

Tesis de Posgrado

Estudio de las esterasas del T. Infestans y su rol en el metabolismo de insecticidas organofosforados

Casabe de Malkenson, Norma Beatriz

1982

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas 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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Casabe de Malkenson, Norma Beatriz. (1982). Estudio de las esterasas del T. Infestans y su rol en el metabolismo de insecticidas organofosforados. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1702_CasabedeMalkenson.pdf

Cita tipo Chicago:

Casabe de Malkenson, Norma Beatriz. "Estudio de las esterasas del T. Infestans y su rol en el metabolismo de insecticidas organofosforados". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1982.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1702_CasabedeMalkenson.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

ESTUDIO DE LAS ESTERASAS DEL T. INFESTANS Y SU ROL EN
EL METABOLISMO DE INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

NORMA BEATRIZ CASABE DE MALKENSON

68004

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
DOCTORA EN CIENCIAS QUIMICAS

1982

10

A MIS PADRES

A MI ESPOSO

A MI HIJA

Agradezco muy especialmente al Doctor EDUARDO NICOLAS ZERBA,
Director de esta Tesis, por haberme orientado hacia el camino
de la investigación entomotoxicológica, por sus muchas y con-
tinuas enseñanzas, por su guía y sus consejos durante la rea-
lización y escritura de este trabajo.

AGRADEZCO:

A los Dres. María Inés Picollo de Villar, Susana Arnstein de Licastro y Edgardo Wood, por lo mucho que me enseñaron y me enseñan, por la colaboración en algunos de los experimentos realizados y por el constante apoyo y la amistad que me brindan.

Al Sr. Fernando Melgar Suarez, por su colaboración en el trabajo diario y su amistad.

Al Sr. Daniel Bazán, quien colaboró en la escritura a máquina de este trabajo.

A los Dres. Roberto Pompei y Federico Lotz, por su labor como Consejeros de Estudios.

Al Dr. Carlos Lantos, por su ayuda desinteresada.

A la Sra. Susana F. de Segovia, quien cuida de nuestro insecuario, por la amistad que me brindara.

Al Dr. José A. Castro, por haber colaborado con las instalaciones de su laboratorio.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, que, a través de sus becas, permitió la realización de este trabajo.

A CITEFA, institución en la que desarrollo mis actividades.

A las siguientes Instituciones: CONICET, SUBCYT (a través de su Programa Nacional de Enfermedades Endémicas); Ministerio de Salud Pública; Gobierno de Japón (a través de su Agencia de Coopera-

ción Técnica); Organización Mundial de la Salud (a través de su UNPD/World Bank/WHO Programme for Research and Training in Tropical Diseases.

Al Grupo Computación de CITEFA , quien preparó el programa de regresión múltiple usado en este trabajo.

A mi esposo, el Licenciado Daniel Luis Malkenson, por la revisión del manuscrito, por su continuo apoyo y ayuda, y por respetar y compartir mi interés en las Ciencias Químicas.

Por último, agradezco a mi familia, a quien debo mucho de lo que soy.

INDICE

INTRODUCCIÓN

I - Esterasas : Generalidades	
Ia - Definición	1
Ib - Rol metabólico	1
Ic - Características generales	5
1 - Mecanismo de hidrólisis	5
2 - Distribución	5
3 - Sustratos	5
4 - pH y Temperatura óptimos	6
II - Clasificación y Nomenclatura	
IIa - Clasificación según el sustrato	6
IIb - Clasificación según su comportamiento frente a inhibidores	7
IIc - Clasificación según su comportamiento frente a cationes bivalentes	8
IIId - Resumen y equivalencias	9
III - Métodos de determinación	
IIIa - Métodos bioquímicos	10
1 - Método titrimétrico	10
2 - Métodos manométricos	11

3 - Método de Ellman	11
4 - Método de Gomori	11
5 - Método de los ésteres de p-nitrofenol	12
6 - Método de Talcott	12
IIIb - Métodos electroforéticos	13
IV - Rol en el metabolismo de Insecticidas	
IV a - Insecticidas degradables por esterasas	15
1) Insecticidas Organofosforados	15
2) Carbamatos	16
3) Piretroideos	16
IVb - Metabolismo detoxificante de Insecticidas por esterasas	17
1) Insecticidas Organofosforados	17
2) Carbamatos	19
3) Piretroideos	20
IVc - Sinergismo	21
IVd - Resistencia	24
V - La vinchuca y la Enfermedad de Chagas	27
VI - Propósitos de este trabajo	31

MATERIALES Y METODOS

I - Material Biológico, manipuleo y disecciones	
Material Biológico	32

Dissección y homogeneización	32
II - Fraccionamiento subcelular	33
III - Determinación de la Actividad esterásica	
IIIa - Método de Ellman	34
IIIb - Método del α NA	35
IIIc - Inhibición "in vitro"	36
Inhibidores utilizados	36
Ensayos de inhibición	37
IIId - Activación por cationes bivalentes	39
IIIe - Actividad enzimática "in vitro" frente a paratión y paraoxón	39
IIIf - Determinación de proteínas	41
IV - Electroforesis en gel de poliacrilamida	
IVa - Técnica electroforética	41
IVb - Técnicas de revelado usadas	44
IVc - Inhibición de la actividad esterásica en gel	45
IVd - Actividad fosfotriesterásica de bandas de esterases	45
V - Estudio de la intoxicación con paratión "in vivo"	
Va - Tratamiento	46
Vb - Medición de la actividad colinesterásica- Sintomatología	47

Vc - Medición de los productos de degradación	47
Vd - Medición de la activación a paraoxón	48
VI - Aislamiento electroforético de una banda de esterasas	
VIa - Técnica electroforética	49
VIb - Control electroforético	50
VII - Caracterización de la enzima aislada	
VIIa - Actividad frente a sustratos	51
VIIb - Determinación de K_m y $V_{máx}$	51
VIIc - Inhibición de la actividad enzimática	52
VIId - Activación por cationes bivalentes	54
VIIe - Actividad versus pH	55
VIIf - Actividad versus temperatura	55
VIIg - Estabilidad térmica	56
VIII - Actividad esterásica de la enzima aislada frente a ésteres fosforados	56
IX - Tratamiento estadístico	58

RESULTADOS Y DISCUSION

I - Actividad esterásica en <u>Triatoma infestans</u>	
Ia - Distribución subcelular	60
Ib - Clasificación	62
Ic - Electroforesis en gel de poliacrilamida	64

Id - Actividad durante el desarrollo post-embrionario	66
II - Rol de las esterasas de <u>T. infestans</u> en el metabolismo de Organofosforados	
IIa - Metabolismo y toxicidad del paratión "in vivo"	66
IIb - Metabolismo de paratión y paraoxón "in vitro"	73
IIc - Aporte de las distintas esterasas al metabolismo de O.P.	74
III - Aislamiento y caracterización de una arilesterasa	
IIIa - Aislamiento	78
IIIb - Actividad frente a sustratos	80
IIIc - Inhibición de la actividad enzimática	82
IIId - Activación por cationes bivalentes	85
IIIe - Efecto del pH y de la temperatura	87
IIIf - Actividad frente a ésteres fosforados	87
RESUMEN Y CONCLUSIONES	92
BIBLIOGRAFIA	99

ABREVIATURAS

AcChE : Acetilcolinesterasa
ATC : Acetiltiocolina
BuChE : Butirilcolinesteras
BTC : Butiriltiocolina
B-C : Buffer-cromógeno
BNPS : BNPS-Escatol
CHD : Ciclohexanodiona
ChE : Colinesterasa
DFP : Di-isopropil fluorfosfato
DTNB : 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico
DL₅₀ : Dosis letal 50
EPN : Etil p-nitrofenil fenilfosfonotionato
FD : Fluoruro de dansilo
INT: violeta de p-iodonitrotetrazolio
NTE : Esterasa neurotóxica
NTD : Neurotoxicidad demorada
NEM : N-etilmaleimida
α NA : Acetato de α-naftol
NAI : N-acetil imidazol
O.P. : Organofosforado
PPA : fenil fenil acetato
PCMB : p-cloromercuribenzoato
PTA : Acetato de tiofenol

PHMB : p-hidroximercuribenzoato

pAF : Bromuro de p-azidofenilacilo

TOCP : Tri o-cresil fosfato

TPE : Tiopropionato de etilo

TEPP : Tetraetil pirofosfato

TEMED : N,N,N',N'-tetrametilendiamina

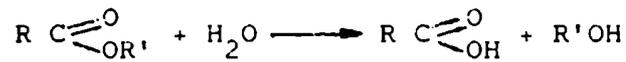
1,5 : 1,5 I AEDANS

INTRODUCCION

I - ESTERASAS: GENERALIDADES

Ia - Definición:

Las esterasas son enzimas que hidrolizan ésteres, con la adición de agua, para dar alcoholes o fenoles y ácidos (1):



Esta es una definición muy amplia, no muy precisa, e incluye muchos tipos de enzimas. En general son excluidas las enzimas que hidrolizan ésteres con cargas negativas cerca de la unión éster (como fosfatasas, sulfatasas, etc.) (2).

Las distinciones previas entre esterasas y otros tipos de enzimas hidrolíticas se han vuelto dudosas a la luz de recientes hallazgos, que indican que muchas de esas enzimas son básicamente similares. Así, ciertas enzimas proteolíticas (tripsina, quimiotripsina) fueron capaces de hidrolizar ésteres carboxílicos rápidamente, catalizando la hidrólisis por el mismo mecanismo general que las esterasas y siendo inhibidas por algunos de los más potentes inhibidores de esterasas (DFP, paraoxón). Del mismo modo, algunas esterasas tuvieron capacidad hidrolítica frente a amidoderivados (3).

Esta superposición en la especificidad de sustrato entre diferentes clases de enzimas hidrolíticas puede deberse en ciertos casos a un mecanismo inespecífico de ruptura de la unión éster, capaz de actuar sobre cualquier éster que pueda aproximarse al sitio activo.

Ib - Rol metabólico:

Las funciones metabólicas de la mayor parte de las esterasas no son conocidas. Se sabe de la existencia de muchas enzimas que exhiben actividad esterásica, pero existe poca información acerca de sus sustratos fisiológicos. Las especificidades de sustrato superpuestas y la

dificultad en su determinación analítica separada hacen difícil la formulación de puntos de vista acerca de la función biológica de estas enzimas. Actualmente hay evidencia al respecto en algunos pocos casos, y a menudo los experimentos decisivos han sido aquellos en los que se usaron compuestos organofosforados o carbamatos como inhibidores selectivos. Así, algunos investigadores afirman que, en insectos, las esterasas intervienen en la absorción/digestión de lípidos de la dieta (4)(5). Ciertas evidencias (6) sugieren fuertemente que estas enzimas jugarían un rol en la movilización de grasas. Whitmore y colaboradores (7) encontraron que algunas carboxi-esterasas intervienen en la regulación del título de hormona juvenil.

Otras evidencias son principalmente negativas; por ejemplo, la inhibición de arilesterasa de hígado (3) parece no producir ningún cambio grueso en el metabolismo.

Aunque la función fisiológica de estas enzimas no sea bien conocida, es obvio que ellas juegan un importante rol en el metabolismo de drogas (8). Un gran número de xenobióticos son ésteres o poseen grupos ésteres en sus cadenas laterales. Ello es particularmente cierto en el caso de los insecticidas (organofosforados, carbamatos, piretroides). Así, en los últimos años ha habido un interés recurrente en estas esterasas por parte de los toxicólogos de insectos.

Hay considerable evidencia de la participación de estas enzimas en el metabolismo de compuestos organofosforados y carbamatos. Mazur (9) informó la hidrólisis de DFP por esterasas de suero o plasma. Aldridge (10) estudió la hidrólisis del paratión por esterasas de suero de conejo; etc. En insectos, Metcalf y colaboradores (11) encuentran que las esterasas aromáticas son importantes en la

detoxificación de O.P. Kapin y Ahmad (4) encuentran arilesterasa en el sistema nervioso de polilla, capaz de hidrolizar los O.P. anticolinesterásicos que quieran alcanzar su blanco, la ChE de sistema nervioso.

Estas enzimas suelen estar asociadas con fenómenos de toxicidad selectiva, como en el caso del malati6n, favoreciendo la detoxificación en mamíferos sobre insectos (12) y en insectos resistentes sobre susceptibles (13).

También fueron investigadas esterasas que hidrolizan piretroides.

Rol de estas enzimas en la neurotoxicidad demorada (NTD):

Es sabido que algunos O.P., inhibidores de AcChE, producen un efecto más persistente conocido como neurotoxicidad demorada. La característica común de estos O.P. es que son ésteres de f6sforo que son inhibidores directos o indirectos de esterasas.

Aldridge (15) sugiri6 que el evento inicial sería la fosforilación de esterasas. En principio se pens6 que la AcChE jugaba alg6n rol, pero luego Earl y Thompson (16)(17) comprobaron que mientras la BuChE era selectivamente inhibida por TOCP, un conocido neurotóxico, AcChE no era afectada. Estos autores sugirieron a la BuChE como blanco primario en NTD. Esta hipótesis fue posteriormente descartada pues: a) varios ésteres no causantes de NTD inhiben BuChE; b) algunos compuestos que causan NTD no afectan la BuChE.

Teoría de la esterasa neurotóxica: en estudios "in vivo" e "in vitro", Johnson (18) encontró diferencias de inhibición de esterasas de cerebro de gallina, entre O.P. que dan NTD y aquellos que no la dan. Una pequeña proporción del total de actividad frente a PPA fue susceptible de inhibición por compuestos que dan NTD como el mipafox. Compuestos in-

capaces de producir NTD, como el paraoxón, no inhibían esa actividad enzimática.

El autor llamó a esa actividad "esterasa neurotóxica" (NTE) y propuso que ella representaba el sitio primario de acción de O.P. que producen neurotoxicidad demorada.

Sin embargo esta teoría no es aceptada universalmente pues:

- 1) La actividad esterásica se recupera completamente cuando aún el animal permanece paralizado.
- 2) Algunos carbamatos parecidos al PPA inhiben la NTE en pollo, pero no producen neurotoxicidad demorada.
- 3) La NTE no ha sido aislada ni son conocidas sus funciones fisiológicas ni bioquímicas.
- 4) La hipótesis no explica la selectividad de especies y la diferencia de susceptibilidad según la edad.

Aunque la participación de las estererasas en NTD no sea como blanco primario, ellas probablemente juegan un rol como proteínas, "no target" En efecto, los O.P. que causan neurotoxicidad demorada parecen tener fuerte afinidad por ciertas estererasas (como la NTE), que actuarían como depósito temporario de estos compuestos, protegiendo inicialmente al animal de sus efectos agudos. Más tarde estos ésteres, liberados lentamente por un proceso reversible, alcanzarían el blanco neurotóxico y se acumularían hasta alcanzar un umbral tal que ocurra NTD. El tiempo requerido para ese "binding", liberación y acumulación en el blanco explicaría el período de demora en la aparición de síntomas luego de una exposición a un compuesto responsable de neurotoxicidad demorada.(19).

Ic - Características generales

1 - Mecanismo de hidrólisis:

El mecanismo de hidrólisis catalizado por esterasas ha sido estudiado extensivamente en el caso de serina-esterasas, pero no es muy conocido en arilesterasas. En forma general: la esterasa (EH) reacciona con el éster (AB), con formación de un complejo de Michaelis (EHAB) para producir un derivado acilado (EA)(2):



Este derivado puede reaccionar con una variedad de aceptores de acilo; usualmente el aceptor es agua.



Si la EA se forma rápidamente pero no se disocia rápidamente en presencia de agua, el éster en cuestión puede inhibir la acción de la esterasa sobre otros sustratos.

2 - Distribución:

Las esterasas son encontradas en distintos tejidos, tanto en mamíferos como en insectos.

Holmes y Masters (20) estudiaron la distribución en mamíferos: ésta parecería ser específica de tejidos y variable según la especie.

Son amplios los estudios realizados en insectos. Kapin y Ahmad (4) estudiaron la presencia de esterasas en polilla y encontraron actividad en los once tejidos ensayados, con distribución variable. Similares conclusiones alcanzaron otros investigadores (11)(21).

3 - Sustratos:

Dijimos ya que los tejidos animales contienen mezclas complejas de esterasas con especificidades de sustrato superpuestas y con sustratos

fisiológicos aún no conocidos. Esto no indica la ausencia de un patrón de especificidad de sustrato distintivo para cada enzima. En general las esterases estudiadas en detalle exhiben máxima actividad frente a ésteres que contienen un grupo acilo particular. Son también conocidos casos de especificidad estereoquímica. Estudios realizados con distintos animales muestran que cada patrón es característico no sólo de la esterase en sí, sino de la especie de la cual deriva.

4 - pH y temperatura óptimos

Debemos recalcar nuevamente que es tal la variedad de enzimas del grupo de las así llamadas esterases, que las respuestas frente a variaciones en las condiciones fisicoquímicas, tales como modificación del pH y de la temperatura de incubación, son también variadas y no es posible hablar de valores óptimos comunes para todo el grupo.

El rango de pH óptimos informados para estas enzimas es muy amplio. Así, Mounter y colaboradores (22) encontraron una esterase de suero de conejo con su mayor actividad a un pH de 6,7; Kapin y Ahmad (4) informan un pH óptimo de 7,5-7,7 para una esterase de intestino de polilla, y una esterase de plasma de conejo actúa a un pH óptimo de 10,6 (23).

En cuanto a valores óptimos de temperatura, también el rango es amplio, desde enzimas con una temperatura óptima de 30°C (24), hasta aquellas que muestran alta actividad por encima de los 50°C (4).

II - CLASIFICACION Y NOMENCLATURA

II a - Clasificación según el sustrato:

Parte de la razón de la carencia de progresos apreciables en defi-

nir el status de las esterazas puede ser atribuída a la baja especificidad y diversidad de sustratos hidrolizados por estas enzimas, y la consecuente dificultad para precisar una clasificación (necesaria para ordenar los conocimientos).

Un intento de clasificación según el tipo de sustrato hidrolizado es el de Gomori (25). Según este autor, las esterazas pueden dividirse en dos grandes grupos: Aliesterazas y colinesterazas.

Las primeras hidrolizan ésteres de alcoholes libres de nitrógeno. Dentro de éstas, las lipasas hidrolizan grasas y aceites, y las esterazas propiamente dichas actúan sobre ésteres simples.

Las colinesterazas hidrolizan preferentemente ésteres de colina; acetilcolina las colinesterazas verdaderas, y butirilcolina las llamadas pseudocolinesterazas.

Es importante recalcar que las diferencias bioquímicas entre los distintos tipos de esterazas son relativas y no absolutas, y que hay muchos ejemplos de superposición entre tipos enzimáticos.

IIb - Clasificación según su comportamiento frente a inhibidores:

1 - Sobre la base de su comportamiento frente a inhibidores O.P., Aldridge (10)(26) distingue dos tipos de enzimas con actividad esterásica:

B-esterazas: Inhibidas por O.P. en una reacción progresiva y dependiente de la temperatura.

A-esterazas: Hidrolizan rápidamente los inhibidores que acilan las B-esterazas.

Hay un tercer grupo de enzimas, que han sido llamadas posteriormente C-esterazas, que no interaccionan con O.P., ni siendo inhibidas ni hidrolizándolos. Es obvio que este grupo abarca una heterogénea colección de enzimas.

Según este sistema de nomenclatura, tanto la ChE de suero como la AcChE de tejido están claramente incluidas dentro de las B-esterasas. 2 - Holmes y Masters (20) clasifican a las esterazas en cuatro grupos, según sus reacciones características con una variedad de inhibidores y sustratos:

Arilesterasas (E.C. 3.1.1.2.) que hidrolizan preferentemente ésteres aromáticos y no son inhibidas por O.P. ni por eserina, pero sí por reactivos de grupos -SH como el PCMB.

Carboxiesterasas (E.C. 3.1.1.1) hidrolizan preferentemente ésteres alifáticos y no son inhibidas por eserina pero sí lo son por O.P.

Colinesterasas (E.C. 3.1.1.7; 3.1.1.8) actúan sobre ésteres de colina a mayor velocidad que sobre ésteres alifáticos y aromáticos; y son inhibidas por O.P. y eserina.

Acetilesterasas (E.C. 3.1.1.6) hidrolizan ésteres aromáticos, pero no son inhibidas por O.P., eserina o reactivos de grupos -SH.

Aunque a la luz de nuevas investigaciones aparecerían otras subdivisiones, la clasificación de Holmes y Masters es hasta el momento la más completa y adecuada.

IIc - Clasificación según su comportamiento frente a cationes bivalentes

Es posible clasificar las esterazas en dos grupos:

I - Activadas por Ca^{++}

II - Activadas por Co^{++} - Mn^{++}

Las enzimas del primer grupo son encontradas en varios tejidos de mamíferos, principalmente hígado y suero, pero hasta ahora no habían sido identificadas enzimas de este tipo en tejidos de insectos (27)(28). Los peces son muy deficientes en este tipo de enzimas. Parecen ser muy espe

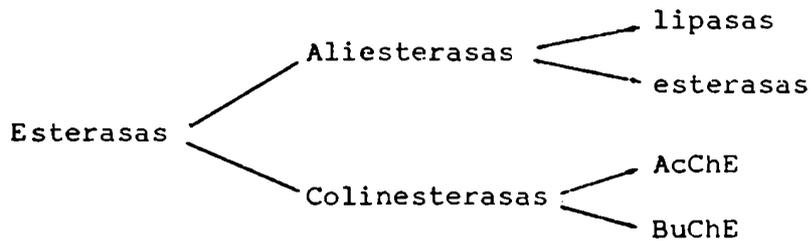
cíficas de fosfatos y muestran poco o nada de actividad frente a tiofosfatos (29).

Las correspondientes al segundo grupo parecen estar presentes en mamíferos (30), insectos (31) y peces (32). En todos los casos pueden tener alta actividad, tanto frente a fosfatos como a tiofosfatos.

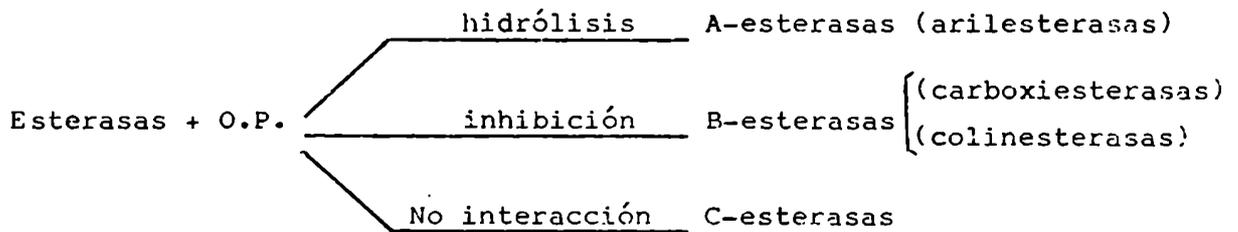
La activación por cationes divalentes involucraría la formación de quelato entre el ión en cuestión y grupos de la molécula de proteína.

IIId - Resumer y equivalencias:

Clasificación según Gomori



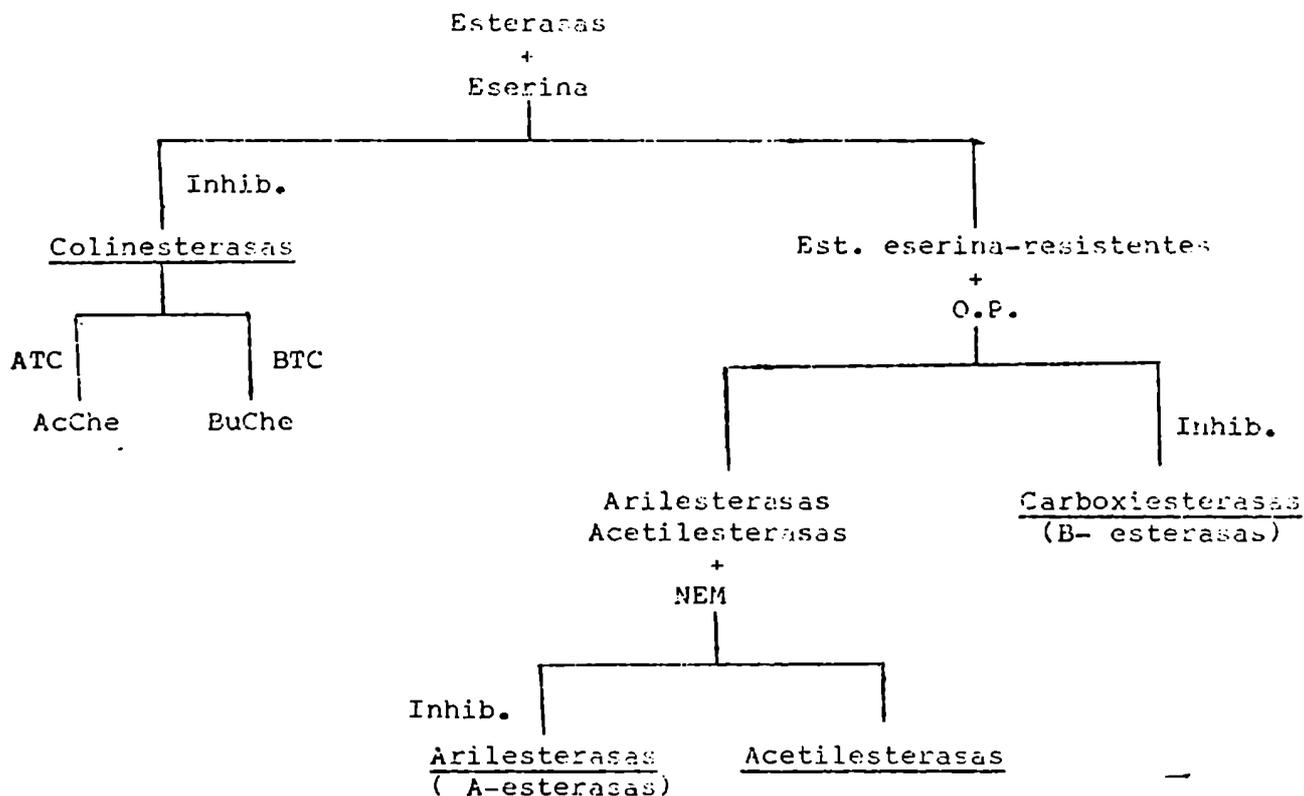
Clasificación según Aldridge



Entre paréntesis figura el nombre equivalente de acuerdo con la clasificación de Holmes y Masters.

Clasificación según Holmes y Masters

Entre paréntesis figura el nombre equivalente de acuerdo con la clasificación de Aldridge.



III - MÉTODOS DE DETERMINACION

IIIa - Métodos bioquímicos

1 - Método titrimétrico:

Se basa en la titulación con álcali del ácido liberado por la hidrólisis enzimática. (33)

El álcali puede agregarse continuamente para mantener el medio de incubación en el pH inicial, o ser agregado luego de un tiempo fijo, para restablecer el pH inicial.

Dada su índole cinética, este método permite apreciar el curso de la reacción enzimática. Ofrece las ventajas de precisión, exactitud

y versatilidad, pero su aplicación es menos sencilla y es de menor sensibilidad que algunos de los métodos espectrofotométricos.

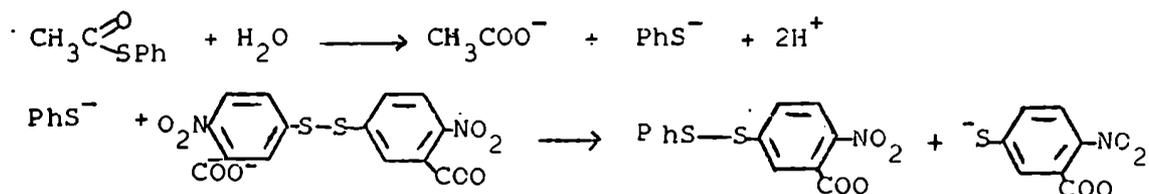
2 - Métodos manométricos

La formación de ácido por esterasas puede también ser seguida por determinación manométrica del CO₂ liberado en una solución de CO₃HNa (34).

Este método, actualmente poco usado, no puede emplearse para estudios de efectos del pH, ni de activación por sales.

3 - Método de Ellman (35)

Para el caso de esterasas, utiliza como sustrato el acetato de tiofenol (PTA). El tiofenol producido por la hidrólisis enzimática reacciona con el 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoato de sodio (DTNB) para dar el anión 5-tio 2-nitrobenzoato (amarillo, $\lambda = 412$ nm):

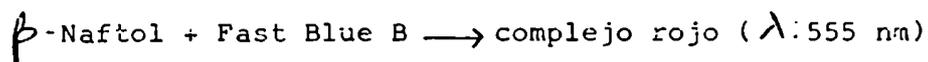
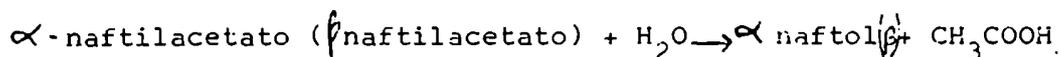


Es un método cinético que mide producto de la reacción y no sustrato remanente, lo que lo convierte en más sensible. Es simple, preciso, versátil, y requiere cortos períodos de incubación. Sus principales inconvenientes son: la necesidad de usar tiosustratos; no permite distinguir entre arilesterasas y acetilesterasas por la imposibilidad de usar inhibidores de -SH que afectarían el reactivo; por la autohidrólisis del sustrato, es adecuado sólo en un rango limitado de pH (6,5-8,5)

4 - Método de Gomori (36)

La actividad esterásica puede también ser determinada espectro-

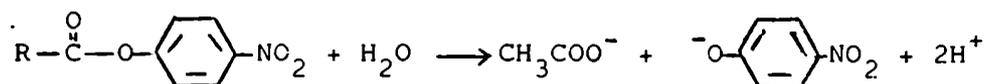
fotométricamente por el α o β naftol generado por la hidrólisis de ésteres de naftilo, a través de una reacción de copulación con un diazocompuesto:



Van Asperen (37) informó que el α -naftilacetato es un excelente sustrato. La técnica, pese a no ser cinética, es muy sensible para estas rasas, especialmente adecuada para el estudio en insectos.

5 - Método de los ésteres de p-nitrofenol (38)

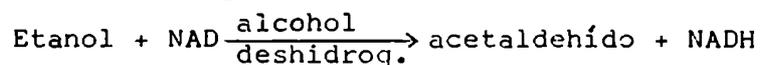
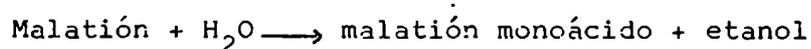
Está basado en la medición cinética espectrofotométrica del p-nitrofenóxido (amarillo, 400nm) formado por la hidrólisis enzimática de los ésteres de p-nitrofenol:



Los ésteres más usados son el acetato y el butirato. Debe tenerse en cuenta que a pH alcalinos estos ésteres suelen ser inestables.

6 - Método de Talcott (39)

Específico para carboxiesterasas, usa como sustrato el malatión. La hidrólisis enzimática de este compuesto es acoplada a la reducción del INT con alcohol deshidrogenasa y NADH diaforasa:



Puede registrarse espectrofotométricamente a 500 nm la absorbancia debida a la reducción del INT. Es una técnica cinética muy específica

y sensible.

III b - Métodos electroforéticos

Las técnicas electroforéticas en gel son de gran utilidad para el estudio enzimático, tanto a los fines analíticos como preparativos. Son métodos razonablemente rápidos que pueden llevarse a cabo con microcantidades de material (muy importante cuando se trabaja con insectos). Las interacciones de proteínas con el material del gel son raras de modo que pueden usarse para separar con éxito distintos tipos de proteínas.

Cuando se trabaja con enzimas se debe tener en cuenta que, una vez resuelta la mezcla enzimática por electroforesis, corresponde una localización de los componentes, y ésto implica preservar la estabilidad enzimática durante la corrida electroforética y durante la localización (es decir, evitar las condiciones que puedan llevar a la inactivación de enzimas).

La actividad enzimática debe además ser localizada prontamente para evitar la difusión de los componentes separados. A tal fin, las técnicas histoquímicas pueden ser efectivamente adaptadas a la tinción en geles. En el caso particular de las esterasas, un sustrato adecuado debe cumplir ciertos requisitos: ser suficientemente soluble en agua, medio en el que trabajan estas enzimas; ser hidrolizable por enzimas; uno de sus productos debe ser un precipitado.

Algunas de las técnicas principalmente indicadas para el revelado de esterasas en gel son:

a) Técnica de los ésteres de naftilo (25):

Usa como sustrato el α o β -naftilacetato. El naftol liberado

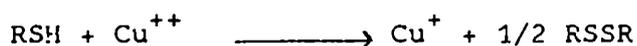
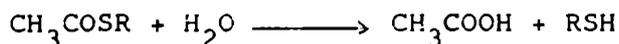
es revelado por la copulación con azocompuestos.

Este método en distintas adaptaciones es el más usado para esterasas.

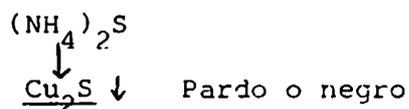
b) Técnica de Booth y Metcalf (40):

Usa como revelante la solución de Gomori. Desarrollada principalmente para determinar colinesterasas, si se usa PTA en lugar de acetiltiocolina o butiriltiocolina como sustratos puede ser adaptada a la determinación de esterasas.

Las interpretaciones más recientes (41) indican una reacción en tres etapas: 1) reducción del Cu^{II} por el tiofenol; 2) formación de un complejo Cu^{I} -tiofenol; 3) precipitación del Cu^{I} por $(\text{NH}_4)_2\text{S}$:

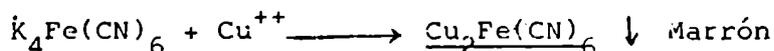
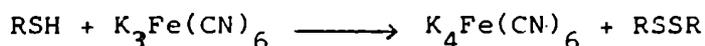


+



c) Técnica de Karnovsky y Roots (42):

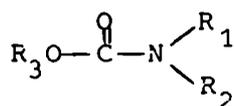
También en este caso se usa PTA como sustrato. La base del método es la reducción por el tiofenol del ferricianuro a ferrocianuro. Este último se combina con los iones Cu^{++} para formar ferrocianuro cúprico insoluble. Como en el método anterior, los iones Cu^{++} en el medio están complejados con citrato, para prevenir la formación de ferricianuro de cobre:



2) Carbamatos

Los carbamatos fueron los últimos en llegar al campo de los insecticidas anticolinesterásicos. Conocida la actividad anticolinesterásica de la fisostigmina (eserina), el principal alcaloide del calabar, se iniciaron trabajos en el desarrollo de análogos sintéticos como la prostigmina. Aunque estos compuestos resultaron inhibidores efectivos de colinesterasa de insectos, no fueron buenos insecticidas dado que por ser ionizados no podían penetrar la barrera nerviosa. Los insecticidas carbámicos modernos han sido modificados eliminando los grupos polares, buscando una mayor solubilidad en lípidos, de modo que puedan penetrar la cutícula del insecto y la vaina nerviosa.

La estructura general de los carbamatos es:



donde: R_1, R_2 : H, metil, etil, propil u otros alquilos de cadena corta.

R_3 : fenol, naftaleno u otros hidrocarburos cíclicos.

3) Piretroideos

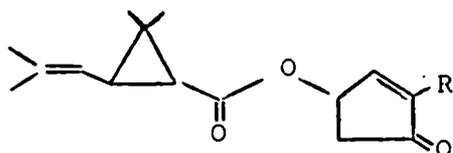
El piretro natural es un extracto de las flores de plantas correspondientes a la familia Compositae y al género *Chrysanthemum*. Sus componentes activos son las piretrinas, las cinerinas y las jazmolinas. Sus ventajas radican en su disponibilidad natural, su eficiencia insecticida y su baja toxicidad en mamíferos. Sus desventajas son principalmente su fotolabilidad y en menor grado su biodegradabilidad. Su acción principal es sobre el sistema nervioso central del insecto, produciendo rápida parálisis.

El primer análogo sintético fue la alletrina, desarrollada en 1949 por Schechter y colaboradores. A la comercialización de la alletrina siguió el desarrollo de pocos piretroideos nuevos, hasta los progresos obtenidos unos quince años después debido a desarrollos de la Sumitomo en Japón y de Elliot y colaboradores en Inglaterra.

Los nuevos piretroideos sirvieron como sustitutos del piretro.

Al presente muchos laboratorios en distintos países examinan cada año miles de piretroideos potenciales, en la búsqueda de compuestos más fotoestables que las piretrinas naturales con propiedades tóxicas al menos similares y de costo razonable.

La estructura es muy variada : en general la mitad ácida es derivada del ácido crisantémico y la mitad alcohol variable:



IVb - Metabolismo detoxificante de insecticidas por esterases

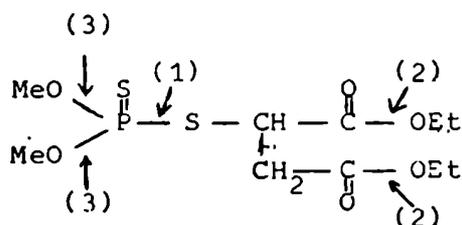
1) Insecticidas organofosforados

La detoxificación metabólica de O.P. es debida principalmente a la ruptura de la unión éster fosfórico, lo cual resulta en la formación de una carga negativa en la molécula. Esa carga negativa inactiva al O.P. como agente fosforilante o anticolinesterásico.

Este mecanismo es generalmente aceptado como de detoxificación porque los productos resultantes son no sólo mucho menos activos como agentes anticolinesterásicos, sino también mucho más solubles en

reacción sería mediada por hidrolasas (posiblemente A-esterasas) y no por glutatión - transferasas u oxidasas de función mixta.

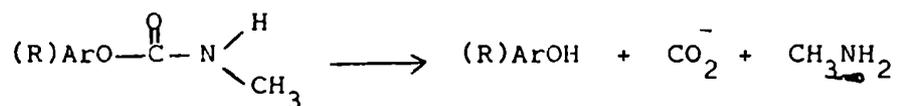
En la molécula de malatión pueden resumirse los tres tipos de ataques hidrolíticos por esterasas en compuestos organofosforados:



- (1) A- esterasas
- (2) B- esterasas
- (3) &A- esterasas ?

2) Carbamatos

Dado que los carbamatos son ésteres, están expuestos también a la ruptura por esterasas (A y B- esterasas), dando productos idénticos a aquellos formados via hidrólisis química, como fenol, oxima o enol y ácidos metil o dimetilcarbámicos (46). Estos últimos son de corta vida biológica y se descomponen en CO₂ y metil o dimetilamina:



Los metabolitos oxidativos que aún poseen una unión éster carbámico intacta también están sujetos a la hidrólisis por esterasas.

Las diferencias en la velocidad de hidrólisis enzimática dependen de la estructura del carbamato y de la especie. Usualmente la unión éster carbámico es relativamente estable en plantas e insectos

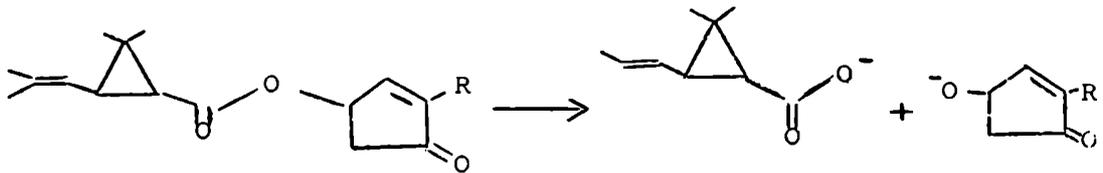
mientras que los mamíferos son más capaces de hidrolizarla. Estas diferencias son en parte responsables de la toxicidad selectiva de los carbamatos.

Por el momento poco se sabe acerca de la bioquímica del proceso de hidrólisis por esterasas, tanto en mamíferos como en insectos. En artrópodos parecería ser que la hidrólisis enzimática es el mecanismo predominante de detoxificación y las diferencias de susceptibilidad a carbamatos se deberían a diferencias en el título de carbamato-esterasas.

También los fenómenos de resistencia a carbamatos estarían asociados a diferencias en el balance esterásico entre cepas resistentes y susceptibles.

3) Piretroideos

También los piretroideos son detoxificados por procesos hidrolíticos:



La principal actividad esterásica frente a piretroideos es localizada, en mamíferos, en microsomas de hígado, probablemente debida a carboxiesterasas microsomales (47). Estas carboxiesterasas son altamente estereoespecíficas, hidrolizando los isómeros trans unas 50 veces más rápido que los isómeros cis.

La fracción soluble de hígado exhibe una actividad que es aproxi-

madamente la quinta parte de la actividad microsomal, y menor estereoespecificidad.

Aunque considerablemente menos activas que las de hígado de mamíferos, también se encontraron enzimas que hidrolizan piretroides en insectos. Estas esterasas hidrolizan generalmente los isómeros trans a mayor velocidad que los cis.

La hidrólisis de piretroides es inhibida por inhibidores de esterasas como los O.P., "in vitro" e "in vivo". La toxicidad aguda de algunos piretroides es aumentada por pretratamiento de los animales con esos inhibidores.

IV c - Sinergismo

Es el efecto exhibido por combinación de dos o más compuestos químicos, por el cual la toxicidad o acción biológica es mucho mayor que la esperada por la simple suma de los efectos causados por los componentes individuales.

Los ejemplos de sinergismo resultante de la inhibición de esterasas están principalmente limitados a casos que involucran al malatión.

Desde que Frawley y colaboradores (48) encontraron que el EPN (etil p-nitrofenilfosfonotionato) potenciaba marcadamente la toxicidad del malatión en mamíferos, han sido examinadas muchas combinaciones de insecticidas. Si los efectos de dos compuestos son simplemente aditivos, al administrar la mitad de la DL₅₀ (dosis letal 50) de cada compuesto, debe esperarse 50% de mortalidad. Si ésta resulta mucho menor que 50%, los efectos son antagónicos; por

otro lado, las combinaciones sinérgicas darán una mortalidad mucho mayor que el 50%.

El efecto del EPN en el metabolismo del malatión en mamíferos ha sido bien estudiado. Es sabido que el EPN inhibe fuertemente la detoxificación enzimática por hidrólisis del carboxiéster del malatión, "in vivo". Como el malatión debe su baja toxicidad a la degradación por carboxiesterasas, la inhibición de estas enzimas resulta en un aumento de toxicidad. El EPN es activado "in vivo" a su oxón, el cual es un buen inhibidor de carboxiesterasas, más que de colinesterasas.

Murphy y colaboradores (49) ensayaron el potente inhibidor de esterasas TOCP (tri-*o*-tolil fosfato), encontrando en él actividad sinérgica frente al malatión. El TOCP y análogos resultan ser pobres inhibidores de esterasas "in vitro" pero "in vivo" son activados e inhiben fuertemente las carboxiesterasas.

La toxicidad en mamíferos de otro O.P. con un grupo carboxiéster en su molécula, el acetión, es también potenciada por EPN y TOCP probablemente debido al mismo mecanismo que opera en el caso del malatión.

Aunque el mevinfós contiene un grupo carboxiéster en su molécula, no es potenciado por el EPN, ya que su principal mecanismo de detoxificación no depende de carboxiesterasas.

Un caso interesante es el del ticnomevinfós, cuyo isómero *cis* es sinergizado por EPN y TOCP, pero no el isómero *trans*.

Como en insectos susceptibles la hidrólisis por carboxiesterasas no es tan importante para la biodetoxificación del malatión, los si-

nergistas del malatión en mamíferos suelen ser inefectivos en insectos. Sin embargo en cepas de moscas y mosquitos resistentes a malatión por alto nivel de carboxiesterasas fueron encontrados algunos O.P. sinergistas del malatión (50) como el EPN y el TOCF.

El sinergismo en O.P. no está restringido a combinaciones que involucren malatión o compuestos con un grupo carboxiéster como uno de los componentes. Ejemplos de otras combinaciones sinérgicas son: ronnel con EPN, paratión, azinfosmetil o demetón; DEF y EPN con dicrotofós o dimetoato(43).

Por otra parte, en tejidos animales hay una variedad de B-esterasas capaces de unir O.P. por "binding". Esas enzimas compiten con la colinesterasa en su reacción con O.P. anticolinesterásicos. Estas reacciones no son críticas para la vida del organismo, y, por lo tanto, esas enzimas juegan un rol como mecanismo de defensa. Si un componente de una combinación de O.P. reacciona más rápidamente con estas proteínas que el otro, entonces este último queda disponible para el ataque a la enzima blanco, acetilcolinesterasa.

Como ya hemos visto, también los carbamatos y piretroides son detoxificados por la acción de esterasas hidrolíticas, y pueden entonces ser sinergizados por inhibidores de estas enzimas. Aunque los estudios en este campo son más recientes, hay informaciones de acción sinérgica de O.P. sobre carbamatos (46) y sobre piretroides (51) (14).

IV d - Resistencia

La resistencia ha sido definida como " la habilidad desarrollada por una cepa de insectos, de tolerar dosis de tóxicos que resultan letales para la mayoría de los individuos de una población normal de la misma especie " (Anónimo, 1957).

Debe enfatizarse que la resistencia es una propiedad de la población y no el resultado de alteraciones individuales. Poblaciones normales de insectos exhiben polimorfismo respecto del grado de susceptibilidad; sólo cuando la mayoría de la población es inicialmente susceptible y por selección con un insecticida desaparece, se aplica el término resistencia. Este concepto de resistencia como " fenómeno preadaptativo" está basado en numerosos estudios en los cuales invariablemente se encuentra que la resistencia depende enteramente de la selección y no puede ser desarrollada con dosis subletales de insecticidas.(52).

Teóricamente, la alteración de cualquiera de los procesos que condicionan la penetración, distribución o interacción con el blanco, de un insecticida, puede contribuir al desarrollo de resistencia.

Las principales causas de resistencia suelen ser:

Sitio de acción alterado;

penetración reducida;

detoxificación aumentada.

Dentro de esta última, nos interesa analizar el posible rol de las esterasas en el fenómeno de resistencia. Aunque como vimos, distintos grupos de insecticidas son ésteres, la resistencia debida a esterásas resultó ser de importancia sólo con insecticidas organo-

fosforados.

Numerosos trabajos describen el rol de las carboxiesterasas en la resistencia de insectos al malatión. Así, Matsumura y colaboradores demostraron una diferencia en la actividad de estas enzimas entre cepas resistentes y susceptibles de mosquito (53) y mosca (54). Las carboxiesterasas de las cepas resistentes resultaron tener la misma afinidad frente al malatión que las correspondientes de las cepas susceptibles, indicando que en estos casos la diferencia era cuantitativa y no cualitativa. Townsend y Busvine (55) informaron que las carboxiesterasas estaban involucradas en la resistencia al malatión en mosca verde. Las actividades hidrolíticas frente al malatión y frente a propionato de metilo se localizaron en la misma fracción subcelular (microsomas), mostrando la cepa resistente mayor actividad frente al primer sustrato pero menor actividad frente al metilpropionato que la cepa susceptible.

En resumen, ha sido bien establecido el papel de las carboxiesterasas en la resistencia al malatión, aunque es interesante notar que las propiedades de las carboxiesterasas en las cepas resistentes de insectos varían ampliamente según la especie.

También ha sido propuesta la participación de "fosfotriesterasas" en la resistencia de insectos a compuestos organofosforados. Matsumura y Hogendijk (56) compararon la actividad esterásica en cepas resistentes y susceptibles de moscas, y encontraron en la enzima de la cepa resistente mayor actividad frente a paratión que en la correspondiente a la cepa susceptible. Welling y colaboradores (57) investigaron la degradación de paraoxón "in vitro" en cepas de moscas, e infor

maron que las moscas resistentes presentaban mayor actividad de una esterasa microsomal que las susceptibles, atribuyendo a esa diferencia el mecanismo de resistencia. Parece cierto entonces que la degradación por fosfotriesterasas puede ser un mecanismo de resistencia, aunque la importancia de su contribución no está aún bien demostrada.

Cabe señalar que se han encontrado dos tipos de correlaciones entre resistencia a O.P. y actividad de esterasas no específicas:

- 1) resistencia asociada con baja actividad esterásica;
- 2) resistencia asociada con alta actividad esterásica.

El primer fenómeno, de correlación negativa, se resume en la famosa hipótesis de la " aliesterasa mutada" (58). Esta hipótesis propone que la mutación de un gen (que codifica la alta actividad aliesterásica en cepas salvajes de moscas) da lugar en cepas resistentes a una fosfotriesterasa, responsable de la mayor capacidad de toxicante de O.P. de estas cepas. Un ejemplo de correlación negativa sería el ya citado de Townsend y colaboradores (55).

Muchos son los informes de correlación directa entre alta actividad esterásica y resistencia a C.P. Fenómenos de este tipo fueron descritos en mosquito(resistencia al diazinón y al fentión), saltamontes, etc (59).

V - LA VINCHUCA Y LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas es una parasitosis causada por la presencia en el organismo humano de un protozooario flagelado, el "Tripanosoma cruzi", también conocido vulgarmente como "Tripanosoma americano". Este parásito se desarrolla en un insecto hematófago, el cual puede transmitir dicho parásito al hombre y a ciertos animales domésticos y salvajes, los cuales constituyen verdaderos reservorios de esta enfermedad permitiendo la continuidad del ciclo de transmisión.

La enfermedad de Chagas es transmitida por un insecto de la familia Redúvidos, que según la región geográfica puede tratarse de: Triatoma infestans en Argentina, Paraguay, Bolivia, sur de Brasil y de Perú, oeste de Chile; Triatoma dimidiata en el norte de Perú, Ecuador, Colombia y América Central; Pastronçilus megistus en el centro de Brasil; Rhodnius prolixus en Venezuela y Colombia ; y otros triatomas de distribución más limitada.

Estos insectos son conocidos vulgarmente con distintos nombres según el país o región. Así en Argentina se los denomina "chinche gaucha" o "vinchuca"; en Brasil "barbeiro"; en Venezuela "chupos"; en los países andinos "chirimayas", etc.

Los triatominos transmisores del parásito son insectos con hábitos domiciliarios, es decir que se encuentran con preferencia en el interior de las viviendas. Existen también numerosos insectos de la misma familia pero de hábitos silvestres, que tienen importancia

en la transmisión de la enfermedad de Chagas entre los mamíferos salvajes. También existen los llamados "triatomas peridomiciliares", que anidan especialmente en gallineros, corrales, conejeras, galpones, etc. y atacan de preferencia a los animales domésticos, y ocasionalmente al hombre.

El Triatoma adulto mide entre dos y medio y tres centímetros de largo, siendo el macho algo menor que la hembra. Como en todos los insectos, el cuerpo de la vinchuca está compuesto de tres regiones: cabeza, tórax y abdomen. En la cabeza se encuentran los órganos sensoriales, en el tórax están asentados los órganos locomotores y en el abdomen el aparato reproductor y las aberturas respiratorias (espiráculos). La cabeza es alargada, y posee un par de ojos compuestos y un par de ojos menores (los ocelos), además de un par de antenas, órganos receptores de sensaciones. Normalmente plegada sobre la parte inferior se encuentra una especie de pico recto denominado rostro.

Estos insectos se reproducen por huevo; la hembra pone hasta 200 de forma elíptica, y de color blanco cuando están recién puestos. Luego este color va cambiando a rosado al adelantar el desarrollo del embrión, cuya evolución se completa entre 15 y 50 días según la temperatura. Los huevos son depositados en la tierra, en las grietas de las paredes y en otros lugares más o menos ocultos.

Al nacer, el insecto tiene unos tres milímetros de largo y es parecido al adulto, pero carece de alas. Unas semanas después la ninfa muda de piel y aumenta de tamaño pero sigue careciendo de alas. Estas mudas se repiten en número de cinco; cada una de ellas

da origen a una ninfa cada vez mayor. Con la última muda aparecen las alas y el insecto adquiere su aspecto definitivo. Todo este proceso dura alrededor de siete meses en condiciones óptimas; la vida de un insecto adulto es de unos quince meses.

Los Triatomas originalmente no están infectados con el Tripanosoma cruzi ; se infectan cuando chupan sangre de una persona o de un animal ya infectados. Junto con la sangre ingieren los tripanosomas, que luego se multiplican en el aparato digestivo del insecto y salen en las deyecciones, que se constituyen por lo tanto en el vehículo de la infección.

Cuando un Triatoma infectado pica a una persona sana, inicia el mecanismo de contagio de la siguiente forma: al llenarse de sangre, defeca, dejando sobre la piel junto con la deyección una gran cantidad de tripanosomas. Si la persona se rasca, se producen microescoriaciones por las que entran los tripanosomas generando la infección.

Las investigaciones epidemiológicas más recientes demuestran que esta enfermedad se encuentra ampliamente extendida en casi todos los países de América del Sur, y también existen casos en América Central y Méjico. Desde el paralelo 42 en el Hemisferio Norte hasta el 43 en el Sur se encuentran triatomas silvestres y domésticos, variando su mayor o menor presencia de acuerdo a las condiciones geográficas y ecológicas de cada país.

Se pensaba que el insecto vector de esta enfermedad sólo existía en zonas rurales, alejado de las grandes ciudades. Sin embargo poco a poco fue invadiendo los barrios pobres de las ciudades, debi-

do especialmente a los movimientos migratorios de campesinos que se trasladan a las grandes urbes con todos sus enseres, conteniendo éstos muchas veces huevos, ninfas o adultos del insecto vector. Actualmente la Enfermedad de Chagas puede presentarse tanto en áreas rurales como urbanas, lo cual constituye un problema sanitario de gran importancia.

Como toda enfermedad transmisible, la prevención es el pilar fundamental en la lucha para controlar o erradicar esta enfermedad del continente americano. La prevención se centraliza en tres aspectos principales:

- a) Destrucción del insecto vector. ?
- b) Mejoramiento de la vivienda! —
- c) Educación sanitaria de las poblaciones!

La destrucción o eliminación del insecto vector es esencial en un programa de control o erradicación de la enfermedad. Los métodos de control actualmente en vigencia no han demostrado suficiente efectividad, y se impone la búsqueda de pautas racionales para la selección y diseño de insecticidas más eficaces.

VI - PROPOSITOS DE ESTE TRABAJO.

El objetivo general de este trabajo es el estudio del sistema esterásico presente en el Triatoma infestans (vinchuca), su caracterización con respecto a: distribución subcelular, inhibición por distintos inhibidores, activación por cationes bivalentes, movilidad electroforética; y especialmente el comportamiento de su actividad hidrolítica frente a ésteres fosforados.

Los estudios sobre el metabolismo degradante de este insecto son escasos o nulos. Este trabajo pretende por lo tanto, ser un aporte inicial al conocimiento de este proceso crítico en la intoxicación del insecto, y de su interacción con compuestos organofósforados, como contribución a la posibilidad del diseño racional de nuevos insecticidas para el control del vector del Mal de Chagas, única forma viable en la actualidad de reducir la incidencia de la enfermedad.

MATERIALES Y METODOS

1

teflón. Los homogenatos así obtenidos fueron filtrados por lana de vidrio con el fin de retener los restos quitinosos.

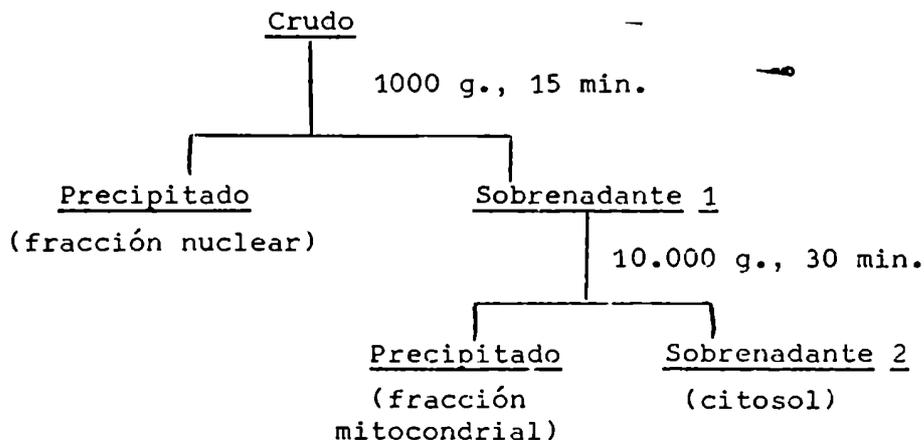
Todas las operaciones descritas se realizaron enfriando en baño de hielo.

II - FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

Se realizó por centrifugación diferencial, a partir de homogenatos de tórax y abdomen (10 tórax/ml.; 5 abdómenes/ml.).

Una vez obtenida la fracción cruda, se midió el volumen y se guardó una alícuota. El resto fue centrifugado a 1000 g. durante 15 minutos en centrífuga refrigerada Tomy Seiko modelo RS-18 III. Se separaron el precipitado de 1000 g. y el sobrenadante de 1000 g. De este sobrenadante, se midió el volumen, se guardó una alícuota, y el resto se centrifugó a 10.000 g. durante 30 minutos, obteniéndose un precipitado de 10.000 g. y un sobrenadante de 10.000 g., cuyo volumen se midió. Los precipitados de 1000 g. y 10.000 g. se resuspendieron en volúmenes conocidos de ClNa 0,5 M.

El procedimiento se resume en el siguiente esquema:



En las cinco fracciones obtenidas por centrifugación diferencial se determinó la actividad de esterasas eserina-resistentes por el método de Ellman luego descrito, usando acetato de tiofenol (PTA) como sutrato.

Se determinó también el porcentaje de actividad luego de la inhibición con paraoxón 10^{-5} M.

III - DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ESTERASICA

IIIa - Método de Ellman (35)

Los reactivos utilizados fueron: DTNB o reactivo de Ellman (Aldrich); Tiopropionato de etilo (Aldrich); PTA (sintetizado en el laboratorio según técnica de Booth y Metcalf (40)).

Se preparó una solución de buffer-cromógeno: 10 mg de DTNB en 100 ml de buffer fosfatos 0,2 M pH 7,2. Esta solución se conserva varios meses en frasco color caramelo a 4°C. Las soluciones de PTA y TPE se prepararon en etanol absoluto.

En un ensayo típico se colocaron en celda de cuarzo de 0,5 cm de paso óptico, 0,95 ml de solución buffer-cromógeno y 0,05 ml de preparado enzimático. La reacción se inició con el agregado de 0,1 ml de solución de sustrato 20 mM, midiéndose la variación de la absorbancia a 412 nm durante 5 minutos en un espectrofotómetro UV-visible Varian 634. En la celda de referencia se colocaron buffer-cromógeno y sustrato para descontar de esa manera la autohidrólisis del mismo.

En los casos en que fuera necesario, se hicieron las correcciones debidas a liberación de color no específico por componentes de preparado enzimático, incubando el tejido en B-C, sin sustrato.

El producto de la reacción es el anión 5-tio-2-nitro benzoato, al-

tamente coloreado. (ϵ_M : 13.600 a 412 nm)

La actividad enzimática se calculó de la siguiente forma:

$$\text{Unidades enzimáticas (U.E.)} = \frac{\mu \text{ moles de sustrato hidrolizado}}{\text{Minuto}} = \frac{\Delta \text{ Absorbancia/minuto} \times 1,1}{13,6 \times 0,5}$$

$$\text{Actividad específica (A.E.)} = \frac{\mu \text{ moles de sustrato hidrolizado}}{\text{minuto} \times \text{mg. proteína}}$$

Definimos U.E. como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μmol de sustrato por minuto a 22°C y pH 7,2.

IIIb - Método del α -NA (37):

Los reactivos usados fueron: acetato de α -naftol (α NA, Sigma); Diazo blue B (Fast Blue B, o-dianisidina tetrazotizada, Sigma); α -naftol (Sigma); dodecil sulfato de sodio (lauril sulfato de sodio, Sigma).

Se preparó una solución de sustrato (α NA) de 4 mg/ml en etanol absoluto.

El reactivo de color se preparó en el momento de usar mezclando dos partes de una solución de Diazo Blue B 1% en buffer fosfatos 0,2M pH 7,2 y cinco partes de una solución del detergente 5%. El α naftol producido por la reacción enzimática da un fuerte color azul con este reactivo ($\epsilon_M = 600 \text{ nm}$). El dodecil sulfato de sodio solubiliza el complejo coloreado y detiene la reacción enzimática.

En un ensayo típico se colocaron en tubo de ensayos 9,8 ml de buffer fosfatos 0,2M pH 7,2, 0,1 ml de sustrato y 0,1 ml de homogenato. A tiempo cero y luego de tres minutos de incubación a 30°C se tomó una alícuota de 2,5 ml y se agregó a 0,5 ml de reactivo de color. La absorbancia fue medida luego de 10 minutos de desarrollo de color (al

cabo de ese tiempo se estabiliza el color del complejo), en celdas de 1 cm de paso óptico, colocando en la celda de referencia la solución correspondiente al tiempo cero.

Para el cálculo de la actividad enzimática se utilizó una curva de calibración obtenida con soluciones de α -naftol de concentración conocida. Del gráfico de Absorbancia versus concentración de α -naftol se obtiene un $\epsilon_M = 5 \times 10^4$.

Se calculó la actividad enzimática de la siguiente forma:

$$\begin{aligned} \text{U.E.} &= \frac{\mu\text{moles de sustrato hidrolizado}}{\text{minuto}} = \\ &= \frac{\Delta\text{Absorbancia/minuto} \times 3 \times 10^{-2}}{0,5} \end{aligned}$$

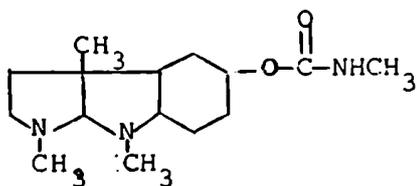
$$\text{A.E.} = \frac{\mu\text{moles de sustrato hidrolizado}}{\text{minuto} \times \text{mg proteína}}$$

Definimos una U.E. como la cantidad de enzima que hidroliza $1 \mu\text{mol}$ de sustrato por minuto a 30°C y a pH 7,2.

III c - Inhibición " in vitro "

Inhibidores utilizados

Eserina



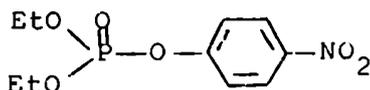
Es un inhibidor de colinesterasas. Se une al sitio esterático de la enzima por su grupo carbamilo y al sitio aniónico por su grupo amino, en una reacción análoga a la reacción entre enzi-

ma y sustrato. La parte catiónica del inhibidor es hidrolizada, quedando la enzima carbamilada. Tiene efecto inhibitorio por la relativa

lentitud con que la colinesterasa es regenerada por hidrólisis del complejo intermedio. Es un inhibidor muy potente pero de acción corta.

Es de importancia en estudios bioquímicos para distinguir reacciones debidas a colinesterasas de las debidas a otras esterasas "e-serina-resistentes". En general, "in vitro" es suficiente una concentración $10^{-5}M$ para inhibir toda actividad colinesterásica.

Paraoxón (O,O - dietil p-nitrofenilfosfato):



Es el metabolito activo del paratión (O,O - dietil p-nitrofenilfosforotionato). Fuerte inhibidor de serina-esterasas (colinesterasas y carboxiesterasas), da una enzima fosforilada extremadamente resistente a la hidrólisis. Tiene alta actividad insecticida, pero es muy tóxico en mamíferos (DL₅₀ oral ratas = 2,5 mg/kg)

p - hidroximercuribenzoato: (PHMB)



Reacciona con grupos -SH de las proteínas, formando monomercáptidos:
 $RSH + R'Hg^+ \longrightarrow RSHgR'$

La reacción del PHMB con grupos -SH puede ser revertida con el agregado de un exceso de un reactivo como cisteína o glutatión, lo cual permite evaluar la importancia de grupos -SH en enzimas.

En el caso de las esterasas interesa para distinguir las aril-esterasas (enzimas sulfhidrúlicas); de otras.

Ensayos de inhibición

Inhibición con eserina (sulfato de eserina, Sigma):

Se estudió por el método de Ellman ya descripto (IIIa). Se usó una solución de inhibidor 10^{-4} M. En un ensayo típico se incubaron: 0,95 ml de buffer-cromógeno, 0,05 ml de homogenato y 0,1 ml de eserina (concentración final de inhibidor: 10^{-5} M) durante 15 minutos a 25°C. Luego se agregaron 0,1 ml de sustrato (PTA) y se midió la actividad enzimática durante 5 minutos.

Inhibición con paraoxón:

Se llevó a cabo según el procedimiento recién descripto, usando 0,01 ml de una solución de paraoxón 10^{-3} M en etanol absoluto (concentración final 10^{-5} M).

En ambos casos se calculó el porcentaje de inhibición por comparación con un control sin inhibidor:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\Delta \text{Abs./min})_{\text{control}} - (\Delta \text{Abs./min})_{\text{inhibido}}}{(\Delta \text{Abs./min.})_{\text{control}}} \times 100$$

Inhibición con PHMB :

Se usó una solución de p-cloromercuribenzoico (que por hidrólisis en medio alcalino da PHMB) 10^{-3} M en buffer fosfatos 0,2M pH 7,2.

Dado que este inhibidor no puede ser utilizado con el método de Ellman por su interferencia con el reactivo de color, su acción inhibitoria fue evaluada por el método del α -NA ya descripto (IIIb).

Se preincubaron durante 15 minutos a 30 °C, 8,8 ml de buffer, 1 ml de inhibidor (concentración final 10^{-4} M) y 0,1 ml de preparado enzimático. Al cabo de ese tiempo se agregaron 0,1 ml de sustrato (α NA) y se operó según lo descripto.

El grado de inhibición se calculó por comparación con un control sin inhibidor:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{inhibido}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100$$

III d - Activación por cationes bivalentes

Para los ensayos de activación por cationes bivalentes se usó el sobrenadante de la centrifugación a 10000 g de homogenatos de tórax y abdomen de T. infestans (5 tórax + abdomen/ml de NaCl 0,5M)

La actividad de las enzimas eserina-resistentes se determinó sobre homogenatos previamente inhibidos con eserina 10^{-5} M durante 15 minutos a 30°C, por el método del α -NA (IIIb).

El efecto de los cationes bivalentes en la actividad enzimática fue estudiado preincubando los correspondientes cloruros (en concentración final 10^{-3} M) durante 15 minutos a 30°C con el preparado enzimático y eserina. Al cabo de ese tiempo fue agregado el sustrato y medida la absorbancia. Paralelamente se llevó un blanco con igual concentración de catión pero sin enzima.

Los cationes ensayados fueron: Ca^{++} , Mg^{++} , Co^{++} y Mn^{++} .

III e - Actividad enzimática " in vitro" frente a paratión y paraoxón

Se ensayó la actividad enzimática de sobrenadantes de la centrifugación a 10000 g de homogenatos de tórax (5/ml) y homogenatos de abdomen (5 abdomenes/ml) en buffer fosfatos 0,5M pH 7,5, usando como sustratos paratión y paraoxón radiactivos.

Los reactivos utilizados fueron: paratión ^{14}C marcado en las posiciones 2 y 6 del anillo bencénico, actividad específica 2,2 mCi/mmol

(ICN). El paraoxón ^{14}C fue obtenido por oxidación del paratión radiactivo según la técnica de Lee (38):

A 10 ml de una mezcla de etanol y agua 50% (V/V) conteniendo 0,4 mmoles de ácido m-cloroperbenzoico (Sigma) se agregaron 0,2 mmoles de paratión ^{14}C en 500 μl de etanol. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por 5 minutos. La mezcla se extrajo tres veces con igual volumen de diclorometano, y éste fue lavado con CO_3HNa 5% frío para remover el exceso de ácido. La fase orgánica remanente se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró. El oxón se aisló por placa delgada (solventes: acetona-hexano-cloroformo-20;40:3).

Para la medición de la actividad enzimática, se incubó 1 ml de cada homogenato con 5 μl de solución de paratión ^{14}C en etanol absoluto (18500 dpm/5 μl) durante 1 hora a 30°C, en incubadora metabólica Dubnoff, con agitación. Los productos de la reacción fueron extraídos con 2 ml de cloroformo, para separar el paratión sin reaccionar, soluble en solvente orgánico, de los metabolitos, solubles en agua. De cada capa, tanto clorofórmica como acuosa, se tomó una alícuota que se transfirió a un vial de centelleo. A la alícuota de la fase acuosa se agregaron 10 ml de cóctel de centelleo Aqua sol-2 (New England Nuclear). En la alícuota de la fase clorofórmica se evaporó el solvente en evaporador analítico N-Evap (Organization) y se agregaron 10 ml del cóctel mencionado. La radiactividad de las muestras fue medida en un contador de centelleo líquido Beckman modelo LS 7000.

En forma paralela se llevó un blanco sin preparado enzimático.

El procedimiento fue repetido con una solución de paraoxón radiactivo en etanol absoluto (40000 dpm/5 μl).

Con los datos de radiactividad (en dpm) soluble en solvente y en fase acuosa se determinó el porcentaje de conversión a metabolitos hidrosolubles.

III f - Determinación de proteínas

El contenido en proteínas se determinó por el método de Lowry y colaboradores (60).

Se realizó una curva standard con albúmina de suero humano (Sigma).

A 0,1 ml de homogenato en 0,9 ml de agua se agregaron 4 ml de solución alcalina de cobre (1ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5% en tartrato de sodio y potasio 1% + 50 ml de Na_2CO_3 2% en NaOH 0,1N), y se dejó 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron 0,4 ml del reactivo de Folin Ciocalteau (Merck) diluído 1 + 2, y después de 30 minutos a temperatura ambiente se leyó la absorbancia a 660 nm contra un blanco sin preparado enzimático.

IV - ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

IV a - Técnica electroforética

Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo en una celda de electroforesis Bio Rad modelo 150 A, circular, de acrílico, con camisa de circulación de agua, y con 12 alojamientos para tubos de 7 cm o de 12,5 cm de largo y 0,7 cm de diámetro externo. Se utilizó una fuente de poder Bio Rad modelo 500.

Para la preparación de los geles se utilizaron los siguientes

reactivos: Acrilamida (Bio Rad), Bis acrilamida (Merck), TEMED (N,N,N',N' tetrametilendiamina;Merck), persulfato de amonio (Merck), Tris (Merck).

Las soluciones stock se prepararon según Davis (61):

Solución stock A: HCl 1N	48 ml
Tris	36,6 g
TEMED	0,23 ml
H ₂ O	c.s.p 100 ml

Solución stock B: Acrilamida	28 g
Bis	0,735 g
H ₂ O	100 ml

Estas soluciones se filtraron y almacenaron en frascos color caramelo en refrigerador, a 4°C.

La solución de trabajo para el gel de concentración de 7% de acrilamida es preparada en el momento de uso, por combinación de volúmenes iguales de soluciones 1 y 2:

Solución 1: 1 volumen de solución A
2 volúmenes de solución B
1 volumen de H₂O

Solución 2: Persulfato de amonio 140mg/100 ml.

Preparación de los geles:

Los tubos de electroforesis bien lavados y secos, cerrados en un extremo con tapones de goma, se llenaron con la solución de trabajo. En la parte superior de cada gel, antes de que gelifiquen, se agregaron con cuidado 50 μ l de agua destilada, de modo de obtener una superficie lisa y plana al gelificar. Esto favorece una mejor corrida

de las bandas proteicas y una mejor resolución en el gel.

Al cabo de unos 30 minutos se produce la gelificación, y quitando el agua quedan los geles listos para su uso.

Preparación de las muestras

Los sobrenadantes de la centrifugación a 10000 g de homogenatos de tórax y abdomen en NaCl 0,5M (10 tórax/ml; 5 abdómenes/ml) fueron mezclados con solución de sacarosa 40% para aumentar su densidad, de modo de tener una concentración final de sacarosa del 10%.

Preparación del buffer de corrida:

Los reactivos utilizados fueron: Tris (Merck); Glicina (Bio Rad).

Se preparó una solución stock de buffer de corrida (6 g de Tris 28,8 g de glicina, H₂O destilada csp 1 litro, pH 8,3), que se diluyó 1/10 en el momento de ser usada en los compartimientos electródicos.

Corrida electroforética:

Se colocaron los tubos con los geles en los alojamientos correspondientes en la cuba electroforética, y se llenaron los recipientes inferior (anódico) y superior (catódico) con buffer de corrida.

Se sembraron 25 μ l de muestra previamente preparada, a través del buffer de la celda catódica, con micrójeringa Hamilton. Como colorante trazador se sembró una gota de solución de azul de bromofenol (Bio Rad) en sacarosa, en uno de los geles. Dicho colorante tiñe la albúmina, fracción proteica de mayor movilidad electroforética.

La corrida se llevó a cabo a 2 mAmpere/gel en condiciones de refrigeración , para evitar la inactivación de las enzimas por el efecto

Joule.

Cuando el frente de corrida llegó a 5 mm del extremo inferior del gel se interrumpió la corrida. Los geles fueron extraídos de los tubos inyectando agua entre la pared interna del tubo y el gel por medio de una jeringa hipodérmica. De esta forma, el gel se desliza suavemente sin ser dañado,

IV b - Técnicas de revelado usadas

Revelado de actividad esterásica

Se utilizó una adaptación del método de Jameson (62), que usa como sustrato el acetato de α -naftol (α NA).

Los reactivos usados fueron: α NA (Sigma), Fast Blue B (Sigma), Tris (Merck).

Los geles se preincubaron en buffer Tris-HCl 0,2M pH 7,0 durante 1 hora y luego se incubaron 1 hora en una solución formada por:

α NA	4 mg
Fast Blue B	10 mg
Etanol absoluto	1 ml
Buffer Tris-HCl	9 ml

preparada en el momento de revelar pues de lo contrario se oscurece, Los geles fueron luego lavados con solución de ácido acético 15% (V/V) durante 15 minutos, y almacenados en ácido acético 7%.

Revelado de proteínas

Las bandas de proteínas fueron localizadas utilizando el colorante Coomassie Brilliant Blue R 250 (Fluka) según los descripto por

Chrambach y colaboradores (63).

Los geles, luego de la corrida electroforética, fueron sumergidos en ácido tricloroacético 12,5%, con agitación. Este pretratamiento de fijación de las bandas de proteínas con el ácido aumenta la sensibilidad de la detección. Después de 30 minutos los geles fueron incubados con una solución de revelado preparada en el momento por dilución 1:20, en ácido tricloroacético 12,5%, de una solución stock de Coomassie Blue 1% en agua.

Al cabo de 30-60 minutos los geles fueron transferidos a una solución de ácido tricloroacético 10% y guardados. La intensidad de las bandas aumentó durante las siguientes 48 horas.

IV c - Inhibición de la actividad esterásica en gel

En los ensayos de inhibición de la actividad enzimática, los inhibidores se agregaron en la concentración requerida tanto en el medio de preincubación como en la solución de incubación.

Fueron usados los siguientes inhibidores: eserina ($10^{-5}M$), paraoxón ($10^{-5}M$) y p-cloromercuribenzoato ($10^{-4}M$)

IV d - Actividad fosfotriesterásica de las bandas de esterases Electroforesis y procesamiento del gel

Las electroforesis en gel de poliacrilamida de homogenatos de tórax fueron llevadas a cabo según lo descrito en la sección IVa de Materiales y métodos.

En cada experimento fueron corridos simultáneamente tres geles. Uno de ellos fue revelado para esterases y otro para proteínas según las técnicas recién descritas (IVb). El tercer gel fue utilizado

para determinar la contribución de cada banda a la hidrólisis de compuestos organofosforados.

Degradación de paratión y paraoxón radiactivos

El gel, luego de la corrida electroforética, fue cortado transversalmente en 28 porciones iguales de unos 3 mm de espesor, mediante un gel slicer Bio Rad modelo 190.

Cada porción fue homogeneizada en 1 ml de buffer fosfatos 0,5M pH 7,5, incubada durante 1 hora a 30°C con una solución de paratión o paraoxón radiactivos, y la actividad hidrolítica determinada según lo descrito en III e de Materiales y métodos.

V - ESTUDIO DE LA INTOXICACION CON PARATION "IN VIVO"

V a - Tratamiento

Se seleccionaron 30 mosquitos adultos machos, con pesos entre 150 mg y 250 mg durante tres semanas. 30 de ellos fueron topicados por el abdomen con una solución de paratión radiactivo en acetona (paratión ^{14}C marcado en las posiciones 2 y 6 del anillo bencénico; actividad específica 2,2 mCi/mmol; ICN) de 18500dpm/5 μl . La dosis topcada fue de 25 $\mu\text{g/g}$ (20 veces la DL_{50} del paratión). Los seis restantes fueron usados como control, topicados sólo con solvente.

A las 2 horas , 3 horas, 4 horas, 5 horas y a tiempo de muerte, (que en promedio fue de 5h 38min \pm 17 min) fueron separados seis insectos al azar, congelados a -16°C por 5 minutos y luego lavados con 2 porciones de 5 ml de acetona, para eliminar el insecticida no pene-

trado. Los extractos de lavado fueron transferidos a un vial de centelleo, se evaporó la acetona y luego del agregado de 10 ml de cóctel de centelleo Aquasol-2 se contó la radiactividad no penetrada en un contador de centelleo Beckman LS 7000.

Los insectos así tratados fueron secados sobre papel de filtro, se les cortó la cabeza, y se separó el tórax del abdomen.

V b -Medición de la actividad colinesterásica-Sintomatología

De cada lote de seis cabezas de vinchuca se prepararon dos homogenatos de tres cabezas cada uno, en 0,3 ml de NaCl 0,5M. Estos homogenatos se filtraron por lana de vidrio y se utilizaron para la determinación de la actividad colinesterásica, usando como sustrato acetiltiocolina 12 mM, según el método de Ellman ya descrito.

Durante el proceso de intoxicación se estudió la aparición de sintomatología característica de la lesión a nivel del sistema nervioso central: excitación, convulsiones, parálisis y finalmente muerte.

V c - Medición de los productos de degradación

Cada grupo de seis tórax y seis abdómenes fue homogeneizado en 4 ml de buffer Tris- HCl pH 7,4. El homogenato obtenido fue extraído con 8 ml de cloroformo y sometido a centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos en centrífuga clínica Rolco, para separar ambas capas de solvente y decantar los restos de tejidos no disgregados.

De cada fracción, tanto clorofórmica como acuosa, se tomó una alícuota de 1 ml sobre la cual se contó radiactividad luego del agregado de 10 ml de cóctel de centelleo. Previamente, en la alícuota de

la fase clorofórmica, fue evaporado el solvente, en evaporador N-Evap (Organomation), bajo corriente de nitrógeno.

V d - Medición de la activación a paraoxón

Los restos de extractos clorofórmicos fueron llevados a sequedad bajo corriente de nitrógeno en tubo de centrífuga. Cada residuo fue tomado con 100 μ l de cloroformo y sembrado en una placa de sílica gel 60F 254 de 0,25 mm de espesor (Merck). En la misma placa se sembró standard radiactivo de paratión, y frío de paratión y paraoxón.

El sistema de solventes de corrida utilizado fue hexano:acetona : cloroformo (40:20:3).

Luego de la corrida, por observación de las placas bajo una lámpara de luz ultravioleta, fueron visualizadas y señaladas las manchas correspondientes a los compuestos no radiactivos.

Las placas de tlc fueron preparadas para ser reveladas por autorradiografía marcando los vértices con tinta radiactiva. En cuarto oscuro fueron expuestas a placas radiográficas marca 3M tipo R. Luego de 40 días de exposición, las placas radiográficas fueron reveladas con revelador 3 M durante 5 minutos, luego lavadas con ácido acético 10% y fijadas con fijador 3 M. Las manchas radiactivas fueron visualizadas como zonas oscuras sobre un fondo transparente.

Una vez revelada, la placa radiográfica fue superpuesta sobre la correspondiente placa de sílica gel para localizar en ésta cada uno de los componentes radiactivos que imprimieron la radiografía. Con lápiz de grafito se marcó sobre la sílica gel la ubicación del paratión y paraoxón radiactivos. La sílica gel que contenía el pa-

ración fue raspada y trasvasada a un vial de centelleo; de la misma manera se procedió con la silica gel con paraoxón. A cada vial se se agregó 10 ml de cóctel de centelleo, se agitó y luego de 24 horas se contó la radiactividad.

VI - AISLAMIENTO ELECTROFORETICO DE UNA BANDA DE ESTERASAS

VI a - Técnica electroforética

Para el aislamiento de una banda de esterasas (banda 9) se utilizó un dispositivo experimental similar a lo descrito por Braatz y Mc Intire (64), sólo que la recolección se efectuó en una cámara formada dentro del mismo tubo que contiene el gel y sellada con membrana de diálisis en cambio de efectuarla directamente en bolsita de diálisis.

Preparación de los geles

Los tubos de electroforesis fueron cerrados en su extremo inferior con su correspondiente tapón de goma y colocados en el soporte para gelificación. Así dispuestos, se agregó a cada uno 0,2 ml de sacarosa 40% y luego 1,2 ml de mezcla de gelificación para gel de 7% de acrilamida (preparada según lo indicado en IVa) cuidadosamente. Por su menor densidad la solución gelificante no se mezcló con la sacarosa y gelificó sobre ella, formándose de esa manera la cavidad en la que se recogió posteriormente la banda enzimática.

Una vez formado el gel, se volcó la sacarosa de la cavidad, se lavó varias veces con agua destilada para eliminar restos de sacarosa y se secó.

La cavidad fue llenada con buffer de corrida y cerrada con membrana de diálisis que se fijó al tubo con un anillo de goma.

Corrida electroforética

Se utilizó el sobrenadante de la centrifugación a 10000 g de homogenatos de tórax de T. infestans preparados según lo indicado en IVa. En cada gel se sembraron 150 μ l de homogenatos. En uno de los geles, reservado como blanco, se sembró sólo una gota de solución de azul de bromofenol más sacarosa.

La corrida se llevó a cabo según lo descrito, hasta que el colorante trazador salió de la cavidad sellada con la membrana de diálisis y difundió en el buffer anódico.

Una vez terminada la corrida, se invirtieron los tubos y se recogieron con microjeringa Hamilton la solución blanco y la solución que contiene la enzima. Ambas soluciones fueron transferidas a sendos tubos de ensayos y guardadas a -16°C hasta el momento de su uso.

VI b - Control electroforético

A los fines de comprobar la homogeneidad electroforética del material aislado según lo descrito en VI a, éste fue sometido a una nueva electroforesis en gel de 7% de acrilamida, y a electroforesis en un gel más tramado, de 10% de acrilamida, preparado según Gabriel(65).

En ambos casos las soluciones aisladas fueron mezcladas con solución de sacarosa 40% de modo de tener una concentración final de sacarosa del 10%. Se sembraron 150 μ l de muestra por gel y se llevó a cabo la electroforesis en gel de poli(acrilamida).

La actividad esterásica se reveló usando α -NA como sustrato

En otra experiencia, uno de los geles preparados para el aislamiento electroforético fue sacado de la celda cuando el azul de bromofenol llegó a 5 mm de la cavidad utilizada para recoger la enzima. Luego del aislamiento, dicho gel y otro sobre el que sí se efectuó la separación de la esterasa fueron revelados con ANA como sustrato, incubando durante 30 minutos.

Los densitogramas de las bandas de esterases fueron obtenidos por procesamiento de los geles mediante un Gel Scanner Varian, a una velocidad de movimiento del gel de 5 mm/minuto; acoplado a un espectrofotómetro Varian 634S y a un registrador Varian Aerograph modelo 20.

VII - CARACTERIZACION DE LA ENZIMA AISLADA

VII a - Actividad frente a sustratos

La actividad de la enzima frente a PTA y TPE fue determinada según la técnica de Ellman.

En un ensayo típico se incubaron 50 μ i de enzima con 0,95 ml de buffer-cromógeno y 0,1 ml de PTA 60 mM o TPE 20 mM, registrándose la actividad enzimática por 5 minutos. La autohidrólisis del sustrato se descontó en la celda de referencia.

VII b - Determinación de K_m y $V_{m\acute{a}x}$

Se prepararon soluciones de PTA 10 mM, 20 mM, 40 mM, 50 mM y 60 mM, con las cuales se cubrió un rango de concentraciones de sustrato desde 0,91 mM hasta 5,45 mM.

Para cada concentración de sustrato se midió la actividad enzi-

mática por el método de Ellman, sobre:

0,95 ml de buffer-cromógeno

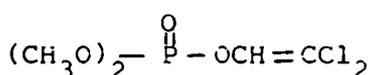
50 l de enzima

0,1 ml de sustrato.

El análisis por regresión de los datos de $1/v$ versus $1/S$ permitió, de acuerdo con el método de Lineweaver-Burke (66), el cálculo de los valores de K_m y $V_{máx}$ de esta enzima con respecto al PTA.

VII c - Inhibición de la actividad enzimática

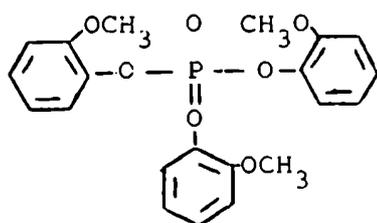
- DDVP (2,2-diclorovinildimetilfosfato)



Inhibidor directo de colinesterasas y carboxiesterasas. Insecticida de contacto y por ingestión con acción fumigante y penetrante y baja actividad residual, tiene rápida acción de volteo contra moscas, mosquitos, etc.

Es rápidamente degradado en mamíferos por pérdida del metilo de la unión éster o del vinilo.

- TOCP (tri o-tolilfosfato)



Es convertido "in vivo" por oxidasas de función mixta en ésteres cíclicos de saligenina. Su principal metabolito activo, el o-tolilsaligeninfosfato, es un potente inhibidor de colinesterasa de suero. Es conocida también su actividad potenciadora del malatión por su acción inhibitoria sobre carboxiesterasas.

- Eserina y paraoxón

El efecto de estos inhibidores ya fue descrito en III d.

Estos inhibidores fueron ensayados sobre la enzima aislada por el método de Ellman. Para tal fin, se preincubaron 50 μ l de enzima y 0,95 ml de buffer-cromógeno durante 15 minutos con el inhibidor en las siguientes concentraciones finales:

DDVP: 10^{-3} M

TOCP: 10^{-3} M

Eserina: 10^{-5} M

paraoxón: 10^{-5} M

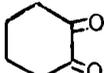
Al cabo de ese tiempo se agregaron 0,1 ml de PTA y se registró la absorbancia durante 5 minutos.

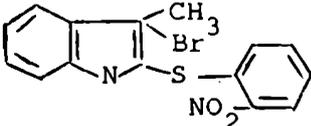
Modificadores proteicos:

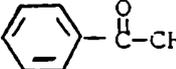
Se ensayó el efecto cualitativo de una serie de modificadores proteicos, por electroforesis en gel de poliacrilamida.

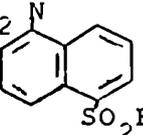
Los compuestos usados fueron:

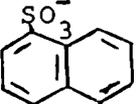
p-hidroximercuribenzoato (PHMB; Sigma)

1,2 ciclohexanodiona (, CHD, Pierce).

BNPS-Escatol (, BNPS, Pierce)

Bromuro de p-azidofenilacilo (, pAF, Pierce)

Fluoruro de dansilo (, FD, Pierce)

1,5-I-Aedans (, 1,5,I, Pierce)

N-acetilimidazol (NAI, Pierce).

Para cada inhibidor se preincubaron 150 μ l de enzima con 15 μ l de inhibidor 10^{-2} M (lo que resulta en una concentración final de 10^{-3} M) durante 15 minutos. Al cabo de ese tiempo se agregaron 45 μ l de sacarosa 40% y se sembraron 150 μ l en gel de 7% de acrilamida. Posteriormente se efectuó la corrida electroforética y el revelado de actividad esterásica usando α NA como sustrato según lo descrito en IV.

VII d - Activación por cationes bivalentes

Para la determinación del efecto de los cationes bivalentes sobre la actividad hidrolítica de la enzima aislada, se usó como sustrato p-terbutilfenil fosforotionato preparado según se describe más adelante.(VIII).

Los cationes ensayados fueron Ca^{++} , Mg^{++} , Co^{++} y Mn^{++} .

En cada ensayo se incubaron 1,4 ml de enzima aislada, 0,6 ml de buffer Tris 0,3M pH 7,4 y 20 μ l de sustrato. A 0,7 ml de esta solución se agregaron 7 μ l de una solución 10^{-1} M del cloruro del catión. Se tomaron dos alícuotas de 0,3 ml cada una, que se incubaron durante 1 hora a 30 $^{\circ}$ C con agitación, en baño metabólico. Paralelamente se llevaron controles sin el agregado de catión. La reacción se cortó con 2 ml de cloroformo y 0,7 ml de agua.

Sobre una alícuota de 0,5 ml de la fase acuosa se agregaron 10 ml de cóctel de centelleo Aquasol-2 y se contó la radiactividad.

De la fase orgánica se tomó una alícuota, se evaporó el solvente y se contó la radiactividad luego del agregado de cóctel.

VII e - Actividad versus pH

Para la observación de la variación de la actividad de la enzima aislada con la modificación del pH del medio, fue necesario utilizar una modificación estática de la técnica de Ellman, dado que, como fuera informado (67) los estudios cinéticos se ven dificultados por la dependencia con el pH de las reacciones de los tioles con el DTNB.

Se prepararon una serie de buffer fosfatos 0,02 M con pH desde 6,5 hasta 9,9.

Para cada valor de pH, se incubaron 50 μ l de enzima, 25 μ l de PTA 60 mM y 0,5 ml del buffer correspondiente, a 25 $^{\circ}$ C durante 5 minutos. Al cabo de ese tiempo la reacción fue detenida por dilución de 0,2 ml de la mezcla de incubación en 0,9 ml de buffer-cromógeno preparado según lo descrito en III a, y se midió la actividad enzimática. Paralelamente se llevó un blanco sin enzima, para descontar la autohidrólisis del sustrato.

VII f - Actividad versus temperatura

La medición de la actividad de la enzima aislada en función de la temperatura de incubación fue realizada por el método de Ellman, usando PTA como sustrato, en celdas termostatzadas.

Se incubaron a las distintas temperaturas, en celdas de 1 cm de paso óptico, volúmenes medidos (2,2 ml) de buffer-cromógeno y sustrato, y una vez termostatzados se agregaron 100 μ l de enzima. La actividad enzimática se registró durante 3 minutos, descontándose la autohidrólisis del sustrato.

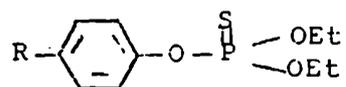
VII c - Estabilidad térmica

La actividad luego de someter la enzima a 50°C, 75°C y 100°C. se midió por el método de Ellman, usando PTA como sustrato.

Para cada punto se incubaron 50 μ l de enzima con 1 ml de buffer-cromógeno en tubo con refrigerante (para disminuir la evaporación), durante 30 minutos. Al cabo de ese tiempo se enfrió, se agregó el sustrato y se registró la variación en la absorbancia durante 5 minutos.

VIII - ACTIVIDAD ESTERASICA DE LA ENZIMA AISLADA FRENTE A ESTERES FOSFORADOS

La actividad esterásica de la enzima aislada se ensayó sobre una familia de ésteres fosforados sintetizados en el laboratorio, de estructura general:



marcados en 1- 14 C-etilo.

Los reactivos utilizados fueron: 14 C- paratión (1- 14 C-O,O dietil p-nitrofenilfosforotionato) 19 mCi/mmol (Amersham); 1- 14 C-Etanol, 45 mCi/mmol (New England Nuclear); p-nitrofenol, p-metilfenol, fenol, p-cianofenol y p-clorofenol (Aldrich); cloruro de tiofosforilo (Aldrich).

Síntesis de las sales de sodio de los fenoles

Se hacen reaccionar mol a mol el fenol correspondiente en tolueno anhidro con EtONa 2 N recién preparado, y se deja reflujar durante me-

día hora. Luego se evapora el solvente, obteniéndose el fenato de sodio correspondiente.

Síntesis de los fosforotionatos radiactivos

Se colocó en baño de hielo seco-acetona durante 20 minutos una ampolla con 250 μCi de $1\text{-}^{14}\text{C}$ etanol. Se abrió el envase y se agregaron por medio de una jeringa hipodérmica 34 μl ($3,3 \times 10^{-4}$ moles) de cloruro de tiofosforilo recién destilado y 0,48 mg de trietilamina disuelta en 100 μl de tolueno anhidro. La mezcla se agitó 5 minutos y se transfirió a un tubo de ensayos. La ampolla de reacción fue lavada 2 veces con 150 μl de éter de petróleo y los líquidos de lavado agregados al tubo de ensayos. Se agregaron $3,3 \times 10^{-4}$ moles de la sal de sodio del fenol, se agitó a temperatura ambiente durante la noche y luego 2 horas a 60°C . Se extrajo con 0,5 ml de NaOH 0,1 N frío y 0,5 ml de agua. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se removió el solvente bajo corriente de nitrógeno.

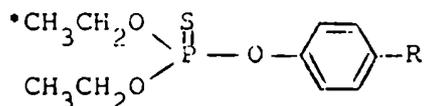
Los fosforotionatos así sintetizados se purificaron por cromatografía en placa delgada (tlc) preparativa, usando placas de sílica gel de 0,5 mm de espesor (Merck) y hexano : acetona : cloroformo (40 : 10 : 3) como solvente de corrida. Los productos radiactivos se eluyeron de las bandas que los contenían usando como solvente acetona.

En la Tabla I se resume la actividad específica de los compuestos sintetizados.

TABLA I:

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE FOSFOROTIOPONATOS SINTETIZADOS EN EL LABORATO-

RIO, DE ESTRUCTURA GENERAL:



R	Actividad específica mCi/mmol	Rendimiento %
H	0,10	18
CN	0,08	19
Cl	0,50	28
CH ₃	0,29	30
(CH ₃) ₃ C	0,34	31

Determinación de la actividad esterásica

Se diluyeron 1,3 ml de la enzima aislada con 0,7 ml de buffer fosfatos pH 7,4. 0,3 ml de esta solución se incubaron con una solución del sustrato radiactivo (concentración final 15 μM) durante 1 hora a 30°C, y se determinó el porcentaje de conversión según lo descrito en el punto IIIe de materiales y métodos.

IX- TRATAMIENTO ESTADISTICO

El análisis por regresión múltiple se realizó con un programa de computación diseñado por el grupo Computación de CITEFA. Dicho

programa permite obtener los parámetros inherentes a la ecuación de regresión y los datos estadísticos para juzgar la validez de los mismos. Ellos son: el r o coeficiente de correlación múltiple (da una indicación del grado de correspondencia entre el dato biológico experimental y el calculado con la ecuación propuesta. $r=1$ indica que la ecuación es perfecta); los términos independientes; los coeficientes de regresión para cada uno de los parámetros estudiados, y como parámetro estadístico el valor de F de significancia para la decisión.

RESULTADOS Y DISCUSION

1

I - ACTIVIDAD ESTERASICA EN TRIATOMA INFESTANS

I a - Distribución subcelular

En la Tabla II se resume la actividad de esterases eserina-resistentes presentes en tórax y abdomen de T. infestans, así como su inhibición por paraoxón.

Cuando la fuente de enzima fue el abdomen se extrajo previamente el intestino, para evitar incluir en este estudio el importante grupo de esterases involucradas en el proceso de digestión. Dado los hábitos hematófagos de este insecto, estas enzimas degradantes no tienen significancia práctica en el estudio del metabolismo de insecticidas.

Como era de esperar de acuerdo con lo informado por otros autores (68) la mayor parte de la actividad expresada por insecto fue medida en la fracción soluble.

Se observó una pérdida de actividad en las distintas fracciones si se las compara con la actividad en homogenato crudo. Estos cambios podrían ser atribuidos a variaciones en la concentración de activadores e inhibidores de estas enzimas.

En lo que respecta a la inhibición por paraoxón 10^{-5} M, se encontró una mayor sensibilidad a la fosforilación en las esterases de tórax que en las de abdomen. Este resultado sugiere mayor actividad de carboxiesterasas que de arilesterasas + acetilesterasas en tórax con respecto a abdomen (20).

En base a estos resultados y a algunos posteriores (electrofo-

TABLA II: ACTIVIDAD DE ESTERASAS ESERINA-RESISTENTES EN FRACCIONES CELULARES DE TORAX Y ABDOMEN DE T. INFESTANS

Fracción	Tórax		Abdomen	
	Actividad específica x 10 ³ (unidades/mg)	% Actividad después de inhibición con paraoxón.	Actividad específica x 10 ³ (unidades/abdomen)	% Actividad después de inhibición con paraoxón.
Crudo	18,1 ± 1,4	38,1 ± 1,4	26,9 ± 4,6	83,5 ± 14,8
Precipitado 1000g	7,0 ± 1,5	2,1 ± 0,5	10,2 ± 3,5	11,3 ± 5,7
Sobrenadante 1000g	16,7 ± 1,1	20,4 ± 2,7	30,6 ± 4,1	87,8 ± 27,2
Precipitado 10000g	12,4 ± 2,7	3,7 ± 0,8	40,3 ± 3,6	26,9 ± 15,4
Sobrenadante 10000g	16,9 ± 1,6	13,8 ± 2,2	23,6 ± 2,5	55,4 ± 16,0

Los resultados son el promedio de tres determinaciones independientes.

Una unidad de actividad esterásica es definida como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la hidrólisis de 1 μmol de sustrato por minuto a 22°C y a pH 7,2.

resis) se decidió realizar los estudios sobre actividad esterásica toxicológicamente importante, en sobrenadante de 10000 g de homogenatos de tórax. Concretamente avalan esta decisión: la mayor simpleza en las disecciones del tórax, muy difícilmente contaminable con el contenido intestinal, el no haberse observado diferencias cualitativas con abdomen en el contenido en los distintos tipos de esterásas, y el haberse establecido la naturaleza soluble de estas enzimas.

I b - Clasificación

1) En un intento por clasificar la actividad esterásica (sobrenadante de tórax) de acuerdo a Holmes y Masters (20), se midió la inhibición producida por eserina, paraoxón y p-cloromercuribenzoato.

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla III.

Como puede apreciarse se encontró inhibición parcial en todos los casos, lo que demuestra la presencia de enzimas clasificables como colinesterasas, carboxiesterasas, arilesterasas y acetilesterasas.

Sobre la base de los valores de inhibición de la Tabla III, puede estimarse la contribución de las actividades correspondientes a los distintos tipos de enzima, como se observa en la Tabla.

2) Como se informara en la Introducción, una posible activación por cationes bivalentes también es un criterio de clasificación de esterásas (29). En nuestro caso ensayamos el efecto del Ca, Mg, Co y Mn.

TABLA III : INHIBICION SELECTIVA DE LAS ESTERASAS DE TORAX DE T. INFESTANS.

Inhibidor	Concentración	% Inhibición
Eserina	10^{-5} M	40
Paraoxón	10^{-5} M	66
PCMB	10^{-4} M	54

CLASIFICACION DE LAS ESTERASAS SEGUN LA ACCION DE LOS INHIBIDORES

<u>Tipo de esterasa</u>	<u>% de actividad</u>
Colinesterasas	40
Carboxiesterasas	26
Arilesterasas	18
Acetilesterasas	16

TABLA IV : EFECTO DE LOS CATIONES BIVALENTES EN LAS ESTERASAS ESERINA RESISTENTES DE T. INFESTANS

Cación 10^{-3} M	Actividad específica unidades/mg	% Activación
Control	0,92 \pm 0,26	-
Ca ⁺⁺	4,46 \pm ,13	384,8
Mg ⁺⁺	0,92 \pm 0,18	0,0
Mn ⁺⁺	1,97 \pm 0,07	114,1
Co ⁺⁺	1,73 \pm 0,05	88,0

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla IV.

Un análisis de los mismos indica claramente el efecto activante (estadísticamente significativo) de Ca, Mn y Co.

Si tenemos en cuenta lo ya mencionado en la Introducción, podemos concluir que el T. infestans posee esterasas correspondientes al grupo I (Ca-activadas) y al grupo II (Co, Mn-activadas)

Este hecho representa un interesante hallazgo, ya que hasta el momento no se han informado esterasas del grupo I en insectos. En cambio, existen varias referencias respecto de la existencia de esterasas del grupo II en mosca, lepidóptero, etc. (69)

I c - Electroforesis en gel de poliacrilamida

El revelado de actividad esterásica usando α -NA como sustrato luego de la separación electroforética sobre gel de poliacrilamida mostró nueve bandas con actividad enzimática no inhibible por eserina (Figura 1). Este patrón de distribución de esterasas fue el mismo en homogenatos de tórax y de abdomen.

Las bandas fueron clasificadas de acuerdo a su inhibición después de incubar con paraoxón 10^{-5} M y p-clorómercuribenzoato 10^{-4} M en buffer Tris-glicina pH 8,3 (20). La actividad correspondiente a la banda V, no inhibible por ninguno de los compuestos ensayados, fue atribuída a acetilesterasa; las bandas II, III, IV, VI, VII y VIII, inhibidas por paraoxón, a carboxiesterasas y finalmente la banda IX a arilesterasa, pues se inhibió con PCMB. La banda I puede ser considerada como una mezcla superpuesta de distintas clases

de esterasas, ya que se observó inhibición parcial luego de la incubación con paraoxón.

Los resultados electroforéticos, si bien mostraron similitud de bandas para tórax y abdomen, sugieren al tórax como mejor sustrato biológico para estos estudios, debido a que se tiene una mejor resolución de las bandas, probablemente a causa de una menor concentración de proteína no enzimática.

I d - Actividad durante el desarrollo post embrionario

Dentro de este estudio general que apunta a una caracterización de los mecanismos detoxificantes del T. infestans en lo que hace a los sistemas esterásicos, fue de interés estudiar la actividad de estas enzimas a lo largo del desarrollo post embrionario.

En la Tabla V se resume la actividad sobre PTA como sustrato, que, como se puede apreciar, no muestra una mayor variabilidad en los distintos estadios.

Este resultado fue confirmado por electroforesis en gel de poli-acrilamida, ya que los zimogramas correspondientes a los distintos estadios ninfales fueron similares.

II - ROL DE LAS ESTERASAS DE T. INFESTANS EN EL METABOLISMO DE O.P.

II a - Metabolismo y toxicidad del paratión "in vivo"

Con el fin de establecer el rol del metabolismo degradante en el proceso toxicodinámico de la interacción insecticida-T. infestans

TABLA V : ACTIVIDAD DE ESTERASAS DE TORAX DE T. INFESTANS FRENTE
A PTA DURANTE EL DESARROLLO POST EMBRIONARIO

Estadio	Actividad específica (unidades / mg)	Actividad/tórax (unidades/tórax)
Ninfa I	0,08	$1,3 \times 10^{-3}$
Ninfa II,III *	0,09	$1,2 \times 10^{-3}$
Ninfa IV	0,08	$7,0 \times 10^{-3}$
Ninfa V	0,13	$19,0 \times 10^{-3}$
Adulta	0,10	$23,0 \times 10^{-3}$

* Determinación efectuada sobre insectos de ambos estadios sin diferenciar entre ellos.

se realizó un tratamiento de intoxicación con paratión (en una dosis que es 20 veces la DL_{50}), y en función del avance del proceso de intoxicación se obtuvo información sobre:

- 1- Inhibición de la colinesterasa.
- 2- Metabolismo degradante y distribución.
- 3- Metabolismo activante.

1 - Inhibición de la colinesterasa:

Diversos autores han informado correlación entre avance de intoxicación, la sintomatología de la misma y la inhibición de la colinesterasa, en el caso de O.P. Metcalf y March (70), intoxicando abejas con con paratión y TEPP (tetraetilpirofosfato), observaron que había coincidencia entre 50% de inhibición e hiperexcitabilidad, 65% y "knock-down", 90% y parálisis y 98% y muerte. Similar experiencia realizaron Mengle y Casida (71) intoxicando moscas con el compuesto O.P. sarin, obteniendo como resultado una correlación entre sintomatología e inhibición de la colinesterasa de cabeza.

La actividad colinesterásica de la cabeza de los insectos tratados con paratión radiactivo como se describe en materiales y métodos, fue medida a distintos tiempos de intoxicación. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla VI.

Los mismos nos indican que hasta la tercera hora no hubo una inhibición significativa en la actividad de esta enzima. Este resultado coincide con la ausencia de síntomas en los insectos. Desde la tercera hora en adelante, comenzó a observarse en algunas de las vinchucas tratadas, excitación, incoordinación, posteriormente parálisis, para

TABLA VI: EVOLUCION DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASICA EN CABEZA DE TRIATOMA INFESTANS DURANTE LA INTOXICACION CON PARATION

Tiempo (horas)	Actividad/cabeza (nmoles/min.cabeza)	Actividad* Remanente %	% Inhibición*
Control	6,19 ± 1,31	100	0
2	4,57 ± 0,39	100	0
3	5,58	100	0
4	2,99 ± 1,37	54,9	45,1
5	2,06 ± 0,68	37,8	62,2
Muerte	1,17 ± 0,40	21,5	78,5

* Expresada sobre el promedio de las actividades hasta 3 horas de intoxicación, consideradas normales. Promedio = 5,45 ± 0,82

TABLA VII: DISTRIBUCION Y METABOLISMO DE PARATION RADIOACTIVO EN T. INFESTANS

Tiempo (horas)	abdomen solv. %	abdomen aq. %	tórax solv.%	tórax aq. %	externo %	recupera- ción %
2	13,51	0,42	13,77	0	72,30	87
3	13,08	0,12	11,70	0	75,10	81
4	11,81	3,14	10,58	0,24	74,20	88
5	17,40	1,65	9,27	0,27	71,40	71
muerte	10,22	4,99	7,89	0,31	84,79	58

llegar, a tiempo de muerte, a una falta total de movimiento, incluso frente a estímulos sonoros y luminosos. Esta aparición de síntomas coincidió con una progresiva inhibición de la actividad enzimática. Como era de esperar, esta inhibición se hace máxima a tiempo de muerte, cuando alcanza un valor de 78,5 %.

Estos resultados nos muestran una evolución más rápida en inhibición y sintomatología que los obtenidos por Wood (72), quien trató T. infestans con 12,5 μ g/g. de paratión. Esta mayor velocidad es fácilmente explicable teniendo en cuenta la mayor dosis de tóxico usada.

Si bien el experimento global de intoxicación "in vivo" fue realizado principalmente para analizar el balance metabólico del paratión, el seguimiento de la inhibición de la colinesterasa y de la sintomatología de la intoxicación aportó un interesante elemento de juicio en paralelo sobre los efectos y el modo de acción del xenobiótico.

2 - Metabolismo degradante y distribución

Ha sido ampliamente reconocida la importancia del metabolismo degradante de insecticidas fosforados en insectos, como paso fundamental condicionante de la acción letal de esos compuestos (43)(73).

En nuestro ensayo topicando T. infestans con paratión radiactivo, se puso especial atención en determinar la magnitud y distribución de los metabolitos polares formados por metabolismo degradante del insecto.

En la Tabla VII se resumen los resultados acerca de la distri-

bución de radiactividad en el avance de la intoxicación.

La fracción acuosa representa los metabolitos polares principalmente producidos por fosfotriesterasas. La fracción soluble en cloroformo está compuesta por paratión y su metabolito activo, paraoxón, producido por la acción de oxidasas de función mixta de localización microsomal. El lavado externo corresponde al paratión que no ha penetrado a través de la cutícula del insecto.

De los resultados de la Tabla VII se pueden extraer algunas conclusiones generales. En primer lugar, respecto de la recuperación, resultó muy llamativa la caída que se observa a partir de la 5ª hora. Dado que el manipuleo y disección de los insectos se realizaron por similar procedimiento para los distintos tiempos de intoxicación, es posible que esta disminución se deba a una interacción entre material biológico y el compuesto radiactivo, posiblemente "binding" a proteínas de los tejidos que se eliminan como precipitado insoluble luego de la centrifugación.

Respecto de la penetración, los resultados de recuperación de paratión sobre cutícula no mostraron diferencias significativas a lo largo del experimento, tomando como base la radiactividad total recuperada. Esto parecería indicar un proceso inicial rápido de penetración, usando el solvente como transportador o "carrier". Pero si se tienen en cuenta los datos de 5 horas y de tiempo de muerte, no puede dejar de tenerse en cuenta que la gran proporción de radiactividad no penetrada deja grandes dudas sobre el valor real de la penetración en estos casos.

Los valores de radiactividad soluble en cloroformo localizada en tórax y abdomen no muestran diferencias apreciables entre sí a lo largo del experimento. En ambos casos se insinúa una tendencia decreciente en los valores a medida que nos acercamos a tiempo de muerte.

En cuanto a la radiactividad soluble en agua, muestra una tendencia creciente a lo largo del experimento, pero, a diferencia de la radiactividad soluble en cloroformo, se la encuentra principalmente localizada en abdomen, lo que podría ser explicado por la mayor cantidad de hemolinfa de esta parte del cuerpo del insecto.

3- Metabolismo activante:

Está ampliamente aceptado que los insecticidas correspondientes a la familia de los fosforotionatos deben ser activados a sus correspondientes fosfatos análogos para manifestar su acción anticolinestérsica. No hay muchos antecedentes en bibliografía respecto del porcentaje de conversión necesario para provocar la muerte del insecto tratado. En general los dosajes de fosfatos luego de la conversión han sido realizados comparativamente entre cepas susceptibles y resistentes de insectos, a los fines de determinar mecanismos de resistencia (74) (75).

En la Tabla VIII se presentan los resultados obtenidos en vinchucas tratadas con paratión. Estos resultados demuestran una importante acumulación de paraoxón, y sugieren que la actividad de fosfotriésterasas es más importante para los tiofosfatos que para los fosfatos.

TABLA VIII

CONVERSION "IN VIVO" DE PARATION A PARAOXON EN TORAX Y ABDOMEN
DE T. INFESTANS

Tiempo de intoxicación (hs.)	Tórax		Abdomen	
	%paratión	%paraoxón	%paratión	%paraoxón
4	95,0	5,0		
5	91,1	8,9	87,4	12,6
Muerte(5h 38')	87,3	12,7	75,8	24,2

Con respecto a las diferencias de acumulación de paraoxón entre tórax y abdomen, las mismas pueden atribuirse a la presencia de los cuerpos grasos en el abdomen. En los insectos estos cuerpos, junto con el intestino, almacenan una buena proporción de oxidasas de función mixta, que actúan en el metabolismo de xenobióticos (76)(77), y en el caso de esta experiencia son responsables de la desulfuración oxidativa del paratión.

II b - Metabolismo de paratión y paraoxón "in vitro"

A los fines de evaluar "in vitro" el metabolismo degradante de

T. infestans en cuanto a la hidrólisis de insecticidas O.P., se incubaron homogenatos de tórax y abdomen con paratión y paraoxón radiactivos, midiendo posteriormente la cantidad de metabolitos hidrosolubles formados. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla IX.

Un análisis de los mismos permite obtener dos conclusiones fundamentales:

- 1) La actividad degradante está localizada en mayor proporción en abdomen.
- 2) La actividad hidrolítica sobre paratión es considerablemente superior a la actividad equivalente sobre paraoxón, sugiriendo que las fosfotriesterasas del T. infestans presentan mayor especificidad hacia tiofosfatos que hacia fosfatos.

Las conclusiones obtenidas coinciden en un todo con los resultados obtenidos en los ensayos "in vivo".

II c - Aporte de las distintas esterasas al metabolismo de O.P.

Obtenida la información "in vivo" e "in vitro" sobre el metabolismo degradante de O.P., y conocida la composición electroforética de esterasas de T. infestans, fue de interés determinar el rol en el metabolismo de O.P. de las distintas bandas con actividad hidrolítica frente a α NA.

Para tal fin se incubaron homogenatos de pequeñas secciones de gel que contenían las bandas, con paratión y paraoxón radiactivos. Posteriormente se midieron los metabolitos hidrosolubles formados en

TABLA IX: RADIATIVIDAD SOLUBLE EN AGUA PROVENIENTE DE PARATION
Y PARAOXON RADIATIVOS, INCUBADOS CON HOMOGENATOS DE
TORAX Y ABDOMENES DE T. INFESTANS

Compuesto	% Radiactividad acuosa *	
	Tórax	Abdomen
Paratión	5,50	12,50
Paraoxón	0,45	5,15

* Corregida por hidrólisis no enzimática.

cada caso.

Los resultados de este experimento se resumen en la figura 2.

Puede verse en la figura que el patrón de degradación frente a ambos sustratos es distinto. Solamente una banda, correspondiente a la banda IX, previamente caracterizada como arilesterasa, mostró actividad frente a ambos sustratos. Esta enzima parece cumplir un rol importante en el metabolismo de O.P. en T. infestans.

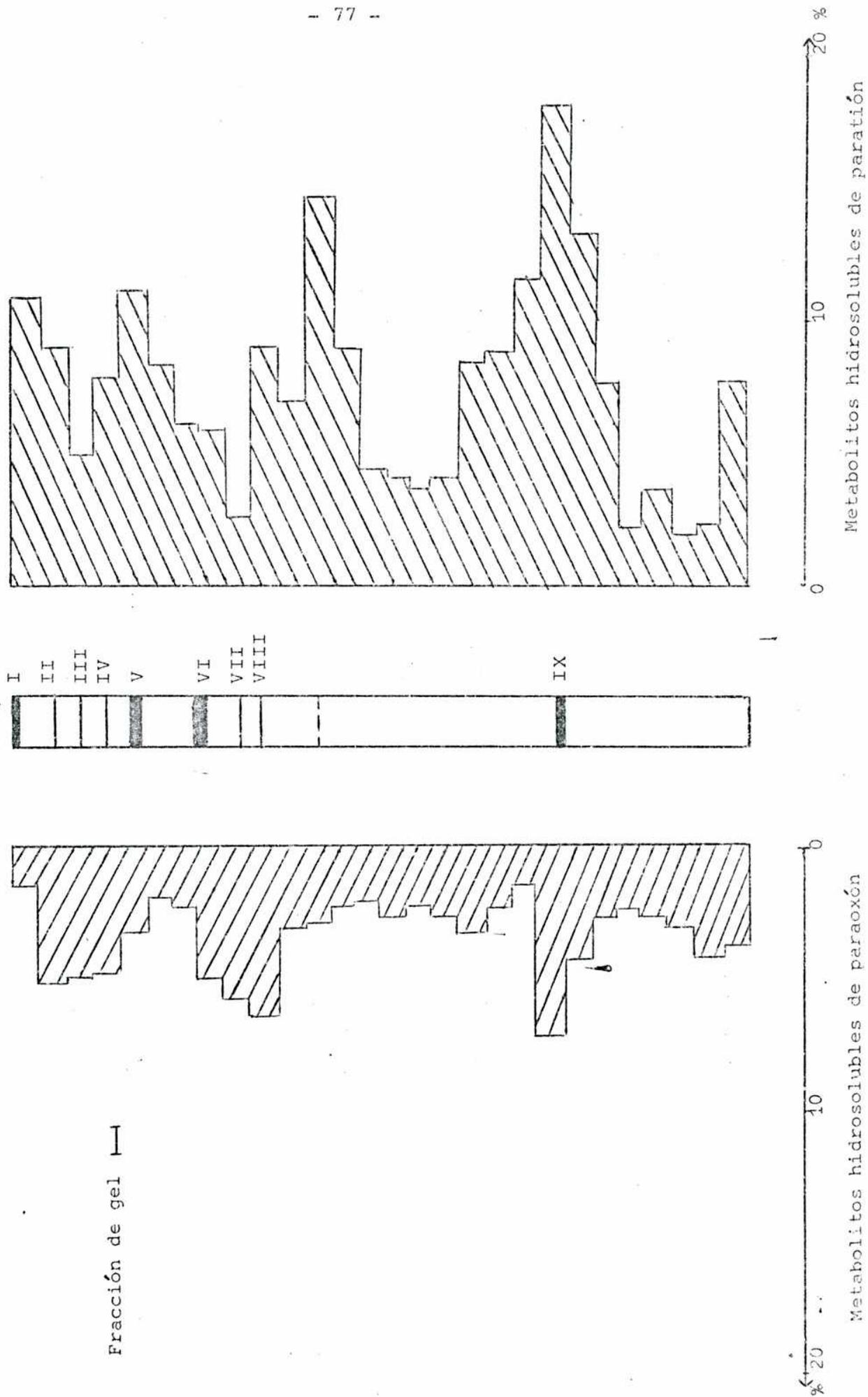
Por otra parte la banda V, clasificada como acetilesterasa, y la banda I, mezcla de distintos tipos de esterases, fueron activas en la hidrólisis del paratión.

Sorpresivamente se observó un pico de degradación de paratión entre las bandas VIII y IX. En esa posición, si bien no hubo una tinción característica de esterases, fue posible detectar una banda de proteínas. Este hecho sugiere la presencia de una esterase específica, con características de "paratiónasa", e inactiva frente a α NA.

Con paraoxón, además de la ya mencionada actividad correspondiente a la banda IX, se observan dos zonas de alta radiactividad soluble en agua, correspondientes a las carboxiesterasas II, III, IV y VI, VII, y VIII, respectivamente. Esta alta radiactividad en la fase acuosa podría ser atribuída a unión a proteínas ("binding"). Este particular tipo de interacción entre carboxiesterasas y O.P. fue informado por otros autores (78) (79), y podría ser interpretada como un mecanismo adicional de inactivación de ciertos compuestos fosforados.

FIGURA 2: METABOLISMO DEGRADANTE DE PARATION Y PARAOXON INCUBADOS CON FRACCIONES DE GEL LUEGO DE LA SEPARACION

ELECTROFORETICA DE ESTERASAS DE T. INFESTANS



III - AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UNA ARILESTERASA

III a - Aislamiento

Los resultados descritos en el punto II c sugirieron que la Banda IX, caracterizada como arilesterasa, tendría un rol primordial dentro del sistema esterásico del T. infestans, en la degradación de ésteres fosforados.

Dada su alta movilidad electroforética se pensó que la forma más práctica de aislarla para su ulterior caracterización podría estar dada por una electroforesis preparativa. Esta particular técnica separativa fue aplicada con éxito al aislamiento de componentes proteicos y enzimáticos (80) a través de modificaciones sencillas de equipos analíticos.

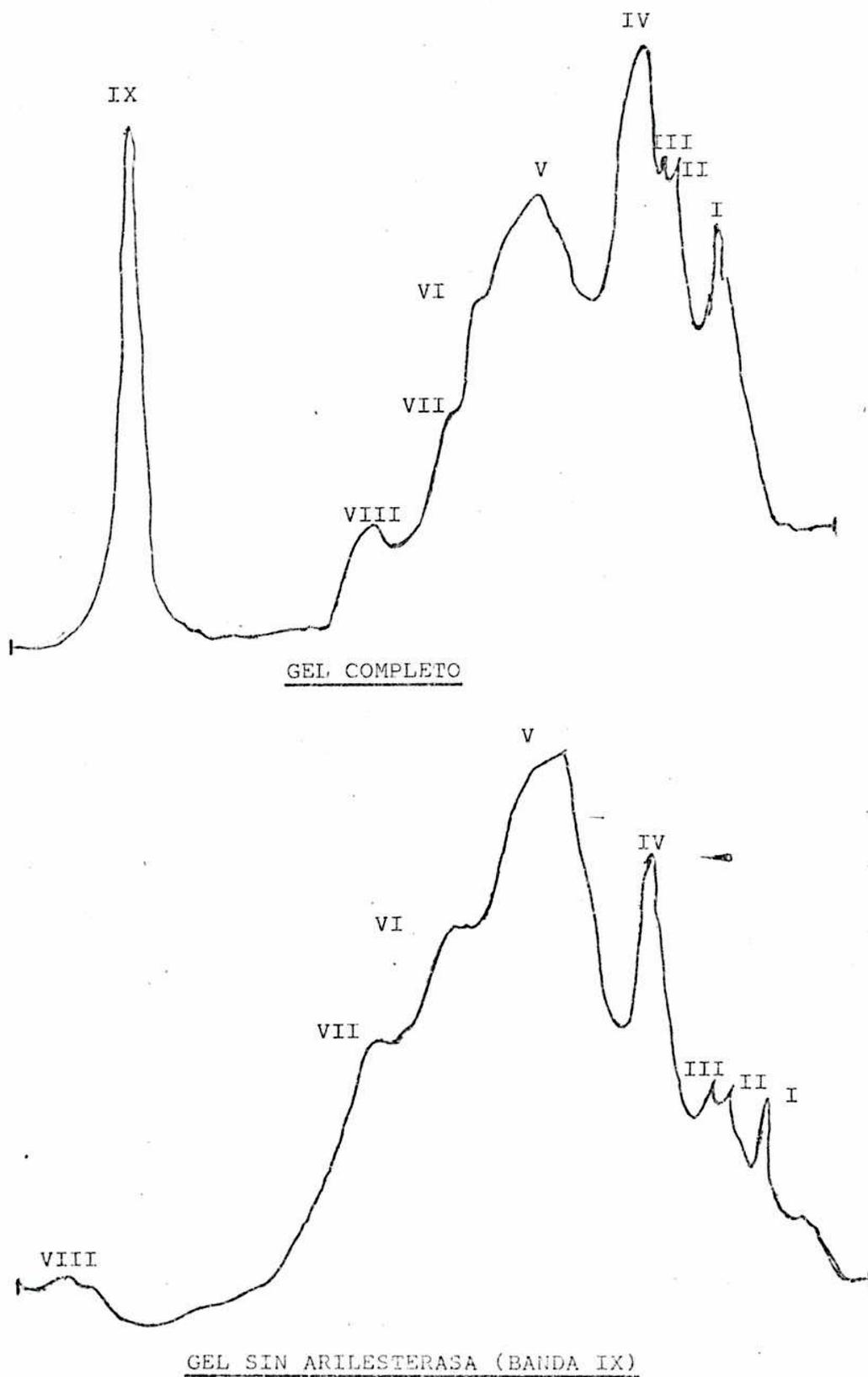
Nosotros adaptamos a los fines de nuestro objetivo la técnica de Braatz y Mc Intire (64) cuyos detalles se describen en Materiales y métodos.

En la figura 3 se puede observar el densitograma de los geles teñidos para actividad esterásica usando α NA como sustrato, antes y después del aislamiento electroforético de la arilesterasa.

La comparación de ambos gráficos indica claramente que sólo la arilesterasa (banda IX) eluyó del gel, quedando aislada y purificada en la cámara contigua al gel.

Este hecho fue corroborado sometiendo la enzima aislada a una nueva corrida electroforética utilizando el gel habitual de 7 % de acrilamida, y un gel con una concentración de 10% de acrilamida. Es-

FIGURA 3: DENSITOGRAMA DE GELES TEÑIDOS CON α NA, ANTES Y DES-
PUES DEL AISLAMIENTO ELECTROFORETICO DE LA BANDA IX.



te gel, más tramado, favorecería la separación de proteínas de alta movilidad electroforética que corren juntos en un gel de 7 % de acrilamida. En ambos casos se constató la presencia de una única banda.

La enzima aislada de esta manera fue posteriormente utilizada para los ensayos de caracterización.

III b - Actividad frente a sustratos

La enzima aislada fue ensayada en su actividad hidrolítica frente a PTA y TPE mediante el método colorimétrico de Ellman (35).

Sólo fue activa frente a PTA, pero no frente a un sustrato alifático como el TPE, lo que corrobora sus características de arilesterasa.

La actividad específica frente a TPA fue de: $0,4 \mu\text{moles}/\text{min.} \times \text{mg}$

Mediante el clásico método de Lineweaver-Burke (66), se obtuvo por regresión la siguiente ecuación para la función característica $1/V$ versus $1/S$:

$$1/V = 10,5 \ 1/S + 0,03$$

De esta ecuación se obtuvo el correspondiente valor de K_m para PTA como sustrato, que fue :

$$K_m = 350 \text{ mM.}$$

La aplicación de la técnica de Ellman para medir la actividad esterásica sobre tiosustratos podría ser considerada no útil en el caso de arilesterasas. Esta técnica, como se describe en la Introducción, se basa en el color desarrollado por la reacción entre el

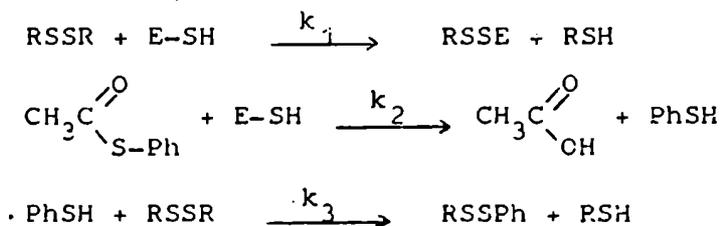
DTNB y grupos -SH, los que obviamente son bloqueados. Como resultado de esto, podría esperarse que el DTNB actúe como inhibidor de enzimas sulfhidrúlicas como son las arilesterasas y, si esto ocurriera, no sería aplicable.

En nuestro caso, dado que la técnica fue aplicable y la enzima mostró características de arilesterasa, se pensó que la reacción entre los -SH críticos de la enzima y el DTNE sería muy lenta si la comparamos con la reacción entre el tiofenol o tioalcohol liberado por la enzima y el reactivo de Ellman, o si lo hacemos con la reacción de hidrólisis catalizada por la enzima.

Con el fin de aportar elementos de juicio acerca de la hipótesis propuesta, se midió la reacción entre DTNE y enzima, en ausencia de sustrato. El resultado fue que el desarrollo de color correspondiente a esta reacción fue despreciable durante los tiempos de medición de la actividad enzimática. Si se tiene en cuenta que un posterior agregado de sustrato permitió determinar normalmente la actividad esterásica, se puede presumir una baja velocidad para la reacción entre el DTNB y los -SH de la arilesterasa aislada.

Este resultado no es sorprendente, si se tiene en cuenta que la velocidad de reacción entre DTNB y grupos -SH es muy variable (81).

En el siguiente esquema se resume lo descripto:



$k_3 > k_2$ para que el método de Ellman sea aplicable.

$k_2 > k_1$ para nuestra enzima.

Por lo tanto en estas condiciones experimentales el reactivo de Ellman no actúa como inhibidor.

III c - Inhibición de la actividad enzimática

Sobre la enzima aislada se ensayaron una serie de inhibidores característicos de distintos tipos de esterasas, utilizando el método de Ellman con PTA como sustrato.

Los inhibidores usados fueron:

Eserina ($10^{-5}M$), inhibidor de colinesterasas (82); paraoxón ($10^{-5}M$), DDVP ($10^{-3}M$) y TOCP ($10^{-3}M$), inhibidores de carboxiesterasas (43).

Ninguno de estos compuestos, en las concentraciones ensayadas, mostró actividad inhibitoria. Según este resultado, la esterasa en estudio podría ser clasificada como arilesterasa o acetilesterasa, y se encuentra libre de contaminación con otros tipos de esterasas.

Adicionalmente se ensayaron como inhibidores una serie de compuestos que, bloqueando determinados grupos funcionales, actúan como modificadores proteicos. Ellos son:

- p- hidroximercuribenzoato (PHMB), clásico reactivo de -SH (83)
- 1,2-ciclohexanodiona (CHD), que condensa específicamente con grupos guanido (84).
- N-acetil imidazol (NAI), reacciona solamente con residuos tirosilos libres, de proteínas no desnaturalizadas (85)

- BNPS-Escatol (BNPS), ataca grupos -SH y triptofano, y, con mucho menor reactividad a cisteína (86).
- Bromuro de p-azidofenilacilo (pAF), alquila selectivamente enzimas sulfhidrúlicas (87).
- Fluoruro de dansilo (FD), reacciona con -OH activos de serina-esterasas (88).
- 1,5-I-Aedans (1,5-I), modificador característico de grupos -SH(89).

Estos compuestos se evaluaron como inhibidores a los fines de tener una información más detallada de los grupos proteicos críticos para la actividad enzimática.

No pudieron ser ensayados por el método de Ellman ya que interfieren con él de distintas formas. Para la caracterización de su actividad inhibitoria se los preincubó con la enzima, y posteriormente se observó la actividad de la misma mediante el revelado de un gel con α NA, luego de la corrida electroforética, como ya fuera descrito.

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla X.

En la misma, la inhibición de la arilesterasa aislada se describe cualitativamente, por la apreciación visual de la intensidad de color correspondiente a cada banda. El análisis del grado de inhibición obtenido nos indica que los compuestos PHMB y pAF producen inhibición total, indicando claramente que estamos en presencia de una enzima sulfhidrúlica, lo que nos aporta un elemento de juicio clave para clasificarla como arilesterasa. Los otros reactivos de -SH ensayados (BNPS y 1,5-I), al mostrar inhibición parcial corro-

TABLA X: INHIBICION DE ACILESTERASA DE T. INFESTANS POR DISTINTOS
MODIFICADORES PROTEICOS

Inhibidor	Grado de inhibición	Grupo modificado
PHMB		-SH
CHD		Guanido
NAI	-	Tirosilos
BNPS		-SH ; triptofano
pAF		-SH
FD	-	-OH de serina
1,5-I		-SH

+ + : Inhibición total
+ : Inhibición parcial
- : No inhibición.

boran que esta enzima tiene -SH con un rol clave en la actividad enzimática.

Otro de los inhibidores ensayados, la CHD, mostró parcial actividad inhibitoria, lo que permite suponer la existencia de un grupo guanido necesario para la normal actividad de la enzima.

Como ya se mencionara (2), numerosas esterasas (B esterasas) basan su acción hidrolítica en ataques nucleofílicos del -OH de la serina. En este caso tal mecanismo no parece tener contribución a la acción hidrolítica, como lo demuestra la resistencia de la enzima a la inhibición por FD.

III d - Activación por cationes bivalentes

La enzima aislada fue ensayada en su actividad hidrolítica en presencia de cationes bivalentes, usando el p-terbutilfenil fosforotionato, que, como se describirá más adelante, resultó ser un excelente sustrato de la misma.

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla XI.

Como puede verse en la Tabla, el cobalto y el manganeso incrementan significativamente la actividad de la enzima. De acuerdo con las clasificaciones ya discutidas en la introducción de este trabajo, podemos considerar a esta esterasa como perteneciente al grupo II (Co-Mn activadas). Este tipo de enzimas han sido encontradas en otras especies de insectos, y también en mamíferos (29).

TABLA XI: ACTIVACION DE ARILESTERASA DE T. INFESTANS POR CATIONES BIVALENTES.

Cación	Actividad (% degradación en 1h)	% Activación
Control	32,8 \pm 1,9	
Ca ⁺⁺	34,7 \pm 9,1	0,0
Mg ⁺⁺	35,0 \pm 1,7	0,0
Co ⁺⁺	46,7 \pm 2,8	42,4 *
Mn ⁺⁺	53,0 \pm 2,9	61,6 *

* Activación estadísticamente significativa. $p < 0,01$.

III e - Efecto del pH y de la temperatura

A los fines de una mejor caracterización de la enzima aislada, se determinó la influencia del pH y de la temperatura sobre la actividad enzimática.

El efecto del primer parámetro se describe en la Tabla XII.

Los resultados allí resumidos indican que la actividad crece continuamente con el pH hasta el máximo valor ensayado. Por otra parte, a pH menores que 7 se reduce drásticamente la actividad.

Estos resultados sugieren que un medio básico es un requerimiento mecanístico para la hidrólisis catalizada por la enzima.

Con respecto al efecto de la temperatura, en la Tabla XIII se resume la actividad enzimática a distintas temperaturas.

Los resultados indican la sorprendente termoestabilidad de esta enzima, que hasta 60°C no sólo mantiene su actividad sino que la incrementa sensiblemente.

Cuando se intentó determinar su resistencia térmica, se encontró que ni aún a 100°C durante 30 minutos perdía su actividad. Este resultado es muy sorprendente, ya que hay muy escasos antecedentes en la bibliografía acerca de enzimas resistentes a altas temperaturas, y una buena parte de ellos se refieren a enzimas de bacterias termófilas (90).

III f - Actividad frente a ésteres fosforados

Los resultados resumidos en la Tabla XIV muestran la actividad degradativa de la enzima aislada frente a una familia de compuestos

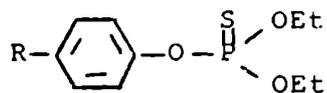
TABLA XII: ACTIVIDAD DE ARILESTERASA DE T. INFESTANS A DIFERENTES pH.

pH	Unidades enzimáticas $\times 10^3$ (μ moles/min.)
5,6	0,16 \pm 0,01
6,5	1,85 \pm 0,07
7,2	5,90 \pm 0,14
7,8	15,95 \pm 0,35
8,6	25,70 \pm 1,55
9,9	37,00 \pm 0,28

TABLA XIII: ACTIVIDAD DE ARILESTERASA DE T. INFESTANS A DIFERENTES
TEMPERATURAS

Temperatura (°C)	Unidades enzimáticas $\times 10^3$ (μ moles/min.)
24	4,93 \pm 0,11
30	8,82 \pm 0,11
40	20,94 \pm 0,57
50	35,56
60	55,00

fosforados radiactivos sintetizados en el laboratorio, de estructura general:



donde los R son sustituyentes seleccionados para cubrir un amplio espectro de polaridad y de efecto electrónico. El miembro más conocido de esta serie homóloga es el insecticida paratión.

Nuestras hipótesis previas hacían suponer que la mayor actividad de la enzima podría corresponder a los compuestos con sustituyentes R de mayor efecto atractor de electrones. Este efecto puede ser medido cuantitativamente por la constante de Hammett σ , definida como:

$$\log \frac{K_s}{K_0} = \rho \times \sigma$$

donde K_s representa la constante de velocidad o equilibrio del miembro s de un grupo de compuestos de una serie homóloga que sufre una reacción, y K_0 es la misma constante para el compuesto sin sustituir. La constante ρ es característica de las condiciones y tipo de reacción, y el parametro de Energía libre σ^- es una medida del efecto electrónico del sustituyente s sobre el centro de reacción (91)(92).

Sin embargo, la más alta velocidad de degradación se alcanzó cuando R fue terbutilo. Este resultado hizo pensar que los efectos hidrofóbicos podrían jugar algún rol preponderante en el mecanismo de reacción enzimática. El parámetro más usual indicador de estos efectos es la constante π desarrollada por Fujita y Hansch (93)(94).

Esta constante se obtiene de los coeficientes de partición entre octanol y agua, y es definida como:

$$\pi = \log P_s - \log P_h$$

donde P_h es el valor para el compuesto sin sustituir y P_s para el sustituyente s.

Con el fin de evaluar la influencia de los efectos electrónicos e hidrofóbicos de los sustituyentes, se efectuó un análisis por regresión de los valores de velocidad de degradación para cada sustituyente con los correspondientes σ y π . Como se informa en la Tabla XIV, los resultados mostraron una buena correlación lineal ($r= 0,971$), estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Los coeficientes de la ecuación de regresión, siendo del mismo orden para π y σ (0,301 y 0,298), sugieren que ambos efectos son importantes en la reacción enzimática.

TABLA XIV: DEGRADACION ENZIMATICA DE FOSFOROTIONATOS DE ESTRUCTURA:



R	Velocidad de degradación ^a nmoles/hora x mg prot.	π ^b	σ ^b
H	56,1 ± 17,0	0	0
CN	150,5 ± 14,5	-0,21	0,69
Cl	115,6 ± 7,6	0,70	0,27
CH ₃	90,9 ± 17,8	0,53	-0,12
NO ₂	97,7 ± 15,3	-0,04	0,82
(CH ₃) ₃ C	210,0 ± 29,7	1,90	-0,17

a: El resultado es el promedio de cuatro determinaciones independientes.

b: valores de bibliografía. Hansch C. y Leo A, " Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology", John Wiley & Sons, New York, 1979.

Correlación obtenida por regresión:

$$\log k = 0,301 \pi + 0,298 \sigma + 1,795$$

Parámetros estadísticos:

r = 0,971 F = 24,6 correlación significativa (p < 0,05)

RESUMEN Y CONCLUSIONES

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos respecto de la actividad de esterasas en homogenatos de Triatoma infestans indican que:

- 1 - La mayor actividad fue encontrada en fracciones solubles, y en abdomen.
- 2 - De acuerdo con los datos obtenidos con inhibidores, se puede afirmar la presencia, dentro del grupo de esterasas eserina-resistentes, de carboxiesterasas, arilesterasas y acetilesterasas.
- 3 - Con respecto a la activación por cationes bivalentes, el incremento de actividad con Ca^{++} , Mg^{++} , Co^{++} y Mn^{++} señala la presencia de esterasas de los grupos I y II.
- 4 - La electroforesis en gel de poliacrilamida reveló la presencia de nueve bandas de esterasas, clasificables como: arilesterasa (banda IX), acetilesterasa (banda V), y carboxiesterasas (bandas II, III, IV, VI, VII, VIII).
- 5 - El patrón de bandas esterásicas no mostró variaciones cualitativas durante el desarrollo post embrionario.

Los estudios realizados acerca del rol de estas esterasas en el metabolismo de insecticidas fosforados señalan que:

- 1 - La intoxicación con paratión, seguida hasta tiempo de muerte, mostró un balance toxicodinámico con un excelente paralelismo entre la inhibición de la colinesterasa de cabeza y la acumulación de paraoxón, metabolito activo. Dentro de este balance, el metabolismo

degradante, objeto fundamental de este trabajo, demostró tener un rol clave, como es sugerido por la cantidad de metabolitos hidrosolubles presentes en abdomen a tiempo de muerte, que representan casi un 50 % del insecticida penetrado.

2 - La incubación de homogenatos de T. infestans con paratión y paraoxón radiactivos mostró una mayor velocidad de degradación para el fosforotionato, siendo más rápida en abdomen que en tórax.

3 - Un análisis de la contribución de cada banda electroforética a la degradación del paratión y paraoxón, sugirió que la banda IX, clasificada como arilesterasa, tiene un rol fundamental en la hidrólisis de compuestos fosforados.

La experimentalmente demostrada importancia de la banda IX justificó su aislamiento electroforético y su caracterización, que dió los siguientes resultados:

1 - La enzima aislada demostró ser electroforéticamente pura, y estar libre de contaminaciones con colinesterasas, carboxiesterasas o acetilesterasas.

2 - Su actividad hidrolítica frente a PTA, pero no frente a TPE, y su inhibición por reactivos de -SH, señalan claramente que la enzima aislada pertenece al tipo de las arilesterasas.

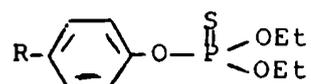
3 - El efecto activador de Co^{++} y Mn^{++} permiten tipificar a esta enzima como perteneciente al grupo II.

4 - La influencia del pH sobre la actividad enzimática mostró la necesidad de un medio básico, y una actividad creciente en función

del pH, hasta el máximo valor ensayado (9,9).

5 - La termoestabilidad de la enzima resultó sorprendente, ya que su actividad no se vió afectada ni aún después de calentarla durante media hora a 100°C.

6 - La actividad hidrolítica de esta enzima sobre ésteres fosforados de estructura general:

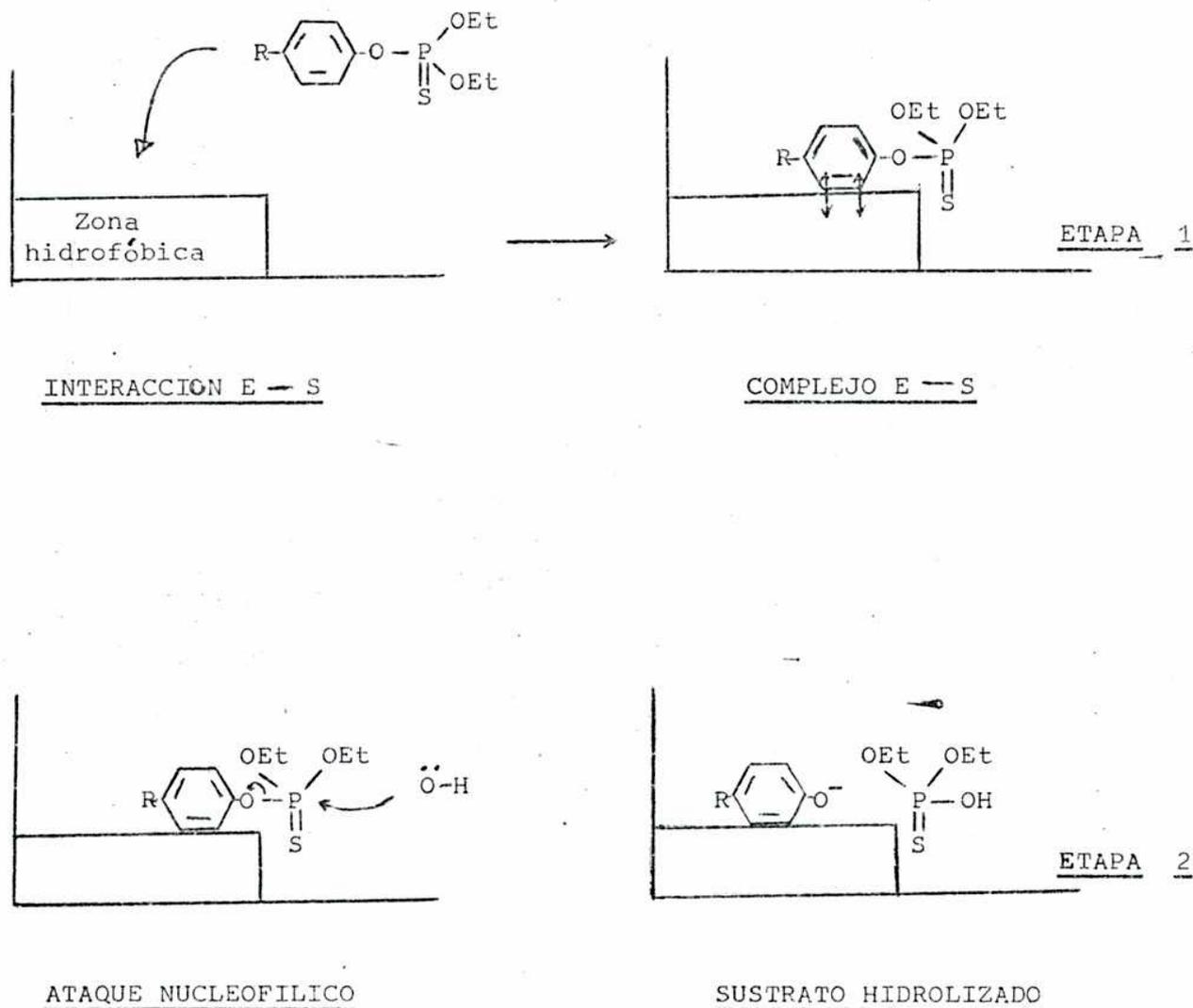


con sustituyentes R de distinta polaridad y distinto efecto electrónico, mostró una relación lineal con los parámetros representativos de efectos electrónicos (σ) e hidrofóbicos (π). Cuando se correlacionaron ambas variables individualmente, sólo la hidrofobicidad presentó buena correlación, sugiriendo una mayor importancia de este efecto.

Las características descriptas para la enzima aislada sugieren un mecanismo de hidrólisis de fosforotiosatos como el que se indica en la Figura 4.

De acuerdo al mismo, habría un primer paso en el cual el sustrato se une a la enzima para formar un complejo enzima-sustrato. Esta unión, descripta como Etapa 1, sería de naturaleza hidrofóbica y se vería favorecida por la interacción entre el grupo aromático del sustrato y la zona hidrofóbica de la enzima. Los sustituyentes del grupo arilo de alta hidrofobicidad harían más eficiente la formación del complejo. Esta suposición se ve corroborada experimentalmente, por haberse determinado que la enzima es una esterasa arí-

FIGURA 4: PROBABLE MECANISMO DE HIDROLISIS DE FOSFOROTIONATOS
POR UNA ARILESTERASA DE T. INFESTANS

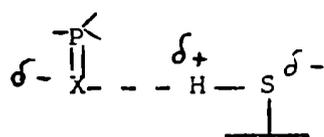


lica, y por el control hidrofóbico que se demostrara para la velocidad de hidrólisis de arilésteres de P con distintos sustituyentes. Lo expuesto justificaría también la mayor eficiencia de la enzima para fosforotioatos que para fosfatos, debido a una mayor hidrofobicidad del $P=S$ frente al $P=O$.

En la Etapa 2, se sugiere un ataque nucleofílico del $-OH$ sobre el fósforo del éster que forma parte del complejo enzima-sustrato. El mecanismo de este paso de la hidrólisis enzimática no sería muy diferente al de una hidrólisis alcalina, excepto por la mayor velocidad de reacción debido a una mayor labilidad del sustrato en el complejo enzima-sustrato que cuando está solo. Como hechos experimentales que apoyan esta hipótesis, se pueden mencionar: el parcial control electrofílico que se demostrara para la hidrólisis enzimática, y que correspondería a la Etapa 2; en efecto, sustituyentes R más electrofílicos (de mayor σ), al hacer más electropositivo al fósforo favorecen el ataque nucleofílico (95). Además, el continuo incremento de la velocidad de reacción a pH crecientes, es coherente con el mecanismo propuesto.

La mayor labilidad del sustrato complejado podría deberse a características hidrofóbicas-hidrofílicas (bimodales) de la enzima, que favorecerían la hidrólisis en medio acuoso de un sustrato liposoluble; o a un efecto electrofílico de algún grupo o grupos pertenecientes o cercanos a la zona hidrofóbica, que, deslocalizando electrones del fósforo, lo hagan más electropositivo, favoreciendo el ataque nucleofílico.

El crítico rol del -SH para la actividad enzimática es difícil de explicar. A modo de hipótesis especulativas, se podría pensar en una asistencia anquimérica de este grupo, que debería estar cercano o pertenecer a la zona hidrofóbica, y que actuaría aumentando la electropositividad del fósforo; como por ejemplo se describe en el siguiente esquema:



Otra posibilidad sería que el o los grupos -SH tuvieran un papel clave en la estructura de la zona hidrofóbica.

En ambos casos su bloqueo implicaría la pérdida de la actividad enzimática. En el primero de ellos, porque la deslocalización de cargas del S u O del sustrato sería necesaria para que el fósforo alcance a ser suficientemente electropositivo, de modo que el ataque del -OH esté más favorecido que en una hidrólisis alcalina. En el segundo caso, el bloqueo del -SH afectaría a la zona hidrofóbica de tal manera que se vería impedida la formación del complejo enzima-sustrato.

Una característica de la enzima difícil de explicar es su sorprendente resistencia al calor. Esta propiedad, difícilmente interpretable como un caso de renaturalización (dadas las drásticas condiciones de calentamiento usadas), mas bien podría interpretarse como un caso de catálisis independiente de la conformación de la proteína y asociado fundamentalmente a características hidrofóbicas de

la macromolécula. Esto recuerda el mecanismo sugerido para transferasas (96), en el cual la enzima provee básicamente un medio hidrofóbico entre sustrato y cofactor, para la reacción de transferencia. Coincidentemente, en algún caso en particular se ha encontrado una actividad de transferasa con una resistencia al calor similar a la hallada en este trabajo para la arilesterasa (Wood E., comunicación personal)

Un estudio como el presente, que lleva a un mejor conocimiento a nivel molecular del mecanismo degradante de insecticidas provisto por una arilesterasa de Triatoma infestans, sienta las bases para el desarrollo futuro de agentes químicos que, bloqueando esta particular actividad enzimática, actúen como sinergistas de insecticidas organofosforados y, por lo tanto, puedan contribuir a un mejor control del insecto vector de la enfermedad de Chagas.

BIBLIOGRAFIA

- 1 - Matsumura F., " Toxicology of Insecticides", 2ª Edición, Plenum Press, New York, 1976.
- 2 - Aldridge W.N. y Reiner E., "Enzime inhibitors as substrates", North Holland, Amsterdam, 1972.
- 3 - Myers D.K., en "The Enzymes", Vol.4, editado por Boyer P., Lardy H. y Myrback K., 2ª edición, Academic Press, New York, 1960.
- 4 - Kapin M. y Ahmad S, Insect Biochem. 10, 331, 1980.
- 5 - Geering K. y Freyvogel T., Comp. Biochem. Physiol. 49B, 775, 1974.
- 6 - Sudderuddin K. y Tan K., Pans 19, 24, 1973.
- 7 - Whitmore D., Whitmore E. y Gilbert L., Proc. Nat. Acad. Sci., 69 69, 1592, 1972.
- 8 - Brandt E., Eberhard H. y Mentlein R., Biochem. Pharmacol., 29, 1927, 1980.
- 9 - Mazur A., J. Biol. Chem. 164, 271, 1946.
- 10 - Aldridge W., Biochem. J., 53, 110, 1953.
- 11 - Metcalf R., Maxon M., Fukuto T., y March R., Ann. Entomol. Soc. Am. 49, 274, 1956.
- 12 - Krueger H. y O'Brien R., J. Econ. Entomol. 52, 1063, 1959.
- 13 - Matsumura F. y Brown A., J. Econ. Entomol. 54, 1176, 1961.
- 14 - Jao L. y Casida J., Pestic. Biochem. Physiol., 4, 456, 1974.
- 15 - Aldridge W., Biochem. J. 56, 185, 1954.
- 16 - Earl C. y Thompson R., Br. J. Pharmacol., 7, 261, 1952.
- 17 - Earl C. y Thompson R., Br. J. Pharmacol. 7, 685, 1952.
- 18 - Johnson M., Biochem. J., 114, 711, 1969.
- 19 - Abou-Donia M., Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 21, 511, 1981.
- 20 - Holmes R. y Masters C., Biochim. Biophys. Acta 132, 379, 1967.

- 21 - Veerabhadrapa P., Marcus O. y Shadaksharaswamy M., Indian J. Exp. Biol. 16, 1158, 1978.
- 22 - Mounter L., Alexander H., Tuck K. y Dien L., J. Biol. Chem. 226, 867, 1957.
- 23 - Becker E. y Barbaro J., Biochem. Pharmacol. 13, 1219, 1964.
- 24 - Houk E. y Hardy J., Insect Biochem. 11, 97, 1981.
- 25 - Gomori G., "Microscopic Histochemistry- Principles and Practice" Universidad de Chicago Press, Chicago, 1952.
- 26 - Aldridge W., Biochem. J. 53, 117, 1953.
- 27 - Kojima K. y O'Brien R., J. Agric. Food Chem. 16, 574, 1968.
- 28 - Yang S., Hodgson E. y Dauterman W., J. Agric. Food Chem. 19, 14, 1971.
- 29 - Hollinworth R., Bull. Wld. Hlth. Org. 44, 155, 1971.
- 30 - Hodgson E. y Casida J., J. Agric. Food Chem. 10, 208, 1962.
- 31 - Krueger H. y Casida J., J. Econ. Entomol. 54, 239, 1961.
- 32 - Hogan J. y Knowles C., J. Fish. Res. Bd Canada 25, 1571, 1968.
- 33 - Jensen-Holm J., Lausen H., Milthers K. y Moiler K., Acta Pharmacol. et Toxicol. 15, 384, 1959.
- 34 - Aldridge W. y Davison A., Biochem. J. 51, 62, 1952.
- 35 - Ellman G., Courtney K., Andres V. y Featherstone R., Biochem. Pharmacol. 7, 88, 1961.
- 36 - Gomori G., J. Lab. Clin. Med 42, 445, 1953.
- 37 - Van Asperen K., J. Insect Physiol. 8, 401, 1962.
- 38 - Lee P. W., Tesis, Universidad de California, Riverside, 1976.
- 39 - Talcott R., Toxicol. Applied Pharmacol., 47, 145, 1979.

- 40 - Booth G. y Metcalf R. L., Science 170, 455, 1970.
- 41 - Tsuji S., Histochemistry 42, 99, 1974.
- 42 - Karnovsky M. y Roots L., J. Histochem. Cytochem 12, 219, 1964.
- 43 - Eto M., "Organophosphorus Pesticides: Organic and Biological Chemistry", CRC Press, Cleveland, 1974.
- 44 - Dauterman W. C., Bull. Wld. Hlth. Org. 44, 133, 1971.
- 45 - Nolan J. y O'Brien R. D., J. Agric. Food Chem. 18, 802, 1970.
- 46 - Kuhr R.J. y Dorough H. W., "Carbamate Insecticides: Chemistry, Biochemistry and Toxicology", 2ªEd., CRC Press, Cleveland, 1977.
- 47 - Hutson D.H., en "Prog. in Drug Metab.", editado por Wiley, 1979.
- 48 - Frawley J.P., Fuyat H.N., Hagan E.C., Blake J.R. y Fitzhugh O. G., J. Pharmacol. Exp. Ther. 121, 96, 1957. —
- 49 - Murphy S.D., Residue Rev., 25, 201, 1969.
- 50 - Plapp F. W. y Tong H.C., J. Econ. Entomol. 59, 11, 1966.
- 51 - Ishaaya I. y Casida J. E., Pestic. Biochem. Physiol. 14, 178, 1980.
- 52 - Crow J.F., Ann. Rev. Entomol. 2, 227, 1957.
- 53 - Matsumura F. y Brown A.W., J. Econ. Entomol. 54, 1176, 1961.
- 54 - Matsumura F., Hogendijk C.J., Entomol. Exp. Appl. 7, 179, 1964.
- 55 - Townsend M.G. y Busvine J.R., Entomol. Exp. Appl. 12, 243, 1969.
- 56 - Matsumura F. y Hogendijk C.J., J. Agr. Food Chem. 12, 447, 1964.
- 57 - Welling W., Blaakmeer P., Ving G.J. y Voerman S., Pestic. Biochem. Physiol. 1, 61, 1971.
- 58 - Oppenoorth F.J., van Asperen K., Science 132, 298, 1960.
- 59 - Motoyama N. y Dauterman W.C., J. Agr. Food Chem. 22, 350, 1974.
- 60 - Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J., J. Biol.

- Chem. 193, 265, 1951.
- 61 - Davis B.J., Ann. N.Y. Acad. Sc. 121, 404, 1964.
- 62 - Jameson G.W., Mac Farlane J. R. y Hogan T.W., Insect Biochem. 6, 59, 1976.
- 63 - Chrambach A., Reisfeld R.A., Wyckoff M. y Zaccari J., Anal. Biochem. 20, 150, 1967.
- 64 - Braatz J.A. y Mc Intire K.R., Preparative Biochem. 7, 495, 1977.
- 65 - Gabriel O., en "Methods in Enzymology", Vol. 22, editado por Colowick S.R. y Kaplan N.O., Academic Press, New York, 1971.
- 66 - Lineweaver H. y Burke D., J. Am. Chem. Soc. 56, 658, 1934.
- 67 - Brocklehurst K., Int. J. Biochem. 10, 259, 1978.
- 68 - Fukunaga K., Fukami J. y Shishido T., Residue Rev. 25, 223, 1969.
- 69 - Dauterman W.C., en "Insecticide Biochemistry and Physiology", editado por C.F. Wilkinson, Plenum Press, New York, 1976.
- 70 - Metcalf R.L. y March R.B., J. Econ. Entomol. 51, 750, 1958.
- 71 - Mengle D.C. y Casida J.E., J. Econ. Entomol. 51, 750, 1958.
- 72 - Wood E.J., Tesis, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, 1978.
- 73 - Dauterman W.C. y Hodgson E., en "Biochemistry of insects", editado por Rockstein, Academic Press, New York, 1978.
- 74 - Hollinworth R.M., Tesis, Universidad de California, Riverside, 1966.
- 75 - Vinopal J.H., Tesis, Universidad de California, Riverside, 1970.
- 76 - Wood E.J. y Picollo M.I., Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 9, 4, 1975.

- 77 - Wilkinson C.F. y Brattsten L.B., Drug Metabolism Reviews, 1, 153, 1972.
- 78 - Cohen S. y Ehrlich M., Toxicol. Appl. Pharmacol. 37, 39, 1976.
- 79 - Plapp F. y Bigley W., J. Econ. Entomol. 54, 103, 1961.
- 80 - Gordon A.H., "Electroforesis of proteins in polyacrylamide and starch gels", Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1975.
- 81 - Ellman G., Arch. Biochem. Biophys. 82, 70, 1959.
- 82 - Ann Silver, "The Biology of Cholinesterase", Frontiers of Biology, 36, 59, 1974.
- 83 - Boyer P.D., J. Am. Chem. Soc. 76, 4331, 1954.
- 84 - Toi K., Bynum E., Norris E. e Itano H., J. Biol. Chem. 242, 1036, 1967.
- 85 - Riordan J. y Vallee B.L., Biochem. 2, 1460, 1963.
- 86 - Ommer G., Fontana A y Anfinsen C., J. Biol. Chem. 245, 1895, 1970.
- 87 - Hixson S.H. y Hixson S.S., Biochemistry 14, 4251, 1975.
- 88 - Vaz W. y Schoellman G., Biochem. Biophys. Acta 439, 194, 1976.
- 89 - Hudson E.N. y Weber G., Biochemistry 6, 4154, 1973.
- 90 - Lehninger A, "Bioquímica", 2ª Edición, Ediciones Omega, Barcelona, 1981.
- 91 - Hammett L.P., "Physical Organic Chemistry", Mc Graw Hill, New York, 1940.
- 92 - Wells P.R., "Linear Free Energy Relationships", Academic Press, New York, 1968.
- 93 - Hansch C. y Fujita T., J. Am. Chem. Soc. 86, 1616, 1964.

- 94 - Fujita T., Iwasa J. y Hansch C., J. Am. Chem. Soc. 86, 5175, 1964.
- 95 - Fukuto T.R., Bull. Wld. Hlth. Org. 44, 31, 1971.
- 96 - Hutson D.H., conferencia presentada en la Research Conference on Bound and Conjugated Pesticide Residues, Vail, Colorado, U.S.A., 1975.