

ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**REVISTA
FARMACÉUTICA
REVIEWS**



1858 - 2011

Revista Farmacéutica 153 N° 1-2 (2011) ISSN 0034-9496

B u e n o s A i r e s - A r g e n t i n a

Volumen 153
N° 1-2
2011



Fundada en 1858

**COMITÉ DE PUBLICACIÓN
EDITORIAL BOARD**

Coordinador
Miguel D'Aquino

Secretario
Gabriel Gutkind

Miembros
Miguel Caso
Luis E. Díaz
Manuel Limeres
Mario A. Los
Ronaldo Meda
Marcelo C. Nacucchio
Maria Luz Pita Martín
Modesto C. Rubio
Marta M. Salseduc
Marcelo Squassini

Editada por la
**Academia Nacional
de Farmacia y Bioquímica**
Junín 956 - P. P.
Tel./Fax: (011)4964-8213
Buenos Aires
acad@ffyb.uba.ar

Dirección postal
Junin 956 P.P.
1113 Buenos Aires - Argentina
<http://www.ffyb.uba.ar/academia/infex.htm>

Diseño y composición láser
Tall. Gráf. Su Impres S.A.

La presente edición
se terminó de imprimir en
Tall. Gráf. Su Impres S.A.
Tucumán 1480 C.A.B.A.
Tel./Fax: 4371-0029/0212

**REVISTA
FARMACÉUTICA
REVIEWS**

Editada por la
Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica
Personería Jurídica N°1 762-30/8/1968

CONSEJO DIRECTIVO 2011

Presidente
Acad. Carlos M. Baratti

Vicepresidente
Acad. Miguel Ángel Caso

Secretario General
Acad. Gabriel Mato

Prosecretario
Acad. Marta M. Salseduc

Tesorero
Acad. Ronaldo Meda

Protesorero
Acad. Miguel D'Aquino

Vocales Titulares
Acad. Carlos A. Gotelli
Acad. Juan P. Rossi

Vocales Suplentes
Acad. Otmaro Roses
Acad. Modesto C. Rubio

Revisores de Cuentas
Acad. Alfredo A. Hager
Acad. Eloy L. Mandrile
Acad. Francisco J. Stefano

Las ideas que se exponen en el Reviews son de exclusiva responsabilidad de los autores y no reflejan necesariamente la opinión de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica.

ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

ACADÉMICOS TITULARES		
Acad. Sem M. Albonico	Acad. Tomás de Paoli	Acad. Marcelo C. Nacucchio
Acad. María Cristina Anón	Acad. Luis E. Díaz	Acad. Edgardo Poskus
Acad. Carlos M. Baratti	Acad. Carlos H. Gaozza	Acad. Rubén V. D. Rondina
Acad. Mirta J. Biscoglio	Acad. Héctor I. Giuliani	Acad. Otmaro E. Roses
Acad. Alberto A. Boveris	Acad. Carlos A. Gotelli	Acad. Juan Pablo F. C. Rossi
Acad. Carlos Bregni	Acad. Gabriel O. Gutkind	Acad. Modesto C. Rubio
Acad. Rodolfo Brenner	Acad. Alfredo A. Hager	Acad. José Alberto Santomé
Acad. Néstor O. Caffini	Acad. Silvia Hajos	Acad. Alfredo Salibian
Acad. Clyde N. Carducci	Acad. Mario A. Los	Acad. Marta M. Salseduc
Acad. Ricardo A. Caro	Acad. Eloy L. Mandrile	Acad. Francisco J. E. Stéfano
Acad. Miguel A. Caso	Acad. Horacio José Gabriel Mato	Acad. María G. Volonté
Acad. Miguel D' Aquino	Acad. Ronaldo Meda	Acad. Regina L. W. de Wikinski
ACADÉMICOS EMÉRITOS		
Acad. Arnaldo L. Bandoni	Acad. Mateo Chekherdemian	Acad. Juan C. Sanahuja
✠ Acad. Osvaldo D. Castrelos	Acad. Enrique Ióvine	Acad. Antonio Somaini
Acad. Jorge D. Coussio	Acad. Alejandro C. Paladini	Acad. Horacio B. Rodríguez
Acad. Héctor M. Chechile		
ACADÉMICOS HONORARIOS		
BRASIL	ESPAÑA	ITALIA
Acad. Evaldo de Oliveira	Acad. Benito del Castillo García	Acad. Rodolfo Paoletti
	Acad. Federico Mayor Zaragoza	
	Acad. M. Teresa Miras Portugal	
	✠ Acad. Juan Manuel Reol Tejada	
ACADÉMICOS CORRESPONDIENTES		
Acad. Aníbal Amat	Acad. Rubén H. Manzo	Acad. Gabriela del Valle Perdigón
Acad. Marcelo O. Cabada	Acad. Modesto R. Montecchia	Acad. Hugo G. Pérez
Acad. Osear H. Fay	Acad. Aldo Mottino	Acad. M. Luz Pita Martín de Portela
Acad. Raúl C. Fazio	Acad. Elsa María Nadalin	Acad. Clelia M. Riera
Acad. Aída Pesce de Ruiz Holgado	Acad. Jorge O. Nicolini	Acad. Alfredo Salibian
Acad. Manuel Limeres	Acad. Otto Orsingher	Acad. Marcelo Squassini
Acad. Guillermo Lossa	Acad. Ana María Pechen D' Angelo	

ACADÉMICOS CORRESPONDIENTES EN EL EXTRANJERO

ALEMANIA

Acad. Pablo Steinberg

BRASIL

Acad. Aluisio Pimenta

Acad. Caio Romero Cavalcanti

CHILE

Acad. Aquiles Arancibia Orrego

Acad. Marco A. Montes Guyot

Acad. Rosa I. Moran Gana

Acad. Wanda Quilhot Palma

COLOMBIA

Acad. Fleming Martinez Rodríguez

CUBA

Acad. Ricardo Galvis

Acad. Héctor Zayas Bazán y Perdomo

ECUADOR

Acad. Julio E Aráoz

Acad. Eduardo Goetchel

ESPAÑA

Acad. María del Carmen Francés Causapé

Acad. Tomás Adzet Porredón

Acad. Francisco Zaragoza García

Acad. Eduardo Mariño Hernández

Acad. Miguel Ylla Cátala Genis

Acad. Antonio Monge Vega

ESTADOS UNIDOS

Acad. Jorge R. Barrio

Acad. Jorge D. Brioini

Acad. Marcel E. Nimni

FRANCIA

Acad. Jean Marc A'iache

Acad. Paul Fleury

Acad. Carlos Soto

ITALIA

Acad. Stefano Govoni

MÉXICO

Acad. Pedro Joseph-Nathan

PANAMÁ

Acad. Ceferino Sánchez

PARAGUAY

Acad. Luis H. Berganza

PERÚ

Acad. Bertha P. Pareja

Acad. José Amiel Pérez

Acad. Fernando Quevedo Ganoza

URUGUAY

Acad. Jorge Ares Pons

Acad. Cayetano Cano Marotta

Acad. Cosme de los Santos Carvallido

Acad. Uberfil Delbene Garate

Acad. Pietro Fagiolino

Acad. Raquel Lombardo de Bertolaza

Acad. Justo Emilio Menes

Acad. Patrick Moyna

Acad. Aníbal Alberto Olmos Ferreira

Acad. Osear Polla Bermúdez

Acad. Joaquín E. Royer Meicoso

VENEZUELA

Acad. José Luis Andrade

ACADEMIA NACIONAL
DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



REVISTA
FARMACÉUTICA
REVIEWS

Vol. 153 (Nº 1-2) Año 2011

SUMARIO

LAS ACADEMIAS DE FARMACIA COMO ORGANOS DE OPINION Y
CONSULTA DE LOS PROBLEMAS DE LA SOCIEDAD ACTUAL.

Baratti CM, Rubio MC, Nacucchio MC, D'Aquino M. 5

COMPOSICION DE LAS FORMULAS PARA NUTRICIÓN PARENTERAL.
PARENTERAL NUTRITION FORMULAE COMPOSITION.

Ana María Menéndez, María Luz Pita Martín de Portela 11

EL PAPEL DEL FARMACÉUTICO EN EL SISTEMA DE SALUD A TRAVÉS DE LA HISTORIA.

THE ROLE OF THE PHARMACIST IN THE HEALTH SYSTEM THROUGH HISTORY.

Mariano Guillermo Blake, Mariano Martín Boccia, María del Carmen Krawczyk y Carlos María Baratti 33

ADITIVOS ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS EN ALIMENTOS, FÁRMACOS Y COSMÉTICOS.

POSIBLES EFECTOS ADVERSOS

Miguel D'Aquino 43

FARMACOTERAPIAS ACTUALES Y FUTURAS PARA EL TRATAMIENTO DEL AUTISMO.

CURRENT AND FUTURE PHARMACOTHERAPY IN THE TREATMENT OF AUTISM.

Analía Gabriela Reínés 59

BIOQUÍMICA DE LA RESISTENCIA A INSECTICIDAS EN INSECTOS

VECTORES DE ENFERMEDADES HUMANAS.

BIOCHEMISTRY OF INSECTICIDE RESISTANCE IN HUMAN DISEASE VECTOR- INSECTS.

Pablo L. Santo Orihuela 69

PROTEÍNAS "DESESTRUCTURADAS": ¿PATOLOGÍA O SALUD?

"UNSTRUCTURED" PROTEINS: PATOLOGY OR HEALTH?

Néstor O. Caffini 83

INFLUENCIA DE LA PROTEÍNA DE RESISTENCIA DEL CÁNCER DE MAMA (BCRP)

EN LA FARMACOCINÉTICA DE LOS ANTIRRETROVIRALES.

Roxana Noemí Peroni 91

LAS β -LACTAMASAS COMO EJEMPLO DE VERSATILIDAD AL SERVICIO DE

LA RESISTENCIA BACTERIANA.

Pablo Power, José Di Conza, Gabriel Gutkind 103

BACTERIAS Gram (+) PROBIÓTICAS: INFLUENCIA SOBRE EL SISTEMA INMUNE

Carolina, Maldonado Galdeano y Gabriela Perdigón 123

**SE AGRADECE ESPECIALMENTE LA COLABORACIÓN
PRESTADA POR EL LABORATORIO MONSERRAT Y ECLAIR S.A
EN LA DISTRIBUCIÓN DE ESTE NÚMERO EN TODO EL PAÍS.**

COOPERARON PARA LA EDICION DE ESTE VOLUMEN 2011

Laboratorios ABBOTT S.A

Laboratorios BAGO S.A

Laboratorios BALIARDA S.A

Laboratorios BRITANIA S.A

CAMARA ARGENTINA DE ESPECIALIDADES
MEDICINALES (CAEME)

Laboratorio CASASCO S.A

Laboratorio GADOR

Droguería del Sur

Novo Nordisk Pharma Argentina S.A

Laboratorios ROUX-OCEFA

ASOCIACIÓN ARGENTINA DE FARMACIA Y
BIOQUIMICA INDUSTRIAL (SaFyBI)

Laboratorios WIENER S.A

BIOQUÍMICA DE LA RESISTENCIA A INSECTICIDAS EN INSECTOS VECTORES DE ENFERMEDADES HUMANAS

BIOCHEMISTRY OF INSECTICIDE RESISTANCE IN HUMAN DESEASE VECTOR- INSECTS.

Pablo L. Santo Orihuela

Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CONICET/CITEDEF)

Juan Bautista de La Salle 4397. Villa Martelli. Buenos Aires. Argentina.

Cátedra de Química Analítica Instrumental. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Junín 956. Capital Federal. Buenos Aires. Argentina.

porihuela@ffyb.uba.ar

Tabla de Contenidos

Resumen-Summary	69
Introducción	70
Desarrollo	71
Control Químico	71
Resistencia a Insecticidas	73
Estudio de los mecanismos de resistencia: análisis toxicológico y bioquímico	73
a) Citocromo P450 (CYP): Mono-oxigenasas	75
b) Glutación S-Transferasas	76
c) Esterasas	76
Técnicas de laboratorio para el análisis bioquímico	77
Análisis de resultados	78
Conclusiones	79
Referencias Bibliográficas	79
Agradecimientos	82

Resumen

El ser humano desde su existencia ha convivido con numerosas especies de insectos a los que se han denominado plagas, debido a sus participaciones activas en la transmisión de enfermedades y a las cuantiosas pérdidas en la producción de alimentos de origen vegetal o animal. Una de las formas de control es el denominado químico que consiste en el empleo de compuestos insecticidas de origen sintético

o natural. El uso prolongado de estos compuestos puede llevar al fenómeno de resistencia, mediante el cual se hace necesario incrementar paulatinamente la dosis de uso del insecticida hasta valores de riesgo toxicológico para otros organismos incluyendo al ser humano. El análisis bioquímico mediante la determinación de la actividad de los distintos grupos de las enzimas que participan en la degradación de estos compuestos (metabolismo del insectici-

da); utilizando distintos sustratos de acuerdo al grupo; es de suma importancia debido a dos motivos. Por un lado porque permite dilucidar si se trata de uno de los más frecuentes causales de resistencia (ya sea en sus orígenes o una vez establecida) y por otro lado porque posibilita el empleo de estrategias alternativas de control, evitando riesgos toxicológicos y el incremento de la resistencia a valores incontrolables.

Palabras claves: *análisis bioquímico, insectos, resistencia, citocromos, esterases, Tripanosomas*

Summary

The human being has coexisted with numerous species of insects since his origins. This kind of insects have been called pests because of their active participation in the transmission of human diseases and numerous losses in the food production from vegetables or animals. One form of management of this species is the

chemical control and it is the use of synthetic or natural insecticidal compounds. The prolonged use of these insecticides can lead to the resistance phenomenon, whereby it is necessary to gradually increase the insecticide dose to toxicological values for other organisms including humans. The biochemical analysis is the evaluation of the activity of different groups of enzymes involved in the degradation of these compounds (insecticide metabolism) using different substrates according to the enzymatic group, and it is very important for two reasons. On the one hand it allows to establish whether it is one of the most frequent causes of resistance (on the beginning or once established) and secondly because it allows the use of alternative control strategies, avoiding toxicological risks and the increased of resistance to uncontrollable values.

Keywords: *Biochemist analysis, insects, resistance.*

Introducción

El ser humano desde su existencia ha convivido con diferentes especies de insectos a los que se han denominado plagas, siendo este último concepto de origen exclusivamente antropocéntrico.

Algunas de estas especies han y continúan estando involucradas en la alteración de la vida humana y de sus ámbitos a lo largo de la historia, ejemplo de ello son sin dudas su participación activa en la transmisión de enfermedades y las cuantiosas pérdidas en la producción de alimentos de origen vegetal o animal (1).

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, se pueden clasificar entonces a estas especies de insectos en dos grupos: el primero denominado plagas sanitarias, si afectan a la salud humana, y el segundo en plagas agrarias o veterinarias, cuando involucran cultivos o

animales.

Analizando a las plagas sanitarias en particular, estas especies de insectos pueden ser en la mayoría de los casos vectores de otros organismos; un ejemplo lo constituye *Triatoma infestans*, conocido en Argentina con el nombre de "vinchuca", vector de *Tripanosoma cruzi* y responsable en la principal vía de transmisión de la Enfermedad de Chagas) (2) o simplemente provocar una molestia por sí mismos sin ser vehículos de otros microorganismos (piojos de la cabeza; *Pediculus humanus capitis*) (3). Existen también numerosas especies de insectos capaces de comportarse como vectores mecánicos de un gran número de patógenos oportunistas, tal es el caso de diferentes especies de cucarachas (*Periplaneta americana*, *Blattella germanica*, etc.) (4-7).

Ya sea por incapacidad de controlar al microorganismo que transmite al vector (falta de terapias, fármacos o vacunas) o debido a que el propio insecto cause los daños, el hombre ha tratado de controlar a estos insectos de distintas maneras a lo largo de su historia. En la actualidad hay tres formas principales de control químico de insectos plaga las que se basan

en el empleo de insecticidas de origen natural, semi-sintético o sintético. Otras formas de control son el mecánico, que consiste en el diseño y empleo de todo tipo de trampas o barreras y por último el biológico, mediante el uso de organismos biológicos que permiten alterar las poblaciones de insectos considerados plagas.

Desarrollo

Control Químico

El mismo se basa en el uso de compuestos insecticidas y se han empleado diferentes familias de insecticidas a lo largo de la historia del control de plagas. Clasificados de acuerdo a la estructura química de los mismos, se han dividido en organoclorados (OCls), cuyo principal y mejor conocido representante ha sido el DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), una familia actualmente prohibida en todo el mundo debido a su elevada persistencia en el medio ambiente y a su potencial riesgo toxicológico y ecotoxicológico (8). Posteriormente fueron introducidos los insecticidas organofosforados (OFs) y carbamatos (CBMs), de los cuales algunos son cuestionados actualmente y otros han sido prohibidos en ciertos tipos de aplicaciones como consecuencia de su elevada toxicidad y características organolépticas desagradables, y a partir de la década del 80 los insecticidas piretroides (Pyr) (9). Estos insecticidas han sido ampliamente utilizados en agricultura, veterinaria y salud con una importante tasa de éxito pero con la consecuente aparición de resistencia en numerosas especies de insectos debido a su prolongada aplicación.

Respecto del mecanismo de acción de estos insecticidas resulta de importancia aclarar que de manera general se pueden considerar como de acción neurotóxica a los insecticidas OCls, OFs y Pyr.

Los OCls, dependiendo del compuesto en particular, pueden tener como sitio blanco a los canales de sodio del axón, donde impiden el cierre de los mismos después de la activación y despolarización de la membrana, de lo que resulta un escape continuo de sodio a través de la membrana nerviosa (10) o al receptor de ácido γ -aminobutírico (GABA), inhibiendo el flujo del anión cloruro (Cl^-) dentro del axón e interfiriendo en el flujo de calcio (11).

Los OFs, denominados anticolinesterásicos al igual que los CRMs, actúan inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa (AChE) -enzima que hidroliza al neurotransmisor acetilcolina en el espacio intersináptico-, causando su acumulación e impidiendo la transmisión continua de impulsos nerviosos. Esto ocasiona la pérdida de coordinación muscular, convulsiones y finalmente la muerte (12).

Tanto en mamíferos como en insectos, la intoxicación con piretroides afecta la generación del impulso nervioso tanto en el sistema nervioso central como en el periférico (13). El sitio de acción primario de los piretroides es el canal de sodio dependiente de voltaje. La apertura y cierre del canal de sodio permite el ingreso a la célula de una corriente de sodio, principal componente en la generación del potencial de acción y en su propagación a lo largo del axón. Los piretroides prolongan en el tiem-

po la corriente de sodio alterando la cinética activación-inactivación-desactivación del canal de sodio (14).

Actualmente se han introducido algunos insecticidas pertenecientes a nuevas familias como los fenilpirazoles (Fipronil), neonicoti-

noides (Imidacloprid) y derivados de plantas (aceites esenciales) de aplicación agraria o veterinaria en la mayoría de los casos. La estructura química de algunos de ellos se puede ver en la Tabla 1.

Tipos de insecticidas de utilidad actual o pasada en el control de insectos que afectan la salud humana

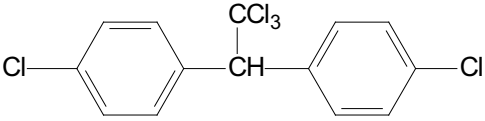
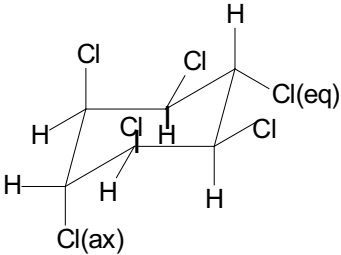
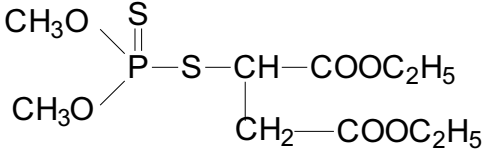
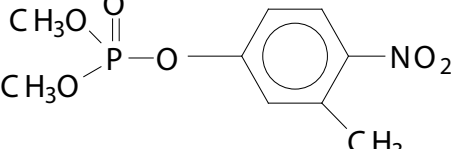
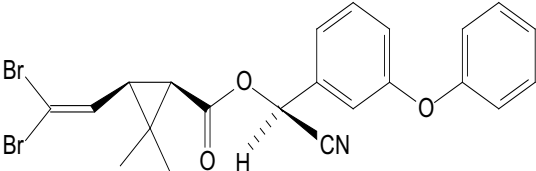
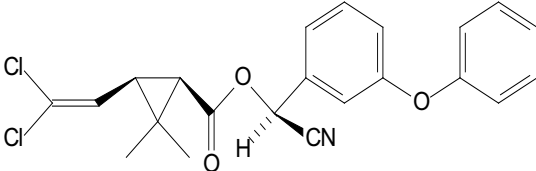
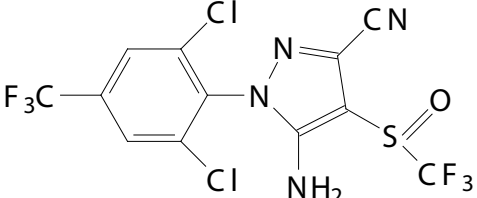
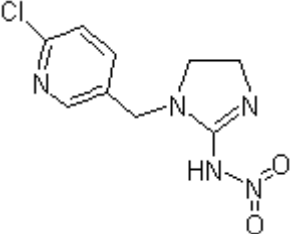
 <p style="text-align: center;">DDT</p>	 <p style="text-align: center;">γ-HCH (Lindano)</p>
 <p style="text-align: center;">Malatión</p>	 <p style="text-align: center;">Fenitrotión</p>
 <p style="text-align: center;">Deltametrina</p>	 <p style="text-align: center;">Cipermetrina</p>
 <p style="text-align: center;">Fipronil</p>	 <p style="text-align: center;">Imidacloprid</p>

Tabla 1: Algunos ejemplos de compuestos pertenecientes a las distintas familias de insecticidas.

Resistencia a insecticidas

El prolongado y/o indiscriminado uso de un tipo de insecticida puede llevar al desarrollo de resistencia en las poblaciones de insectos a las cuales se les aplica. Este fenómeno, que se manifiesta con la aparición de individuos que toleran dosis letales para los individuos llamados sensibles en las primeras utilidades del producto, se basa en una evolución genética de las poblaciones (15,16) en las que sobreviven los resistentes que al reproducirse entre ellos generan un incremento del número de individuos resistentes. Dicha forma de evolución se visualiza en la Figura 1.

La Organización Mundial de la Salud definió este fenómeno en 1957 de la siguiente

forma: "Resistencia es la capacidad desarrollada por una población de insectos para tolerar dosis de compuestos tóxicos que serían letales para la mayor parte de los individuos de una población normal de la misma especie" (17).

Debido a este fenómeno, las poblaciones de insectos tratadas con cualquier tipo de insecticida deben ser monitoreadas en forma continua, de manera de detectar la aparición de resistencia con antelación y establecer las conductas apropiadas de cambio. Mediante el monitoreo se evita el uso innecesario de dosis y tipos de insecticidas inefectivos, protegiendo la salud humana y el ecosistema (18).

Generación del fenómeno de resistencia en una población de insectos como consecuencia del uso de insecticidas

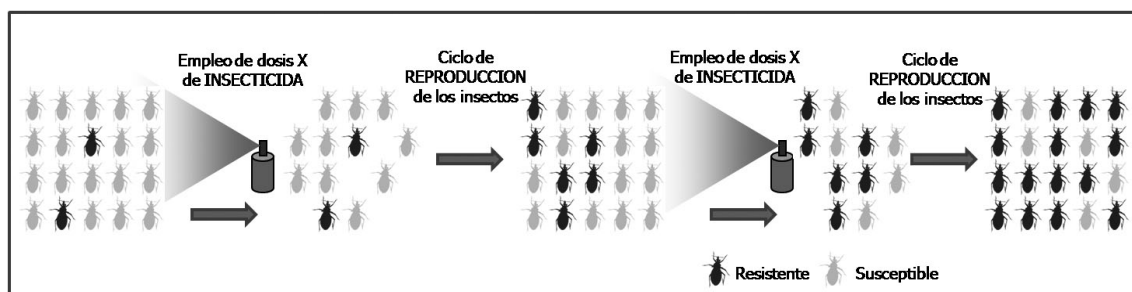


Figura 1: aumento del número de insectos resistentes a una dosis fija X de insecticida con el empleo prolongado del mismo en el control.

Estudio de los mecanismos de resistencia: análisis toxicológico y bioquímico empleando como modelo a *Triatoma infestans* (vinchuca).

El monitoreo de la resistencia en una determinada población de insectos tratada con insecticidas se realiza mediante un conjunto de análisis toxicológicos, bioquímicos y moleculares sobre muestras representativas de las poblaciones de insectos en estudio.

El análisis toxicológico se basa en la realización de los denominados bioensayos, que consisten en la exposición de los insectos de manera individual y mediante tóxico a distintas dosis de insecticidas para determinar un parámetro estadístico de toxicidad siendo el ejemplo más común la *Dosis Letal 50 (DL₅₀)* entre otros.

Para este tipo de análisis se debe contar con una cepa susceptible de referencia. La misma puede ser una colonia de insectos estableci-

da en laboratorio por un lapso aproximadamente de 5 generaciones (5 años en el caso del ciclo de vida de *Triatoma infestans*) ó bien, una colonia iniciada por recolección de material de campo en zonas donde no hubo aplicación de insecticidas (en un lapso no menor a cinco años) (19) asegurando de esta manera la susceptibilidad de los mismos. También es necesaria una población susceptible de campo, con insectos provenientes de una población no expuesta a insecticidas como control de la cepa de referencia.

Los parámetros de toxicidad calculados

para la cepa de referencia son contrastados con los parámetros de las poblaciones de campo de *T. infestans* sujetas a estudio. Los individuos seleccionados en condiciones estandarizadas (generación, estadio, tiempo de vida, condiciones ambientales, etc.) (19) de estas poblaciones son expuestos mediante la aplicación de tópicos a dosis crecientes del insecticida o formulado insecticida (principio activo + vehiculizador) permitiendo la realización de una curva de dosis de insecticida en función de la mortalidad de insectos.

Grafico de mortalidad en función de la dosis de insecticida

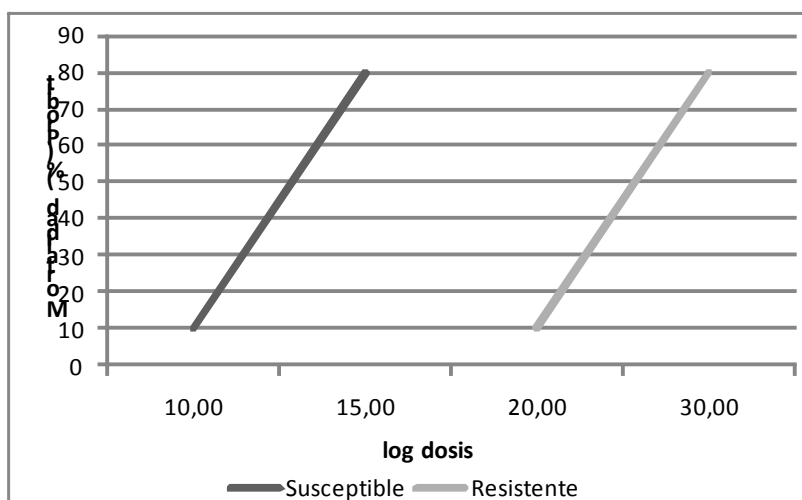


Figura 2. La curva de la población resistente se encuentra desplazada hacia valores de dosis mayores debido a que la cantidad de insecticida que se necesita aplicar es mayor que la cantidad de insecticida que se aplica a los insectos susceptibles.

Utilizando esta curva se calculan entonces los parámetros estadísticos de DL_{50} (dosis que produce la mortalidad del 50% de la población expuesta) mediante el análisis de regresión Probit (20). A partir de los parámetros DL_{50} estimados para la cepa susceptible y la población en estudio se calcula el Grado de Resistencia (GR) (21) según la siguiente ecuación:

$$\text{Grado de Resistencia (GR)} = \frac{DL_{50} \text{ Población de Campo}}{DL_{50} \text{ Cepa Susceptible}}$$

El GR representa el factor por el que se debe multiplicar la dosis que produce una determinada mortalidad en los individuos susceptibles para producir una equivalente mortalidad en los individuos resistentes.

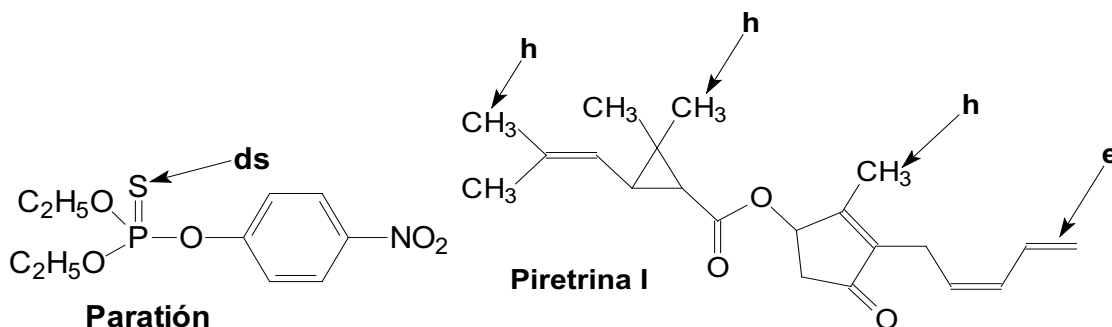
El análisis bioquímico se realiza en el laboratorio mediante evaluación de la actividad de distintos tipos de enzimas involucradas en el metabolismo (biotransformación) de compuestos insecticidas (22). Este es uno de los mecanismos que se presenta con mayor frecuencia en las poblaciones resistentes. Dentro de este tipo de análisis también se encuentran aquellos que evalúan cambios en la cutícula del insecto (barrera que evita principalmente la desecación de los insectos), la que puede presentar modificaciones que conllevan a la disminución de la permeabilidad de los formulados insecticidas y a la consecuente disminución del ingreso de los mismos al insecto (23,24).

Los principales tipos de enzimas vinculados a la degradación de insecticidas son los que se detallan a continuación:

a) Citocromo P450 (CYP): Mono-oxigenasas

Las mono-oxigenasas citocromo P450 (CYP) se encuentran presentes en prácticamente todos los tejidos de los insectos y están involucradas tanto en la síntesis y degradación de ecdisteroides y hormona juvenil como en el metabolismo de xenobióticos naturales y sintéticos (25). El número de P450s de insectos se aproxima a 200 e incluye miembros en las familias CYP 4, 6, 9, 12, 15, 18 y 28 (26). La importancia de las CYP y su rol en el metabolismo de insecticidas ha sido ampliamente demostrada en insectos (27,28). Presentan un alto grado de inespecificidad en cuanto a sustratos pero también predilección por compuestos liposolubles. Metabolizan insecticidas a través de un gran número de reacciones como: hidroxilaciones aromáticas, alíclicas y alifáticas, dealquilaciones de éteres y aminas sustituidas, oxidaciones de tioéteres a sulfóxidos y sulfonas, epoxidación de dobles enlaces y desulfuración (29). (Figura 3)

Sitios de acción de las mono-oxigenasas P450 sobre compuestos de las distintas familias de insecticidas



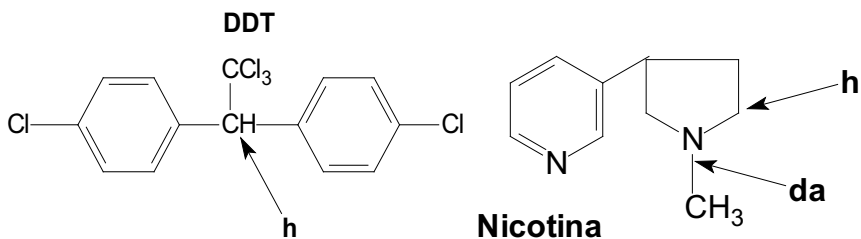


FIGURA 3. Algunas reacciones de citocromo P450 sobre insecticidas
h=hidroxilación, e=epoxidación, da=dealquilación, ds=desulfuración

El metabolismo de los insecticidas por monooxigenasas puede resultar en detoxificación o activación (25). La resistencia mediada por CYPs puede ser debida a una detoxificación incrementada (o a una activación disminuída) y podría ser el resultado de un cambio en la actividad catalítica de la monooxigenasa P450 involucrada o a un cambio en el nivel de expresión de la proteína (30). La aparición de cambios en el metabolismo oxidativo de los insectos ha conferido resistencia a carbamatos (CRB) (31) y principalmente a piretroides (32-39).

b) Glutatión S-Transferasas

Cumplen dos roles en el metabolismo de xenobióticos: conjugación de compuestos electrofílicos con el glutatión endógeno, protegiendo

así a moléculas biológicas como ácidos nucleicos y proteínas; y proporción de una efectiva vía de excreción a través de un producto hidrosoluble (40). Este grupo de enzimas catalizan la conjugación de insecticidas tales como los organofosforados (OF), CRB y organoclorados (OCl) que dependen de la presencia de glutatión (41,42).

c) Esterasas

Estas enzimas son de distribución ubicua y actúan sobre múltiples sustratos ya que hidrolizan la unión de tipo éster R-COO-R'. Según los tipos de sustratos sobre los cuales actúan y los compuestos que las inhiben se ha realizado una clasificación simplificada de las esterazas (43-45). (Tabla 2)

Tabla 2. Clasificación simplificada de esterazas de acuerdo al sustrato de preferencia.

Tipo de Esterasas	Sustrato preferencial
A- Esterasas (Arilesterasas)	Esteres Aromáticos
B- Esterasas (Carboxilesterasas) (Colinesterasas)	Esteres Alifáticos Esteres de colina
C- Esterasas (Acetilesterasas)	Acetil ésteres

Son proteínas de bajo peso molecular que se encuentran en su mayoría, solubles en la hemolinfa de los insectos y sólo una pequeña fracción se halla unida a algún tipo de membrana.

Tres de las principales familias de insecticidas neurotóxicos (los OFs, CRMs y Pyrs) son ésteres y pueden ser hidrolizados por esterasas. El aumento de la actividad degradativa mediada por esterasas es un mecanismo de resistencia muy importante en OFs, a veces importante en piretroides y poco importante en CRMs. La acción de esterasas conduce a productos menos tóxicos, más hidrosolubles y más fáciles de excretar (15). En más de 30 especies de insectos que son plagas de agricultura o de importancia médica y veterinaria, se ha desarrollado resistencia como resultado del aumento de la actividad de esterasas (33,46).

El análisis molecular se realiza mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (47) analizando las posibles modificaciones a nivel genético (secuencias de ADN) que codifican para las enzimas involucradas en la degradación de insecticidas y para los sitios de acción (receptores) de los insecticidas.

Técnicas de laboratorio para el Análisis Bioquímico

Como modelo para el desarrollo del tema se toma el estudio de la actividad enzimática en *Triatoma infestans* (vector principal en

Argentina de la Enfermedad de Chagas), en la cual el laboratorio del CIPEIN tiene mayor experiencia.

Los insectos muestra pueden provenir del campo (poblaciones sujetas a estudios) y/o de cepas criadas en el laboratorio. En general se reciben provenientes insectos adultos (machos y/o hembras) del campo y se trabaja con la primera generación (F1) tanto para la realización del análisis toxicológico como del bioquímico (33,34).

Las actividades enzimáticas pueden determinarse en homogenatos de insectos ó bien en distintos componentes del cuerpo del insecto mediante disecciones de cabeza, tórax o abdomen. Este último procedimiento se elige en el caso de que se requiera conservar la estructura y cofactores enzimáticos (en general lábiles) de los órganos del insecto y es denominado como "técnica ex-vivo" (48).

En particular la determinación de mono-oxigenasas P450 se realiza utilizando a la 7-etoxicumarina como sustrato y se evalúa en abdómenes escindidos de insecto. Este sustrato es *o*-desetilado por acción de este grupo enzimático generando 7-hidroxi cumarina; compuesto con características fluorescentes que puede ser medido por espectrofluorometría punto final (λ excitación: 400 nm y λ emisión: 440) (35,49,48). (Figura 4)

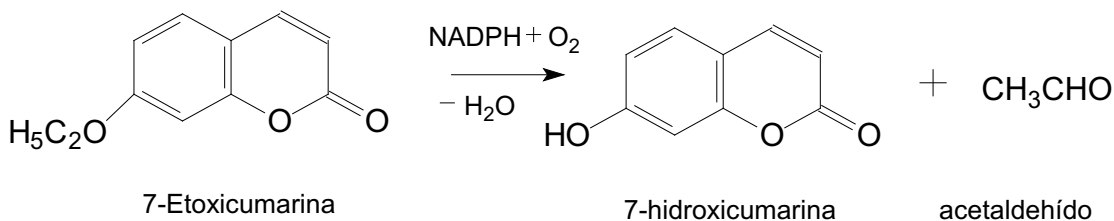


Figura 4: reacción de *o*-deetilación de la 7-etoxicumarina.

La medición de actividad de esterasas se realiza en la actualidad mediante el empleo de una gran variedad de sustratos debido a sus características de baja especificidad, por cuanto actúan sobre diversos tipo de uniones éster. Los sustratos más comunmete utilizados son el α y β naftil acetato (50,51), p-nitro fenil acetato (52); acetato de tiofenol (PTA) (53). Todos estos sustratos se evalúan espectrofotometricamente mediante técnicas cinéticas o de punto final.

En el Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN) se desarrolló un sustrato de medición cinética de esterasas, el 7-permetrato de cumarilo (7-CP) de mayor especificidad y sensibilidad debido a su analogía estructural con los piretroides y a que su producto de hidrólisis, la 7-hidroxicumarina, es detectable por espectrofluorometría en homogenatos individuales de insectos. (54). (Figura 5)

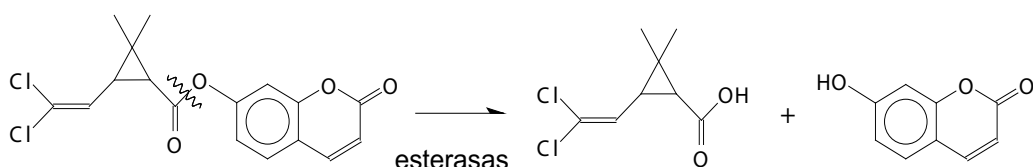


Figura 5: 7-permetrato de cumarilo y su producto de hidrólisis fluorescente la 7-OH cumarina.

El último grupo de enzimas involucradas son las Glutación S-transferasas, La actividad enzimática de este grupo se evalúa a mediante la técnica cinética espectrofotométrica descrita por Habig et al (55) empleando glutatión reducido sobre homogenatos individuales. (Figura 6).



Figura 6: Reacción utilizada para la determinación de la actividad de Glutacion S-transferasas

Análisis de resultados

Los resultados de las actividades enzimáticas se expresan como cantidad de producto formado en función del tiempo, por individuo y/o cantidad de proteína (56) (dependiendo si la técnica se realiza sobre un individuo o más por determinación). Se realiza la conversión de las respectivas unidades relativas de fluorescencia (RFU) o de absorbancia dependiendo de la técnica, y empleando estándares de los productos respectivos para realización de las curvas de calibración (57).

Los valores de actividad enzimática convertidos son representados mediante histogramas y analizados estadísticamente mediante métodos paramétricos (Análisis de la Varianza) o no paramétricos (*Kruskal-Wallis*). (Figura 7).

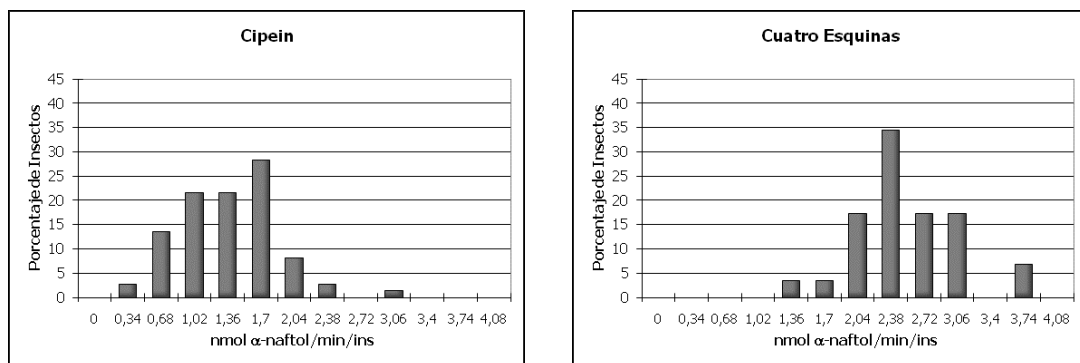


Figura 7: Ejemplo de representación con histogramas. Los valores de actividad de p-nitrofenil acetato esterasas son expresados en picomoles por minuto y por insecto y agrupados en rangos de valores de actividad mediante la construcción de histogramas. CIPEIN es una cepa de *T. infestans* criada en laboratorio susceptible a insecticidas mientras que Cuatro Esquinas (población domiciliada de origen riojano) presenta mayor cantidad de insectos con valores incrementados de actividad (57).

Conclusiones

El análisis bioquímico a través del estudio de las enzimas degradativas, permite dilucidar una de las principales causas de la resistencia a insecticidas en insectos vectores de enfermedades humanas.

En consecuencia, es posible detectar la aparición de resistencia con anticipación, evitando el uso indiscriminado de insecticidas y de esta

manera evitar tanto la exposición innecesaria de seres humanos y ecosistema a insecticidas, como el establecimiento de la resistencia.

Por otra parte es de utilidad para evaluar el empleo de estrategias alternativas, como por ejemplo el uso de otra clase de insecticidas con distinto modo de acción, y entonces efectuar un correcto y eficiente control de los insectos vectores.

Referencias Bibliográficas

1. van Emden HF and Service MW. (2004) Pest and vector control, Cambridge University Press, United Kingdom,.
2. Schofield CJ, Jannin J and Salvatella R, (2006) The future of Chagas disease control. Trends in Parasitology 22: 583-588.
3. Burgess IF, (2003) Human lice and their control. Annual Review of Entomology 49: 457-481.
4. Kinfu A and Erko B, (2008) Cockroaches as carriers of human intestinal parasites in two localities in Ethiopia. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 102: 1143-1147.
5. Zarchi AAK and Vatani H, (2008) A Survey on Species and Prevalence Rate of Bacterial Agents Isolated from Cockroaches in Three Hospitals. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 9:197-200.
6. Fakoorziba MR, Eghbal F, Hassanzadeh J and Moemenbellah-Fard MD, (2010) Cockroaches (*Periplaneta americana* and *Blattellagermanica*) as potential vectors of the pathogenic bacteria found in nosocomial infections. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 104: 521-528.
7. Oliva GR, Díaz C, Fuentes González O, Martínez MD, Fernández C, Cordoví R, Lago PM

- and Herrera N, (2010) *Blattella germanica* as a possible cockroach vector of micro-organisms in a hospital. *Journal of Hospital Infection* 74: 93-95.
8. Zerba E, (1999) Susceptibility and resistance to insecticides of Chagas disease vectors. *Medicina* 59: 41-46.
 9. Barbera C. (1989) *Pesticidas Agrícolas*, Omega.
 10. Coats JR. (1982) *Insecticide Mode of Action*, Academic Press, pp 3-24.
 11. Saunder and Harper. (1994) *Pesticides*, in *Principles and methods of toxicology*, Hayes A.W.(Ed). Raven Press Ltd. New York, pp 389-415.
 12. Hassall KA. (1982) *The Chemistry of pesticides: Their metabolism, Mode of Action and Uses*, in *Crop protection*, Verlagchemie,.
 13. Perry AS, Yamamoto I, Ishaaya I and Perry R. (1998) *Insecticides in agriculture and environmental. Retrospects and Prospects*.
 14. Bloomquist JR, (1999) *Insecticides: Chemistries and Characteristics*. University of Minnesota.
 15. Oppenoorth FJ. (1985) *Biochemistry and Genetics of Insecticide Resistance*, in *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, ed by Kerbut GA and Gilbert LL, Pergamon Press, pp 731-773.
 16. Georghiou GP and Mellon RB. (1983) *Pesticide Resistance in Time and Space*, in *Pest Resistance to Pesticides*, ed by Georghiou GP and Saito T, pp 1-46.
 17. WHO. (1957) *Seventh report Expert Committee on insecticides*. Tech Report Ser: 125-137.
 18. Kuhr RJ and Motoyama N. (1998) *Pesticides and the Future*, IOS Press, Amsterdam, Netherlands.
 19. WHO, World Health Organization. (1994) *Protocolo de evaluación de efecto insecticida sobre Triatominos*. *Acta Toxicol Arg* 2: 29-32.
 20. Lichfield JT and Wilcoxon FJ. (1949) A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Exp Ther* 96: 99-103.
 21. Robertson J and Preisler H. (1992) *Pesticide bioassays with arthropods*. CRC, Boca Raton, FL.
 22. Matsumura F. (1985) *Classification of insecticides*, in *Toxicology of insecticides*, Plenum Press, pp 45-107.
 23. Weling W and Paterson GD. (1985) *Toxicodynamics of insecticides*, in *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Pergamon Press, pp 603-645.
 24. Juarez MP and Calderon Fernandez GM. (2007) *Cuticular hydrocarbons of triatomines*. *Comp Biochem Physiol* 147: 711-730.
 25. Feyereisen R. (1999) *Insect P450 enzymes*. *Annu Rev Entomol* 44: 507-533.
 26. Fogleman JC, Danielson PB and MacIntyre RJ. (1998) *The molecular basis of adaptation in Drosophila: the role of cytochrome P450s*. *Evol Biol* 30: 15-77.
 27. Agosin M. (1985) *Role of microsomal oxidations in insecticide degradation*, in *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, ed by Kerkut G and Gilbert L, Pergamon, New York, pp 647-712.
 28. Scott JG, Liu N and Wen Z. (1998) *Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 121: 147-155.
 29. Wilkinson CF. (1983) *Role of mixed function oxidase in insecticide resistance*, in *Pest Resistance to Pesticide*, ed by Georghiou P and

- Saito T, Plenum Press., New York, United States of America, pp 175-207.
30. Oppenoorth FJ. (1984) Biochemistry of insecticide resistance. *Pestic Biochem Physiol* 22 :187-193.
 31. Rose RL, Barbhuiya L, Roe RM, Rock GC and Hodgson E. (1995) Cytochrome P450-Associated Insecticide Resistance and the Development of Biochemical Diagnostic Assays in *Heliothis virescens*. *Pestic Biochem Physiol* 51: 178-191.
 32. Yu SJ and Nguyen SN. (1992) Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in the diamondback moth. *Pestic Biochem Physiol* 44: 74-81.
 33. Santo Orihuela PL, Vassena CV, Zerba EN, Picollo MI. (2008) Relative Contribution of Monooxygenase and Esterase to Pyrethroid Resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *J Med Entomol* 45: 298-306.
 34. Picollo MI, Vassena CV, Santo Orihuela PL, Barrios S, Zaidemberg M and Zerba E. (2005) High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. *J Med Entomol* 42: 637-642.
 35. González Audino P, Vassena C, Barrios S, Zerba E and Picollo M. (2004) Role of enhanced detoxication in a deltamethrin-resistant population of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) from Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 335-339.
 36. Charani Ranasinghe BCA. (1998) Over-expression of cytochrome P450 CYP6B7 mRNA and pyrethroid resistance in Australian populations of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Pestic Sci* 54: 195-202.
 37. Shinji Kasai IS. (1998) P450 monooxygenases are an important mechanism of permethrin resistance in *Culex quinquefasciatus* Say larvae. *Arch Insect Biochem Physiol* 37: 47-56.
 38. Bartlett GR and Keil CB. (1997) Identification and Characterization of a Permethrin Resistance Mechanism in Populations of the Fungus Gnat *Lycoriella mali* (Fitch) (Diptera: Sciaridae). *Pestic Biochemistry and Physiology* 58: 173-181.
 39. Sheppard RC. (1995) Oxidative metabolic resistance to cyanopyrethroids in the horn fly (Diptera: Muscidae). *J Econ Entomol* 88: 1531-1535.
 40. Sivori JL, Casabe N, Zerba EN and Wood EJ. (1997) Induction of Glutathione S-transferase Activity in *Triatoma infestans*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 92: 797-802.
 41. Lumjuan N, Stevenson BJ, Prapanthadara La, Somboon P, Brophy PM, Loftus BJ, Severson DW and Ranson H. (2007) The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. *Insect Biochem Mol Biol* 37: 1026-1035.
 42. Hemingway J and Penilla RP. (1997) Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. A large-scale field trial in Southern Mexico. *Pestic Sci* 51: 375-382.
 43. Aldridge W.N. (1953) Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem J* 53: 110-117.
 44. Guedes RNC, Zhu KY, Dover BA and Kambhampati S. (1997) Partial Characterization of Phosphotriesterases from Organophosphate-Susceptible and -Resistant Populations of *Rhizopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Pestic Biochem Physiol* 57: 156-164.

45. Wheelock CE, Shan G and Ottea J. (2005) Overview of Carboxylesterases and Their Role in the Metabolism of Insecticides. *J Pestic Sci* 30: 75-83.
46. Hemingway J and Karunaratne S. (1998) Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med Vet Entomol* 12: 1-12.
47. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
48. Desousa G, Cuany A, Brun A, Amichot M, Rahmani R and Berge JB. (1995) 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.
49. Ullrich 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.
50. Gomori G. (1953) Human esterases. *J Lab Clin Med* 42: 445-453.
51. van Asperen K. (1962) A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *J Insect Physiol* 8: 401-414.
52. Wallace G, Casabé N, Wood E and Zerba E. (1988) Assay of pyrethroid-hydrolysing esterases using (1,R)-cis-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylates as substrates. *Xenobiotica* 18: 351-355.
53. Ellman GL, Courtney KD, Andres j and Featherstone RM. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7: 88-95.
54. Santo Orihuela P, Picollo MI, Zerba E and Masuh H, (2006) The 7 cis- or trans- coumaryl permethrate esterases as a possible biochemical marker of pyrethroid resistance in *Pediculus humanus capitis*. Third International Congreso on Phthiraptera (ICP3). Ciudad de Buenos Aires. Argentina.
55. Habig WH, Pabst MJ and Jakoby WB. (1974) Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130-7139.
56. Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
57. Santo Orihuela PL. (2008) Estudio de las enzimas detoxificantes relacionadas con la resistencia a insecticidas piretroides en *Triatoma infestans* (Klug) de la República Argentina y Bolivia. Tesis. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

Agradecimientos

La realización de este trabajo ha sido posible gracias al Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.