

## **Pediculicidas – Avaliações por Ensaios *In Vitro* ou *In Vivo*.**

Campinas, janeiro de 1998

Carlos Fernando S. Andrade & Luciana U. dos Santos

(Depto. de Zoologia, IB – UNICAMP)

Nos gêneros *Pediculus* e *Phthirus* estão as espécies de piolho que parasitam o homem. No primeiro gênero a espécie *Pediculus humanus* é tida como a única da família Pediculiidae que parasita o homem. A espécie *P. humanus* parasita o corpo, e é classicamente a responsável pela transmissão de doenças. A espécie *P. capitis* se aloja no couro cabeludo, e não tem sido incriminada pela transmissão de doenças. Acredita-se também que a forma ancestral é a da cabeça. A separação em diferentes “habitats” (cabeça *versus* corpo e roupas), levou à várias outras diferenças morfológicas e seguramente também levou a diferenças fisiológicas.

As mudanças dos hábitos higiênicos do homem moderno e cerca de 50 anos de uso de pediculicidas, levaram a um controle estável do *P.humanus* e conseqüentemente a diminuição do números de casos das bacterioses por ele transmitidas. Estas mudanças de hábitos certamente também refletiram na redução das populações de *P.capitis*. Mas ainda hoje o piolho da cabeça frequentemente causa aflição em adultos e crianças, não tendo ao que parece nenhuma relação com classe social ou hábitos higiênicos. Uma das características desses hematófagos que permitem que sejam ainda relativamente comuns, é o fato de na maioria das vezes causarem poucos sintomas no ser humano. Trabalhos em diferentes países relatam que entre 10 a 36% das pessoas infestadas com o *P.capitis* (o mesmo podendo acontecer com o piolho púbico) sequer sofrem o típico prurido. A infestação nesses casos acaba sendo detectada, principalmente pela visualização do inseto e seus ovos.

O controle de ectoparasitas que realizam seu ciclo todo sobre o hospedeiro tem sido sempre um desafio maior do que o de parasitas periódicos. As pulgas e carrapatos moles por exemplo, podem passar boa parte de sua vida fora do vertebrado que

parasitam. Para os animais domésticos ou na proteção de rebanhos, o controle pode ser feito com produtos sobre os animais, além de outras medidas no próprio ambiente (uso de outros produtos ou manejo ambiental pelo uso de métodos mecânicos por exemplo). Contra os ectoparasitos permanentes, a tendência é o uso repetitivo de um ou mais princípios ativos, ou a aplicação de produtos com elevada ação residual sobre o hospedeiro (spot on, pour on, brincos, banhos etc.). Pediculicidas a base de Malathion ou permetrina podem permitir várias semanas de ação residual. Essas medidas classicamente funcionam induzindo forte pressão de seleção, levando em pouco tempo ao desenvolvimento de resistência (trabalhos como os de Levot e Coleshaw, respectivamente com piolhos de ovelhas e cabras, são bons exemplos disso). De qualquer forma, o desenvolvimento de produtos para a veterinária é mais simples e dinâmico. Os rebanhos precisam ser protegidos e as perdas econômicas revertidas. Assim, moléculas de descoberta relativamente recente como a Abamectina, Ivermectina, Moxidectina e o Fipronil tem sido usadas como substitutos aos organofosforados e piretróides, para os quais a resistência já é bem documentada. Nesses casos, e devido à resistência cruzada, algumas moléculas novas de organofosforados ou piretróides acabam sendo ineficazes mesmo antes de serem lançadas no mercado. As Avermectinas também tem sido avaliadas (via oral), em humanos e coelhos infestados com *Pediculus*, mas em uma recente carta à NPA, Dr. Michael Skoien, da Merck & Co. Inc. deixa claro que a empresa não vai recomendar o uso do Estromectol para o controle da escabiose ou da pediculose até obter uma aprovação oficial nos EUA.

O controle da pediculose *capitis* feito com produtos químicos tem apresentado também paulatina redução de efeito, sendo necessária a busca de fórmulas alternativas de controle. Os relatos técnicos de resistência aos pediculicidas são cada vez mais comuns e permitem manifestações preconceituosas ou tendenciosas, que seguramente refletem no mercado desses produtos. Pesquisadores da Universidade de Montreal (P. Robert & V.X. Nguyen), da Escola de Medicina de Harvard (P. Armstrong, C. Hahn) ou do Centro de Entomologia Médica da Universidade de Cambridge (I. Burgess, J.

Maunder) têm trabalhado no assunto. *Sites* da Internet voltados para a área de saúde fazem comentários e recomendações, generalizando por exemplo "...*the only pesticide that worked well and consistently contain Permetrin*". Nos Estados Unidos, a Associação Nacional da Pediculose (NPA) mantém a discussão e estimula o cidadão a registrar na sua *homepage* casos de insucesso no uso de produtos para o tratamento da pediculose e escabiose. Ainda, financia pesquisadores da Escola de Saúde Pública de Harvard e do CDC para estudarem o assunto. A NPA também vende (US\$ 14,95) e fortemente recomenda o uso de um pente de dentes cilíndricos e muito próximos (LiceMeister<sup>TM</sup>), como forma de controle manual/mecânico. Na Grã-Bretanha, a Community Hygiene Concern atua fazendo fortes críticas às autoridades e aos produtos agora tidos como ineficientes.

Não resta dúvida de que a descoberta de novos pediculicidas (e por extensão novas propostas de manejo) é um grande desafio. Neste sentido, bioensaios para a avaliação de formulações promissoras necessitam ser realizados. A criação e mesmo a manutenção de *P. h. capitis* fora do seu único hospedeiro, o homem, ainda é o maior entrave, e restam algumas poucas opções no sentido de se conseguir materiais biológico para os testes. Estes, basicamente seriam de dois tipos: testes preliminares de seleção de princípios e fórmulas e testes de eficiência de produtos já comercializados ou prestes a serem lançados no mercado. Os ensaios com fórmulas ou produtos poderiam também ser caracterizados como *in vivo* ou *in vitro*, considerando-se basicamente se o tratamento e o acompanhamento do efeito letal sobre as diferentes fases (ovo, ninfas e adultos) são ou não realizados sobre um hospedeiro vertebrado.

### **1-Ensaio *in vivo*.**

1.A.- Testes de campo ou em pacientes- Pessoas infestadas são selecionadas e as fórmulas são diretamente avaliadas em suas cabeças (*P.c.*) ou no corpo (*P.h.* e *P. pubis*). Ensaio desse tipo são os mais classicamente encontrados na literatura antiga para a avaliação de produtos, e todo o experimento é feito nas pessoas selecionadas.

**Vantagens:** Esses ensaios são práticos e os resultados do efeito agudo dos produtos sobre os piolhos adultos são muito realistas; pode-se contar adicionalmente com o

relato das pessoas tratadas sobre outras características do produto e avaliar reações individuais. **Desvantagens:** Há uma dificuldade natural em se conseguir um número adequado de pessoas infestadas (colaboradoras ou voluntárias), que normalmente não apresentam uma quantidade homogênea de piolhos e nem o mesmo histórico de tratamentos prévios por piolhidas (No sentido de se contornar essa variável, uma adaptação desse método tem sido feita por pesquisadores como Taplin, Pitman, Rousset e Burgess entre outros. Assim, são coletados piolhos pré e pós-tratamento, para serem mantidos sob condições de laboratório e observação de mortalidade. Nesse caso, apenas o tratamento é realmente *in vivo*). Ainda como desvantagens, não se pode avaliar princípios ou fórmulas cuja toxicologia ao homem não seja bem conhecida, e o acompanhamento da ação residual nas pessoas deve ser rigoroso para que re-infestações não mascarem os resultados. **Observações.** 1- De acordo com Dr. Ian Burgess, diversos produtos avaliados quanto à sua ação ovicida mostraram em testes clínicos desse tipo, uma ação aguda superestimada, quando foram reavaliados no laboratório. 2- Em alguns raros casos pode-se ter uma excelente população para testes. Dr. Ping-Chin Fan e colaboradores por exemplo, puderam avaliar em Taiwan 4 produtos em um total de 1.657 escolares: Nix (541), Para aerosol (322), Prioderm (531) e Delice (263).

**1.B. Uso de animais testes no laboratório.** Pouco tem sido feito em termos de se avaliar pediculidas para uso humano diretamente sobre animais teste. Como as formas de *Pediculus* não se adaptam bem em outros animais, as melhores opções seriam as de se trabalhar com outras espécies de ectoparasitas (como modelos) em animais de fácil criação e manutenção no laboratório. **Vantagens:** Possibilidade de se obter grande número de insetos teste, em criações controladas; permite avaliações comparativas de diferentes princípios ou fórmulas; infestações homogêneas; pode-se trabalhar com preparados de toxicologia ainda pouco conhecida. **Desvantagens:** necessidade de se criar e manter o hospedeiro vertebrado; o inseto teste não é a espécie alvo de controle e não tem o mesmo histórico de exposição aos produtos de mercado. **Observações:** De qualquer forma, os testes com outros ectoparasitos poderiam ser tão

úteis quanto os realizados com colônias *P. humanus* adaptadas à coelhos (discutido mais abaixo).

## **2- Ensaios *in vitro* (ou *ex-vivo*).**

2.A.- Com a subespécie alvo *P. capitis* - Esse tipo de ensaio pressupõe uma boa coleta de piolhos, que são trazidos ao laboratório, alimentados (no homem) e ensaiados. Podem ser feitos com ovos, ninfas e adultos coletados, ou mesmo com ninfas de primeiro estágio obtidas a partir de uma boa coleta de ovos (ex. Blommers & van Lennep e de Boer). **Desvantagens:** a dificuldade natural em se ter uma boa coleta, bem como em se manter, transportar e alimentar os piolhos. *P.h.capitis* necessita de alimentação freqüente. **Vantagens:** a avaliação é diretamente feita sobre a espécie alvo, com seu histórico de exposição aos pediculicidas de mercado. **Comentários:** *P. capitis* em geral alimenta-se um pouco de cada vez e várias vezes ao dia. Isso dificulta sua manutenção no laboratório. Além disso, é mais susceptível à dissecação e uma mortalidade entre os piolhos não tratados pode ser esperada.

2.B.- Com *Pediculus humanus*. - A subespécie corpórea do piolho tem se mostrado muito mais adaptável às condições de laboratório e tem sido criada em humanos ou outros animais para ensaios *in vitro* provavelmente desde os trabalhos iniciais de Moore & Hirschfelder em 1919. As culturas mantidas em Orlando, Flórida, por Culpepper em 1942 eram inicialmente alimentadas por 30 a 45 minutos (duas vezes ao dia) nas costas de voluntários. Entre 30 a 40 mil piolhos eram colocados em cada voluntário. Com o trabalho adicional de pesquisadores como Davis & Hansens, Smith & Eddy e Haddon, essas técnicas foram aprimoradas e a alimentação passou a ser feita em coelhos (linhagem Branca Nova Zelândia), como a mantida por Cole em Gainesville. Essa linhagem de piolhos *P. humanus* ficou conhecida como “Linhagem Orlando” e hoje encontra-se em vários outros laboratórios de universidades ou em empresas, como a Insect Control & Research Inc., Baltimore. Pesquisadores como Maunder, Valade, Boucharinc, Burgess e Mumcuoglu têm trabalhado com piolhos derivados dessa linhagem. **Vantagens:** Pode-se dispor a qualquer momento dos insetos de uma criação isogênica, necessitando-se portanto de poucos indivíduos por repetição;

pode-se criar muitos indivíduos e portanto realizar ensaios paralelos entre várias fórmulas ou concentrações. **Desvantagens:** Trata-se de uma linhagem com características ecológicas e fisiológicas já muito distantes daquelas do tipo selvagem; é sensível e delicada, podendo mesmo em algumas colônias regredir sua adaptação aos coelhos (de acordo com Cole, “*Colonies have been known to barely subsist under unfavorable conditions and gradually die out almost unnoticed*”); as avaliações serão sempre comparativas, obtendo-se um *efeito relativo* entre concentrações e/ou fórmulas.

**Observações:** Pode-se a qualquer momento iniciar-se uma criação com esses piolhos e embora a técnica de criação esteja bem definida em várias publicações, o sucesso e o tempo necessário são imprevisíveis. Os ensaios são realizados sempre *in vitro*.

Várias tentativas de se manter ou mesmo criar piolhos em laboratório para ensaios *in vitro* foram também feitas pela alimentação através de membranas, artificiais ou não. Os estudos mais clássicos foram com a utilização de peles como a de cadáver humano (Pshenichnov), camundongo (Buxton), pintinho (Fuller e colaboradores) ou do esquilo voador (Lauer & Sonenshine). Membranas de origem vegetal ou sintéticas foram também experimentadas, sempre com certo grau de sucesso.

### **3. Características dos Ensaios.**

Uma enorme gama de variáveis está associada a qualquer tipo de bioensaio, e para os piolhos, a literatura praticamente registra “novidades” a cada novo trabalho publicado. Se por um lado, no sentido de se homogeneizar os tratamentos alguns pesquisadores artificializam muito seus ensaios, por outro, na tentativa de uma maior aproximação das condições reais de utilização de produtos, outros pesquisadores acabam por conseguir resultados apenas relacionados a uma condição particular. Até mesmo o protocolo padrão americano (ASTM) e o francês (SSP) são abertamente criticados. Referindo-se a esses, Dr. I. Burgess salienta como desvantagens o fato de não levarem em conta variações do solvente (veículo), ação surfactante, características quanto à evaporação ou duração da exposição. Comenta ainda que baseado nas avaliações que tem feito sobre diferentes métodos, desde 1988, a única maneira eficiente de se testar formulações *in vitro* seria tentar imitar como o consumidor usaria

o produto. Conseqüentemente, cada formulação necessitaria seu próprio procedimento teste.