y los embriones. Esto es, tanto para formas eclosionadas como para huevos y para los insecticidas a los cuales se ha detectado resistencia la población BA presentó los niveles de resistencia más bajos y la población GH presentó los

niveles de resistencia más altos. La población HB presentó niveles de resistencia intermedios, siendo en algunos casos similar al nivel de BA (en DDT y embriones) y en otros similar al nivel observado para GH (en d-fenotrina y embriones), pero nunca mostrando niveles de resistencia por fuera de los límites marcados por BA y GH. En el caso de DDT, para los estados postembrionarios no se pudo determinar valores finitos de los niveles de resistencia para las poblaciones HB y GH, por lo que no fue posible saber si GH es realmente la población de mayor resistencia. Considerando las pendientes de las curvas y su relación a la composición genética de la población, es de destacar que las poblaciones de resistencia baja e intermedia, BA y HB, muestran en general pendientes más bajas que la población de mayor resistencia GH y principalmente que la población de *P. humanus humanus*. Esto advertiría que (bajo las condiciones planteadas por Chilcutt and Tabashnik (1995)) las poblaciones BA y HB podrían estar en pleno proceso de selección presentando mayor heterogeneidad genética, y que la población GH podría estar muy avanzada en su proceso de selección y consecuentemente mayor homogeneidad genética.

Según lo demostrado en este trabajo, y los pocos trabajos discutidos en la introducción que han reportado la manifestación de resistencia en huevos de poblaciones con resistencia detectada en estados postembrionarios en otras especies de insectos, se evidencia y se advierte del problema de la expresión de resistencia en embriones. En el contexto del control de *P. humanus capitis* en particular, y del control de plagas en general, este hecho es de gran importancia en el momento que se plantea una estrategia de manejo de resistencia (detectada en adultos o larvas) donde la interrupción del desarrollo embrionario es parte fundamental de tal estrategia.

Teniendo en cuenta lo descrito en la introducción acerca de la posibilidad de que los embriones desarrollen el mismo o distintos mecanismos de resistencia que las formas eclosionadas (Smith & Wagenknecht, 1959), el análisis de los ensayos toxicológicos y de los patrones de resistencia a los distintos insecticidas, el análisis de lo obtenido en los ensayos de inhibición enzimática *in vivo* y los resultados de las actividades enzimáticas ayudarán a responder esta cuestión.

### ***Desentrañando los mecanismos de resistencia***

#### **Resistencia cruzada y Resistencia múltiple**

Comenzando con el análisis de los mecanismos de resistencia es importante recordar que se eligieron a las poblaciones según el nivel de resistencia a permetrina detectada por método de exposición a papel para estados postembrionarios (Picollo *et al.*, 1998 y 2000;

Vassena *et al*, 2003). En este trabajo se determinó el nivel de resistencia a permetrina en adultos por el método de tópico y luego se evaluó y se demostró (resultados y discusión de esta tesis) la expresión de resistencia a permetrina en embriones. Luego se realizaron los ensayos de resistencia a otros insecticidas como estrategia que ayude a dilucidar los mecanismos de resistencia desarrollados en ambos estados del ciclo de vida, embriones y estados postembrionarios. Como se ha anticipado en la sección materiales y métodos, la resistencia a dos o más insecticidas en una misma población puede deberse a un mismo mecanismo bioquímico-fisiológico de resistencia (resistencia cruzada) o a mecanismos de resistencia específicos para cada insecticida y desarrollados en forma independiente (resistencia múltiple). En el último caso, cada insecticida involucrado debe haber sido usado en el control de la plaga de manera que haya podido desarrollarse la resistencia a esos compuestos en forma independiente. En el caso de resistencia cruzada, uno de los insecticidas pudo no haber sido usado nunca en el control de la plaga habiéndose desarrollado el mecanismo de resistencia común por el uso de otro insecticida. Generalmente los insecticidas involucrados en casos de resistencia cruzada son metabolizados por las mismas enzimas degradativas o presentan el mismo modo de acción, de manera que los mecanismos de resistencia desarrollados por el uso de uno de los insecticidas pero compartidos por los demás, son aumento de la vía degradativa o modificación del sitio de acción. De esta manera la estrategia de detectar resistencia cruzada, o no detectarla, ofrece indicios del tipo de mecanismo que ha evolucionado en las poblaciones.

Como se ha explicado en esta discusión el patrón de resistencia a piretroides y DDT en adultos y huevos es similar. En el caso del insecticida spinosad no se detectó resistencia ni en estados postembrionarios ni en estado embrionario. El caso de carbaril es muy particular, ya que no se ha detectado resistencia en los estados postembrionarios pero se ha detectado bajos valores de resistencia en los embriones en las tres poblaciones evaluadas. Sin embargo, estos bajos niveles de resistencia no muestran la tendencia observada para piretroides y DDT (BA baja resistencia, HB resistencia intermedia y GH alta resistencia) sino que los tres niveles son muy similares entre sí. Más adelante intentaremos una explicación a esta observación.

### **Interpretación de la resistencia a Piretroides**

Los insecticidas permetrina y d-fenotrina son actualmente usados en el control de del *P. humanus capitis*. Teniendo en cuenta esto, la resistencia a ambos insecticidas puede ser interpretada como resistencia cruzada ya que por ser compuestos de la misma familia (piretroides) comparten modo de acción y vías metabólicas, y cualquiera de los dos

mecanismos que haya evolucionado por presión con el primer piretroide utilizado (permetrina), muy posiblemente actuaría como mecanismo de resistencia para el otro piretroide (d-fenotrina). Pero esta no es la única interpretación posible, también pudo haber ocurrido un caso de resistencia múltiple. Al ser utilizados ambos piretroides en el control de la misma plaga (piojo de la cabeza) pudieron haber evolucionado independientemente dos mecanismos de resistencia distintos uno hacia cada piretroide. Una de estas posibilidades es más lógica que la otra y si sólo contáramos con estos datos, no estaría mal darle más peso a la posibilidad más lógica como posible explicación. Como los dos piretroides fueron utilizados de manera consecutiva, es más probable que el piretroide utilizado en segundo término (d-fenotrina) continúe la selección del primer piretroide (permetrina), a que seleccione otras nuevas variantes. Si ocurrió esto, el resultado no difiere de resistencia cruzada a un insecticida que nunca se haya utilizado, es más, se trata de resistencia cruzada. Teniendo en cuenta todo lo dicho hasta este momento, los posibles mecanismos de resistencia podrían ser: modificación del canal de sodio dependiente de voltaje y/o aumento del metabolismo ya sea por esterasas como por oxidasas de función mixta. De todas formas, el hecho que estas mismas poblaciones sean resistentes al insecticida organoclorado DDT podría ayudar a la interpretación más correcta.

#### **Interpretación de la resistencia a DDT.**

Antes de seguir con la discusión es conveniente comentar las características toxicológicas del DDT. Aunque capaz de afectar la función de muchas enzimas, de neuroreceptores y de canales iónicos *in vitro*, la acción tóxica del DDT en insectos y a nivel de nervios aislados es mejor explicada, al igual que la de los insecticidas piretroides, por su acción sobre el canal de sodio dependiente de voltaje (Osborne, 1985; Soderland y Bloomquist, 1990, Perry *et al*, 1998). Las bases fisiológicas y bioquímicas de la acción del DDT sobre las membranas nerviosas y el canal de sodio son similares a las detalladas para los insecticidas piretroides en la introducción de este trabajo. El insecticida organoclorado DDT presenta tres mayores rutas metabólicas en insectos. La vía metabólica más común es la dehidroclorinación para dar el compuesto DDE (2,2-bis (p-clorofenil)-1,1-dicloroetano), reacción catalizada por la enzima dependiente de glutatión DDT-dehidroclorinasa. Otra vía es una hidroxilación para dar el compuesto Dicofol (2,2-bis (p-clorofenil)-2-hidroxi-1,1,1-tricloroetano), catalizada por el sistema P450 (oxidasas de función mixta). Una tercer ruta es una dechlorinación reductiva a TDE (DDD) (2,2,-bis (p-clorofenil)-1,1-dicloroetileno)). Otros metabolitos incluyen FW-152 (2,2-dicloro-1,1-bis(p-clorofenil)etanol), DBP (p,p'-



diclorobenzofenona) y probablemente ácido p-clorobenzoico. (Millburn, 1995; Chambers *et al.*, 1995; Perry *et al.* 1998). Como vemos, en el metabolismo de DDT actúa el complejo enzimático P450 y no están involucradas las esterasas (algo esperable debido a la carencia de grupos ésteres en la molécula).

Dado que el DDT comparte con los piretroides el modo de acción y, debido a una vía metabólica menor del DDT, el complejo enzimático P450 como vía degradativa, es posible el desarrollo de resistencia cruzada entre esas dos familias de insecticidas (piretroides y DDT). Si el DDT no hubiese sido utilizado nunca en el control de la pediculosis en Argentina, claramente estaríamos ante un caso de resistencia cruzada, y lo más probable sería que se tratara de modificación del sitio de acción, el canal de sodio dependiente de voltaje (Bloomquist y Sodelund, 1990), es decir un mecanismo de resistencia tipo-*kdr*. Pero el análisis no es tan fácil. Como vimos en la introducción el DDT ha sido utilizado en el control del *P. humanus capitis* en Argentina hasta el año 1980. Este uso previo del DDT hace posible nuevamente la existencia de resistencia múltiple, habiéndose desarrollado primero resistencia a DDT y luego, en forma independiente, la resistencia a piretroides. Que se haya dejado de utilizar hace más de 20 años, induce a pensar que la resistencia actual al DDT (la resistencia a este insecticida detectada en este trabajo en las poblaciones BA, HB y GH) se deba a la resistencia desarrollada por presión con piretroides, es decir resistencia cruzada. Los mecanismos posibles serían modificación del sitio acción, con mayores posibilidades, o mayor actividad del complejo P450, menos probable. Al igual que el caso de piretroides, también es posible una selección continua, primero por DDT y luego por los piretroides, de la misma variante genética (sitio de acción u OFM).

### **Interpretación de los bioensayos con Carbaril**

El nivel de susceptibilidad al insecticida carbaril en las poblaciones estudiadas ayudará a la discusión de los mecanismos de resistencia. Para evaluar las evidencias aportadas por carbaril es conveniente conocer ciertos aspectos de este insecticida. El insecticida aril N-metilcarbamato, Carbaril (1-naftil metilcarbamato) ejerce su acción tóxica inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa, enzima que degrada al neurotransmisor acetilcolina, resultando en una acumulación de acetilcolina en la sinapsis nerviosa y finalmente interrumpiendo la transmisión nerviosa (Eldefrawi, 1985; Perry *et al.*, 1998). El metabolismo del insecticida Carbaril presenta varias posibles rutas y reacciones. Una vía es la hidrólisis del éster carboxílico para dar ácido metilcarbámico y 1-naftol, cuyo mecanismo de reacción puede ser hidrolítico (catalizado por esterasas) u oxidativo (catalizado por el complejo enzimático

P450). En insectos, la hidrólisis del carbaril es una ruta metabólica menor y ocurre sólo vía metabolismo oxidativo. Otra vía es la epoxidación, catalizada por oxidasas de función mixta, y posterior hidrólisis del epóxido, catalizada por una epóxido hidrolasa, para dar el 5,6-dihidrodiol correspondiente. También puede ocurrir hidroxilación aromática y/o hidroxilación alifática, ambas catalizadas por oxidasas de función mixta. Finalmente pueden ocurrir conjugaciones (reacciones de fase II) con Ac. glucurónico o sulfato. (Millburn, 1995; Chambers *et al*, 1995; Perry *et al*. 1998). El comportamiento de la susceptibilidad a este insecticida difiere en algún punto entre lo observado en adultos y lo observado en huevos. En adultos no se observó resistencia en ninguna de las poblaciones, pero en el caso de embriones se determinó una incipiente resistencia, con niveles similares para las poblaciones BA, HB y GH. La falta de resistencia en adultos evidencia la no ocurrencia de procesos que produzcan resistencia a carbaril. Teniendo en cuenta el metabolismo y el modo de acción del carbaril, los posibles mecanismos de resistencia a este insecticida son: acetilcolinesterasa modificada y/o aumento de actividad metabólica, complejo P450 (mayoritariamente) o actividad de esterasas (en menor medida).

En el caso de embriones la interpretación de los resultados no es tan fácil. El bajo nivel de resistencia observado en huevos que no sigue el perfil entre poblaciones visto para piretroides o DDT (BA nivel más bajo, HB nivel intermedio y GH nivel más alto), sugiere que podría haber algún mecanismo de resistencia presente en huevos y no en adultos. En la introducción se ha discutido las posibilidades de modos de acción y mecanismos de resistencia exclusivos del desarrollo embrionario. Si el insecticida en cuestión puede actuar como sustrato de enzimas involucradas con procesos específicos del desarrollo embrionario, tales enzimas actuarían en el metabolismo del insecticida y, por lo tanto, el aumento de su actividad comportarse como un mecanismo de resistencia. Es posible también el aumento de la actividad de variantes exclusivas del embrión de las enzimas detoxificantes vistas en la introducción.

### **Interpretación de la susceptibilidad a Spinosad**

Para el insecticida spinosad no se observó resistencia ni en huevos ni en adultos. El actinomicete *Saccharopolyspora spinosa* produce una familia de macrolidos conocidos como spinosinas. Un extracto del caldo de fermentación producido por *S. spinosa* conteniendo spinosinas A y D es conocido como spinosad (Crouse and Sparks, 1988). Este insecticida actúa activando los receptores nicotínicos de acetilcolina en un nuevo sitio, diferente a los sitios conocidos para los insecticidas nicotínicos. También altera la función de los canales de

cloruro dependientes de GABA, aunque no es conocido si este efecto es biológicamente significativo (Crouse and Sparks, 1988). Estudios de metabolismo muestran que el compuesto spinosina A tiene una baja tasa de penetración y una baja tasa de metabolismo en insectos. El complejo P450 no parece estar involucrado en el escaso metabolismo de spinosina A. Otros estudios muestran falta de resistencia cruzada con poblaciones que poseen actividad aumentada de diferentes sistemas enzimáticos detoxificantes (Crouse and Sparks, 1988). De esta manera a pesar de la baja tasa de penetración, el muy bajo metabolismo permitiría una alta concentración de este compuesto en el medio interno del insecto y con grandes probabilidades de alcanzar el sitio de acción (Crouse and Sparks, 1988). Teniendo en cuenta lo conocido hasta el momento sobre el metabolismo y el novedoso modo de acción del spinosad, los resultados obtenidos en *P. humanus humanus* y *P. humanus capitis* coinciden con lo esperado, es decir que no exista resistencia cruzada al spinosad en poblaciones con resistencia a piretroides y DDT. Una excepción podría darse en los embriones con respecto a la existencia de mecanismos de resistencia no esperados a partir de los datos de los estados postembrionarios (como el caso del carbaril).

#### **¿Como están las cosas hasta este momento de la discusión?**

Hasta este estado de la discusión algunas consideraciones generales pueden señalarse. El patrón de resistencia para cada insecticida indica un mecanismo de resistencia común a piretroides y DDT. Estos mecanismos pueden ser o bien modificación del canal de sodio dependiente de voltaje o aumento de metabolismo oxidativo (complejo P450). No hay resistencia ni a carbaril (en adultos) ni a spinosad, por lo que modificaciones en el canal de sodio dependiente de voltaje parece ser el proceso involucrado en la resistencia. Si las oxidasas estuvieran mayormente involucradas, habría sido observada resistencia a carbaril. Bajos niveles de resistencia a carbaril se observaron en huevos y como ya se comentó, puede deberse a procesos propios del desarrollo embrionario.

#### **Inhibiendo los complejos enzimáticos**

Los ensayos de inhibición enzimática *in vivo* han resultado de difícil aplicación a *P. humanus capitis*, tanto en estados embrionarios como postembrionarios. La conocida dificultad de los adultos y ninfas de *P. humanus capitis* para sobrevivir fuera de su hábitat natural sumado a los adversos requerimientos de los bioensayos de inhibición, muy posiblemente sea la explicación de los escasos resultados obtenidos. En cuanto a los huevos, embriones en pleno desarrollo y las varias capas (rodeando al embrión) que deben ser

atravesadas por el insecticida y el inhibidor, posiblemente influyan sobre los distintos procesos toxicocinéticos dificultando su expresión y/o su interpretación. Los resultados de los ensayos de dosis única muestran que para los estados postembrionarios el uso del PBO, inhibidor de enzimas P450, causó mayor mortalidad por d-fenotrina, tanto en la población susceptible como en las poblaciones resistentes. El porcentaje de inhibición en las poblaciones resistentes a piretroides es similar a la de la población susceptible excepto para la población GII, lo que sugiere que estas enzimas aportan a la resistencia observada en esta población. En los embriones se observa un patrón similar que para adultos. Los resultados y el análisis de los ensayos de inhibición muestran un aporte (no muy importante) del complejo P450 en la resistencia observada a piretroides, al menos en GH.

Con el análisis de las evidencias toxicológicas hemos acotado en gran medida el espectro de posibles mecanismos fisiológicos-bioquímicos que subyacen las resistencias detectadas. Con el fin de avanzar en el análisis de los mecanismos de resistencia y, si es posible, que nuestro razonamiento se encamine hacia alguno en particular se analizarán los resultados de actividad enzimática.

#### **¿Que evidencias aportan las actividades de los complejos enzimáticos?**

En este punto, el desarrollo del trabajo permitió (por el gusto de hacerlo) y requirió (por la necesidad de hacerlo) nuevamente el planteo de un objetivo *a posteriori*: medir actividad de enzimas detoxificantes en huevos de *P. humanus capitatus*. Aunque hay trabajos donde se ha medido la actividad de enzimas relacionadas a procesos toxicológicos en varias especies de insectos (Tahmisian, 1943; Smith and Wagenknecht, 1959; Zschintzsch *et al*, 1965; Smallman and Mansingh, 1969; Picollo de Villar, 1979 y 1980; Shobha Rani & Lakshmi pathi, 1995; Gangadhar Rao & Shetty 1996), no hay trabajos hasta la fecha donde se haya medido actividad de enzimas detoxificantes en huevos de las subespecies de *P. humanus*. Este trabajo de tesis muestra que es posible medir actividad esterasa en huevos de *P. humanus humanus* y *P. humanus capitatus* con las tres técnicas utilizadas, independientemente que se demuestre o no su relación con la resistencia observada. En este trabajo y con la técnica utilizada no se ha podido medir actividad de enzimas P450 en huevos de piojos. Aunque la imposibilidad de medir actividad enzimática con una dada metodología podría adjudicarse a una falta de sensibilidad del método, en el caso particular de las enzimas P450 la falta de actividad en huevos de insectos es la explicación más probable (Agosin, 1985; Cariño *et al*, 1994). Más adelante se discutirán estas posibilidades.

Una vez que se ha demostrado la posibilidad de determinar actividad de enzimas detoxificantes en huevos se analizarán los resultados obtenidos para cada población y cada estado de desarrollo. La actividad del complejo enzimático P450 en estados postembrionarios entre las poblaciones sigue el patrón de resistencia entre las poblaciones para piretroides y DDT. La población de referencia (*P. humanus humanus*) presenta el nivel más bajo de actividad. Entre las poblaciones resistentes BA presenta la actividad más baja, GH tiene el valor de actividad más elevado y HB presenta una actividad intermedia. Estos resultados sugieren fuertemente que, si bien no se puede afirmar una relación causal, el complejo P450 parece estar involucrado con la resistencia a piretroides y DDT en formas postembrionarias en las poblaciones estudiadas. Este hecho parecería no concordar con la resistencia no detectada a carbaril, ya que las oxidasas de función mixta están involucradas en el metabolismo de este insecticida. Como se ha discutido en la introducción de este trabajo, el complejo P450 presenta múltiples formas de citocromo P450, coexistiendo o expresándose en diferentes estados del desarrollo del insecto (enzimas P450 específicas de larvas o de adultos) y donde cada uno cataliza diferentes reacciones pero con un único patrón de especificidad de sustrato (Agosin 1985, Soderland y Bloomquist 1990, Feyereisen 1999). Teniendo en cuenta esto último, es posible plantear la posibilidad de que las oxidasas medidas en *P. humanus capitis* adultos muestren un determinado patrón de especificidad, estando involucradas en el metabolismo de piretroides o DDT, o piretroides y DDT, y no en el metabolismo del carbaril. El posible rol de las oxidasas en la resistencia de formas postembrionarias de *P. humanus capitis* ya ha sido informado por Gonzalez Audino *et al* (2004). Por lo que se está analizando en este trabajo, el rol del complejo P450 en la resistencia de *P. humanus capitis* a piretroides no excluye el posible rol de otro mecanismo como la modificación en el canal de sodio voltaje dependiente.

En el caso de los embriones, no se ha podido medir actividad oxidasa por el método fluorométrico usando huevos de *P. humanus capitis*. No haber podido medir actividad puede implicar baja sensibilidad del método para detectar la actividad del complejo P450 presente en embriones de piojos, o bien que el sustrato utilizado no sea el adecuado para las oxidasas de los embriones. Si estos fueran los casos, las enzimas P450 no detectadas de los huevos de piojos se expresarían sólo en los embriones y serían responsables del bajo nivel de resistencia observado en este estado del desarrollo. Es importante notar, aunque no mostrado en este trabajo de tesis, que se ha intentado otra metodología de medición de actividad oxidasa y por razones metodológicas no pudo ser adaptada para huevos de *P. humanus capitis*. Sin embargo, los trabajos donde se ha medido actividad de OFM en los estados de desarrollo de

insectos coinciden en la escasa o nula actividad encontrada en los huevos (Hodgson, 1985; Agosin, 1985; Cariño *et al*, 1994). Es conocido en los insectos que la actividad del complejo P450 presenta dramáticas variaciones tanto entre los estados de desarrollo como dentro de cada estado de desarrollo (Hodgson, 1985; Agosin, 1985; Cariño *et al*, 1994). En general, aunque pueden existir variaciones, la secuencia ontogenética de la actividad de enzimas P450 es la siguiente: baja o nula actividad en huevos; aumento de la actividad en cada período intermuda; no actividad en cada muda; baja o nula actividad en la pupación y durante el estado de pupa; y baja actividad en el adulto recién eclosionado en insectos donde el adulto se alimenta, máximo de actividad en algún punto del estado adulto declinando a partir de la senescencia (Hodgson, 1985, Agosin, 1985; Cariño *et al*, 1994). Generalizando, altos niveles de actividad del complejo P450 están asociados a los estados del ciclo de vida que se alimentan activamente (larvas y adultos), y los estados que no se alimentan (huevo, pupa y adultos que no se alimentan) presentan bajos o nulos niveles actividad de este complejo (Hodgson, 1985; Cariño *et al*, 1994; Feyereisen, 1999). De esta manera la ausencia de actividad de enzimas P450 en huevos de piojos observada en este trabajo coincide con lo generalmente aceptado sobre la actividad de enzimas P450 en huevos de insectos. Si este fuera el caso, el incipiente nivel de resistencia a carbaril expresado en huevos se debería a algún proceso involucrado en el desarrollo embrionario cuyo incremento en la población resistente reduce la toxicidad del carbamato. En resumen, el análisis de actividad del complejo P450 muestra que estas enzimas están involucradas en la resistencia observada en adultos y no parecen (según el sustrato utilizado) estar involucradas en la resistencia observada en embriones.

La actividad de las enzimas esterases medida con tres sustratos diferentes no muestra relación con los niveles de resistencia a piretroides. La carencia de relación entre los niveles de resistencia detectados y la actividad enzimática medida por un método determinado, no implica que esas enzimas no estén involucrados en la resistencia observada (French-Constant, 1990). Como se ha mencionado en la introducción, las esterases son un complejo grupo de enzimas de difícil clasificación debido a que existen en múltiples formas, cada una con un patrón específico de sustratos dentro de la gran cantidad de compuestos que hidrolizan (Soderlund and Bloomquist, 1990). De esta manera, alguna esterasa con particular especificidad de sustrato puede estar involucrada en la resistencia observada, y su actividad podría no ser detectada por no utilizarse el sustrato adecuado (Bloomquist and Soderlund, 1990). Esto es probable que suceda cuando se usa, como en este trabajo, sustratos modelo tales como  $\alpha$ -naftilacetato y PTA. Estos sustratos detectan actividad de esterases generales o

de un conjunto de muchas esterasas específicas donde todas, incluidas las que nos interesan, hidrolizan el sustrato confundándose en una actividad común. También puede ocurrir que el sustrato no sea adecuado por no ser sustrato de la esterasa buscada. Pero en este trabajo, además de los sustratos modelos, se ha utilizado el sustrato perimetrato de cumarina desarrollado por el CIPEIN, el cual tiene analogía estructural con insecticidas piretroides derivados del ácido perimetrínico y por tal razón se le adjudica especificidad para piretroide esterasas. Además de haber buscado especificidad como sustrato para piretroides, en la estrategia de síntesis de este sustrato se planteó la necesidad de contar con un método de alta sensibilidad. La formación del producto fluorescente 7-hidroxicumarina por la hidrólisis del perimetrato de cumarina permite la utilización del fundamento del método de medición altamente sensible de OFM (Ulrich and Weber, 1972; Gonzalez Audino *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos muestran tanto para huevos como para adultos, que los desvíos estándar de todas las poblaciones se solapan mostrando que no difieren en su actividad de perimetrato esterasa. De todas maneras se debe destacar que la actividad entre las poblaciones es menos pareja mostrando a la población HB con mayor actividad en adultos, y a la población GH con mayor actividad en embriones. Pero en ningún caso estas pequeñas diferencias muestran el patrón observado para los niveles de resistencia a piretroides y DDT (BA bajo, HB intermedio y GH alto). Estas diferencias en alguna de las poblaciones puede significar un pequeño aporte de las esterasas, en esa población, a la resistencia causada principalmente por otro/s mecanismo/s. Futuros estudios ayudarán a confirmar esta apreciación.

### **Análisis final de los Mecanismos de Resistencia**

Una vez realizado el análisis de todos los ensayos y luego de haber seguido un razonamiento donde se han acotado o se han ampliado (según los resultados que se iban analizando), los posibles mecanismos involucrados en la resistencia se realizará un análisis final y se presentará un modelo de mecanismos de resistencia más probable. Es importante aclarar que estos mecanismos propuestos son, según las evidencias y como se dijo recién, más *probables* y como tal no excluyen aquellos menos probables y que fueron planteados en su momento:

- La resistencia observada a los piretroides utilizados y a DDT, los altos valores de los niveles de resistencia, la misma relación entre los niveles de resistencia en las poblaciones utilizadas para piretroides y DDT y la poca inhibición del complejo P450 *in vivo* sugieren que un mecanismo tipo *kdr* (sitio de acción, canal de sodio dependiente de voltaje, alterado) es un principal mecanismo de resistencia que ha evolucionado en los

estados postembrionarios de *P. humanus capitis*. Que las mismas evidencias sean observadas en embriones sugieren que el mismo mecanismo (tipo *kdr*) ocurre en este estado de *P. humanus capitis*. La carencia de resistencia a carbaril en adultos y ninfas refuerzan esta visión para estados postembrionarios.

- Los estados postembrionarios muestran que las enzimas P450 parecen contribuir a la resistencia observada (sobre todo por los resultados de actividad enzimática). Según el sustrato utilizado, la escasa inhibición in vivo y en concordancia con las evidencias de actividad P450 en huevos de insectos, el aumento de la actividad de las enzimas P450 no parece ser un mecanismo presente en embriones de *P. humanus capitis*.

- La baja y particular (no sigue la relación de resistencia a piretroides y DDT entre las poblaciones) resistencia a carbaril en embriones sugiere un mecanismo de resistencia asociado a algún proceso de desarrollo y por lo tanto solo expresado en huevos.

- La cantidad de sustratos desde generales hasta muy específicos, utilizados en el análisis de las esterases en este trabajo sugieren que estas enzimas no están involucradas en la resistencia a piretroides observada en adultos y ninfas ni en embriones.

- El planteo de un mecanismo de resistencia tipo *kdr* en estados embrionarios y postembrionarios se refuerza (en comparación con otras posibilidades) justamente por estar presente tal mecanismo en ambos estados de desarrollo. Nuevamente se recurrirá a la lógica de lo más probable como posibilidad más cercana a la realidad. La evolución de un mismo mecanismo en embriones y estados postembrionarios no sólo está soportado por las evidencias toxicológicas sino por la continuidad genética en las generaciones (el embrión recibe los genes de los adultos de la generación anterior). Si entre otras posibilidades hay fuertes evidencias de un mecanismo común en embriones y adultos, el posible hecho de que los embriones expresen dicho mecanismo por simple herencia ó por selección en huevos de un mecanismo ya evolucionado en adultos y heredado de éstos, es un refuerzo teórico extra con que cuenta la hipótesis del mecanismo de resistencia común. Este hecho junto con la similar relación entre los niveles de resistencia de las poblaciones estudiadas en estados postembrionarios y embrionarios (bajos niveles en BA, intermedios en HB y altos en IIB) sugiere como muy probable la modificación del canal de sodio dependiente de voltaje como el principal mecanismo de resistencia evolucionado en *P. humanus capitis*.

Como se ha discutido, modificación en el sitio de acción de piretroides y DDT (canal de sodio dependiente de voltaje), mecanismo tipo *kdr*, se ha propuesto como el principal mecanismo involucrado en *P. humanus capitis* en embriones y estados postembrionarios.



Paradójicamente, este mecanismo es el único de los que hemos propuesto como posibles, que no se ha intentado detectar en forma mas o menos directa. La única forma de relacionar sitio de sitio de acción neurofisiológico de piretroides y DDT alterado con la resistencia observada es por estudios electrofisiológicos, lo que permite detectar diferencias en la transmisión del impulso nervioso entre poblaciones susceptibles y resistentes (Hemingway, 1999). Otra alternativa es realizar estudios de biología molecular y detectar sustituciones aminoacídicas en el canal de sodio dependiente de voltaje o mutaciones puntuales en el gen que codifica para tal proteína en las poblaciones resistentes. Estudios sobre estas posibilidades no fueron parte de los objetivos de esta tesis ya que los estudios realizados se centraron en el perfil toxicológico (principalmente) y bioquímico de poblaciones susceptibles y resistentes. Esto está en concordancia con el perfil histórico toxicológico-bioquímico del CIPEIN. Sin embargo se comenzará en el CIPEIN el desarrollo de líneas de investigación en análisis molecular y genético de los mecanismo de resistencia.

Muchos trabajos han informado resistencia a insecticidas en poblaciones de *P. humanus capitis*, pero sólo unos pocos han tenido como objetivo discutir los mecanismos de resistencia desarrollados. Ya se ha destacado que las publicaciones mencionadas no han trabajado sobre la posible resistencia desarrollada en embriones, con lo cual la comparación de estos trabajos se limitará a los estados postembrionarios y se extenderá la discusión a los embriones, motivo de esta tesis. Hemingway *et al* (1999) identificaron mecanismos involucrados en la resistencia a piretroides en poblaciones de *P. humanus capitis* de Israel. Estas poblaciones fueron resistentes a DDT, permetrina y a d-fenotrina. Se determinó como principal mecanismo de la resistencia detectada sitio de acción alterado tipo *kdr*. Se encontró elevada actividad de glutatión-transferasas relacionada solamente con la resistencia a DDT. También se encontró una no muy elevada actividad de oxidasas (P450) relacionada a la resistencia a piretroides y DDT, asignándole un rol secundario en la resistencia detectada en los bioensayos. No encontraron evidencias de que las esterasas estén involucradas como mecanismo de resistencia. Los resultados y el análisis seguido por los autores es similar al que se ha seguido en esta tesis. Los autores proponen como principal mecanismo al mecanismo tipo *kdr*, al igual que en esta tesis, en forma indirecta. Lee *et al* (2000) también reportaron como principal mecanismo evolucionado en dos poblaciones del Reino Unido un mecanismo de sitio de acción tipo *kdr* y como mecanismo secundario elevada actividad del complejo P450. Los autores demostraron la presencia de sustituciones aminoacídicas como consecuencia de mutaciones puntuales en el gen del canal de sodio dependiente de voltaje. Picollo *et al* (2000) han reportado, por ensayos de inhibición *in vivo*, elevada actividad de enzimas

detoxificantes (P450 y esterasas) como responsable, en parte, de la resistencia observada a piretroides en poblaciones de Buenos Aires, siendo más importante el complejo P450 que las esterasas. Según el hecho de que tras la inhibición de ambos sistemas enzimáticos la reversión de la resistencia no fue completa los autores sugieren que otro mecanismo, probablemente sitio de acción alterado tipo *ksr*, esté involucrado en la resistencia a piretroides en poblaciones de *P. humanus capitis* de Buenos Aires.

Como se observa, este trabajo de tesis confirma lo adelantado por los trabajos previos en las poblaciones de piojos de Buenos Aires. Además estas poblaciones han desarrollado mecanismos bioquímicos de resistencia en forma similar a los evolucionados en otros países como Israel y Gran Bretaña. Esto coincide con historias similares de control químico, excepto ciertos compuestos utilizados, y el casi compulsivo uso de piretroides en los últimos años ocurrido en estos tres países.

El primer estudio de detección de resistencia en embriones de *P. humanus capitis* y el primer estudio de análisis de mecanismo de resistencia a insecticidas en embriones de insectos (esta tesis doctoral) ha realizado un aporte significativo dentro de los estudios de resistencia, a pesar de las muchas dificultades que presenta trabajar con huevos de piojos. A partir de la realización de nuevos trabajos en esta línea de investigación se podrá analizar comparativamente los resultados obtenidos en esta tesis, los cuales, en ese momento, aumentarán considerablemente su valor científico.

### ***Spinosad: un candidato a pediculicida***

Finalizando la discusión del trabajo se analizará el potencial del insecticida spinosad como pediculicida. Como se ha discutido, en las poblaciones estudiadas no se ha observado resistencia a este insecticida ni en formas eclosionadas ni en huevos. Además de la similitud en susceptibilidad, tales poblaciones mostraron pendientes de las curvas dosis-repuesta comparables a la pendiente de la curva de la población susceptible, sugiriendo (dentro de las restricciones descritas por Chilcatt & Tabashnik (1995)) similitud en la variabilidad genética poblacional relacionada a los procesos toxicológicos generados por exposición a spinosad. De esta manera las poblaciones resistentes a piretroides y DDT muestran similar respuesta toxicológica al spinosad que la población susceptible, indicando que esta respuesta es la tolerancia "natural" de los piojos a este insecticida. Sin embargo este hecho no es suficiente en la consideración del spinosad como pediculicida. Si aún sin haberse desarrollado resistencia a un insecticida, la tolerancia al mismo es muy alta, tal insecticida no sería un buen candidato para el control de la plaga. Esto se debe a que las dosis a usar deberían ser muy

altas por su poca *efectividad*, lo que podría afectar a organismos no blanco (incluyendo al hombre) reduciendo considerablemente sus posibilidades de *selectividad* (Crouse and Sparks, 1998). De esta manera se pueden considerar buenos criterios para analizar nuevos agentes de control a la efectividad, comparación de la tolerancia del nuevo insecticida con aquellas de insecticidas que han controlado eficientemente la plaga, y a la selectividad, comparación de tolerancias entre la plaga y organismos no blanco (Crouse and Sparks, 1998). Como se ha comentado, los piretroides han sido eficientes en el control de *P. humanus capitis* en el pasado, por lo que la comparación de las  $DL_{50}$  o  $CL_{50}$  entre los piretroides y el spinosad en la población susceptible (comparación de tolerancias) es una buena medida de la efectividad del spinosad. Según lo obtenido en este trabajo, los valores de  $CL_{50}$  y  $DL_{50}$  del insecticida spinosad comparan favorablemente con los valores de  $CL_{50}$  y  $DL_{50}$  para permetrina y d-fenotrina tanto para el estado embrionario como postembrionario. Resultados similares de efectividad se ha encontrado para *Heliothis virescens*. En estos trabajos, el nivel de actividad obtenido por diversos bioensayos para spinosina A es comparable a una variedad de piretroides (insecticidas eficaces en el control de esta plaga) y significativamente más alto que una amplio rango de organofosforados, carbamatos y clorados (Crouse & Sprks, 1998). En cuanto a la selectividad, este trabajo no ha generado datos en este sentido por lo que se presentarán y analizarán sólo datos de bibliografía. El spinosad mostró un alto grado de seguridad hacia muchos insectos benéficos, particularmente neuróptero, hemíptero y colcóptero, y hacia los organismos utilizados en la evaluación de la toxicidad ambiental (Crouse & Sparks, 1998). La seguridad ambiental mostrada por el spinosad es complementada por un perfil de toxicidad favorable hacia mamíferos. El spinosad muestra uno de los mejores perfiles de selectividad de los insecticidas actualmente en uso (Crouse & Sparks, 1998). Por todo lo expresado y analizado en cuanto a la efectividad y selectividad del spinosad, se presenta a este insecticida como una interesante opción a los piretroides en el control químico de *P. humanus capitis*.

## CONCLUSIONES FINALES

- Las manchas oculares y los apéndices (patas y antenas) observados a través del corion fueron buenos marcadores del desarrollo embrionario. El desarrollo de estos marcadores permitió definir tres etapas del desarrollo embrionario: desarrollo temprano, desarrollo medio y desarrollo tardío.
- Las condiciones ambientales óptimas para el desarrollo embrionario de *P. humanus capitis* en laboratorio se encuentran en los rangos de 27-31°C de temperatura y 45-75% de humedad relativa. Estas condiciones fueron determinantes en el éxito de los biensayos con embriones.
- La respuesta toxicológica de la población BA no fue la esperada para una población susceptible, siendo la población *P. humanus humanus* la verdadera población susceptible.
- Las poblaciones de *P. humanus capitis* analizadas son resistentes a permetrina, d-fenotrina y DDT. Estas poblaciones no son resistentes ni a carbaril ni a spinosad.
- Las poblaciones de *P. humanus capitis* con resistencia a piretroides (permetrina y d-fenotrina) y DDT detectada en estados postembrionarios muestran embriones resistentes a los mismos insecticidas.
- Las metodologías de medición de actividad esterasa utilizadas en estados postembrionarios permitieron medir tal actividad en huevos. Esto no se pudo lograr con la metodología de medición de actividad de enzimas P450.
- No se observó relación entre la actividad esterasa y el nivel de resistencia de las poblaciones en estados postembrionarios ni en embriones. Se sugiere que estas enzimas no están involucradas en la resistencia observada.
- La actividad de las enzimas P450 muestra relación con el niveles de resistencia en los estados postembrionarios. No fue posible determinar este hecho en los embriones sugiriéndose que estas enzimas no están expresadas en el estado embrionario.
- Se sugiere un mecanismo tipo *kdr* o modificación del canal de sodio dependiente de voltaje como principal mecanismo de resistencia a piretroides y DDT evolucionado en los estados postembrionario y embrionario en *P. humanus capitis*. Aumento en la actividad detoxificante del complejo P450 parece aportar a la resistencia observada en los estados embrionarios.
- Se sugiere al spinosad como posible molécula pediculicida

### ***Mecanismos de resistencia***

- Considerando que se plantea al canal de sodio dependiente de voltaje como principal mecanismo de resistencia a piretroides en las poblaciones de *P. humanus capitis* estudiadas, distintas técnicas electrofisiológicas en piojos de estas poblaciones no mostrarán las alteraciones fisiológicas características de la intoxicación con piretroides y DDT (por ejemplo: descargas repetitivas de potenciales de acción, depolarización del potencial de reposo de la membrana neuronal, etc).

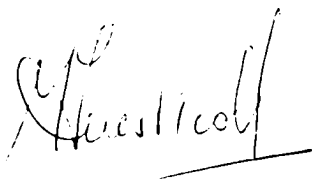
Lo recién planteado no sería tan complicado en adultos como en embriones. En estos últimos, estudios electrofisiológicos realizados sobre ninfas I recién eclosionadas darían importante información acerca de la expresión de este tipo de mecanismo de resistencia en los embriones.

- En este mismo sentido, estudios de biología molecular sobre canal de sodio dependiente de voltaje en piojos pertenecientes a las poblaciones resistentes estudiadas, posiblemente muestren alteraciones en la secuencia aminoacídica de la proteína canal y en la secuencia nucleotídica del gen que la codifica.

- Estudios de genética poblacional (isoenzimas, morfometría y marcadores moleculares) ayudarán a entender la estructura genética de las poblaciones resistentes de *P. humanus capitis*. Este tipo de estudios también ayudarán a entender que es una población de piojos o a que se debería llamar población en *P. humanus capitis*.

### ***Manejo de resistencia en P. humanus capitis***

- La búsqueda de nuevas moléculas que no tengan al canal de sodio dependiente de voltaje como sitio de acción, con alta eficacia pediculicida y con alto grado de selectividad es el camino directriz de actuales y futuros planes de investigación. En este marco se encuadran la continuación del estudio del spinosad y el análisis de varios compuestos naturales.





***Bibliografía***

## BIBLIOGRAFIA

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Abrahamovich, A.; Cicchino, A.; González, A.; Castro, D.C. y Mendez, E. 1995. Influencia del sexo y la edad en la prevalencia de la pediculosos capitis en N. E. de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Trabajo presentado en el III Congreso Argentino de Entomología, Mendoza, Argentina.
- Agosin, M. 1985. Role of microsomal oxidations in insecticide degradation. pp 529-603, in *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, G.A. Kerkut and C.I. Gilbert (eds), vol 12: Insect control. Pergamon Press.
- Amevigbe, M.D.D.; Ferrer, A.; Champorie, S.; Monteny, N.; Deunff, J. and Richard-Lenoble, D. 2000. Isoenzymes of human lice: *Pediculus humanus* y *P. Capitis*. *Med. Vet. Entomol.* 14: 419-425.
- Bloomquist, J.R. 1996. Ion channels as target for insecticides. *Ann. Rev. Entomol.* 41: 163-190.
- Barker, S.C. 1994. Phylogeny and classification, origins, and evolution of host associations of lice. *Int. Parasitol.* 8: 1285-1291.
- Berman, E.L. and Firstenberg, D. 1979. The human body louse egg-correlative study of anatomy by SEM and light microscopy. *Scanning Elect. Microsc.* III: 197-202
- Brown AWA. 1958. Nature and characterization of resistance. In: *Insecticide resistance in arthropods. Monograph series, vol 38.* WIIO Geneva 240 pp.
- Burgess, I. 1995. *Pediculus humanus capitis* in schoolchildren. *Lancet.* 345: 730-731.
- Burkhart, C.N.; Stankiewicz, B.A.; Pchalek, I.; Kruge, M.A. and Burkhart, C.G. 1999 a). Molecular composition of the louse sheath. *J. Parasitol.* 85(3): 559-561.
- Burkhart, C.N.; Burkhart, C.G.; Gunning, W.T. and Arbogast, J. 1999 b). Scanning electron microscopy of human head louse (Anoplura: Pediculidae) egg and its clinical ramifications. *J. Med. Entomol.* 36(4): 454-456.
- Burkhart, C.N.; Arbogast, J.; Smythe, P. and Burkhart, C.G. 1999 c). Histochemical analysis of the nit of *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *J. Med. Entomol.* 36(4): 530-532.
- Busvine, J.; Burn, J. and Gamlin, R. 1948. Experiments with D.D.T. and Gamma B.II.C. (Gammexane) for use against Head Lice. *The Medical Officer.* 79: 121-124.
- Buxton, P.A. 1946. *The Louse: an account of the which infest man, their medical importance and control.* Edward Arnold & Co. London.

- Cariño, F.A.; Koener, J.F.; Plapp Jr, F.W. and Feyereisen, R. 1994. Constitutive overexpression of the citocromo P450 gene *CYP6A1* in a house fly strain with metabolic resistance to insecticides. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 24(4): 411-418.
- Casida, J.E. and Quistad, G.B. 1995. *Pyrethrum flowers, production, chemistry, toxicology, and uses.* Oxford university press, Inc. Oxford.
- Chambers, J.E.; MA, T.; Chambers, H.W. 1995. Insecticide metabolism in mammals. pp 135-161. in *Progress in pesticide biochemistry and toxicology, vol 8: The mammalian metabolism of agrochemicals*, Hutson D.H. and Paulson, G.D. (eds). John Wiley and son Ltd, Chichester. England.
- Chilcutt, C.F. and Tabashnik, B.E. 1995. Evolution of pesticide resistance and slope of the concentration-mortality line. Are they related?. *J. Econ. Entomol.* 88(1): 11-20.
- Cochran, D.G. 1995. Insect resistance to pyrethrins and pyrethroids. pp 234-249, in *Pyrethrum flowers, production, chemistry, toxicology, and uses*, Casida, J.E. and Quistad, G.B. (eds). Oxford university press, Inc. Oxford.
- Coz, J.; Combescot-Lang, C. and Verdier, V. 1993. Resistance du pou tete *Pediculus capitis* L. 1758 aux pyrethrinoides d-phenotrine et permethrine en France. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* 2: 245-252.
- Crouse, G.D. and Sparks, T.C. 1988. Naturally derived materials as products and lead for insect control: the spinosyns. *Rev. Toxicol.* 2:113-146.
- Dasch, G.A. 2002. Louse borne bacterial diseases: Problems, questions, and new approaches. 2<sup>nd</sup> International congress on Phthiraptera. The University of Queensland, Brisbane, Australia. July 8-12, 2002.
- Dauterman, W.C. 1976. Extramicrosomal metabolism of insecticides. pp 149-177. In *Insecticide biochemistry and physiology*, Wilkinson, C.F. (ed). Plenum press. New York and London.
- Dauterman, W.C. 1985. Insect metabolism: extramicrosomal. pp 713-731. In *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, G.A. Kerkut and C.I. Gilbert (eds), vol 12: Insect control. Pergamon Press.
- de Sousa, G.; Cuany, A.; Brun, A.; Amichot, M.; Rahmani, R. and Bergé, J.P. 1995. A Microfluorometric method for measuring ethoxycoumarin-O-deethylase activity on individual *Drosophila melanogaster* abdomens: interest for screening resistance in insect populations. *Anal. Biochem.* 229: 86-91.
- Devonshire, A.L. and Field, L.M: 1991. Gene amplification and insecticide resistance. *Ann. Rev. Entomol.* 36: 1-23.



- Devonshire, A.L.; Field, L.M.; Foster, S.P.; Moores, G.D.; Williamson, M.S. and Blackman, R.L. 1998. The evolution of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. (B)*, 353: 1677-1684.
- Doucet, M.M.A.; Miranda, M.B. and Arce, M.A. 1997. Prevalences of *Pediculus humanus capitis* and *Sarcoptes scabiei* in primary schools of Cordoba, Argentina. Analysis in relación to sex, age, and socio-economic conditions. *Res. Rev. Parasitol.* 57(2), 67-69.
- Downs, A.M.R.; Stafford, K.A.; Harvey, I. and Coles, G.C. 1999. Evidence for double resistance to permethrin and malathion in head lice. *Br. J. Dermatol.* 141: 508-511.
- Downs, A.M.R.; Stafford, K.A. and Coles, G.C. 2000. Susceptibility of British head lice, *Pediculus capitis*, to imidacloprid and fipronil. *Med. Vet. Entomol.* 14: 105-107.
- Eldefrawi, A.T. 1985. Acetylcholinesterases and anticholinesterases. pp 115-131. In *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, G.A. Kerkut and C.I. Gilbert (eds), vol 12: Insect control. Pergamon Press.
- Elea Laboratorios S.A.C.I.F. y A. E Instituto de investigaciones científicas y técnicas de las Fuerzas Armadas (CITEFA). Patente de invención en trámite: Una composición pediculicida. Argentina. Acta N° P99 01 04387.1999.
- Elliot, M. Chemicals in insect control. pp 3-31. In *Pyrethrum flowers, production, chemistry, toxicology, and uses*, Casida, J.E. and Quistad, G.B. (eds). Oxford university press, Inc. Oxford.
- Feyereisen, R. 1999. Insect P450 enzymes. *Ann. Rev. Entomol.*
- French-Constant, R.H.; Anthony, N.; Andreev, D. And Aronstein, K. 1996. Single versus multiple origins of insecticide resistance: inferences from the cyclodiene resistance gene *Rdl*. pp 106-116. In *Molecular genetic and evolution of pesticide resistance*. Brown, T.M. American chemical society, Washington, DC.
- French-Constant, R.H.; Pittendrigh, B.; Vaughan, A. and Anthony, N. 1998. Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes?. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 353: 1685-1693.
- French-Constant R.H and Roush R.T. 1990. Resistance detection and documentation: the relative roles of pesticidal and biochemical assay. pp 4-38. In *Pesticide resistance in arthropods*, Roush R.T. and Tabashnik B.E (eds). Chapman and Hall. New York and London.
- French-Constant, R.H.; Anthony, N.; Aronstein, K.; Rocheleau, T. And Stilwell, G. 2000. Cyclodiene insecticide resistance: from molecular to population genetics. *Ann. Rev. Entomol.* 45: 449-466.

- Forgash, A.J. 1984. History, evolution, and consequences of insecticide resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.* 22: 178-186.
- Gangadhar Rao, D.E. and Shetty, N. 1996. Proteins and esterase isozymes during developmental stages of organophosphate resistant strains in *Anopheles stephensi* Liston. *Comp. Biochem. Physiol.* 114(c): 51-55.
- Gilbert, S. F. 1997. *Development biology*, fifth edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA
- Gillott, C. 1981. *Entomology*. Plenum Press, New York.
- Gonzalez Audino, P.; Barrios, S.; Vassena, C.; Mougabure Cueto, G.; Zerba, E. and Picollo, M.I. 2004. Increased Monooxygenase Activity Associated with Resistance to Permethrin in *Pediculus humanus capitis* De Geer (Phthiraptera: Pediculidae) from Argentina. (enviado).
- Gratz, N.G. 1977. Treatment resistance in louse control, pp 179-190. In *Scabies and Pediculosis*. Orkin, M; Maibach, M.I.; Parisch, L.C. and Schwartzman R.M. (eds). Lippincott. Philadelphia.
- Grosscurt, A.C. 1980. Larvicidal and ovicidal resistance to diflubenzuron in the housefly (*Musca domestica*). *Proceedings C* 83: 127-141.
- Hatsushika, R.; Naramoto, S. and Miyoshi, K. 1983. Scanning electron microscope studies on head louse, *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Kawasaki Med. J.* 9(2): 109-119.
- Hemingway, J.; Hawkes, N.; Prapanthadara, L.; Indrananda Jayawardena, K.G. and Ranson, H. 1998. The role of gene splicing, gene amplification and regulation in mosquito insecticide resistance. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. (B)* 353: 1695-1699.
- Hemingway, J.; Miller, J. And Mumcuoglu, K.Y. 1999. Pyrethroid resistance mechanisms in the head louse *Pediculus capitis* from Israel: implications for control. *Med. Vet. Entomol.* 13: 89-96.
- Hinton, H.E. 1981. *Biology of insect eggs*. Vol II: 20-Phthiraptera. pp 549-562. Pergamon Press.
- Ito, S.H. and Goh, P.M. 1984. Deltamethrin as a potential ovicidal pyrethroid against *Plutella xylostella* L. *Toxicol. Lett.* 22: 161-164.
- Hodgson, E. 1985. Microsomal mono-oxygenases. pp 225-323. In *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. G.A. Kerkut and C.I. Gilbert (eds), vol 11: Pharmacology. Pergamon Press.

- Ibarra, I. 1993. Lice (Anoplura). pp 517-529. In *Medical insects and arachnids*. Lane, R.P. and Crosskey, R.W. Chapman & Hall.
- 2<sup>nd</sup> International Congress on Phthiraptera. The university of Queensland, Brisbane, Australia. July 8-12, 2002.
- Kettle, D.S. 1995. *Medical and veterinary entomology: 19-Phthiraptera*. pp 361-382. CAB International.
- Kislansky, V. 1999. Pediculosis. pp 541-542. En *Dermatología infantil en la clínica pediátrica*. Pueyo de Casabé, S.T. y Máximo, J.A. (eds) ISBN.
- Kim, K. and Ludwig, H.W. 1978. The family classification of the Anoplura. *Syst. Entomol.* 3: 249-284.
- Leo, N.P.; Campbell, N.J.H.; Yang, X.; Mumcuoglu, K. And Barker, S.C. 2002. Evidence from mitochondrial DNA that head lice and body lice of humans (Phthiraptera: Pediculidae) are conspecific. *J. Med. Entomol.* 39(4): 662-666.
- Lee, S.H.; Yoon, K.; Williamsom, M.S.; Goodson, S.J.; Takano-Lee, M.; Edman, J.D.; Devonshire, A.L. and Clark, M. 2000. Molecular analysis of kdr-like resistance in permethrin-resistant strain of head lice, *Pediculus capitis*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 66: 130-143.
- Leonard, B.R.; Graves, J.B. and Sparks, T.C. 1991. Ovicidal effects of selected insecticides against pyrethroid-susceptible and -resistant tobacco budworm. *Southwest. Entomol.* 15: 163-172.
- Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Exp. Ther.* 96: 99-110.
- Maunder, J.W. 1971. Resistance to organochlorine insecticides in head lice and trials using alternative compounds. *The Medical Officer* 125, 27-29.
- McKenzie J.A. 1996. *Ecological and evolutionary aspects of insecticide resistance*. Academic Press, Inc. California. USA.
- McKenzie, J.A. and Batterham, P. 1998. Predicting insecticide resistance: mutagenesis, selection and response. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 353: 1729-1734.
- Michaelides, P.K. and Wright, D.J. 1997. Activity of soil insecticides on eggs of *Diabrotica undecimpunctata howardi*: effects on embryological development and influence of egg age. *Pestic. Sci.* 49: 1-8.
- Millburn, P. 1995. The fate of xenobiotics in mammals: biochemical processes. pp 1-87, in *Progress in pesticide biochemistry and toxicology*, vol 8: The mammalian metabolism

of agrochemicals, Hutson D.H. and Paulson, G.D. (eds). John Wiley and son Ltd, Chichester. England.

Miller, R.N.; Wisseman, C.L.; Sweeney, G.W.; Verschuere, A. and Fabricant, Y. 1972. First report of resistance of human body lice to malathion. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 66, 372-374.

Mouches, 1985

Mougabure Cueto, G. 2001. Efectos biológicos del 1-dodecanol en *Rhodnius prolixus* Stal, 1859 y *Triatoma infestans* (Klug,1834) (Hemiptera: Reduviidae). Tesis de Maestría. Universidad Nacional de General San Martín.

Mougabure Cueto, G.; Vassena, C.; Gonzalez Audino, P.; Picollo, M.I. y Zerba, N.E. 2000. Efectividad de lociones capilares sobre poblaciones de *Pediculus capitis* resistentes a insecticidas. *Acta. Toxicol. Argent.* 8(1): 10-12.

Mougabure Cueto, G; Gonzalez Audino, P.; Vassena, C.; Picollo, M.I. and Zerba, N.E. 2002. Toxic effect of aliphatic alcohols against susceptible and permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *J. Med. Entomol.* 39(3): 457-460.

Mougabure Cueto, G.; Picollo, M.I. and Zerba, N.E. 2004. Biological effect of 1-dodecanol on *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) (enviado).

Mumcuoglu, K.Y.; Miller, J. And Galun, R. 1990. Susceptibility of the human head and body louse, *Pediculus humanus* (Anoplura: Pediculidae) to insecticides. *Insect Sci. Appl.* 11: 223-226.

Mumcuoglu, K. Y.; Hemingway, J.; Miller, J.; Ioffe-Uspensky, I.; Klaus, S.; Ben-Ishai, F. and Galun, R. 1995. Permethrin resistance in the head louse *Pediculus capitis* from Israel. *Med. Vet. Entomol.* 9: 427-432.

Nation, J.L. 2002. *Insect physiology and biochemistry: Embryogenesis.* pp 1-25. CRC Press.

Nomura, M.; Kato, Y. and Miyata, T. 2000. The genotype and heredity of modified acetylcholinesterase of the green rice leafhopper (*Nephotettix cincticeps* Uhler). *Pestic. Biochem. Physiol.* 66, 73-82.

Oppenoorth F.J. 1985. Biochemistry and genetics of insecticide resistance. pp 731-773. In *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology.* G.A. Kerkut and C.I. Gilbert (eds), vol 12: Insect control. Pergamon Press.

Osborne, M.P. and Pepper, D.R. 1992. Mechanisms of *kdr* and *super-kdr* resistance. pp 71-89. In *Molecular mechanisms of insecticide resistance, Diversity among insects.* Mullin, C.A. and Scott, J.G. (eds). American chemical society, Washington, DC.

- Osborne, M.P.; Pepper, D.R. and Hein, P.J.D. Site-insensitive mechanisms in knockdown-resistant strain of house fly, *Musca domestica*. Marshall Clark, J. (ed). American chemical society, Washington, DC.
- Perry, A.S.; Yamamoto, I.; Ishaaya, I. and Perry R.Y. 1998. Insecticides in agriculture and environment. Springer-Verlag, Berlin.
- Picollo de Villar, M.I. 1979. Caracterización del desarrollo embrionario de *Triatoma infestans* (vinchuca) y su relación con la susceptibilidad a insecticidas organofosforados. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires.
- Picollo, M.I. 1999 a). Riesgos y beneficios en el uso de pediculicidas. Rev. Soc. Entomol. Argent. 58 (1-2), 238-242.
- Picollo, M.I. 1999 b). Biología de los parásitos. pp 535-538. En Dermatología infantil en la clínica pediátrica. Pueyo de Casabé, S.T. y Máximo, J.A. (eds) ISBN.
- Picollo, M.I.; Vassena, C.; Casadio, A.; Máximo, J. and Zerba, E.N. 1998. Laboratory studies about susceptibility and resistance to insecticides in the head lice *Pediculus capitis*. J. Med. Entomol. 35: 814-817.
- Picollo de Villar, M.I.; Wood, E.J.; Zerba, E.N.; A. de Licastro, S. and Casabe, N. 1980. Cholinesterases and eserine-resistant esterases in the developing embryo of *Triatoma infestans* and its role as targets for inhibition in the ovicide actino of parathion. Comp. Biochem. Physiol. 67(c): 55-59.
- Picollo, M.I.; Vassena, C.; Mougabure Cueto, G.; Verneti, M. and Zerba, E. 2000. Resistance to insecticides and effects of synergists on permethrin toxicity in *Pediculus capitis* (Phthiraptera, Pediculidae) from Buenos Aires. J. Med. Entomol. 37: 721-725.
- Plapp, F.W and Wang, T.C. 1980. Genetics of metabolic resistance to insecticides in the house fly: evidence for the role of a major regulatory gene. International Congress of Entomology, Japan.
- Pollack, R.J.; Kiszewski, A.; Armstrong, P; Hahn, C.; Wolfe, N.; Rahman, H.; Laserson, K.; Telford, S. and Spielman, A. 1999. Differential permethrin susceptibility of head lice sampled in the United States and Bornco. Arch. Pediatric. Adolescent Med. 153: 969-973.
- Raymond, M. And Pasteur, N. 1996. Evolution of insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: the migration hypothesis of amplified esterase genes. pp 90-97. In Molecular genetics and evolution of pesticide resistance. Brown, T.M. (ed). American chemical society, Washington, DC.

- Raymond, M.; Chevillon, C.; Guillemaud, T.; Lenormand, T.; and Pasteur, N. 1998. An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. (B)* 353: 1707-1711.
- Retana Salazar, A.P. 1994. Filogenia de los piojos (Insecta: Anoplura) de los monos del viejo mundo (Catarrhini). *Rev. Biol. Trop.* 42 (3): 633-638.
- Robertson, J.L. and Preisler, H.K. 1992. *Pesticide bioassays with arthropods*. CRC, Boca Raton, FL.
- Robinson, D.; Leo, N.; Prociv, P and Barker, S.C. 2002. Potential role of head lice, *Pediculus humanus capitis*, as vectors of *Rickettsia prowazekii*. 2<sup>nd</sup> International congress on Phthiraptera. The University of Queensland, Brisbane, Australia. July 8-12.
- Roush, R.T. and McKenzie, J.A. 1987. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Ann. Rev. Entomol.* 32: 361-380.
- Roush, R.T. and Tabashnik B.E. 1990. *Pesticide resistance in arthropods*. Chapman and Hall. New York and London.
- Roush, R.T. and Daly, J.C. 1990. The role of population genetics in resistance research and management. In *Pesticide resistance in arthropods*, pp 97-152. Roush R.T. and Tabashnik B.E (eds). Chapman and Hall. New York and London.
- Rupes, V.; Moravec, J.; Chmela, J.; Ledvinka, J and Zelcova, J. 1995. Resistance of head lice *Pediculus capitis* to permethrin in Czech Republic. *Centr. Eur. J. Publ. Health.* 3, 1: 30-32.
- Shobha Rani, K. and Lakshmipathi, V. Changes in quantitative and qualitative patterns of esterases in developing eggs of *Chrysochoris purpureus* Westw. *Entomon.* 20(2): 7-11.
- Smallman, B.N. and Mansingh, A. 1969. The cholinergic system in insect development. *Ann. Rev. Entomol.* 14: 387-408.
- Smith, E.H. and Wagenknecht, A.C. 1959. The ovicidal action of organophosphate insecticides. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:1133-1144.
- Smith, E.H. and Salkeld, E.H. 1966. The use and action of ovicides. *Ann. Rev. Entomol.* 11: 331-368
- Soderlund, D. 1995. Mode of action of pyrethrins and pyrethroids. pp 217-232. In *Pyrethrum flowers, production, chemistry, toxicology, and uses*, Casida, J.E. and Quistad, G.B. (eds). Oxford university press, Inc. Oxford.
- Soderlund, D.; Sanborn, J.R. and Lee, P.W. 1983. Metabolism of pyrethrins and pyrethroids in insects. pp 401-435. In *Progress in pesticide biochemistry and toxicology*, vol 3. Hutson D.H. and Roberts, T.R. (eds). John Wiley and son Ltd, Chichester. England.

- Soderlund, D.M and Bloomquist, J.R. 1990. Molecular Mechanisms of insecticide resistance. pp 58-97. in Pesticide resistance in arthropods, Roush R.T. and Tabashnik B.E (eds). Chapman and Hall. New York and London.
- Sparks, T.C.; Lockwood, J.A., Byford, R.L.; Graves, J.B. and Leonard, R.B. 1989. The role of behavior in insecticide resistance. Pestic. Sci. 26: 383-399.
- Tahmisian, T.N. 1943. Encimes in ontogenesis: choline-esterase in developing *Melanoplus differentialis* eggs. J. Exptl. Zool. 92: 199-213.
- Tomita, T.; Yaguchi, N. Mihara, M.; Takahashi, M.; Agui, N. D Kasai, S. 2003. Molecular análisis of a *para* sodium channel gene from pyrethroid-resistant head lice, *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). J. Med. Entomol. 40(4): 468-474.
- Ulrich, V. and Weber, P. 1972. The O-dealkylation of 7-ethoxycoumarin by liver microsomes. A direct fluorometric test. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1171-1177.
- Valles, S.M.; Perera, O.P. and Strong, C.A. 2003. Relationship between th *para*-homologous sodium channel point mutation (g—c at nucleotide 2979) and knockdown resistance in the german cockroach using multiplex polymerase chain reaction to discern genotype. J. Econ. Entomol. 96(3): 885-891.
- Vassena, C.V.; Mougabure Cueto, G.; Gonzales Audino, P.: Alzogaray, R.A.; Zerba, E.N. and Picollo, M.I. 2003. Prevalence and levels of permethrin resistance in *Pediculus humanus capitis* De Geer (Anoplura: Pediculidae) from Buenos Aires, Argentina. J. Med. Entomol. 40(4): 447-450.
- Weast, E.C. and Astle, M.J. 1982. Handbook of chemistry and physics. 63<sup>rd</sup> edition. CRC Press.
- Wigglesworth, V.B. 1972. The principles of insect physiology. 7<sup>th</sup> ed. Chapman & Hall, London.
- Joklik, K.W.; Willett, H.P. and Bernard Amos, D. 1987. Zinsser's Microbiology. McGraw-Hill Professional.
- Zlotkin, E. 1999. The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. Ann. Rev. Entomol. 44: 429-455.
- Zschintzsch, J.; O'Brien, R.D. and Smith, E.H.. 1965. The relation between uptake and toxicity of organophosphates for eggs of the large milkweed bug. J. Econ. Entomol.58: 613-621.