

## Tesis de Posgrado

# Propiedades del sistema colinesterásico de la cabeza del *Triatoma infestans* y su relación con la acción insecticida de compuestos organofosforados

Wood, Edgardo J.

1978

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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

**Cita tipo APA:**

Wood, Edgardo J.. (1978). Propiedades del sistema colinesterásico de la cabeza del *Triatoma infestans* y su relación con la acción insecticida de compuestos organofosforados. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1575\\_Wood.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1575_Wood.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Wood, Edgardo J.. "Propiedades del sistema colinesterásico de la cabeza del *Triatoma infestans* y su relación con la acción insecticida de compuestos organofosforados". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1978.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1575\\_Wood.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1575_Wood.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

FOYMA

Propiedades del Sistema Colinesterásico  
de la cabeza del Triatoma infestans y su  
relación con la acción Insecticida de  
Compuestos Organofosforados

Edgardo J. Wood

Reg. N.º 1575  
ej. 2

Tesis presentada para optar al título de  
Doctor en Ciencias Químicas

1978

1575-4

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Eduardo N. Zerba

Jefe del Grupo Entomotoxicología

CITEFA

Agradezco:

Al Dr.E.N.Zerba con quien me he iniciado en la investigación entomotoxicológica, por su constante interés, sus valiosas opiniones y su intensa dedicación tanto experimental como de dirección en la realización de este trabajo.

Al Dr.J.A.Castro, quien en el pasado supo mostrarme una dimensión de la Toxicología que yo ignoraba, y quien en todo momento colaboró con las facilidades de su laboratorio (Bio-toxicología de CITEFA) y con sus importantes sugerencias.

Al Dr.C.Cardini por su labor como consejero de estudios, su apoyo y su constante acción para allanarme dificultades, y muy especialmente por su ayuda en el orden personal.

A la Lic.M.I.Picollo de Villar por la realización de valiosos experimentos biológicos.

A la Lic.S.A.de Licastro por la síntesis orgánica de varios compuestos utilizados en este trabajo.

A la Dra.E.Segura y al Instituto del Diagnóstico y Tratamiento de la Enfermedad de Chagas-Mazza "Dr.Mario Fatala Chabén, y en especial a la Sra.Magdalena Defis quien tanto hizo por la implementación y mantenimiento de nuestro Insectario.

A aquellas Instituciones que contribuyeron a la realización de este trabajo en mayor o menor medida: SECYT , CIC , Secretaría de Salud Pública, CONICET , y muy especialmente a mi Institución, CITEFA.

Vaya muy especialmente mi agradecimiento a mi esposa, quien con su paciencia y constante apoyo moral sustentó la dedicación y el trabajo de todos estos años para la realización de este trabajo.

al esposito

al padre

ABREVIATURAS UTILIZADAS:

IATC	ioduro de acetiltiocolina
ATC	acetiltiocolina
BTC	butiriltiocolina
IBTC	ioduro de butiriltiocolina
ACh	acetilcolina
BzCh	benzoilcolina
AChE	acetilcolinesterasa
BuChE	butirilcolinesterasa
ChE	colinesterasa
PCh	propionilcolina
A $\beta$ MeCh o MeCh	acetil $\beta$ metilcolina
OP	organofosforado
SNA	sistema nervioso autónomo
SNC	sistema nervioso central
SNPa	sistema nervioso parasimpático
SN	sistema nervioso
GABA	ácido $\gamma$ amino butírico
TOCP	tri-ortocresilfosfato
TEPP	tetraetilpirofosfato
DFP	diisopropilfluorfosfato
DOC	deoxicolato de sodio
SDS	dodecilsulfato de sodio
DDVP	dietildiclorovinilfosfato
$\alpha$ NA	$\alpha$ naftilacetato
$K_m$	constante de Michaelis
$V_{max}$	velocidad máxima de transformación enzimática
SNP	sistema nervioso periférico
SNS	sistema nervioso simpático

INDICE:

Introducción

I) Colinesterasas:definición y nomenclatura.....	1
II) Historia de las Colinesterasas y los Insecticidas Organofosforados.....	2
III) Aspectos enzimológicos.....	6
IIIa) Generalidades.....	6
IIIb) Algunas características.....	7
IIIc) Especificidad por sustrato.....	7
IIId) Inhibidores y Activadores.....	8
IIIe) Inhibición por sustrato,pH y temperatura.....	9
IV) La molécula de Colinesterasa(Peso molecular).....	10
V) Isoenzimas.....	11
VI) Mecanismo de acción de la Acetilcolinesterasa.....	12
VIa) Sitio de unión.....	13
VIb) Sitio esterático.....	15
VIc) Mecanismo de catálisis.....	16
VId) Mecanismo esquemático de acción de la Acetilcolinesterasa,según Krupka.....	17
VII) Reacción de ésteres organofosforados con la acetilcolinesterasa.....	18
VIIa)Recuperación de la actividad enzimática.....	22
VIIb) Envejecimiento de las enzimas fosforiladas('Aging)....	23
VIII) Acetilcolinesterasa de insectos.....	24
IX) Sistema nervioso de insectos.....	30
X) Efectos de los compuestos organofosforados en insectos.....	37
XI) La vinchuca y la enfermedad de Chagas.....	42
Objetivos de este trabajo.....	45

PARTE EXPERIMENTAL:

Materiales y Métodos

I) Material biológico.....	47
II) Obtención de la Acetilcolinesterasa de cabeza de <u>Triatoma infestans</u> .....	47
IIa) Disección.....	47
IIb) Homogenización.....	47
IIc) Purificación de la colinesterasa de cabeza de <u>T.infestans</u> .....	48

IIId) Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	50
III) Medición de la actividad colinesterásica.....	57
IIIa) Método cinético espectrofotométrico.....	57
IIIb) Método cinético titrimétrico.....	58
IV) Caracterización de la actividad colinesterásica.....	60
IVa) Curvas de actividad específica vs concentración de sustrato.....	60
IVb) Determinación de $K_m$ y $V_{max}$ .....	61
IVc) Curvas de actividad vs pH.....	61
IVd) Curvas de actividad vs temperatura.....	62
IVe) Tiempo de inactivación a temperatura constante.....	62
IVf) Determinación de la actividad colinesterásica frente a distintos sustratos.....	62
V) Inhibición "in vitro".....	63
Va) Propiedades de los inhibidores.....	63
Vb) Inhibición de la actividad colinesterásica.....	68
Vc) Determinación de $I_{50}$ .....	70
Vd) Determinación de $k_i$ .....	71
VI) Inhibición de la Acetilcolinesterasa de cabeza de <u>T.infestans</u> "in vivo" .....	72
VIa) Determinación bioquímica de la inhibición "in vivo" por intoxicación con paration.....	72
VIb) Determinación en gel de poliacrilamida de la inhibición "in vivo" por intoxicación con paration....	73
VIc) Histopatología de la intoxicación por paration.....	74
VII) Evaluación de la toxicidad de los compuestos organofosforados.....	75
VIIa) Determinación de la Dosis Letal 50( $LD_{50}$ ).....	75
VIIb) Tratamiento estadístico de los resultados.....	77
VIII) Otras determinaciones.....	77
VIIIa) Determinación de proteínas.....	77
VIIIb) Determinación de lípidos.....	77
 <u>Resultados y discusión:</u>	
I) Medición de la actividad colinesterásica.....	78
II) Extracción y solubilización de la actividad colinesterásica.....	82
IIa) Medios de extracción.....	82



IIb) Efecto del butanol.....	84
IIc) Efecto de los detergentes.....	86
III) Purificación de la Acetilcolinesterasa de cabeza de <u>T.infestans</u> .....	88
IV) Caracterización de la Acetilcolinesterasa de cabeza de <u>T.infestans</u> .....	95
IVa) Variación de la actividad colinesterásica con la con- centración de sustrato.Determinación de $K_m$ y $V_{max}$ .....	97
IVb) Respuesta de la actividad colinesterásica con dis- tintos sustratos frente a diferentes inhibidores.....	104
IVc) Variación de la actividad colinesterásica con el pH.....	109
IVd) Variación de la actividad colinesterásica con la temperatura.....	113
IVe) Actividad colinesterásica frente a distintos sustratos.....	117
IVf) Composición enzimática de los preparados crudo y purificado.....	119
IVg) Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida.....	120
V) Actividad y susceptibilidad del sistema colinesterásico de cabeza de <u>T.infestans</u> a compuestos organofosforados en función del desarrollo post-embrionario.....	125
Va) Evolución de la actividad colinesterásica.....	125
Vb) Evolución de la susceptibilidad de la Colinesterasa a inhibidores organofosfatos.....	128
VI) Modo de acción de los compuestos organofosforados en <u>T.infestans</u> .....	130
VII) Toxicidad de los compuestos organofosforados en <u>T.infestans</u> .....	142
<u>Resumen y Conclusiones</u> .....	156
<u>Bibliografía</u> .....	161

*Introducción*

## INTRODUCCION

### I) COLINESTERASAS: DEFINICION Y NOMENCLATURA

Desde su descubrimiento y durante aproximadamente 40 años las colinesterasas (ChE) han sido descritas de muchas formas. (1,2 y 3)

Una definición que involucra sus principales características es que las ChE son hidrolasas que, bajo condiciones óptimas, catalizan la hidrólisis de ésteres de colina a una velocidad mayor que otros ésteres y que son inhibidas por bajas concentraciones ( $10^{-5}$  M o menos) de eserina y de compuestos organofosforados (OP).

Como en todas las definiciones hay excepciones, sobre todo en lo que se refiere a la susceptibilidad a inhibidores. Por ejemplo en el cerebro de rana, la hidrolasa presente cumple con los criterios para ChE, pero no es totalmente inhibida por eserina aún en concentraciones de  $10^{-4}$  M. (4)

Esta falta de conformidad subraya un punto importante: Las ChE no son idénticas en todas las especies. Ellas constituyen una familia de enzimas que pueden clasificarse en dos amplios grupos, aquellas que hidrolizan preferentemente acetil-ésteres tales como acetilcolina (ACh) y aquellos que prefieren otros tipos de ésteres como la butirilcolina (BuCh).

Nuevamente esta división no es absoluta y es más aplicable a los mamíferos que a las otras especies.

La denominación de las ChE representa una larga controversia. En 1952 Stedman et al. (5) aislaron una enzima a partir del suero de caballo que hidrolizaba la ACh y la llamaron colina-esterasa. Mencil y Hudney (6) mostraron más tarde que el suero contenía dos enzimas que eran capaces de hidrolizar la ACh.

La mayor parte de la actividad era debido a una enzima no específica, es decir que no hidrolizaba solamente ésteres de colina sino que también lo hacía con ésteres no colínicos, como la tributirina.

El resto de actividad se atribuía a una segunda enzima, que se pensaba sólo actuaba sobre ésteres de colina. Esta última se parecía mucho a la enzima específica que ellos mismos encontraron en cerebro y que Alles y Hawes (7) encontraron en eritrocitos.

Mendel y Rudney (6) y (8) sugirieron el nombre de colinesterasa o colinesterasa verdadera para esta enzima, y el nombre provisorio de pseudocolinesterasa a la no específica.

Con los años otros nombres se introdujeron. La colinesterasa verdadera fue llamada también; ChE I, específica, eritrocítica, tipo-e, aceto-, o acetil colinesterasa. En 1964 la Comisión de Enzimas propuso el nombre de acetil colina hidrolasa (E.C 3.1.1.7) como nombre sistemático, y como nombre trivial el de acetilcolinesterasa.

El término pseudocolinesterasa sugerido por Mendel y Rudney ha sido ampliamente usado para los tipos no específicos de enzimas, pero no obstante, siempre estuvo cuestionada esa denominación.

Glick (9) señaló que "pseudo" generalmente implica "falso" y esto en su opinión, hacía el término inaceptable.

En la tabla 1 se resumen algunas propiedades y nomenclatura de las colinesterasas.

## II) HISTORIA DE LAS COLINESTERASAS Y LOS INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

Las colinesterasas tienen una historia interesante, su existencia fue predecida por Dale en 1914 (10), pero 15 años antes, él y Dudley demostraron que la ACh era un constituyente natural de los tejidos animales. Dale hizo su predicción en base a la desaparición del efecto producido por una inyección de ACh en un animal. Él escribió "En la sangre a la temperatura corporal no parece improbable que exista una esterasa que contribuya a eliminar un éster activo de la circulación y la restauración de la condición de sensibilidad original". Loewi y Navratil en 1926 (11) proveyeron base experimental a esta observación cuando reportaron que si la eserina estaba presente, el efecto de la ACh sobre el corazón de rana era más prolongado. Ellos atribuyeron este resultado, a la inhibición por eserina de la enzima normalmente responsable de la destrucción de la ACh. Seis años más tarde Stedman et al. (5) prepararon el primer extracto crudo de colinesterasa a partir de suero de caballo.

TABLA 1

ALGUNAS PROPIEDADES Y NOMENCLATURA DE COLINESTERASAS

	. Acetilcolinesterasa	. Colinesterasa
Nombre sistemático	acetilcolina-acetilhidrase (3.1.1.7)	Acilcolina acilhidrase (3.1.1.8)
Nombres alternativos	Colinesterasa específica, verdadera, eritrocítica, tipo e, AChE.	Colinesterasa no específica, de suero, tipo s, BuChE, PrChE.
Fuente	Órgano eléctrico, tejido nervioso, eritrocitos, veneno de cobra.	suero, páncreas, corazón, hígado.
Especificidad por sustratos	ACh >> PrCh > BuCh D-acetil-β-metilcolina. acetil ésteres.	BuCh, PrCh > ACh Benzoilcolina Butiril y Propionil ésteres.
Inhibida por:		
Exceso de sustratos	+ (> 3.10 <sup>-3</sup> M)	- (a 10 <sup>-1</sup> M)
Amonio cuaternario	++	+
Iso-OMPA*	+	++

\* N,N'-diisopropilfosforodiamida anhidrido.

Tres años después Stedman y Stedman (12) encontraron colinesterasa en el cerebro de gato y reportaron que la concentración en el ganglio basal era dos veces la de la corteza cerebral.

Durante el mismo período los fisiólogos, principalmente Dale y sus colegas trataron de establecer si la ACh actuaba como un neurotransmisor.

Una condición necesaria para la teoría de la transmisión colinérgica era que la ACh liberada como transmisor fuera destruida durante el breve período refractario. Mientras se intentaba suponer que la colinesterasa cumplía esa función, no había evidencia de que la enzima estuviera en los sitios de importancia a concentraciones adecuadas. Sin embargo, en 1937 Marnay y Nachmanshon trabajando en músculo de rana demostraron que casi toda la colinesterasa presente en esos tejidos estaba localizada en las terminales nerviosas (13) y (14).

Un año después publicaron evidencia sobre la adecuada concentración de enzima para hidrolizar la ACh con la rapidez demandada por la teoría (15). Durante la segunda guerra mundial, las colinesterasas adquirieron un significado especial en el contexto de la guerra química.

Muchos de los agentes desarrollados como potenciales gases de guerra eran poderosos inhibidores de estas enzimas.

Desde entonces los insecticidas organofosforados se ubicaron entre las armas más poderosas que posee el hombre para controlar las especies de artrópodos perjudiciales, los que en muchos casos resulten una amenaza para los alimentos y la salud de la humanidad. Durante los pasados 20 años los insecticidas orgánicos, incluyendo los ésteres organofosforados, DDT, y otros compuestos organoclorados han resultado satisfactorios como agentes primarios de control de insectos.

Aunque han sido de un innegable beneficio para el hombre, su uso ha creado serios problemas. Por ejemplo el DDT y otros hidrocarburos clorados debido a su persistencia en el medio ambiente, constituyen una real amenaza para la calidad de nuestro ambiente y de esta manera se justifican los argumentos presentados por ecólogos, conservacionistas y el público en general advocando contra su uso continuado.

Los ésteres organofosforados aunque mucho menos persistentes que los hidrocarburos clorados, resultan a menudo bastante tóxicos para los animales de sangre caliente y deben usarse con discreción. Aunque la solución no parece fácil, existe un esfuerzo concertado entre los científicos para aliviar algunos problemas de los pesticidas orgánicos. Un enfoque prometedora, es el uso de insecticidas selectivos con acción letal directa sólo contra las especies plagas e inocuo para las formas de vida beneficiosas o deseables. Mucho del peligro inherente a los poderosos organofosforados anticolinesterásicos para con el hombre y otros animales podría ser eliminado con el exclusivo uso de insecticidas selectivos.

Desafortunadamente, sólo un pequeño número de insecticidas OP selectivos han sido desarrollados hasta el momento.

Sin embargo, las implicancias generadas por estos pocos compuestos selectivos ha preparado a los toxicólogos para redoblar sus esfuerzos en este sentido. Los insecticidas selectivos serán necesarios si queremos un medio ambiente libre de los peligros de las sustancias químicas tóxicas.

Apenas terminada la guerra, el estudio de las ChEs recibió un nuevo estímulo con la introducción de una técnica histoquímica para su detección (16) y (17). Esto permitió las correlaciones entre los hallazgos bioquímicos, fisiológicos y morfológicos. En los últimos tiempos para investigar la ChE se usaron técnicas que incluyen microscopía electrónica, radioquímica y resonancia magnética nuclear. Estos métodos resolvieron interrogantes pero generaron otros nuevos. En temas como el de las isoenzimas y el peso molecular de las ChEs, se puede apreciar exactamente cuán lejos se está hoy día de conocer con propiedad sus características físicas, y de comprender sus sutilezas fisiológicas.

---

### III) ASPECTOS ENZIMOLOGICOS

#### IIIa) GENERALIDADES

Enzimólogos y fisiólogos tienden a enfocar las ChEs en forma bastante diferente. Los enzimólogos se interesan en las enzimas por sí mismas, quieren conocer su estructura proteica, el peso molecular, identificar sus sitios activos y las isoenzimas, y determinar la especificidad por sustratos y todas las constantes cinéticas que caracterizan el potencial hidrolítico de una enzima in vitro.

Los fisiólogos por el contrario pueden tener poco interés por las enzimas en sí. Para ellos podría ser suficiente conocer que in vivo la AChE es la responsable de hidrolizar la ACh en las sinapsis colinérgicas y que la presencia de AChE puede ayudar a la identificación de caminos colinérgicos. Es decir, están interesados principalmente en qué hace la enzima más que en cómo lo hace.

Las características establecidas para una preparación enzimática purificada en tubo de ensayo, aunque académicamente importante, pueden resultar de valor limitado para la enzima que realiza su función fisiológica normal en el tejido nervioso intacto.

Mientras que los fisiólogos pueden argumentar que el tratamiento de los enzimólogos de los aspectos bioquímicos puede resultar demasiado esotérico, los enzimólogos pueden argumentar con similar justificación que los fisiólogos deberían poseer algunos conocimientos básicos de la AChE si van a invocar su acción para justificar sus hallazgos experimentales.

La toxicología, como un cuerpo del conocimiento que estudia el mecanismo de acción tóxica de distintas sustancias, no pueden apartarse de ambos enfoques, los necesita por igual y los compatibiliza.

Hollingworth R.M. sin entrar a debatir sobre la utilidad de la purificación de las ChEs y el estudio de sus propiedades, lo que se reconoce como trabajo esencial, recuerde mantener siempre presente que lo que puede resultar bueno para la bioquímica puede no serlo para la toxicología (18).



Estas y otras enzimas merecen estudios a todos los niveles si se pretende entender su significado toxicológico en los organismos vivos.

En particular las propiedades de las enzimas unidas a membranas (como las colinesterasas) pueden sufrir cambios durante el proceso de solubilización. Por lo tanto una enzima cristalizada puede resultar lo perfecto para un bioquímico pero puede no tener similitud con la enzima original in vivo (18) lo que la alejaría del interés toxicológico.

### IIIb) ALGUNAS CARACTERÍSTICAS

Las ChEs se pueden definir como aquellas enzimas que bajo condiciones óptimas para cada sustrato, hidrolizan ésteres de colina más rápido que otros ésteres. Otra característica distintiva de las ChEs en la mayoría de las especies es su susceptibilidad a la inhibición por eserina en concentraciones de  $10^{-5}$  M o menores. Tanto las arilesterasas ( EC 3.1.1.2; llamadas antes A-esterasas) como las carboxilesterasas ( EC 3.1.1.1; llamadas antes B-esterasas o aliesterasas ) son resistentes a concentraciones mucho mayores de eserina.

Las ChEs son también inhibidas por los compuestos OP ,pero esa propiedad no es exclusiva ,pues es compartida por las carboxilesterasas.

Se distingue entre acetilcolinesterasas ( EC 3.1.1.7 ) y pseudocolinesterasas ( EC 3.1.1.8 ), los criterios para esta división incluyen diferencias en las especificidades por sustratos e inhibidores ( tabla I ).

### IIIc) ESPECIFICIDAD POR SUSTRATO

El sustrato natural de la AChE de vertebrados es la acetilcolina que es el éster de colina predominante en los tejidos. La acetil $\beta$ metilcolina se hidroliza considerablemente más lento que la ACh pero es más específica de la AChE ya que otras colinesterasas no la hidrolizan apreciablemente (6) y (8). La actividad de la AChE respecto a la butirilcolina es muy baja comparada con la de la ACh, sin embargo en ciertas especies incluyendo las ratas se ha observado que hidrolizan la BuCh significativamente (19). Por otro lado la benzoilcolina es apenas hidrolizada por la AChE de mamíferos, y es por ello que se ha usado como sustrato específico de las pseudocolinesterasas.

En general las AChEs hidrolizan ésteres de colina y de tiocolina con semejante habilidad, pero también son capaces de hidrolizar ésteres no cargados, sin nitrógeno cuaternario, como el análogo de la ACh. el : 3,3 dimetilbutilacetato. La AChE de eritrocitos humanos demostró que su actividad tanto con sustratos alifáticos como con los colínicos es el grupo acilo quien determina la velocidad de hidrólisis, siendo los acetatos los óptimos, los propionatos y formatos más lentos, y recién después los butiratos. Esteres aromáticos y arilésteres tales como fenilacetato y naftilacetato son hidrolizados también por las AChE (2).

#### IIIId) INHIBIDORES Y ACTIVADORES

Las AChEs pueden distinguirse de las pseudo-ChE usando los llamados inhibidores específicos. Algunos de ellos como el BW284C51 inhibe la AChE pero no la pseudo-ChE, mientras que otros como el clorhidrato de etopropazina actúan a la inversa, siendo resistente la AChE y susceptible la pseudo-ChE. Inhibidores diferenciales como el diisopropilfosfofluoridato (DFP) afecta a ambos tipos de enzimas, pero a distintas concentraciones, las AChEs necesitan concentraciones mayores que las pseudo-ChE para una inhibición efectiva en todas las especies ensayadas.

Además de los inhibidores del tipo de los carbamatos y OP que son efectivos a bajas concentraciones, hay muchos otros agentes que reducen la actividad enzimática. Entre éstos se encuentran, la acetona (20), cinc y níquel (21), y varios aniones incluyendo el fluoruro.

El cobre es también inhibidor, y en una época se creía que la actividad de la AChE dependía de grupos -SH libres, pero se ensayaron agentes como el iodoacetato y el glutatión oxidado, conocidos por reaccionar con grupos -SH libres y el resultado no mostró inhibición significativa (22).

Son menos numerosas las sustancias que activen la AChE, entre ellas podemos citar al cadmio (23), magnesio (21), litio, potasio y sodio (24).

El magnesio parece ser el más potente, pero como Cohen y Oosterbaan (25) señalan, los efectos de los iones varían mucho con las condiciones de los experimentos.

En el caso del sodio y del potasio no sólo activan la enzima sino que aumentan la concentración de sustrato óptimo. Mendel y Rudney (26) sugirieron que el efecto del potasio puede tener algún significado fisiológico en la regulación de la actividad de la AChE con la ACh liberada en las terminales nerviosas.

El calcio es un activador de la pseudo-ChE pero no tiene efecto sobre la AChE (21) perteneciente a eritrocitos de caballo, pero en cambio activa la AChE de eritrocitos humanos y bovinos (27) y (28) .

### IIIe) INHIBICION POR SUSTRATO + pH - y TEMPERATURA

Una característica muy importante de la AChE es su susceptibilidad a la inhibición cuando el sustrato está presente en exceso, esto la distingue de la pseudo-ChE.

La temperatura óptima para la AChE de tejido de mamífero es entre 37° y 40°C (20). De acuerdo con Shukuya (29) y Wilson y Cabib (30) en un rango de 15°-30°C la constante de Michaelis ( $K_m$ ) es independiente de la temperatura. La inactivación de la enzima en tejidos de mamíferos parece comenzar a los 56°C (31) y a 70°C se pierde toda actividad colinesterásica.

La liofilización no reduce la actividad enzimática, lo que tiene implicancias prácticas muy útiles. El pH óptimo varía con la fuente de enzima, pero para la mayoría de los preparados con ACh como sustrato, está en un rango de 8,0-8,5 (25). La curva que representa la variación de la actividad de la AChE con ACh respecto al pH. tiene forma de campana y ha sido tomada como evidencia que en el sitio esteréico del centro activo de la enzima hay un grupo básico y otro ácido.

Los puntos isoeléctricos varían de especie en especie, para la AChE de anguila eléctrica es de 5,1-5,2 (32) mientras que para eritrocitos de caballo es de 4,65-4,70 (20) .

#### IV) LA MOLECULA DE COLINESTERASA

##### PESO MOLECULAR

Aunque lo que más se conoce es la composición del sitio activo, existen algunos datos del resto de la molécula y de la enzima como un todo. Se conoce la composición de aminoácidos de una preparación pura de AChE de anguila eléctrica (33) .

Las primeras estimaciones del peso molecular de la AChE de anguila estaban en el orden de los millones (34) . Lawler en 1963 (35) extrajo un polímero de AChE con una actividad específica de 425 mmoles de ACh/mg de proteína por hora y un peso molecular de 25 y 31 millones calculados por viscosidad y por dispersión de luz respectivamente. A medida que los métodos de purificación se fueron mejorando, los pesos moleculares disminuyeron y en cambio aumentaron las actividades específicas.

Leuzinger et al. en 1969 (36) obtuvieron una preparación cristalina y homogénea electroforéticamente de 260.000 de peso molecular y una actividad de 730 mmoles de ACh/mg de proteínas por hora .

La experimentación para determinar peso molecular indicó que la molécula de AChE puede ser dividida en subunidades, pero lo que aún no está claro es qué significado tiene esto, respecto a la función enzimática.

Leuzinger (36 y 37) sugirió que la AChE era un dímero formado por dos protómeros cada uno de los cuales estaba compuesto por dos cadenas polipeptídicas no idénticas. De acuerdo con el grupo de Leuzinger cada molécula de AChE posee solamente dos sitios activos y ellos proponen dos posibles esquemas que vinculan la estructura molecular con la función. En el primero cada centro activo debería ser construido por la cadena alfa que provee la serina para el sitio esterático, y la cadena beta que provee el sitio aniónico .

Como una alternativa ellos sugieren que la cadena alfa contribuiría al centro activo proveyendo el sitio aniónico y el sitio esterático, mientras que la cadena beta sería de función desconocida, pero podría representar el receptor de la ACh. .

## V) ISOENZIMAS

El hecho que una enzima pueda existir en más de una forma molecular ha sido aceptado desde hace años. La existencia de formas moleculares múltiples fue detectado por primera vez utilizando electroforesis.

Cuando una preparación enzimática corrida en gel de almidón se resuelve en un número de bandas con distintas movilidades pero catalíticamente equivalentes, a estas formas moleculares de la enzima se las llama isoenzimas. Entonces isoenzimas resultan ser las formas moleculares diversas de una misma enzima. Algunos autores como Eldefrawi (38), distingue las isoenzimas (formas moleculares diversas) de los agregados de distintos tamaños de una misma forma molecular. Otros no hacen esta distinción e incluyen como isoenzimas a las aglomeraciones interconvertibles de una forma común. Grafius y Millar (39) demostraron que la formación de esos agregados reversibles en los preparados de AChE de Electrophorus se ve influenciada por las condiciones experimentales de pH y fuerza iónica. Si el fenómeno de agregación evidenciable en tubo de ensayo tiene que ver con la situación in vivo no está claro, pero el agregado o el grado de agregación debe tenerse muy en cuenta en los estudios cinéticos in vitro.

Main (40) trabajó con pseudo-ChE de humano y de suero de caballo y con AChE de eritrocitos de bovino y encontró que la cinética de inhibición podía ser afectada por el estado de agregación. El patrón isoenzimático de algunas enzimas puede cambiar con el desarrollo como por ej. la láctico deshidrogenasa. Esto podría reflejar diferencias en la oxigenación de los tejidos embrionicos y adultos. (41)

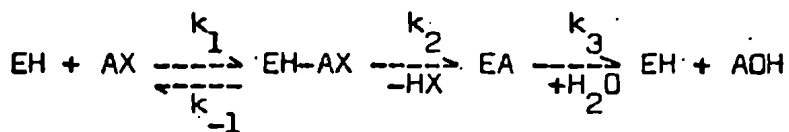
Cambios durante el desarrollo en la naturaleza de las colinesterasas han sido estudiados por su especificidad con sustratos histoquímicos en tejido cerebral de varias especies (42 y 43).

El significado funcional de las distintas formas isoenzimáticas de la AChE aún no está claro. Grafius y Millar (39) teniendo en cuenta la influencia de la agregación de la AChE del pH y la fuerza iónica, sugieren muy tentativamente que este fenómeno podría tener alguna importancia en el control de la permeabilidad de las membranas.

La existencia de AChE en varios estados de solubilidad es de importancia práctica en la experimentación histoquímica y puede explicar porqué algunos métodos son útiles para demostrar AChE en las placas terminales y no son satisfactorios para tejido ganglionar y menos aún para sistema nervioso central (SNC) (44).

VI) MECANISMO DE ACCION DE LA ACETILCOLINESTERASA

En general la hidrólisis de los ésteres de colina (AX) por las ChE (EH) se puede expresar según el esquema siguiente:



Donde EH es la enzima, AX es el sustrato, EH-AX es el complejo de Michaelis Menten, EA es la enzima acilada, y AOH es el amino alcohol (en el caso de la ACh es la colina).

Con sustratos que se hidrolizan muy rápido como la ACh y la ATC el paso limitante es la desacetilación ( $k_3 < k_2$ ), pero con sustratos muy pobres la acetilación es más lenta que la desacetilación ( $k_2 < k_3$ ).

Las colinesterasas no poseen ni necesitan grupo prostético o metálico, aunque se ha reportado que la actividad es aumentada por cationes como  $Mg^{++}$  y  $Ca^{++}$ .

Por lo tanto la actividad catalítica se debe exclusivamente a la estructura de la molécula de proteína. La zona activa de la molécula contiene dos sitios activos, uno fija el sustrato y tiene que ver especialmente con la especificidad (sitio de unión o sitio aniónico), y el otro cataliza el proceso hidrolítico del sustrato (sitio esterático o sitio catalítico) (45).

Existe una influencia del pH en la  $V_{max}$  y en la  $K_M$  lo cual es lógico ya que las reacciones que ocurren en la catálisis involucran grupos iónicos tanto de la enzima como del sustrato y el grado de ionización es dependiente del pH.

La relación entre la constante de ionización  $K_a$  (usualmente expresada como su logaritmo negativo,  $pK_a$ ) y el pH este claramente explicado por O'Brien (46).

La curva que representa la dependencia de la actividad con el pH tiene forma de campana, y un máximo para la AChE de mamíferos alrededor de 8,5. Esta forma de la curva fue interpretada por Wilson y Bergmann (47 y 48) como evidencia de la existencia de un grupo ácido y otro básico en el sitio activo de la enzima.

Un fenómeno que ocurre con otras enzimas pero que es de particular interés en el caso de las ChEs es la inhibición por sustrato (49).

En los gráficos de velocidad de reacción versus el logaritmo negativo de la concentración de sustrato se observe la clásica curva en forma de campana con un máximo en el caso de la AChE; y una curva sigmoide en el caso de la pseudo-ChE.

La AChE es inhibida por un gran exceso de concentración de sustrato y la pseudo-ChE no. La AChE da una curva en forma de campana ya sea que se grafique versus la concentración de sustrato o el logaritmo negativo de la concentración de sustrato. En este último caso, la campana es simétrica y el eje de simetría corresponde a la concentración óptima, la que para la mayoría de los preparados es de  $2,5-3,0 \times 10^{-3}$  M de acetilcolina.

#### VIa) SITIO DE UNION

La especificidad por sustratos que contienen grupos catiónicos, sugiere la presencia de un grupo activo aniónico donde se fija el sustrato por fuerzas electro-státicas y se dispone espacialmente de forma que se produce un mejor ataque del sitio catalítico.

La colina y las sales de amonio cuaternario son inhibidores de la AChE, pero ese grupo aniónico no parece importante para otros sustratos como la butirilcolina (50).

La inhibición por colina y tetraetilamonio a pH menor de 7,0 disminuye, esto se puede explicar pues para algunos autores el  $pK_a$  del sitio aniónico sería de 6,2 aproximadamente, lo cual implicaría que a pH más bajos que el  $pK_a$  estaría en la forma protonada y esto conspiraría contra la unión

del inhibidor. El ión tetralquilamonio, sin embargo no se une solamente por fuerzas coulombicas, sino que una parte considerable de su afinidad es debida a fuerzas de unión hidrofóbicas de los grupos alquílicos. (45) Los grupos metilo de la ACh contribuyen también en forma considerable a la unión del sustrato a la proteína enzimática por fuerzas hidrofóbicas entre los grupos alquílicos y la porción no polar de la molécula proteica. En resumen, el sitio aniónico fija el sustrato por fuerzas electrostáticas y por fuerzas hidrofóbicas, y existe una pequeña contribución en la fijación debida a la interacción entre el sitio esterático y el grupo carbonilo del sustrato.

La AChE cataliza también la hidrólisis de ésteres no catiónicos como el acetato de fenilo, acetato de indoxilo, acetato de indofenilo.

Estos sustratos no se unen todos al mismo sitio de la ACh. Un alquilante como el 2-cloro-N-cloroetil-N metil-2 feniletilamina (MCP) inhibe completamente la actividad de AChE frente a la ACh, debido probablemente a la alquilación del sitio aniónico, pero por el contrario la actividad para el acetato de indofenilo se exalta (51).

La alquilación causa moderada inhibición de la hidrólisis del acetato de fenilo y el acetato de indoxilo.

Estos efectos no se deben a cambios en el  $K_m$  (formación complejo enzima-sustrato) sino a cambios en  $k_2$  (constante de acilación de la enzima).

O'Brien propuso tres sitios de unión distintos para la AChE;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (52) sitio  $\alpha$ : (es el aniónico) a él se unen alquilantes como el MCP y sustancias catiónicas como la ACh, tetraetilamina, colina, etc. Estos se llaman agentes  $\alpha$ .

sitio  $\beta$ : se unen a él los organofosforados, carbamatos, acetato de fenilo y acetato de indoxilo. Es una porción hidrofóbica y la interacción con estos sustratos e inhibidores se debilita por agentes  $\alpha$ .

sitio  $\gamma$ : se unen a él, acetato de indofenilo, fluoruro de acetilo, fluoruro de dimetilcarbamil, fluoruro de dimetilsulfonilo. Se postula que la acción de los agentes  $\alpha$  inducen el corrimiento del sitio  $\gamma$  a la vecindad del sitio esterático por cambio configuracional.



## VIb) SITIO ESTERATICO

Según Krupka hay tres grupos catalíticos en el sitio esterático, dos grupos básicos  $pK_a$  :5,5 y  $pK_a$  :6,3 y un grupo ácido de  $pK_a$  :9,2-10,4(53).

De acuerdo a los  $pK_a$  de los grupos involucrados en la proteína es muy probable que el grupo imidazólico de la histidina sea el responsable de los grupos básicos( $pK_a$  :6).

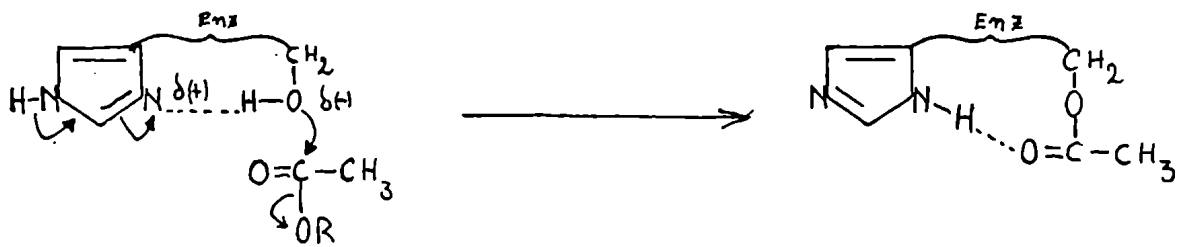
Evidencias indirectas de esto fueron por ejemplo el tratamiento de la quimotripsina (serina-proteasa que se obtiene al estado puro más fácilmente) por fotooxidación selectiva con lo que se destruyó la histidina resultando una enzima sin actividad enzimática ni reactividad con organofosforados (54).

Las serinas proteasas y colinesterasas tratadas con DFP-<sup>32</sup>P y luego hidrolizadas dieron una fracción o-fosforil serina. Las secuencias de aminoácidos alrededor de la serina para todas las hidrolasas sensibles a OP presentan un aminoácido dibásico (glutámico en estererasas y aspártico en proteasas) precediendo a la serina, la que es seguida por alanina en estererasas y glicina en proteasas(55,56 y 57)

Estos descubrimientos sugieren que el OH de la serina en la secuencia GLU-SER-ALA y ASP-SER-GLI juega un rol importante en el sitio catalítico de estererasas y proteasas.

## VIc) MECANISMO DE CATALISIS

La serina libre no cataliza la hidrólisis de ésteres ni reacciona con los compuestos OP, el grupo OH debe estar activado por otro grupo de aminoácidos de la molécula de proteína. El imidazol de la histidina activa el OH de la serina, se forma un enlace hidrógeno entre el N con doble ligadura del anillo imidazólico no protonado y el OH de la serina, creando una carga parcial negativa sobre el oxígeno, el que puede atacar nucleofílicamente el carbonilo del sustrato o el fosforilo de los inhibidores (58).

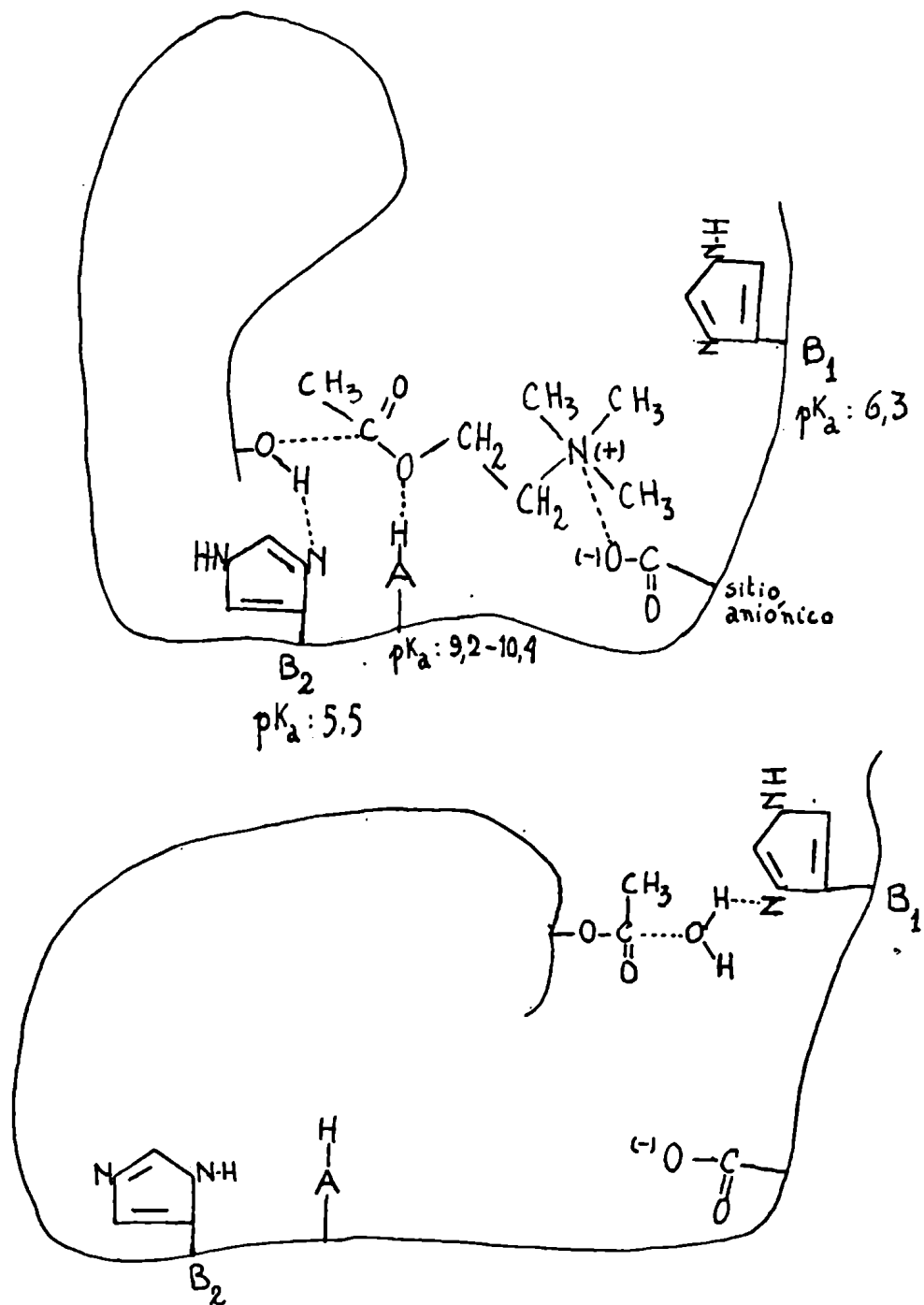


La serina acilada formada se hidroliza rápidamente. Krupka mostró que uno de los sitios básicos ( $pK_a$ :5,5) funciona en la acetilación del OH de la serina, y el otro grupo básico ( $pK_a$ :6,3) lo hace en la desacetilación. Este grupo imidazol activa una molécula de agua, la que ataca la acetil serina sustrayéndole un protón de manera similar a la activación del OH de la serina en el paso de acetilación.

La zona activa de la enzima debe tener una configuración estérica adecuada de modo de permitir el ataque combinado de los grupos activos que no están adyacentes como el imidazol y el OH de la serina. El mecanismo más probable es el propuesto por Krupka y en cuyo esquema el grupo ácido se correspondería con un OH fenólico de la tirosina ( $pK_a$ :9,2-10,4)(53).

\_\_\_\_\_o\_\_\_\_\_

VI d) MECANISMO ESQUEMATICO DE ACCION DE LA ACETILCOLINESTERASA

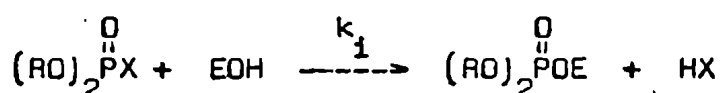


VII) REACCION DE ESTERES ORGANOFOSFORADOS CON LA ACETILCOLINESTERASA

Inhibición de la actividad colinesterásica:

A diferencia de las sales de amonio cuaternario que son inhibidores reversibles, los ésteres organofosforados son inhibidores irreversibles que basan su acción en la fosforilación del sitio esterático (el OH de la serina). La reacción básicamente corresponde a la acilación del sitio de hidrólisis enzimática del sustrato natural pero la gran diferencia radica en que, mientras la enzima acetilada tiene una vida media de 0,1 msec. la enzima fosforilada es de  $10^7$  veces mayor (59).

La reacción es progresiva y depende de la temperatura (60), se puede esquematizar de la siguiente forma:



$k_i$  : es la constante de velocidad bimolecular.

Como la concentración del inhibidor (i) es mucho mayor (al menos 10 veces) que la de la enzima (e) en la mayoría de los experimentos, y casi constante durante el curso de la reacción, sigue una cinética de pseudo primer orden. De esta manera la velocidad de formación de la enzima fosforilada es:

$$\frac{dp}{dt} = k_i (e-p) \cdot i$$

Entonces teniendo en cuenta que la actividad enzimática es proporcional a la concentración de enzima, la constante de velocidad se calcula:

$$k_i = \frac{2,3}{t \cdot i} \log \frac{100}{a}$$

donde (a) es la actividad enzimática residual porcentual al tiempo t . Aunque la potencia inhibitoria está dada más exactamente por la constante de velocidad  $k_i$  , se expresa amenudo como  $I_{50}$ , que es la concentración molar de inhibidor necesaria para causar 50% de inhibición de la actividad enzimática a un tiempo dado de incubación, o por su logaritmo negativo  $pI_{50}$  .

La  $I_{50}$  está relacionada con la  $k_i$  de la siguiente manera, para un valor de  $a=50$  la ecuación anterior resulta:

$$I_{50} = \frac{0,695}{t \cdot k_i}$$

Los valores de  $pI_{50}$  de los inhibidores organofosforados están entre los valores 6 y 9 .

Los insecticidas organofosforados, excepto los fosfatos y fosforotiolatos, son mucho menos eficientes como inhibidores. Ellos son activados en el organismo para manifestar su actividad biológica.

La fosforilación de la enzima es similar a la hidrólisis alcalina de los ésteres organofosforados ( $SN_2$ ). En lugar del ión hidróxido, el grupo OH de la serina activado por el imidazol, sirve como agente nucleofílico para el átomo de fósforo, con una carga positiva parcial.

Sin embargo los organofosfatos reaccionan con la enzima mucho más rápido (varias potencias de 10) que el ión hidróxido, sugiriendo la formación de un complejo enzima-inhibidor como intermediario que favorece la reacción subsiguiente.

Esto está también sugerido por la competición que existe entre el sustrato ACh y los organofosfatos y la semejanza en los requerimientos estructurales entre sustratos adecuados e inhibidores efectivos (61).

La inhibición depende del pH como en la reacción enzimática normal.

Los organofosfatos pueden interpretarse como sustratos particularmente pobres.



EH: enzima libre; PX: inhibidor organofosforado con un grupo X que se libera.

El esquema de reacción involucra un paso reversible para la formación de un complejo enzima-inhibidor (EH-PX) análogo al complejo de Michaelis con sustrato, y un paso de fosforilación que resulta en una inhibición irreversible. El primer paso depende de la afinidad del inhibidor por el sitio activo, y se caracteriza por una constante de disociación ( $K_a$ ) que es una medida de la afinidad (cuando menor es la constante, mayor será la afinidad)

$$K_a = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

El segundo paso se debe a la habilidad fosforilante del inhibidor, la que se mide por la constante  $k_2$ , que es una constante monomolecular y es llamada constante de fosforilación (62 y 63).

Cuando la concentración de inhibidor ( $i$ ) es mucho mayor que la de la enzima ( $e$ ), la velocidad de formación de la enzima fosforilada es:

$$\frac{dp}{dt} = k_2 \cdot c = \frac{i}{1+K_a} k_2 (e - p)$$

$c$ : concentración del complejo enzima-inhibidor.

$p$ : concentración de la enzima fosforilada

Integrando esta ecuación resulta:

$$\frac{1}{i} = \frac{t}{2,3 \Delta \log v} \frac{k_2}{K_a} - \frac{1}{K_a}$$

donde  $\Delta \log v$  es la variación del logaritmo de la velocidad de hidrólisis en el intervalo  $t$ .

Graficando  $1/i$  contra  $t/2,3 \Delta \log v$ , se pueden obtener gráficamente las constantes  $K_a$  y  $k_2$ .

El cociente  $k_2/K_a$  tiene las unidades de una constante de velocidad bimolecular ( $M^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ).

Main definió  $k_i = k_2/K_a$

$$\frac{dp}{dt} = k_i (e-c-p) i$$

$$k_i = \frac{2,3 \Delta \log v}{t} \left( \frac{1}{i} + \frac{1}{K_a} \right)$$

ECUACION DE MAIN

La  $k_i$  se la llama constante de reacción bimolecular, porque no es una simple constante de velocidad, sino que incluye un equilibrio y una constante cinética. Por analogía con la interacción enzima-sustrato, el modelo propuesto por Krupka puede aplicarse para ilustrar esquemáticamente la reacción de organofosforados inhibidores con la AChE (64). En el esquema, S es el sitio aniónico o el sitio de unión hidrofóbica (el sitio  $\beta$  de O'Brien).

La afinidad es afectada principalmente por el factor estérico ( $K_a$ ).

La fosforilación ( $k_2$ ) es una  $SN_2$  sobre el fósforo y está afectada por el factor electrónico del inhibidor. La fuente de enzima influye sobre esta constante, por ej. el DFP tiene 160 veces más afinidad por la ChE de suero que por la AChE de eritrocitos.

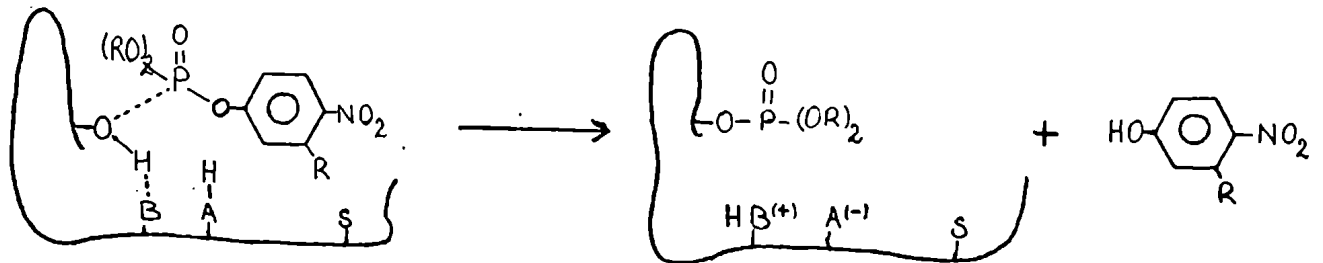
Aunque las medidas de  $k_2$  y  $K_a$  requieren concentraciones altas de inhibidor ( $10^{-3}$  M -  $10^{-4}$  M) las velocidades de inhibición se miden generalmente a concentraciones de inhibidor aproximadamente  $10^{-6}$  M lo cual es mucho menos que el valor de  $K_a$  ( $10^{-3}$  -  $10^{-4}$ ).

En estas condiciones la concentración del complejo puede ser despreciable y la ecuación de MAIN se convierte en la clásica de ALDRIDGE, que ha sido usada ampliamente para la evaluación de la capacidad inhibitoria de los organofosfatos.

ALDRIDGE:

$$k_i = \frac{2,3 \Delta \log v}{t \cdot i}$$

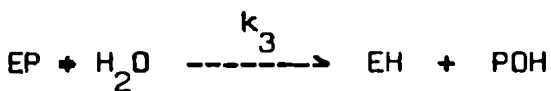
MECANISMO ESQUEMATICO DE REACCION DE ORGANOFOSFATOS CON ACETILCOLINESTERASA



VII a) RECUPERACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

Reactivación espontánea o desfosforilación

Aunque lentamente la enzima fosforilada en presencia de agua se hidroliza, dando el ácido del fosfato y la enzima libre.



La velocidad de la reactivación espontánea no depende del grupo que se aleja (leaving group) original del organofosforado por supuesto, pero sí de la enzima y de los sustituyentes (RG-) sobre el fósforo.

La velocidad de la reacción la podemos expresar como tiempo de vida media de la enzima fosforilada, o como actividad del centro catalítico, en número de grupos fosforilo hidrolizados por minuto.

La estabilidad de la AChE fosforilada es comparable a la de los organofosforados, por ejemplo, el Sarin tiene una vida media de 5u horas para su hidrólisis y la enzima de la anguila eléctrica fosforilada con el Sarin es de 48 horas.

Las colinesterasas de insectos tienen una baja actividad del centro catalítico para grupos fosforilos y carbamilos. Pero esto in vivo no ocurre (65 y 66) pues es probable por ej. en moscas que posean reactivadores naturales de la ChE inhibida.



El número de turn over para los dietil-fosfatos es de un billón de veces menor que el de la ACh, por eso a uno se lo llama inhibidor y al otro sustrato. La desfosforilación de la enzima fosforilada es esencialmente una reacción de desplazamiento nucleofílico sobre el fósforo que liberará a la enzima.

Algunos compuestos como la hidroxilamina y sus derivados, oximas y ácidos hidroxémicos se estudiaron como reactivadores in vitro con éxito.

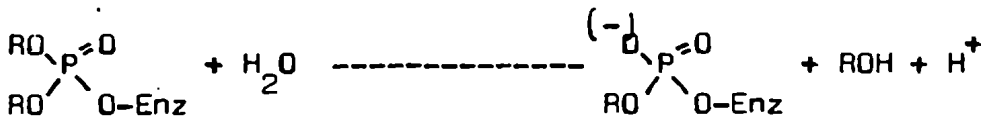
Hoy día son utilizados en mamíferos y en el hombre con seguridad derivados del 4-PAW (Piridinaldoximas) para la terapia del envenenamiento por organofosforados. Estos compuestos se usan en combinación con la atropina, la cual bloquea la transmisión sinéptica reemplazando la ACh de sus receptores. Son drogas complementarias en su acción terapéutica.

La atropina es efectiva en las terminales del SNP y en las sinapsis del SNC y en los ganglios del SNA, pero no lo es en las uniones neuromusculares. Las oximas contratan, reactivando la AChE inhibida en las sinapsis y además descomponiendo directamente los organofosforados.

#### VII b) ENVEJECIMIENTO DE LAS ENZIMAS FOSFORILADAS (AGING)

Las AChE inhibidas cambian gradualmente a formas no reactivables. Esto es lo que se ha dado en llamar "aging" o envejecimiento.

Se acepta que el aging se debe a la dealquilación de la dialcoxilfosfonil enzima.

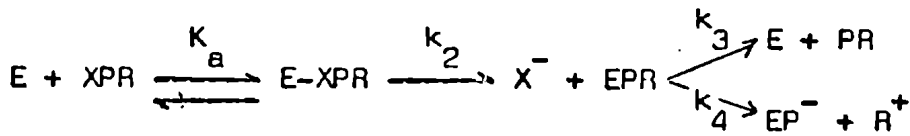


Se ha demostrado grado de paralelismo cuantitativo entre el aging y la aparición alcoxihidroxifosfonil-enzima.

Después de la dealquilación, la enzima se vuelve estable y resiste ataque nucleofílico de oximas por tener su carga negativa.

Todos los principios que hemos visto para las AChE son aplicables a las ChE y a otras B-esterasas y en general a las serina-proteasas.

Resumiendo la reacción entre un organofosforedo y una hidrolasa sensible a organofosfatos se puede describir así :



Las velocidades de cada paso serán diferentes según la fuente de enzima que se utilice.

Un insecticida deseable (organofosforado) debe reaccionar distinto con la AChE del hombre y la de la peste.

Paso de reacción		Acetilcolinesterasa
Afinidad por enzima	$K_a$	Peste > hombre
Fosforilación	$k_2$	Peste > hombre
Desfosforilación	$k_3$	Peste < hombre
Aging	$k_4$	Peste > hombre

VIII) ACETILCOLINESTERASA EN INSECTOS.

Las colinesterasas de insectos se ven influenciadas por una serie de factores que incluyen el pH, la concentración salina, y la concentración de enzima. Las ChE de vertebrados también son afectadas por las condiciones experimentales pero la diferencia que existe con los insectos es que éstos incluyen miembros muy diferentes entre sí, en lo que respecta a aspectos tanto estructurales como de comportamiento, y es por eso que las especies más pequeñas no presentan otra alternativa que trabajar con homogenatos de las cabezas enteras y en muchos casos con los insectos enteros. Los preparados de diferentes insectos pueden ser muy dispares respecto al pH óptimo, los electrolitos, materiales inhibidores y activantes, y la

concentración de enzima. Wolfe y Smallman (67) encontraron que la concentración óptima de ACh como sustrato para preparados de cabezas de abejas era menor que la de homogenatos de cabezas de moscas. Mientras que ésto se puede interpretar como una diferencia fundamental entre las dos enzimas, los autores mencionan la posibilidad que ésto se deba a diferencias en la concentración de enzima. Cuando los preparados de cabeza de moscas se diluyen, la concentración de sustrato óptima cae a un valor comparable al de las abejas. Obviamente resulta muy importante discernir si las diferencias entre preparados enzimáticos de distintas especies se deben a diferencias genuinas de las enzimas o a otros componentes que a la postre afectan su función.

Un ejemplo extremo es el pH óptimo para la ChE de cabeza de moscas, Babers y Pratt (68) encontraron que era 5,75 pero para lo mismo Chadwick et al. (69) y también Wolfe y Smallman (67) dieron valores de 8,0 y 9,0.

Algunos factores tienen más de un efecto, por ejemplo el ClNa aumenta la velocidad de hidrólisis en la ChE de cabeza de moscas pero disminuye la afinidad de la enzima por el sustrato (ocurre cualitativamente lo mismo con la ChE de cerebro de ratón). Otras sales aumentan la velocidad de hidrólisis de la ChE de moscas y éstas incluyen al  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , ClK,  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ , y  $\text{NO}_3\text{Na}$ ; sin embargo estas sales por encima de 0,5N reducen la actividad enzimática.

Lord y Potter (70) encontraron una sustancia en extractos de un escarabajo de la harina Tribolium castaneum, que inhibía la hidrólisis de la ACh.

Menn y McBain (71) describen una sustancia anticolinesterásica en las cucarachas, Blaberus craniifer y Bletella germanica.

Este tipo de compuestos inhibitorios pueden existir en otras especies y su presencia en un homogenato puede resultar en una baja actividad colinesterásica y equivocadamente ser atribuida a una propiedad característica de la enzima.

Las ChE de insectos al igual que la de mamíferos se desnaturalizan rápidamente a temperaturas por sobre los 55°C (72), pero el proceso de desnaturalización en los insectos comienza a temperaturas menores, según Wolfe y Smallman (67) aproximadamente a 35°C.

Dauterman et al. (73) como parte de su proceso de purificación, calienta su preparado parcialmente purificado de cabezas de moscas a 54-55°C en

presencia de ACh, y en este caso la desnaturalización no existe.

Wolfe y Smallman (67) encontraron que el ClNa tiene un efecto protector similar. Protección de este tipo por presencia de alguna sustancia en los preparados puede ser la responsable de las diferencias en las velocidades de desnaturalización por calor que han sido obtenidas por diferentes autores. Lo que en general se debe tener en cuenta es que los preparados de insectos pueden comportarse en forma variable según las condiciones experimentales. Por esta razón las propiedades deben considerarse más cualitativamente que cuantitativamente.

En los mamíferos se puede distinguir con facilidad entre AChE y otras ChE pero en insectos esta división no es tan definitivamente clara.

Caside (74) (75) ensayó preferencias por sustratos de acetilesterasas incluyendo AChE en una cantidad de insectos. Encontró una enzima con propiedades similares a la AChE de mamíferos en las cabezas de moscas adultas y en gusanos de seda, en cambio en el cordón nervioso de las cucarachas y en otros insectos encontró una enzima que se parecía a la pseudo-ChE de mamíferos. Además encontró esterases con propiedades intermedias entre los dos tipos de enzimas en algunos insectos.

Teniendo en cuenta ésto y otros trabajos similares, Chadwick (72) señaló que la clasificación usada para las colinesterasas de mamíferos no es aplicable en invertebrados sin otra aclaración o calificación.

Wolfe y Smallman (67) compararon la hidrólisis de varios sustratos por ChE en las fracciones; soluble y particulada de cabeza de moscas y de abejas. Las ChE de moscas sufrían inhibición por sustrato con 0,1M de ACh, MeCh y BuCh, en cambio la BzCh apenas se hidrolizaba, pero la triacetina se hidrolizaba apreciablemente especialmente por la fracción soluble. La enzima de cabeza de abeja difiere en que a una concentración de 0,1M de MeCh se hidrolizaba más rápido que la ACh y no causaba inhibición por sustrato, y la BzCh no se hidrolizaba.

Con concentraciones por debajo de 0,01M tanto los preparados de abeja como los de mosca hidrolizaban ACh más rápido que cualquier otro éster.

Se concluyó que la ChE de cabeza de mosca se parecía a la AChE de mamíferos y que no había presente cantidades significativas de pseudo-ChE ni en cabeza de moscas ni en abejas.

Quedaba implícito en estas conclusiones que la enzima de abeja se la consideraba una ChE verdadera independientemente de la falta de inhibición por exceso de MeCh.

Dauterman (73) desarrolló una técnica de purificación parcial de la ChE de cabeza de mosca y midió la actividad en los sucesivos pasos de purificación y comparó los valores con los obtenidos con AChE de eritrocitos de bovino, encontrando diferencias significativas entre ambas enzimas. En especial la actividad hacia la BuCh, triacetina, y el fenilbutirato son mayores con la enzima de mosca.

Dauterman (73) está de acuerdo con Wolfe y Smallman (67) en que una enzima es la responsable de la hidrólisis de todos los sustratos, pero la pregunta es, si ésta se debería llamar ChE, pues su número de "turnover" para algunos acetatos alifáticos y aromáticos y posiblemente el fenilbutirato es tan alto como el de la ACh.

Sin embargo por su gran afinidad hacia la ACh y en base a consideraciones fisiológicas, debería llamarse "verdadera" colinesterasa, si se requiriera alguna clasificación.

Casida (75) publicó datos comparativos muy útiles sobre especificidad por sustratos en una cantidad de insectos adultos, en sus huevos y larvas en desarrollo, incluyendo también algunos ácaros en su estudio.

Usando experimentos con sustrato mezcla determinó si una o diferentes enzimas eran las responsables de la hidrólisis de ACh, triacetina y O-nitrofenilacetato (NPA) en varios insectos.

Donde la hidrólisis de ACh, triacetina, NPA se debía a una misma enzima (como en los homogenatos de cabezas de moscas) la inhibición con eserina colina o TEPP era generalmente muy marcada con los tres sustratos.

Por otra parte en el escarabajo de alfombra la ACh y el NPA se hidrolizan por enzimas distintas y  $10^{-6}$  M de eserina sólo inhibe la hidrólisis de la ACh. Es particularmente interesante lo encontrado en moscas, respecto a la variación cuali y cuantitativa en las ChE, en sus huevos y estados larvales más precoces existen dos enzimas responsables de la hidrólisis de la ACh y el NPA, pero una sola enzima ataca a ambos sustra-

tos en las formas adultas. Casida (75) resume su trabajo comparativo de insectos y ácaros diciendo que sus ChE aparecen como un grupo de enzimas relacionadas con propiedades que varían ampliamente entre ellas y en comparación con las colinesterasas de mamíferos.

El considera que las diferencias en especificidad son tan grandes que pueden ser usadas como base para la selectividad.

Gran parte de las investigaciones sobre ChE de insectos se han llevado a cabo con la esperanza de encontrar alguna propiedad que pudiera ser explotada en el diseño de pesticidas altamente selectivos.

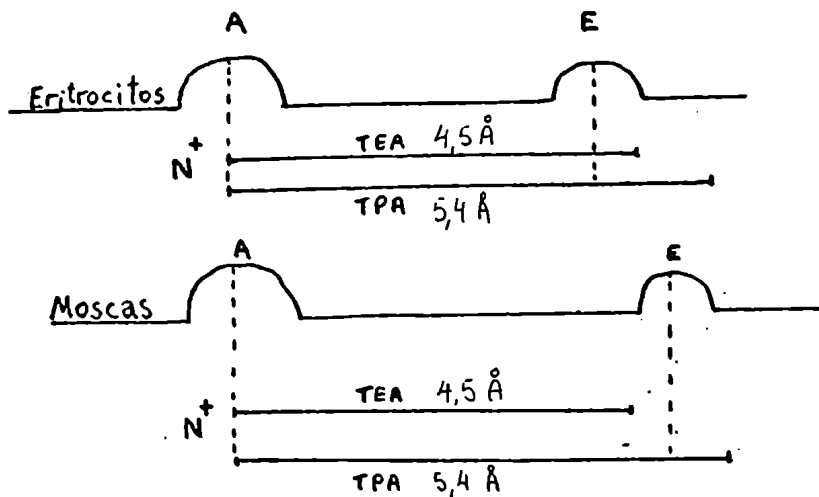
La selectividad sin embargo no es sólo diferenciar mamíferos de insectos sino distinguir entre los insectos beneficiosos para la humanidad y los que no lo son.

No es suficiente estar alerta a las variaciones en las propiedades de las ChE en las diferentes especies, sino preguntarse qué es lo que exactamente provoca estas diferencias. La explicación más probable es hasta el momento que las diferencias residen en la configuración del sitio activo.

O'Brien (76) buscando diferencias entre los sitios activos de las ChE de cabeza de moscas y la AChE de eritrocitos de bovino, comparó los efectos sobre las enzimas de las sales de alquil amonio.

Estos compuestos se supone que se unen al sitio aniónico y pueden interferir con la fosforilación del sitio esterático por compuestos organofosforados. Con ChE de eritrocitos el tetraetilamonio (TEA) y el tetrapropilamonio (TPA) fueron igualmente efectivos en reducir el grado de inhibición causada por compuestos OP. Esto sugiere que el nitrógeno cuaternario está unido al sitio aniónico y que tanto la extensión del TEA como la del TPA son suficientes para enmascarar al sitio esterático. Sin embargo el TPA es 32 veces más efectivo que el TEA en la protección de la ChE de cabeza de mosca de la fosforilación, lo que está indicando que enmascara el sitio esterático mucho más eficazmente.

O'Brien concluye que en la ChE de eritrocitos la distancia entre el sitio aniónico y el esterático debe ser menor que el diámetro del TEA, esto es menor que  $4,5\text{\AA}$ , pero en la ChE de cabeza de mosca debe ser mayor que  $4,5\text{\AA}$  pero no más de  $5,4\text{\AA}$ , que es el diámetro del TPA.



Las ChE de insectos se caracterizan por ser capaces de hidrolizar ésteres de colina pero mostrando grandes variaciones respecto a la especificidad por los sustratos en las distintas especies, incluyendo su habilidad para hidrolizar ésteres no colínicos.

Su actividad in vitro es influenciada por las sales, el pH y la concentración de enzima. La forma en que son afectadas varía entre las distintas especies. Parece probable que algunas de estas diferencias se deban en mayor o menor medida a variaciones en las dimensiones y en la disposición espacial del sitio aniónico y del sitio esterático en el centro activo. La histoquímica es valiosa porque relaciona la enzima y la estructura, y provoca la pregunta ¿Qué hace esto aquí? más que el ¿Cómo lo hace? de la bioquímica. En el caso de los insectos los estudios histoquímicos no son muy numerosos por dos razones: primero por el tamaño muy pequeño de muchos de los insectos que introduce dificultades técnicas, pero con el desarrollo de la histoquímica a nivel ultraestructural este problema está desapareciendo. En segundo lugar, se sabe que en muchos insectos existe una barrera de difusión (77) que está afuera del tejido nervioso e impide la entrada de los sustratos histoquímicos.

## IX) SISTEMA NERVIOSO DE INSECTOS

La mayoría de los insecticidas modernos deben su toxicidad a la habilidad para atacar el SN como "target" primario. El SN es una de las porciones del cuerpo más susceptibles y vulnerables en los organismos altamente desarrollados. La característica más impactante de los insectos es que tienen un SNC tan bien desarrollado que resulta casi comparable en organización al de los mamíferos. La manera más rápida y segura de trastornar químicamente los mecanismos regulares del cuerpo es sin duda intoxicando el SN. Generalmente el éxito de un compuesto insecticida depende del alto grado de desarrollo nervioso en los insectos peste.

En este sentido, el hombre por ser el organismo más altamente desarrollado podría ser muy susceptible al mismo tóxico nervioso. Pero afortunadamente han sido inventados varios compuestos útiles, que pueden selectivamente atacar a los insectos sin causar demasiado daño a animales beneficiosos y a los hombres.

En los últimos años, ha surgido el conocimiento que en algunos casos las diferencias en susceptibilidad entre mamíferos e insectos son el resultado de diferencias inherentes en sus SN.

Por ejemplo diferencias en susceptibilidad a tóxicos nerviosos entre insectos y mamíferos podría parcialmente atribuirse a diferencias morfológicas en la distribución nerviosa, los insectos poseen varias terminales nerviosas expuestas sin ninguna protección, mientras que los mamíferos tienen relativamente pocos de estos sitios vulnerables.

Las diferencias son de un gran interés no solamente toxicológico, sino desde el punto de vista de la bioquímica comparada.

Históricamente los estudios del SN resultan de la amalgama de la zoología de invertebrados y de vertebrados. La organización básica del SN se estudió en mamíferos y sus funciones fundamentales se estudiaron en invertebrados (axón gigante de calamar y de langosta de mar).

Las diferencias básicas en la organización nerviosa entre mamíferos e insectos pueden demostrarse considerando la estructura fundamental del SN de los mamíferos primero y luego señalar la morfología específica y las diferencias fundamentales en el sistema de insectos.



Figura 1

DIAGRAMA SIMPLIFICADO DEL SISTEMA NERVIOSO DE MAMIFEROS

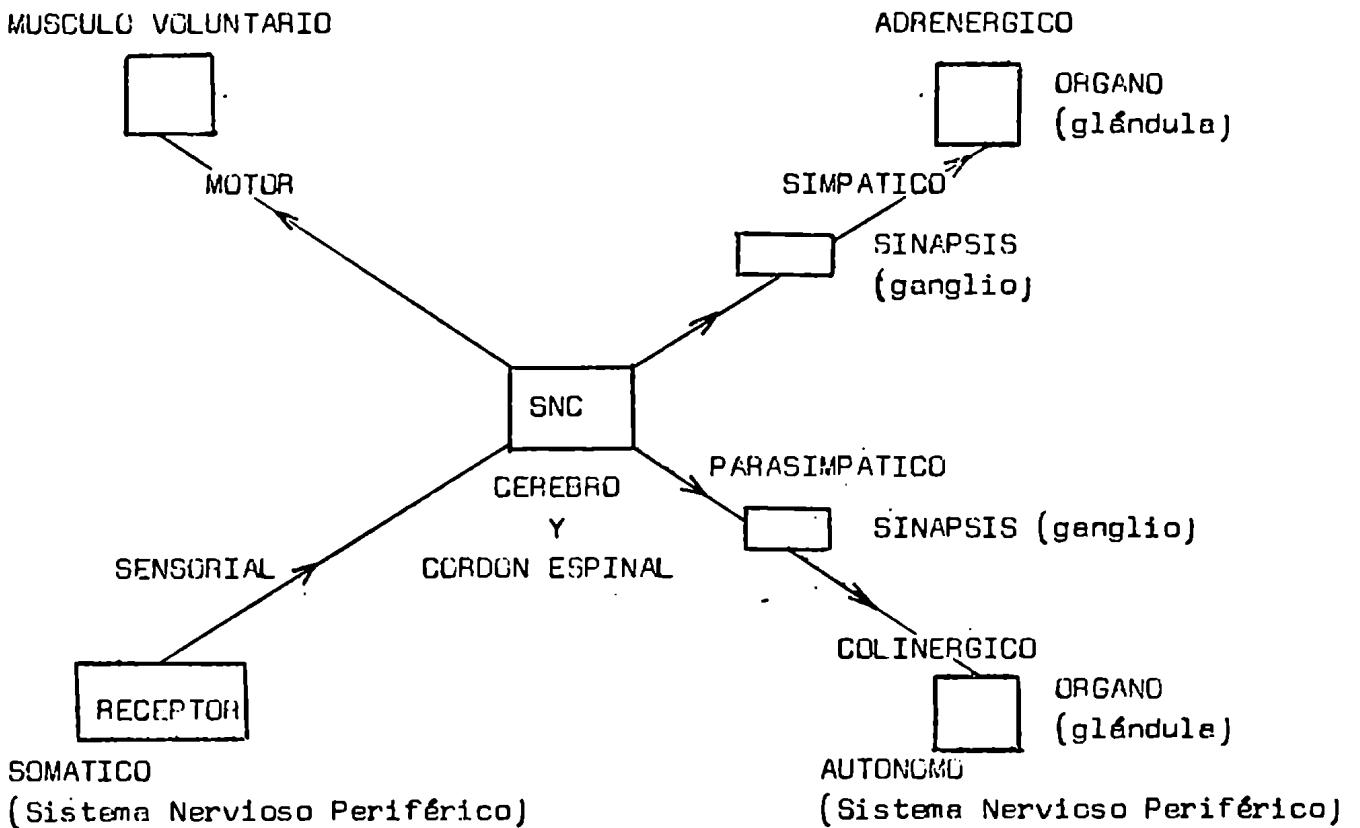
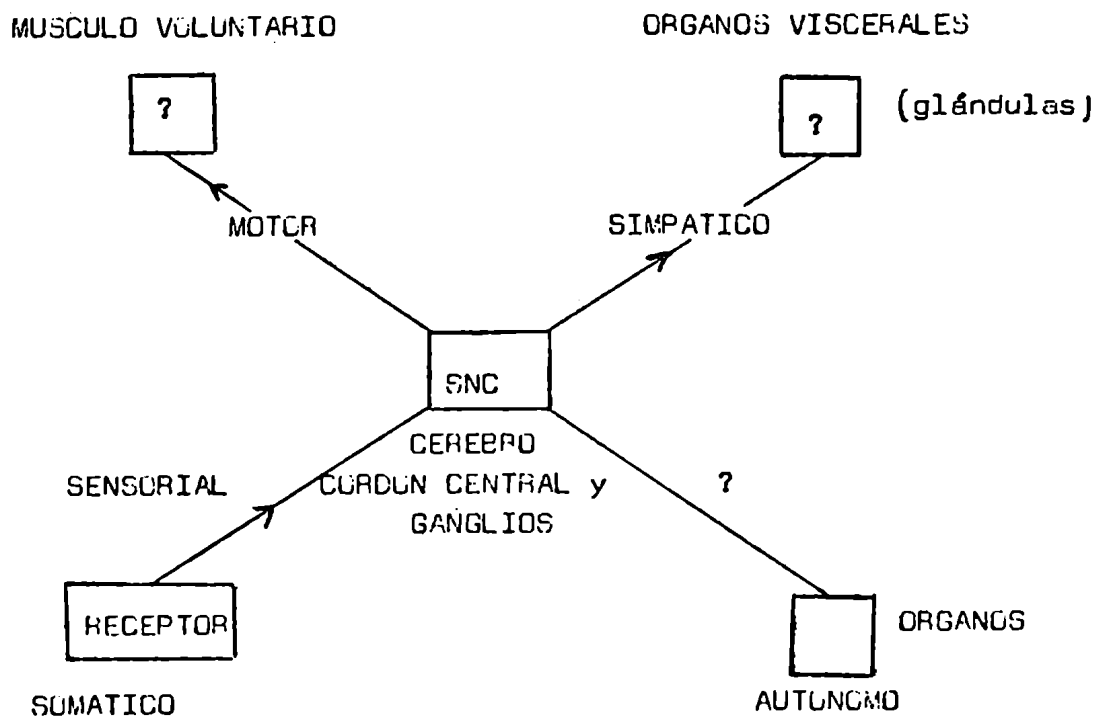


Figura 2

DIAGRAMA SIMPLIFICADO DEL SISTEMA NERVIOSO DE INSECTOS



(Modificado de O'Brien R.D.O. "Toxic Phosphorus Esters" N.Y. Acad. Press, 1960, pag 434)

Las figuras 1 y 2 indican características generales de los SN de mamíferos y de los insectos. Ambos tienen dos subdivisiones muy importantes en común: el SNC y el SNPeriférico.

El primero formado por el cerebro y el cordón nervioso espinal en mamíferos y el cerebro y el cordón nervioso central en insectos.

El SNC como su nombre lo indica,funcione como sistema central de integración y está compuesto por millones de células nerviosas que están conectadas unas con otras por uniones llamadas sinapsis.

El SNP está compuesto por dos subdivisiones:el sistema somático y el sistema autonómico. El sistema somático comanda los movimientos de los organismos y está compuesto por una vía aferente o sensitiva y otra eferente o motora que lleva la respuesta al efector del estímulo informado por la sensitiva.

En el caso en que el cerebro no analice el estímulo y ordene la respuesta,es decir que la información conducida pase directamente a los nervios motores,estamos frente a lo que se da en llamar arco reflejo.

El nervio eferente termina en la unión neuromuscular cuya sinapsis con el efector es colinérgica ( ACh ).

El sistema nervioso autónomo (SNA) regula la actividad visceral,es involuntario y comprende el: sistema nervioso simpático (SNS) y el sistema nervioso parasimpático (SNPa) de acciones opuestas que se diferencian por sus sinapsis postganglionares, en un caso el mediador químico es la Adrenalina o Noradrenalina (SNS) y en el SNPa es la ACh .

El SN de insectos es considerablemente más simple que el de mamíferos. Sin embargo, en algunas circunstancias, ciertas partes del mismo son altamente especializadas para la adaptación a un complejo modo de vida. Como se ve en las figuras 1 y 2 las diferencias básicas entre el SN de insectos y el de mamíferos son:

- 1)En el SNP no hay sistema colinérgico (ACh).
- 2)No existen dos sistemas autónomos, el SNS y el SNPa. Hay uno solo que está controlado principalmente por hormonas .
- 3)En el SNP no hay ganglios.(Los ganglios de los insectos corresponden al SNC de los mamíferos)

4) En el SNC de los insectos no se identificó otro transmisor químico que no sea la ACh, aunque se cree que existen algunas aminas biogénicas activas.

Además de las grandes diferencias, el SN de insectos tienen las siguientes diferencias morfológicas e histológicas:

1) En el SN de insectos no hay mielinación distinta observable.

2) El cordón nervioso de insectos está cubierto por una corteza fibrosa llamada simplemente vaina o corteza neural, formada por una parte externa no celular (lamella neural) y otra interna que es celular (perineurium). Esta vaina protege al sistema nervioso y actúa como barrera de difusión cumpliendo un rol similar al de la barrera hemato-encefálica de los mamíferos.

3) La unión neuromuscular no tiene placas terminales específicas como en los mamíferos. Los axones de los insectos se ramifican en varias ramitas e inervan cada una de las fibras musculares, mientras que en mamíferos las placas terminales gobiernan el total de un grupo de fibras musculares.

4) El SN de insectos está provisto de un sistema de tráqueas que le proveen oxígeno directamente a las células nerviosas por difusión.

Sin embargo, el SN de insectos se parece al de mamíferos en muchos aspectos, y las similitudes básicas son más impactantes que las diferencias.

Por otra parte, las variaciones entre especies de insectos son enormes, a los fines de comparar con los mamíferos estamos obligados a considerarlos en general. Pero entre los insectos que sufren metamorfosis heteromorfa y holomorfa hay grandes diferencias en el SN desde el punto de vista de la organización. Diferencias entre especies son muy numerosas y complejas, salvo en unos pocos casos muy bien estudiados (77).

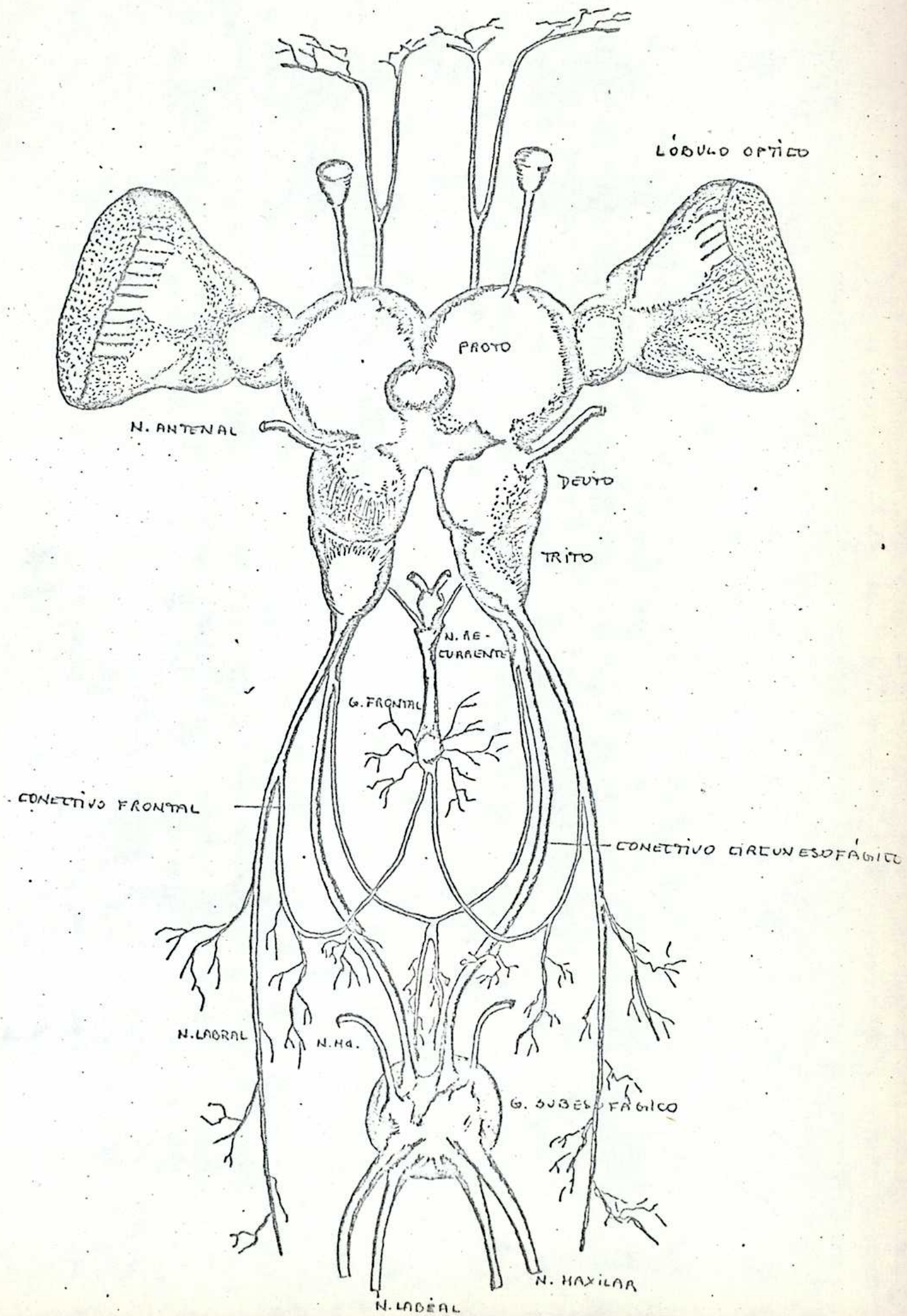
#### SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DEL TRIATOMA INFESTANS (vinchuca).

El SNC está formado por el cerebro o ganglio supraesofágico, el ganglio subesofágico y la cadena ventral, como en los insectos en general.

En nuestro laboratorio se llevó a cabo la disección de cerebros de vinchucas adultas, cuya morfología responde al esquema general presentado

Figura 3

SISTEMA NERVIOSO CEREBRAL



en la figura 3 . El cerebro está formado por el Protocerebro que posee los lóbulos ópticos que inervan los ojos compuestos, en el centro los lóbulos protocerebrales de donde salen los nervios que inervan los ocelos, y los cuerpos setiformes cuyo desarrollo se relaciona con la inteligencia del insecto. El Deutocerebro que controla los nervios de las antenas (función olfativa), y el Tritocerebro que inerva la región gustativa y conecta el SNC con el SNA o estomogástrico.

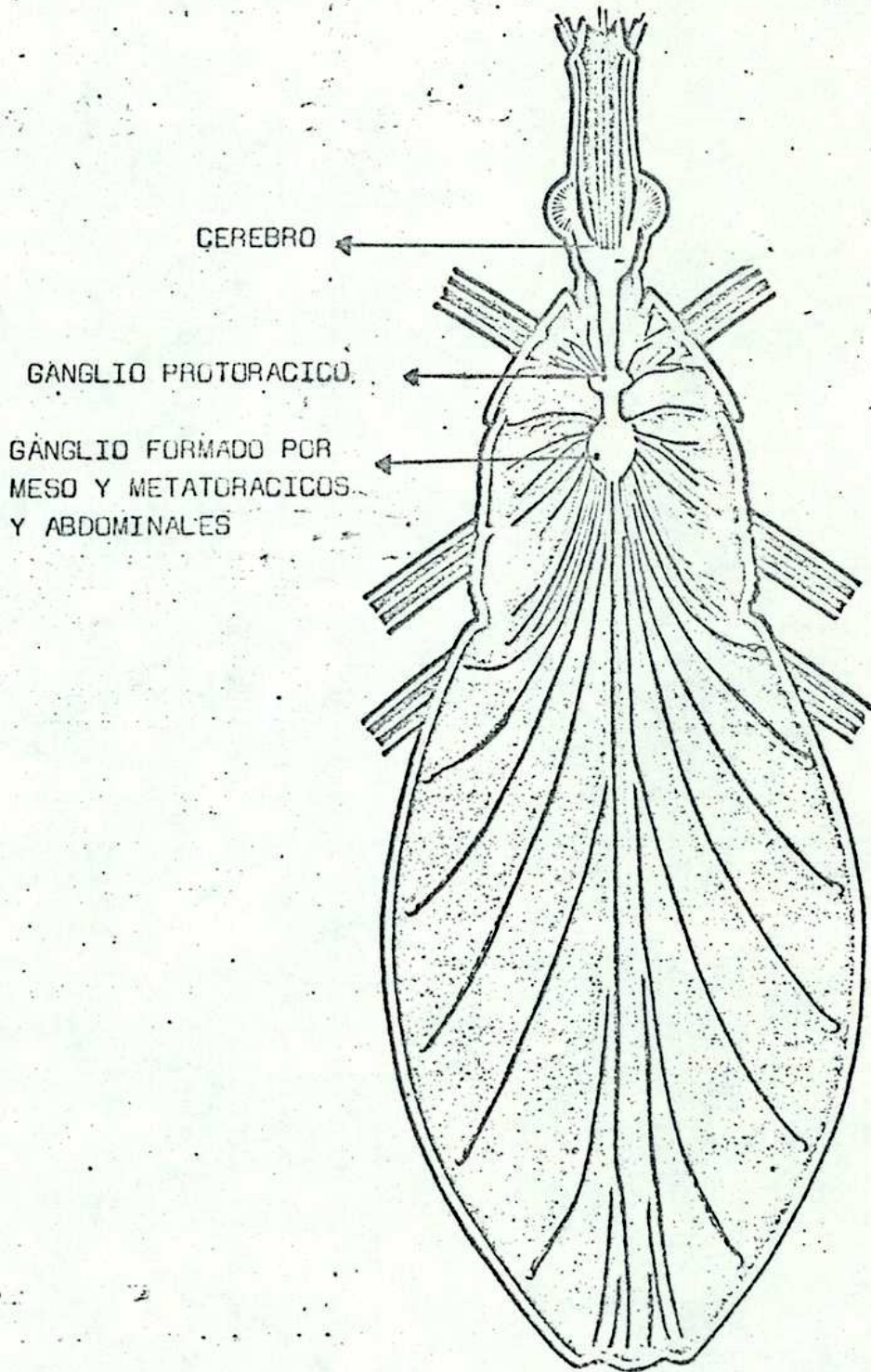
El ganglio subesofágico se encuentra todavía en la cabeza del insecto y por debajo del esófago, inerva los apéndices bucales, de él salen los nervios labial y maxilar (figura 3).

La cadena ventral está formada en los insectos en general por los ganglios torácicos y los ganglios abdominales, en el Triatoma infestans al igual que en otros Hemípteros y en los Dípteros los ganglios torácicos y abdominales se fusionan. En la vinchuca (figura 4) vemos en el tórax un ganglio protorácico y otro ganglio resultante de la fusión de los ganglios meso- y metatorácicos y los ganglios abdominales.

En la figura 4 se representan los principales nervios que conforman el SNP del insecto y que se vinculan con el SNC a través de la cadena ventral. Los centros motores están distribuidos por todo el SNC de los insectos, y es por eso que sus movimientos no están supeditados a la integridad del cerebro sino al ganglio del segmento que corresponda. De aquí que insectos sin cabeza puedan mantener movimientos a veces por horas, aunque sea el ganglio cerebral el que da dirección a la locomoción y ejerce sobre ella control restrictivo.

El SNA destinado a regular las funciones de la vida vegetativa consiste en dos formaciones: una Dorsal, que nace del cerebro y está destinada especialmente a inervar intestino anterior y medio, y la otra Ventral, que nace de la cadena ventral y sirve a espiráculos, intestino posterior y genitales.

Figura 4      SISTEMA NERVIOSO DEL TRIATOMA INFESTANS  
ESQUEMA DE SUS PRINCIPALES NERVIOS



## X) EFFECTOS DE LOS COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS EN INSECTOS

La hipótesis vigente es que el principal modo de acción de compuestos OP y carbamatos es la inhibición de la AChE, pero no hay demasiado acuerdo sobre a qué nivel es crítica la inhibición para causar la muerte.

En la literatura se han reportado casos en que los compuestos resultaron tóxicos con poca inhibición de la ChE total, en cambio hay otros que con altos porcentajes de inhibición de la ChE total no mostraron efectos tóxicos. Las técnicas bioquímicas usadas para el estudio del modo de acción de OP y carbamatos han sido in vivo e in vitro pero nada dicen de la distribución de la enzima/s en los tejidos celulares.

La histoquímica en cambio permite saber si la inhibición es completa y en una zona altamente restringida, y si la muerte ocurre por el cese de la función en una zona localizada, o si la inhibición está generalizada o sólo restringida al sistema nervioso.

En las placas motoras terminales de músculo de Acheta domestica (grillo) se encontró una sola ChE que hidrolizaba la ATC y era inhibida por eserina (78). Ningún otro preparado de músculo de insecto mostró esta actividad.

Intoxicación por aplicación tópica de OP en moscas mostró que el sitio vital de acción es el área periférica de los ganglios torácicos y en grillos es el cerebro y el cordón nervioso.

Evidencias ultraestructurales demostraron que las ChE que hidrolizan ATC están unidas a membrana.

El GABA se ha confirmado como transmisor químico en las uniones neuromusculares inhibitorias presentes en los Artrópodos (79).

En insectos el SNC está formado por los ganglios supra y subesofágicos y una cadena de ganglios ventrales, como vimos en la sección anterior, y es en este sistema en donde se acepta como transmisor a la ACh (80).

Se encontraron también catecolaminas en insectos, y la posibilidad de existencia de un mecanismo de sinapsis adrenérgica en el SNC, particularmente en el sexto ganglio abdominal de cucaracha (81).

El transmisor en uniones neuromusculares de insectos todavía no se conoce (82) aunque hay hipótesis que una indolalquilamina, un derivado de la Nicotinamida y el ácido glutámico participan en la transmisión sinéptica (83) y (84).

La neuroactividad de la L-leucina se ha demostrado en el cordón abdominal de la cucaracha americana, pero su rol fisiológico no se ha confirmado aún (85).

Los síntomas de envenenamiento por organofosfatos son en general, irritabilidad aumentada, luego hiperexcitabilidad, luego temblores de todo el cuerpo (más marcado en las extremidades, y finalmente parálisis y muerte. El curso de estas acciones varía con la dosis, el compuesto, y la ruta de administración, por lo general dosis altas producen efectos más rápidos. En cucarachas los fosfatos (TEPP y DFP) causan síntomas violentos en pocos minutos, mientras que fosforotionatos (Paration) pueden no mostrar efectos por varias horas, como por ejemplo 2 horas a dosis de 3 veces la  $LD_{50}$  y 7 horas a la  $LD_{50}$ .

Esta diferencia es más notable con inyección, y menos con aplicación tópica. Excepto con dosis muy altas, la muerte se demora mucho, con TEPP se mueren en 18-26 horas después del envenenamiento y con Paration entre 21-36 horas después del envenenamiento (86).

En la mosca estos efectos están comprimidos, la hiperexcitabilidad es común en 30 minutos, la parálisis en 3 horas y la muerte en 24 horas (87).

Los primeros experimentos de envenenamiento por OP en insectos fueron hechos por Chedwick y Hill en 1947 (88). En un estudio que resulta modelo ellos mostraron que mínimas cantidades de DFP y TEPP (también eserina que es un carbamato) inhibían la ChE de insectos in vivo e in vitro.

Encontraron un paralelismo notable entre la inhibición de la ChE in vivo a una dada dosis y el porcentaje de mortalidad.

Luego surgió el famoso estudio de Metcalf y March en 1949 (89), ellos trabajaron con abejas y mostraron para el TEPP y el Paration una correlación entre síntomas e inhibición de la ChE; en general un 50% de inhibición conduce a la hiperexcitabilidad, un 65% al Knock down, un 90% a la postración, y un 98% a la muerte.



Chamberlain y Hoskins (86) usaron 18 organofosfatos en la cuceracha americana e hicieron observaciones in vivo. Sus datos mostraban que compuestos rápidamente tóxicos como el TEPP y el Paraoxon inhibían la ChE en un 90% en 30 minutos para una dosis cercana a la  $LD_{50}$ , en cambio compuestos más lentos como el Paration causaban inhibición significativa después de horas de haber sido tratados. Notaron que la ChE de las cucarachas tratadas se recuperaban rápidamente cuando eran tratadas con dosis subletales de TEPP. Más tarde fue demostrado que la ChE de insectos intoxicados podía recuperarse rápidamente no sólo en el caso del TEPP (90) sino para el Malation también (91) y el DFP (92).

Estos resultados demuestran la enorme diferencia de rapidez con que se recupera la ChE en insectos respecto a la de mamíferos.

La recuperación de la ChE de insectos in vitro es despreciable después de la inhibición por organofosfatos, sin embargo en mamíferos se encuentra una recuperación espontánea significativa.

La diferencia entre la recuperación in vivo e in vitro no se puede atribuir a una distinta naturaleza de la enzima inhibida.

Si la ChE de mosca es inhibida in vivo y luego las cabezas son homogenizadas, el comportamiento de la ChE es tal cual el de la enzima inhibida in vitro; no se recupera espontáneamente, puede reactivarse por oximas, y muestra aging (92).

Por lo tanto la diferencia debe atribuirse a algún factor presente in vivo pero no in vitro. Mengle y O'Brien (92) demostraron que las moscas sobrevivientes de la intoxicación contenían un factor capaz de inducir la recuperación de la ChE inhibida. Este factor era muy débil, pues desaparecía de los homogenatos a los 30 minutos de permanecer en el frío, y debería estar ausente en las moscas muertas. Por otro lado Neubert et al. (93) encontraron un factor reactivo en suero de mamíferos.

La acetilcolina (ACh) no es tóxica para los insectos (94) (95) y no es efectiva contra la transmisión sináptica de los insectos (96), en cambio en los mamíferos es tóxica e interrumpe la sinapsis.

Sin embargo no se puede dudar de la posibilidad de que la ACh esté presente en insectos, pues estudios hechos en abejas y moscas combinando cromatografía y ensayos farmacológicos lo han demostrado (97) (98).

El fracaso de la ACh para matar o para interrumpir la conducción ner-

viosa en insectos se explica por la existencia de la barrera iónica que protege su sistema nervioso.

En los mamíferos se acumulan pequeñas cantidades de ACh como resultado de la intoxicación por OP y ésta es el resultado de la interrupción nerviosa.

En los insectos se pueden producir grandes acumulaciones de ACh por tratamiento con dosis masivas de organofosfatos, por ej. usando TEPP : 10 ug por mosca se hallaron aumentos de 21,2% en ACh en cabezas de moscas (90). Existe actualmente evidencia en favor de la cadena causal de eventos en el envenenamiento por OP en insectos: 1) inhibición de la ChE, 2) acumulación de ACh, 3) interrupción del sistema nervioso (probablemente por despolarización causada por la ACh) y 4) finalmente la muerte. Los estudios hechos desde 1947 a 1949 condujeron a que la muerte por la acción de los OP en insectos era debida a la inhibición de la ChE (88) (89). Hasta ahora no hay evidencia significativa en contra de esta teoría, nadie ha demostrado otro sistema que sea inhibido en el envenenamiento en forma tal que sea de importancia demostrable para el insecto. En general debería haber una relación directa entre la inhibición in vivo y la toxicidad.

La ChE ha sido encontrada en todos los insectos adultos y larvas estudiadas hasta ahora.

Lord y Potter fueron los primeros en sugerir que otras esterasas además de las ChE podían ser importantes en el envenenamiento por OP (99) (100). Se creyó en primera instancia que la ACh no era tóxica para los insectos pues en dosis masivas de 1000 mg/kg no mataba (94), en cambio en mamíferos tenía una  $LD_{50}$  en ratón de 20 mg/Kg (101), y otros compuestos como la prostigmina y la atropina tampoco eran letales para los insectos. Este argumento en contra de la "hipótesis de la ChE" se resolvió cuando se vio que la ACh no endógena fracasaba en su entrada al cordón nervioso o al sitio de acción debido a la barrera iónica que lo cubre.

Esto lleva a explicar también porqué puede fallar la atropina como antídoto para los insectos, ya que tiene un  $pK_a = 9,3$  y a un  $pH = 7$  estará en un 99,5% ionizada.

Metcalf (102) y Asperen (103) usando combinaciones de sustratos e inhibidores demostraron en insectos (abejas, moscas, y cucarachas) que contenían: a) una AChE cuyas propiedades en muchos aspectos son iguales a la de los mamíferos, b) una aliesterasa que es lábil e insensible a la eserina pero sensible a los OP, c) una esterasa aromática que es insensible a la eserina y a los OP y está preferentemente en el cuerpo y no en la cabeza de la abeja y cucaracha.

Si se requiere hacer estudios de inhibición con algún grado de especificidad no se podrían usar sustratos aromáticos pues las tres enzimas podrían hidrolizar ésteres aromáticos.

Trabajos de van Asperen y Oppenoorth (104) concluyen que las aliesterasas no son un factor importante en el envenenamiento por OP.

Otros mostraron que la aliesterasa se inhibía con TOCP y no afectaba a la ChE, esto se hizo con moscas y no mostraron signos de envenenamiento. El TOCP usado a una dosis de 90 ug/mosca no afectaba la ChE (105).

Probablemente la razón porque se inhibe tan rápidamente la aliesterasa en mosca sea que está en un 96% fuera del SN y por lo tanto más disponible para la inhibición, en contraste al 91% de la ChE que está dentro del SN (105).

Para buscar la causa de muerte precisa de los insectos por los OP a través de observaciones realizadas en insectos se deba decidir primero:

a) qué es muerte, y b) qué tipo de datos pueden establecer su causa.

Con los insectos el criterio de muerte amenudo usado es la ausencia de movimiento espontáneo o inducido (ese estado puede representar una parálisis por lo que no es un buen criterio). Otro sería el cese respiratorio medido como consumo de oxígeno pero en este caso puede ser que los tejidos continúen respirando aún cuando el organismo como un todo esté muerto.

Si la lesión primaria es inhibición de una enzima, esto conduce mediata o inmediatamente a la lesión terminal (la que también sería bioquímica si el cese respiratorio fuera el criterio).

Entre la lesión primaria y la terminal habrá en la cadena causal numerosos pasos, por ej. en mamíferos la lesión primaria es la inhibición de la AChE, y esto lleva a dos causas fisiológicas: bloqueo nervioso y falla en el aparato respiratorio, luego anoxia y finalmente la muerte.

En insectos todavía no está aclarado la sucesión de pasos en la cadena causal que conduce a la muerte por compuestos OP ni carbamatos.

---

#### XI) LA VINCHUGA Y LA ENFERMEDAD DE CHAGAS-MAZZA.

Como todos los insectos el cuerpo de la vinchuca está compuesto de tres regiones: cabeza, tórax y abdomen. Exteriormente se puede observar que en la cabeza posee los órganos sensoriales, en el tórax están insertados los órganos locomotores y en el abdomen, el aparato reproductor y las aberturas respiratorias (espiráculos).

La cabeza es alargada, fusiforme en la mayoría de las especies. Posee un par de ojos compuestos, que son globosos y salientes, un par de ojos simples (ocelos) y un par de antenas que son los órganos receptores de sensaciones. Como continuación del extremo anterior de la cabeza pero normalmente plegado sobre la parte inferior, se observa una especie de pico recto, denominado rostro, el que es tan largo como la longitud total de la cabeza.

En la cara ventral del tórax se insertan las patas que son delgadas y relativamente largas. Gran parte del dorso del abdomen está cubierto por las alas. Queda descubierto el conxivo, que es el reborde que rodea el abdomen y se destaca por mostrar manchas transversales claras.

La vinchuca es un hemíptero de la familia de los Redúvidos que se caracteriza entre otras cosas por tener su rostro recto, corto y dividido en tres segmentos.

Hay más de un centenar de especies de vinchucas; de ellas, 16 habitan en nuestro país, pero no todas tienen importancia epidemiológica en la

transmisión del Trypanosoma cruzi, que es un parásito unicelular microscópico, agente causal de la Enfermedad de Chagas-Mazza.

Un grupo de especies tiene hábitos silvestres y es vector del tripanosoma entre los mamíferos salvajes. Otro grupo suele invadir la zona peridomiliaria, estableciéndose en gallineros, corrales, conejeras, etc; se alimentan sobre los animales domésticos, participando en la transmisión del parásito al perro, gato y otros mamíferos que se crían cerca de las viviendas: estas especies de vinchucas están muy cerca del hombre, pero no llegan a invadir sus viviendas y por lo tanto no se alimentan sobre él ni le transmiten la enfermedad.

En nuestro país hay una sola especie de vinchuca que convive habitualmente con el hombre en el interior de las viviendas y se alimenta con su sangre: es el Triatoma infestans llamado popularmente chinche gaucha o simplemente vinchuca. En esta especie se han llevado a cabo los estudios del presente trabajo.

Las vinchucas se reproducen por huevo. La hembra pone hasta 200 huevos en su vida, que son de forma elíptica y de color blanco cuando son recién puestos. Luego este color va cambiando a rosado al adelantarse el desarrollo del embrión cuya evolución completa depende de la temperatura, 15 días en óptimas condiciones de laboratorio y hasta 50 días en la naturaleza. Los huevos son depositados en zonas ocultas. Desde que sale del huevo hasta que alcanza el estado adulto, el insecto experimenta una serie de transformaciones (metamorfosis holomorfa), que tiene una duración variable en relación con la temperatura, la humedad y la alimentación.

Al nacer, el insecto tiene unos 3 mm de largo y es parecido al adulto pero carece de alas y no está diferenciada sexualmente. Unas semanas después esta ninfa I muda de piel y aumenta de tamaño pero sigue careciendo de alas, estas mudas se repiten en número de cinco, y 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 de adulto con la correspondiente diferenciación sexual. Todo este proceso dura alrededor de 7 meses en condiciones óptimas, la vida del insecto adulto es de unos 15 meses.

El adulto mide 2,5 cm ó 3 cm de largo, siendo el macho algo menor que la hembra. La vinchuca es hematófaga desde que nace y a través de todas las

etapas de su desarrollo. Se alimenta exclusivamente sobre animales de sangre caliente. La vinchuca adulta puede chupar hasta 0,5 ml de sangre por vez, pero la resistencia al ayuno es notable, la ninfa del primer estadio puede vivir hasta 3 meses sin alimentarse y la máxima resistencia se encuentra en las ninfas del quinto estadio quienes pueden soportar hasta 200 días de ayuno.

La vinchuca originariamente no está infectada con el Tripanosoma cruzi se infecta cuando chupa sangre de una persona o animal ya infectado, junto con la sangre ingiere 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.

La Enfermedad de Chagas-Mazza o Tripanosomiasis Americana se extiende en América desde el paralelo 42° N hasta el 45° S, en donde existen 30 millones de personas infectadas de los cuales 5-8 millones tienen daño cardíaco permanente. En nuestro país constituye uno de los principales problemas de salud pública, ya que se conocen 2,5 millones de personas infectadas de las cuales 500.000 tienen complicaciones cardíacas.

La Enfermedad de Chagas-Mazza es primeramente una enfermedad rural y asociada a condiciones de pobreza, la infección humana puede provenir por contacto directo con la heces de vinchucas infectadas, ingestión o alimentos contaminados, bebiendo leche de animales infectados, por transfusiones sanguíneas o en forma congénita.

Todas las formas ninfales del insecto y ambos sexos pueden transmitir la enfermedad 20 días después de haber picado a un animal infectado.

Los hombres infectados por el tripanosoma permanecerán toda su vida disminuidos ya que no se conoce aún cura ni protección inmunológica.

Por lo tanto la importancia de las investigaciones sobre el vector no necesita mayor aclaración. Lo mismo ocurre, naturalmente, con las investigaciones sobre sustancias capaces de eliminar al vector. Un Comité de Especialistas internacionales en el Informe técnico N° 202 del año 1960 perteneciente a la Serie de Informes Técnicos de la OMS, concluyen que los problemas más indicados para su investigación en este caso son:

a) Estudios sobre la fisiología y la bioquímica de los hemípteros transmisores, como fuente de información útil para su control y b) Pruebas sistemáticas de nuevos insecticidas, o ya conocidos, pero no probados aún.

## OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO

Como propósito general, esta Tesis pretende caracterizar el sistema colinesterásico del Triatoma infestans (vinchuca) y estudiar su inhibición dentro del proceso de intoxicación del insecto con insecticidas organofosforados.

Los objetivos propuestos permitirán conocer con mayor detalle la lesión bioquímica primaria producida por los mencionados insecticidas en la vinchuca, vector de la enfermedad de Chagas-Mazza, cuyo efectivo control químico posibilitará reducir drásticamente la endemia cuyas terribles consecuencias para el país son ampliamente conocidas.

En lo particular, los propósitos de este trabajo son:

- a) Aislación y solubilización de la actividad colinesterásica de cabeza de vinchuca .
- b) Purificación parcial de la enzima responsable de la actividad acetilcolinesterásica con criterio toxicológico. Es decir, no llevar el proceso de purificación hasta un muy buen nivel bioquímico, sino buscar la eliminación de componentes indeseables como pueden ser otras esterasas, lípidos, eventuales inhibidores endógenos, etc. dentro de un enriquecimiento discreto de la actividad específica frente al sustrato acetiltiocolina.
- c) Caracterización de la enzima aislada y purificada frente a: temperatura, pH, activadores, inhibidores, sustratos, estabilidad térmica, comportamiento electroforético en gel de poliacrilemida, y obtención de los parámetros cinéticos característicos  $K_M$  y  $V_{máx}$  frente a los sustratos acetiltiocolina y butiriltiocolina.
- d) Estudio de la susceptibilidad de la enzima aislada y purificada a compuestos organofosforados, obteniendo las constantes bimoleculares de la reacción de inhibición  $k_i$  para el Paraoxon, Malaoxon, y DDVP. Se intenta vincular la acción tóxica sobre los insectos de estos compuestos determinada a través de las correspondientes  $LD_{50}$  con las respectivas potencias anticolinesterásicas determinadas a través de las  $k_i$  de los fosfatos in vitro.

e) Estudio de la inhibición "in vivo" de la actividad colinesterásica de la cabeza en vinchucas tratadas con Peration, con el fin de obtener correlación entre el avance de la intoxicación (síntomas característicos) y la depresión de la actividad colinesterásica, como un elemento de juicio para avalar la hipótesis aceptada de causa de muerte en insectos intoxicados con compuestos organofosforados.



*Materiales*

*y*

*Métodos*

PARTE EXPERIMENTAL:

MATERIALES Y METODOS

I) MATERIAL BIOLÓGICO: Se utilizaron ejemplares de Triatoma infestans (Klug) (vinchucas) de una colonia criada y mantenida en nuestro laboratorio (libres de Tripanosoma cruzi) desde el año 1974 y formada a partir de ejemplares silvestres y del Insectario del Instituto del Diagnóstico y Tratamiento del Mal de Chagas "Dr. Mario Fatala Chaven". Nuestro Insectario mantiene exactamente las condiciones de temperatura y humedad relativa ambiente (HRA) en 30° y 70% respectivamente, tanto para los huevos como para las cinco formas ninfales y los insectos adultos.

En los casos en que fue necesario se identificaron los distintos estadios larvales según características standardizadas en nuestro laboratorio. Las condiciones standard de crianza y mantenimiento del Insectario permiten mayor precisión en los ensayos biológicos.

II) OBTENCION DE LA ACETILCOLINESTERASA DE CABEZA DE TRIATOMA INFESTANS

II a) DISECCION: Se separó la cabeza de las ninfas y adultos previamente congeladas a -16°, por medio de pinzas de disección con el fin de asegurar la obtención de los ganglios supra e infraesofágicos pertenecientes al SNC del insecto. El ganglio supraesofágico es el cerebro del insecto como ya fuera descrito en la Sección correspondiente de la Introducción. Las cabezas fueron usadas inmediatamente o fueron almacenadas por cortos períodos de tiempo en congeladora a -4° hasta el momento de ser usadas.

II b) HOMOGENIZACION: Las cabezas obtenidas fueron seccionadas al nivel de los ojos compuestos por medio de tijeras de disección y luego separadas las antenas y el rostro en cada caso. Se colocaron en tubo de vidrio del homogenizador previamente enfriado en hielo. Se ensayaron distintos medios de homogenización que se describirán en cada caso.

Se utilizó un homogenizador Sorvall, modelo Omni Mixer 171U6 con "pestle" de teflon para tubos de 5 ml de capacidad.

El homogenato así obtenido se filtró por lana de vidrio, reteniéndose

los restos quitinosos de las cabezas. El filtrado constituyó en cada caso la correspondiente fracción cruda del preparado colinesterásico de cabeza de vinchucas.

## II c) PURIFICACION DE LA COLINESTERASA DE CABEZA DE TRIATOMA INFESTANS.

Se utilizaron entre 0,8 y 1,0 gr de cabezas de insectos adultos cortadas como se indicó, y se colocaron en tubo de homogenizador con  $\text{ClNa}$  0,5 M en buffer fosfatos 0,02M pH:7,2 (70 mg de cabezas/ml).

Se cortan las cabezas con tijera de disección por la mitad para favorecer la destrucción de la quitina y la posterior homogenización del material en el Omni Mixer. Se homogenizaron en frío y se filtraron por lana de vidrio, el filtrado fue la fracción cruda.

Se midió el volumen de la fracción cruda que fue tomado como el volumen de referencia y se guardó una alícuota para la determinación de actividad enzimática y de proteínas.

La fracción cruda se centrifugó a 18.800 g durante 30 minutos en una centrífuga Sorvall Superspeed SS-3 automática instalada en cámara fría. Se separaron el sobrenadante I y el pellet I. El pellet I se tomó con 0,5 volúmenes de DOC 15 mM en buffer fosfatos 0,02M pH:7,2 y se lo homogenizó dejándolo por una hora a temperatura ambiente para favorecer la solubilidad de las enzimas de membrana. Al cabo de ese tiempo se midió el volumen de la fracción y se guardó una alícuota para medir actividad enzimática y proteínas.

El sobrenadante I cuyo volumen fue medido también se lo guardó en frío para medir luego actividad enzimática y proteínas.

El pellet I resuspendido y homogenizado se lo centrifugó a 10.000 g durante 20 minutos, y se obtuvieron así el sobrenadante II y el pellet II. Se midió el volumen del sobrenadante II y se guardó una alícuota para determinar proteínas y medir actividad enzimática.

Al pellet II se lo resuspendió en un volumen igual al sobrenadante II de DOC 15 mM en buffer fosfatos 0,02M pH:7,2 y se lo guardó en frío hasta la determinación de actividad enzimática y proteínas.

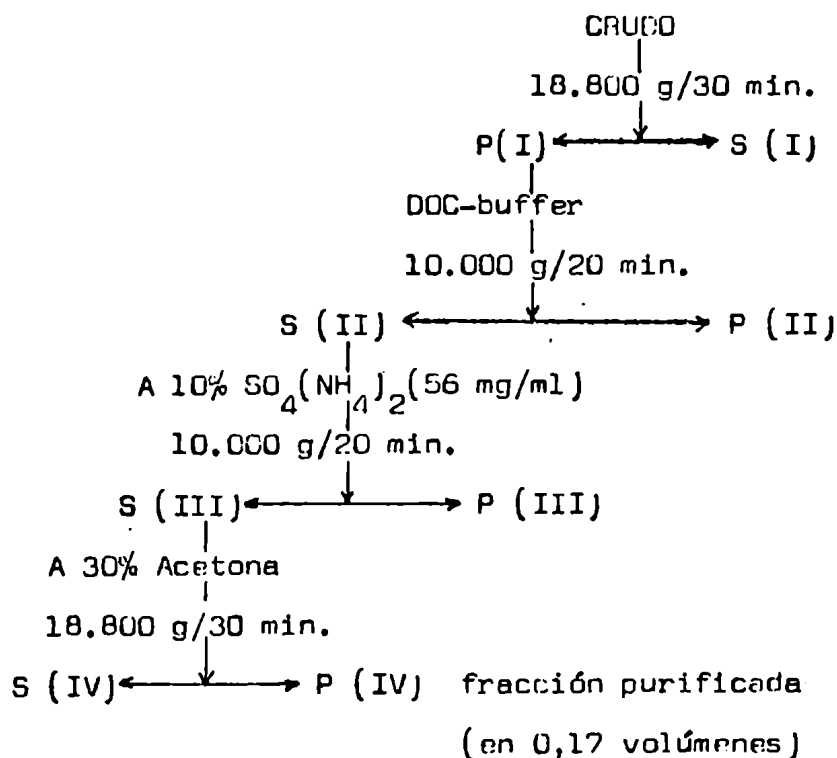
Al sobrenadante II se lo llevó a 10% de saturación con sulfato de amonio sólido, cuidando en el agregado que no se produjeran concentraciones locales altas y trabajando siempre en hielo. Se lo dejó 30 minutos

en baño de hielo para alcanzar el equilibrio de solubilidad y se lo centrifugó en frío a 10.000 g durante 20 minutos. Luego de ésto se obtuvieron el sobrenadante III y el pellet III . Se midió el volumen del sobrenadante III y se guardó una alícuota para la posterior medición de actividad enzimática y de proteínas. El pellet III se resuspendió en un volumen igual al del sobrenadante III de DOC 15 mM en buffer fosfatos 0,02M pH:7,2 y se lo guardó en frío para la posterior medición de la actividad enzimática y de proteínas.

El sobrenadante III se lo diluyó con igual volumen de agua destilada para disminuir su densidad y luego fue llevado a 30% de concentración con acetona. El agregado de la acetona previamente enfriada a  $-15^{\circ}$  se hizo lentamente y tratando de evitar en todo momento la producción de concentraciones locales altas. Se homogenizó muy bien la solución resultante y se lo mantuvo en congeladora durante una noche. Luego se centrifugó a 18.800 g durante 30 minutos, obteniéndose un sobrenadante IV y un pellet IV . Se midió el volumen del sobrenadante IV y se lo guardó en frío para la medición de la actividad enzimática y proteínas.

El pellet IV se lo resuspendió en 0,17 volúmenes de ClNa 0,5M en buffer fosfatos 0,02M pH:7,2. Se midió la actividad enzimática en esta fracción purificada y su contenido proteico.

Esquema del proceso de purificación:



## II d) ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Para las corridas electroforéticas se utilizó una fuente de poder Bio Rad modelo 500 y una celda electroforética Bio Rad modelo 15u A circular de acrílico con camisa de circulación de agua y 12 alojamientos para tubos de 12,5 cm de largo y 0,7 cm de diámetro externo o para tubos de 7 cm de largo y 0,7 cm de diámetro externo .

Los geles fueron preparados con acrilamida (monómero), bisacrilamida (comonómero), temed (acelerador), persulfato de amonio (catalizador) y Tris de Merck. Las soluciones stock para la preparación de los geles se llevó a cabo según Davis B.J. Am.N.Y.Acad.Sc., 121,404,1964.

Las soluciones stock se filtraron y se almacenaron en frascos de vidrio color caramelo en refrigerador a 4°, sirviendo de esta manera por varios meses.

Solución stock A: ClH 1N : 48 ml  
Tris : 36,6 gr  
TEMED : 0,23 ml  
Agua dest. : csp 100 ml  
pH: 8,9

Solución stock C: Acrilamida ; 28,0 gr  
Bisacrilamida:0,735 gr  
Agua dest. : 100 ml

Para realizar el gel de corrida, se preparó la solución de trabajo en el día de la siguiente forma:

### Solución de Trabajo para gel de corrida de 7% de acrilamida:

Solución A ; 1 volumen		SOLUCION DE PORO CHICO (I)
Solución C : 2 volúmenes		
Agua dest. : 1 volumen		
pH: 8,9 (8,8-9,0)		

Persulfato de Amonio:0,14 gr		SOLUCION DE PORO CHICO (II)
Agua dest. : 100 ml		

Se combinan iguales volúmenes de las soluciones (I) y (II) y se vierten en los tubos de vidrio para electroforesis.

Preparación de gel de poro grueso:

Solución stock B:

ClH 1N : 48 ml

Tris : 5,98 gr

TEMED : 0,46 ml

Agua dest. : csp 100 ml

pH:6,7

Solución stock D:

Acrilamida : 10 gr

Bisacrilamida:2,5 gr

Agua dest.: 100 ml

Solución stock E :

Riboflavina : 4 mg

Agua dest. : 100 ml

Solución stock F :

Sacarosa : 40 gr

Agua dest. : 100 ml

El gel de poro grueso se prepara mezclando:

1 parte de B + 2 partes de D + 1 parte de E + 4 partes de F

Se vierte sobre el gel de poro fino polimerizado y se inicia la fotocatalisis iluminando los tubos por medio de tubos fluorescentes.

Preparación de los geles:

Los tubos de electroforésis son lavados perfectamente con Extran con el fin de desengrasarlos y luego fueron enjuagados con abundante agua destilada ,se los secó con papel de filtro por afuera y se escurrieron perfectamente sus paredes internas.

Se colocaron en el extremo inferior de los tubos unos tapones de goma "ad hoc" y se los colocó en el rack para gelificación cuidando que quedaran nivelados respecto a la mesa con los tornillos niveladores.

Así dispuestos los tubos, se procede a llenarlos con la solución de trabajo recién preparada. Para los tubos de 7 cm de largo, se los llenó con 1,5 ml cada uno. Al cabo de 30 min. o 60 min., según el estado del catalizador (persulfato de amonio) se gelifica la poliacrilamida dentro de los tubos.

Antes que gelificaran se les agregó una gota de agua en la parte superior de cada gel con cuidado de no remover la solución de acrilamida, con el fin de lograr una superficie suave y lisa al gelificar, y que el menisco se formara sobre la gota de agua y no sobre el gel. Esto permite una mejor corrida de las bandas proteicas y una mejor resolución en el gel.

Después de gelificados, los tubos se invirtieron sobre papel absorbente secándose su interior para quedar listos para su uso o previo agregado del gel de poro grueso.

Preparación del Buffer stock de corrida:

TRIS : 6,0 gr

Glicina : 28,8 gr

Agua dest. : csp 1 lt

pH: 8,3

Se debe envasar en frasco color caramelo y a 4° para una duración de varios meses.

La solución stock del buffer se diluyó 1/10 antes de ser usada en los compartimentos electródicos.

Se pueden correr hasta 12 muestras con 500 ml de buffer diluido 1/10 antes de ser descartado.

Jamás se deben mezclar después de una corrida el buffer del compartimento anódico con el del catódico.

Preparación de las muestras:

Las fracciones crudas o purificadas de homogenatos de cabezas de nuestras vinchucas se obtuvieron con DCC 15 mM en buffer fosfatos pH:7,2 0,02M, y se centrifugaron a 10.800 g por 30 min.

Estos sobrenadantes fueron mezclados con una solución de sacarosa 40% para aumentar su densidad antes de ser sembrados sobre los geles de corrida. Se sembraron muestras de una concentración final de sacarosa entre 10-30% y que contenían a razón de 2,5 cabezas de vinchucas por gel.

Corrida electroforética:

Se colocaron los tubos con los geles en los alojamientos correspondientes en la cuba electroforética y se llenaron con el buffer 1/10 el recipiente inferior(anódico) y el recipiente superior(catódico).

Se cuidó que no quedaran burbujas de aire en la parte inferior de los geles, para lo cual se les colocó una gota de buffer después de sacarles las gomitas que los tapaba y antes de sumergirlos en el buffer de la celda anódica.

Así dispuestos, se procedió a sembrar las muestras que habían sido previamente preparadas, no sembrando más de 0,2 mg de proteínas por gel. La siembra se hizo con microjeringa Hamilton de 50 ul a través del buffer de la celda catódica. Las muestras quedaron directamente sobre el gel de corrida debido a que se aumentó la densidad por la sacarosa. Como colorante trazador se agregó 2 ml de Azul de bromo fenol (0,001%) en el recipiente catódico (-), o bien una gota de ABFenol mezclado con cada muestra individualmente. El ABFenol tiñe a la Albúmina ( que es la fracción proteica de mayor movilidad electroforética) y el colorante libre correrá adelante solo.

Se conectó la celda a la fuente de poder con el polo (-) arriba y el polo (+) abajo y se aplicaron 2 mA por tubo hasta que las muestras entraran en gel, luego se aplicó 5 mA por tubo y se trabajó a corriente constante en condiciones de refrigeración para evitar inactivación de la enzima por el calor producido por efecto Joule.

La corrida se interrumpió cuando el colorante ABFenol llegó a 5 mm del extremo inferior del gel.

#### Tinción para proteínas de los geles después del desarrollo electroforético:

Los geles fueron extraídos de los tubos de la siguiente forma:

Se inyectó agua entre la pared interna del tubo y el gel por medio de una aguja y una jeringa, lubricándose de esta forma el gel que se deslizó suavemente al retirar la aguja sin que se le hubiera provocado daño alguno.

El revelado de proteínas se realizó con una solución formada por:

Amido Schwartz: 1 gr

Acido acético 7%: 100 ml

Los geles se sumergieron en la solución de tinción por 30 min., luego de lo cual se recuperó el colorante y se lavaron los geles con agua de la canilla por unos minutos.

La decoloración de los geles se llevó a cabo en Acético 7%, reemplazando la solución frecuentemente para acelerar la decoloración que puede llevar dos o tres días.

Una alternativa interesante fue llevar a cabo la decoloración electroforéticamente, colocando los geles en los tubos de decoloración que son de



un diámetro interno mayor a los tubos de corrida, tal que permiten la entrada de los geles. La parte inferior de estos tubos está semicerrada de modo que los geles no caen, pero permite a su vez la comunicación con la solución del recipiente anódico (+).

Se colocó solución de acético 7% en ambos recipientes electródicos y se conectó a la fuente a corriente constante, 5 mA por tubo y al cabo de 45 minutos se terminó la decoloración, habiendo pasado el colorante a la celda anódica.

Revelado de la Actividad colinesterásica en los geles:

Método I: Se utilizó una adaptación de la técnica de Koelle modificada por Tsuji (106).

Procedimiento: 1) Se preincubaron los geles extraídos de los tubos después de la corrida electroforética en la solución buffer de revelado para acondicionarlos al pH de revelado de la actividad enzimática.

La preincubación se hizo por 30 min. cambiando el buffer acetato 0,1M pH: 5-6, dos o tres veces.

2) Se incubaron los geles en una solución formada por:

Solución de Cobre-Glicina: 1 ml

( 3,75 gr de glicina, 2,50 gr de sulfato de cobre y 100 ml de agua dest.)

Etanol absoluto: 1 ml

Buffer acetato 0,1M pH: 5-6 = 8 ml

Ioduro de ATC : 30 mg

o

Ioduro de BTC : 40 mg

Se disolvió el I ATC o el I BTC en unas gotas de agua dest. y se le agregó la mezcla de solución de Cobre-Glicina+Etanol abs.+Buffer Acetato.

Se incubaron los geles en esta solución en baño termostetizado a 30° durante 4 horas. Al cabo de este tiempo apareció una banda blanca de precipitado cuproso del complejo ioduro de cobre-tiocolina, en el lugar donde migró la enzima.

3) Se procedió a lavar los geles en buffer acetato 0,1M pH 5-6 durante una hora.

4) El revelado se llevó a cabo en solución de Ferricianuro de potasio 3% durante 15 min., apareciendo bandas marrones de actividad enzimática, o en solución de sulfuro de amonio diluido, durante 1 min. en cuyo caso las bandas aparecieron color pardas o negras.

5) Se lavaron los geles muy bien con agua y se guardan con agua en tubos de ensayo tapados para evitar que se sequen y distorsionen .

Método II: Se utilizó una adaptación de la técnica de Booth y Metcalf (107 ) que utilizan la solución de Gomori G. ( 108 ).

Procedimiento:

Solución stock:  $SO_4 Cu.5H_2O$  : 0,3 gr  
Glicina : 0,375 gr  
 $Cl_2 Mg.6H_2O$  : 1,0 gr  
Acido Maleico: 1,75 gr  
OHNa 1N : 30,0 ml  
 $H_2O$  dest. : 170,0 ml  
pH: 6 (controlar con pHmetro)

Solución de incubación:

Se pesaron 20 mg de I ATC y se disolvieron en unas gotas de agua y se le agregó 10 ml de la solución stock.

Una alternativa fue usar PTA, 80 mg disueltos en 3 ml de acetona o alcohol absoluto y luego agregarle 27 ml de la solución stock para dar una suspensión lechosa.

- 1) Se preincubaron los geles durante 30 min. en la solución stock.
- 2) Se incubaron en la solución de incubación durante 4 horas.
- 3) Se lavaron los geles con agua durante 1 hora.
- 4) Se incubaron en una solución de sulfuro de amonio amarillo diluida en 70% de etanol, lo que mejoró la penetración en el gel y aparecieron las bandas de actividad de color pardo o negro.
- 5) Se lavaron los geles en agua y se guardaron en tubos de ensayo con agua y bien tapados.

Método III: Se utilizó una adaptación de la técnica de Jameson et al. ( 109 ) Utilizo como sustrato el Naftil Acetato (aNA) que se copula con el Fast Blue RR y revela actividad esterásica en general.

Procedimiento:

1) Se preincubaron los geles durante 30 min. en solución buffer Tris-ClH 0,2M pH 7,0

2) Se incubaron en una solución formada por:

alfa-Naftil Acetato(Sigma Chem.Co,) : 4 mg

Etanol absoluto : 1 ml

Buffer Tris-ClH 0,2M pH: 7,0 : 9 ml

Fast Blue B (Sigma) : 10 mg

La solución se preparó en el momento de proceder a revelar pues de lo contrario se oscurece. El alfa naftil acetato se disolvió en el etanol absoluto y el fast blue B en el buffer y luego se mezclaron.

Se incubaron los geles en esta solución durante una hora en baño termotático a 30°.

3) Se lavaron los geles con solución de ácido acético 15% (v/v) durante 15 min.

4) Se almacenaron los geles en acético 2%.

Inhibición de la actividad colinesterásica en gel:

En todos los casos y utilizando cualquiera de los métodos de revelación, para llevar a cabo inhibición enzimática, se procedió a agregar el o los inhibidores en la concentración requerida tanto en los medios de preincubación como en las soluciones de incubación, a la misma concentración en ambos casos.

Se usaron como inhibidores Eserina  $10^{-5}$  M y Paraoxon  $10^{-5}$  M de concentración final.

---

### III) MEDICION DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASICA

#### III a) METODO CINETICO ESPECTROFOTOMETRICO

Se utilizó un espectrofotómetro UV-visible Varian 634 de doble haz, con un registrador Varian Modelo 20 acoplado. Se usaron celdas de cuarzo de 0,5 cm de paso óptico. Se aplicó una adaptación del método de Ellman (110). Se utilizaron los siguientes reactivos: ácido 5,5' ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) o reactivo de Ellman (Aldrich), yoduro de ATC (Fluka), yoduro de BTC (Sigma), tiopropionato de etilo (TPE) (Aldrich), feniltioacetato (PTA) fue sintetizado en el laboratorio según Booth y Metcalf R.L. Science 170, 455, 1970b). Se tomaron 5 ml de tiofenol (Benceno-tiol) y se enfriaron en baño de hielo. Se agregó lentamente y agitando 7,5 ml de anhídrido acético. Se dejó en baño de hielo aproximadamente 2 horas y luego a temperatura ambiente (por una noche). Se destiló a presión reducida (5-6 mm de Hg), intercalando una trampa de OHNa sólido. Se recogieron dos fracciones, una hasta 70° y otra que destiló entre 80-88°.

Se tomó una gota de la segunda fracción y se midió el índice de refracción  $n_D^{22} = 1,55934$ . Se tomó esta fracción con  $Cl_3CH$  y se lavó rápidamente con 1% de OHNa dos veces. La capa clorofórmica se secó con  $SO_4Na_2$  anhidro y se evaporó el  $Cl_3CH$  en corriente de nitrógeno. El residuo se destiló a presión reducida (4-5 mm de Hg), y comenzó a destilar a 88° (la mayor parte lo hizo a esa temperatura), destilando el total entre 88°-90°.

Se hizo un control por índice de refracción que dio:  $n_D^{22} = 1,56805$  (en bibliografía es  $n_D^{22} = 1,5706$ ) y se controló por TLC con  $Cl_4C$ -acetato de etilo (50:1) y cromatoplacas Merck de silicagel GF, dando un  $R_f = 0,31$  (bibliografía:  $R_f$  de tiofenol = 0,67;  $R_f$  de feniltioacetato = 0,38;  $R_f$  del ácido tioacético = 0,24)

Se hizo un control bioquímico del compuesto utilizándolo como sustrato de esterases de sobrenadantes microsomales de hígado de rata, y con preparados de esterases de huevos de vinchucas y dio una muy buena actividad enzimática usando el cromógeno DTNB del método de Ellman.

Finalmente se consideró el producto obtenido como puro.

Se preparó una solución de buffer-cromógeno pesando 10 mg del ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico en 100 ml de buffer fosfatos 0,2M pH 7,2.

Se conserva a 4° varias semanas y se usó frasco color caramelo.

La solución de ioduro de acetiltiocolina 12 mM se preparó pesando 34,7 mg en 10 ml de agua dest., la solución de butiriltiocolina 12 mM se preparó pesando 38 mg en 10 ml del ioduro de BTC, la solución de feniltioacetato 20 mM se preparó pesando 30,4 mg en 10 ml de etanol absoluto, y se pesó 40 mg de tiopropionato de etilo que se disolvieron en unas gotas de etanol para luego llevarlo a 10 ml con agua dest.

Procedimiento:

Se colocó en la celda de cuarzo de 0,5 cm de peso óptico, 1 ml de la solución de buffer-cromógeno y 0,05 ml de preparado enzimático agregando finalmente 0,05 ml del sustrato con lo cual comenzó la reacción enzimática que se registró cronometrando la lectura directa del espectrofotómetro o midiendo las pendientes en el registrador acoplado.

En la celda de referencia se colocó buffer-cromógeno y sustrato, descontándose de esta forma la autohidrólisis del mismo. Se hicieron también las correcciones debidas a la liberación de color no específicas por componentes del preparado enzimático, incubando el tejido en buffer-cromógeno sin sustrato.

El producto de la reacción es el anión 5-tio-2-nitrobenzoico que es altamente coloreado ( $E_m$ : 13.600 a 412 nm).

Se calculó la actividad de la siguiente forma:

$$\text{Act.} = \frac{\text{nmoles de sustrato hidrolizado}}{\text{min.}} = \frac{\Delta \text{Abs}/\text{min} \times 1,1 \times 10^3}{13,6}$$

$$\text{Act. específica} = \frac{\text{nmoles de sustrato hidrolizado}}{\text{min.} \times \text{mg de proteínas}}$$

Definimos UNIDAD ENZIMATICA : la cantidad de enzima que hidroliza 1 nmol de sustrato por minuto a 22° y a pH 7,2 .

III b) METODO CINETICO TITRIMETRICO

Se usó un titrímetro Radiometer tipo TTT la con escala externa de rango de pH 6,00-8,00 (divisiones de la escala: 0,01 pH), con un titrígrafo

acoplado Radiometer tipo SBR 2/s BU 1 . Se utilizaron un electrodo de vidrio y otro de calomel y agitación magnética.

La solución titulante fue OHNa 0,001 N preparada en el día con agua bidestilada libre de CO<sub>2</sub>, a partir de una solución valorada de OHNa 0,1N.

El titulante se debe controlar con una solución de Ftaleto ácido de potasio. La lectura de pH del aparato fue controlada cada vez con buffer Radiometer pH 6,5 y buffer ftalato ácido de potasio pH 4,00. Para el titulante se utilizó una bureta-jeringa Agla de 0,5 ml.

#### Procedimiento:

Después de chequear la lectura de los electrodos con los buffer mencionados, se colocó en un vaso de vidrio de 10 ml; 3 ml de agua y 0,3ml de preparado enzimático (el pH de los homogenatos crudos en ClNa 0,5M es 6,5). Se colocaron, electrodos en la solución y se ajustó el titrigráfico en pH-stat programando en el titrimetro las siguientes condiciones de operación: pH final 7,2 ,Proportional band en 0,3 , Range 20° , Deley of shut-off en ∞, Selector en: UP-Scale y en el módulo graficador se ajusta: Recording en ON, comenzando así la pretitulación es decir llevando la solución enzimática al pH final de la titulación.

Hecho esto, se debió comprobar la posibilidad de liberación espontánea de ácido a partir de la solución enzimática, para lo cual se dejó el equipo unos minutos funcionando. En el caso en que ocurrió liberación de ácido, se graficó y luego se dedujo del valor de la actividad enzimática en presencia de sustrato para obtener el valor real.

Después que el titrigráfico graficó por unos minutos las lecturas de la solución sin sustrato, se agregó 1 ml de ACh 10<sup>-3</sup> M en la solución agitada magnéticamente. Se barrió la superficie de la solución con un suave flujo de nitrógeno para evitar durante la titulación cualquier influencia debida al CO<sub>2</sub> . Se dejó el titulador automático funcionando aproximadamente 5 min. en cada caso, dependiendo el tiempo de titulación de la actividad que se estuviera midiendo.

Durante toda la operación se puede seguir el agregado de titulante directamente en el pH-metro externo o indirectamente en la curva del titrigráfico, notándose inmediatamente cualquier anomalía.

Cálculo de la actividad: La titulación se hizo con una bureta-jeringa Agla de 0,5 ml y el titulante fue 0,001N, es decir que la ordenada del papel registrador se recorrió totalmente de 0-100% con el agregado de 0,5 umoles de DHNa. La ordenada de la curva del títrografo indicó en umoles la cantidad de DHNa usada en cada caso, en cambio la abcisa indicó el tiempo en minutos ( velocidad del registrador 10 mm/min. ).

La simple lectura y la correspondiente conversión dio en cada caso la actividad colinesterásica expresada en :

$$\text{Act.} = \frac{\text{nmol de ácido liberado}}{\text{min.}}$$

$$\text{Act. específica} = \frac{\text{nmol de ácido liberado}}{\text{min.} \times \text{mg de proteína}}$$

---

#### IV) CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD COLINESTEFASICA

##### IVa) CURVAS DE ACTIVIDAD ESPECIFICA vs CONCENTRACION DE SUSTRATO

Se prepararon soluciones de ATC y BTC de 0,12mM; 1,2 mM; 12 mM; 120 mM y 240 mM con las cuales se cubrieron las concentraciones finales desde  $1,09 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  hasta  $2,18 \cdot 10^{-2} \text{ M}$  de los sustratos mencionados.

Se incubaron las cantidades adecuadas de las soluciones de los sustratos ATC y BTC con el preparado crudo en solución de buffer-cromógeno a 22°:

1,00 ml de buffer-cromógeno

0,050 ml de preparado enzimático

0,050 ml de ATC o BTC

Se registró la actividad enzimática por 5 minutos y se calcularon los :  
nmoles de sustrato hidrolizados/min. x mg de proteínas como se describiera para cada concentración de sustrato, descontando la autohidrólisis de los sustratos y el blanco de preparado enzimático (sin sustrato presente).

De igual manera se procedió con el preparado purificado, el cual se diluyó previamente con ClNa 0,5M en buffer fosfatos 0,02M pH 7,2 para que diera una actividad de aproximadamente 0,050  $\Delta \text{Abs}/\text{min}$  con una concentración final de ATC de  $5,45 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ .

La dilución del preparado purificado utilizado para su caracterización fue de 52 ug/100ul de proteínas.

Finalmente se graficaron las curvas de actividad específica en nmoles de sustrato hidrolizado/min x mg de proteínas vs pS (logaritmo negativo de la concentración molar de sustrato) para los sustratos ATC y BTC frente a los preparados crudos y purificados de la AChE de cabeza de vinchuca.

#### IV b) DETERMINACION DE $K_m$ y de $V_{max}$

Se calcularon los valores de  $1/v$  y de  $1/S$  para los sustratos ATC y BTC para homogenatos crudos y preparados purificados.

Los resultados se expresaron de acuerdo al método de Lineweaver y Burk (11) y graficamente se calcularon los valores de  $K_m$  y de  $V_{max}$ .

Para los homogenatos crudos se utilizaron concentraciones de ATC y de BTC que fueron desde  $10^{-5}$  M hasta  $5,45 \cdot 10^{-4}$  M, en cambio para los preparados purificados se usaron concentraciones de sustratos desde  $5,45 \cdot 10^{-6}$  M hasta  $5,45 \cdot 10^{-4}$  M.

#### IV c) CURVAS DE ACTIVIDAD vs pH

Se prepararon una serie de buffer fosfato 0,2M de pH 6,0 hasta pH 9,0 y se ensayeron con preparados crudos y purificados frente a ATC.

Todos los puntos fueron medidos por duplicado agregando la enzima a la mezcla de sustrato y buffer-cromógeno y midiendo enseguida la actividad enzimática, la otra serie fue incubada la enzima con el buffer-cromógeno por 20 min. antes de agregar el sustrato (ATC).

Los resultados obtenidos de las dos maneras fueron graficados como actividad porcentual vs pH, considerando como 100% a la actividad a pH 7,2, no percibiéndose diferencias. Se usó el método de Ellman ya descrito para ATC. Las curvas de actividad vs pH utilizando ACh como sustrato se realizaron por el método titrimétrico ya descrito, para lo cual se procedió de igual manera a la descrita arriba sólo que las soluciones de enzima en agua fueron llevadas antes de comenzar a medir la actividad a los valores de pH que se estudiarían: pH; 6,5; 6,7; 7,0; 7,2; 8,0; y 8,6.

Se tuvo muy en cuenta en descontar la autohidrólisis del sustrato (ACh) sobretodo a valores de pH mayores a 7,2 .



#### IV d) CURVAS DE ACTIVIDAD vs TEMPERATURA

Se incubaron a distintas temperaturas volúmenes medidos (1,050ml) de buffer-cromógeno y sustrato, y una vez termostatizados se agregaron 0,050ml de homogenatos crudos o purificados. Se utilizaron celdas termostatizadas para mantener la temperatura de incubación durante la medida espectrofotométrica. Las lecturas de actividad enzimática se registraron durante 3 minutos. Los datos finalmente se graficaron como actividad porcentual vs temperatura, tomando como 100% la actividad a 50° para los homogenatos crudos y en el caso de los preparados purificados el 100% correspondió a la actividad a 45°.

#### IV e) TIEMPO DE INACTIVACION A TEMPERATURA CONSTANTE

Los preparados enzimáticos crudos fueron incubados en un baño termostático a 50°, y a tiempos fijos se retiraron alícuotas a las que se les midió la actividad frente a ATC y BTC, de la manera que fuera descripta ya para el método espectrofotométrico.

De manera similar se procedió para el preparado purificado pero la temperatura de incubación en el baño termostático fue en este caso de 45°.

Los datos se graficaron como inactivación porcentual vs tiempo de incubación .

#### IV f) DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASICA FRENTE A DISTINTOS SUSTRATOS.

Se prepararon soluciones de distintos ésteres de colina que son conocidos sustratos de colinesterasas para estudiar las distintas afinidades que presentaban nuestros preparados crudos y purificados de I. infestans frente a dichos O-alquilésteres. La medición de la actividad colinesterásica para estos sustratos se llevó a cabo titrimétricamente como ya fuera descripto.

Preparación de las soluciones:  $10^{-3}$  M :

cloruro de ACh (PM: 181,66): 1,82mg/10ml

cloruro de BCh (PM: 209,7) : 2,09mg/10ml

ioduro de PCh (PM:287) : 2,87mg/10ml

ioduro de BzCh (PM: 243,6) : 2,43mg/10ml

cloruro de A $\beta$ MeCh (PM:195,7): 1,96mg/10ml

Se utilizó un homogenato crudo de una concentración de 3,3 mg de proteínas/0,3ml

La mezcla de titulación estaba compuesta por: 3,7 ml de agua+1 ml de sus-

trato  $10^{-3}$  M + 0,3ml de homogenato crudo = 5 ml

En el caso del preparado purificado se utilizó una concentración de:

63 ug/30ul para estos ensayos, y la mezcla de titulación estuvo compuesta

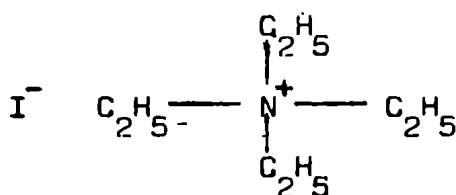
por: 4 ml de agua + 1 ml de sustrato  $10^{-3}$  M + 0,030ml de enzima purificada= 5ml.

Finalmente se compararon las actividades específicas para cada sustrato

en una concentración final de  $2 \cdot 10^{-4}$  M.

## V) INHIBICION "in vitro"

### V a) PROPIEDADES DE LOS INHIBIDORES



#### 1) Ioduro de tetraetilamonio (TEA)

PM: 257

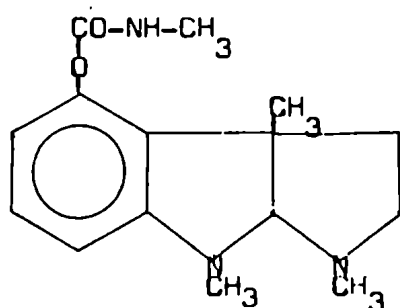
Este compuesto pertenece a una serie de inhibidores que interfieren con

la unión del sustrato al sitio aniónico de la AChE.

A este grupo pertenecen también compuestos como el Decametonio, tetrapropil amonio, etc. El nitrógeno cuaternario ataca el sitio aniónico evitando la entrada del sustrato. La reacción de TEA con la AChE difiere de la reacción entre la enzima y el sustrato en que no hay reacción con el sitio activo esterático. El TEA utilizado en nuestros experimentos fue sintetizado en nuestro laboratorio de la siguiente manera:

0,1 mol de trietilamina en gran exceso de ioduro de etilo fue calentado a baño de María durante 1 hora. El exceso de ioduro de etilo se eliminó a presión reducida y el producto remanente fue recristalizado de etanol 3 veces. El ioduro de TEA obtenido fue caracterizado por punto de fusión.

#### 2) ESERINA (sulfato de eserina Sigma)



Este tipo de compuesto se une al sitio aniónico y al sitio esterático de la AChE en una reacción cualitativamente análoga a la reacción entre la enzima y el sustrato. El efecto inhibitorio surge por la relativa lentitud con que la AChE es regenerada por hidrólisis del complejo intermediario. Distintos inhibidores darán diferentes intermediarios y sus velocidades de hidrólisis determinarán la duración y la reversibilidad de la reacción.

La eserina es un ejemplo de inhibidor de acción corta, se une al sitio esterático por su grupo carbamilo y al sitio aniónico por su grupo amino. La parte catiónica del inhibidor es hidrolizada dejando la enzima carbamylada. Luego ésta es gradualmente hidrolizada pero a una velocidad mucho menor que la hidrólisis del complejo enzima-acetilada de la reacción normal. Un uso importante de la eserina es en estudios bioquímicos e histológicos, donde sea necesario distinguir reacciones debidas a ChE de las debidas a otras esterasas "eserina-resistentes".

En la mayor parte de las especies una concentración de eserina  $10^{-5}$  M es suficiente para inhibir in vitro toda actividad colinesterásica.

La eserina es un inhibidor muy potente pero de acción corta y es soluble en lípidos. Tanto las sales de eserina como sus soluciones son oxidables por exposición a la luz y al aire, de modo que cualquier solución con un leve tinte rosado debe ser descartada.

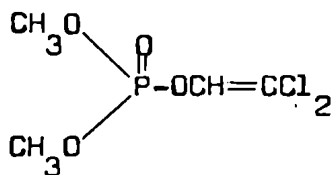
### 3) Fosfatos Orgánicos:

La mayoría de los organofosfatos reaccionan con la ChE solamente en el sitio esterático dando una enzima-fosforilada que es extremadamente resistente a la hidrólisis, lo que significa en definitiva una inhibición irreversible.

En general la literatura es confusa respecto a si un inhibidor en particular es irreversible o reversible, lo que ocurre es que en alguna medida tanto la AChE fosforilada como la carbamylada se pueden hidrolizar espontáneamente, pero esta velocidad es en general extremadamente lenta y el efecto fisiológico de una recuperación de ese tipo puede despreciarse.

En general la AChE fosforilada es más estable que la carbamylada, pero el grado de estabilidad depende del tipo y fuente de enzima tanto como de la

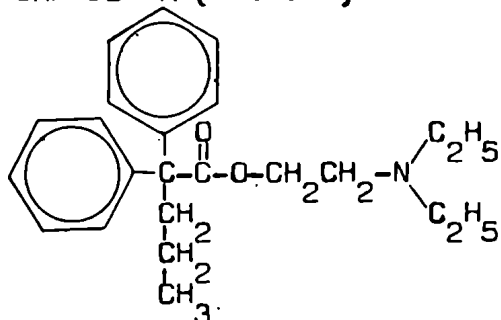




DDVP (Diclorvos, Vapona)  
(PM: 205)

El DDVP (2,2 Diclorovinil dimetilfosfato) es un inhibidor directo de la ChE de una vida media en agua a pH 7 de aproximadamente 8 horas. La LD<sub>50</sub> oral en ratas es 80 mg/Kg, es un insecticida de rápido "Knock-down" y tiene acción como fumigante pero posee un bajo poder residual. En mamíferos es rápidamente degradado por pérdida del metilo de la unión éster o del vinilo.

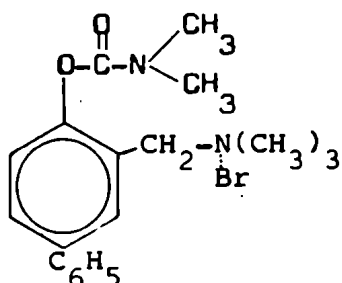
4) SKF-525 A (PM: 389)



SKF-525 A (PM:389)

El SKF-525 A (Clorhidrato de 2-Dietilaminoetil-2,2-difenilvalerato) de Smith Kline & French Laboratories, es un inhibidor del metabolismo de drogas que ha sido reportado por Díaz Gómez y Castro (112) como inhibidor muy rápido, competitivo y reversible de la ChE de suero de caballo y es probable que su acción se deba a la unión en el sitio esterático. Es mucho más afín la seudo-ChE de suero de caballo a la inhibición por SKF-525 A que la AChE de eritrocitos de bovino.

5) Nu-683 (PM: 393,3)

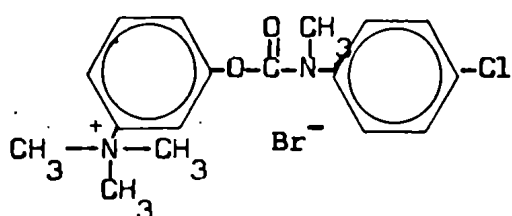


El Nu-683 de Hoffmann-La Roche (Dimetilcarbamato del bromuro de 2-hidroxi-5-fenil-benzil-Trimetilamonio) es una sal de amonio cuaternario soluble en agua y estable térmicamente.

A diferencia de la eserina el Nu-683 forma un complejo muy estable con las ChEs no específicas. La pseudo-ChE de plasma humano es inhibida 95% por  $10^{-7}$  M de Nu-683 y un 25% por  $10^{-9}$  M, en cambio la AChE de eritrocitos humanos es inhibida un 15% con  $10^{-8}$  M de Nu-683.

Pero existen diferencias en las distintas especies en cuanto a la susceptibilidad a la inhibición por Nu-683 de las dos enzimas, pseudo-ChE y la AChE. (113).

6) Nu-1250 (PM:399,4)



El Nu-1250 de Hoffmann-La Roche (N-p-clorofenil-N-metilcarbamato del bromuro de m-hidroxifenil trimetilamonio) es un análogo de la Prostigmina, soluble en agua que está reportado como inhibidor selectivo de la AChE. Sin embargo entre el margen de susceptibilidades a la inhibición de AChE y pseudo-ChE existen muchas diferencias de especie en especie.

Para la AChE de eritrocitos humanos es miles de veces más inhibidor que para la pseudo-ChE de plasma (en tejidos de perro es sólo 20 veces más inhibidor para la AChE que para la pseudo-ChE). En eritrocitos humanos la AChE es inhibida 66% por  $10^{-8}$  M de Nu-1250 mientras que la ChE de plasma no se inhibe (114)., con tejidos de gato no se encontraron diferencias significativas usando Nu-683 ni con Nu-1250 con los sustratos A MeCh y BzCh (115).

---

V b) INHIBICION DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASICA

Inhibición por TEA:

Se preparó una solución de 0,5M, 1,285gr en 10 ml de agua y se usó un volumen de 0,020 ml de esta solución en un volumen final de 1 ml, lo que resultó en una concentración final de 10 mM de TEA.

Se incubaron: 0,050 ml de homogenato + 0,020 ml de TEA (0,5M) + 0,980ml de buffer-cromógeno, durante 7 min. a 25° y se agregaron 0,050ml de sustrato ATC o BTC 12 mM y se midió la actividad enzimática durante 5 min como fuera reportado, calculando el porcentaje de inhibición por comparación con un control sin TEA.

Inhibición con Eserina:

Se preparó una solución de sulfato de eserina  $10^{-4}$  M, 3,24 mg. en 100ml de agua dest. Se incubaron 0,900ml de buffer-cromógeno + 0,050ml de homogenato + 0,100 ml de eserina  $10^{-4}$  M (resultando una concentración final de  $10^{-5}$  M) durante 15 min. a 25° y se agregaron 0,050ml de sustrato ATC o BTC 12 mM y se midió la actividad enzimática durante 5 min, calculando el porcentaje de inhibición por comparación con un control sin eserina.

Inhibición con Nu-683:

Se preparó una solución  $10^{-2}$  M que se guardó en heladera y se repuso cada dos días, 39 mg en 10 ml de agua. A partir de esta solución madre se prepararon otras  $10^{-3}$  M y  $10^{-4}$  M. Se incubaron 0,900ml de buffer-cromógeno + 0,050 ml de homogenato + 0,100 ml de Nu-683  $10^{-3}$  M o  $10^{-4}$  M (resultando concentraciones finales de  $10^{-4}$  M o  $10^{-5}$  M respectivamente), durante 5 min. a 25° y se agregó 0,050 ml de sustrato ATC o BTC 12 mM y se midió la actividad enzimática durante 5 min. calculando el porcentaje de inhibición por comparación con un control sin Nu-683.

Inhibición con Nu-1250:

Se preparó una solución madre de Nu-1250  $10^{-2}$  M, pesando 40 mg y disolviéndolos en 10 ml de agua. A partir de ella se prepararon dos soluciones,  $10^{-3}$  M y  $10^{-4}$  M. Se incubaron; 0,900 ml de buffer-cromógeno + 0,050 ml de homogenato + 0,100 ml de Nu-1250  $10^{-3}$  M o  $10^{-4}$  M (resultando finalmente  $10^{-4}$  M o  $10^{-5}$  M en Nu-1250), durante 5 min a 25° y se agregó 0,050 ml de sustrato ATC o BTC 12 mM y se midió la actividad enzimática durante 5 min., calculando el porcentaje de inhibición por comparación con un control sin Nu-1250.

Inhibición con SKF 525A:

Se preparó una solución de  $10^{-3}$  M de SKF 525A, 38,9 mg en 100 ml de agua que se guardó a 4°. Se incubaron : 0,95U ml de buffer-cromógeno + 0,050ml de homogenato + 0,05U ml de SKF 525A  $10^{-3}$  M (resultando una concentración final de  $5 \times 10^{-5}$  M en SKF 525A), durante 5 min. a 25° y se agregó 0,05U ml de sustrato ATC o BTC 12 mM y se midió la actividad enzimática durante 5 min. calculando el porcentaje de inhibición por comparación con un control sin SKF 525A .

Inhibición con Iso-OMPA:

Se preparó una solución  $10^{-3}$  M , 3,80 mg en 10 ml de etanol absoluto. Se incubaron; 0,95U ml de buffer-cromógeno + 0,05U ml de homogenato + 0,05U ml de iso-OMPA  $10^{-3}$  M (resultando finalmente una concentración de iso-OMPA de  $5 \times 10^{-5}$  M), durante 5 min. a 25° y se agregó 0,05U ml de sustrato ATC o BTC 12 mM y se midió la actividad enzimática durante 5 min., calculando el porcentaje de inhibición por comparación con un control sin iso-OMPA.

Inhibición con Paraoxon:

Se preparó una solución de Paraoxon  $5,6 \times 10^{-3}$  M , 15,3 mg en 10 ml etanol absoluto. A partir de esta solución madre se prepararon otras  $10^{-4}$  M ,  $10^{-5}$  M  $10^{-6}$  M y  $10^{-7}$  M. Se incubaron; 0,95U ml de buffer-cromógeno + 0,05U ml de homogenato + 0,05U ml de Paraoxon (de las soluciones preparadas), durante 20 min. a 30° y se agregó 0,05U ml de ATC 12 mM y se midió la actividad enzimática durante 5 min., calculando el porcentaje de inhibición para cada concentración de Paraoxon ensayada por comparación con un control sin Paraoxon.

Inhibición con Malaoxon:

Se preparó una solución de Malaoxon  $10^{-3}$  M, 15,7 mg en 50 ml de etanol absoluto. A partir de esta solución madre se prepararon soluciones de  $10^{-4}$  M y  $10^{-5}$  M. Se incubaron; 0,95U ml de buffer-cromógeno + 0,05U ml de homogenato + 0,05U ml de Malaoxon (de las soluciones preparadas) durante 15 min. a 30° y se agregó 0,05U ml de ATC 12 mM y se midió la actividad enzimática durante 5 min., calculando el porcentaje de inhibición para cada concentración de inhibidor ensayada por comparación con un control sin Malaoxon.



Inhibición con DDVP:

Se preparó una solución de DDVP  $10^{-2}$  M, 20,5 mg en 10 ml de agua. A partir de esta solución madre se prepararon otras soluciones:  $10^{-3}$  M,  $10^{-4}$  M y  $10^{-5}$  M. Se incubaron; 0,950 ml de buffer-cromógeno + 0,050 ml de homogena to + 0,050 ml de DDVP (de las soluciones preparadas.) durante 10 min. a  $30^{\circ}$  y se agregó 0,050 ml de sustrato ATC 12 mM y se midió la actividad enzimática durante 5 min. calculando el porcentaje de inhibición para concentración de inhibidor utilizada por comparación con un control sin DDVP .

V c) DETERMINACION DE  $I_{50}$  :

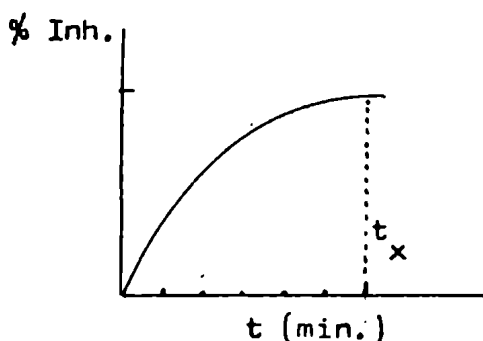
La  $I_{50}$  es la concentración molar de inhibidor necesaria para disminuir la actividad enzimática a la mitad.

Primeramente se debe establecer el tiempo de preincubación mínimo que produzca un máximo de inhibición en la actividad colinesterásica. Para ello se incuba el preparado enzimático en buffer-cromógeno con una concentración de inhibidor fija ( alrededor de  $10^{-5}$  M o  $10^{-7}$  M) por un rango de tiempo entre 0 y 60 min. en un baño a  $30^{\circ}$ . Al final de cada período de preincubación se agrega el sustrato, se mezcla bien y al cabo de un minuto se comienza a registrar la actividad.

El porcentaje de inhibición se calculó de la siguiente forma:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\Delta \text{Abs/min})_{\text{sin Inhibidor}} - (\Delta \text{Abs/min})_{\text{con Inhibidor}}}{(\Delta \text{Abs/min})_{\text{sin Inhibidor}}} \times 100$$

Se graficó el % de Inhibición vs tiempo de preincubación en minutos:



De esta manera quedó establecido el  $t_x$  de preincubación para un determinado inhibidor y una dada enzima frente a un sustrato en particular.

Con este tiempo de preincubación ( $t_x$ ) se trabajó para la determinación de la  $I_{50}$ . El cálculo de la  $I_{50}$  se efectuó gráficamente a partir de 3 o 4 medidas de inhibición realizadas con distintas concentraciones de inhibidor cercanas a la que produce un 50% de la actividad enzimática.

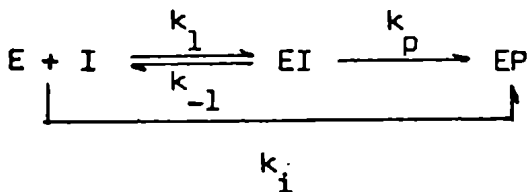
Se graficó %Inhibición vs pI (-log de la concentración molar de inhibidor) calculando los porcentajes de inhibición en cada caso como se describiera a un tiempo de preincubación constante predeterminado.

V d) DETERMINACION DE "k<sub>i</sub>":

La reacción entre un inhibidor organofosfato y la ChE sigue una cinética de pseudo primer orden, y la velocidad de inhibición de la ChE es proporcional a la concentración de inhibidor.

El enfoque cinético más simple es suponer que se trata de una reacción bimolecular entre la AChE y el organofosfato.

Aldridge ( 116 ) propuso que la inhibición irreversible de la AChE por organofosfatos podría representarse de la siguiente manera:



E: enzima libre , I: inhibidor , EI: complejo enzima-inhibidor ,  
 EP: enzima inhibida o fosforilada ,  $k_1$ : constante de velocidad de asociación de la enzima al inhibidor ,  $k_{-1}$ : constante de velocidad de disociación del complejo EI ,  $k_p$ : constante de velocidad de fosforilación ,  
 $k_i$ : constante bimolecular de inhibición .

Aldridge pensó que como se trataba de una reacción bimolecular se podría obtener una constante de inhibición de segundo orden de la siguiente forma:

$$k_i = \frac{\ln A_0/A_t}{I \cdot t} \times \frac{1}{I}$$

$A_0$ : actividad enzimática a tiempo cero ,  $A_t$ : actividad enzimática a tiempo t , t: tiempo , I: concentración de inhibidor .

Normalmente al graficar  $\ln A_0/A_t$  vs  $t$  se obtienen relaciones lineales muy buenas para los oxo derivados de compuestos organofosforados que se encuentran en concentraciones muy en exceso respecto a la enzima.

Procedimiento para la determinación de " $k_i$ ":

Se prepararon homogenatos de cabeza de vinchucas con 10 cabezas de insectos adultos en 2 ml de ClNa 0,5M en buffer fosfatos 0,02M ph 7,2 que se filtraron por lena de vidrio.

Se colocaron 0,450 ml de homogenato crudo en un baño a 30° y se le agregaron 0,050 ml de solución de Triton X-100 10% ( 60mg en 0,6 ml de agua) con lo cual se tuvo una concentración final de Triton X-100 al 1% .

Se tomaron 100 ul de preparado enzimático para medir la actividad control a  $t = 0$  ( $A_0$ ), y se le agregaron 0,950 ml de buffer-cromógeno y 0,050 ml de ATC 12 mM.

Al resto del homogenato termostatizado a 30° se le agregó el inhibidor, 4 ul de una solución  $10^{-4}$  M y se agitó muy bien para homogenizar, a partir de ese momento se tomaron los tiempos de inhibición a concentración de inhibidor constante, que resultó finalmente  $10^{-6}$  M para Paraoxon , Malaoxon y DDVP. En el caso de preparados enzimáticos purificados se trabajó con concentraciones de  $10^{-7}$  M para Paraoxon y Malaoxon y de  $5 \times 10^{-7}$  M para DDVP. A cuatro tiempos fijos por lo menos (que pueden ser: 3,6,9 y 12 minutos) de incubación a 30° con el inhibidor, se sacaron 100 ul de preparado enzimático y se midió la actividad enzimática durante dos minutos, con lo cual se obtienen los distintos valores de  $A_t$ .

Se graficó finalmente  $\ln A_0/A_t$  vs  $t$  para cada compuesto ensayado y de la pendiente de las rectas obtenidas se tiene  $k_i \times ( I )$  y consecuentemente los valores de  $k_i$  conociendo las concentraciones de inhibidor utilizadas.

VI) INHIBICION DE LA ACETILCOLINESTERASA DE CABEZA DE TRIATOMA INFESTANS IN VIVO .

VI a) DETERMINACION BIOQUIMICA DE LA INHIBICION IN VIVO POR INTOXICACION CON PARATION.

Se preparó una solución de Paration 0,25 mg/ml en acetona y se aplicó por tópico 0,05 ul/mg en insectos adultos machos entre 100 y 200 mg de peso y ayunados durante 14 días mantenidos a 30° y a 70% de HRA.

Los 90 insectos tratados se dispusieron en 10 cristalizadores de vidrio de 10 cm de diámetro a razón de 9 insectos por recipiente, colocando papel plegado en cada uno de ellos para facilitar que los insectos trepan y evitar así contaminación accidental de cabezas por contacto con abdómenes topicados. Se preparó un grupo control topicados sólo con el solvente. A intervalos de 1 hora se separaron 9 insectos al azar y se los congeló a -16° por 3 min., luego de lo cual se los sometió a lavados con acetona para eliminar el insecticida que no hubiera penetrado y luego con agua para la eliminación de la acetona.

Los insectos se secaron sobre papel de filtro y se realizaron 3 homogenatos (a cada hora) de 3 cabezas cada uno con 0,2 ml de ClNa 0,5M. Se filtraron por lana de vidrio y se incubaron con: 0,950 ml de buffer-cromógeno + 0,100 ml de homogenato + 0,050 ml de ATC 12 mM para medir la actividad enzimática.

Los porcentajes de inhibición se realizaron comparando las medidas de actividad correspondientes a cada hora exacta después del tratamiento con la actividad del grupo control. Se determinó el contenido de proteínas para cada homogenato de modo de calcular la actividad específica.

Los resultados obtenidos por triplicado fueron evaluados mediante el test de "Student" utilizando una computadora Hewlett Packard 9810A.

En el análisis de los datos un  $p < 0,05$  demostró variaciones significativas, y un  $p > 0,5$  no demostró variaciones significativas.

#### VI b) DETERMINACION EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE LA INHIBICION IN VIVO POR INTOXICACION CON PARATION .

Tres grupos de 15 vinchucas adultas macho de 200 mg de peso promedio ayunadas durante 14 días y mantenidas a 30° y a 70% de HRA fueron tratadas por aplicación tópica de una solución de Paration de 0,25 mg/ml a razón de 0,05 ul/mg de insecto.

Al tiempo de muerte los insectos fueron separados en 3 grupos de 15 y tratados según se describió en VI a) . Les 15 cabezas se homogenizaron

en 0,3 ml de DOC 15 mM en buffer fosfatos 0,02M pH 7,2, se dejaron 1 hora a temperatura ambiente y luego se centrifugaron a 10.800 g por 30 min. El sobrenadante resultante se mezcló en la proporción de 70 ul + 50 ul de solución de sacarosa 40% y se sembró sobre el gel de corrida directamente como se describió en II e). De igual manera se procedió con el grupo de insectos control.

Con los tórax de los insectos tratados y control se hicieron homogenatos de 5 tórax en 0,5 ml de DOC 15 mM en buffer fosfatos 0,02 M pH 7,2 y se dejaron 1 hora a temperatura ambiente siendo centrifugados luego a 10.800 g durante 30 min. Los sobrenadantes resultantes se mezclaron en la proporción 200 ul + 100 ul de solución de sacarosa 40% y se sembró 100 ul de esta mezcla en cada gel. Con los tórax de los insectos control se procedió de igual manera.

Las condiciones de corrida electroforética fueron las reportadas en II e) como así mismo la técnica de revelado de actividad enzimática con alfa naftil acetato.

#### VI c) HISTOPATOLOGIA DE LA INTOXICACION POR PARATION

Con el fin de estudiar el daño en el SNC provocado por la intoxicación con Paration en Triatoma infestans, se utilizaron grupos de ninfas V obtenidas de nuestro insectario que fueron expuestas a un film seco de Paration de 18 ug/cm<sup>2</sup> y a las 6 horas de la exposición se comenzó a notar claros síntomas de incoordinación nerviosa. En ese momento se los sacrificó.

Se les cortó las cabezas y se fijaron superficialmente con solución de Bouin ( 70 ml de solución acuosa saturada de ácido pícrico + 25 ml de formol 40% y 5 ml de ácido acético glacial) durante 60 minutos.

Al cabo de ese tiempo y siempre en medio acuoso y utilizando un microscopio estereoscópico Nikon modelo SMZ-2, se procedió a quitarles la cutícula mediante cortes longitudinales laterales con lo cual se facilitó la buena penetración del fijador, dejándolos en el mismo por 1 hora más.

Se los sometió luego a un proceso de deshidratación sumergiéndolos en concentraciones crecientes de etanol: 70% , 96% y 100% dejándolos 10 min. en cada uno de ellos. Terminada la deshidratación se utilizó benzol como líquido intermediario durante 5 min. para embeberlos luego en parafina fundida 24 horas. Por último se incluyeron en parafina Merck PF:57-6U orientando la pieza de forma tal que la superficie de corte coincidiera con el plano longitudinal del cerebro.

Se obtuvieron cortes de 3 micrones utilizando un micrótomo para cortes en parafina Reichert. Los cortes fueron coloreados por la técnica hematoxilina-eosina de Mayer ( 117 ). Los tiempos usados para la desparafinización, hidratación, coloración y para la posterior hidratación y montaje fueron muy breves para evitar el daño de los tejidos.

La secuencia fue: xilol: 20 min; etanol 96%: 7 min; etanol 70%: 10 min ; Hemelumbre de Mayer: 10 min ; Agua corriente para virar al azul: 20 min; Eosina: 5 min ; etanol 96%: 1 min; etanol 100%: 1 min ; xilol: 30 seg.

Para la preparación de la Hemelumbre de Mayer se usó hematoxilina de George T. Gurr Ltd y para la solución de eosina 0,1% , eosina amarillenta de la misma firma comercial.

La observación de los preparados histológicos se realizó con un microscopio Nikon modelo SK<sub>e</sub> y para la obtención de las microfotografías se le agregó un equipo fotomicrográfico automático Nikon modelo AFM .

## VII) EVALUACION DE LA TOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS

### VIIa) DETERMINACION DE LA DOSIS LETAL 50 (LD<sub>50</sub>).

#### Aplicación tópica de los tóxicos:

Se seleccionaron los insectos cuidadosamente por estadio y peso y en el caso de los adultos por sexo, peso y edad . Los insectos ayunados durante 7 días se inmovilizaron colocándolos en posición dorsal en un cepo diseñado especialmente con lo que se facilitó la aplicación de los tóxicos por tópico. Los insectos fueron pesados al mg con una balanza analítica Mettler H-54 .

Se prepararon las soluciones de los compuestos OP en acetona de la siguiente manera: DDVP: 3 mg/ml; 1 mg/ml; 0,33 mg/ml; 0,11 mg/ml para el Malation: 1 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,060 mg/ml y 0,015 mg/ml y el Paration: 1 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,25 mg/ml ; 0,125 mg/ml; 0,0625 mg/ml .

Se topicaron 0,05 ul/mg de peso de las soluciones preparadas con una microjeringa Hamilton de 50 ul provista de un "reppiting dispenser" .

La topicación se realizó en la parte ventral de los insectos y los controles se topicaron de igual manera pero sólo con el solvente. Se utilizaron de 4 a 5 vinchúces por nivel de concentración de pesticida.

Los cuidados posteriores al tratamiento fueron : tanto los insectos tratados como los controles se colocaron en frascos de vidrio perfectamente limpios y tapados con una tela de gasa que permite el intercambio de aire.

Todos los frascos tienen en su interior un papel plegado que permite que los insectos se trepen a él. Los frascos debidamente rotulados con las dosis ensayadas se colocaron en una incubadora a 30° y a 70% de HRA, en condiciones que resultaron iguales a las de crianza para no variar su metabolismo . Se observaron los resultados de mortalidad a 24 horas y a 48 horas dando así por terminado el ensayo .

#### Aplicación de los tóxicos por inyección intracelomática:

Se prepararon soluciones de los tóxicos en acetona 5% por ser una concentración de solvente que no presentó mortalidad de los controles.

Los compuestos ensayados se prepararon en concentraciones de 1 mg/ml en acetona 5% y se inyectaron 0,05 ul/mg de peso.

Los insectos utilizados fueron machos o ninfas V que fueron inyectados con una jeringa Hamilton de 50 ul y una aguja N°30.

La zona a inyectar es la membrana intersegmental entre el cuarto y quinto segmento abdominal ventral. Se introdujo la aguja en el costado derecho del insecto en la forma lo más paralela posible a la superficie del cuerpo y se incorporó el insecticida en forma lenta cuidando que no saliera hemolinfa. Las vinchucas se debieron inmovilizar para este procedimiento en el cepo tomándolas por el tórax.

Se ensayaron 4 niveles ( 4 concentraciones del compuesto) con 6 u 8 insectos por nivel, procediendo de la manera descrita con los cuidados después del tratamiento .

## VIIb) TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Existen varios tratamientos estadísticos de los resultados para evaluar experimentos de Dosis-Efecto, en nuestro caso utilizamos el de Litchfield y Wilcoxon (118) y el método de Weil (119).

El método de Litchfield y Wilcoxon permite calcular la  $LD_{50}$ , la pendiente de la curva y los límites de confianza. Usa los datos en sus unidades originales que se grafican en papel de probabilidades logarítmicas (PROBIT) los porcentajes de mortalidad en la escala de probabilidades y las dosis en la escala logarítmica.

En los casos en que se tuvieron datos de 0% y 100% de mortalidad y los datos intermedios no alcanzaron para trazar una recta se recurrió al método de Weil. La única condición de aplicabilidad de este tratamiento es que la combinación de resultados en los niveles ensayados figuren en las tablas de Weil, en caso afirmativo se puede obtener el valor de  $LD_{50}$  con sus límites inferior y superior.

## VIII) OTRAS DETERMINACIONES

### VIIIa) DETERMINACION DE PROTEINAS:

Las proteínas se determinaron por el método de Lowry y colaboradores (120). Se realizó una curva standard con albúmina de suero humano (Sigma) 1 mg/ml. Se usó un blanco de reactivos con 1 ml de agua y 4 ml de solución alcalina de cobre, se dejó 10 min a temperatura ambiente y luego se agregó 0,40 ml de reactivo de Folin Ciocalteu diluido 1+2, y se esperó 30 min. a temperatura ambiente para luego leer a 660 nm en un espectrofotómetro Varian 634.

### VIIIb) DETERMINACION DE LIPIDOS:

Se llevó a cabo según el Merckotest 3321, se utilizó una solución de vainillina 8 mM en ácido fosfórico 11 M y se leyó a 530 nm en un espectrofotómetro Varian 634.



*Resultados*

*y*

*Discusión*

## RESULTADOS Y DISCUSION

### I) Medición de la Actividad Colinesterásica

Hoy día existen muchos métodos bioquímicos para la determinación de la actividad colinesterásica, de utilidad en distintas aplicaciones.

Las diferentes técnicas se pueden clasificar de acuerdo Ann Silver (121) en:

- a) Métodos gasométricos
- b) Métodos dependientes del cambio de pH.
- c) Métodos titrimétricos.
- d) Métodos colorimétricos y espectrofotométricos.
- e) Métodos que dosan sustrato remanente.
- f) Métodos radiométricos.
- g) Métodos misceláneos.

a) Dentro de estas técnicas la más usada es la manométrica de Warburg, cuya primera aplicación en ChE fue la propuesta por Ammon R. (122).

A pesar de haber sido desarrollada hace muchos años, es una de las más exactas.

Según Augustinsson K.B. (123) el error es de  $\pm 2\%$ .

El método se basa en la liberación de  $\text{CO}_2$  que se produce cuando el ácido liberado por la hidrólisis enzimática reacciona con una solución de  $\text{CO}_3\text{HNa}$ .

El volumen de  $\text{CO}_2$  producido es proporcional a la actividad enzimática y se mide manométricamente. Sus desventajas consisten en que no pueden ser aplicados para estudios de efectos de pH, ni para efectos de activación por sales por la presencia del  $\text{CO}_3\text{HNa}$  que en alguna medida reduce el efecto de activación.

Esta técnica ha sido ampliamente utilizada y entre las múltiples modificaciones reportadas una de ellas se adapta a determinaciones en insectos (124).

b) La velocidad de cambio de pH debida al ácido producido por la hidrólisis del sustrato se puede registrar electrométricamente (125), o registrado fotométricamente por cambio de color de indicadores de pH como el rojo fenol o el azul de bromotimol (126).

Augustinsson K.B. ( 123) señaló que la sensibilidad y exactitud de este método no difiere del de Warburg.

c) El principio de este método es la titulación con álcali del ácido liberado por la hidrólisis enzimática. El álcali puede ser agregado continuamente para mantener el medio de incubación en el pH inicial, o puede ser agregado después de un tiempo fijo para restablecer el pH al original. Augustinsson K.B. (127) enumera una larga lista de variantes que usan indicadores para determinar el punto final de la titulación, recomendando este procedimiento donde la exactitud no es vital.

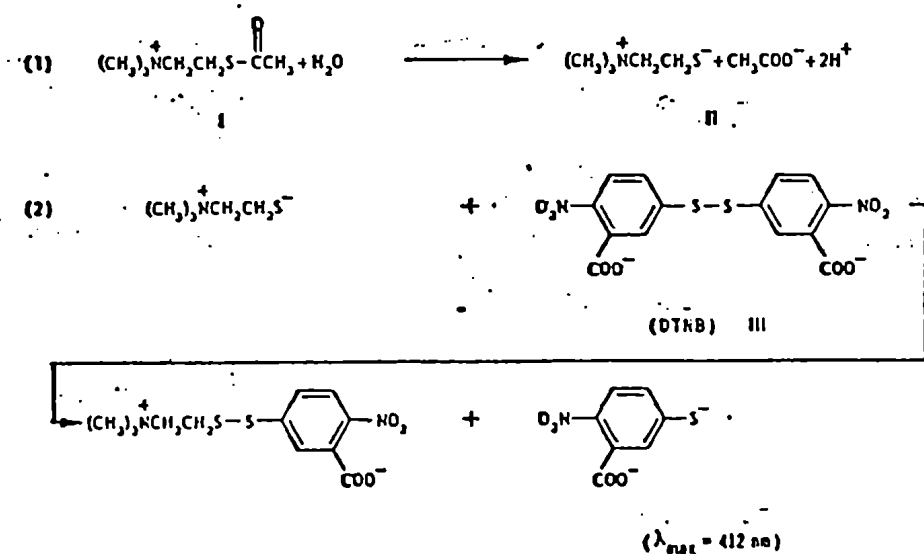
Es posible mucha mayor exactitud y precisión cuando el punto final de la titulación se determina electrométicamente.

El desarrollo del "pH-stat" ( 128) ha hecho de la técnica titrimétrica una de las más exactas actualmente disponibles.

Según Augustinsson K.B. ( 123) su aplicación parece virtualmente ilimitada. Dada su índole cinética permite apreciar el curso de la reacción enzimática.

d) Augustinsson K.B. ( 127) menciona como técnicas colorimétricas la que se basa en la reacción del  $Cl_3Fe$  con el ácido acético dando un complejo pardo, o la que usa carbonaftoxicolina como sustrato para medir finalmente B-naftol copulado.

Ellman et al. ( 110) desarrollaron un método espectrofotométrico que requiere como sustrato ATC o BTC. La tiocolina producida por hidrólisis enzimática reacciona con el 5,5'ditiobis-2-nitrobenzoato de sodio para dar el anión amarillo 5-tio-2-nitrobenzoato ( $\lambda = 412nm$  ,  $E_m = 13.6UU$  ).



A diferencia de otros métodos colorimétricos esta técnica esta basada en la medición del producto de la reacción y no en el dosaje del sustrato remanente ,lo que la convierte en más sensible. Según Holmstedt ( 129) este método presenta como ventajas, simplicidad, alta precisión, constancia de pH, versatilidad y cortos períodos de incubación.

Indudablemente es uno de los métodos más directos y rápidos con que se cuenta actualmente.

e) Los métodos más antiguos para medir ChE se basaban en la medición de la ACh remanente después de la incubación de la enzima con el sustrato. Inicialmente el método corriente fue el ensayo biológico "bioassay". Actualmente existen otros métodos, de los que el más común es el de Hestrin (130 ).

Esta técnica se basa en la reacción entre la hidroxilemina en medio alcalino y la acetilcolina remanente para dar acetihidroxámico que por agregado de  $Cl_3Fe$  en ClH da un complejo soluble rojo púrpura.

Según Holmstedt ( 129) los métodos basados en la medición de sustrato remanente presentan como desventaja que no miden la velocidad de desaparición del sustrato y por lo tanto, son inferiores a otras técnicas de determinación de ChE. Por otra parte no es tan exacto como el manométrico o titrimétrico pero es muy sensible.

f) Los métodos radiométricos son los de más reciente desarrollo.

El método de Winteringham F.P.W. y Disney R.W. ( 131) se basa en la incubación de la enzima con ACh (acetil-1-<sup>14</sup>C-colina).

El acetato (<sup>14</sup>C) formado es volatilizado y la actividad residual del sustrato remanente es contada en centellador líquido.

Otros métodos miden la actividad del acetato (<sup>14</sup>C) después de la separación de la ACh, siendo el paso de separación producto y sustrato la variante más usual (132 y 133).

g) Existen numerosas técnicas que no se pueden clasificar en la forma descripta. Entre ellas mencionaremos al método de Prince A.K. (134 ) que usa como sustrato yoduro de 1-metilo-7-acetoxiquinolinio.

La hidrólisis de este sustrato da un compuesto altamente fluorescente, el 1-metil-7-hidroxi-quinolinio, cuya fluorescencia por unidad de tiempo es proporcional a la actividad enzimática.

Este método no es altamente específico pues el sustrato puede ser hidrolizado por otras hidrolasas, pero es muy sensible.

Cranmer M.F. y Peoples A. ( 135) desarrollaron un método cromatográfico en fase gaseosa en el que el sustrato es el 3,3 dimetilbutilacetato, es muy rápido y sensible, pero tiene reservas en cuanto a especificidad. Con el objeto de medir la actividad ChE en homogenatos de cabeza de vinchucas, fueron ensayados los métodos de Hestrin, Ellman y titrimétrico. Para la mayor parte de las determinaciones llevadas a cabo utilizamos el método de Ellman que resultó ampliamente satisfactorio debido a su sensibilidad, precisión, exactitud, rapidez y versatilidad.

El único reparo destacable es la limitación que introduce la necesidad de tio-sustratos. Esto trae aparejado inconvenientes tales como no poder utilizar sustratos altamente específicos que ayuden a distinguir entre ChE no específicas y AChE, o encontrar anomalías en la dependencia de la actividad con el pH causadas por el grupo tioéter, como se describe más adelante. A pesar que la ATC no es el sustrato natural de la AChE su uso a los fines de la medición bioquímica de actividad está ampliamente aceptado ( 136).

El método titrimétrico ofrece semejantes ventajas de precisión, exactitud, y versatilidad pero su aplicación es menos sencilla y su sensibilidad es menor. Habida cuenta de sus relativas desventajas, su aplicación fue restringida a las determinaciones en las que fue necesario utilizar sustratos oxigenados.

El método colorimétrico de Hestrin fue ensayado según la modificación de Castro y Castro ( 137) en virtud de su reportada sensibilidad ( 130). La aplicación de este método para homogenatos de cabeza de vinchucas no ofreció ninguna ventaja respecto al de Ellman. Por el contrario su naturaleza no cinética, la menor exactitud y la mayor complejidad operativa nos condujo a descartarlo como alternativa recomendable para nuestros fines.

## II) Extracción y solubilización de la Actividad Colinesterásica

### a) Medios de extracción

Fueron probados distintos medios de homogenización a los fines de obtener las condiciones óptimas de extracción de las enzimas responsables de la actividad colinesterásica de cabezas de vinchucas.

En la tabla 2 se resume los resultados obtenidos con agua destilada, ClNa 0,15M y 0,50M, butanol 1% en 0,15M de ClNa, deoxicolato de sodio 15y 30 mM . También fueron ensayados como medios de extracción soluciones de ClK 0,15M y buffer fosfatos 0,2M pH=7,2; los que demostraron muy pobre eficiencia de extracción, ya que sus actividades resultaron menores a las obtenidas con agua destilada.

Del análisis de la tabla 2 surgen algunas consideraciones sobre los medios probados. El ClNa mejoró la actividad del homogenato crudo respecto al agua destilada. Este efecto puede deberse a un incremento en la extracción o a la activación de la enzima. Con el fin de comprobar esta última posibilidad se evaluó el efecto de distintos cationes sobre la actividad enzimática. Para ello se prepararon homogenatos crudos en agua destilada de cabezas de vinchucas adultas. Soluciones de ClNa, ClK, Cl<sub>2</sub>Ca y Cl<sub>2</sub>Mg 0,1M fueron utilizadas independientemente, para llegar a una concentración final de 50 mM en el volumen de incubación.

El reactivo de Ellman se preparó en agua destilada llevada a pH 7,2 con solución de OHNa diluido. Los resultados fueron los siguientes:

Medio de incubación	AGUA destilada	ClK	ClNa	Cl <sub>2</sub> Ca	Cl <sub>2</sub> Mg
Actividad enzimática porcentual	100	132	140	140	124

En todos los casos la influencia de los iones aumentó la velocidad inicial de hidrólisis de la ATC en el mismo orden respecto a la correspondiente al agua destilada.

Efectos similares de activación por cationes fueron reportados para AChE proveniente del núcleo caudado del buey ( 138) en eritrocitos de bovino ( 139) en eritrocitos humanos ( 140) en anguila eléctrica (141 ) y en cabezas de moscas (142 ).

Este efecto activador del catión  $\text{Na}^+$  que observamos en ChE de Triatoma infestans podría en parte justificar el incremento de actividad enzimática respecto al agua destilada, que se observa en tabla 2.

Tabla 2

Medios de homogenización de cabezas de Triatoma infestans

	Actividad enzimática del homogenato crudo <u>nmoles de ATC</u> min x ml	Actividad % en el sobrena- dante de 1000 g	Actividad % en el sobrena- dante de 10.000 g
Agua destilada	57,30	--	--
ClNa 0,15M	77,65	31	6,2
ClNa 0,50M	95,44	37	5,1
Butanol 1%			
en ClNa 0,15M	155,30	36,5	7,3
Triton X-100 0,1%			
en ClNa 0,15M	35,59	77,3	47,0
Triton X-100 0,5%			
en ClNa 0,15M	46,91	86	52,0
Deoxicolato de			
Sodio 30 mM	106,76	100	100
Deoxicolato de			
Sodio 15 mM	113,23	100	100

Los valores fueron obtenidos por duplicado de homogenatos de cabezas de vinchucas adultas a razón de cinco por ml.

b) Efecto del butanol

La adición de distintos alcoholes en el medio de homogenización mejora la actividad colinesterásica como ha sido reportado para la AChE de cucaracha americana ( 143) y para mosca doméstica ( 73 ) .

La justificación para este incremento en la actividad colinesterásica fue que los alcoholes, especialmente el n-butanol actuarían como detergentes. De esta forma liberarían la enzima de su asociación a membranas. Otra posibilidad estudiada fue que el butanol actuara como un activador independientemente de su efecto solubilizante de enzimas particuladas. Colhoun ( 143) y Takade ( 142) encontraron que también se observaba un incremento en la actividad colinesterásica agregando el butanol en el medio de incubación.

Ambos autores justifican este hecho por cambios conformacionales que afectan el sitio activo de la enzima .

Esta posibilidad estaría avelada por la observación de Herskovitz T.T. et al. ( 144) que encontraron cambios en la conformación del quimotripsinógeno por el agregado de alcoholes.

Shatoury H.H. ( 145) sugirió que en realidad el n-butanol inhibiría la ChE de cabeza de mosca por desnaturalización y el efecto de activación observado sería debido a la activación de una proenzima.

Nosotros encontramos que el agregado de butanol en el medio de homogenización de los preparados de cabeza de T. infestans mejoran la actividad respecto a los obtenidos en agua destilada. Este incremento de la actividad enzimática es función de la concentración de butanol hasta 1%, como se observa en el Gráfico 1 , siendo luego constante hasta la máxima concentración estudiada.

A los fines de evaluar un posible efecto activador del n-butanol, se lo agregó en una proporción de 5% referida al volumen de incubación, cuya composición se describe en la sección Materiales y Métodos. El homogenato crudo fue obtenido en ClNa 0,5M, luego de 5 minutos de preincubación se inició la reacción enzimática por agregado del sustrato.



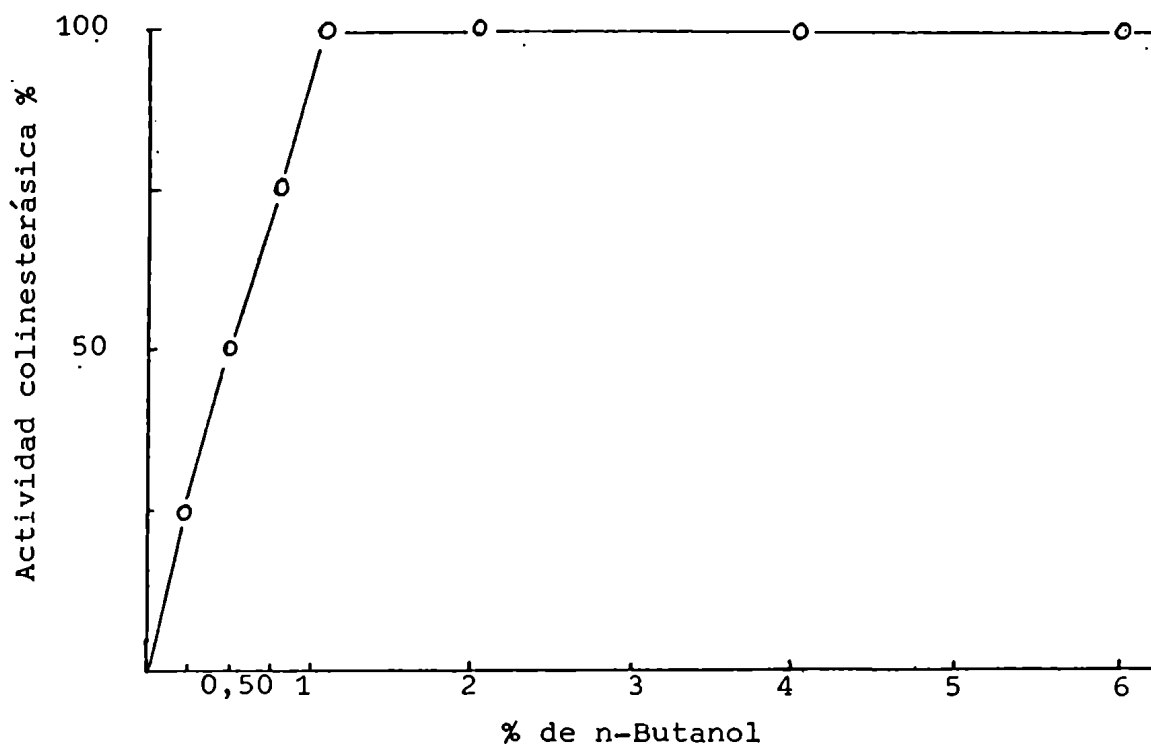
La actividad enzimática fue incrementada en un 17% cuando se usó ATC como sustrato y en un 39% para BTC.

En otro experimento similar la concentración de n-butanol fue de 1% y el período de preincubación de 40 minutos. En este caso el aumento de la actividad enzimática frente a ATC fue de 120% demostrando una dependencia con el tiempo del fenómeno de exaltación de la actividad colinesterásica.

Nuestros resultados sugieren que el efecto del n-butanol en homogenatos de cabeza de vinchucas podría deberse fundamentalmente a activación. En efecto de la observación de la Tabla 2 surge que una centrifugación a 10.000 g por 60 minutos lleva la actividad colinesterásica frente a ATC a un nivel similar a la obtenida con ClNa 0,15M y 0,50M después de igual tratamiento. Este resultado descartaría el efecto detergente del n-butanol como factor crítico del incremento de actividad enzimática observado cuando es incluido en el medio de homogenización.

Gráfico 1

Variación de la actividad colinesterásica respecto a la concentración de n-butanol en el medio de homogenización.



c) Efectos de los Detergentes

Muchos estudios sobre distribución subcelular de AChE de cerebro de mamífero demostraron que la enzima está asociada con elementos particulados de la célula (146) (147) (148), y especialmente en subfracciones que contienen membranas y terminales nerviosas (149) (150).

También evidencias histológicas y estudios de microscopía electrónica demostraron la AChE localizada en estructuras membranosas de la célula (151).

En nuestros preparados de cabeza de vinchucas la actividad enzimática frente a ATC permanece en un 90% en el pellet de una centrifugación a 105.000 g durante 1 hora. Nuestras primeras tentativas de solubilización de la AChE de cabeza de vinchuca fueron fracasos y sugirieron que podría tratarse de una lipoproteína o estar combinada con sustancias lipídicas de la célula. Algunos agentes tensioactivos habían sido usados ya para solubilizar o disociar lipoproteínas en procedimientos de purificación de AChE (152). Según Dewald B. et al. (153) los agentes más útiles para solubilizar enzimas de membrana han sido el deoxicolato de sodio, dodecil sulfato de sodio, y el Triton. Nuestras experiencias estuvieron orientadas a encontrar un agente tensioactivo que permitiera obtener homogenatos crudos con una buena actividad enzimática hacia el sustrato ATC y esta actividad se mantuviera en el sobrenadante a pesar de las centrifugaciones. En la tabla 2 observamos los resultados del empleo de un detergente no iónico como el Triton X-100 y de uno iónico como el deoxicolato de sodio. Del análisis de esta tabla surge como más adecuado el DOC como solubilizante de la AChE de cabeza de T. infestans ya que la actividad de los crudos es mayor a la obtenida con agua destilada solamente y dicha actividad no disminuye por una centrifugación de 10.000 g durante 1 hora. En cambio usando Triton X-100 se obtienen homogenatos crudos con menor actividad que los obtenidos con agua destilada y principalmente no resulta adecuado porque dicha actividad se pierde en un 50% después de centrifugado 1 hora a 10.000 g.

El Triton X-100 fue probado en las concentraciones de 0,1% y 0,5% ya que fue reportado (154) que hasta concentraciones del 2% de detergentes no iónicos no inhiben la actividad de la AChE.

La mejor solubilización observada cuando se usó DOC en lugar de Triton podría justificarse en base a un diferente modo de acción.

El DOC a diferencia del Triton X-100 actúa separando lípidos de proteínas. ( 155) ( 156) ,facilitando la solubilización de AChE cuya naturaleza lipoproteica fue reportada por varios autores (157 ) (158 ).

El efecto solubilizante del DOC agregado al medio de homogenización resultó genuino, ya que se verificó la posibilidad de modificación de la actividad enzimática de cabeza de vinchuca por acción del detergente. Para ello se agregó, a homogenatos de cabeza obtenidos en agua destilada, una proporción de DOC que resultara en una concentración final de 30 mM y se los preincubó durante 40 minutos a temperatura ambiente luego de lo cual se agregó el sustrato (ATC) y se midió la actividad colinesterásica que en ningún caso difirió de la del homogenato original obtenido sólo en agua.

Respecto a las concentraciones de DOC estudiadas vemos en tabla 2 que una concentración de 30 mM no sólo no produce homogenatos de mayor actividad que cuando utilizamos 15 mM, sino que ésta resulta inferior .

Sihotang encontró trabajando con AChE de eritrocitos humanos que concentraciones crecientes de DOC producían un marcado aumento de la actividad enzimática hasta 60 mM, notándose, para concentraciones mayores, una brusca caída de la actividad. (155 ). El autor justifica este hecho por la remoción de fosfolípidos provocado por el detergente. Tratándose la AChE de una enzima asociada a fosfolípidos, la concentración de éstos en el medio tendría un valor crítico por debajo del cual la enzima actuaría con menor eficiencia. Sihotang verificó esta hipótesis revertiendo el fenómeno por agregado de fosfolípidos exógenos.

En nuestro caso probablemente la concentración de 30 mM nos lleva a una concentración deficiente en fosfolípidos lo que justificaría la ligera caída en actividad al compararla con la obtenida con 15 mM del detergente.

Finalmente el DOC aparece como un medio de solubilización adecuado y promisorio de obtención de AChE de homogenatos de cabeza de vinchuca a los fines de posteriores estudios de purificación y caracterización enzimática.

### III) PURIFICACION DE LA ACETILCOLINESTERASA DE CABEZA DE TRIATOMA INFESTANS

El estudio de las propiedades de la AChE de insectos , en especial de cabeza, es de sumo interés no sólo para la bioquímica comparada, sino también desde un punto de vista toxicológico, para el diseño de insecticidas organofosforados ( 159)( 160).

Las propiedades favorables de algunos de estos insecticidas en cuanto a su selectividad (es decir mayor toxicidad en insectos que en mamíferos) ha sido justificada en parte por una mayor actividad inhibitoria sobre sistemas colinesterásicos de insectos que de mamíferos ( 161)(162 )( 163). Una buena parte de los estudios existentes sobre ChE de insectos han sido realizados con homogenatos crudos(164 )(165 )( 166) y no son demasiados los intentos realizados para purificarlos dado que son enzimas de membrana y en algunos casos por no ser abundante y demasiado activo el material biológico. Sin embargo algunos éxitos se han conseguido en la purificación parcial o intensiva y posterior caracterización de AChE de cabeza de moscas ( 73 )(167 ), grillo(168 ), cucaracha(169 ) y abeja(170 ).

Metcalf (171 ) ha sugerido la necesidad de estudiar las AChE purificadas de aquellos insectos que son plaga. El encontró diferentes valores para las constantes de fosforilación y de inhibición frente a los mismos inhibidores trabajando con AChE purificada de mosca, abeja y grillo.

De acuerdo a estos resultados, él sugiere que cada especie de insecto podría tener AChE estructuralmente distintas como se demostró para otras enzimas estudiadas sobre una base comparativa como por ejemplo la ribonucleasa.

Heilbronn E.(171 ) consideró necesario la realización de un esfuerzo para la purificación y cristalización de ChEs, con el objeto de obtener nueva información sobre la reacción entre esas enzimas y los agentes anticolinesterásicos. En cambio Hollingworth alertó sobre la posibilidad que las propiedades de las ChEs por el hecho de ser enzimas de membrana, podrían cambiar durante el proceso de purificación, y por lo tanto no resultar útil para el uso con un criterio toxicológico.

Según Aldridge W.N.( 171) sería posible realizar progresos en el diseño de mejores insecticidas aún utilizando ChEs impuras.

Nosotros tratamos de establecer una metodología que nos permitiera obtener la AChE de cabeza de Triatoma infestans suficientemente purificada con el objeto de estudiar sus características y el efecto de los compuestos OP sobre ella. Desde este punto de vista resultaban componentes indeseables en homogenatos crudos de cabeza de vinchucas, las colinesterasas no específicas, las esterasas eserina-resistentes, los lípidos y los inhibidores endógenos. Por otra parte, la discreta actividad colinesterásica intrínseca del Triatoma infestans que es común a los Hemípteros (164) y la insolubilidad de este sistema enzimático de membrana, representó una limitación para la aplicación de métodos de purificación más exhaustivos y en general de bajo rendimiento.

En nuestro caso, del estudio de diferentes pasos de purificación, seleccionamos como satisfactorios los correspondientes al esquema que se describe en la parte experimental. El mismo implica una centrifugación diferencial del homogenato crudo, una solubilización del pellet en DCC, una nueva centrifugación, un fraccionamiento en sulfato de amonio del sobrenadante resultante y finalmente un fraccionamiento acetónico.

Este procedimiento simple y rápido permitió obtener un preparado enzimático purificado 14 veces con un rendimiento del 78%.

En la tabla 3 se resumen los valores obtenidos, de volumen, proteínas totales, actividad frente a ATC, rendimiento porcentual y factor de purificación en cada paso del proceso de purificación.

El análisis de los resultados parece indicar que los pasos del fraccionamiento de sulfato de amonio y el acetónico son los de mayor contribución al enriquecimiento en actividad específica. Si observamos el rendimiento % en cada etapa de la purificación, encontramos un resultado inesperado. En efecto, al partir del paso de la centrifugación diferencial se aprecia un significativo incremento en el rendimiento a pesar de que existe una disminución apreciable del contenido proteico. Este hecho sugirió la posibilidad de que existiera un inhibidor colinesterásico endógeno en la cabeza de T. infestans cuya progresiva eliminación posibilitaría un aumento de la actividad ChE y por lo tanto un incremento en el rendimiento del proceso. A los fines de corroborar esta hipótesis, se midió en forma comparada la actividad en homogenatos de cabeza de T. infestans y en cerebros aislados, con los resultados que se resumen en la table 4.

TABLA 3 PURIFICACION DE LA ACETILCOLINESTERASA DE CABEZA DE TRIATOMA INFESTANS.

(\*) Una Unidad de AChE se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 nmol de ATC por min. a 22° y pH 7,2

FRACCION	VOLUMEN ml	PROTEINAS TOTALES mg	UNIDADES TOTALES (*)	ACTIVIDAD ESPECIFICA Unidades/mg	RENDIMIENTO %	PURIFICACION
HOMOGENATO CRUDO	12	75	775	10,4	100	1
PELLET 18.800g resuspendido en DOC/Buffer	6,2	39	270	7	35	0,7
SOBRENADANTE 10.000g	5,7	17	406	24	53	2,3
SOBRENADANTE DE FRACCION SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 10%	5,25	8	569	72	74	6,9
PELLET FRACCION ACETONA 30% resuspendido en ClNa 0,5M/Buffer	1,9	4	600	150	78	14,4

TABLA 4 ACTIVIDAD COLINESTERASICA EN CABEZA Y CEREBRO DE T. INFESTANS

	<u>nmoles de ATC</u> min x mg proteínes	<u>nmoles de BTC</u> min x mg de prot.	<u>nmoles ATC</u> min x cabeza	<u>nmoles ETC</u> min x cabeza
CEREBRO	150	15	15	1,5
CABEZA	10	2	8	1,6

El análisis de los mismos avala la hipótesis de la existencia de un inhibidor del sistema colinesterásico presente en cabeza pero no en cerebro de vinchuca. En efecto como se puede ver en la Tabla 4, la actividad en cerebro frente a ATC resultó 15 veces mayor que en cabeza. Cabe destacar que a priori la disminución del color presente en los homogenatos crudos y observable en los sucesivos pasos de purificación (especialmente en el primer pellet) sugirió la posibilidad de que el inhibidor estuviera vinculado a esa coloración. La comprobación de que el color de los homogenatos crudos era debido a los ojos compuestos del insecto, nos hizo poner especial énfasis en la eliminación de los mismos cuando se hizo la disección de los cerebros. Estos ojos aislados fueron homogenizados y ensayados en su capacidad inhibitoria de colinesterasas, con los resultados siguientes:

	AChE de cabeza de moscas (crudo)	AChE de cabeza de vinchucas (purificada)	AChE de eritrocitos de bovino (comercial)
INHIBICION	95%	97%	0%

Para la realización de este experimento se prepararon homogenatos de cabeza de moscas en ClNa 0,5M filtrados por lana de vidrio, homogenatos de cabeza de vinchuca purificados como se describiera y una solución de AChE de eritrocitos bovinos (Sigma) en solución fisiológica.

En todos los casos por dilución se logró igual actividad frente a ATC. A cada preparado enzimático se le agregó el equivalente a un cuarto de ojo compuesto homogenizado en ClNa 0,5M.

Los resultados indican claramente la presencia de un inhibidor de AChE en los ojos compuestos del T.infestans.

Sorpresivamente la AChE de eritrocitos bovinos no fue afectada por el mencionado inhibidor, lo que sugiere una marcada especificidad del mismo para AChE de insectos.

Nuestros objetivos respecto a la purificación de la AChE de cabeza de T.infestans no estaban sólo circunscriptos a obtener un incremento en la actividad específica sino a eliminar componentes toxicológicamente indeseables. En primer lugar resultaba crítica la eliminación de otras ChEs. Como se observa en la tabla 5, la actividad frente a ATC y a BTC en homogenatos crudos, sugiere la presencia de al menos dos tipos de ChE, una AChE y otra BuChE. El análisis de la relación ATC/BTC en cada paso del proceso de purificación (tabla 5) nos muestra un progresivo enriquecimiento en la actividad de la AChE, que se hace máximo en el pellet de 0-30% en acetona (pellet IV). Esto sugiere la eliminación durante el proceso de purificación de la BuChE.

De acuerdo con Aldridge y Reiner (60) la actividad frente a una mezcla de sustratos debiera ser igual a la actividad de cada uno medido independientemente, en el caso de estar en presencia de dos enzimas frente a dos sustratos específicos. Si en cambio la velocidad frente a mezcla de sustratos fuera menor que la medida independientemente, caben dos alternativas: o existe una enzima que hidroliza los dos sustratos, o hay dos enzimas que hidrolizan los dos sustratos (especificidad superpuesta).

Si bien este es nuestro caso,  $\text{velocidad mezcla} < \text{velocidad(ATC)} + \text{velocidad(BTC)}$  (tabla 5), no cabe la posibilidad de que estuviéramos en presencia de una sola enzima que hidrolizara ATC y BTC, ya que el cociente de la actividad frente a ambos sustratos (ATC/BTC) no permaneció constante durante los sucesivos pasos de purificación (tabla 5).

Este hecho, sumado a algunas evidencias que se mencionarán cuando describamos la caracterización de la AChE, parece indicar que de dos ChE presentes en el homogenato crudo, sólo queda una en el preparado purificado



**TABLA 5** DATOS QUE REPRESENTAN LA ACTIVIDAD INDIVIDUAL FRENTE A LOS SUSTRATOS ATC,BTC,y PTA, LA ACTIVIDAD DE SUSTRATO MEZCLA FRENTE ATC+BTC,ATC+PTA Y BTC+PTA, Y ACTIVIDAD RELATIVA ATC/BTC Y PTA+ESERINA/PTA DE LAS DISTINTAS ETAPAS DEL PROCESO DE PURIFICACION DE HOMOGENATOS DE CABEZA DE TRIATOMA INFESTANS.

FRACCION	ATC	BTC	PTA	ATC+BTC	ATC+PTA	BTC+PTA	PTA+ESERINA	$\frac{PTA+ESERINA}{PTA}$ (INDICE DE ESTERASAS)	ATC/BTC
	-----valores de Abs./min a 412 nm para 0,050 ml de cada fracción-----								
HOMOGENATO CRUDO	0,045	0,012	0,037	0,026	0,069	0,043	0,020	0,54	3,75
PELLET I	0,057	0,010	0,035	0,030	0,080	0,025	0,009	0,26	5,70
SOBRENADANTE									
II	0,055	0,007	0,022	0,029	0,070	0,022	0,007	0,32	7,85
SOBRENADANTE									
III	0,088	0,010	0,044	0,026	0,103	0,036	0,014	0,32	8,80
PELLET IV									
	0,063	0,004	0,022	0,025	0,060	0,015	0,000	0,00	15,80

con características de AChE, pero con una ligera capacidad de hidrolizar BTC. La enzima eliminada podría ser clasificada como una BuChE por su afinidad a BTC. La presencia de esterasas eserina-resistentes en los homogenatos crudos representan para los fines toxicológicos una contaminación indeseable. En efecto, pues las mismas pueden actuar degradando .. compuestos CP, invalidando de esta manera los estudios cinéticos de inhibición de ChE llevados a cabo con tales anticolinesterásicos, como por ejemplo fuera reportado para el DDVP en plasma humano ( 173) y para el Malation en homogenatos de *Culex Pipiens Pipiens* (174 ).

Las esterasas pueden ser clasificadas de acuerdo a Holmes y Masters (172 ) en carboxiesterasas las que son inhibidas por organo fosfatos pero no por eserina, arilesterasas las que no son inhibidas por organofosfatos pero se inhiben por reactivos de sulfhidrilos, acetilesterasas las que no son inhibidas por organofosfatos, ni por eserina, ni por reactivos de sulfhidrilos y las ChEs que como ya se describiera abundantemente, son inhibidas por organofosfatos y por eserina.

En nuestros preparados crudos de cabeza de *Triatoma infestans* detectamos actividad de esterasas diferentes de la ChE. Esta actividad fue clasificada según Holmes y Masters frente a inhibidores específicos ( eserina y paraoxon  $10^{-5}$  M) usando como sustrato apropiado el PTA. Los resultados indicaron que un 78% de la actividad esterásica fue atribuible a acetil y arilesterasas y un 22% debido a carboxiesterasas.

Respecto a la proporción de esterasas, en la table 5 mencionamos un índice de esterasas (eserina resistentes) que representa el cociente entre la actividad frente a PTA y la actividad frente a PTA del mismo preparado pero inhibido por eserina. Este índice da idea del contenido de esterasas (eserina resistentes) y varía entre 0, cuando no hay esterasas hasta 1, cuando la actividad medible sólo se debe a las mismas.

Nuestros preparados crudos de cabeza de *Triatoma infestans* mostraron un índice de esterasas de 0,54 (tabla 5) decreciendo ligeramente durante los sucesivos pasos de purificación, para caer abruptamente a cero en la fracción acetónica. Este paso de purificación (fraccionamiento acetónico) fue reportado por Casida ( 75 ) como útil en la separación de mezclas de esterasas con colinesterasas.

A los fines de tener una mayor certeza que en el preparado purificado no había aliesterasas (esterasas con mayor afinidad por sustratos alifáticos, así llamadas según antigua clasificación) se midió actividad usando como sustrato el TPE. La actividad medida con TPE en homogenatos crudos fue 2 nmoles de TPE/min mg de proteínas, mientras que en el preparado purificado fue cero.

Desde el punto de vista toxicológico, otro de los componentes indeseables en los homogenatos crudos son los lípidos.

Hellebrand (175) purificó 20 veces la ChE de cabeza de mosca y enfatizó la eliminación de una buena parte de los lípidos, cuyo efecto solvente sobre inhibidores podría falsear los resultados en experimentos cinéticos con ChE. En nuestro caso, si bien no observamos una eliminación total del material lipóideo, él mismo se vio reducido en un 70%.

En resumen el esquema de purificación descrito, si bien no resultó en una purificación exhaustiva, respondió en cuanto a simplicidad y pureza del producto final al fin toxicológico para el cual fue desarrollado, y al mismo tiempo permitió tener una mejor idea de los componentes (especialmente los enzimáticos) de nuestros preparados crudos.

#### IV) CARACTERIZACION DE LA ACETILCOLINESTERASA DE CABEZA DE TRIATOMA INFESTANS.

Las ChEs se pueden considerar como una familia de enzimas con diferentes propiedades. Dentro de esta familia, los distintos tipos de actividad enzimática pueden clasificarse en al menos dos grupos, I y II.

El grupo I está constituido por las llamadas acetilcolinesterasas (AChE) o ChE verdadera o específica y el grupo II está integrado por las llamadas pseudo-ChE, no específica o butiril-ChE (BuChE) (127).

La AChE, como ya se expuso, tiene la función fisiológica de hidrolizar la ACh y puede ser inhibida por altas concentraciones de ese mismo sustrato y en general no hidroliza BCh. La AChE está presente en el tejido nervioso y en los eritrocitos de la mayoría de los animales.

En cambio la BuChE no tiene un rol fisiológico conocido, hidroliza la BCh y a la PCh a mayor velocidad que a la ACh y no se inhibe por exceso de sustrato.

La BuChE está presente en el plasma sanguíneo de la mayor parte de los vertebrados, en el hígado, en el páncreas y en menor cantidad en los tejidos nerviosos junto a la AChE.

La presencia de las ChEs ha sido demostrada en un número de insectos suficientes como para que su distribución sea aceptada como universal.

Otros autores han demostrado actividad colinesterásica en los Ordenes; Ortópteros, Homópteros, Hemípteros, Coleópteros, Dípteros, Himenópteros, Escorpiónidos y Arácnidos ( 75 ).

Las ChEs están primariamente en el sistema nervioso de los insectos, pero también han sido detectadas en los músculos de las alas y patas de algunos insectos y en el intestino de un escarabajo ( 176 ).

A pesar de que el sistema colinesterásico ha sido estudiado como ningún otro sistema enzimático en insectos y en Invertebrados, nada se sabe aún de las características y propiedades de este sistema en Triatomíneos y en particular en la vinchuca, que es el conocido vector del Mal de Chagas-Mazza (Tripanosomiasis Americana).

Este tipo de estudio se vuelve más interesante si tenemos presente que como menciona Casida ( 75 ) el desarrollo de insecticidas OP con toxicidad selectiva puede ser ampliamente dependiente de las diferencias de especificidad de las AChEs entre los insectos y entre los insectos y los mamíferos.

Nosotros demostramos actividad esterásica en preparados crudos de cabeza de T. infestans y también en preparados de tórax y abdomen del mencionado Hemíptero. Particularmente nuestro interés se centró en la actividad medida en cabeza, por estar directamente vinculada al SNC, ya que en ella están presentes los dos ganglios nerviosos más importantes que dirigen la actividad nerviosa del insecto, el ganglio supraesofágico o cerebro y el ganglio subesofágico.

Nuestros preparados crudos de cabeza de T. infestans evidenciaron habilidad para hidrolizar ésteres de tiocolina (ATC y BTC) y tioésteres aromáticos (PTA). Como es sabido la hidrólisis catalizada por las ChEs es altamente sensible a la eserina, mientras que otras esterases son muy resistentes a este inhibidor. Por lo tanto una manera útil de distinguir ChEs de otras esterases fue la de utilizar el efecto selectivo de la

eserina. Las esterasas que no son inhibidas por eserina  $10^{-5}$  M no deben ser designadas como ChEs ( 127).

A los fines de un mejor entendimiento de las propiedades del sistema colinesterásico de cabeza del I.infestans, el mismo fue caracterizado frente a distintos agentes físicos y químicos.

#### IVa) VARIACION DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASICA CON LA CONCENTRACION DE SUSTRATO. DETERMINACION DE $K_m$ y $V_{max}$ .

Nosotros encontramos que nuestros preparados crudos de cabeza de I.infestans presentaban una actividad frente a ATC y a BTC inhibible por eserina lo que los constituía en un sistema colinesterásico. En la figura 5 se evidencia la respuesta de nuestros preparados crudos frente a concentraciones crecientes de los sustratos ATC y BTC, de donde se distinguen al menos dos tipos de actividades. Frente a la ATC nuestros preparados crudos mostraron la típica curva en forma de campana con una concentración óptima de ATC (0,545 mM) y pronunciada inhibición por exceso de sustrato. Este tipo de respuesta es característica de las AChEs y no de las BuChEs. La respuesta frente a BTC fue cuatro veces menor que la de ATC y no presentó inhibición por exceso de sustrato, respondiendo esta característica a la de una BuChE.

La misma caracterización frente a distintas concentraciones de sustratos fue realizada sobre el preparado purificado, lo cual se representa en la figura 6. En este caso se observa una típica respuesta de AChE, pues la curva de ATC tiene la conocida forma de campana y la de BTC también presenta inhibición por exceso de sustrato, lo que parece indicar que la AChE de cabeza de vichuca presenta especificidad cruzada hacia ATC y BTC, aunque con una mayor afinidad por la ATC que por la BTC.

Estos resultados de nuestra enzima purificada de cabeza de I.infestans recuerdan la AChE purificada de cabeza de moscas la que presenta una actividad no despreciable frente a BTC, lo que la diferencia de las AChEs de mamíferos y en especial de la de eritrocitos de bovino ( 73 ).

Nosotros calculamos los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  para el homogenato crudo (figura 7) y para el preparado purificado (figura 8) gráficamente por el método de Lineweaver y Burk .

FIGURA 5

CURVAS DE ACTIVIDAD ESPECIFICA DE HOMOGENATOS CRUDOS DE

CABEZA DE TRIATOMA INFESTANS VERSUS LA CONCENTRACION DE ATC -O-

Y DE BTC --●-- .

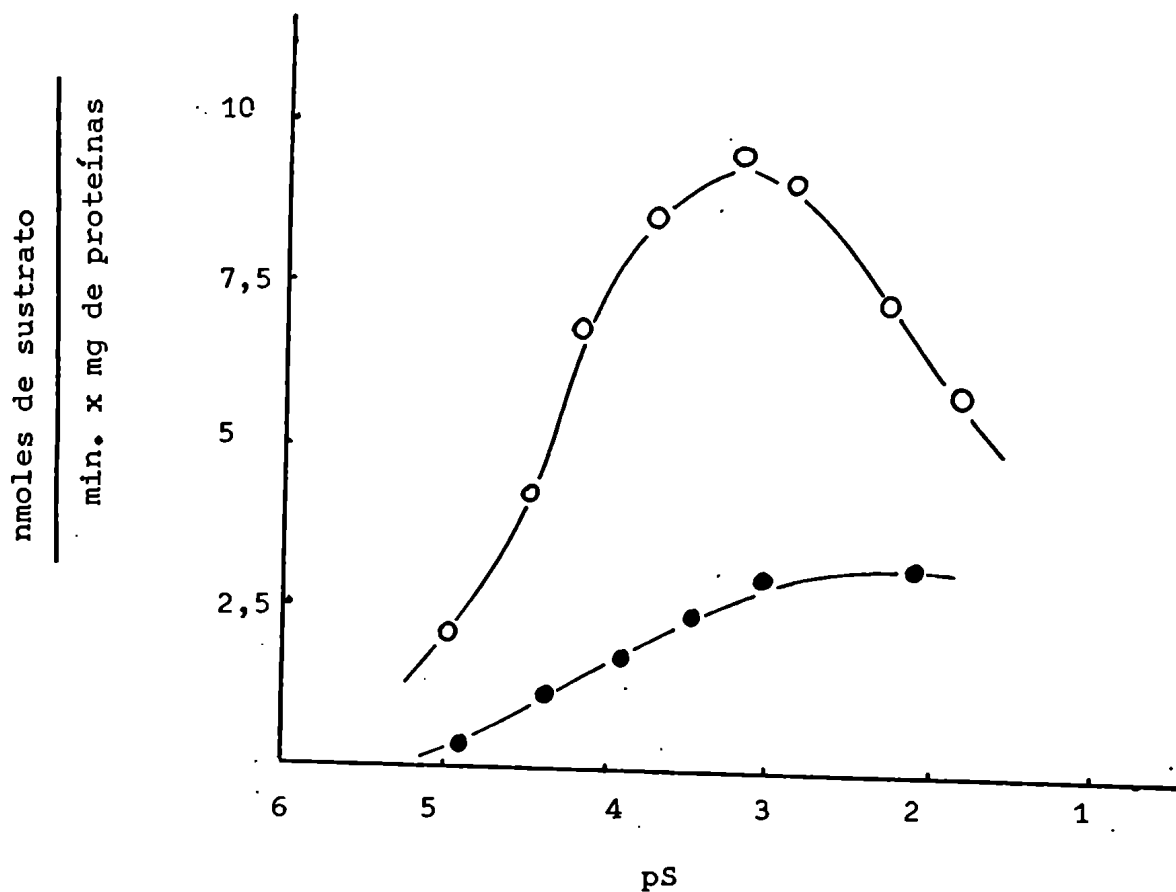


FIGURA 6

CURVAS DE ACTIVIDAD ESPECIFICA DE PREPARADOS PURIFICADOS DE AChE DE CABEZA DE TRIATOMA INFESTANS VERSUS LA CONCENTRACION DE ATC -○- Y DE BTC -●- .

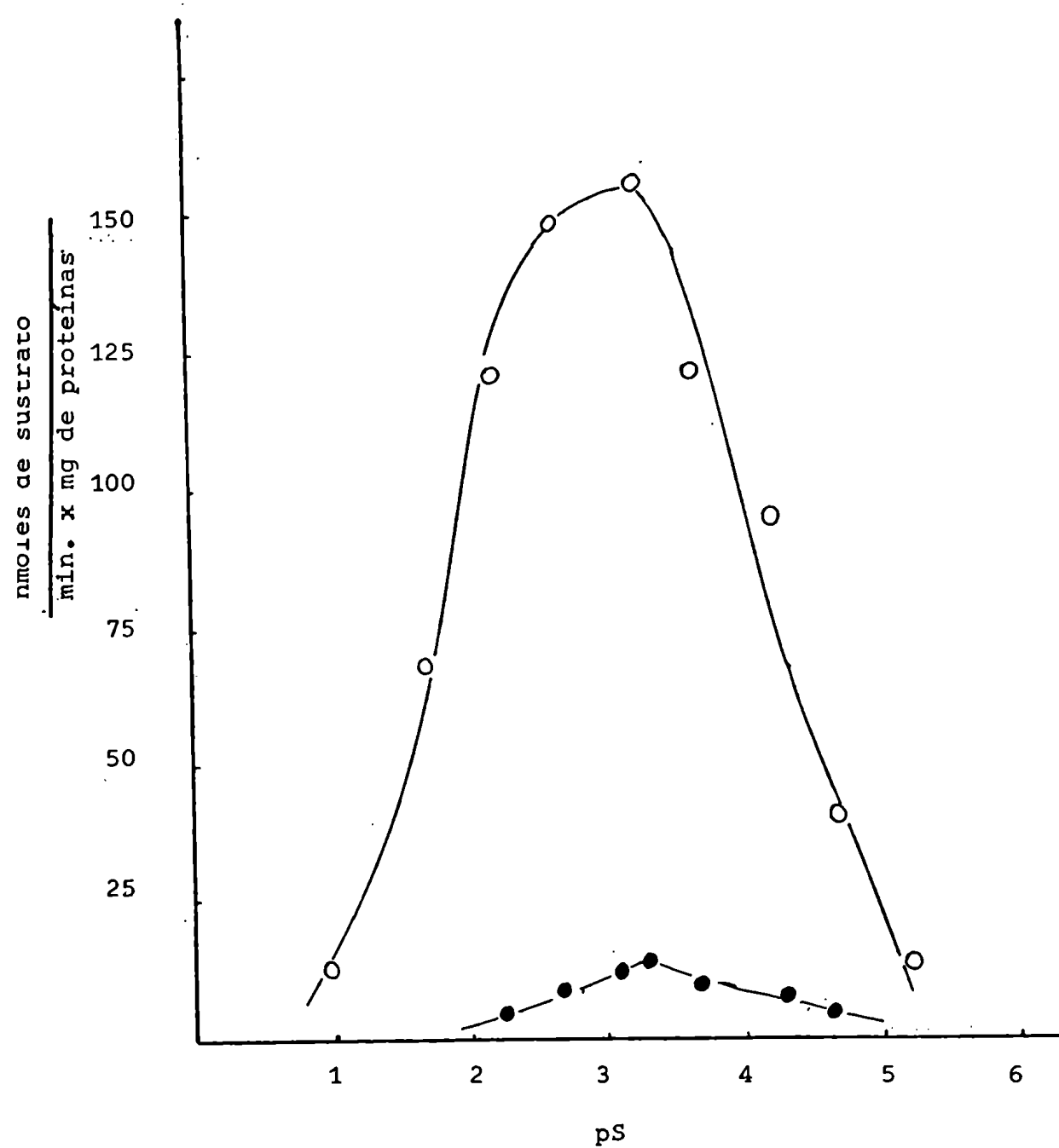


FIGURA 7

CURVAS QUE REPRESENTAN POR EL METODO DE LINEWEAVER Y BURK LA RELACION ENTRE ACTIVIDAD ESPECIFICA DE HOMOGENATOS CRUDOS DE CABEZA DE TRIATOMA INFESTANS Y LAS CONCENTRACIONES DE ATC - O - Y DE BTC - ● - .

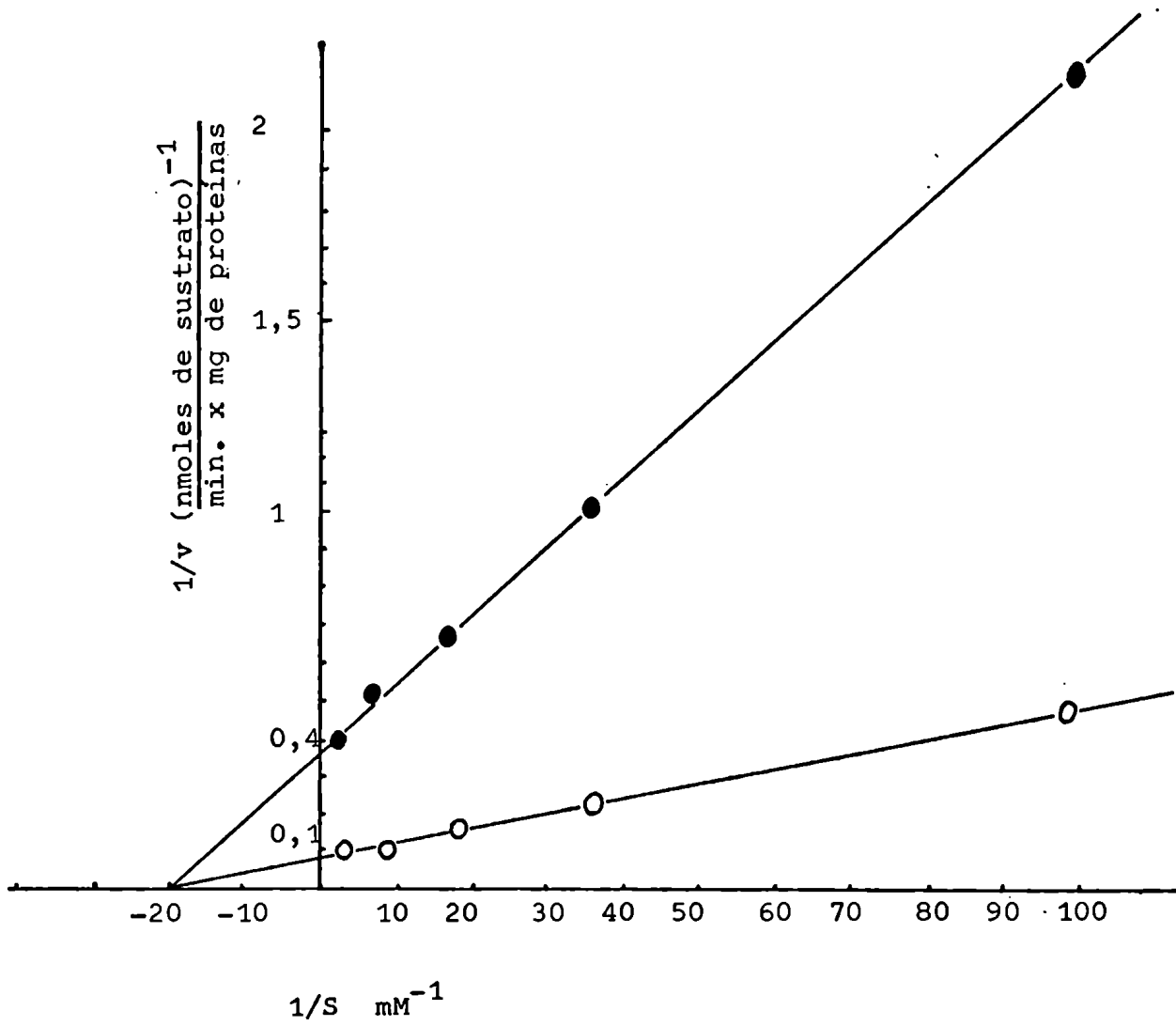




FIGURA 8

CURVAS QUE REPRESENTAN POR EL METODO DE LINEWEAVER Y BURK

LA RELACION ENTRE ACTIVIDAD ESPECIFICA DE PREPARADOS PURIFICADOS

DE AChE DE CABEZA DE TRIATOMA INFESTANS Y LAS CONCENTRACIONES

DE ATC -○- Y DE BTC -●- .

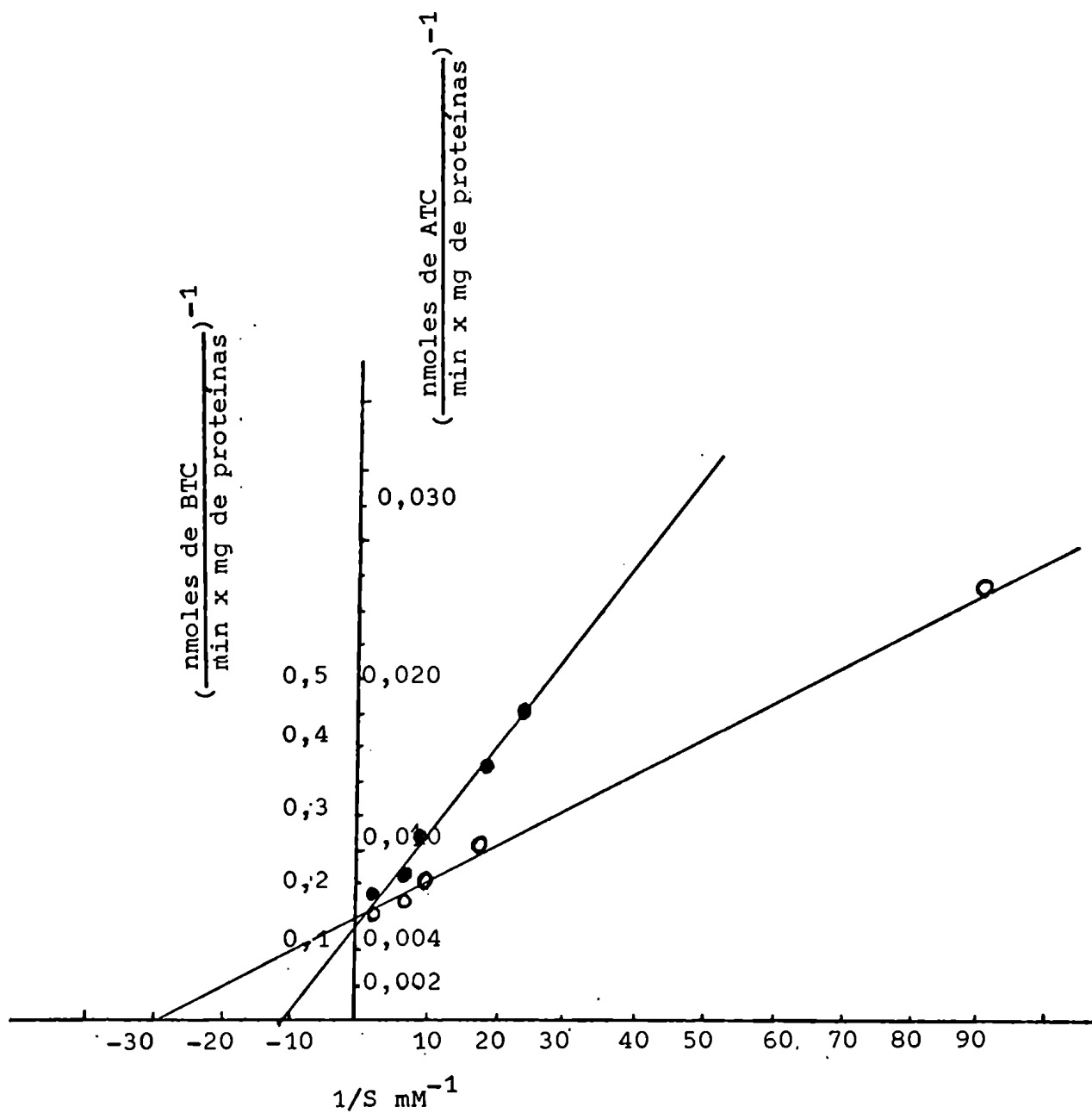


TABLA 6

DATOS DE  $K_m$  Y  $V_{max}$  DE LA COLINESTERASA DE CABEZA DE TRIATOMA INFESTANS EN PREPARADOS CRUDOS Y PURIFICADOS .

	CRUDO		PURIFICADO	
	ATC	BTC	ATC	BTC
$K_m$ (M)	$5 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$3,3 \cdot 10^{-5}$	$9,1 \cdot 10^{-5}$
$V_{max}$ <u>nmoles</u> min x mg proteínas	10,4	2,63	150	9,5

En la tabla 6 vemos que la afinidad por los sustratos ATC y BTC del sistema enzimático crudo es el mismo, si bien es cierto que presentan una diferencia de 4 veces respecto a las  $V_{max}$  para cada sustrato ( es mayor frente a ATC que a BTC). En cambio en los preparados purificados se puede apreciar una afinidad 3 veces mayor para ATC que para BTC y una diferencia en  $V_{max}$  de 15 veces más para ATC que para BTC .

Si comparamos los valores de  $K_m$  para los preparados crudos y purificados frente a ATC vemos que si bien son del mismo orden, el  $K_m$  (ATC) del purificado es menor que el correspondiente valor del preparado crudo, lo cual estaría indicando una mayor afinidad de la enzima pura por el ATC que la del extracto crudo.

Las ChEs dentro de un mismo grupo de enzimas sean AChEs o sean BuChEs presenten diferencias en ciertas propiedades cuando comparamos varias especies de animales, y dentro de una misma especie cuando comparamos distintos órganos o diferentes preparados enzimáticos ( 75 ).

Las diferencias entre especies son muy marcadas sobre todo entre los insectos. En la tabla 7 se presentan valores de  $K_m$  obtenidos con ATC en distintas especies de vertebrados e insectos.

TABLA 7

DATOS QUE REPRESENTAN LAS CONSTANTES DE MICHAELIS-MENTEN DE LAS COLINESTERASAS DE MAMIFEROS E INSECTOS EN COMPARACION CON LAS DE TRIATOMA INFESTANS.

FUENTE DE ENZIMA	$K_m$ (M) (ATC)	REFERENCIAS
SUERO DE CABALLO	60 $10^{-5}$	Simeon Vera, Croatica Chemica Acta, 46, 137, 1974
SUERO HUMANO	70 $10^{-5}$	idem
NUCLEO CAUDADO DE BOVINO	23 $10^{-5}$	Chan S.L. et al. J. Neurochem., 19, 2747, 1972b.
ERITROCITOS HUMANOS	12,5 $10^{-5}$	Shafai T. y Cortner J.A., Biochem. Biophys. Acta, 236, 612, 1971a.
AChE de CABEZA DE GRILLO	8,7 $10^{-5}$	Yu Ching-Chieh, Ph.D. Thesis, University of Illinois at Urbana-Champaign, 1970.
AChE de CABEZA DE MOSCA	2,88 $10^{-5}$	An-Horng Lee, Metcalf R.L., Kearns C.W., Insect Biochem, 4, 267, 1974.
AChE de CABEZA DE T. infestans (vinchuca)	3,3 $10^{-5}$ 4,35 $10^{-5}$	PURIFICADO CRUDO

En general vemos que la afinidad por la ATC es mayor en el preparado de AChE de cabeza de T. infestans purificado que en el resto de los casos presentados, salvo en el homogenato de cabeza de moscas, el cual posee un  $K_m$  muy próximo al de nuestros preparados purificados.

IVb) RESPUESTA DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASICA CON DISTINTOS SUSTRATOS FRENTE A DIFERENTES INHIBIDORES.

Además de las respuestas a diferentes concentraciones de sustratos, la caracterización de las ChEs puede ser llevada a cabo en parte por la distinta acción inhibitoria de compuestos más o menos específicos y por la respuesta de la actividad enzimática a diferentes concentraciones de un mismo inhibidor.

Los compuestos inhibidores de las ChEs utilizados en este trabajo resultaron buenas herramientas bioquímicas y toxicológicas.

La reacción normal entre la ChE y su sustrato involucra el ataque del sustrato a la enzima con producción de una forma de enzima acilada, la que rápidamente se hidroliza y produce enzima libre nuevamente.

Los anticolinesterásicos interfieren en general con esta secuencia, y el punto de ataque dependerá de la naturaleza del inhibidor.

Estos pueden bloquear; 1) el sitio aniónico, 2) los sitios aniónico y esterático, o 3) el sitio esterático, pero en casi todos los casos la reacción es similar en alguna medida a la que ocurre entre la enzima y el sustrato. Algunos inhibidores son casi tan activos contra la AChE como con la BuChE, pero otros tienen una acción preferencial sobre una de las dos enzimas. Tal vez convenga recalcar que ningún inhibidor es absolutamente específico a un tipo de ChE. La acción diferencial es solamente de grado de magnitud y se refleja en las distintas concentraciones a las cuales el inhibidor afecta los dos tipos de enzimas.

Con algunos compuestos inhibidores, en determinadas especies, se logra completa inhibición de una enzima con concentraciones que causan también inhibición significativa en la otra enzima.

Con otros inhibidores hay muy poca o ninguna superposición en las concentraciones efectivas y éstos son los llamados inhibidores selectivos.

En nuestro caso el problema que se nos presentó fue establecer la especificidad de la enzima o de las enzimas presentes en nuestros homogenatos crudos de cabeza de vinchucas, distinguir entre ChEs y estererasas no específicas, entre AChE y BuChE u otras pseudo-ChEs. Estas diferenciaciones las llevamos a cabo con apropiadas combinaciones de los llamados sustratos específicos y de los llamados inhibidores específicos.

Lo importante que hubo que tener en cuenta fue que la especificidad de estos compuestos es mucho más relativa que absoluta y particularmente en algunas especies. Además hubo que tener en cuenta que la clasificación de ChE verdadera y pseudo-ChE responde a patrones elaborados con enzimas de mamíferos que no siempre son reproducibles en invertebrados y más específicamente en los insectos.

En nuestro caso ensayamos como inhibidores selectivos de AChE; el TEA (164), el Nu-125U (165) y como inhibidores selectivos de BuChE; el ISO-OMPA (121), el SKF-525A (112), el Nu-683 (165) y la eserina como inhibidor específico de las colinesterasas en general.

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 8, y el análisis de los mismos nos indica que toda la actividad enzimática observada, tanto frente a ATC como a BTC fue debida a ChEs como lo demuestra la total inhibición por eserina  $10^{-5}$  M. El ISO-OMPA y el SKF-525A por su parte produjeron una mayor inhibición sobre la actividad BuChE que sobre la actividad AChE.

Si bien no mostraron una selectividad total, este resultado puede considerarse como una respuesta diferencial en concordancia con lo reportado para ChEs de otras especies (165). Un análisis análogo se puede hacer respecto al TEA como inhibidor de la AChE, ya que el TEA 0,1M inhibió el 97% de la actividad en cabeza de moscas y un 36% en cabeza de abejas usando en ambos casos como sustrato la ACh (164) y en cabeza de vinchucas muestra una clara inhibición diferencial frente a ATC y a BTC (tabla 8). En cambio el Nu-683 y el Nu-1250 si bien mostraron una respuesta diferencial respecto a ATC y BTC, su selectividad fue inversa a lo esperado de acuerdo a lo reportado para AChE de eritrocitos humanos (114) y pseudo-ChE de plasma humano (113).

TABLA 8

DATOS QUE REPRESENTAN LA ACCION DE INHIBIDORES SELECTIVOS SOBRE LA ACTIVIDAD COLINESTERASICA DE CABEZA DE TRIATOMA INFESTANS EN HOMOGENATOS CRUDOS Y PURIFICADOS FRENTE A LOS SUSTRATOS ATC Y .BTC.

COMPUESTOS INHIBIDORES	TIEMPO DE PRE- INCUBACION (min.)	INHIBICION				
		CRUDO			PURIFICADO	
		Conc. (M)	ATC	BTC	Conc. (M)	ATC
Nu-1250	5	$5 \cdot 10^{-5}$	34%	100%	$10^{-5}$	22%
Nu-683	5	$5 \cdot 10^{-5}$	80%	15%	$10^{-5}$	72%
		$5 \cdot 10^{-6}$	64%	---		
SKF-525A	5	$5 \cdot 10^{-5}$	0%	50%	$5 \cdot 10^{-5}$	0%
TEA	7	$10^{-2}$	72%	22%	$10^{-2}$	75%
ISO-OMPA	5	$5 \cdot 10^{-5}$	0%	24%	$5 \cdot 10^{-5}$	0%
ESERINA	15	$10^{-5}$	100%	100%	$10^{-5}$	100%

Si bien este resultado es inesperado cabe destacar que Koelle ( 115 ) trabajando con ChE de diferentes tejidos del gato, tambien tuvo resultados anómalos usando estos mismos inhibidores.

A los fines de comparar nuestros resultados con estos inhibidores con los reportados en bibliografía ( 165 ) para otras especies, se presenta la siguiente tabla:

	Cerebros de moscas (ACh)	Cerebros de abejas (ACh)	Cerebros de ratón (ACh)	Cabezas de vinchucas (crudo)		Cabezas de vinchucas (purificado)
				(ATC)	(BTC)	(ATC)
(Conc. Inh.)	$3 \cdot 10^{-8} \text{ M}$	$3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$1,5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$	$5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$		$10^{-5} \text{ M}$
<u>Nu-683</u> (% de Inh.)	50%	50%	50%	64%	0%	72%
(Conc. Inh.)	$2,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	$4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$4 \cdot 10^{-9} \text{ M}$	$5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$		$10^{-5} \text{ M}$
<u>Nu-1250</u> (% de Inh.)	50%	50%	50%	34%	100%	22%

De la respuesta de nuestros homogenatos crudos de cabeza de Triatoma infestans frente a distintos sustratos e inhibidores más o menos selectivos ( tabla 8 ) es posible sacar algunas pautas respecto a la composición del sistema colinesterásico presente en ellos.

Estas conclusiones se presentan en forma esquemática en la tabla 9, en la que se advierte el camino analítico seguido para dilucidar la presencia de al menos dos actividades colinesterásicas, una AChE y otra BuChE, en los homogenatos crudos de cabeza de vinchucas.

TABLA 9 ESQUEMA QUE RESUME LAS CONCLUSIONES OBTENIDAS DE LOS RESULTADOS DE TABLA 8 .

SUBSTRATOS	INHIBIDORES	RESPUESTAS: % de INHIBICION	CONCLUSIONES
1) ATC	-----	-----	Probable presencia de uno o ambos tipos de colinesterasas.
2) ATC	Eserina $10^{-5}$ M	100%	Confirmación de (1)
3)a) ATC	SKF 525A $5 \cdot 10^{-5}$ M	0%	Muy probablemente presencia de AChE.
3)b) ATC	iso-OMPA $5 \cdot 10^{-5}$ M	0%	idem 3)a).
4) ATC	TEA $10^{-2}$ M	72%	Confirmación de presencia de AChE.
5) BTC	-----	-----	Probable presencia de BuChE.
6) BTC	TEA $10^{-2}$ M	22%	Muy probable presencia de BuChE.
7) BTC	SKF 525A $5 \cdot 10^{-5}$ M	50%	Confirmación de presencia de BuChE.
8) BTC	iso-OMPA $5 \cdot 10^{-5}$ M	24%	



IVc) VARIACION DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASICA CON EL pH .

Cuando se ensayó la actividad enzimática de nuestros preparados crudos de ChE de cabeza de T.infestans frente a ATC a distintos pH por el método espectrofotométrico de Ellman (figura 9) encontramos que la actividad creció claramente desde valores de pH 6 hasta pH 7,2-7,4 donde alcanzó un valor máximo que fue considerado como 100% de actividad, y a pH mayores de 7,2 se obtuvieron valores constantes no notándose un descenso significativo de la actividad hasta pH 9 .

Un cuadro semejante se encontró al ensayar el preparado purificado frente a ATC a distintos pH. Este tipo de resultados podría hacer pensar en la presencia de una ChE de tipo II en el homogenato crudo y en el purificado, ya que como es sabido la actividad de las pseudo-ChEs varían con el pH en forma diferente a las AChEs. La AChE en general aumenta su actividad con el pH hasta un máximo entre pH 7-8 dependiendo de la especie y luego cae abruptamente a pH mayores, en cambio las pseudo-ChEs aumentan rápidamente su actividad desde pH ácidos hasta pH alrededor de 7 y luego decae muy lentamente o se mantiene constante a medida que el pH es aumentado.

Pero cuando ensayamos nuestros preparados crudos frente a ACh a distintos pH se observó que la actividad crecía rápidamente desde pH 6 hasta pH 7,2 y luego disminuía a pH mayores. Si sumamos a esta observación el resultado obtenido con nuestro preparado purificado frente a ACh a distintos pH vemos que estamos en presencia de una AChE . En efecto el pH óptimo variará según la fuente de enzima y del tipo de preparado, pero la curva de actividad enzimática vs pH para AChE tiene la forma de campana cuando se usa ACh como sustrato. Este tipo de curva en forma de campana ha sido tomada como criterio de que en el sitio activo de la AChE existen un grupo básico y otro ácido tal que una variación de pH para ambos lados del pH óptimo alteraría el grado de ionización de un grupo o del otro.

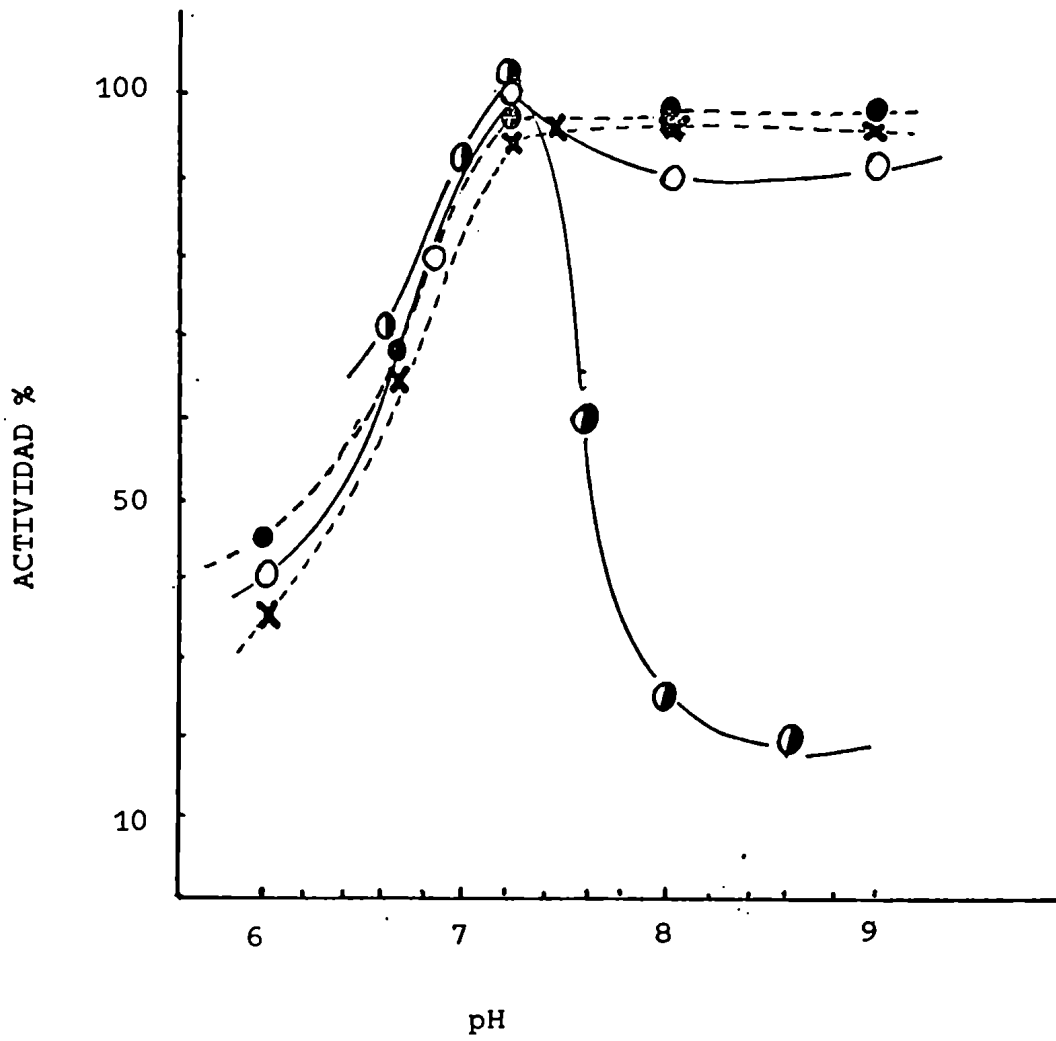
Bergmann et al. ( 177) trabajando con AChE de anguila eléctrica encontraron que con ciertos sustratos incluyendo la ATC, la actividad enzimática dependía del pH sólo en la zona ácida aumentando hasta pH 7 y manteniéndose constante a pH mayores. Nuestros resultados con homogenatos crudos y purificados frente a ATC a distintos pH son consistentes con estos hallazgos y con lo demostrado para AChE de grillo ( 168) frente a ATC y PTA.

FIGURA 9

CURVAS DE VARIACION DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASICA DE CABEZA

DE TRIATOMA INFESTANS CON EL pH. HOMOGENATOS CRUDOS FRENTE A ATC -- X--

Y ACh -○- , Y DE PREPARADOS PURIFICADOS FRENTE A ATC -●- Y ACh -◐-



La explicación estaría dada porque el sitio activo (esterático) de la AChE tiene un grupo nucleofílico ( $G_1$ ) que es el OH de la serina y un grupo electrofílico ( $G_2$ ) que es el OH fenólico de una tirosina, variaciones del pH del medio afectarían el grado de ionización de estos grupos influyendo directamente sobre la unión del sustrato al sitio esterático.

En efecto, la enzima cataliza la hidrólisis de la ACh cuando se une por puente hidrógeno el oxígeno etéreo de la ACh y de otros O-alquil ésteres con el  $G_2$ , es decir el OH fenólico de la tirosina, y por otro lado en el  $G_1$  el OH de la serina activado por un imidazol de la histidina (próximo a éste en el sitio activo) ataca nucleofílicamente el carbonilo de la ACh. Los iones hidrógeno inactivan competitivamente el OH de la serina a pH bajos, y por otro lado los OH inactivan competitivamente el grupo electrofílico ( $G_2$ ) impidiendo la unión por puente hidrógeno al oxígeno etéreo que es lo que facilita el desprendimiento de la colina por un lado y del acético por el otro (después del ataque nucleofílico sobre el carbonilo). Cuando se utiliza ATC que tiene un azufre en lugar del oxígeno etéreo, es decir que deriva de la tiocolina, la unión puente hidrógeno entre el OH fenólico y el azufre no tiene lugar, debido a que el azufre es mucho menos electronegativo que el oxígeno.

Pero la polarizabilidad del azufre es suficiente para romper la unión C-S-alquilo (el azufre tiene semejante electronegatividad al carbono) después del ataque nucleofílico al carbonilo del acetilo, lo que no es posible que ocurra con un O-alquil éster por tener una estructura muy estable, y requerir necesariamente de activación para romper esa unión (por ejemplo por puente hidrógeno).

El pH óptimo de la AChE de cabeza de vinchuca resultó semejante al de la AChE purificada de cucarachas y menor que el de preparados de cabeza de moscas y de grillos (tabla 10).

---

TABLA 10

DATOS QUE REPRESENTAN EL pH OPTIMO DE ACTIVIDAD COLINESTERASICA DE  
DISTINTAS ESPECIES DE INSECTOS.

FUENTE DE ENZIMA	SUSTRATO	pH OPTIMO	REFERENCIAS
CABEZA DE MOSCA	ACh	8-9	Chadwick et al., Biol. Bull., 106, 139, 1954
CUCARACHA (SNC)	ACh	7,4	Stegwee D., Physiol. Comparata et Oecol., 2, 241, 1951.
CUCARACHA (intestino)	ACh	6,5-7,0	Kooistra G., Physiol. Comparata et Oecol., 2, 75, 1950.
CUCARACHA (enteras purificadas)	ACh	7,2-7,4	Lord K.A., Biochem. J., 78, 483, 1961.
CABEZA DE GRILLO (purificada)	ACh ATC PTA	8 8 8	Lee An-Horng, Metcalf R.L., Kearns C.W., 1974, Insect Biochem., 4, 267,
CABEZA DE VINCHUCA (purificada)	ACh ATC	7,2 7,2	

IVd) VARIACION DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASICA CON LA TEMPERATURA.

Como es de esperar para una enzima la actividad colinesterásica de nuestros preparados se vió afectada por la temperatura. En general la temperatura óptima para la AChE de tejidos de mamíferos está entre 37° y 40° ( 20 ), y de acuerdo a Shukuya ( 29 ) y a Wilson y Cabib ( 30 ) el  $K_m$  sería independiente de la temperatura para ésta enzima entre 15° y 30°. La AChE de mamíferos comienza su inactivación a 56° ( 31 ) y se pierde totalmente a 70°. Las ChEs de insectos son rápidamente inactivadas por sobre los 55° ( 72 ). En nuestro caso obtuvimos valores similares con los preparados crudos de ChE de cabeza de T.infestans y con los preparados purificados ( figura 10 ).

En la figura 10 se observa que tanto con el crudo como con el purificado la actividad aumenta sostenidamente por encima de los 20° hasta llegar a un máximo a 45° para la AChE purificada y un máximo a 50° para la ChE de homogenatos crudos de cabeza de vinchucas. Esto estaría indicando una mayor termolabilidad de la AChE en el preparado purificado que en el crudo. Después de los respectivos máximos la caída de actividad en ambos casos con el aumento de la temperatura se hace bastante paralela. Algo similar ocurre cuando se ensaya la variación de la actividad ChE de cerebro de abeja y de eritrocitos de bovino con la temperatura ( 178 ).

En la figura 11 se representa la curva de inactivación por calor de homogenatos crudos de cabeza de T.infestans sometidos a 50° durante distintos tiempos. Del análisis del gráfico vemos que a los 25 minutos se pierde un 25% de la actividad frente a ATC y BTC y este porcentaje de inactivación se mantiene paralelo para ATC y BTC hasta los 90 minutos, a partir de donde las curvas se separan hasta llegar a los 150 minutos donde vemos un 60% de inactivación frente a ATC y un 30% frente a BTC. En principio la actividad colinesterásica del crudo se muestra muy termoestable, ya que recién a los 240 minutos de incubación a 50° se observa un 50% de inactivación frente a BTC y un 73% frente a ATC. La variación diferente de las curvas de ATC y BTC sugieren la presencia de al menos dos enzimas con termoestabilidad distinta. En efecto a los 150 minutos aparece una disminución de la actividad que es mayor frente a ATC que a BTC, probablemente debide a una AChE menos termoestable que

FIGURA 10

CURVAS DE VARIACION DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASICA DE CABEZA DE TRIATOMA INFESTANS EN HOMOGENATOS CRUDOS --●-- Y PREPARADOS PURIFICADOS -O- FRENTE A ATC CON LA TEMPERATURA.

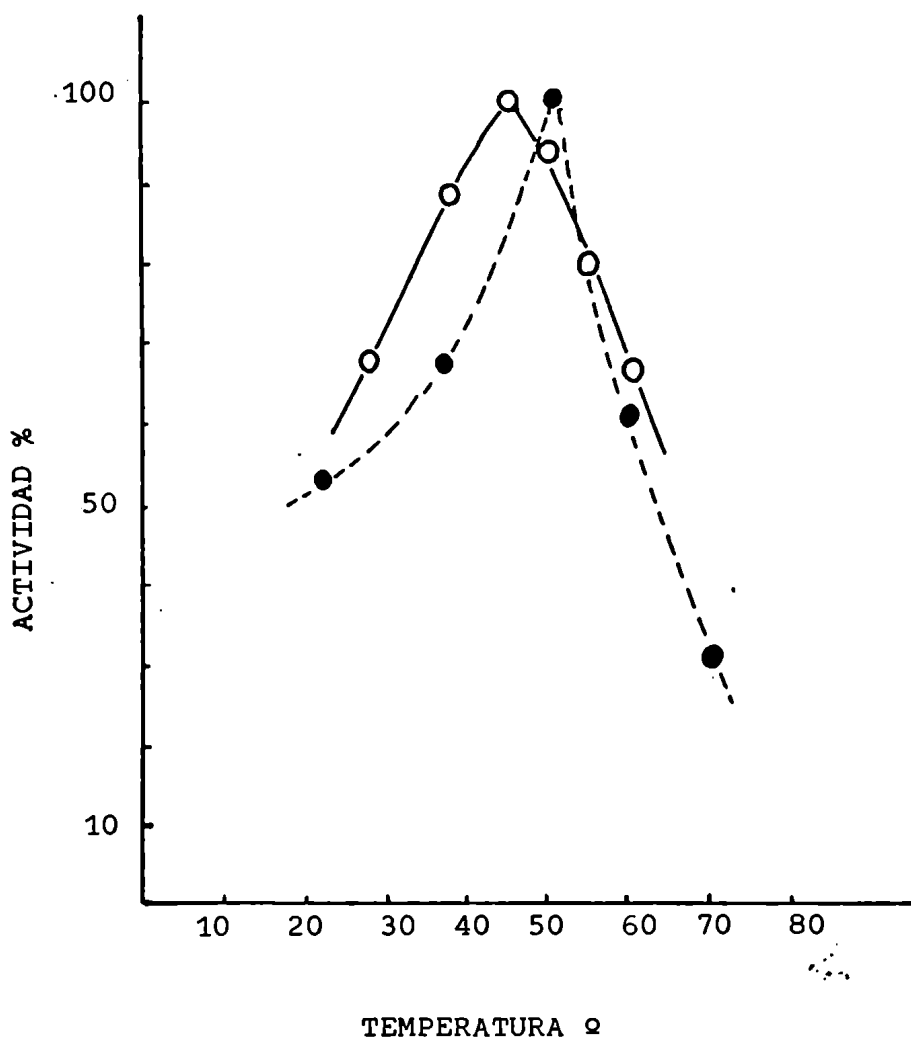


FIGURA 11

CURVAS DE INACTIVACION POR CALOR A 50º EN FUNCION DEL TIEMPO DE HOMOGENATOS CRUDOS DE CABEZA DE TRIATOMA INFESTANS FRENTE A ATC -○- Y A BTC -●-●- .

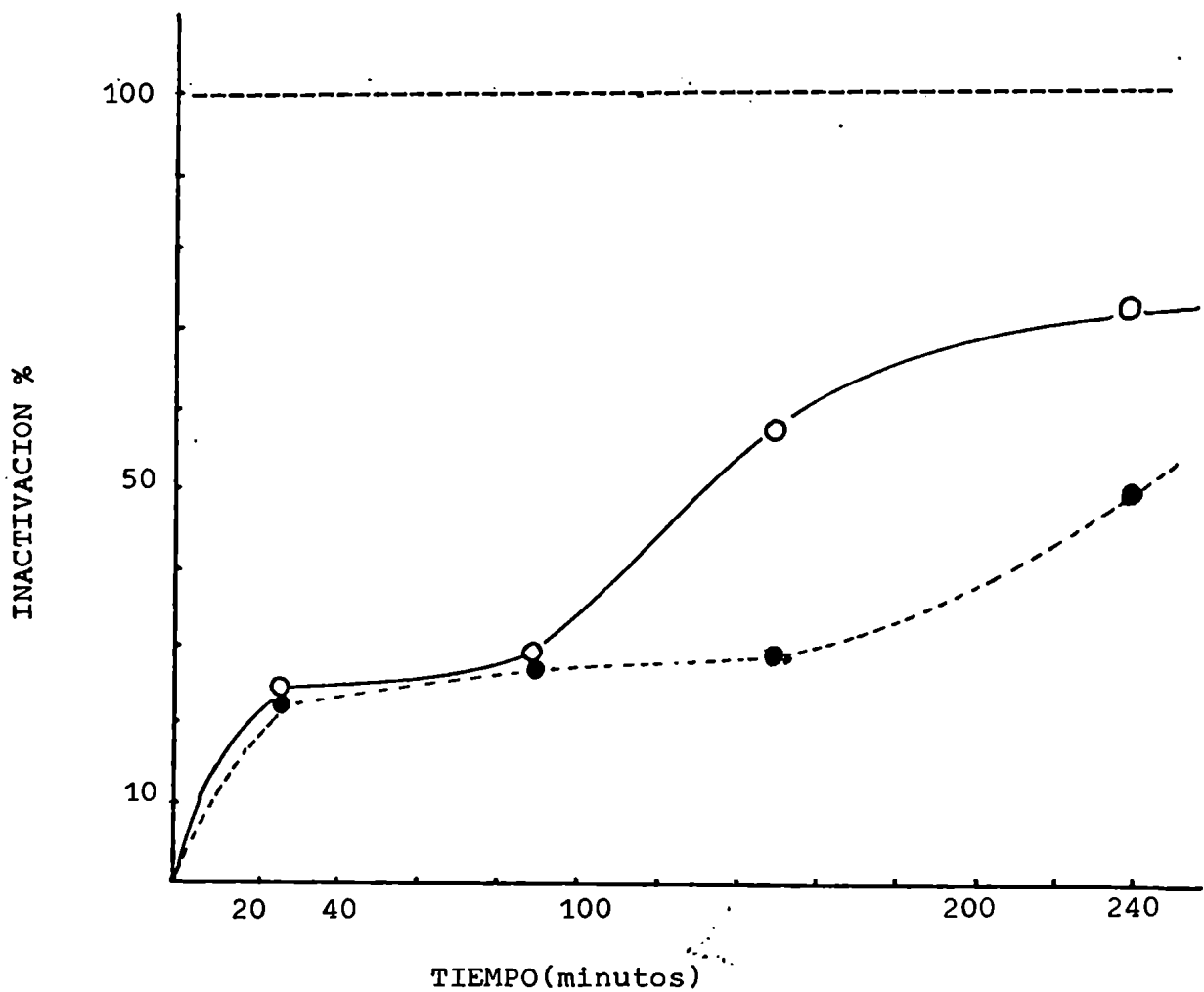
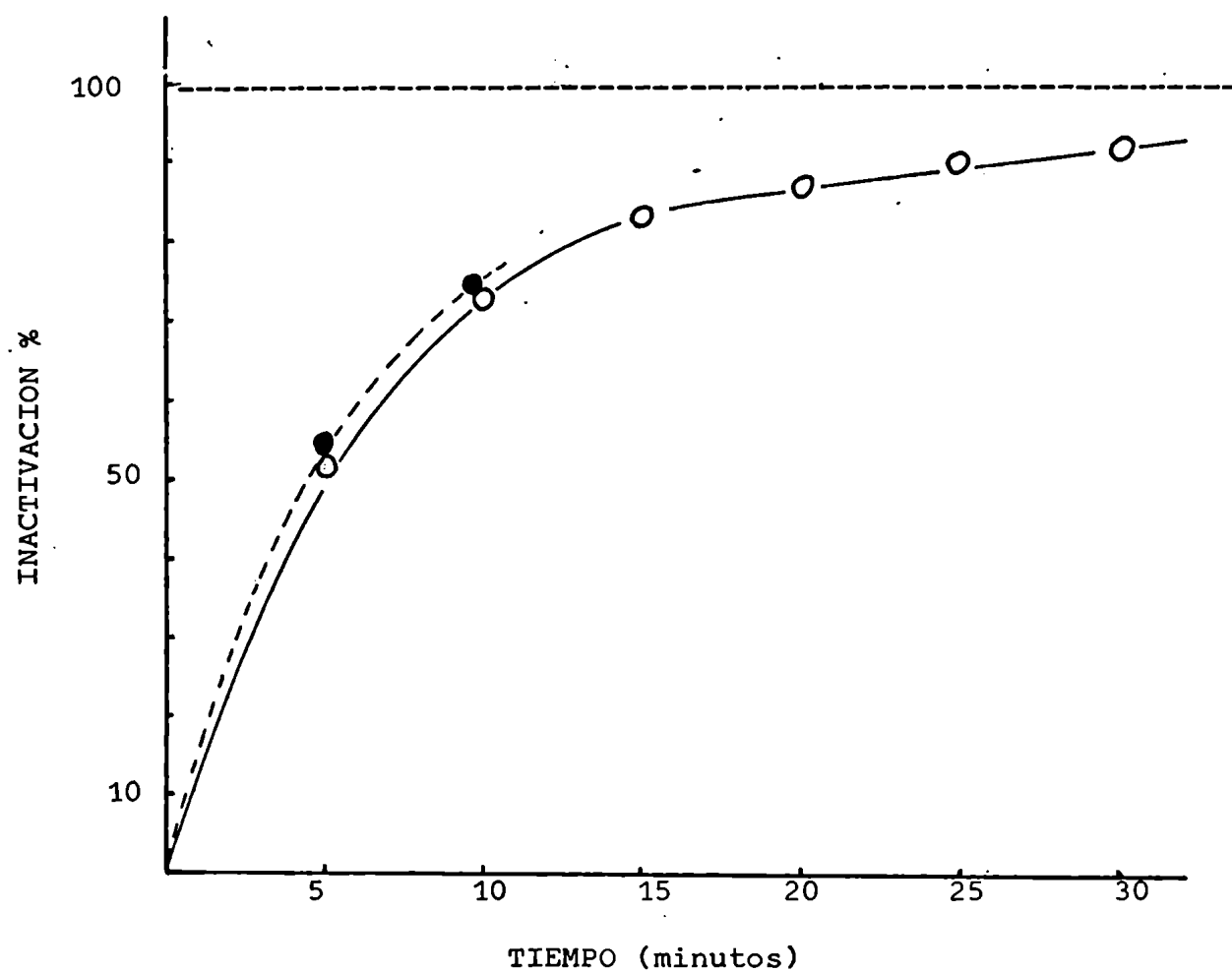


FIGURA 12

CURVAS DE INACTIVACION POR CALOR A 45° EN FUNCION DEL TIEMPO  
DE PREPARADOS PURIFICADOS DE AChE DE CABEZA DE TRIATOMA INFESTANS  
FRENTE A ATC -○- Y A BTC -●-●- .





la enzima responsable de hidrolizar BTC (BuChE).

En la figura 12 se representa la curva de inactivación por calor a 45° del preparado purificado de AChE de cabeza de vinchucas. Del análisis de la misma se advierte la menor termoestabilidad del preparado purificado respecto del crudo ya que a los 5 minutos de calentamiento a 45° se alcanzó un 52% de inactivación, efecto que en el crudo se logró a 50° después de 2 horas y media.

En la figura 12 vemos un paralelismo en las curvas de inactivación para ATC y BTC, lo que sugiere la existencia de una sola enzima que hidroliza a ambos sustratos.

#### IVe) ACTIVIDAD COLINESTERÁSICA FRENTE A DISTINTOS SUSTRATOS

La actividad colinesterásica específica fue determinada en homogenatos crudos y purificados frente a distintos sustratos, los resultados obtenidos se resumen en la tabla 11. El análisis de la misma nos indica que tanto el homogenato crudo como el purificado fueron activos frente a todos los sustratos usados. Ambos preparados mostraron su mayor actividad frente a ACh y a ATC lo que se explica por la presencia de una AChE. Si se tiene en cuenta la cadena alifática del éster de colina vemos que en el preparado purificado se observa un orden de actividad : acetil > propionil > butiril, análogo al reportado para AChE purificada de Blattella germanica (cucaracha) (169).

En cambio en el preparado crudo se observa una mayor actividad frente a BCh que a PCh, justificable por la presencia de una BuChE.

La ApMeCh es un sustrato reportado por su especificidad para la AChE (127) y en nuestro caso resultó ser un buen sustrato de homogenatos crudos y purificados. En cambio la BzCh, conocida por su especificidad para la BuChE y por no ser hidrolizada por la AChE de mamíferos (127), fue sorprendentemente hidrolizada por nuestro preparado purificado.

Los tiosustratos ensayados fueron hidrolizados por ambos preparados aún el éster neutro PTA.

TABLA 11

DATOS QUE REPRESENTAN LA ACTIVIDAD ESPECIFICA COLINESTERASICA DE PREPARADOS CRUDOS Y PURIFICADOS DE CABEZA DE TRIATOMA INFESTANS FRENTE A DISTINTOS SUSTRATOS.

TIPO DE SUSTRATO	CONCENTRACION (M)	$\frac{\text{nmoles de sustrato}}{\text{min x mg de proteina}}$ (CRUDO)	$\frac{\text{nmoles de sustrato}}{\text{minxmg de proteina}}$ (PURIFICADO)
ACETILCOLINA	$2 \cdot 10^{-4}$	10,9	523,8
PROPIONIL-COLINA	$2 \cdot 10^{-4}$	5,8	301,6
BUTIRIL-COLINA	$2 \cdot 10^{-4}$	7,05	198,4
ACETIL METIL-COLINA	$2 \cdot 10^{-4}$	6,5	238,0
BENZOIL-COLINA	$2 \cdot 10^{-4}$	5,8	142,8
ACETILTIO-COLINA	$5,45 \cdot 10^{-4}$	10,4	150,0
BUTIRILTIO-COLINA	$5,45 \cdot 10^{-4}$	2,6	9,5
FENILTIO-ACETATO	$1 \cdot 10^{-3}$	8,6	5,35

#### IVF) COMPOSICION ENZIMATICA DE LOS PREPARADOS CRUDO Y PURIFICADO

Los resultados obtenidos principalmente con diferentes sustratos e inhibidores indican que nuestros preparados crudos de cabeza de T.infestans contienen una mezcla compleja de esterases. La actividad enzimática frente a PTA previa inhibición con eserina  $10^{-5}$  M señala la presencia de esterases (no colinesterasas). La inhibición con paraoxon previa inhibición con eserina permitió detectar la presencia de carboxiesterasas además de las aril + acetilesterasas (172 ).

Respecto al sistema colinesterásico (eserina sensible) el análisis de :

- 1) La actividad significativa frente a ATC y BTC (tabla 11).
- 2) Las curvas de actividad específica vs concentración de ATC y BTC (figura 5).
- 3) La acción de inhibidores más o menos selectivos como el SKF-525A, ISO-OMPA, TEA, Nu-683, y el Nu-125U usando ATC y BTC como sustratos (tabla 8).
- 4) Las curvas de inactivación por calor a 50° frente a ATC y BTC (figura 11). representa una buena evidencia de la presencia de al menos dos ChEs, una verdadera (tipo I) y otra pseudo-ChE (tipo II).

El esquema de purificación aplicado sobre este complejo homogenato crudo simplificó considerablemente el contenido esterásico. En efecto, el contenido en esterases (eserina resistentes) se redujo a cero (tabla 5).

El sistema colinesterásico purificado se comporta como constituido por una única enzima de acuerdo a las siguientes evidencias experimentales:

- 1) Una actividad significativa frente a ATC y muy pobre frente a BTC (tabla 11).
- 2) Curvas de actividad específica vs concentración de ATC y BTC (ocurriendo inhibición por exceso de sustrato en ambos casos) (figura 6).
- 3) Acción de inhibidores selectivos como el SKF-525A, TEA, ISO-OMPA, Nu-683, y Nu-125U, usando ATC como sustrato (tabla 8).
- 4) Inactivación por calor a 45° usando ATC y BTC como sustratos, siguen una respuesta paralela (figura 12).

De estas evidencias y del resto de la caracterización que se describiera concluimos que la actividad del preparado purificado de cabeza de T.infestans corresponde a una AChE ( tipo I ).

---

#### IVg) ANALISIS POR ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

A los fines de obtener una mejor información sobre la composición esterásica de los preparados crudo y purificado, como asimismo de contar con un criterio de pureza directo para evaluar nuestro preparado purificado, se ensayó la electroforesis en gel de poliacrilamida, como se describe en la parte experimental.

Los resultados obtenidos revelando con aNA el zimograma obtenido de un preparado crudo de cabeza de T. infestans se muestra en la figura 13. En el mismo se pueden apreciar claramente 5 bandas de actividad enzimática, indicadas en orden de menor a mayor movilidad electroforética como 2, 3, 4, 5 y 6.

En corridas electroforéticas independientes hechas con homogenatos similares se reveló con ATC como se describió en la parte experimental, observando en ellas 2 bandas de actividad enzimática de las cuales, una era también visualizada por aNA (banda 2) y la otra de menor movilidad la que se indicó como banda 1.

El comportamiento de las bandas frente a ambos revelados como asimismo su inhibición por eserina y paraoxon se resume en la tabla 12.

De acuerdo a ese comportamiento, en dicha tabla se puede observar una clasificación tentativa de esterasas de acuerdo a Holmes y Masters (172).

La misma nos indica que las bandas 1 y 2, probablemente las de mayor peso molecular, pueden ser atribuidas a ChEs, las bandas 3 y 6 podrían clasificarse como aril y/o acetilsterasas, en cambio las bandas 4 y 5 presentan un comportamiento de carboxiesterasas.

Preparados purificados de AChE de cabeza de T. infestans, como ya se describiera, fueron estudiados en forma similar por electroforesis en gel de poliacrilamida. Sorprendentemente ninguna de las bandas presentes en el crudo fueron visualizadas en este caso. Cuando se usó gel espaciador para realizar la corrida electroforética del preparado purificado, se pudo visualizar por aNA que la actividad enzimática quedaba en el espaciador sin entrar al gel de corrida. Dadas las características de porosidad del gel espaciador se puede afirmar que la presencia de una banda en el mismo estaría asociada a una enzima de alto peso molecular

— que no tiene la posibilidad de entrar al gel de corrida (figura 13).

Esta nueva banda ausente en los zimogramas de preparados crudos, sería la única enzima presente en preparados purificados, que las evidencias bioquímicas ya mencionadas, la señalan como una AChE.

Este cambio de movilidad electroforética en la banda correspondiente al preparado purificado podría explicarse en base a observaciones reportadas con ChEs de otras fuentes. En efecto, han sido encontradas formas moleculares múltiples de AChE en todo el reino animal; gusanos (179), insectos (38), peces (181) y mamíferos (182).

Estas formas moleculares múltiples pueden agregarse o desagregarse reversiblemente por una diversidad de factores. Hollunger y Niklasson (183), trabajando con AChE de núcleo caudado de bovino encontraron una forma soluble de 80.000 de PM, cuyo almacenamiento formaba agregados de 250.000 o 500.000 y hasta 1.000.000 o más de PM.

También observaron que las tentativas de purificación de los preparados de bajo PM sufrieron agregación para dar formas de alto PM.

Por otra parte, Eldefrawi et al. (38) trabajando con AChE de mosca extraída con soluciones de Triton X-100, encontraron que la enzima se agregaba en bajas concentraciones salinas. Además encontraron cambios en las bandas del zimograma obtenido en gel de poliacrilamida cuando los preparados envejecían.

Estas evidencias reportadas, podrían ayudar a explicar el comportamiento electroforético de nuestro preparado purificado. En efecto, la banda correspondiente a una AChE de alto PM observada en el preparado purificado puede ser atribuida a una forma de agregación debida al proceso de purificación aplicado. Esta transformación no ofrecería dudas en cuanto a la representatividad de esta forma enzimática respecto a la enzima de homogenatos crudos, ya que la agregación sólo afectaría al PM y no a las propiedades catalíticas, como lo demostrara Massoulié et al. (184) para AChE de Electrophorus electricus.

Respecto al proceso de purificación ensayado, con el fin de obtener una información general de la eficiencia del mismo, se recurrió a analizar

el zimograma revelado para proteínas tanto del homogenato crudo como del purificado. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 14.

Cabe aclarar que la banda que aparece en todos los zimogramas correspondientes al preparado purificado en el frente de corrida, no es revelable como esterasa ni como proteína y podría ser atribuida a lípidos y/o trazas de pigmento.

El análisis de los zimogramas de la figura 14, indica una notable simplificación de las bandas de proteínas del homogenato crudo al preparado purificado, donde sólo se observa una en el tope superior del gel que corresponde a la AChE agregada.

TABLA 12

CARACTERISTICAS DE LAS BANDAS PRESENTES EN EL ZIMOGAMA DE LA FIGURA 13

Clasificación BANDAS	Revelado		Inhibición	
	naftil acetato	ATC	Eserina	Paraoxon
Colinesterasa I	no	si	si	si
Colinesterasa II	si	si	si	si
Aril y/o				
Acetilesterasa III	si	no	no	no
Carboxi- esterasa IV	si	no	no	si
Carboxi- esterasa V	si	no	no	si
Aril y/o				
Acetilesterasa VI	si	no	no	no

FIGURA 13

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE PREPARADOS  
DE ACETILCOLINESTERASA DE CABEZA DE TRIATOMA INFESTANS.  
ZIMOGRAMA REVELADO CON ALFA-NAFTIL ACETATO.

A: preparado purificado - B: preparado crudo -  
C: esquema del preparado crudo (banda I: revelada con ATC)

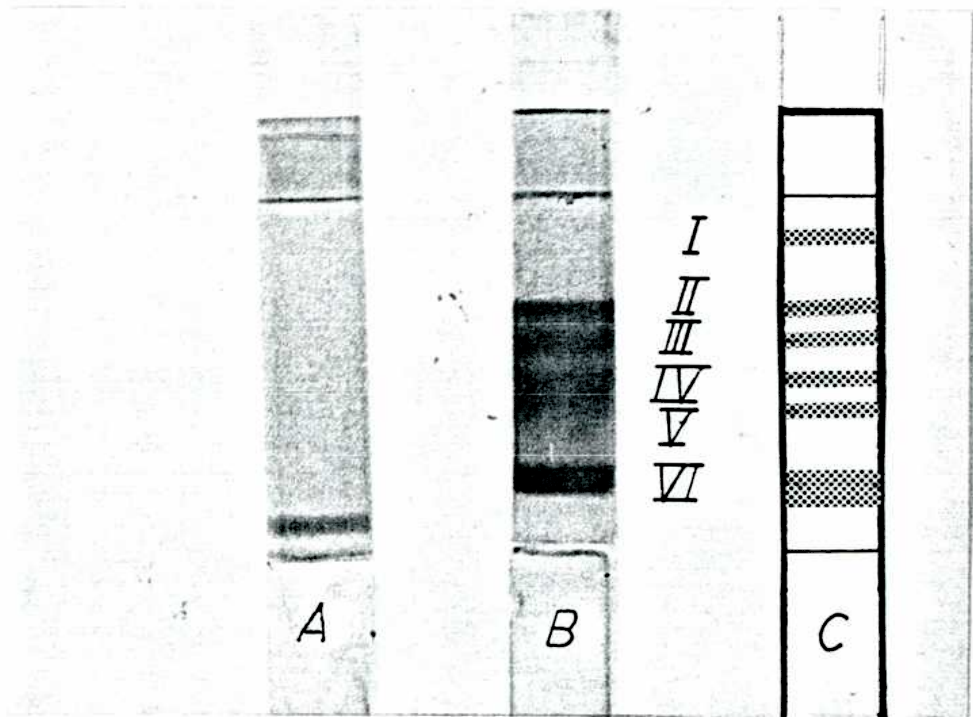
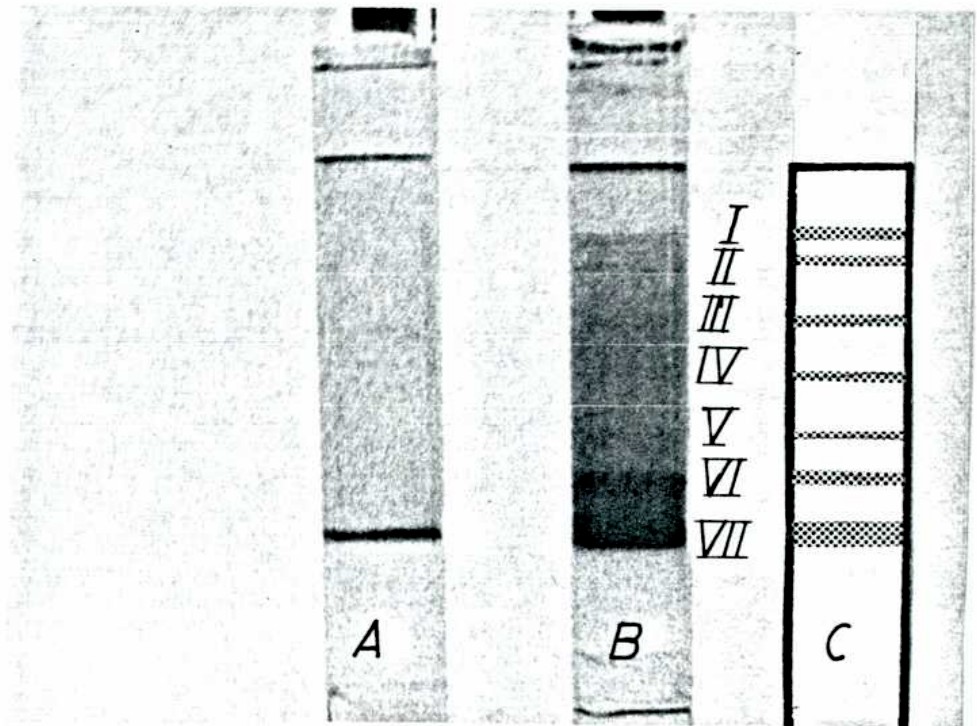


FIGURA 14

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE PREPARADOS DE  
ACETILCOLINESTERASA DE CABEZA DE TRIATOMA INFESTANS-  
TINCION DE PROTEINAS-

A; preparado purificado -- B: preparado crudo -- C: esquema del  
preparado crudo.





V) ACTIVIDAD Y SUSCEPTIBILIDAD DEL SISTEMA COLINESTERASICO DE CABEZA DE TRIATOMA INFESTANS A COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS EN FUNCION DEL DESARROLLO POST-EMBRIONARIO.

Va) EVOLUCION DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASICA

Es ampliamente conocido que la actividad colinesterásica es afectada por una variedad de factores entre los cuales podemos citar por su importancia toxicológica a la edad, sexo, y etapa de desarrollo del insecto.

Un conocimiento de la influencia de los mismos, podría ayudar a interpretar diferencias en susceptibilidad a compuestos anticolinesterásicos.

Respecto al desarrollo post-embriionario de insectos es sabido que el SNC es remodelado para desarrollar nuevas funciones con la incorporación de un nuevo repertorio de comportamiento, así como también el exoesqueleto y la musculatura es redimensionada durante la metamorfosis de larva a pupa y luego a adulto (en los insectos de metamorfosis heteromorfa) o como en la vinchuca, durante los distintos estadios hasta llegar a adulto (insectos de metamorfosis holomorfa).

Esta metamorfosis del SNC puede involucrar; muerte celular programada, proliferación de neuronas y glía, crecimiento del neuropilo, formación de nuevas sinapsis, migración de neuronas y fusión de ganglios.

En nuestro caso el T. infestans presenta una metamorfosis holomorfa y aunque la variación de su comportamiento durante el desarrollo post-embriionario no presenta cambios espectaculares es dable esperar una remodelación gradual del sistema nervioso hasta llegar a adulto.

Del estudio realizado midiendo la actividad colinesterásica para los distintos estadios, surgieron los datos que se resumen en la tabla 13 y en la figura 15. El análisis de estos datos arroja una aparente contradicción en cuanto a la forma de expresar la variación de la actividad colinesterásica. En efecto, cuando la actividad colinesterásica se expresa por unidad orgánica ( por cabeza ) como se aprecia en la figura 15, la misma crece durante el desarrollo post-embriionario hasta llegar a adulto. En cambio cuando la actividad enzimática es expresada por peso de cabezas en mg, la tendencia es exactamente la opuesta, es decir decrece

TABLA 13. DATOS QUE REPRESENTAN LA EVOLUCION DEL PESO DE LAS NINFAS Y CABEZAS, ug DE PROTEINAS POR CABEZAS, ACTIVIDAD ESPECIFICA FRENTE ATC Y BTC, ACTIVIDAD POR CABEZA Y POR PESO DE CABEZA FRENTE A ATC Y BTC, EN FUNCION DEL DESARROLLO POST-EMBRIONARIO DEL TRIATOMA INFESTANS.

ESTADIOS	NINFAS mg	CABEZAS mg.	PROTEINAS por cabeza ug	nmoles min. cabeza		nmoles min. mg de cabeza		nmoles min. mg de proteins	
				ATC	BTC	AIC	BIC	ATC	BTC
I	1.3	0.16	15	0.60	0.12	3.75	0.75	40.0	8.0
II	4.0	0.45	40	1.09	0.27	2.42	0.60	27.3	6.75
III	11.0	0.90	70	2.0	0.37	2.22	0.41	28.6	5.29
IV	31.0	2.20	150	2.82	0.80	1.28	0.36	18.8	5.33
V	98.0	4.40	200	4.85	1.13	1.10	0.25	24.3	5.65
VI	200.0	6.50	550	6.90	1.50	1.06	0.23	12.5	2.72
	250.0	7.0	620	7.10	1.60	1.01	0.22	11.5	2.59



desde ninfa I hasta adulto. Estas tendencias son mucho mayores y marcadas en la AChE que en la BuChE. Este hecho estaría justificado, dado que la AChE es casi la única ChE en el SNC que aumenta significativamente durante el desarrollo del mismo, debido a que está asociada a las neuronas y a la glía las cuales aumentan mitóticamente a través del desarrollo post-embriionario.

Vb) EVOLUCION DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE LA COLINESTERASA A INHIBIDORES ORGANOFOSFATOS

Algunos autores piensan que el fenómeno de resistencia en insectos, tan difundido hoy día, se podría explicar en parte por modificaciones en la susceptibilidad de la enzima "target" de los insecticidas OP. Esto hace importante el estudio y caracterización de estos sistemas "target" en los insectos plaga.

O'Brien et al. (185) reportaron que una cepa de mosca resistente, fue 1500 veces menos susceptible a un insecticida OP (Rabon) que una cepa normal de la misma especie. Esta variación tan notable, se debió a las diferentes características de las respectivas AChEs.

Brattsten y Metcalf (186) consideran distintos factores que podrían justificar diferencias de toxicidad de carbamatos con la edad de los insectos en distintas especies de moscas. Entre las causas estudiadas figuran variaciones en la susceptibilidad de la ChE a los insecticidas anticolinesterásicos.

Es obvia la importancia toxicológica del estudio de las variaciones de las enzimas "target" en cuanto a su susceptibilidad frente a inhibidores. En la tabla 14 se recopilan los valores de  $I_{50}$  para paraoxon, malaoxon y DDVP calculados en ChE de cabeza de vinchucas en distintos estadios de su desarrollo post-embriionario, como asimismo en adultos de distinto sexo, distinta edad y distinto estado nutricional.

Como se aprecia en la tabla 14, no se encontraron diferencias significativas para los fosfatos ensayados. Siendo en general el paraoxon el más activo. Estos resultados muestran que las variaciones de susceptibilidad del insecto en sus estadios de desarrollo no pueden ser atribuidas a modificaciones en la enzima "target" que le hagan más o menos susceptible a los inhibidores.

TABLA 14

DATOS QUE REPRESENTAN LA VARIACION EN LA SUSCEPTIBILIDAD DE LA COLINESTERASA DE DISTINTOS ESTADOS DEL DESARROLLO POSTEMBRIONARIO, SEXO, LA EDAD, y EL ESTADO NUTRICIONAL DEL Triatoma infestans A LA INHIBICION POR PARAOXON, MALAOXON y DDVP EXPRESADA COMO "I<sub>50</sub>".

ESTADIOS	I <sub>50</sub> (Molar)		
	PARAOXON	MALAOXON	DDVP
II	2,1 10 <sup>-6</sup>	0,5 10 <sup>-6</sup>	4,0 10 <sup>-6</sup>
III	1,1 10 <sup>-6</sup>	1,5 10 <sup>-6</sup>	2,0 10 <sup>-6</sup>
V	1,1 10 <sup>-6</sup>	1,5 10 <sup>-6</sup>	3,8 10 <sup>-6</sup>
VI	1,1 10 <sup>-6</sup>	1,5 10 <sup>-6</sup>	4,0 10 <sup>-6</sup>
(Adultas recién mudadas)	1,1 10 <sup>-6</sup>	1,5 10 <sup>-6</sup>	4,0 10 <sup>-6</sup>
VI	1,2 10 <sup>-6</sup>	1,5 10 <sup>-6</sup>	4,0 10 <sup>-6</sup>
(5 meses de edad, y recién comidos)			
VI	1,2 10 <sup>-6</sup>	1,5 10 <sup>-6</sup>	4,0 10 <sup>-6</sup>
(5 meses de edad y 15 días de ayuno)			

VI) MODO DE ACCION DE LOS COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS EN TRIATOMA INFESTANS.

O'Brien (197) describió la cadena causal de eventos que conducen a la muerte por OP en mamíferos de la siguiente forma: 1) Inhibición de la ChE , 2) Acumulación de ACh, 3) Interrupción de la función nerviosa central o periférica, 4) Falla respiratoria y 5) Muerte por asfixia.

El enumeró los mecanismos involucrados en la muerte como broncoconstricción, descenso de presión sanguínea, bloqueo neuromuscular de músculos respiratorios y falla del centro respiratorio.

Mengle y Casida ( 188) demostraron para 12 de 17 compuestos OP ensayados, que el tiempo de máxima inhibición de ChE en moscas tratadas coincidió con el tiempo de muerte.

Sin embargo Hopf y Taylor ( 189) reportaron que la ChE del nervio de la langosta puede ser totalmente inhibida por un OP y el insecto aún no demostrar estar afectado.

Parece no tener chance que la inhibición de cualquier otra esterasa, como las aliesterasas, puedan resultar la causa de intoxicación en insectos ( 190).

Existen muchos otros datos que avalan y contradicen la teoría anticolinesterásica de los OP en la intoxicación de insectos, pero el balance de evidencias hasta el presente soporta el punto de vista que la inhibición de la ChE en mamíferos es análoga a lo que ocurre en insectos.

Van Asperen ( 191) dice que debe tenerse en cuenta que para probar que una sustancia debe su toxicidad a la inhibición de una enzima, es necesario verificar: 1) que tiene una fuerte acción inhibitoria "in vitro" sobre la enzima, 2) que esta enzima en el insecto vivo está realmente inhibida en el momento en que aparecen los síntomas de intoxicación.

Con el fin de verificar una posible correlación entre la inhibición "in vivo" de la ChE de cerebro de vinchucas y la sintomatología de envenenamiento por OP se realizó la siguiente experiencia. Seleccionamos 90 vinchucas machos, ayunadas durante 14 días y fueron elegidas por pesos entre 100 y 200 mg, fueron tratadas por aplicación tópica como se describió en la sección Materiales y Métodos con paratión en una dosis 12,5 ug/gr .

La dosis usada correspondió a 10 veces la  $LD_{50}$  determinada en hembras, con el fin de poder evaluar el proceso de intoxicación en un lapso que favoreciera la observación ( aproximadamente 9 horas ) .

Los insectos tratados se dispusieron en 10 cristalizadores de vidrio de 10 cm de diámetro a razón de 9 insectos por recipiente, colocando papel plegado en cada uno de ellos a los fines de evitar contaminación accidental de cabezas por contacto con abdómenes topicados.

Se realizó una observación detallada del comportamiento y sintomatología de los insectos tratados comparándolos con el grupo control.

Después de intervalos de una hora, se separaron 9 insectos al azar y se los congeló a  $-16^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos, luego de lo cual se los sometió a lavado con acetona para eliminar posibles vestigios de insecticida no penetrado y luego se los lavó con agua destilada para eliminar la acetona.

Con los insectos secados con papel de filtro se realizaron 3 homogenatos de 3 cabezas cada uno en 0,2 ml de solución de  $\text{ClNa}$  0,5M. Sobre dichos preparados se efectuó la medición de la actividad ChE de cabezas de vinchu- cas y determinación de proteínas. En los casos en que se observó muerte los insectos fueron inmediatamente congelados a  $-16^{\circ}\text{C}$  para la correspondiente determinación de actividad ChE.

Se adoptó como criterio de muerte la inmovilidad del insecto, las patas recogidas y cruzadas sobre la parte ventral y total falta de respuesta a estímulos por contacto físico y luminosos.

Los tiempos individuales de muerte fueron registrados, siendo su promedio 7 horas y 3 minutos con una desviación standard de 1 hora y 24 minutos. Los resultados obtenidos son presentados en la Tabla 15 y en la figura 16. El estudio sobre el efecto tóxico del insecticida aplicado, se basó en las observaciones de las respuestas físicas y el comportamiento de los insectos tratados.

En la dosis ensayada aparecieron los característicos síntomas de los venenos nerviosos que se pueden describir en cuatro estadios:

1) Excitación, 2) Convulsiones, 3) Parálisis, y 4) Muerte.

El primer síntoma de intoxicación aparece después de un cierto lapso que se llama período latente que en nuestro caso fue entre 3 horas 30 minutos y 4 horas. Estos períodos latentes prolongados están indicando generalmente la penetración del tóxico y la subsiguiente conversión metabólica del compuesto "in vivo" a una forma más tóxica.

La comparación de los tiempos relativos en los distintos estadios de la intoxicación indican la naturaleza del envenenamiento, como acción peralif-tica o estimulante. En nuestro caso el período de excitación es mayor que el de parálisis como puede observarse en la figura 16 .

La excitación es precedida por un período en el que el insecto aparece inquieto y esto se manifiesta por los típicos movimientos de "limpieza" que consisten en limpiarse las antenas u otras partes del cuerpo con la boca, actividad que no fue observada en la vinchuca.

La excitación puede reconocerse generalmente por los movimientos frenéticos del insecto, en vinchucas esto es muy notable ya que tiene como todos los hemípteros hábitos muy perezosos.

Después de la excitación y antes de las convulsiones, los insectos tratados presentaron claros síntomas de incoordinación que podrían provenir de una perturbación nerviosa central.

En el período de las convulsiones se observan rápidos movimientos de las patas, como debida a fibrilación muscular, despliegue de las alas, mayor duración de la relajación del rostro (que vulgarmente podría describirse como "pico extendido").

En cuanto a las convulsiones observadas parecieran distinguirse dos tipos diferentes. Las primeras en aparecer son rápidas contracciones y relajaciones de las patas acompañadas a veces por similares movimientos de rostro y antenas. Las segundas se caracterizan por lentas y sostenidas extensiones de las patas, que producen una anormal elevación del insecto sobre el par de patas traseras.

Estas dos clases de convulsiones recuerdan las definidas en mamíferos intoxicados por OP ( 77 ). Las primeras descritas como clónicas o corticales características de la acción de la estricnina y las segundas tónicas o medulares propias de la intoxicación por curare ( 192 ).

En la figura 16 se representó la Actividad específica colinesterásica en función del tiempo de intoxicación. Hasta la cuarta hora no se observó un decrecimiento significativo de la actividad enzimática, el análisis estadístico de estos datos aplicando el test de Student dio un  $p > 0,5$  indicativo de que no hay diferencias entre ellos .



TABLA 15 DATOS QUE REPRESENTAN EL PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASICA DE CABEZA DE TRIATOMA INFESTANS EN FUNCION DEL TIEMPO DE INTOXICACION POR PARATION.

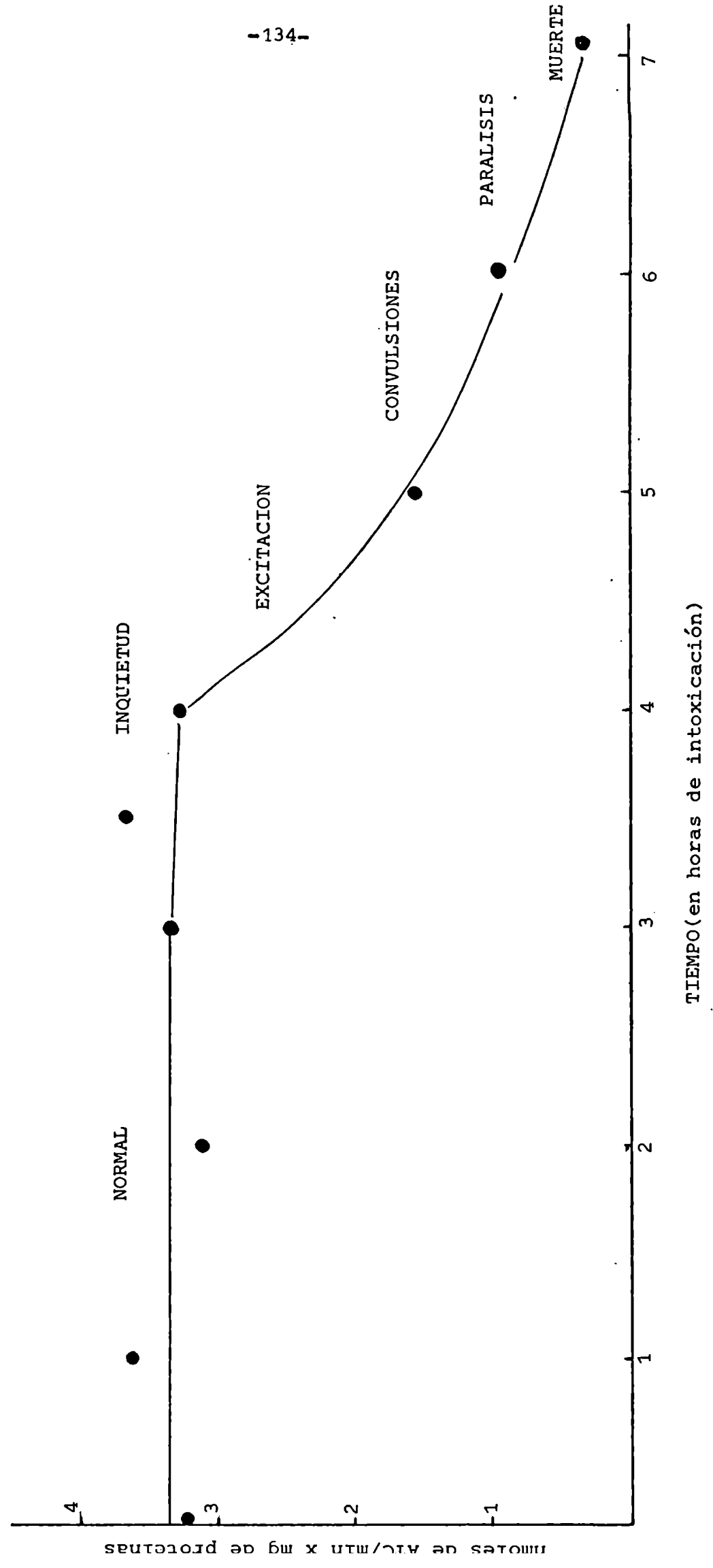
TIEMPO (horas de intoxicación)	ACTIVIDAD ESPECIFICA nmoles de ATC/min x mg proteíñas			ACTIVIDAD ESPECIFICA PROMEDIO $\pm$ $\sigma$	INHIBICION (*)	SINTOMAS
	1 $\sigma$	2 $\sigma$	3 $\sigma$			
0	2,85	3,36	3,62	3,26 $\pm$ 0,39	0	normal
1	3,70	3,56	3,59	3,62 $\pm$ 0,06	0	"
2	2,88	3,00	3,49	3,14 $\pm$ 0,32	0	"
3	2,10	2,88	5,14	3,36 $\pm$ 1,58	0	"
3,5	3,72	4,17	3,36	3,75 $\pm$ 0,42	0	inquietud
4	3,30	2,85	3,72	3,30 $\pm$ 0,61	0	excitación
5	0,87	2,16	1,74	1,58 $\pm$ 0,65	53,4%	incoordinación y convulsiones.
6	1,00	0,97	1,00	1,00 $\pm$ 0,03	70,5%	convulsiones y parálisis.
tiempo de muerte (#)	0,26	0,52	0,29	0,36 $\pm$ 0,26	89,4%	muerte

(\*) Referido a la actividad promedio para los datos obtenidos hasta las 4 horas de intoxicación, considerados como nivel de actividad normal (3,39  $\pm$  0,23 nmoles de ATC/min x mg de proteíñas)

(#) tiempo de muerte promedio = 7 horas 3 min.  $\pm$  1 hora 24 min.

FIGURA 16

CURVA DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE COLINESTERASA DE CABEZA DE TRIATOMA INFESTANS  
EN FUNCION DEL TIEMPO DE INTOXICACION POR PARATION.



La actividad observada luego de 5 horas de intoxicación muestra un decremento significativo (  $p < 0,05$  ) que se continuó hasta el tiempo de muerte cuyo promedio fue de 7 horas .

Con los datos de actividad específica que no mostraron diferencias significativas ( de 0 a 4 horas ,  $p > 0,5$  ) se obtuvo el valor medio, el que se tomó como el nivel normal de actividad ChE en el insecto. En base a este valor en la Tabla 15 se representa el porcentaje de inhibición en función del tiempo de intoxicación .

A pesar que los primeros síntomas aparecieron entre las 3 horas y media y las 4 horas, no se observó para estos tiempos inhibición de la actividad ChE . Recién en la quinta hora, cuando los insectos manifiestan "Knock down" y convulsiones, la inhibición de la actividad ChE se hace detectable (53,3%). Plapp y Bigley (193) observaron máxima inhibición de ChE en moscas tratadas con una dosis de malation y paration igual a la  $LD_{50}$  de 50-60% y 69% respectivamente. En el mismo trabajo se reportó que la inhibición máxima de ChE dependía de la dosis aplicada.

En nuestro experimento a la sexta hora de intoxicación todos los insectos estaban afectados, la mayor parte de ellos con convulsiones o paralizados y la actividad ChE había descendido a un 29,5% de la actividad normal.

Al tiempo de muerte promedio observado ( de 7 horas y 3 minutos ) la actividad ChE llegó a su valor mínimo que fue de 10,5% del valor normal, es decir un 89,5% de inhibición.

Nuestros resultados son consistentes con las observaciones de otros autores respecto a una correlación entre avance progresivo de la intoxicación manifestada por síntomas característicos y la inhibición de la actividad ChE en la cabeza del insecto.

Metcalf y March ( 89 ) intoxicando abejas con paration y TEPP observaron en general que un 50% de inhibición conducía a hiperexcitabilidad, 65% a "knock down", 90% a parálisis y 98% a muerte .

Mengle y Casida (188) intoxicando moscas con Sarin encontraron similar correlación de sintomatología e inhibición de la ChE de cabeza de moscas. Cabe destacar que no sólo en cerebros de insectos ha sido observada una correlación entre la inhibición de la ChE y el proceso de intoxicación por OP.

Booth y Metcalf ( 180) demostraron en moscas mediante técnicas histoquímicas que parece ser más crítica la inhibición en tórax que en cerebro. UK y Himel ( 195) encontraron inhibición progresiva en el tiempo trabajando con tórax de moscas intoxicadas con un tiofosfato (Clorpirifos). En su trabajo de tesis Booth estudió mediante técnicas histoquímicas la inhibición ChE en distintas especies de insectos intoxicados con OP. El concluye que no parece haber una regla general respecto al sitio más crítico asociado a causa de muerte.

En nuestro caso medimos la inhibición en ChE de cabeza de vinchucas ya que en la mayor parte de los insectos en los que se estudió intoxicación por OP "in vivo" se encontraron muy buenas correlaciones entre la sintomatología del avance de la intoxicación y la caída de la actividad ChE en cabeza. Por otra parte los hábitos hematófegos del T. infestans complican la interpretación de la inhibición de la actividad ChE en tórax.

La bibliografía sobre inhibición enzimática correspondiente al tiempo de muerte reportó porcentajes variables, indicando en general una inhibición masiva. Incluso en algunos casos, distintos compuestos a diferentes dosis producían porcentajes distintos de inhibición ChE al tiempo de muerte. Aparentemente no existiría una inhibición determinada correspondiente al tiempo de muerte. A la luz de recientes hallazgos este hecho podría interpretarse como que la causa de muerte podría estar asociada a la inhibición de determinada isoenzima de la AChE más crítica para la vida del insecto. O'Brien et al. ( 185 ) y Zettler y Brady ( 194) trabajando con tórax y cabezas de moscas separaron por electroforesis en gel de poliacrilemida distintas isoenzimas de la AChE cuya inhibición en insectos intoxicados con compuestos OP variaba.

Por otra parte Booth-Metcalf encontraron por histoquímica en moscas tratadas con OP que la inhibición de la ChE periférica del ganglio torácico tiene una importancia crítica en el envenenamiento del insecto.

Este hecho podría hacer pensar que además de la posible importancia de diferentes isoenzimas como punto de ataque crítico de los OP, la AChE de determinadas áreas del SN podrían tener una particular importancia en relación con la sintomatología y muerte de los insectos intoxicados.

A los fines de obtener una información más detallada de la inhibición colinesterásica "in vivo" de los T. infestans intoxicados por paration se realizó un análisis de los homogenatos crudos de cabezas por gel de poliacrilamida en los insectos intoxicados.

La figure 17 muestra el zimograma revelado con eNA, proveniente de los insectos intoxicados con paration al tiempo de muerte y comparativamente el zimograma correspondiente a un grupo de insectos control realizado en las mismas condiciones.

La comparación de ambos zimogramas muestra la inhibición de las bandas II, IV y V en los insectos intoxicados.

Este hecho se encuadró dentro de lo esperado ya que nuestra hipótesis de trabajo sobre causa de muerte considera el metabolismo de paration a paraoxon y la subsiguiente inhibición de la colinesterasa por él mismo.

Esta inhibición se manifiesta en el zimograma, en la desaparición de la banda II. La desaparición de las bandas IV y V, si bien no estarían ligadas a la causa de muerte representan una lesión bioquímica esperada ya que corresponden a esterasas sensibles al paraoxon, como se demostró por inhibición in vitro.

Las bandas III y IV permanecieron inalteradas en los homogenatos de insectos intoxicados por paration. Este hecho puede considerarse lógico ya que estas mismas bandas no fueron susceptibles a la inhibición por paraoxon in vitro, lo que motivó su clasificación como aril y/o acetil-esterasas de acuerdo a Holmes y Masters(172).

Con el objeto de complementar los estudios sobre causa de muerte del Triatoma infestans intoxicado con organofosforados en este caso paration, se llevó a cabo un estudio histológico del ganglio supraesofágico de ninfas V de insectos control e insectos tratados.

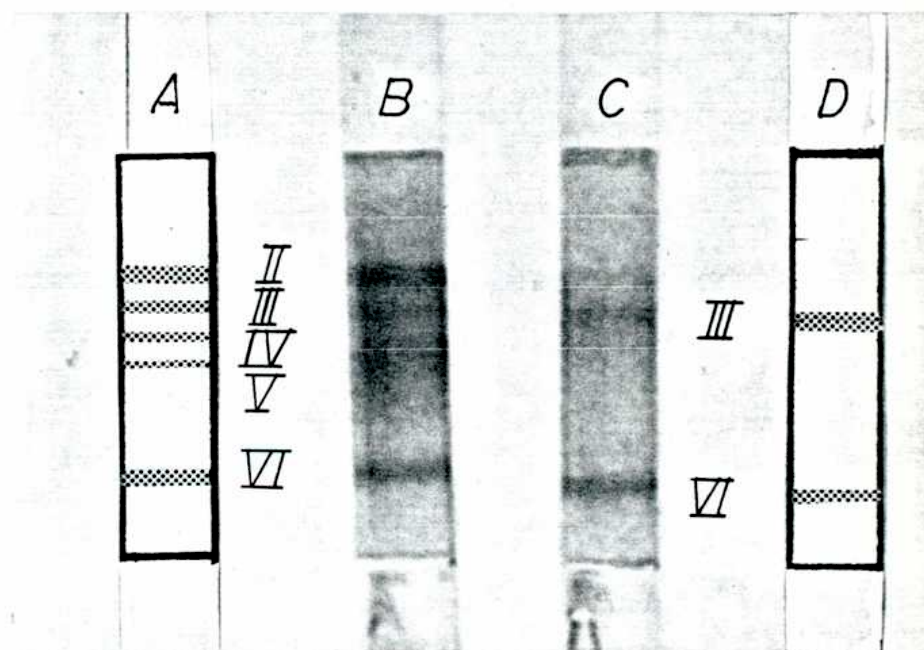
FIGURA 17

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE PREPARADOS CRUDOS  
DE ACETILCOLINESTERASA DE CABEZA DE TRIATOMA INFESTANS.

ZIMOGRAMA DE INHIBICION IN VIVO POR INTOXICACION CON  
PARATION A TIEMPO DE MUERTE.

A y B: esquema y zimograma de grupo control.

C y D: esquema y zimograma de grupo intoxicado.



Como sabemos los insecticidas sintéticos modernos, entre los que hallamos los OP, han revelado que causan la muerte de los insectos tratados por su acción a nivel del SN.

Los estudios histopatológicos pueden proveer una respuesta a la causa de muerte y al sitio de acción de un tóxico.

Es importante investigar de qué manera, a qué velocidad y en qué orden ocurre un cambio patológico y se extiende.

En general la histopatología de insecticidas en insectos es sorprendentemente escasa (196), en nuestro caso tratamos ninfas V de I. infestans con un film de Paration que contenía 18 ug/cm<sup>2</sup>. A las 6 horas de estar expuestos los insectos al insecticida, se comenzaron a notar claros síntomas de incoordinación nerviosa. Entonces se sacrificaron las ninfas, se les separó la cabeza y se procedió a la disección de los cerebros bajo lupa en solución fisiológica, se fijaron en solución BUIN, se deshidrataron en soluciones de alcohol de concentración creciente, se incluyeron en parafina y se hicieron los cortes de 3 micrones (longitudinales) con micrótopo, luego la tinción de los preparados se hizo con hematoxilina-eosina.

Con el grupo de ninfas control, se procedió de igual manera.

De la observación al microscopio de los cortes del grupo control, se advierte la zona periférica correspondiente a la corteza del cerebro donde se hallan los cuerpos celulares de las neuronas con sus nucleolos y cromatina concentrada (color azul, por la hematoxilina que es acidófila y el citoplasma de color rojo por la eosina que es basófila), en el centro vemos el neuropilo o médula que corresponde a la zona de los axones, donde se lleva a cabo la integración nerviosa, que presenta una tinción muy pareja y se observa claramente el ordenamiento de las fibras, figura 18.

En los preparados de las ninfas tratadas, sacrificadas al tiempo en que demostraron incoordinación nerviosa, se aprecia claramente en la corteza núcleos vacuolizados y cromatina dispersa juntamente con nucleolos sueltos.

En la médula notamos tinción despareja, vacuolas, agujeros por existencia de gotas de grasa (con esta tinción no se revelan) y desorden generalizado en las fibras, figura 19.

Como resultado de esta experiencia podemos decir que en cierta manera demostramos una correspondencia entre el daño tisular (o histopatología) del sistema nervioso más exactamente en el cerebro de las ninfas V de T. infestans con la sintomatología de incoordinación nerviosa producida por tratamiento con un insecticida OP (paratión).

Richards y Cutkomp ( 197 ) creían que los cambios histopatológicos visibles inducidos en los nervios por tratamiento con insecticidas aparecían muy tardíos post-mortem.

Más allá de las discrepancias de los distintos puntos de vista y yendo al significado de este tipo de experimentos, es necesario aclarar que sería poco atinado no otorgarle algún valor a los cambios histopatológicos observados en insectos intoxicados, al menos cuando se los compara con insectos no tratados.

De todas maneras y refiriéndonos a los efectos observados debemos comprender que lo que uno está observando en este tipo de estudios es un tejido que ha sido metado y en el que inexorablemente algunos cambios post-mortem han ocurrido ya. Por lo tanto cuando pretendemos estudiar el efecto de un tóxico de esta manera debemos tener ésto bien en cuenta.

En general en los estudios de causa de muerte la evidencia experimental de ésta es obviamente tardía, y se pasa de lo vivo a lo muerto sin posibilidad intermedia. Es decir podría suceder que se interpretara como causa lo que en definitiva es efecto.

Finalmente podemos concluir que en el envenenamiento de vinchuca por paratión encontramos un efecto histológico notable a nivel de ganglio supraesofágico que podemos resumir en dos palabras: Plasmólisis y Cromatólisis.

Plasmólisis implica destrucción del citoplasma y pared celular, mientras que Cromatólisis significa desintegración y distorsión del material cromatínico del núcleo.



FIGURA 18 y FIGURA 19

HISTOPATOLOGIA DE CEREBROS DE NINFAS V DE TRIATOMA INFESTANS  
INTOXICADAS CON PARATION.

Figura 18 : corte longitudinal de grupo control (magnificación:320x)

Figura 19 : ; corte longitudinal de intoxicados (magnificación:320x)

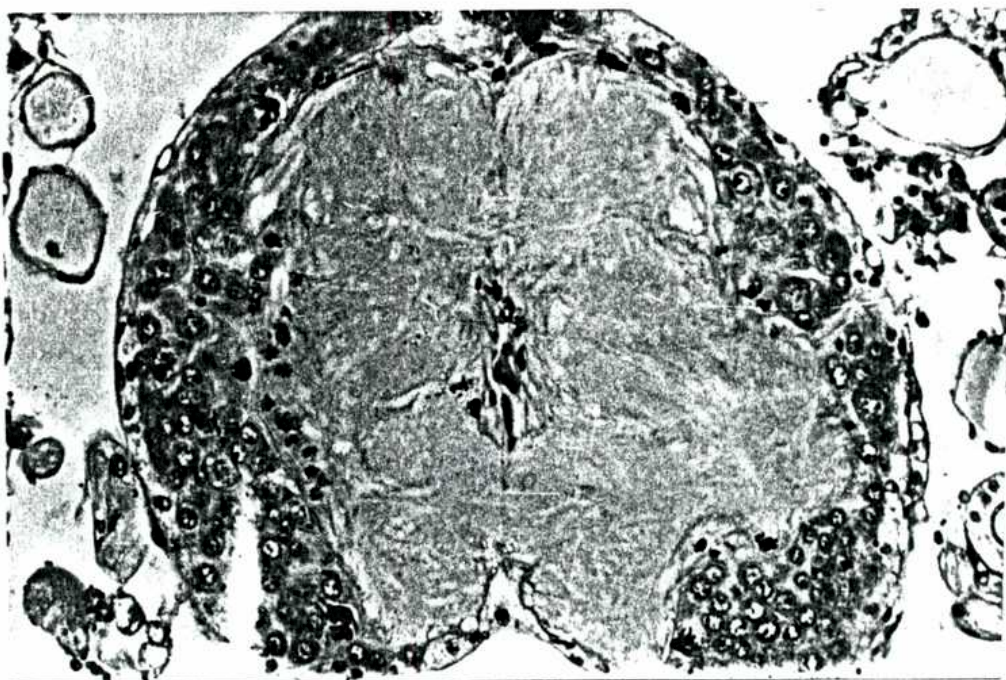


FIGURA 18

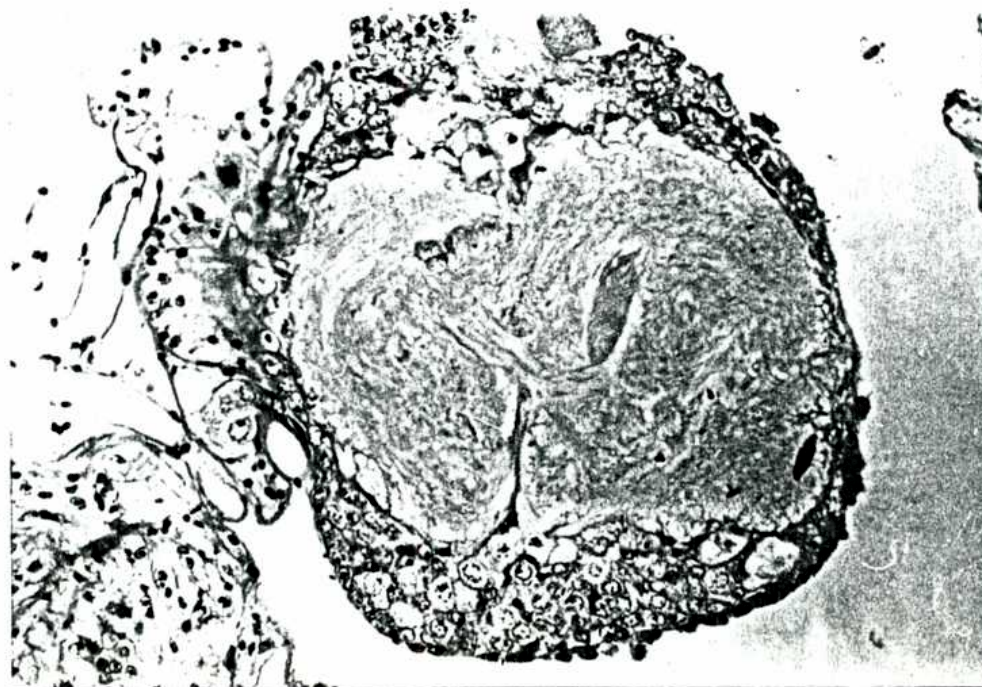


FIGURA 19

## VII) TOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS EN TRIATOMA INFESTANS

Como se ha descripto extensamente en la introducción de este trabajo, resulta ampliamente aceptado que los compuestos OP matan vertebrados e invertebrados por la inhibición de la ChE, con la consecuente interrupción de la conducción nerviosa y acumulación de ACh en las terminales de los nervios.

Nosotros estudiamos la acción letal de los insecticidas OP comerciales; paration, malation y DDVP a través de la dosis letal 50 por aplicación tópica en vinchucas.

Paralelamente se ensayó la toxicidad por inyección intracelomática de los correspondientes metabolitos activos; paraoxon, malaoxon, y nuevamente el DDVP que es de por sí inhibidor directo.

Estos ensayos tuvieron como objetivo obtener una información cualitativa de cómo pueden influir algunos de los pasos básicos de la intoxicación del T. infestans con compuestos OP, sobre la acción letal de los mismos.

Estos pasos básicos son: a) Penetración: proceso por el cual el tóxico atraviesa la cutícula y alcanza la hemolinfa.

b) Metabolismo Activante: proceso por el cual los compuestos tiofosfatos son oxidados a fosfatos ( $\text{>P}^{\text{S}} \rightarrow \text{>P}^{\text{O}}$ ) por las oxidasas de función mixta microsomaes de insectos (los fosfatos son los verdaderos inhibidores de la ChE).

c) Metabolismo Degradante: proceso por el cual el tóxico es hidrolizado por distintos sistemas enzimáticos que lo convierten en metabolitos inactivos.

d) Ataque al "target": proceso por el cual el tóxico o su metabolito activo penetran al SN y se une a la AChE.

En la tabla 16 se resumen los valores obtenidos de inhibición de la ChE de cabeza de vinchuca y de acción letal sobre el insecto adulto.

Los valores de inhibición son informados como  $I_{50}$  sobre homogenato crudo de cabeza y constante bimolecular de inhibición obtenida con homogenato crudo y enzima purificada, reportándose también la  $k_i$  calculada a partir de la  $I_{50}$  por la ecuación que vincula a ambas ( $k_i = 0,695/t \times I_{50}$ )

El valor de acción letal corresponde a la  $LD_{50}$  de paraoxon, malaoxon y DDVP, obtenida por inyección intracelomática como se describe en Materiales

y Métodos. Respecto a los parámetros utilizados para medir inhibición ( $I_{50}$  y  $k_i$ ) cabe destacar que aunque ambos valores están vinculados por una relación matemática ( $k_i = 0,695/t \times I_{50}$ ) pueden determinarse experimentalmente en forma independiente.

Actualmente se prefiere usar el valor de  $k_i$  por ser más representativo de la reacción de inhibición. Por otra parte la literatura más antigua abunda en datos de  $I_{50}$  que no siempre son comparables entre sí, ya que no hay un criterio uniforme para el tiempo de preincubación, que condiciona el valor determinado.

Nuestras determinaciones experimentales de  $k_i$  arrojaron valores de  $\ln A_0/A_t$  en función del tiempo (tablas 17 y 18) cuya linealidad fue excelente (figuras 20 y 21). Cuando se trabajó con homogenatos crudos (tabla 17) fue necesario agregar Triton X-100 al 1% para la obtención de funciones lineales (figura 20), hecho ya reportado para similares determinaciones efectuadas sobre ChE de cabeza de mosca (198) (163).

En el caso de las determinaciones de  $I_{50}$ , los valores de porcentaje de inhibición y pI (tabla 19) también mostraron una correcta relación lineal (figura 22).

El análisis de los resultados de la tabla 16 permite varias observaciones. En primer lugar se debiera tratar de establecer una correlación entre la acción letal de cada compuesto y su capacidad de inhibir la ChE de la cabeza del insecto, como se encontrara en moscas con distintos inhibidores directos (organofosfatos) (199) y (200).

En nuestro experimento tratamos de minimizar la influencia de la penetración y el metabolismo, utilizando inhibidores directos y aplicándolos por vía intracelomática. Dado el escaso número de compuestos utilizados sólo se pretendió una estimación cualitativa de la relación inhibición-toxicidad, o sea tratar de verificar si buenos inhibidores de la ChE del insecto estudiado son activos como insecticidas.

En efecto, se puede apreciar que en todos los casos (tabla 16) los compuestos ensayados resultaron muy buenos inhibidores de la ChE de cabeza de vinchuca, con valores de  $I_{50}$  y  $k_i$  de similar orden, lo que se reflejó en la toxicidad de los mismos, como lo demuestran sus valores de  $LD_{50}$  intracelomática.

Otra interesante observación que surge de la tabla 16, es el cambio que experimentan las respectivas constantes de inhibición bimolecular cuando se las determina sobre el sistema colinesterásico purificado respecto de las obtenidas con homogenatos crudos.

En efecto, las  $k_i$  sobre preparados purificados resultaron aproximadamente 50 veces más altas. Si bien este hecho podría ser interpretado por la diferente composición esterásica de ambos preparados, como se describe en la Sección IV de este trabajo, se debe tener en cuenta que se agregó 1% de Triton X-100 a los homogenatos crudos, con el fin de linealizar la respuesta y poder obtener el valor de  $k_i$ . El agregado del detergente podría provocar una protección de la enzima, como ya fuera reportado para la ChE de cabeza de mosca (142).

En la tabla 16 se informan también las  $k_i$  calculadas a partir de los valores de  $I_{50}$  según la ecuación  $k_i = 0,695/t \cdot I_{50}$ .

Estos valores resultaron en muy buena coincidencia con las  $k_i$  experimentales para el malaoxon y paraoxon, no así para el DDVP cuya  $k_i$  calculada resultó 2,4 veces mayor que la obtenida experimentalmente.

En cuanto a los valores de  $I_{50}$  obtenidos en nuestro caso, resultaron mayores que los reportados por la bibliografía para la ChE de cabeza de mosca, como se resume a continuación:

	$I_{50}$ (Molar)	
	Mosca (°)	Vinchuca
Maleoxon	$6 \cdot 10^{-8}$	$1,5 \cdot 10^{-6}$
Paraoxon	$1,1 \cdot 10^{-7}$	$1,1 \cdot 10^{-6}$
DDVP	$0,5 \cdot 10^{-7}$	$4 \cdot 10^{-6}$

(°) van Asperen K., Nature, 181, 355, 1958.

A los fines de intentar evaluar cualitativamente influencias de otros pasos del proceso de intoxicación, se ensayó la toxicidad por tópica de los inhibidores indirectos; paration y malation cuyos metabolitos activos, paraoxon y maleoxon fueron ensayados por vía intracelomática.

También el DDVP que es un inhibidor directo fue evaluado por aplicación tópica.

Se utilizó el método de Litchfield y Wilcoxon (118) para el cálculo de las LD<sub>50</sub> del paraoxon (figura 23), maleoxon (figura 24) y DDVP (figura 25). En cambio se aplicó el método de Weil (119) para calcular los valores de LD<sub>50</sub> por tópico del paration, malation y DDVP. Los resultados obtenidos con estos últimos se resumen a continuación, como asimismo y con fines comparativos los valores que la bibliografía informa para Musca domestica.

	LD <sub>50</sub> (tópico) ug/gr		
	Vihchuca	Mosca	Referencias
Paration	12,5	0,93	(a)
Malation	32,0	30,0	(b)
DDVP	26,5	0,6	(c)

(a) Eto M., Organophosphorus Pesticides: Organic and Biological, 1974., CRC Press

(b) O'Erien R.D., Insecticides: Action and Metabolism, Acad. Press, N.Y., pag. 262, 1967.

(c) Heath D.F., Organophosphorus poisons, Pergamon Press, pag. 222, 1961.

Los 3 compuestos ensayados por tópico muestran el mismo orden de toxicidad, siendo el más activo el paration. Aunque las complejas interrelaciones existen en el proceso global de intoxicación, en su mayoría no fueron evaluadas. Estos resultados sumados a los valores de LD<sub>50</sub> intracelomático de los inhibidores directos (tabla 16) permitirían suponer que el paso de conversión  $\text{>P-S} \rightarrow \text{>P=O}$  (metabolismo activante) no sería un paso limitante para la acción letal de los inhibidores indirectos.

En efecto, la LD<sub>50</sub> obtenida por tópico para el DDVP, compuesto que no requiere bioactivación, es 100 veces mayor que la obtenida por vía intracelomática, factor que podría ser atribuido a la menor eficiencia de penetración. El factor 100 mencionado para el DDVP, que representaría la menor eficiencia de penetración en el ensayo por tópico, se mantiene tanto en el malation como en el paration, a pesar que en este caso estamos comparando el precursor o inhibidor indirecto (malation y paration) con el metabolito

activo o inhibidor directo (malaoxon y paraoxon).

Es esta comparación la que sugiere la eficiente transformación del malation y paration en malaoxon y paraoxon, responsables de la acción letal.

De la comparación de los valores obtenidos de  $LD_{50}$  por tópico en T. infestans con los que la bibliografía menciona para Musca domestica surge que el paration y DDVP resultaron mucho más tóxicos en moscas que en vinchucas. Mientras que el malation tiene el mismo orden de toxicidad en ambas especies.

TABLA 16  
 DATOS QUE REPRESENTAN LA ACCION LETAL SOBRE INSECTOS ADULTOS Y LA POTENCIA INHIBITORIA SOBRE LA ACTIVIDAD COLINESTERASICA DE CABEZA DE Triatoma infestans DE LOS ORGANOFOSFATOS: PARAOXON, MALAOXON Y DDVP.

COMPUESTO	LD <sub>50</sub> intracelomática ug/g	I <sub>50</sub> (M) homogenato crudo	PI <sub>50</sub> homogenato crudo	k <sub>1</sub> (M <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ) (crudo)	k <sub>1</sub> (M <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ) (crudo)	k <sub>1</sub> (M <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ) (ACHE purifica da)
MALAOXON	0,10	1,5 10 <sup>-6</sup>	5,82	3,08 10 <sup>+4</sup>	2,94 10 <sup>+4</sup>	1,45 10 <sup>+6</sup>
PARAOXON	0,35	1,1 10 <sup>-6</sup>	5,96	3,18 10 <sup>+4</sup>	3,0 10 <sup>+4</sup>	1,25 10 <sup>+6</sup>
DDVP	0,19	4,0 10 <sup>-6</sup>	5,40	1,80 10 <sup>+4</sup>	0,75 10 <sup>+4</sup>	3,10 10 <sup>+5</sup>

$$k_1 = \frac{0,695}{t \cdot I_{50}}$$

Experimental

TABLA 17

DATOS QUE REPRESENTAN LA PERDIDA DE ACTIVIDAD COLINESTERASICA DE HOMOGENATOS CRUDOS DE CABEZA DE Triatoma infestans (con 1% de Triton X-100) CON EL TIEMPO DE INHIBICION POR PARAOXON  $10^{-6}$ M MALAOXON  $10^{-6}$ M y DDVP  $10^{-6}$ M .

	TIEMPO (min.)	A	$A_0/A_t$	$\ln A_0/A_t$
PARAOXON	0	64	1	0
	5	55	1,16	0,15
	8	50,5	1,27	0,24
	10	47,5	1,35	0,30
MALAOXON	0	64	1	0
	3	58	1,10	0,09
	5	55	1,16	0,15
	7	52	1,23	0,20
DDVP	0	63	1	0
	7	60	1,05	0,05
	12	58	1,10	0,09
	20	55	1,16	0,15



TABLA 18

DATOS QUE REPRESENTAN LA PERDIDA DE ACTIVIDAD DE LA AChE PURIFICADA DE CABEZA DE Triatoma infestans CON EL TIEMPO DE INHIBICION POR PARAOXON  $10^{-7}$ M, MALAOXON  $10^{-7}$ M, y DDVP  $5 \times 10^{-7}$ M .

	TIEMPO (min.)	A	$A_0/A_t$	$\ln A_0/A_t$
PARAOXON	0	56	1	0
	3	36	1,55	0,43
	6	26	2,15	0,77
	9	19	2,95	1,08
	12	13	4,30	1,46
MALAOXON	0	56	1	0
	3	34	1,65	0,5
	6	24	2,34	0,85
	10	12	4,67	1,54
	15	6	9,34	2,23
DDVP	0	56	1	0
	2	39	1,43	0,36
	5	26	2,15	0,77
	8	16	3,50	1,25
	11	10	5,60	1,72

TABLA 19

DATOS QUE REPRESENTAN LA PERDIDA DE ACTIVIDAD COLINESTERASICA DE HOMOGENATOS CRUDOS DE CABEZA DE Triatoma infestans POR INHIBICION A TIEMPOS CONSTANTES DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE PARAOXON, MALAOXON y DDVP.

	(I) Molar	pI	% Inhibición
PARAOXON (20 min.)	0,5 10 <sup>-6</sup>	6,31	20
	1,0 10 <sup>-6</sup>	6,0	45
	1,1 10 <sup>-6</sup>	5,96	50
	1,9 10 <sup>-6</sup>	5,72	78
MALAOXON (15 min.)	0,5 10 <sup>-6</sup>	6,31	15
	1,0 10 <sup>-6</sup>	6,0	34
	1,5 10 <sup>-6</sup>	5,82	54
	2,5 10 <sup>-6</sup>	5,61	72
DDVP (10 min.)	1,0 10 <sup>-6</sup>	6,0	20
	2,0 10 <sup>-6</sup>	5,7	35
	3,0 10 <sup>-6</sup>	5,52	43
	4,5 10 <sup>-6</sup>	5,35	54

FIGURA 20

CURVAS DE PSEUDO PRIMER ORDEN QUE REPRESENTAN LA RELACION ENTRE  $\ln A_0/A_t$  vs tiempo PARA LA INHIBICION COLINESTERASICA DE HOMOGENATOS CRUDOS DE CABEZA DE Triatoma infestans (con 1% de Triton X-100) POR PARAOXON  $10^{-6}M$ , (-o-), MALAOXON  $10^{-6}M$  (-x-), y DDVP  $10^{-6}M$  (-●-).

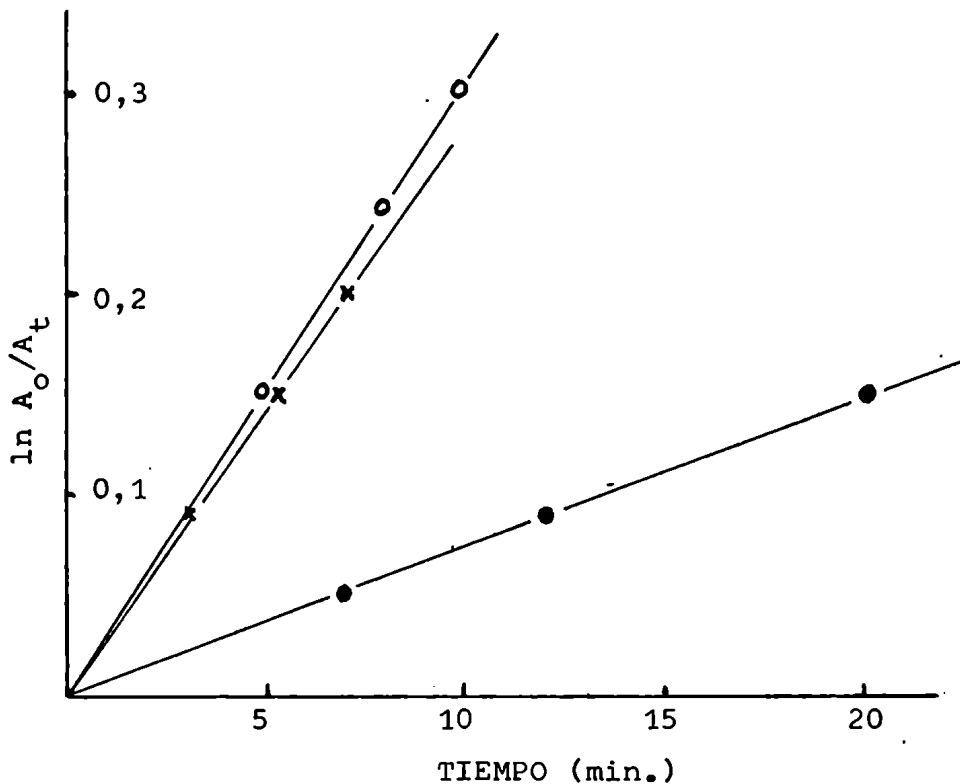


FIGURA 21

CURVAS DE PSEUDO PRIMER ORDEN QUE REPRESENTAN LA RELACION ENTRE  $\ln A_0/A_t$  vs tiempo PARA LA INHIBICION DE LA AChE PURIFICADA DE CABEZA DE Triatoma infestans POR PARAOXON  $10^{-7}M$  (-o-), MALAOXON  $10^{-7}M$  (-x-), y DDVP  $5 \times 10^{-7}M$  (-●-).

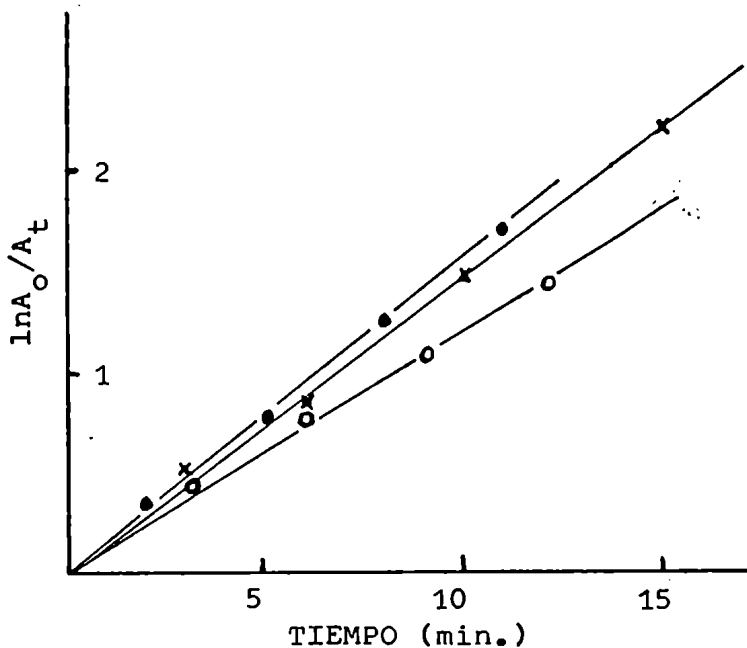


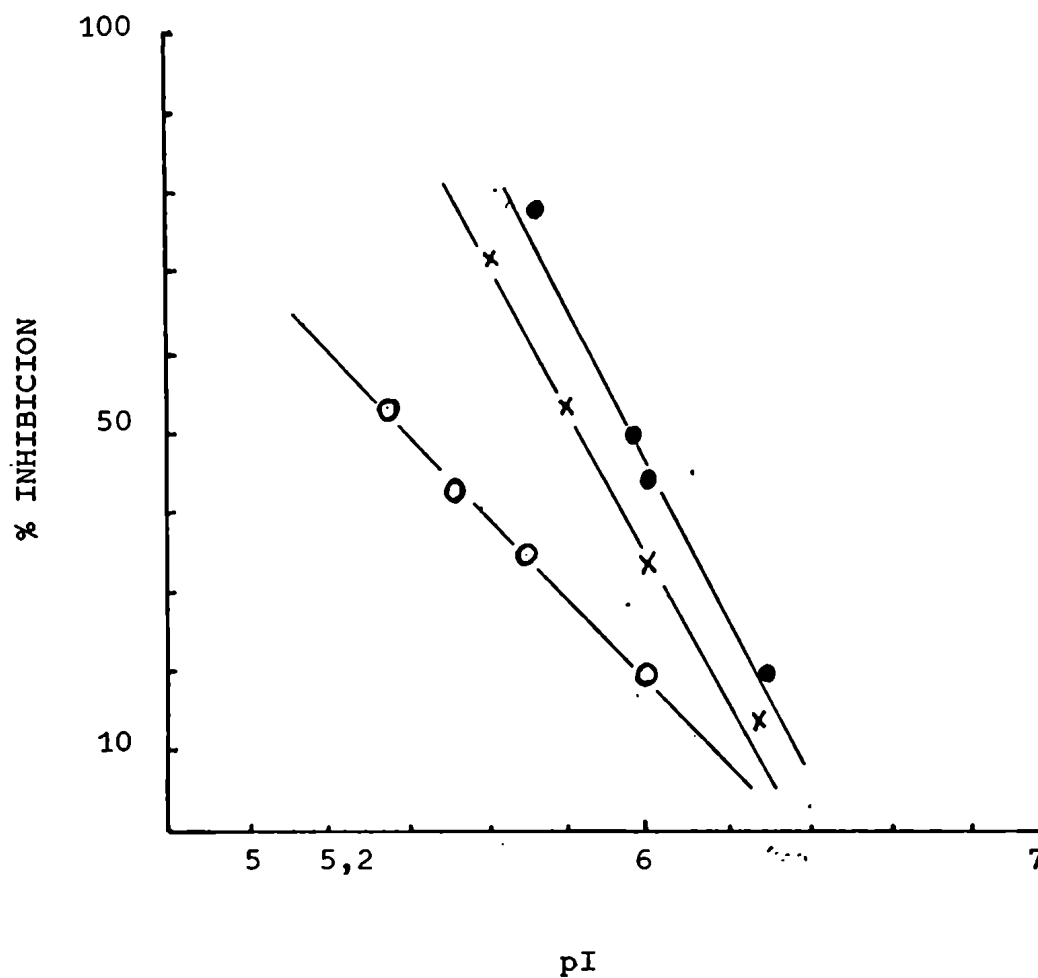
FIGURA 22

CURVAS QUE REPRESENTAN LA RELACION ENTRE EL PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASICA DE LA CABEZA DEL Triatoma infestans Y LAS DISTINTAS CONCENTRACIONES DE PARAOXON, MALAOXON y DDVP A TIEMPOS FIJOS Y EXPRESADAS COMO pI (-log Concentración Molar de Inhib.)

PARAOXON: ( -●- )

MALAOXON: ( -x- )

DDVP; ( -○- )



CURVA DE MORTALIDAD DE TRIATOMA INFESTANS ADULTAS POR INYECCION  
INTRACELOMATICA DE PARAOXON.

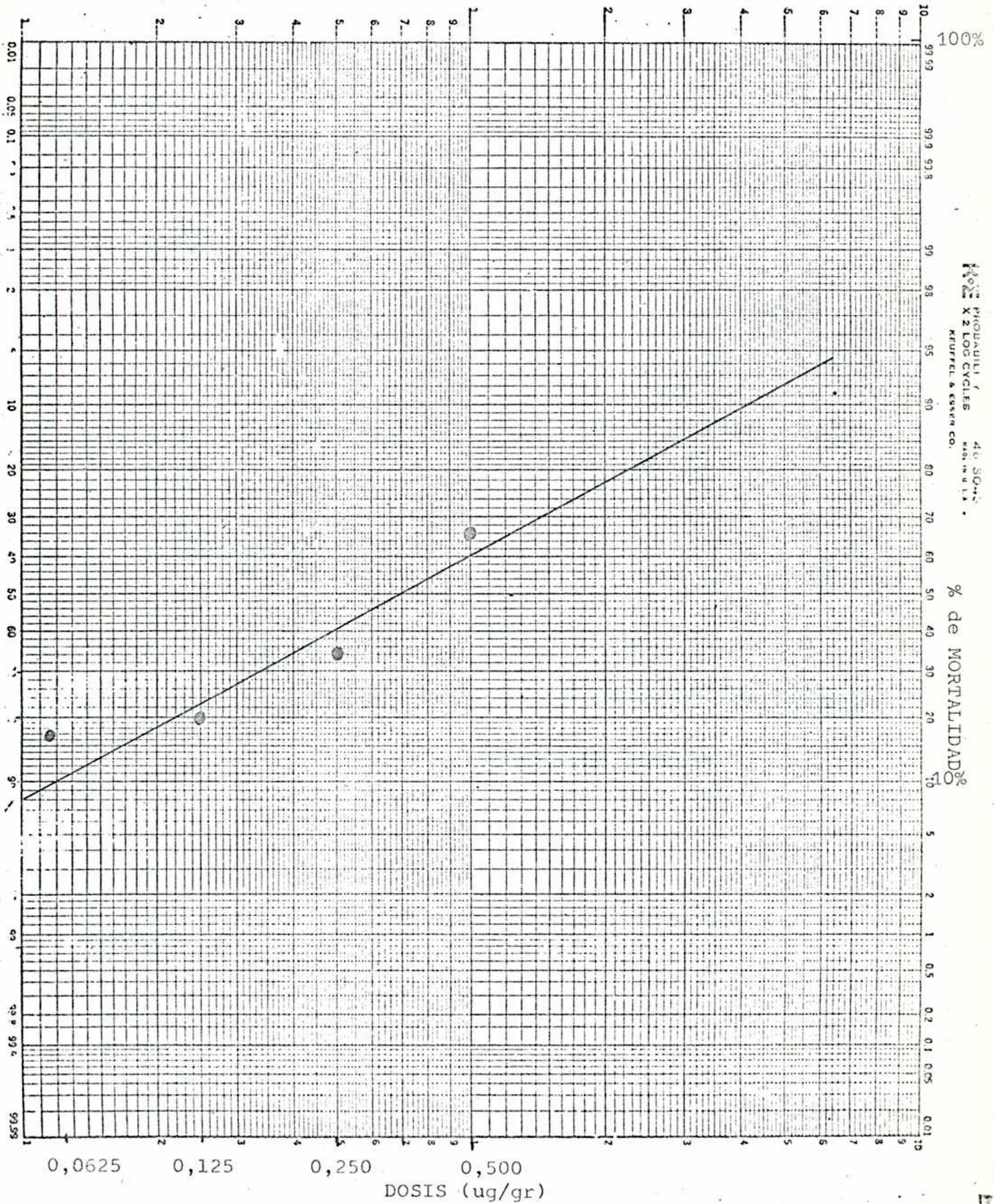


FIGURA 24

CURVA DE MORTALIDAD DE TRIATOMA INFESTANS ADULTAS POR INYECCION  
INTRACELOMATICA DE MALAOXON.

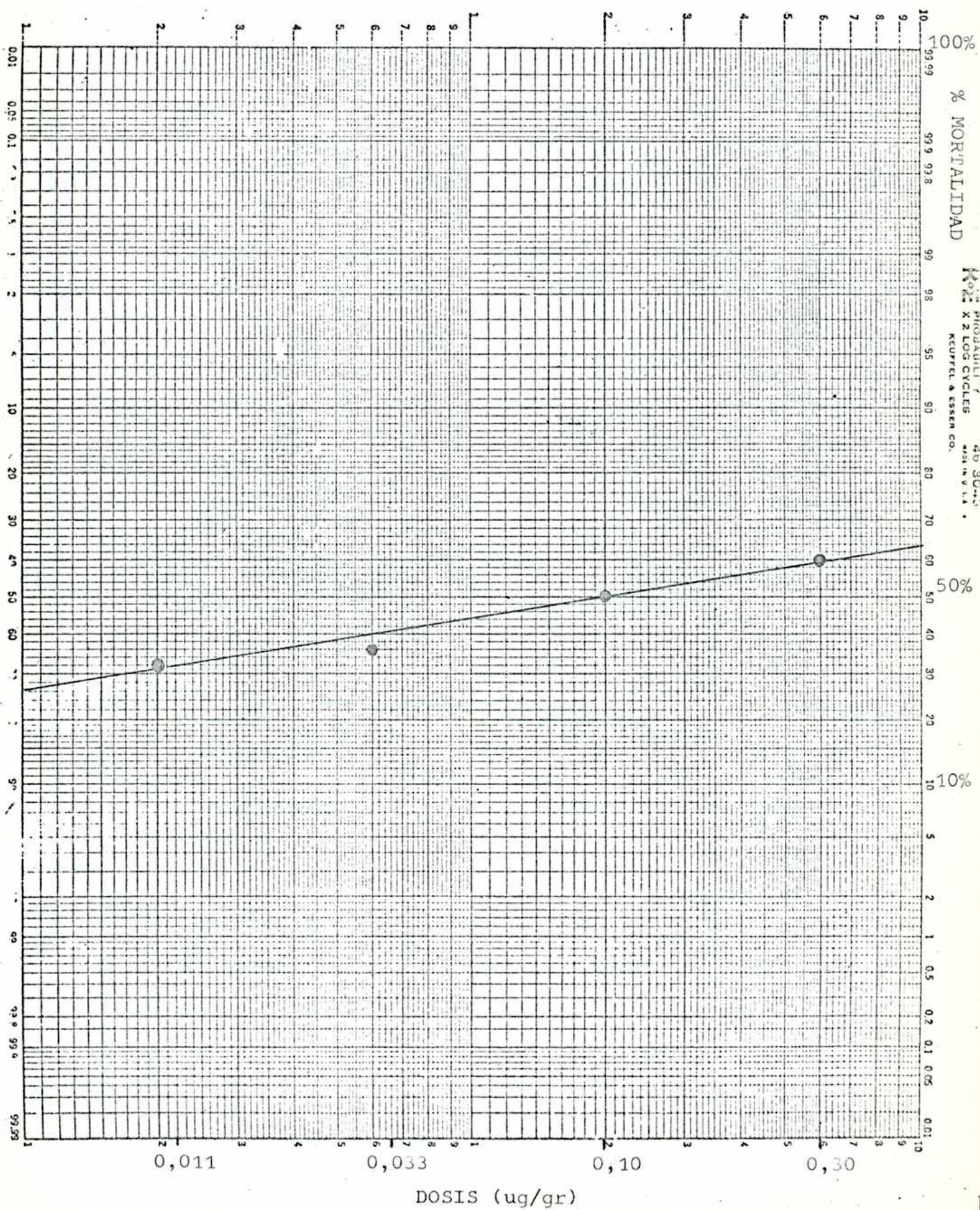
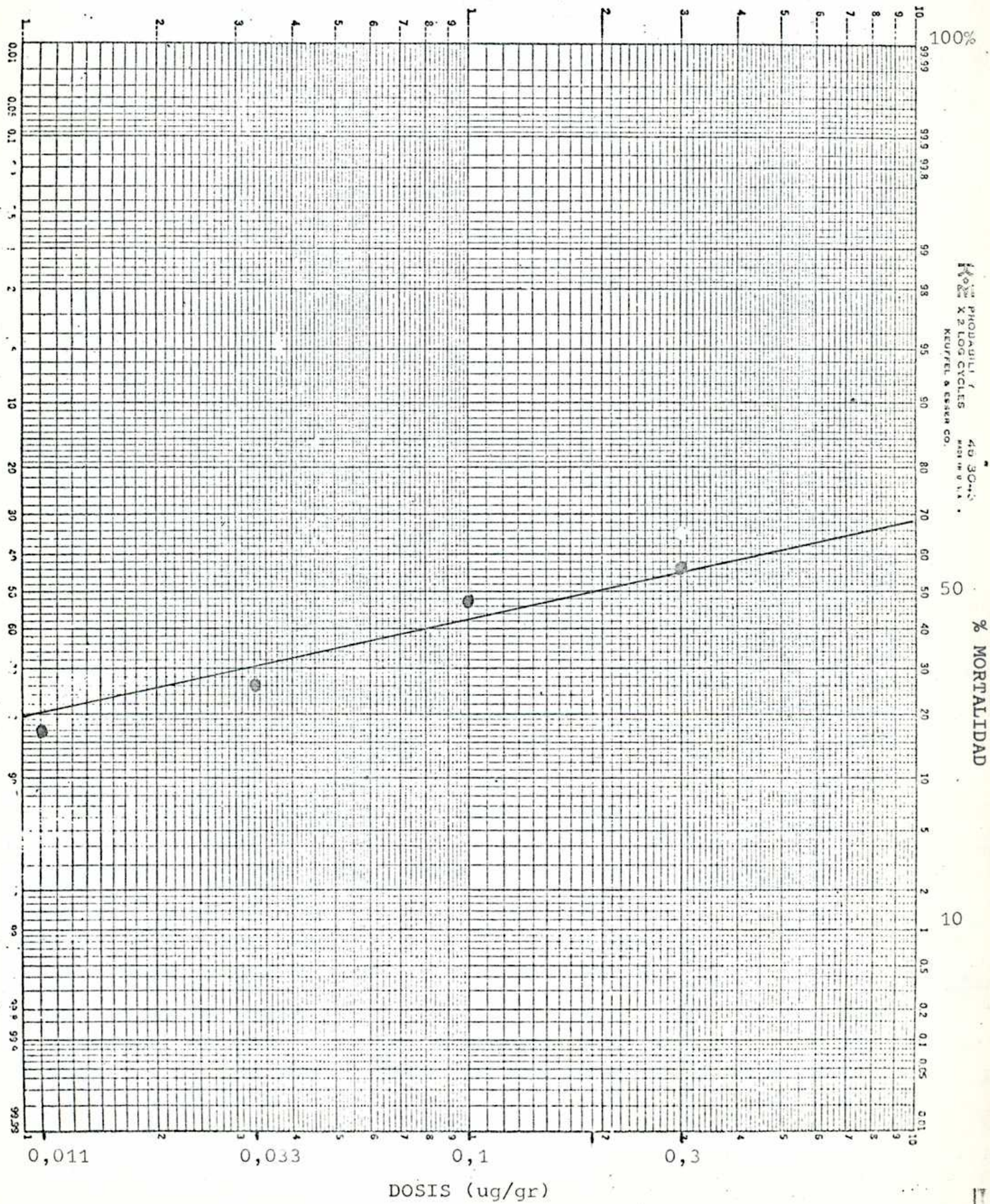


FIGURA 25

CURVA DE MORTALIDAD DE TRIATOMA INFESTANS ADULTAS POR INYECCION  
INTRACELOMÁTICA DE DDVP.



## RESUMEN Y CONCLUSIONES

Este trabajo representa una contribución al estudio de los efectos tóxicos de las sustancias en los organismos vivos, fundamentalmente en lo que hace a los mecanismos de bioacción, que de acuerdo a R.D.O'Brien es el rol fundamental de la toxicología.

Se pretendió interpretar el mecanismo de intoxicación del T.infestans tratado con insecticidas organofosforados, en ese sentido fue de especial interés el estudio de la "lesión bioquímica" primaria que como se acepta actualmente en otros insectos, es la inhibición de la AChE del SNC.

Dada la falta de conocimientos que hay acerca de la bioquímica del sistema nervioso del T.infestans fue necesario inicialmente caracterizar la AChE de la cabeza del mismo.

Los resultados y conclusiones se pueden resumir de la siguiente manera:

1.- Dado que la AChE de cabeza de T.infestans resultó ser una enzima particulada, fue necesaria su solubilización. Para tal fin se encontró como agente óptimo el DCC 15 mM.

2.- Los homogenatos crudos de cabeza de T.infestans mostraron una actividad esterásica compleja. Mediante el uso de sustratos e inhibidores específicos en mayor o menor grado y del análisis de las curvas de actividad vs concentración de sustratos y de inactivación por calor, se evidenció un sistema colinesterásico compuesto al menos por dos enzimas, una AChE y otra BuChE. Además se comprobó la presencia de otras esterases eserina-resistentes clasificables como acetil, aril y carboxi esterases.

3.- Sobre el homogenato crudo de la enzima solubilizada como ya se expuso, se aplicó un esquema de purificación con el fin de eliminar componentes toxicológicamente indeseables.

El mismo consistió en una centrifugación diferencial, un fraccionamiento con sulfato de amonio y un fraccionamiento acetónico. El preparado fue purificado 14 veces con un rendimiento del 78% .

Un estudio del mismo mediante el uso de inhibidores selectivos y diferentes sustratos, como asimismo de la información de las curvas de actividad específica vs la concentración de sustratos e inactivación por calor a 45°, permitió establecer la presencia de una única ChE cuyas caracterís-



ticas correspondieron a una AChE (verdadera o tipo I, según clasificación hecha para enzimas de mamíferos).

Además se comprobó la ausencia de esterasas eserina-resistentes como asimismo una reducción sustancial de la cantidad de lípidos.

La electroforesis en gel de poliacrilamida utilizada como criterio de pureza mostró que el preparado purificado, a diferencia del crudo, no presentaba bandas de esterasas ni proteínas. La tinción para proteínas, en coincidencia con la actividad enzimática fue visible en la interfase entre el gel separador y el gel de corrida, demostrando la presencia de al menos una enzima de alto peso molecular que no entró en gel.

4.- El preparado purificado fue caracterizado frente a distintos agentes físicos y químicos, y establecidos sus parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$  frente a ATC y a BTC.

La actividad en función de la temperatura alcanzó un máximo a 45°.

La respuesta de la actividad enzimática usando ACh como sustrato frente al pH presentó la típica forma de campana de las ChEs verdaderas, con un máximo a pH 7,2.

Las curvas de actividad específica en función de la concentración de ATC y BTC presentaron inhibición por exceso de sustrato en ambos casos, siendo la concentración óptima de ATC y BTC: 0,545 mM.

El valor de  $K_m$  para ATC fue de  $3,3 \cdot 10^{-5}$  M y para BTC de  $9,1 \cdot 10^{-5}$  M, y las  $V_{max}$  fueron 150 nmoles/min mg de proteína y 9,5 nmoles/min mg de proteína respectivamente.

La actividad colinesterásica del preparado purificado fue significativamente inhibida por concentraciones del orden de  $10^{-5}$  M de eserina y Nu-683 y por TEA en una concentración de  $10^{-2}$  M.

El preparado purificado presentó actividad enzimática frente a los ésteres de colina que se enumeran en orden decreciente de actividad específica: acetilcolina; propionilcolina; acetil  $\beta$  metilcolina; butirilcolina y benzoilcolina. También fue activo frente a ésteres de tiocolina mostrando una actividad aproximadamente 15 veces mayor frente a ATC que a BTC. Una discreta actividad fue observada frente al éster neutro PTA, aproximadamente 30 veces menor que frente a ATC.

5.- La composición esterásica tanto del preparado crudo como del purificado fue establecida por análisis electroforético en gel de poliacrilamida. El preparado crudo mostró 6 bandas de actividad enzimática: 2 de ellas atribuibles a ChEs; 2 a aril y/o acetilesterasas y 2 a carboxiesterasas.

El purificado no mostró ninguna de las bandas presentes en el crudo visualizándose sólo una en la interfase entre el gel espaciador y el gel de corrida lo que demostró su alto peso molecular.

Este hecho fue interpretado como una agregación de la enzima durante el proceso de purificación .

Esta alteración de la enzima, si bien parece apartarse del objetivo toxicológico de purificación sin modificaciones significativas, debe considerarse una consecuencia previsible al purificar AChEs.

En efecto, siendo ellas enzimas de membrana, su solubilización significa ya una importante modificación. Por otra parte es bien conocida la composición de las AChEs en subunidades, cuya interconversión puede ocurrir sólo con simples cambios de medios alterando su peso molecular. Como consecuencia, sólo se puede decir que es difícil afirmar la representatividad de las AChEs purificadas respecto al sistema que opera "in vivo" pero no obstante ello, las purificaciones ya realizadas han hecho avanzar considerablemente el conocimiento sobre estas enzimas y su inhibición por compuestos organofosforados.

6.- El estudio de la evolución de la actividad colinesterásica de homogenatos crudos de cabeza de I. infestans en función del desarrollo post-embriionario demostró que la misma expresada por cabeza de insecto se incrementa tanto frente a ATC como a BTC, desde ninfa I hasta llegar a adulto . Cuando se expresó la actividad colinesterásica por mg de peso de cabeza, se observó una disminución de la misma a lo largo del desarrollo post-embriionario frente a ambos sustratos.

7.- La susceptibilidad del sistema colinesterásico frente a organofosforados, medido en homogenatos crudos de cabeza de I. infestans en distintas etapas del desarrollo post-embriionario, en distintos estados nutricionales sexo y edad, no mostró diferencias significativas (expresada como  $I_{50}$ ).

8.- Se estableció una correlación entre la evolución de la intoxicación por paration en I.infestans seguida por su sintomatología y la inhibición de la ChE de cabeza del mismo.

Para una dosis de 12,5 ug/gr de paration se comenzó a observar inhibición a la quinta hora de intoxicación, la que alcanzó a un 90% al tiempo de muerte.

El estudio por electroforesis en gel de poliacrilamida de los homogenatos de cabeza de los insectos intoxicados por paration a tiempo de muerte mostraron que de las 5 bandas de actividad enzimática revelables por aNA del grupo control, sólo aparecían aquellas bandas caracterizadas como acetil y/o erilesterasas, en coincidencia con la resistencia de las mismas a la inhibición por paraoxon, demostrada paralelamente "in vitro". La histopatología de cortes de ganglios supraesofágicos de ninfas V intoxicadas con paration a tiempo de incoordinación nerviosa, arrojó como resultado notables diferencias respecto a similares cortes histológicos de un grupo de ninfas V control.

Los cortes de los intoxicados presentaron en todos los casos evidentes cambios en el citoplasma y en los núcleos celulares (plasmolisis y cromatolisis).

9.- La potencia anticolinesterásica del malaoxon, paraoxon y DDVP fue determinada en preparados crudos y purificados de cabeza de I.infestans. Para el preparado crudo se obtuvieron los siguientes valores de constante bimolecular de inhibición; malaoxon:  $2,94 \cdot 10^4$ , paraoxon:  $3 \cdot 10^4$ , y DDVP:  $0,75 \cdot 10^4$ , siendo para el preparado purificado:  $1,45 \cdot 10^6$ ;  $1,25 \cdot 10^6$  y  $3,1 \cdot 10^5$  respectivamente.

La comparación de los valores de  $k_i$  obtenidos en ambos preparados nos muestra el significativo incremento en la susceptibilidad de la AChE purificada frente a los fosfatos ensayados.

10.- En concordancia con la potencia anticolinesterásica del malaoxon, paraoxon y DDVP, las  $LD_{50}$  intracelomáticas de los mismos mostraron una alta toxicidad en I.infestans adultos.

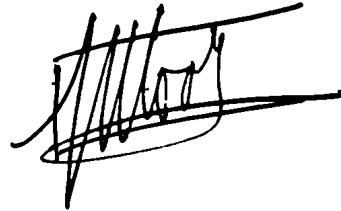
11.- Las  $LD_{50}$  de paration, malation y DDVP determinadas por tópico, demostraron que la vía cuticular es dos órdenes de magnitud menos eficiente que

la vía intracelomática. La comparación de las  $LD_{50}$  por tópico y por inyección de inhibidores directos e indirectos permitiría suponer que la transformación metabólica activante P=S a P=O se efectuaría eficientemente en vinchuca.

12.- La presencia de un inhibidor endógeno de ChE en cabeza de T. infestans fue detectada en homogenatos crudos.

Se estableció que el mismo estaba asociado a los ojos compuestos del insecto, pudiendo tratarse del pigmento de los mismos y con características de inhibidor selectivo de ChEs de insectos.

---



*Bibliografia*

- 1.- Mounter, L.A. y Whittaker, V.P. *Biochem.J.* 47, 525, 1950.
- 2.- Augustinsson, K.B. "Cholinesterases and Anticholinesterase Agents" G.B. Koelle, ed. (Springer, Berlin) pág. 89-128, 1963.
- 3.- Augustinsson, K.B. *Bull. World Health Org.* 44, 81, 1971.
- 4.- Hawkins R.D. y Mendel B. *J. Cell. Comp. Physiol.* 27, 69, 1946.
- 5.- Stedman E., Stedman E. y Easson L.H. *Biochem.J.* 26, 2056, 1932.
- 6.- Mendel B. y Rudney H. *Biochem.J.* 37, 59, 1943.
- 7.- Alles G.A. y Hawes R.C. *J. Biol. Chem.* 133, 375, 1940.
- 8.- Mendel B. y Rudney H. *Science* 98, 201, 1943.
- 9.- Glick D. *Science* 102, 100, 1945.
- 10.- Dale H.H. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 6, 147, 1914.
- 11.- Loewi O. y Navratil E. *Pflügers Arch.* 214, 689, 1926.
- 12.- Stedman E. y Stedman E. *Biochem.J.* 29, 2107, 1935.
- 13.- Marnay A. y Nachmansohn D. *J. Physiol. London* 89, 359, 1937.
- 14.- Marney A. y Nachmansohn D., *Compt. Rend. Soc. Biol.* 124, 942, 1937.
- 15.- Marney A. y Nachmansohn D., *J. Physiol. London* 92, 37, 1938.
- 16.- Koelle G.B. y Friedenwald J.S., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 70, 617, 1949
- 17.- Koelle G.B. y Friedenwald J.S., *Am. J. Ophthalmol.*, 33, 253, 1950.
- 18.- *Bulletin of the World Health Org. General Discussion-Sessions I and II* vol. 44, pag. 113-118, 1971.
- 19.- Bayliss B.J. y Todrick A., *Biochem J.*, 62, 62, 1956.
- 20.- Augustinsson K.B., *Acta Physiol Scand.* 15, Suppl. 52, 1-182, 1948.
- 21.- Cier A., Cuisinaud G., Legheand J. y Solal M., *Bull. Trav. Soc. Pharm. Lyon* 14, 19, 1970.
- 22.- Mounter L.A. y Whittaker V.P., *Biochem.J.* 53, 167, 1953.
- 23.- Pham-Huu-Chanh y Plencade Y., *Biochem Pharmacol.*, 20, 729, 1971.
- 24.- Maheshwari U.R., Shirachi D.Y. y Trevor A.J. *Brain Res.*, 35, 437, 1971.
- 25.- Cohen J.A. y Costerbean R.A. "Cholinesterases and Anticholinesterase Agents", G.B. Koelle ed., Springer, Berlin, pag 299-373, 1963.
- 26.- Mendel B. y Rudney H., *Science*, 102, 616, 1945.
- 27.- Heller M. y Hanahan D.J., *Biochim. Biophys. Acta*, 255, 251, 1972.
- 28.- Dawson R.M. y Crone H.D., *J. Neurochem.*, 21, 247, 1973.
- 29.- Shukuya R., *J. Biochem. Tokyo*, 40, 135, 1953.

- 30.- Wilson I.B. y Cabib E., *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 202, 1956.
- 31.- Plattner F. y Hintner H., *Pflügers Arch.*, 225, 4, 1930.
- 32.- Hargreaves A.B., "Bioelectrogenesis" C. Chagas y A. Paes de Carvalho eds. Elsevier, Amsterdam, pag. 397-405, 1961.
- 33.- Leuzinger W. y Baker A.L., *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.*, 57, 446, 1967.
- 34.- Rothenberg M.A. y Nachmansohn D., *J. Biol. Chem.*, 168, 223, 1947.
- 35.- Lawler L.C., *J. Biol. Chem.*, 238, 132, 1963.
- 36.- Leuzinger W., Goldberg M. y Cauvin E., *J. Mol. Biol.*, 40, 217, 1969.
- 37.- Leuzinger W., *Biochem. J.*, 123, 139, 1971.
- 38.- Eldefrawi M.E., Tripathi R.K. y O'Brien R.D., *Biochim. Biophys. Acta*, 212, 308, 1970.
- 39.- Grafius M.A. y Millar D.B., *Biochemistry*, 6, 1034, 1967.
- 40.- Main A.R., *J. Biol. Chem.*, 244, 829, 1969.
- 41.- Masters C.J. y Holmes R.S., *Biol. Rev.*, 47, 309, 1972.
- 42.- Kása P. y Csillik B., *Prelim. Abstr. Neurochem. Congr. Oxford*, pag. 54, 1965.
- 43.- Krnjević K. y Silver A., *J. Anat.*, 100, 63, 1966.
- 44.- Koelle W.A., Hossaini K.S., Akbarzadeh P. y Koelle G.B., *J. Histochem. Cytochem.*, 18, 812, 1970.
- 45.- Wilson I.B. Acetylcholinesterase, en "The Enzymes", vol. 4, Boyer P.D., Lardy H., y Myrbäck K. Eds., Academic Press, 501, 1960.
- 46.- O'Brien R.D., "Insecticides: Action and Metabolism", Acad. Press, N.Y., 1967.
- 47.- Wilson I.B. y Bergmann F., *J. Biol. Chem.* 186, 683, 1950.
- 48.- Wilson I.B., Bergmann F. y Nachmansohn D., *J. Biol. Chem.*, 186, 781, 1950.
- 49.- Van Rossum J.M., Receptor theory in enzymology en "Molecular Pharmacology" vol II, Ariens E.J., ed. (Acad. Press, N.Y.) pag. 199-255, 1964.
- 50.- Augustinsson K.B. "The Enzymes" vol. 4, Boyer P.D., Lardy H., Myrbäck K., eds. Acad. Press, pag. 521, 1960.
- 51.- O'Brien R.D., *Biochem. J.*, 113, 713, 1969.
- 52.- O'Brien R.D. "Drug Design", vol II, Ariens E.J., ed., Acad. Press, N.Y., 161, 1971.
- 53.- Krupka R.M. *Biochemistry*, 5, 1988, 1966.
- 54.- Weil L., James S. y Buchert A.R., *Arch. Biochem. Biophys.*, 46, 266, 1953.

- 55.- Osterbaan R.A. y Jansz H.S. *Comprehensive Biochemistry*, vol 16,1,1965. (Florkin M. y Stotz E.H. eds., Elsevier, Amsterdam)
- 56.- Cohen J.A., Osterbaan R.A., Jansz H.S. y Berends F., *J. Cell Comp. Physiol.*, 54, (Suppl 1), 231, 1959.
- 57.- Cunningham L., *Comprehensive Biochemistry*, Florkin M., Stotz E.H., eds., vol 16, 85, 1965.
- 58.- Cunningham L.W., *Science*, 125, 1145, 1957.
- 59.- Aldridge W.N., *Bull. W.H.O.*, 44, 25, 1971.
- 60.- Aldridge W.N. y Reiner E., "Enzyme Inhibitors as substrates", North Holland, Amsterdam, 1972.
- 61.- Aldridge W.N., *Biochem. J.*, 53, 62, 1953.
- 62.- Main A.R., *Science*, 144, 992, 1964.
- 63.- Main A.R., y Iverson F., *Biochem J.*, 100, 525, 1966.
- 64.- Fukuto T.R., *Residue Rev.*, 25, 327, 1969.
- 65.- Ahmad S., *Comp. Biochem. Physiol.*, 33, 579, 1970.
- 66.- Mengel D.C. y O'Brien R.D., *Biochem. J.*, 75, 201, 1960.
- 67.- Wolfe L.S. y Smallman B.N., *J. Cell Comp. Physiol.*, 48, 215, 1956.
- 68.- Babers F.H. y Pratt J.J., *Physiol Zool*, 23, 58, 1950.
- 69.- Chadwick L.E., Lovell J.B. y Egner V.E., *Biol. Bull.*, 106, 139, 1954.
- 70.- Lord K.A. y Potter C., *Nature*, 172, 679, 1953.
- 71.- Menn J.J. y Mc. Bain J.B., *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 61, 1578, 1968.
- 72.- Chadwick L.E., "Cholinesterases and Anticholinesterases Agents", G.B. Koelle ed., Springer, Berlin, pag. 741-798, 1963.
- 73.- Dauterman W.C., Talens A. y van Asperen K., *J. Insect. Physiol.*, 8, 1, 1962.
- 74.- Casida J.E., *J. Physiol*, London, 127, 20, 1955.
- 75.- Casida J.E., *Biochem. J.*, 60, 487, 1955.
- 76.- O'Brien R.D., *J. Agr. Food Chem.*, 11, 163, 1963.
- 77.- Matsumura F., "Toxicology of Insecticides", Plenum Press, N.Y. and London 1976.
- 78.- Booth G.M. y Lee A.H., *Bull W.H.O.*, 44, 91, 1971.
- 79.- Takagi H., ed., "Sites of Action of Drugs", Nankodo, Tokyo, 68, 1968.
- 80.- Smallman B.N. y Mansingh A., *Annu. Rev. Entomol.*, 14, 387, 1969.



- 81.- Gahery Y. y Boistel J., "The Physiology of the insect central nervous systems", Treherne J.E. y Beament J.W., eds., Acad. Press, London, 73, 1965.
- 82.- Brown B.E., Science, 155, 595, 1967.
- 83.- Colhoun E.H., "Advances in Insect Physiology" Vol. I Baement J.W., Treherne J.E. y Wigglesworth V.B., eds., Acad. Press, London, 1, 1963.
- 84.- Kerkut G.A., Shapira A. y Walker R.J., Comp. Biochem. Physiol., 16, 37, 1965.
- 85.- Tashiro S., Taniguchi E., y Eto M., Science, 175, 448, 1972.
- 86.- Chamberlain W.F., y Hoskins W.M., J. Econ. Entomol., 44, 177, 1951.
- 87.- Mengle D.C. y Casida J.E., J. Econ. Entomol. 51, 750, 1958.
- 88.- Chadwick L.E. y Hill D.L., J. Neurophysiol., 10, 235, 1947.
- 89.- Metcalf R.L. y March R.B., J. Econ. Entomol., 42, 721, 1949.
- 90.- Smallman B.N. y Fisher R.W., Can. J. Biochem. and Physiol., 36, 575, 1958.
- 91.- O'Brien R.D., J. Econ. Entomol., 49, 484, 1956.
- 92.- Mengle D.C. y O'Brien R.D., Biochem J., 75, 201, 1960.
- 93.- Neubert D., Schaefer J. y Kewitz H., Naturwissenschaften, 45, 290, 1958.
- 94.- Hopf H.S., Ann. Appl. Biol., 41, 248, 1954.
- 95.- Tobias J.M., Kollross J.J. y Savit J., J. Cellular Comp. Physiol., 28, 159, 1946.
- 96.- Roeder K.D., Bull. Johns Hopkins Hosp., 83, 587, 1948.
- 97.- Augustinsson K.B. y Grahn M., Acta Physiol. Scand., 32, 174, 1954.
- 98.- Chefurka W. y Smallman B.N., Can. J. Biochem. and Physiol., 34, 731, 1956.
- 99.- Lord K.A. y Potter C., Nature 166, 893, 1950.
- 100.- Lord K.A. y Potter C., Ann. Appl. Biol., 38, 495, 1951.
- 101.- Molitor H., J. Pharmacol. Exptl. Therap., 58, 337, 1936.
- 102.- Metcalf R.L., Maxon M., Fukuto T.R. y March R.B., Ann. Entomol. Soc. Am., 49, 274, 1956.
- 103.- Van Asperen K., J. Insect Physiol., 3, 306, 1959.
- 104.- Van Asperen K. y Oppenoorth F.J., J. Entomol. Exptl. et Appl., 2, 48, 1959.
- 105.- Stegwee D., Nature 184, 1253, 1959.
- 106.- Tsuji S., Histochemistry 42, 99, 1974.
- 107.- Booth G.M. y Metcalf R.L., Science 170, 455, 1970b.
- 108.- Gomori G., Microscopic Histochemistry—Principles and Practice—Univ. of Chicago Press, Chicago, 1952.

- 109.- Jameson G.W., Mac Farlane J.R. y Hogan T.W., *Insect Biochem.*, 6, 59, 1976.
- 110.- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. y Featherstone R.H., *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88, 1961.
- 111.- Lineweaver H., y Burk D., *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658, 1934.
- 112.- Díaz Gómez M.I. y Castro J.A., *Biochem. Pharmacol.*, 20, 929, 1971.
- 113.- Hawkins R.D. y Gunter J.M., *Biochem. J.*, 40, 192, 1946.
- 114.- Hawkins R.D. y Mendel B., *Biochem. J.*, 44, 260, 1949.
- 115.- Koelle G.B., *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 100, 158, 1950.
- 116.- Aldridge W.N., *Biochem. J.*, 7, 451, 1950.
- 117.- Di Fiore M. *Diagnóstico Histológico*, tomo I, Ed. El Ateneo, Bs. As. 1974.
- 118.- Litchfield J.T. y Wilcoxon F., *J. Pharmacol. exp. Ther.* 96, 99, 1949.
- 119.- Weil C.S., *Biometrics*, Sept., 249, 1952.
- 120.- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J., *J. Biol. Chem.* 193, 265, 1951.
- 121.- Ann Silver, *The Biology of Cholinesterases—Frontiers of Biology*, 36, 59, 1974.
- 122.- Ammon R., *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 233, 486, 1933.
- 123.- Augustinsson K.B., en *Analysis of Biogenic amines and their related enzymes*, Glick D. ed., N.Y., Wiley, 217-269, 1971.
- 124.- Smith E.H., y Salkeld E.H., *J. Econ. Entomol.*, 58, 188, 1965.
- 125.- Michel H.O., *J. Lab. Clin. Med.*, 34, 1564, 1949.
- 126.- Limperos G. y Ranta K.E., *Science*, 117, 453, 1953.
- 127.- Augustinsson K.B., en *Assay Methods for Cholinesterases—Methods of Biochemical Analysis*, Glick D. ed., Interscience Publishers N.Y., 5, 1957.
- 128.- Jacobsen C.F., Léonis J., Linderstrøm-Lang K. y Ottesen M., en *Methods of Biochem. Analysis*, Glick D. ed., Interscience P., N.Y., 4, 171, 1957.
- 129.- Holmstedt B.O., *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 44, 99, 1971.
- 130.- Jensen-Holm J., Leusen H.H., Milthers K. y Møller Knud O., *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, 15, 384, 1959.
- 131.- Winteringham F.P.W. y Disney R.W., *Nature (Lond)*, 195, 1303, 1962.
- 132.- Lewis M.K. y Eldefrawi M.E., *Anal. Biochem.*, 57, 588, 1974.
- 133.- Reed D.J., Goto K. y Wang C.H., *Anal. Biochem.*, 16, 59, 1966.

- 134.- Prince A.K., *Biochem. Pharmacol.*, 15, 411, 1966.
- 135.- Cranmer M.F. y Peoples A., *J. Chromatog.*, 57, 365, 1971.
- 136.- Ann Silver, *The Biology of Cholinesterases—Frontiers of Biology*, 36, 63, 1974.
- 137.- Castro J.A. y Castro C.R., *Anales Asoc. Quim. Argentina*, 51, 223, 1963.
- 138.- Maheshwari U.R., Shirachi D.Y. y Trevor A.J., *Brain Res.*, 35, 437, 1971.
- 139.- Dawson R.M. y Crone H.D., *J. Neurochem.*, 21, 247, 1973.
- 140.- Heller M. y Hanahan D.J., *Biochim. Biophys. Acta*, 255, 251, 1972.
- 141.- Nachmansohn D., *Nature*, 145, 513, 1940 a.
- 142.- Takade D.Y., Thesis, Univ. de California, Riverside, 1973.
- 143.- Colhoun E.H., *Nature*, 189, 309, 1961.
- 144.- Herskovitz T.T., Gadegbeku B. y Jaillet H., *J. Biol. Chem.*, 245, 2588, 1970.
- 145.- Shatoury H.H., *J. Ins. Physiol.*, 9, 165, 1963.
- 146.- Aldridge W.N. y Johnson M.K., *Biochem. J.*, 73, 270, 1959.
- 147.- Nathan P. y Aprison M.H., *Fed. Proc.*, 14, 106, 1955.
- 148.- Toshi G., *Exp. Cell. Res.*, 16, 232, 1959.
- 149.- De Robertis E., en *Binding Sites of Brain Biogenic Amines*, editado por Himwich H.E. y Himwich W.A., *Prog. Brain Res.*, Elsevier Amsterdam, 8, 1964 .
- 150.- Whittaker V.P., *ibid*
- 151.- Koelle G.B., *J. Pharm. Pharmacol.*, 14, 65, 1962.
- 152.- Ord M.G. y Thompson R.H.S., *Biochem. J.*, 49, 191, 1951.
- 153.- Dewald B., Dulaney J.T. y Touster O., en *Methods in Enzimology*, XXXII, part B, 82, 1974 .
- 154.- Jackson R.L. y Aprison M.H., *J. of Neurochem.*, 13, 1367, 1966.
- 155.- Sihotang K., *Eur. J. Biochem.*, 63, 519, 1976.
- 156.- Hardwicke P.M.D. y Green M.N., *Eur. J. Biochem.*, 42, 183, 1974.
- 157.- Mitchell C.D. y Hanahan D.J., *Biochemistry*, 5, 51, 1966.
- 158.- Grafius M.A., Bond H.E. y Miller D.B., *Eur. J. Biochem.*, 22, 382, 1971.
- 159.- Metcalf R.L. y Frederickson H., *J. Econ. Entomol.*, 58, 143, 1965.
- 160.- Metcalf R.A. y Metcalf R.L., *Pest Biochem. Physiol.*, 3, 149, 1973.
- 161.- Vinopal J.H. y Fukuto T.R., *Pest. Biochem. Physiol.*, 1, 44, 1971.
- 162.- Hollingworth R.M., Fukuto T.R. y Metcalf R.L., *J. Agric. Food Chem.*, 15, 235, 1967.
- 163.- Zerba E.N. y Fukuto T.R., *J. Agric. Food Chem.*, enviado para su publicación, 1978.

- 164.- Metcalf R.L., March R.B., y Maxon W.G., *Ann. Ent. Soc. Am.*, 48, 222, 1955.
- 165.- Winteringham F.P.W., y Disney R.W., *Biochem. J.*, 91, 506, 1964.
- 166.- Wood E.J., Malkenson D., Picollo M.I., Zerba E.N., de Licastro S.A. y Ruvda M.A., *Bioquímica Clínica*, IX, 77, 1975.
- 167.- Huany C.T., y Dauterman W.C., *Insect Biochem.*, 3, 325, 1973.
- 168.- Lee A.H., Metcalf R.L. y Kearns C.W., *Insect Biochem.*, 4, 267, 1974.
- 169.- Lord K.A., *Biochem. J.*, 18, 483, 1961.
- 170.- Guibault G.G., Kuan S.S. y Sader M.K., *J. Agric. Food Chem.*, 18, 692, 1970.
- 171.- Metcalf R.L., *Bull. W.H.O.*, 44, 117, 1971.
- 172.- Holmes R.S. y Masters C.J., *Biochem. Biophys. Acta*, 132, 379, 1967.
- 173.- Boyer A.C., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 43, 475, 1978.
- 174.- Hooper G.H.S., *Insect Biochem.*, 6, 255, 1976.
- 175.- Hellebrand K., *J. Agr. Food Chem.*, 15, 825, 1967.
- 176.- Stegwee D., *Physiol. comp.*, 2, 241, 1951.
- 177.- Bergmann F., Rimon S., y Segal R., *Biochem. J.*, 68, 493, 1958.
- 178.- Archer T.E. y Gunter Zweig, *J. Agr. Food Chem.*, 7, 178, 1959.
- 179.- Haites N., Don M. y Masters C.J., *Comp. Biochem. Physiol.*, 42B, 303, 1972.
- 180.- Booth G.M. y Metcalf R.L., *Ann. Entomol. Soc. America.*, 63, 197, 1970.
- 181.- Grafius M.A., Friess S.L. y Millar D.B., *Arch. Biochem. Biophys.*, 126, 707, 1968.
- 182.- Wright D.L. y Plummer D.T., *Biochem. J.*, 133, 521, 1973.
- 183.- Hollunger E.G. y Niklasson B.H., *J. Neurochem.*, 20, 821, 1973.
- 184.- Massoulié J., Bon S., Rieger F. y Vigny M., *Croatia Chemica Acta*, 47, 163, 1975.
- 185.- O'Brien R.D., Hertzarski B., Tripathi R.K., y Hart G.J., *Mechanism of Pesticide Action*, G.K. Kohn ed., ACS Symposium series 2, pag 5, 1974.
- 186.- Brattsten L.B. y Metcalf R.L., *Pesticide Biochem. and Physiol.*, 3, 189, 1973.
- 187.- O'Brien R.D., *Toxic Phosphorus esters*, Acad. Press, N.Y., 241-257, 1960.
- 188.- Mengle D.C. y Casida J.E., *J. Econ. Entomol.*, 51, 750, 1958.
- 189.- Hopf H.S. y Taylor H.T., *Nature* 182, 1381, 1958.
- 190.- Stegwee D., *Nature* 184, 1253, 1959.
- 191.- van Asperen K., *Nature*, 181, 355, 1958.

- 192.- Litter M., *Farmacología*, 4ª edición, Ed. El Ateneo, Bs. As., 525, 1973.
- 193.- Plepp F.W. y Bigley W.S., *J. Econ. Entomol.*, 54, 103, 1961.
- 194.- Zettler J.L. y Brady U.E., *Pesticide Biochem. Physiol.*, 5, 471, 1975.
- 195.- Uk S. y Himel Ch.M., *J. Agr. Food Chem.*, 20, 638, 1972.
- 196.- Ashraf M., *Pakistan J. of Scientific Res.*, 15, 138, 1963.
- 197.- Richards Jr. y Cutkomp L.K., *J. New York Ent. Soc.*, 53, 313, 1945.
- 198.- Sanborn J.R. y Fukuto T.R., *J. Agr. Food Chem.*, 20, 926, 1972.
- 199.- Fukuto T.R. y Metcalf R.L., *J. Agr. Food Chem.*, 4, 930, 1956.
- 200.- Fukuto T.R. y Metcalf R.L., *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 372, 1959.