

Tesis de Posgrado

Actividad esterásica de tegumento y penetración de insecticidas fosforados en *Triatoma infestans*

Fontan, Andrea Adriana

1985

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

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

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

Cita tipo APA:

Fontan, Andrea Adriana. (1985). Actividad esterásica de tegumento y penetración de insecticidas fosforados en *Triatoma infestans*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1881_Fontan.pdf

Cita tipo Chicago:

Fontan, Andrea Adriana. "Actividad esterásica de tegumento y penetración de insecticidas fosforados en *Triatoma infestans*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1881_Fontan.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ACTIVIDAD ESTERASICA DE TEGUMENTO Y PENETRACION DE INSECTICIDAS

FOSFORADOS EN *TRIATOMA INFESTANS*

ANDREA A. FONTAN

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Tesis.
1881
p. 3.

1985

Quiero agradecer muy especialmente al Dr. Eduardo Nicolás Zerba, Director de esta Tesis, por haberme orientado en el conocimiento de esta disciplina nueva para mí y quien con su constante apoyo en lo académico y lo humano, hiciera posible la realización de este trabajo en un clima de solidaridad y compañerismo.

Agradezco

Al Señor Daniel Bazán por su enorme colaboración en la escritura a máquina de este trabajo, consecuencia de su compañerismo y amistad. A los Dres. Edgardo Wood, Norma Casabé, María Inés Picollo y Susana Arnstein de Licastro por su colaboración en algunos de los experimentos realizados, por lo que cada uno me enseña cotidianamente y por su amistad.

A la Sra. Susana de Segovia, quien cuida de nuestro insectario, por el apoyo maternal que siempre me brindó.

Al Señor Fernando Melgar Suarez y al Licenciado Guillermo Wallace por el humor y el afecto con que matizaron estos años.

Al Dr. Julio Azcurra por su labor como Consejero de Estudios. Al Dr. José Alberto Castro, por haber colaborado con las instalaciones de su laboratorio.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a CITEFA, instituciones a las que pertenece el Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas, lugar donde desarrollo mis actividades en especial al CONICET ya que a través de sus becas se concretó este trabajo.

A las siguientes instituciones: Organización Mundial de la Salud (a través de su UNPD/World Bank/WHO Programme for Research and Training in Tropical Diseases); SECYT (a través de su Programa Nacional de Enferme-

dades Endémicas); Gobierno de Japón (a través de su Agencia Internacional de Cooperación Técnica, J.I.C.A.).

A mi esposo, el Ingeniero E. Marcelo Rodriguez Chatruc, por su continua ayuda para la realización de este trabajo y por su respeto y confianza en lo que hago.

Finalmente debo agradecer a mi familia, a mis padres, aunque ausentes a quienes les debo mucho de lo que soy y en especial a mis tíos y mi hermana por el incalculable valor de su solidaridad y su cariño en los momentos más difíciles.

ABREVIATURAS

•

ATC = Acetiltiocolina.

BTC = Butiriltiocolina.

C 400 = Carbowax 400.

C 600 = Carbowax 600.

C 4000 = Carbowax 4000.

C 20M = Carbowax 20M.

HVI - 95 = Aceite parafínico mineral HVI-95.

220 - 280 = Fracción de bajo punto de ebullición del anterior.

JH = Hormona juvenil.

LD₅₀ = Dosis letal 50.

LD₉₀ = Dosis letal 90.

LD₉₅ = Dosis letal.

α - NA = Acetato de α-naftol.

O.P. = Organofosforados.

S.N.C. = Sistema Nervioso Central.

PTA = Acetato de tiofenol.

INDICE.

INTRODUCCION.

I - Tegumento.	
Ia - Estructura.	1.
Ib - Actividad enzimática en tegumento.	
Ib.1 - Metabolismo de compuestos endógenos.	5.
Ib.2 - Metabolismo de insecticidas.	6.
Ib.3 - Actividad esterásica.	8.
II - Penetración de insecticidas.	
IIa - Mecanismo de ingreso de insecticidas de contacto.	11.
IIb - Sitios de penetración.	16.
IIc - Cinética de penetración.	18.
IIId - Parámetros que condicionan la velocidad de penetración.	24.
Objetivos de este trabajo.	30.
El <i>Triatoma infestans</i> y la Enfermedad de Chagas.	32.
MATERIALES Y METODOS.	
Material biológico.	34.
Actividad esterásica en tegumento.	
Disecciones.	34.
Procedimiento histológico.	35.

Preparación de homogenatos. ●	35.
Sustratos e inhibidores.	36.
Determinaciones enzimáticas.	37.
Electroforesis.	37.
Degradación de compuestos fosforados.	39.
Cinética y mecanismo de penetración de organofosforados. Efecto de carriers.	
Reactivos utilizados.	
Material radiactivo.	40.
Material no radiactivo.	41
Cinética de penetración.	41.
Estudios autorradiográficos.	43.
Estudios histológicos.	44.
 RESULTADOS Y DISCUSION.	
I - Actividad esterásica.	
Ia - Estructura del tegumento.	45.
Ib - Actividad esterásica. Localización.	50.
Ic - Actividad esterásica. Influencia de la edad.	50.
Id - Actividad esterásica. Influencia del ayuno.	53.
Ie - Caracterización de la actividad esterásica.	54.
 II - Degradación de compuestos fosforados.	59.
IIa - Paratión.	59.

I Ib - Malatión.	61.
I Ic - Características de las esterasas que degradan fosforados	63.
I Id - Relevancia de la detoxificación tegumental.	63.
III - Sitios de penetración.	
IIIa - Estudios autorradiográficos en insectos adultos.	65.
IIIb - Estudios autorradiográficos en ninfa V.	70.
IIIc - Estructura del tegumento de adultos.	70.
IIId - Estructura del tegumento de ninfa V.	74.
IIIe - Correlación entre estudios autorradiográficos e histo- lógicos.	74.
III f - Cinética de penetración.	76.
IV - Efecto de carriers.	78.
IVa - Efecto de la dosis de carrier sobre la velocidad de pe- netración.	78.
IVb - Efecto de la polaridad y viscosidad del carrier sobre la velocidad de penetración.	78.
IVc - Cinética de penetración de ¹⁴ C-carriers.	80.
IVd - Estudios autorradiográficos de distribución.	
1) ¹⁴ C-carriers.	83
2) ¹⁴ C-malati3n + carriers.	88.
V - Resumen y Conclusiones.	94
BIBLIOGRAFIA.	98.

INTRODUCCION

I.- TEGUMENTO

Ia.- Estructura

El cuerpo de un insecto se encuentra recubierto por una estructura que actúa a manera de exoesqueleto, denominada tegumento.

El tegumento, dadas sus propiedades, y por ser la estructura más externa del cuerpo cumple variadas funciones de alta importancia para la vida del insecto. Entre ellas se cuenta: mantener la forma del cuerpo y actuar como barrera para la pérdida de agua y la entrada de organismos patógenos. Por su rigidez es resistente a la abrasión, aunque presenta zonas flexibles que permiten el movimiento en puntos de articulación. Las capas más internas sirven como reservorio de sustancias alimenticias durante el ayuno y la muda. Forma estructuras sensoriales y respiratorias (tráqueas). Finalmente, dada su ubicación estratégica, se considera al tegumento el primer punto de interacción con ciertas sustancias tóxicas, como por ejemplo, un insecticida de contacto (1).

El tegumento se encuentra formado por una cutícula externa (acelular) y una epidermis simple subyacente (Figura 1).

La epidermis es la encargada de la secreción de los componentes cuticulares durante la muda, así como de la resorción de la vieja cutícula. Está formada por un epitelio simple, en general cilíndrico o cúbico, cuya morfología varía según la actividad celular. Las células epidérmicas emiten proyecciones citoplasmáticas, contenidas dentro de los canales de po-

ro, que atraviesan endo, exocutícula y cuticulina. Se acepta que el depósito de cera de la cutícula se realiza a través de estos canales.

Dentro de la epidermis existen células diferenciadas con funciones específicas como son: glándulas dermales, que emiten finos conductos a través de la cutícula y secretan la capa de cemento de la epicutícula; oenocitos, que se encuentran adosados a la cara basal del epitelio y pueden ser transportados al cuerpo graso; células tricógenas que forman setas o pelos y células tormógenas que envuelven a las anteriores y permiten la articulación de la seta. (2) . Además, ha sido descrito otro tipo de células. denominadas células tendón, encargadas del anclaje de la cutícula a la epidermis. (3) .

Por debajo de la epidermis aparece una membrana basal delgada.

La cutícula se considera formada por varias capas, de acuerdo con diferencias en composición y funciones: la epicutícula (externa) y la procutícula (interna) .

La epicutícula se subdivide a su vez en tres subcapas, que del exterior al interior son:

- capa de cemento: formada por proteínas polimerizadas por puentes hidroquinónicos (proteínas curtidas) que le dan coloración.

- capa de cera : de composición variable según las especies, pero en general formada por hidrocarburos, ácidos grasos libres, ésteres de n-alcoholes y ácidos saturados e insaturados y colesterol libre. Dentro de es-

ta capa existe una zona denominada de lípidos orientados formada por una mono o bicapa lipídica bien ordenada. Dada su gran hidrofobicidad, esta capa evita la pérdida de agua y por lo tanto, la desecación.

-cuticulina: formada por lipoproteínas polimerizadas. Es resistente a degradación enzimática, por ácidos minerales y solventes orgánicos. Es además coloreada.

La procutícula es la capa más prominente dentro de la cutícula. Representa la cutícula "quitinosa", dado que en su composición aparece fundamentalmente quitina, polímero de acetilglucosamina. Sin embargo, dentro de la procutícula aparecen dos subcapas denominadas exo y endocutícula, con diferente proporción de quitina cada una. Por ejemplo, la endocutícula de Periplaneta posee un 60 % de quitina respecto de su peso seco, mientras que la exocutícula sólo contiene un 22% (2). En general, la endocutícula presenta un contenido mayor de quitina respecto de la exocutícula.

El material no quitinoso de la procutícula es proteico. Sin embargo existen diferencias cualitativas entre las proteínas de exo y endocutícula. En el caso de la exocutícula se trata de una proteína curtida denominada esclerotina. Esta proteína se forma durante el proceso de esclerotización de las capas externas de la procutícula, posterior a la muda. Durante este proceso se generan enlaces covalentes en los cuales el N de grupos $-NH_2$ y el S de grupos $-SH$ de las cadenas proteicas se unen a núcleos aromáticos quinónicos. Dado que esta reacción ocurre con grupos hidrofílicos, la cutícula, luego de la esclerotización, es menos hidrofílica, es decir que la exocutícula es una estructura menos hidrofílica que la endo-

cutícula (4).

El alto contenido de quitina y la ausencia de esclerotización hacen a la endocutícula una estructura elástica. La exocutícula por su bajo contenido en quitina y su alto grado de esclerotización aporta al tegumento su rigidez característica.

Ib.- Actividad enzimática en tegumento.

Ib 1.- Metabolismo de compuestos endógenos

El tegumento de los insectos es bioquímicamente activo. Esta actividad se relaciona, en su mayor parte, con los procesos de resorción, síntesis y esclerotización de la cutícula. Como ejemplo, podría citarse que han sido descritas quitinasas que aparecen durante la muda y durante períodos de intermuda (3). En el fluido de muda, sintetizado al menos en parte por las células epidérmicas, aparecen proteasas encargadas de degradar proteínas de endocutícula (5) (6). Se conocen varias polifenoloxidasas, presentes en distintas especies, de localización variable dentro del tegumento, que intervienen en el proceso de esclerotización (4).

La actividad metabólica del tegumento no está restringida a los períodos de muda únicamente. Se sabe que, tanto el depósito de endocutícula como su resorción pueden ocurrir fuera de períodos de muda. En particular puede relacionarse con factores alimentarios, como es el caso para Hemípteros hematófagos del género *Rhodnius* en los cuales hay un depósi-

to adicional de endocutícula luego de la ingesta y una resorción asociada con el ayuno (1).

Se han detectado esterasas en el tegumento en relación con la síntesis de la capa cerosa y su reparación. Dependiendo de la especie, pueden aparecer en epidermis, procutícula o epicutícula. En cutícula, en general se asocian con los canales de poro que, se considera pueden transportar los componentes de la capa de cera o sus precursores (7) (8) (13).

Existen esterasas tegumentales, como las descubiertas en antenas, patas y alas de *Trichoplusia ni*, capaces de degradar feromonas. Su función sería prevenir la acumulación de estas hormonas en la superficie del insecto (12).

Ib 2.- Metabolismo de insecticidas.

Además de la actividad enzimática relacionada con la degradación y síntesis de compuestos endógenos, existen en el tegumento enzimas capaces de metabolizar sustancias exógenas. Esto no es sorprendente si se considera que el tegumento es la primera barrera defensiva en la interacción del insecto con el medio ambiente. En particular, han sido citados ejemplos de metabolismo degradante, así como activante de insecticidas de contacto. Sternburg y Kearns (9) descubrieron transformación de DDT a DDE por la cutícula de langosta. Quraishi informó una conversión

similar por el tegumento de pupa de mosca (10). Ahmed y Gardiner supusieron una activación de malatión a malaoxón (metabolito tóxico) por el tegumento de *Schistocerca gregaria* (11) como causa de una sintomatología más típica de envenenamiento al aplicar el insecticida por tópico respecto de por inyección.

Un caso particular de degradación a nivel del tegumento es el observado en *Calliphora erythrocephala* en relación con el metabolismo del ¹⁴C-dieldrin. En sus primeros trabajos (14) Singh observó, luego de analizar los productos obtenidos en el lavado con acetona, que una parte del dieldrin topicado es degradado a nivel de las ceras epicuticulares. Sin embargo, la naturaleza de los metabolitos obtenidos fue diferente de la que se detectó dentro del insecto. Esto llevó a suponer la posible contribución de otros organismos en este metabolismo, en particular de la microflora bacteriana del tegumento. Estudios posteriores (14 bis) de caracterización de la microflora y utilizando antibióticos específicos como pretratamiento de las moscas topicadas, permitieron corroborar el rol, al menos parcial de estos microorganismos en el metabolismo cuticular del dieldrin.

Resumiendo, podría decirse que el tegumento es una estructura con capacidad metabolizante de compuestos endógenos, de feromonas y de compuestos exógenos, como por ejemplo, insecticidas. A esta actividad contribuyen enzimas intrínsecas del insecto, así como, en algunos casos en

zimas producidas por microorganismos de la flora tegumental.

Ib 3.- Actividad esterásica.

Las esterases son enzimas que hidrolizan ésteres, con la adición de H₂O para dar alcoholes o fenoles y ácidos (15).



Ha existido en general gran confusión para definir el status de las esterases. Esto se debe a la gran diversidad y baja especificidad de sus tratos hidrolizados por estas enzimas, lo que dificulta su clasificación.

Un intento de clasificación según el tipo de sustrato hidrolizado es el de Gomori (18). Según este autor, las esterases pueden dividirse en dos grandes grupos:

Aliesterasas: hidrolizan ésteres de alcoholes libres de nitrógeno. Incluye las lipasas que hidrolizan grasas y aceites y las esterases propiamente dichas, que actúan sobre ésteres simples.

Colinesterasas: hidrolizan preferentemente ésteres de colina; acetilcolina las colinesterasas verdaderas y butirilcolina las llamadas pseudo-colinesterasas

Sobre la base de su comportamiento frente a inhibidores O.P., Aldridge (19) (20) distingue dos tipos de enzimas con actividad esterásica:

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

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

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

Holmes y Masters (21) clasifican a las esterasas en cuatro grupos, según sus reacciones características con una variedad de inhibidores y sustratos:

Arilesterasas: hidrolizan preferentemente ésteres aromáticos y no son inhibidas por O.P. ni por eserina, pero sí por reactivos de grupos -SH como el p-cloromercuribenzoato.

Carboxiesterasas: hidrolizan preferentemente ésteres alifáticos y no son inhibidas por eserina pero sí lo son por O.P..

Colinesterasas: actúan sobre ésteres de colina a mayor velocidad que sobre ésteres alifáticos y aromáticos, y son inhibidas por O.P. y eserina.

Acetilesterasas: hidrolizan ésteres aromáticos, pero no son inhibidas por O.P., eserina o reactivos de grupos -SH.

Hasta el momento, la clasificación de Holmes y Masters parece ser la más precisa.

Los insecticidas de uso más corriente en la actualidad son los denominados "insecticidas de segunda generación". Se reconocen cuatro grupos: organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroideos. Organofosforados, carbamatos y piretroideos son susceptibles de ser atacados por estererasas, por contener en su molécula uno o más grupos éster.

El ataque por estererasas conduce, en general a productos menos tóxicos, así como más hidrosolubles, por lo tanto más fácilmente excretables. Es decir, estas enzimas intervienen en la detoxificación del compuesto.

Por otra parte, las estererasas pueden regular fenómenos tales como la selectividad insecto-mamífero (como fue demostrado por Krueger y O'Brien para el malatión (16)) o resistencia (17).

A nivel del tegumento, como ya se citara, han sido desciptas estererasas, pero no se ha demostrado su intervención en el metabolismo de insecticidas.

II.- PENETRACION DE INSECTICIDAS.

IIa.- Mecanismo de ingreso de insecticidas de contacto.

En la interacción de un insecto con un insecticida, la penetración es el primer paso toxicocinético que condiciona la cantidad de compuesto capaz de alcanzar el sitio de acción. A pesar de la importancia de este proceso, no ha sido dilucidado aún en forma concluyente el mecanismo por el cual un insecticida penetra al medio interno del insecto.

Existen dos teorías que explicarían el proceso de penetración. La generalmente más aceptada, asume que la penetración ocurre a través del tegumento. La hemolinfa recibe el compuesto y lo transporta dentro del organismo, en particular, hasta su sitio de acción.

Polles y Vinson determinaron la velocidad de penetración del endrin a través del tegumento aislado de *Heliothis virescens* en contacto con hemolinfa. Encontraron velocidades semejantes a las determinadas "in vivo" y además la cantidad de insecticida penetrado a 24 hs., excedió la necesaria por inyección para producir sintomatología (35).

Burt y Lord (36) y Burt et al (37) establecieron que la hemolinfa de cucarachas (*P. americana*) tratadas por tópico con una LD₉₀ de diazoxón ó una LD₉₅ de piretrina I contiene suficiente cantidad de insecticida para explicar los disturbios observados en el SNC.

Según esta teoría y considerando la heterogeneidad del tegumento, un

insecticida aplicado sobre la cutícula entraría en contacto con la capa cerosa, para luego alcanzar la procutícula, más polar y de allí la hemolinfa.

La penetración estará entonces regulada por fenómenos de partición y dependerá de la polaridad del compuesto que penetra, como fuera observado por Olson y O'Brien (22). Estos autores encontraron una correlación inversa entre lipofilicidad del compuesto y velocidad de penetración cuando los insecticidas se topican en acetona, solvente que introduce el compuesto dentro de la capa cerosa. Por otra parte, cuando se trata de soluciones acuosas existe una relación directa entre lipofilicidad y velocidad de penetración (23). En este caso el fenómeno limitante sería la partición entre fase acuosa-capacerosa.

La segunda teoría, sustentada principalmente por Gerolt (24) (25) (26) (27), sugiere que el insecticida aplicado por tópico se mueve lateralmente en el tegumento y alcanza su sitio de acción (SNC) vía el sistema traqueal. Este sistema es continuo con el tegumento y alcanza todos los tejidos del insecto permitiendo el intercambio gaseoso. Existen observaciones que avalarían esta teoría, aunque en general, la interpretación de las mismas puede considerarse ambigua y no compartida por la mayoría de los autores que han trabajado en el tema.

Gerolt (24) observó que los tiempos de volteo para moscas topicadas con dieldrin o dichlorvos son menores si la topicación se realiza cerca del SNC que si se realiza lejos del SNC. Esto podría explicarse considerando un transporte por tráquea, antes que por hemolinfa si se asume que el flujo por hemolinfa es suficientemente rápido. Sin embargo, mu-

chos son los factores que podrían intervenir determinando estas diferencias en tiempo de volteo y no necesaria y únicamente la distancia de migración superficial durante la penetración del compuesto.

En otro de sus experimentos, Gerolt (24) demostró que el tiempo de volteo no se ve afectado por la inyección de aceite de oliva en la hemolinfa previa a la penetración de dieldrin, DDT, metil-paratión o chlorfenvinphos. Esta observación argumentaría en contra de la hemolinfa como transportadora de estos xenobióticos, suponiendo una mayor afinidad de estos insecticidas liposolubles por el aceite de oliva, respecto de la hemolinfa acuosa. Sin embargo, Olson (28) demostró que la hemolinfa (en contraste con el agua) compete favorablemente por el dieldrin con el aceite de oliva. La presencia de proteínas "carrier" en la hemolinfa justifica las diferencias observadas con soluciones acuosas diferentes de la hemolinfa.

Si los insecticidas son transportados al sitio de acción por la hemolinfa, es dable esperar que un bloqueo en su circulación produjera diferencia en su tiempo de acción. Gerolt testeó ésto realizando una ligadura a nivel de la "cintura", lo que reduce notablemente la circulación de la hemolinfa. La inexistencia de diferencias significativas en el tiempo de volteo, al topicar en abdomen, respecto de los controles fue considerada una prueba en detrimento del papel transportador de la hemolinfa. Sin embargo, ésto puede aceptarse sólo en el caso en que el flujo por hemolinfa fuera el paso limitante en la toxicocinética del compuesto. En

relación con ésto Yeager y Munson (29) observaron que la cauterización del vaso dorsal inhibe la aparición de síntomas de intoxicación por DDT en cucarachas.

Los experimentos anteriormente citados pretenden desestimar el rol de la hemolinfa en el transporte de xenobióticos. Otros experimentos intentan apoyar el transporte lateral por tegumento y lastráqueas como vía de ingreso:

Larvas de moscas expuestas a dieldrin radiactivo acumularon este compuesto especialmente en tráqueas respecto de otros órganos como tubo digestivo, cuerpo graso, túbulo de Malpighi y hemolinfa. Resultados semejantes fueron obtenidos por Matsumura (30) con *Periplaneta americana* y malatión. En este caso, la mayor actividad específica también correspondió a las tráqueas. Sin embargo, otros investigadores no lograron detectar acumulación en tráqueas luego de la aplicación por tópico de varios insecticidas sobre moscas adultas (31)(32)(33).

Uno de los estudios más concluyentes realizados por Gerólt se refiere a sus experimentos con moscas a las que se les colocó un anillo de cera alrededor de la "cintura". Este anillo actuaría como sumidero de insecticidas en su migración lateral aunque no debería alterar mayormente el ingreso a través del tegumento. Estas moscas topicadas en el abdomen fueron insensibles a dieldrin, mientras que el tópico en el tórax donde aparecen los espiráculos, poros de ingreso de las tráqueas, no mostró diferencias con las moscas control. Resultados semejantes fueron observada

dos con *Blatella germanica* siempre que los espiráculos abdominales fueran sellados (34).

Se ha podido demostrar por otra parte, difusión lateral de methomyl aplicado por tópico sobre el abdomen de mosca, y recuperado en tórax (34).

Podrían citarse muchos otros experimentos capaces de avalar con mayor o menor grado de certidumbre alguna de las dos teorías. Sin embargo, ninguno es suficientemente concluyente como para desechar totalmente la teoría opuesta.

Probablemente, ambas teorías representen una sobresimplificación del mecanismo y no sean en realidad tan antagónicas y excluyentes como han sido consideradas durante mucho tiempo.

Los resultados obtenidos hasta el momento avalan con mayor fuerza el ingreso a través del tegumento, en tanto que la difusión lateral del com puesto aumenta la superficie de intercambio, favoreciendo por lo tanto la penetración. Por otra parte, considerando la continuidad estructural del tegumento traqueal con el del resto del cuerpo del insecto, esta difusión lateral podría permitir el ingreso a través de tráqueas como mecanismo secundario.

Las pruebas experimentales aportadas por Gerolt resultan en muchos casos ambiguas y encontradas con las citadas por otros autores, y no permiten suponer que su teoría explique el mecanismo principal de ingreso. En cambio, una interpretación más global del fenómeno, considerando las semejanzas estructurales entre tráqueas y el resto del tegumento permi-

ten considerarla un mecanismo accesorio al ingreso a través del tegumento con transporte por hemolinfa.

I Ib.- Sitios de penetración

El tegumento no es uniformemente permeable en toda su extensión. Por el contrario, varios autores han informado de la existencia de estructuras tegumentarias de permeabilidad diferencial aumentada. Entre ellas figuran: sensilias, membrana articular de la base de la sensilia, conjuntivas y canales de poro.

Las sensilias tarsales que aparecen en ciertas moscas adultas y abejas parecen ser el punto de ingreso facilitado, que las hace más sensibles a residuos de tóxicos, en relación con otros géneros que no las poseen como *Epilachna* y *Oncopeltus*. La cutícula que cubre la sensilia es más delgada que la del resto del tegumento. Probablemente ésta sea la causa de su mayor permeabilidad (60).

A nivel de las membranas articulares que rodean la base de la sensilia, el citoplasma de la célula epidérmica subyacente se encuentra casi en contacto con el exterior. Esto las haría especialmente permeables, como fue demostrado por Wilcoxon y Hartzell (60).

Ciertos autores consideran estas estructuras los únicos puntos de ingreso del insecticida. Tal es el caso de Wigglesworth (61) quien postula que sensilias, membranas articulares y conjuntivas son los únicos porta-

les de ingreso en *Rhodnius* adulto y estadios ninfales avanzados, mientras que para períodos inmediatamente post-muda la penetración sería generalizada en todo el tegumento. Sin embargo, aún cuando existan puntos de ingreso favorecido, no necesariamente debe suponerse que éstos sean los únicos portales de ingreso. Sería más aceptable pensar en términos de una penetración diferencial a través de estas zonas.

Los canales de poro y las glándulas dermales también han sido considerados puntos preferenciales de ingreso. Sin embargo, no puede generalizarse este hecho, ya que existen especies altamente sensibles a insecticidas de contacto como las larvas mosquitos, cuya cutícula no presenta canales de poro. Algo semejante ocurre con el ácaro *Tetranychus urticae* Koch descrito por Gibbs y Morrison (60).

Originariamente algunos autores interpretaron la importancia de estos canales en relación con la penetración de soluciones acuosas pero no de aceites o sustancias liposolubles (60). Sin embargo, hoy se sabe que los canales de poro están atravesados por filamentos de cera y no parece existir ningún obstáculo para el pasaje de sustancias no polares, sino por el contrario éste se vería favorecido (1).

En líneas generales, podríamos decir que existen en el tegumento estructuras que, por sus características de composición química y/o disposición, ofrecen menor resistencia al ingreso de insecticidas a través su yo.

•
IIc.- Cinética de penetración.

La cuantificación del proceso de penetración requiere una expresión cinética del mismo. Esta cuantificación generalmente se realiza asumiendo que el tóxico penetra a través del tegumento y es transportado por la hemolinfa.

El método más común implica topicar el insecto con una determinada cantidad del tóxico radiactivo y realizar luego a diferentes tiempos, la vados externos con un solvente como acetona, metanol o hexano para deter minar la cantidad de compuesto remanente en el "exterior". En realidad, estos solventes remueven la capa de cera epicuticular, con lo cual, lo que en realidad se mide es la penetración hacia las capas internas del tegumento (38).

La cinética de penetración a través del tegumento podría en ciertos casos predecirse por la ley de difusión de Fick, lo que conduciría a con siderar la penetración como una reacción de primer orden (38). Podría re cordarse que una reacción de primer orden es aquella cuya velocidad es pro porcional a la concentración de un único reactivo (39).

Esto se muestra en la ecuación (1)

$$\text{Ec (1) } \frac{-dc}{dt} = k \cdot C \quad \text{en la que } C \text{ es la cantidad de com}$$

puesto remanente en el exterior a un tiempo t y k es la constante de pe netración en las condiciones definidas para la determinación.

$$[k] = t^{-1}$$

Si se acepta que k es independiente de C y que no existe transporte inverso hacia el exterior la integración de la ecuación (1) lleva a la siguiente expresión:

$$\ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = -kt \quad \text{Ec (2)}$$

en la que C_0 es la cantidad de compuesto aplicado originalmente (38).

Graficando el \ln de la fracción de insecticida remanente en el exterior vs t se obtiene una recta de pendiente $-k$. El $T_{1/2}$ definido como el tiempo necesario para que la cantidad de tóxico en el exterior originalmente topicado se reduzca a la mitad es, entonces: (40)

$$T_{1/2} = 0.693/k \quad \text{Ec (3)}$$

En muchos casos, las curvas experimentales obtenidas son rectas y pueden explicarse sin problemas en los términos antes mencionados. Es el caso del DDT en cucarachas Madeira o del dieldrin, dimetoato y paraoxón para *P. americana* (41) determinados por Olson y O'Brien. (figura 2a). Buerger (40), por otra parte, desarrolló un modelo teórico para explicar estas cinéticas lineales. En su modelo, considera al tegumento formado por una serie de comportamientos arbitrarios, paralelos entre sí. En cada uno de ellos la velocidad de transporte es proporcional a su concentración. Asume además, que todos los comportamientos, excepto los extremos externo e interno se encuentran en estado estacionario y que la concentración dentro del insecto es despreciable, de tal modo que el trans-

% Externo

*inf. de la muestra
a medida
temperatura ambiente*

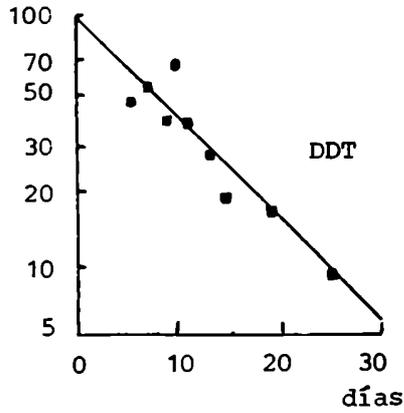


Figura 2a *pertharion marginatus*
ley 504 b

% recuperado
de las dosis
aplicadas

2,3-dimetilbenzil-(±)- cis-trans-crisantemato

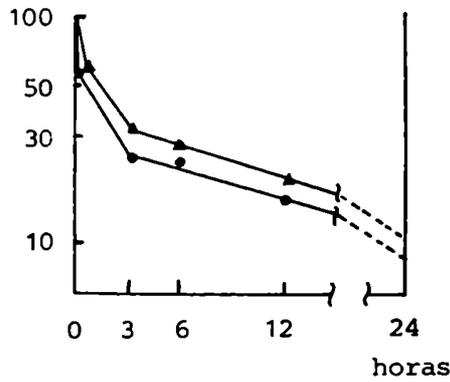


Figura 2b

- ▲ "Wash-off" con hexano
- "Wash-off" con metanol

pertharion marginatus
 → 1º etapa se extrae y se repone →
 acumula el compuesto en la cutícula (asoc.)
 e parte de ella extraída con H₂O o H₂O₂
 - 2º etapa se cumple la ley de first

% recuperado
de las dosis
aplicadas

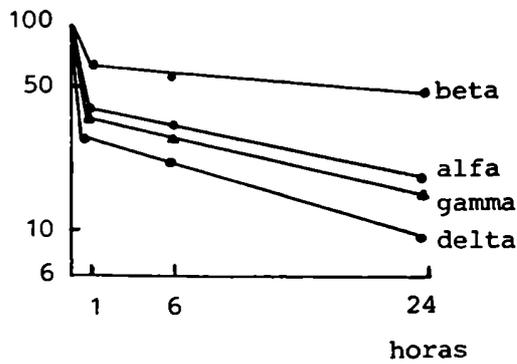


Figura 2c *pertharion marginatus*

porte inverso desde el interior del insecto hacia el exterior también lo sea. Esta última consideración sólo sería posible en el caso de un metabolismo muy activo del compuesto. Por otra parte Olson (45) demostró difusión inversa de DDT en *P. americana*.

En otros estudios se obtienen curvas de penetración bifásica, o incluso más complejas. Podría citarse lo observado en *Phaedon cochleariae* con piretroideos (42) o en *Periplaneta americana* con los isómeros del HCH (43) (figura 2, b y c).

Varias son las interpretaciones que se han dado para cinéticas de penetración no rectas. Matsumura (44) encuentra una curva bifásica para la penetración de malatión en *P. americana*. A través de sus estudios demuestra una primera etapa de penetración rápida, asociada con una acumulación del compuesto en cutícula. Este malatión es capturado por proteínas de cutícula extraíbles con agua a 90°C. Descontando este primer paso de absorción, la penetración puede explicarse en los términos de la ley de Fick.

Olson (45) explica la penetración multifásica del DDT en *P. americana*, asumiendo que no se trata de una simple función de primer orden, sino de un agregado de eventos de primer orden que ocurren como consecuencia de la heterogeneidad estructural del tegumento.

Welling (40) propone un modelo de 2 compartimientos cuticulares para explicar la cinética de penetración de insecticidas a través del tegumento (figura 3). El primer compartimiento representa la parte más externa de la cutícula de la cual el tóxico es extraíble por lavado con sol-

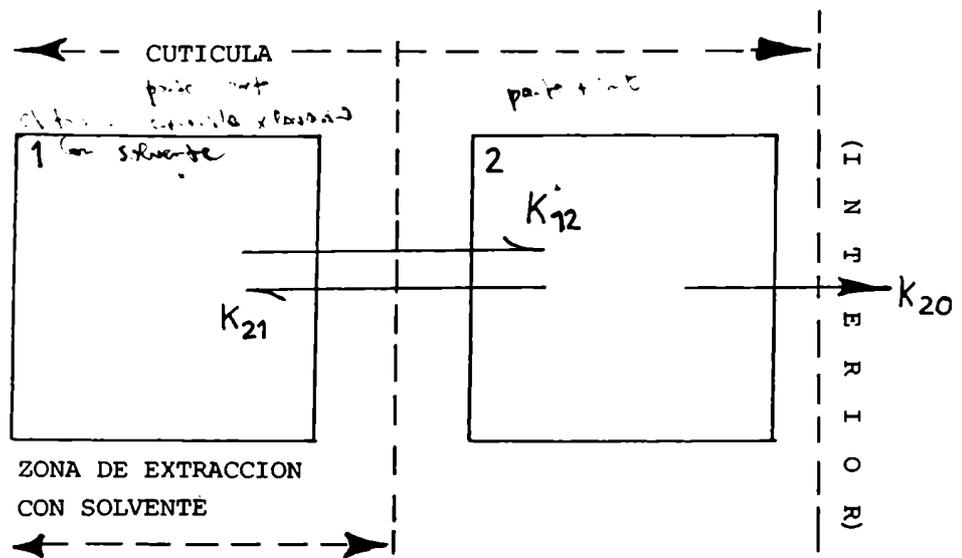


FIGURA 3

vente. El segundo representa la cutícula más interna, de la cual el tóxico no es extraíble por lavado con solventes. Este segundo compartimiento contacta con el interior del insecto. Según este modelo, las variaciones de concentración de compuesto en el tiempo pueden ser descritas por un par de ecuaciones diferenciales de primer orden. Un gráfico semilogarítmico de C vs tiempo, en general, no es entonces una línea recta sino una curva, suma de 2 exponenciales. Sin embargo, cuando existe algún paso limitante hay 2 casos límite en que esta curva se aproxima a una línea recta: 1) si la transferencia de masa del compartimiento 2 al interior del insecto es paso limitante y la cantidad de compuesto contenido en el compartimiento 2 es despreciable. 2) si la transferencia de masa del compartimiento 1 al 2 es paso limitante.

Un caso particular se describe cuando la salida del compartimiento 2 es limitante y además la cantidad de compuesto contenido en el mismo no es despreciable. En este caso, la curva se caracteriza por una caída abrupta lineal inicial seguida por otra línea recta cuya pendiente se corresponde con la constante de penetración desde compartimiento 2 al interior del insecto.

Este modelo presupone también la constante de penetración independiente de la concentración de compuesto y la no existencia de difusión inversa desde el interior del insecto hacia el compartimiento 1.

En líneas generales, los modelos ideados para explicar las cinéticas de penetración consideran al tegumento formado por un número dado de com

partimientos. El intercambio de compuesto entre ellos determina la velocidad de penetración. Probablemente, estos intercambios sean particiones entre subestructuras tegumentales de diferente polaridad.

IIId.- Parámetros que condicionan la velocidad de penetración.

Los parámetros que regulan la velocidad de penetración de un compuesto pueden dividirse en 3 grandes grupos:

- a) Relacionados con las características del compuesto que penetra.
 - b) Relacionados con las condiciones en las que se aplica el compuesto.
 - c) Relacionados con las propiedades del tegumento como barrera.
- (a) La polaridad del compuesto, ha sido demostrado, influye sobre la velocidad de penetración.

Olson y O'Brien (22), estudiando la penetración en *P. americana* de K_2HPO_4 , H_3PO_4 , dimetoato, paraoxón, dieldrin y DDT en acetona observaron que compuestos con menor coeficiente de partición aceite de oliva/ H_2O penetran con mayor velocidad que aquellos con mayor coeficiente. Por lo tanto, la polaridad se relaciona directamente con la velocidad de penetración.

Otros autores encontraron en condiciones semejantes resultados concordantes con los de Olson y O'Brien. Tal es el caso para los isómeros del hexaclorociclohexano estudiados en gorgojos (46).

Resultados aparentemente opuestos fueron obtenidos para la penetra-

ver
página 12

tración de urea, alcoholes y compuestos relacionados a través del tegumento aislado de langosta (23). Sin embargo, en este caso, la topicación se realizó utilizando soluciones acuosas de los compuestos. En el caso de la topicación con acetona, este solvente desorganiza la capa de cera de la epicutícula, con lo cual los compuestos son introducidos directamente dentro de ella. La penetración se verá favorecida, bajo esas condiciones, para compuestos más polares y capaces de introducirse en la procutícula proteica y polar. Cuando la topicación se realiza en H₂O, el factor limitante corresponde a la partición del compuesto entre el solvente de tópico y la capa cerosa que primariamente se le opone. Por lo tanto, una menor polaridad favorecerá el ingreso.

Los datos de Olson y O'Brien (22) fueron utilizados por Penniston et al (47) para cuantificar la relación entre penetración a través del tegumento y polaridad como una ecuación parabólica:

$$\log T \ 1/2 = 0.124 (\log P)^2 + 0.36 (\log P) + 1.492 \quad \text{Ec (4)}$$
$$r = 0.998$$

donde, T 1/2 es la vida media de penetración y P el coeficiente de partición aceite de oliva/agua.

Esta cuantificación parabólica con sus coeficientes, conduce a pensar en una polaridad intermedia óptima, para la cual T 1/2 se haría mínimo.

Estos resultados han sido interpretados fisiológicamente considerando el transporte pasivo de compuestos a través de membranas lipofílicas.

Cuando la polaridad disminuye las moléculas penetran más fácilmente las membranas lipídicas, pero, por otro lado, a mayor polaridad, más fácilmente pueden abandonar esta barrera. De aquí que deba existir una polaridad óptima para la cual el pasaje a través de la membrana sea máximo.

Otro parámetro a considerar es la viscosidad del compuesto que ingresa. Licastro et al (48) determinaron una relación lineal directa entre el log $1/K_p$ y la viscosidad relativa del compuesto trabajando con dietil fenil fosforotatonatos p-sustituídos en *T. infestans*. Esta relación inversa entre viscosidad y velocidad de penetración hace pensar en la importancia que la migración superficial y la percolación a través de canales pueden tener en el mecanismo de penetración, dada la dependencia directa con la viscosidad que estos fenómenos tienen.

b) Además de las características del compuesto, las condiciones en que se lo topica influyen sobre su velocidad de penetración.

La primera variable a considerar es la dosis. Algunos investigadores han observado que, aumentando la dosis, la velocidad de penetración relativa (medida como una fracción de la dosis administrada) decrece (49) (50)

Analizando la penetración del DDT, Hewlett (51) concluyó que la relación entre la cantidad de insecticida absorbido (W) a un tiempo dado después de la aplicación por tópico y la dosis externa (d) está representado por la siguiente expresión:

$$W = a (1 - e^{-d/a}) \quad \text{Ec (5)}$$

por lo que a medida que la dosis aumenta, la cantidad de compuesto absor-
bido se acerca a un valor límite a, sugiriendo un fenómeno de saturación.

La proporción de solvente/insecticida, para los isómeros del HCH, es también importante. Kurihara (53) observó que, cuando la cantidad de sol-
vente aumenta, a una dosis fija, o la dosis disminuye a un volumen de solvente fijo, la velocidad inicial de penetración aumenta, sugiriendo que el solvente juega un rol importante como vehículo del insecticida. Es decisivo, asimismo, el tipo de solvente en que se administra el compuesto. Hadaway et al (52) encontraron en moscas tse-tse que la tasa de penetración de organoclorados y organofosforados difiere según el solvente que se utiliza. La penetración del DDT, a 4 hs, por ejemplo, fue del 75% si el solvente es diisobutilcetona y del 25% si el solvente es acetona.

El agregado de aceites en las preparaciones de insecticidas a menudo
incrementa la toxicidad. El DDT en solución de benceno es de 4 a 6 veces más tóxico para *Macrosiphum* sp. que la suspensión acuosa. El agregado de aceites a la rotenona aumenta notablemente su toxicidad. En muchos casos, soluciones en aceite de chlordane son tóxicas para insectos que no son afectados por suspensiones o polvo del mismo insecticida (15). Ahmed y Gardiner (54) demostraron que el malatión diluído en aceites minerales es más tóxico que el malatión concentrado aplicado por tópico en langosta.

Estas diferencias de toxicidad han sido correlacionadas con diferenci

cias en la velocidad de penetración generada por el agregado del aceite a la formulación. En relación con ésto, otros autores determinaron directamente la tasa de penetración. Sawicki (49) comparó la formulación del diazoxón en acetona y n-dodecano y determinó que la velocidad de penetración inicial es mayor cuando se utiliza el hidrocarburo de alto punto de ebullición.

Licastro (48) demostró que el agregado de aceites parafínicos de alto punto de ebullición acelera la penetración del paratión en *T. infestans*.

Por otra parte, hay evidencias de que una excesiva cantidad de aceite en la formulación tiene un efecto negativo sobre la penetración (24) producido probablemente por la captura del insecticida por la gran masa de aceite.

Las propiedades del solvente o del "carrier" importantes en la modulación de la velocidad de penetración son: su volatilidad, viscosidad, tensión superficial y liposolubilidad. Las tres primeras determinan el área sobre la cual se dispersa un volumen dado de solvente. Es dable esperar que una mayor área de intercambio conduzca a una mayor velocidad de penetración.

La liposolubilidad, se relaciona con la solubilidad del insecticida en el "carrier" pero además con la solubilidad de las ceras epicuticulares, lo que conduce a una diferente disrupción de esa capa (40).

En relación con el mecanismo por el cual diferentes solventes aumentan o disminuyen la penetración de insecticidas, recientemente, Schouest

(55) estudió por microscopía electrónica de barrido el grado de cristalización del compuesto en relación con el solvente utilizado. Encontró, que la aplicación de dicarbasulf en una mezcla de acetona-kerosene aumenta su toxicidad hacia moscas y disminuye notablemente la cantidad de cristales formados. Probablemente la menor volatilidad del solvente retarde la precipitación del dicarbasulf favoreciendo la penetración.

c) El tercer factor de importancia que modula la penetración es el conjunto de características del tegumento como barrera:

Ha sido demostrada por algunos autores la importancia que la capa lipídica tiene sobre la velocidad de penetración. Benezet y Forghash (31) observaron en mosca doméstica que la abrasión de lípidos cuticulares con ácido silícico originó una disminución en la penetración del malatión. Más aún, las diferencias en velocidad de penetración existentes entre cepas resistentes y susceptibles desapareció luego de la abrasión.

Sin embargo, en *P. americana*, la remoción de lípidos por abrasión con ácido silícico o talco o por "frotado" con cloroformo, aumentó la penetración de paratión y malatión (22) (44).

Concordantes con lo anterior son los trabajos de Patil y Guthrie (57) (58). Siguiendo los primeros trabajos de Weismann (56) en los que se demostró que un mayor contenido lipídico aumenta los valores de LD₅₀, en moscas resistentes al DDT, estos autores examinaron los lípidos cuticulares de moscas susceptibles y resistentes. Observaron diferencias cuantitativas y no cualitativas en estos lípidos y sugirieron un cambio en la pene-

tración cuando se introducen fosfolípidos anómalos.

El grado de esclerotización, así como el grosor de la cutícula influyen también sobre la penetración.

O'Kane (59) demostró que las áreas débilmente esclerotizadas que aparecen sobre la cabeza de cucaracha, son más permeables a la nicotina que las áreas más rígidas.

En general se acepta que la penetración disminuye cuando el grosor de la cutícula aumenta. Así, larvas y ninfas se hacen menos permeables a medida que progresa el estadio y el tegumento se engrosa (60).

Sin embargo, existen cutículas muy delgadas y además altamente impermeables. Usando varias soluciones acuosas se observó, analizando larvas de dípteros, que por ejemplo la cutícula impermeable de *Corethorus plumi cornis* tiene solamente 2 μ de grosor, mientras que la cutícula altamente permeable de *Chironomus plumosus* tiene más de 7 μ .

Probablemente, el grado de esclerotización tenga mayor peso que el grosor cuticular en su influencia sobre la cinética de penetración.

Objetivo de este trabajo:

Dado que los insecticidas constituyen un grupo de sustancias químicas sin las cuales la sociedad no podría subsistir, una estrategia obvia para el control de insectos es acelerar la búsqueda de compuestos químicos biodegradables y selectivos que mataran al insecto, pero que no presenta

ran efectos nocivos para otros organismos o el medio ambiente (62). Sin duda, un análisis racional del sistema acelera la obtención de nuevos y mejores métodos de control. En este sentido los conocimientos básicos sobre la fisiología y la bioquímica del insecto, así como los mecanismos que regulan la interacción del tóxico con el insecto permiten dirigir la estrategia de control.

En particular, es sabido que el tegumento es la estructura más distintiva de los Artrópodos (63). Es también la primera barrera que se interpone en la penetración del insecticida. Es de suma importancia entonces, conocer el inicio de la toxicocinética del insecticida, condicionado en gran parte por el tegumento.

El objetivo general de este trabajo ha sido analizar la primera interacción entre insecticidas organofosforados y el *Triatoma infestans*, principal vector de la Enfermedad de Chagas en nuestro país, analizando el mecanismo de penetración y la capacidad del tegumento en la degradación de estos compuestos.

En consecuencia se estudió la actividad esterásica presente en el tegumento de *T. infestans* adulto, su localización, su dependencia de edad y estado nutricional del insecto, además de la caracterización electrofóretica y mediante inhibidores específicos. Se determinó también el rol de estas enzimas en la degradación de compuestos organofosforados.

En relación con el mecanismo de penetración se analizó la existencia de sitios preferenciales de penetración y su correlación con particulari

dades de la estructura tegumental. Asimismo se consideró el efecto que "carriers" de alto PM ejercen sobre la cinética y el modo de ingreso de estos compuestos.

Estos estudios, además del conocimiento básico que aportan, podrían ser utilizados en el futuro para el mejoramiento de las formulaciones de insecticidas utilizados en la lucha contra el vector del Mal de Chagas, a través de cambios cuali-cuantitativos que favorecieran la penetración al insecto y disminuyeran la degradación a nivel del tegumento.

El *Triatoma infestans* y la Enfermedad de Chagas.

La única endemia transmitida por insectos que tiene importancia epidemiológica en nuestro país, por el alto número de individuos infectados, es la enfermedad de Chagas, dolencia americana que se extiende desde México hasta el norte de la Patagonia. Según un informe técnico de la Organización Mundial de la Salud del año 1960 (64), se calcula que en toda América existen 35 millones de personas expuestas a la enfermedad y de entre ellas 7 millones están infestadas.

Esta enfermedad es ocasionada por un protozoario, el *Tripanosoma cruzi*, que cumple su ciclo de vida alternando entre dos huéspedes: un mamífero y un insecto vector. Estos insectos pertenecen a la subfamilia *Triatominae* (*Reduviidae*, *Hemiptera*), son de hábitos hematófagos y se los conoce vulgarmente, en nuestro país, con el nombre de "vinchuca"

Existen varias especies de Triatomíneos capaces de transmitir la enfermedad en diferentes zonas. Sin embargo, en la Argentina, la especie domiciliar responsable de esta transmisión es el *Triatoma infestans*.

La vinchuca, originalmente no infectada, se infecta con el *Tripanosoma cruzi* al alimentarse de sangre de mamíferos enfermos. Luego puede transmitir el protozoo a otro individuo sano en sucesivas ingestas. Este insecto es hemimetábolo y en su ciclo de vida aparecen 5 estadios ninfales sucesivos, que se desarrollan a partir del huevo y que conducen al adulto. Todos los estadios ninfales y el adulto son hematófagos y transmisores de la enfermedad.

Sin duda, el conocimiento racional de nuevos y mejores métodos de control del insecto podría conducir en el futuro a controlar esta enfermedad.

La única manera, viable hasta el momento de controlar la enfermedad, es la interrupción del ciclo de vida del parásito por la eliminación del insecto vector. En este sentido, se realizan campañas de desinsectación de viviendas utilizando insecticidas capaces de matar al *Triatoma infestans* adulto, así como a sus estadios ninfales y huevos (65).

MATERIALES Y METODOS

Material biológico:

Se utilizaron insectos adultos o ninfas V de la especie *Triatoma infestans* pertenecientes a una colonia criada en nuestro laboratorio desde el año 1979, mantenida en cámara de cría, a 30°C y con una humedad relativa del 50 - 60 %.

ACTIVIDAD ESTERASICA EN TEGUMENTO

Disecciones:

Se utilizaron insectos adultos con un día de ayuno, excepto en los experimentos relacionados con el estado nutricional.

Los insectos fueron decapitados por corte y se eliminaron apéndices locomotores y alas. En todas las experiencias se utilizó el tegumento abdominal dorsal, que se disecó con bisturí realizando un corte a nivel de la pleura recorriendo el borde abdominal libre. Finalmente se levantó posteriormente el tegumento, a la vez que se eliminaron los restos de tejido graso adheridos. Por corte se separó el tegumento del resto del insecto.

Una vez aislados, los tegumentos fueron lavados exhaustivamente en buffer Fosfato de sodio 0.07 M, pH 7.8, para eliminar posibles contaminaciones con contenido intestinal.

En algunas experiencias se utilizaron cutícula y epidermis por separa-

do. Estas dos fracciones son fácilmente separables entre sí. La epidermis se extrajo por raspado con una aguja de la superficie interna del tegumento. Aparece como una estructura membranosa, translúcida, incolora, no quebradiza y extraíble como una unidad en cada segmento. El resto del tegumento, la cutícula, es de apariencia quebradiza y coloreada.

Procedimiento histológico:

Los tegumentos o cutículas de insectos adultos fueron fijados en solución de Bouin (66) durante 15 hs., deshidratados en etanol 96° durante 3hs. y en etanol absoluto por 2 hs.

La inclusión se realizó en parafina (punto de solidificación: 57-60°C Merck, Alemania Occidental) y los cortes de 6-8 μ se realizaron utilizando un Micrótopo Lipshaw. La coloración de hematoxilina-eosina se efectuó según la técnica de Mayer (66).

Las observaciones se llevaron a cabo utilizando un microscopio Nikon modelo SKe adicionado con accesorios para microfotografía.

Preparación de homogenatos:

Los homogenatos, ya sea de tegumento, cutícula o epidermis, se realizaron en buffer Fosfato de sodio 0.07 M, pH: 7.8, utilizando un micropotter de vidrio esmerilado de 1 ml y fueron filtrados por lana de vidrio. Todos

los homogenatos se prepararon conteniendo 10 unidades anatómicas por ml de buffer.

En las experiencias realizadas previo lavado con Tritón X 100, se utilizó una solución estéril 1 % de este detergente. Los insectos fueron lavados exteriormente luego de retiradas las alas. En estos casos la extracción se realizó en condiciones de esterilidad.

Sustratos e inhibidores:

El acetato de tiofenilo (PTA) se preparó de acuerdo con la técnica de Booth y Metcalf, 1970. Los siguientes reactivos fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (E.E.U.U.) : Bromuro de acetiltiocolina (ATC), ioduro de butiril tiocolina (BTC), acetato de α -naftilo (α -NA) y fisostigmina (eserina).

El O,O-dietyl,O-p-nitrofenilfosfato (paraoxón) se adquirió en Aldrich (E.E.U.U.).

El $[^{14}\text{C}]$ -paratión (O,O- $[1-^{14}\text{C}]$ - dietyl p-nitrofenilfosforotionato), 19 mCi/mmol, 1.3 umol/ml utilizado es de Amersham (Inglaterra). El $[^{14}\text{C}]$ -malatión (S-1,2-di (etoxicarbonil) etil O,O- $[^{14}\text{C}]$ -dimetil fosforoditioato, 5.16 mCi/mmol, 3.1 umol/ml utilizado es de Pathfinder Laboratories Inc. (E.E.U.U.) .

En todos los casos se utilizaron solventes de calidad pro-análisis o la mejor disponible comercialmente.

Determinaciones enzimáticas:

Las determinaciones enzimáticas de esterasas se realizaron a 25°C según el método cinético de Ellman (67) adaptado para insectos en nuestro laboratorio (68), utilizando 150 μ l de homogenato como fuente de enzima. Como sustratos se utilizaron soluciones de ATC y BTC 12 mM y PTA 20 mM.

En el análisis del efecto de inhibidores específicos se preincubó el preparado enzimático con eserina 10^{-5} M o eserina 10^{-5} M más paraoxón 10^{-5} M durante 15 minutos a 25°C y luego se determinó la actividad esterásica.

Las variaciones de absorbancia en el tiempo se determinaron con un espectrofotómetro Varian 634 de doble haz, 1 nm de slit, con registrador acoplado.

Las concentraciones de proteínas se determinaron por el método de Folin-Ciocalteu (75) con el mismo aparato.

Electroforesis:

La electroforesis se realizó sobre geles de poliacrilamida en buffer Tris-glicina (pH: 8.3) utilizando un aparato Bio Rad (70). Se utilizó poliacrilamida al 7 % para obtener un pequeño tamaño de poro durante la separación. Se aplicó una corriente de 4 mA por tubo durante 2 hs. a 5 °C.

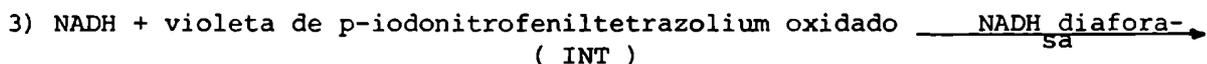
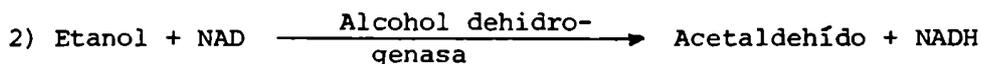
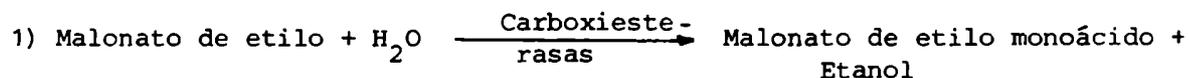
La separación electroforética se realizó con homogenatos de epidermis, sembrándose 150 y 300 μ l.

Los zimogramas se realizaron utilizando α -NA por 1 h según la técnica

de Jameson et al (70).

La técnica de tinción para productos de carboxiesterasas se realizó por una modificación del método colorimétrico de Talcott (71) de manera de adaptarlo a electroforesis en gel de poliacrilamida (72).

Este método colorimétrico se basa en una reacción acoplada de hidrólisis del sustrato (carboxiésteres etílicos , en este caso malonato de etilo) con la reducción del colorante de p-iodonitrofeniltetrazolium según el siguiente esquema:



NAD + INT reducido

El violeta de p-iodonitrofeniltetrazolium reducido tiene un pico de absorbancia a 500 nm.

En la adaptación realizada, antes del teñido, los geles se sumergieron en buffer Tris-ClH 0.3 M, pH: 8.5 durante 1 hora a 25 °C. Luego se incubaron en una solución preparada inmediatamente antes de usar conteniendo: 9.6 ml de una solución del colorante de tetrazolium (44 mg INT en 100 ml

de buffer Tris-ClH 0.3 M pH: 8.5) 0.2 ml de una solución de NAD 18 mM, 0.2 ml de una solución de alcohol dehidrogenasa con 25 U/ml, 0.05 ml de una solución de NAD -diaforasa 0.1 U/ml y 0.025 ml de una solución 150 mM de malonato de etilo.

La incubación se realizó a temperatura ambiente durante una noche para permitir un desarrollo completo del color y luego los geles fueron transferidos a tubos limpios conteniendo agua destilada (no es necesario decolorar)

Se realizaron controles en ausencia de sustrato dado que los homogenatos podrían aportar alguna coloración inespecífica.

DEGRADACION DE COMPUESTOS FOSFORADOS

Se incubaron 500 ul de homogenato de epidermis con 5 ul de una solución acetónica de $[^{14}\text{C}]$ - paratión durante 0, 1 y 2 hs a 30 °C. A cada tiempo se tomaron alícuotas de 100 ul y se realizó la extracción con Cl_3CH :buffer pH 7.8 (3:1) de modo de separar los productos de hidrólisis (hidrosolubles) del paratión y paraoxón que permanecen en la fase clorofórmica. En el caso del $[^{14}\text{C}]$ - malatión la incubación se realizó en iguales condiciones que las anteriores. La extracción se realizó con Cl_3CH a pH 2 de modo de separar los productos de hidrólisis por fosforotriesterasas, que permanecen en fase acuosa a pH 2, de los de carboxiesterasas que, a ese pH pasan a la fase clorofórmica (73).

Se tomaron alícuotas de cada fracción, cuya radiactividad fue medida en un Contador de Centelleo Líquido Beckman LS-7000 (E.E.U.U.), usando Aguasol-2 (New England Nuclear, E.E.U.U.) como solución centelladora.

En ambos casos se realizaron incubaciones control en ausencia de homogenato para descontar autohidrólisis.

La identificación de α y β monoácidos del malatión se realizó por cromatografía en capa delgada (TLC) con un sistema de solventes formado por 0.5 % ácido acético glacial en acetona y posterior localización de las manchas por autorradiografía. Se utilizaron placas radiográficas 3M y el tiempo de exposición fue de dos semanas.

CINETICA Y MECANISMO DE PENETRACION DE ORGANOFOSFORADOS - EFECTO DE CARRIERS

Reactivos utilizados:

Material radiactivo:

El material radiactivo utilizado, además del ya citado, fue el siguiente: Dotriacontano - 16-17 $[^{14}\text{C}]$, Pathfinder Lab. Inc. (E.E.U.U.) AE: 7.8 mCi/mmol diluído para su uso a una AE: 0.43 mCi/mmol, y una concentración de 8 $\mu\text{mol/ml}$. $[^{14}\text{C}]$ polietilenglicol 4000, Amersham (Inglaterra), AE: 40 mCi/mmol diluído para su uso a una AE: 3.6 mCi/mmol, y una concentración de 1.25 $\mu\text{mol/ml}$.

Material no radiactivo:

El malatión fue una donación de American Cyanamid.

Carriers parafínicos: aceite parafínico mineral HVI 95 y su fracción de bajo punto de ebullición (220-280) (Shell, Argentina)

Polietilenglicoles : Carbowax 20 M, Carbowax 600, Carbowax 400 y Ftalato de octilo fueron adquiridos a Varian, E.E.U.U.

Se utilizaron solventes de calidad pro-análisis o la mejor disponible en el mercado.

Cinéticas de Penetración:

Las cinéticas de penetración de $[^{14}\text{C}]$ -malatión y $[^{14}\text{C}]$ -malatión adicionado con "carriers " se realizaron por la técnica de "wash - off " (48).

Se utilizaron individuos adultos, hembras, de 2 meses de edad, 8 días de ayuno y un peso aproximado de 200 mg.

Se topicó un volumen fijo de 10 ul sobre tegumento dorsal a nivel de los últimos tergitos, luego de retiradas las alas. La dosis de $[^{14}\text{C}]$ -malatión topicada también fue fija y de 0.3 nmoles / insecto (\approx 2400 dpm/ insecto)

La topicación se realizó en solución acetónica, con o sin formulación con " carriers ".

En la formulación con "carriers" se utilizaron dos dosis diferentes: 50 μg "carrier"/g de insecto y 250 μg "carrier"/g de insecto. Los "carriers"

utilizados fueron:

- a) parafínicos (no polares): Aceite parafínico HVI- 95 (de alta viscosidad) y su corte de destilación 220-280 °C (220-280) (de baja viscosidad)
- b) Polietilenglicoles (polares): Carbowax 20 M (20 M); Carbowax 600 (C 600) y Carbowax 400 (C 400) (desde una mayor viscosidad a una menor)
- c) Ftalato de octilo (polaridad intermedia)

El porcentaje de penetración a cada tiempo (25°C) se determinó por lavado externo con acetona más malatión (4 mg/100 ml), respecto del tiempo 0. Para determinar la recuperación y el porcentaje de compuesto interno se homogenizó en acetonitrilo:H₂O (3:1) más malatión 10 mg/100 ml. En el cálculo de recuperación se contabilizó también lo obtenido por lavado con metanol del recipiente en que se mantuvieron los insectos (74).

Para el recuento de la radiactividad se evaporaron las muestras acetónicas y metanólicas y se contaron en un Contador de Centelleo Líquido LS 7000 (Beckman, E.E.U.U.) usando Aquasol 2 (New England Nuclear, E.E.U.U.) Las muestras de homogenización se contaron tomando una alícuota del total e incluyéndola en solución centelladora.

Las cinéticas de penetración de $[^{14}\text{C}]$ "carriers" se determinaron también por la técnica de " wash-off" (48) en condiciones semejantes a las utilizadas para las cinéticas de $[^{14}\text{C}]$ - malatión + "carriers". Como "carrier" no polar se usó $[^{14}\text{C}]$ - dotriacontano en solución acetónica. Se topicaron

250 ug $[^{14}\text{C}]$ - dotriacontano / g insecto contenido en 10 ul de solución acetónica. Solución de lavado: acetona + squalano 4 mg/100 ml. Solución de homogenización: Cl_3CH + squalano 10 mg/100ml. Solvente de lavado de recipientes : Cl_3CH .

Como "carrier" polar se usó $[^{14}\text{C}]$ - carbowax 4000 en solución acetónica. Se topicaron 250 ug $[^{14}\text{C}]$ -carbowax 4000 / g insecto contenido en 10 ul de solución acetónica. Solución de lavado: acetona + carbowax 4000 4 mg/100 ml. Solución de homogenización: Cl_3CH + carbowax 4000 10 mg/100 ml. Solvente de lavado de recipientes: Cl_3CH .

El recuento se realizó luego de la evaporación de las muestras y utilizando iguales condiciones que en los casos anteriores.

En todos los casos las determinaciones para cada tiempo se realizaron con pool de 3 insectos y por duplicado.

Estudios autorradiográficos:

Los estudios autorradiográficos se realizaron según el siguiente esquema:

- 1- Eliminación de alas del insecto.
- 2- Tópico dorsal de la solución radioactiva correspondiente.
- 3- 0;1 ó 2 hs de penetración del compuesto a 25 °C.
- 4- Lavado o no con acetona 3 veces x 2 ml cada vez.
- 5- Disección del tegumento completo y exposición en oscuridad sobre placas

radiográficas 3M.

6- Revelado con revelador y fijador 3M para placas radiográficas. Los tiempos de exposición y los de revelado se standardizaron de manera de hacer comparables los resultados.

Para diseccionar el tegumento se realizaron cortes a nivel de la unión entre tergo y pleura. Se levantó el tergo y se retiraron los órganos internos. Se realizaron cortes a nivel de la unión entre esterno y pleura.

Una vez separados tergo, esterno y ambas pleuras se realizaron pequeños cortes laterales de modo de llavar esas estructuras a un sistema plano.

Antes de exponer cada parte del tegumento a la placa autorradiográfica se eliminaron los restos de tejido graso que pudieran haber quedado asociados con la cara interna.

Estudios histológicos:

Los estudios histológicos se realizaron en forma semejante a la descrita en el ítem anterior, utilizando adultos o ninfas V de avanzada edad según los casos.

RESULTADOS Y DISCUSION

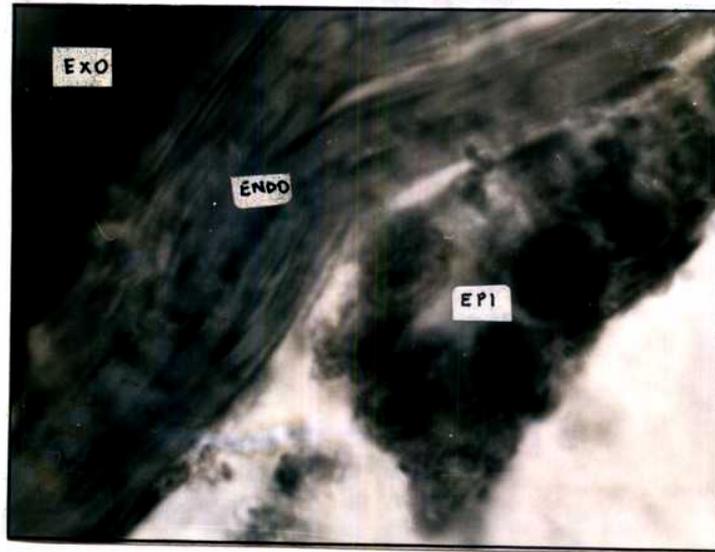
I- ACTIVIDAD ESTERASICA

Ia- Estructura del tegumento:

Con el fin de estudiar la actividad enzimática en tegumento se separaron por raspado dos zonas características como se describe en materiales y métodos. Fue de interés determinar a qué capas constitutivas del tegumento corresponderían ambas fracciones aisladas. Se procedió entonces a realizar una histología del tegumento entero y del tejido esclerotizado al que previamente se le separó el tejido blando. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 4, 5 y 6. En todos los casos se pueden observar dos capas cuticulares características que aparecen con diferente coloración: una externa coloreada según la zona del corte, de amarillo y marrón, y una interna rojiza. Probablemente la capa externa corresponda a la epi y exocutícula siendo el color observado el característico de esta zona, visible externamente en el insecto. Por lo tanto, la misma no habría sido teñida por ninguno de los dos colorantes probablemente debido a una composición predominante de compuestos neutros (esclerotina). La capa interna aparece fuertemente teñida por la eosina que es un colorante basófilo, lo que permite suponer que corresponde a la endocutícula. Su componente fundamental es la quitina, un polímero de acetilglucosamina (2), cuya estructura básica (grupos aminos) permitiría la combinación con la eosina para formar la sal insoluble coloreada (66).

En la Figura 4 correspondiente al tegumento entero, internamente a la cutícula se observa un epitelio formado por células con morfología variada. En contacto con la cutícula aparece una capa celular formada por células

Figura 4: Corte sagital de tegumento abdominal dorsal de *T. infestans* adulto (500x).



EXO : Epi más exocutícula

ENDO : Endocutícula

EPI : Epidermis

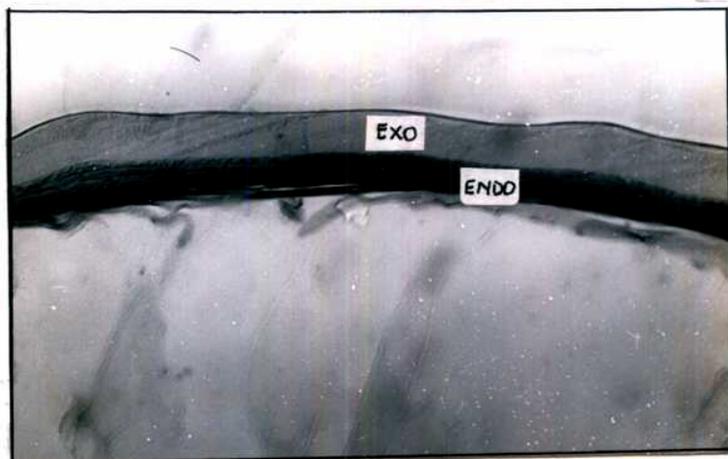
Figura 5: Corte sagital de tegumento abdominal dorsal de *T. infestans* adulto en el que aparecen separadas cutícula y epidermis. (200x)



A : Cutícula

B : Epidermis

Figura 6: Corte sagital del tegumento abdominal dorsal de *T. infestans* adulto después de haber sido extraída la epidermis (100x).



EXO : Epi más exocutícula

ENDO : Endocutícula

planas, que en algunos cortes apareció continua y separada del resto del epitelio. Esta podría corresponder a un tipo especializado de células epidérmicas descritas por algunos autores como células tendón, cuya función sería ligar la cutícula al resto de la epidermis (3). Más internamente aparecen células con núcleo esférico, heterogéneas con respecto a su morfología. Esto podría reflejar los diferentes tipos celulares que se sabe aparecen en la epidermis relacionados con funciones celulares específicas.

En muchos cortes, por ejemplo el correspondiente a la Figura 5, la epidermis aparece separada de la cutícula. Sin embargo, la distribución y morfología celular se mantienen, lo que hace suponer que la epidermis se separa con facilidad de la cutícula durante el corte. La línea de separación parece encontrarse a nivel de las células tendón. Para tratar de determinar si ésta podría ser también la línea de separación entre el tejido esclerotizado y el tejido blando se realizaron tinciones sobre preparados histológicos de tejido esclerotizado aislado. Como se observa en la Figura 6 el tejido esclerotizado no contiene células de ninguno de los tipos determinados en el tegumento entero, sino que aparece formado únicamente por las capas cuticulares: epi más exocutícula y endocutícula. La estructura de la epi-exocutícula aparece sin embargo discontinua; lo que podría explicarse considerando su inelasticidad característica en relación con las tensiones sufridas durante la extracción del tejido blando. Los resultados anteriores permiten suponer que el tejido blando comprendería la epidermis y su membrana basal (la que no ha podido ser observada, probablemente debido a su pequeño espesor), mientras que el tejido esclerotizado representaría la cutícula.

Ib - Actividad esterásica - Localización.

Se determinó en homogenatos de tegumento aislado usando PTA como sustrato obteniéndose una A.E. de 29.3 nmoles de PTA/h x unidad anatómica.

La mayor parte de esta actividad enzimática fue medida en la epidermis como se observa en la Figura 7 que describe localización de la actividad e influencia del ayuno en la misma.

Debido a que se publicara una contribución de actividad enzimática cuticular aportada por organismos de la microflora en trabajos realizados en *Calliphora erythrocephala* (14 bis), se intentó evitar una contaminación similar en nuestros estudios. Para tal fin se lavó exhaustivamente la superficie externa del tegumento con una solución de Triton X-100 1%.

No se observaron diferencias significativas en la actividad enzimática cuticular luego de este tratamiento lo que sugiere la irrelevancia de una posible contribución microbiana en la actividad esterásica cuticular medida en *T. infestans*.

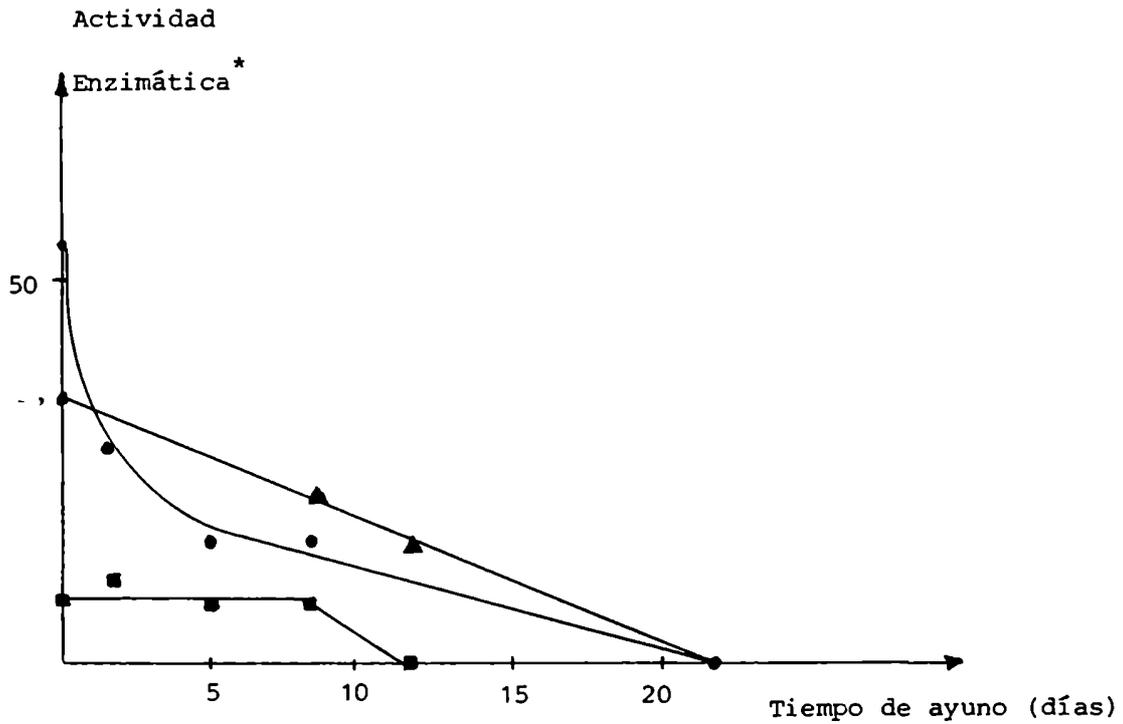
Ic - Actividad esterásica - Influencia de la edad.

En la Tabla 1 se resumen los datos obtenidos de actividad enzimática tegumental de insectos adultos de diferentes edades. Los resultados allí expuestos muestran un gran incremento en la actividad una semana después de la muda. Posteriormente los resultados se estabilizan decayendo ligeramente con la edad.

Trabajos previamente publicados (76) (77) informan acerca de la presencia

Figura 7: Relación entre la actividad esterásica tegumental y el estado nutricional del insecto. Localización de estas esterases.

ya para medir la actividad de las esterases (actividad enzimática) se usó el método de colorimetría (reacción de color de color y absorbancia) con este propósito y se obtuvieron los resultados de la tabla.



- Epidermis
- Cutícula
- ▲ Tegumento completo

Los resultados son promedio de dos determinaciones.

*nmoles de PTA hidrolizado/h x unidad anatómica.

Tabla 1: Actividad esterásica tegumental determinada en insectos de diferente edad.

Días después de la muda	Actividad * Enzimática.
1 - 7	0.35 \pm 0.35
10 - 20	52 \pm 5.6
40 - 50	44.8 \pm 14.4
60 - 70	28.4 \pm 12.4
90 - 100	29.6 \pm 8.8

*nmoles PTA hidrolizado / h x unidad anatómica.

Los resultados son promedio de dos determinaciones independientes.

de hormonas juveniles y mecanismo^o regulatorios en tegumentos de insectos. El hecho de que el proceso regulatorio es en buena medida mediado por esteroides, justifica la influencia de la edad sobre la actividad esteróide tegumental observada en *T. infestans*.

Id - Actividad esteróide - Influencia del ayuno.

En un seguimiento de la actividad esteróide tegumental, utilizando individuos en diferentes estados nutricionales se observaron los resultados que se resumen en la Figura 7. Un análisis de la misma nos indica que en epidermis la dependencia de la actividad con el ayuno del insecto es más acentuada que en cutícula. En ambos casos se determinó que la actividad deja de ser detectable luego de varios días de ayuno (22 días para la epidermis y 13 para el tejido esclerotizado). En la misma Figura se muestran los resultados obtenidos en una experiencia similar llevada a cabo con tegumento completo. También en este caso se observó dependencia de la actividad con el tiempo de ayuno, la cual se hizo no detectable a los 22 días.

Los resultados obtenidos sobre la influencia de la edad en la actividad esteróide sugieren que los profundos cambios de actividad observados con el ayuno son fundamentalmente debidos al estado nutricional del insecto. Esta influencia del estado nutricional es justificable teniendo en cuenta que el tiempo transcurrido luego de la ingesta determina notables cambios demostrados en diferentes especies de insectos (78).

Probablemente, uno de los cambios más notables, observado en *R. prolixus*,

corresponde a características de plasticidad, cuyo mecanismo podría estar regulado por variaciones de pH, fuerza iónica y otras condiciones del tegumento (79). Hillerton en esta misma especie observó que inmediatamente luego de la ingesta se deposita una capa adicional de endocutícula que se reduce con el tiempo de ayuno. Estos complejos procesos asociados a insectos hematófagos que como el *T. infestans* se alimentan esporádicamente, involucran una serie de procesos hormonales y enzimáticos que podrían justificar nuestra observación de decremento de actividad esterásica con el tiempo de ayuno. Sin embargo, el decremento en la síntesis de ceras y la reabsorción de endocutícula como una reserva alimenticia durante el ayuno (78) podría ser considerado como un factor más importante en el decaimiento de la actividad esterásica tegumental.

Ie - Caracterización de la actividad esterásica.

Para establecer bioquímicamente la presencia de diferentes tipos de esterásas, se ensayó la actividad de homogenatos de tegumento completo frente a distintos sustratos e inhibidores específicos. Fueron utilizados el PTA, típico sustrato de esterásas en general, el ATC de acetilcolinesterasas, y el BTC, de butirilcolinesterasas. Como inhibidores se ensayaron la eserina que inhibe específicamente colinesterasas y el paraoxón que inhibe colinesterasas y carboxiesterasas. Homogenatos de tegumento presentaron actividad frente a PTA y BTC pero fueron inactivos frente a ATC, lo que descarta la presencia de acetilcolinesterasas. La degradación de PTA fue inhibida en un 20% en

presencia de eserina 10^{-5} M, y 50% con paraoxón 10^{-5} M. La actividad frente a BTC se inhibió completamente con eserina y eserina más paraoxón (Tabla 2).

De acuerdo a los resultados obtenidos que se resumen en la Tabla 2 y teniendo en cuenta la clasificación de esterases de Holmes y Masters (21) se puede estimar que la actividad enzimática comprende aproximadamente un 20 % de butirilcolinesterasas, 30 % de carboxiesterasas y un remanente atribuible a arilesterasas y acetilesterasas.

A los fines de profundizar la caracterización se efectuó la electroforesis en gel de poliacrilamida de homogenatos de epidermis. En los zimogramas obtenidos que se muestran en la Figura 8 sólo se pudo observar una banda de alta movilidad, activa frente al α -NA y al malonato de etilo. El hecho de evidenciar claramente sólo una banda probablemente se debe, o a una superposición de esterases de alta movilidad electroforética o, a la baja actividad esterásica de los homogenatos, lo que haría que ciertas bandas no alcancen el límite de sensibilidad del método.

Los resultados obtenidos muestran la complejidad del sistema esterásico tegumental del *Triatoma infestans* . La presencia de diferentes tipos de esterasas sugieren más de un rol para estas enzimas. De acuerdo con los antecedentes bibliográficos, las esterases tegumentales podrían estar involucradas en el proceso de muda, en la síntesis de ceras, la ya mencionada regulación de JH, el metabolismo de lípidos, la degradación de feromonas acumuladas superficialmente, etc. (2) (1) (76) (77) (12).

Asimismo, estas enzimas están involucradas en el metabolismo de com-

Tabla 2: Caracterización de la actividad enzimática tegumental.

enz. hámico o tegumental.

SUSTRATO	Actividad* Enzimática	% Inhibición con	
		Eserina <i>especifico de colinesterasas</i>	Eserina más paraoxón <i>con inhibición de la actividad de la colinesterasa</i>
PTA <i>1000 - 10000, 10000</i>	23.4 \pm 12	20	50
BTC <i>10000 - 100000, 100000</i>	4.2 \pm 0.6	100	100
ATC <i>10000 - 100000, 100000</i>	0.0		

*nmoles de sustrato / h x unidad anatómica.

Los resultados son promedio de tres determinaciones independientes.

puestos exógenos, como por ejemplo, los insecticidas (16) (17).

Resultó interesante explorar esta posibilidad y los resultados que se obtuvieron se describen en el próximo punto.

II - DEGRADACION DE COMPUESTOS FOSFORADOS

Fue de sumo interés establecer un posible rol de las esterases descritas en el ítem anterior en la degradación de insecticidas organofosforados. Esta posible biotransformación representaría un metabolismo detoxificante localizado en tegumento. Hasta lo que sabemos no hay trabajos publicados sobre degradación de insecticidas mediada por esterases tegumentales.

II a - Paratión

Los homogenatos de epidermis mostraron actividad hidrolítica hacia ^{14}C - paratión.

Como se observa en la Figura 9 la actividad específica determinada de la pendiente de la recta correspondiente en el gráfico fue de : 0.032 nmoles ^{14}C - paratión/h x unidad anatómica.

La técnica utilizada para medir la actividad hidrolítica del paratión sugiere la siguiente degradación:

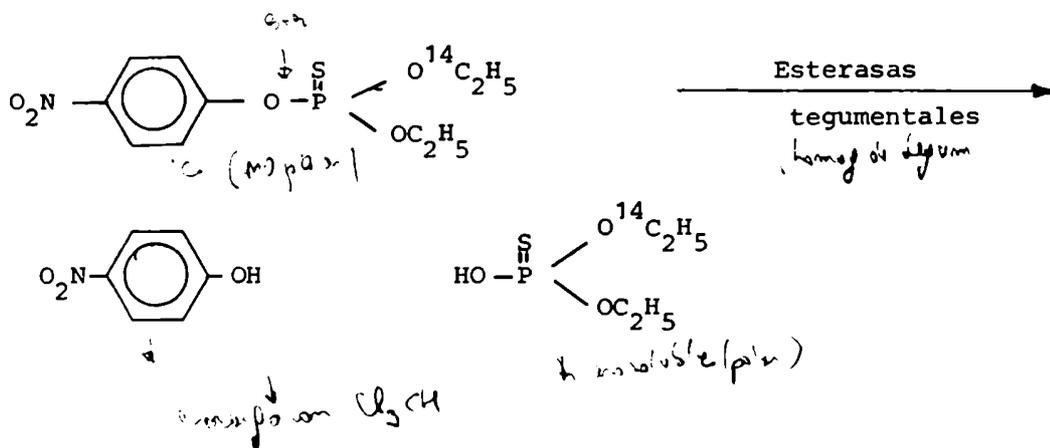
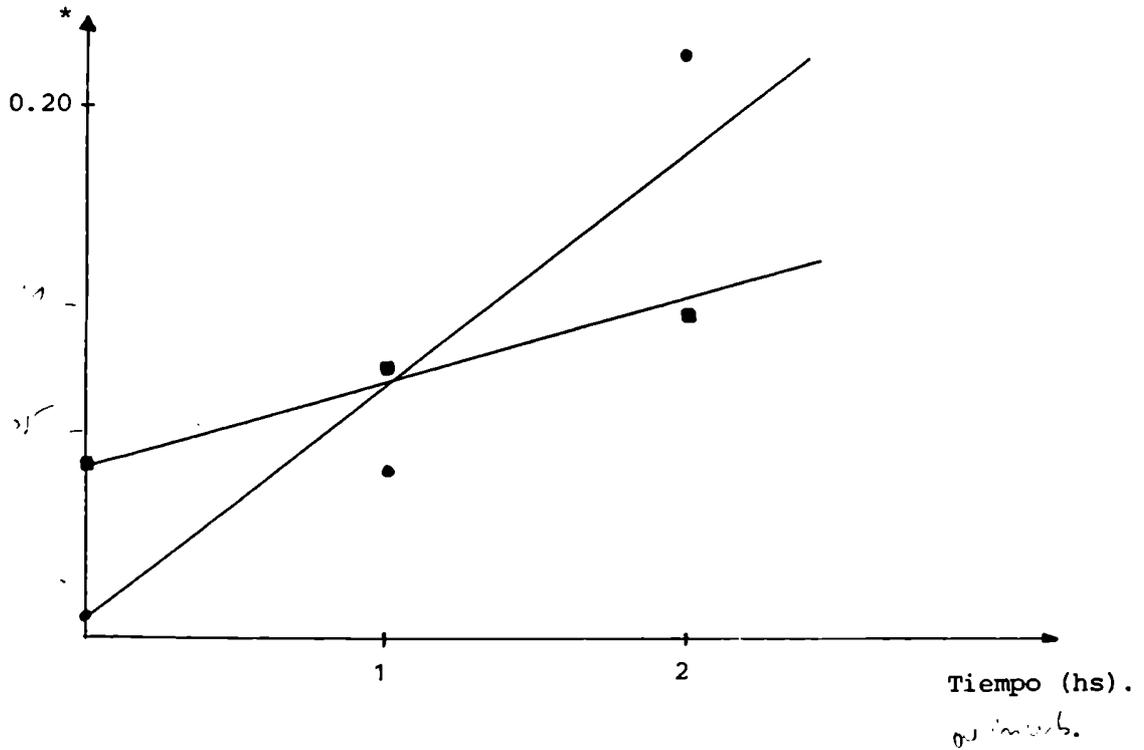


Figura 9: Hidrólisis de ^{14}C -paratión y ^{14}C -malatión por homogenatos de epidermis.



- Paratión
- Malatión

Los resultados son promedio de dos determinaciones independientes.

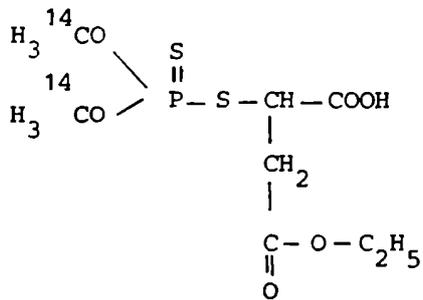
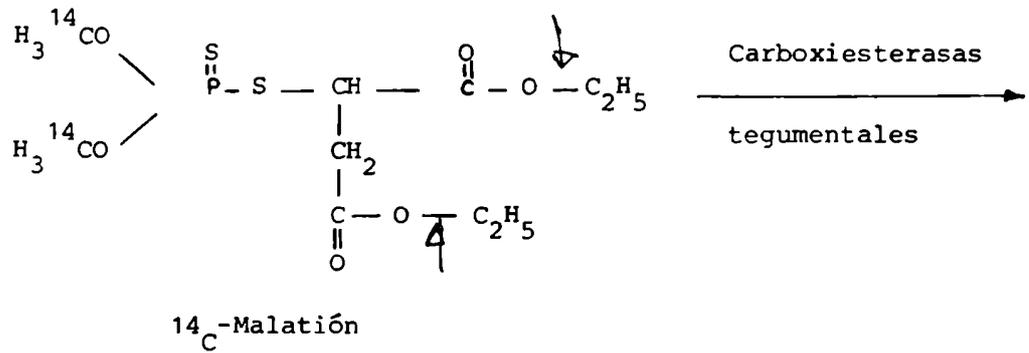
*nmoles de sustrato hidrolizado /h x unidad anatómica.

Como se observa en la Figura 9 las mediciones de hidrólisis del paratión mostraron radiactividad acuosa a tiempo 0. Esta radiactividad inicial en la fase acuosa podría ser interpretada como unión de ^{14}C -paratión no degradado a proteínas hidrosolubles. Este fenómeno ya fue descrito en mediciones de actividad esterásica realizadas en el áfido *Myzus persicae* (80).

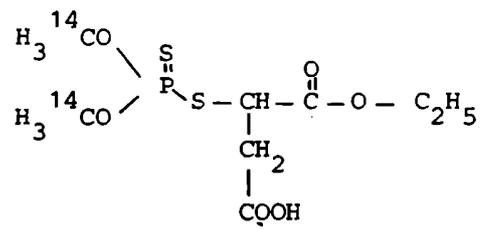
IIb - Malatión

Cuando se incubó ^{14}C -malatión con homogenatos de epidermis la actividad específica fue de 0.082 nmoles de ^{14}C -malatión hidrolizado/h x unidad anatómica, obtenida de la recta correspondiente (Figura 9).

En este caso la técnica utilizada (ver Materiales y Métodos) mostró la ausencia de ruptura del enlace P — S — C mediada por fosforotriesterasas. Toda la degradación parece corresponder a actividad de carboxiesterasas cuyos metabolitos son α y β monoácidos de acuerdo a :



α -Monoácido



β -Monoácido

La autorradiografía de la separación cromatográfica en capa delgada de los metabolitos radiactivos confirmó la presencia de α y β monoácidos. Este tipo de degradación ha sido ampliamente descripta en otras especies de insectos (73) (81) aunque nunca se encontró estas enzimas en tegumento.

1999

II c - Características de las esterasas que degradan fosforados.

Los resultados obtenidos acerca de la hidrólisis del paratión y malatión y las características de las esterasas tegumentales sugieren un perfil para la actividad degradante de fosforados. En efecto, la observada ruptura de la unión P-O-arilo en paratión y la ausencia de ruptura P-S-alquilo en malatión hacen suponer la presencia de fosforotriesterasas arilespecíficas. Asimismo, y en la degradación de malatión se observó la presencia de carboxiesterasas tegumentales. Esta presunta combinación de esterasas es coherente con lo observado en la separación enzimática por electroforesis en gel de poliacrilamida. Efectivamente, fue observada una única banda cuya revelación la mostró activa frente a α -NA (actividad arilesterásica) y, frente al malonato de etilo (actividad carboxiesterásica).

II d- Relevancia de la detoxificación tegumental.

La bibliografía no es muy abundante en lo referente a metabolismo de insecticidas a nivel del tegumento de insectos. Han sido descriptos algunos casos de metabolismo degradante como el pasaje de DDT a DDE en langosta y en pupa de mosca (9) (10). Es llamativo que no haya más estudios en esta área dada la importancia de esta degradación como primera barrera defensiva de insectos tratados con insecticidas de contacto. En *Triatoma infestans* ha sido reconocida la trascendencia de la activi-

•
dad esterásica como mecanismo defensivo frente a la agresión con insecticidas fosforados (82).

No cabe duda que la verdadera relevancia de la detoxificación tegumental está ligada a los sitios de ingreso del insecticida a través del tegumento del insecto. En efecto, zonas muy limitadas de ingreso reducirían el rol de este camino metabólico en el proceso global de intoxicación. Por tal motivo fue de interés estudiar la forma de ingreso de los insecticidas en *Triatoma infestans* y los resultados obtenidos a este respecto se describen en el punto siguiente.

III - SITIOS DE PENETRACION

IIIa - Estudios autorradiográficos en insectos adultos:

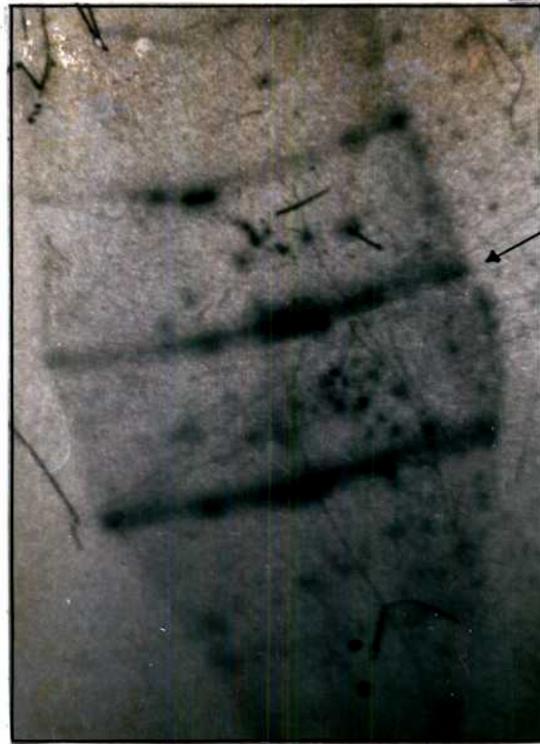
Fue de interés establecer si la penetración de insecticidas liposolubles a través del tegumento se realiza inespecíficamente en toda su superficie, o si por el contrario, existen sitios preferenciales de ingreso. Para tal fin se analizó por autorradiografía, previo lavado externo con acetona y disección, la cara interior y la exterior del tegumento de insectos adultos luego de 1 y 2 horas de penetración de paratión radioactivo topicado en solución acetónica.

En las Figuras 10 y 11 se observan las zonas de radioactividad encontradas en la cara interna y externa del tegumento, que corresponden a acumulación de paratión marcado. Las Figuras mencionadas indican que la acumulación se correlaciona con las membranas intersegmentales y con la unión del tegumento dorsal con el ventral.

En las Figuras 12 y 13 se esquematizan las observaciones bajo lupa de la autorradiografía que muestran la acumulación de ^{14}C -paratión en cara interna y externa del tegumento diseccionado. Comparativamente, en las mismas Figuras se observa el detalle fotográfico de la membrana intersegmental.

La observación de las Figuras 12 y 13 permite apreciar que en la cara externa cada banda de radioactividad correspondiente a una membrana intersegmental aparece dividida y formada por dos más pequeñas paralelas, sin radioactividad revelada entre ambas. En cambio en la cara interna a ca

Figura 10: Autorradiografía del tegumento dorsal de adulto post tóxico con ¹⁴C-paratión y lavado con acetona (3.3x).



Membrana
intersegmental

10a - cara interna



Membrana
intersegmental

10b - cara externa

Figura 11: Autorradiografía del tegumento lateral de adulto post tóxico con ^{14}C -paratiión y lavado con acetona (3.3x).

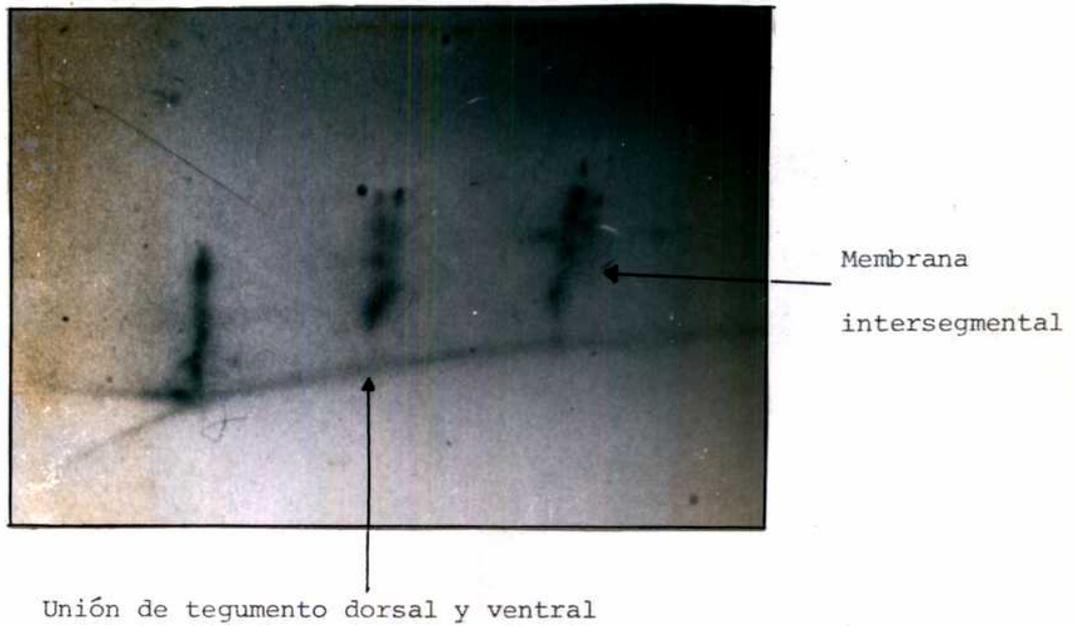
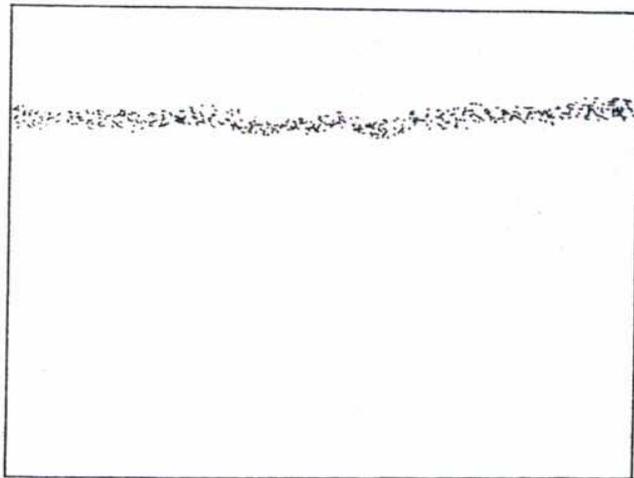


Figura 12: Detalle de la membrana intersegmental (cara interna) y esquema de la distribución de ^{14}C -paratiión revelado por autorradiografía.



12a - Membrana intersegmental que une el 5° y 6° segmento abdominal (10x).

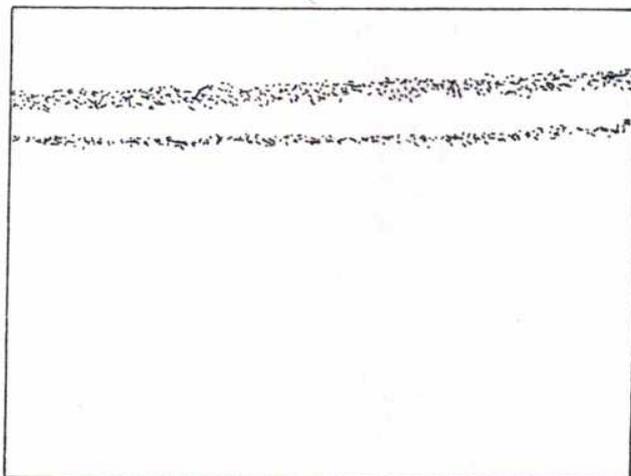


12b - Representación gráfica de la autorradiografía.

Figura 13: Detalle de la membrana intersegmental (cara externa) y esquema de la distribución de ^{14}C -paratión revelado por autorradiografía.



13a - Membrana intersegmental que une el 5° y 6° segmento abdominal (10x).



13b - Representación gráfica de la autorradiografía.

da membrana intersegmental le corresponde una única banda de menor intensidad.

IIIb - Estudios autorradiográficos en ninfa V.

Sobre ninfa V de avanzada edad se realizaron a modo comparativo estudios autorradiográficos de penetración de ^{14}C -paratión similares a los realizados en insectos adultos. En este caso, el perfil de distribución del ^{14}C -paratión en tegumento fue muy diferente al observado en adultos como se muestra en la Figura 14. En efecto, la autorradiografía muestra una distribución más uniforme en todo el tegumento, sugiriendo que en ninfas V no habría sitios preferenciales para la penetración.

IIIc - Estructura del tegumento de adultos.

Se realizaron estudios histológicos sobre cortes sagitales y transversales de abdomen de insectos adultos. Los resultados obtenidos, luego de la tinción de hematoxilina-eosina se observan en las Figuras 15 y 16. Las mismas muestran en detalle la membrana intersegmental y la unión entre tegumento dorsal y ventral, respectivamente. Como ya se describiera en el punto Ia esta tinción permite reconocer la exocutícula amarilla de la endocutícula rojiza. En las mencionadas Figuras se puede apreciar que, tanto la cutícula correspondiente a la membrana intersegmental como la de la unión dorso-ventral se encuentran formadas fundamentalmente por endocutícula.

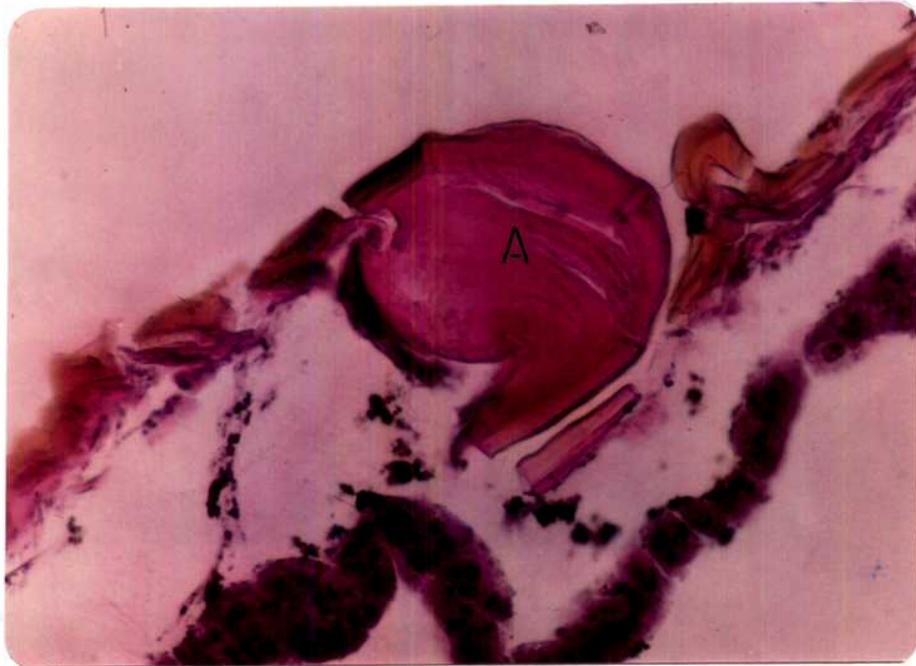
Figura 14: Autorradiografía del tegumento dorsal de ninfa V post tónico con ^{14}C -paratión y lavado con acetona (3.3x).



Figura 15: Corte sagital de abdomen (tegumento dorsal) de *Triatoma infestans* adulto. (100x).

Coloración de hematoxilina -eosina

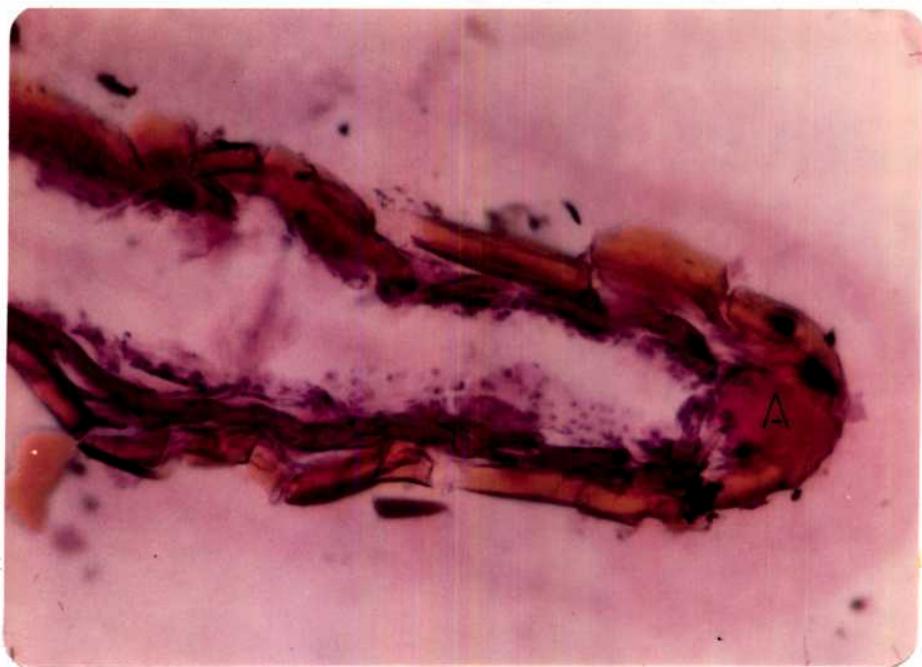
Rojos endotrucales
rojo en peritoneo



A = Membrana intersegmental

Figura 16: Corte transversal de abdomen de *Triatoma infestans* adulto (100x).

Coloración hematoxilina -eosina.



A = Unión de tegumento dorsal y ventral.

IIIId - Estructura del tegumento de ninfa V.

Un estudio histológico similar al realizado sobre insectos adultos se efectuó sobre ninfas V de edad avanzada.

Los resultados obtenidos luego de la tinción con hematoxilina-eosina se pueden observar en la Figura 17. El análisis de la misma indica que en este caso toda la cutícula aparece proporcionalmente más rica en endocutícula que lo que se observara en adultos.

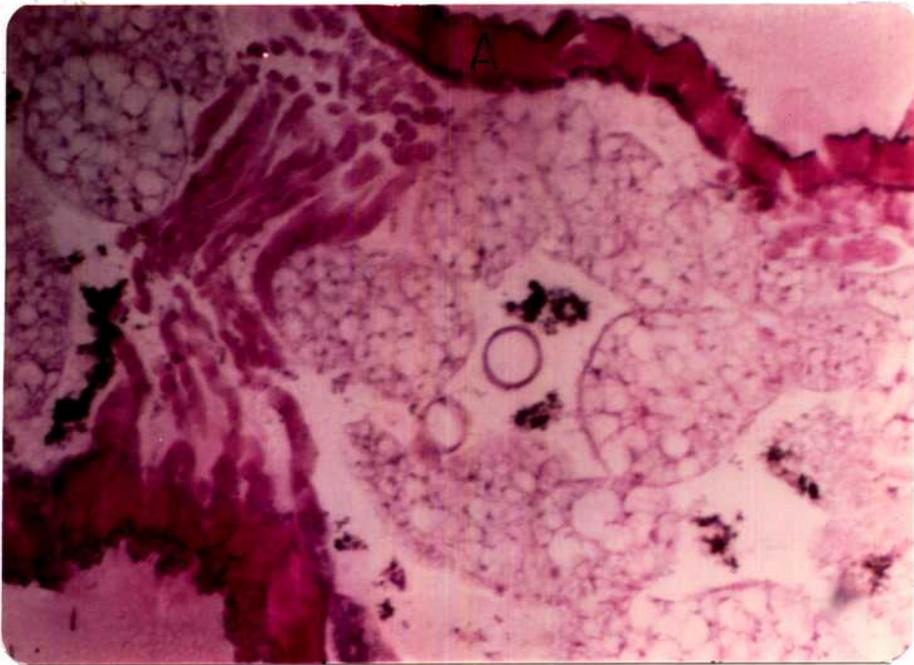
IIIe - Correlación entre estudios autorradiográficos e histológicos.

Los estudios autorradiográficos realizados en tegumentos de insectos adultos sugieren zonas más eficientes de penetración, que de acuerdo con las Figuras 10 y 11 corresponden a la membrana intersegmental y a la unión dorso-ventral. Estos posibles puntos preferenciales de ingreso corresponden a zonas menos rígidas que permiten la expansión del tegumento (2). El estudio histológico de estas zonas mostró, como ya se describiera, que las mismas son ricas en endocutícula (Figura 15 y 16). En el caso de las ninfas V toda la cutícula mostró ser rica en endocutícula y esto se correlacionó con la observación autorradiográfica de que la penetración estaría favorecida en toda la superficie del tegumento.

Tanto los resultados histológicos y autorradiográficos obtenidos en adultos y ninfas V parecen indicar que la penetración ocurre con mayor eficiencia a través de endocutícula. Esta hipótesis avalaría los sitios preferenciales de ingreso de paratión en adulto y la inespecificidad del ingre-

Figura 17: Corte sagital de abdomen de ninfa V de *Triatoma infestans* (40x).

Coloración de hematoxilina-eosina.



A = Cutícula.

so a través del tegumento de ninfas V.

En el caso de adultos la diferencia de la marca que se observa en las autorradiografías de membrana intersegmental de cara interna y externa podría ser debida a la morfología de esta membrana especialmente en lo que respecta al repliegue de la endocutícula. (Figuras 12 y 13).

IIIIf - Cinética de penetración.

Se midió comparativamente entre ninfas V y adultos la velocidad de penetración de ^{14}C mediante la técnica de "wash-off" ya descrita. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 3. En la misma se observan los porcentajes de penetración en función del tiempo y muestran un mayor ingreso de insecticida en ninfas V que alcanzó a un 58.6% a 4 horas frente a 23.4% para adultos.

Los resultados de la Tabla 3 demuestran una mayor eficiencia de penetración en ninfas V. Lo observado está en concordancia con nuestros resultados autorradiográficos e histológicos y avalan la hipótesis expuesta acerca de un ingreso favorecido de insecticidas liposolubles a través de endocutícula.

Tabla 3: Cinética de penetración de ¹⁴C-paratión en ninfas V y adultos de *Triatoma infestans*.

Tiempo (hs).	% penetración.		P
	Adultos	Ninfas V.	
2	10.9 ± 3.2	31.1 ± 3	0.003
4	23.4 ± 8.9	58.6 ± 6.8	0.003

Los resultados son promedio de al menos tres determinaciones independientes.

IV - EFECTO DE CARRIERS

•

Con el fin de evaluar la influencia de las propiedades físico-químicas, como también la dosis, de diferentes carriers sobre la velocidad y modo de penetración, se utilizaron como tales, aceites parafínicos no polares y polietilenglicoles (polares).

IVa - Efecto de la dosis de carrier sobre la velocidad de penetración.

En el caso de los carriers de baja polaridad (220-280 y HVI-95) la dosis utilizada en la formulación no parece tener gran influencia sobre la velocidad de penetración del ^{14}C -malatión (Tabla 4). Cuando se utilizan carriers polares (C20 y C400), los datos en Tabla 4 sugieren una tendencia a la disminución en la velocidad de penetración del ^{14}C -malatión al aumentar las dosis de carriers. Por otra parte, a dosis bajas se observa una gran dispersión en los valores de porcentaje de penetración. Considerando los datos obtenidos del estudio autorradiográfico que se discute en los siguientes puntos, ésto podría deberse a una ocupación irregular de los sitios de penetración por el carbowax. Este fenómeno se haría más notable a bajas dosis o tiempos cortos de penetración. Aún así, los carriers polares, en general, reducen la velocidad de penetración del ^{14}C -malatión respecto del control (Tabla 4).

IVb - Efecto de la polaridad y viscosidad del carrier sobre la velocidad de penetración.

Tabla 4: Porcentaje de penetración (a 2 horas) de ¹⁴C-malati3n para formulaciones con diferentes dosis de carriers.

CARRIER		D O S I S D E C A R R I E R	
		50 ug/g*	250 ug/g*
NO POLARES	220 - 280	25.7 ± 4.3	30.8 ± 1.4
	HVI - 95	29.1 ± 0.5	20.0 ± 0.6
POLARES	C20M	25.5 ± 10.4	7.1 ± 0.9
	C 400	14.9 ± 10.6	9.3 ± 2.1

CONTROL (sin carrier): 24.8 ± 0.6.

*Dosis de carrier en ug de carrier/g de vinchuca.

Recuperaci3n promedio: (85.4 ± 7)%.

Los resultados que se muestran en la Tabla 5 sugieren, para el caso de los carriers no polares, que un aumento en la viscosidad del carrier produce una disminución en la velocidad de penetración del ^{14}C -malatión.

Este particular efecto de la viscosidad del carrier fue previamente informado por nuestro laboratorio para el caso particular de la penetración del ^{14}C -paratión (48).

En la relación con los carriers polares, la velocidad de penetración del ^{14}C -malatión, aparece como independiente de la viscosidad del carrier. Considerando la polaridad relativa de los carriers testeados se observa una relación inversa con la velocidad de penetración, es decir a mayor polaridad menor penetración. La polaridad se midió a través de la sumatoria de las constantes de Mac Reynolds (83).

IVc - Cinética de penetración de ^{14}C -carriers.

En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos al determinar la cinética de penetración de ^{14}C -Dotriacontane (elegido como representante de los carriers no polares) y ^{14}C -carbowax 4000 (elegido como ejemplo de carrier polar).

La extracción de ^{14}C -carriers por lavado con acetona parece ser más eficiente en el caso de ^{14}C -Dotriacontane. Sin embargo, a 1 hora de penetración, los valores de porcentaje de penetración para ambos carriers se estabilizan y no se observa una cinética clara. Este fenómeno podría explicarse considerando un posible binding de ^{14}C -carrier a cutícula ocurrido durante la primera hora de penetración, o bien, por una penetración rápida seguida

Tabla 5: Porcentaje de penetración de ¹⁴C-malati6n formulado con carrier de distinta polaridad y viscosidad.

CARRIER*	% penetraci6n		Polaridad relativa**
	1 hora	2 horas	
Aceite de baja viscosidad (220 - 280)	20 ± 10.7	30.8 ± 1.4	1.0
Aceite HVI - 95	15.6 ± 6.6	20.0 ± 0.6	
Ftalato de octilo	11.7 ± 0.3	13.9 ± 3.4	6.0
Carbowax 400	6.5 ± 4.6	9.3 ± 2.1	16.4
Carbowax 600	6.7 ± 1.7	16.5 ± 5.2	
Carbowax 20M	4.6 ± 0.2	7.1 ± 0.9	
Control	18.2 ± 5.1	24.8 ± 0.6	

* 250 ug carrier/g vinchuca.

** Medida por constantes de Mac Reynolds.

Recuperaci6n promedio: (93.6 ± 8)%.

Tabla 6: Porcentaje de penetración de ^{14}C -carriers.

CARRIER	1 hora	2 horas	4 horas
^{14}C -doctriacontane.	4.9 \pm 4.9	5.8 \pm 0.3	6.9 \pm 0.9
^{14}C -carbowax 4000.	27.5 \pm 5.4	22.0 \pm 0.6	23.8 \pm 4.1

Recuperación:

^{14}C -dotriacontane = (102.4 \pm 0.6) %.

^{14}C -carbowax 4000 = (90.5 \pm 0.7) %.

por una saturación del compartimiento interno. Los resultados obtenidos por autorradiografía de tegumento previo tópico con ^{14}C -carrier y lavado con acetona, que se discuten en el punto siguiente, avalan la primera teoría para el carrier no polar, ya que buena parte de la radioactividad queda retenida en tegumento y aparece en la autorradiografía. Para el caso del carbowax (carrier polar), la segunda posibilidad parece más adecuada ya que se observa muy poca radioactividad retenida en tegumento al realizar el estudio autorradiográfico correspondiente.

IVd - Estudios autorradiográficos de distribución.

1) ^{14}C - carriers.

Las autorradiografías de tegumento correspondiente a las Figuras 18, 19, 20 y 21 se obtuvieron luego del tópico dorsal "in vivo" del carrier correspondiente y disección sin previo lavado con acetona. El análisis de las mismas demostró una mayor migración superficial en tegumento dorsal para ^{14}C -carbowax respecto de ^{14}C -Dotriacontane. En este último caso parece existir una barrera neta de migración superficial representada por la membrana intersegmental. Asimismo, para el ^{14}C -carbowax, aparece radioactividad netamente asociada a la membrana intersegmental, fenómeno no observado para el ^{14}C -Dotriacontane (Figura 18 y 19). Esto podría atribuirse a la mayor afinidad del ^{14}C -carbowax por esta parte de la cutícula debido a su riqueza en endocutícula, el componente más polar de la cutícula.

Las Figuras 20 y 21 permitieron comprobar que la migración superficial hacia el tegumento ventral es mayor en el caso del ^{14}C -Dotriacontane

Figura 18: Autorradiografía del tegumento dorsal (cara externa) de *T. infestans* adulto obtenida luego de la topicación dorsal con ^{14}C -C4000, disección y exposición sin previo lavado con acetona. (1 hora de penetración a 25° C). (5x).



Figura 19: Autorradiografía del tegumento dorsal (cara externa) de *T. infestans* adulto obtenida luego de la topicación dorsal con ^{14}C -Dotriacontane, disección y exposición sin previo lavado con acetona. (1 hora de penetración a 25° C) (5x).



Figura 20: Autorradiografía de los tegumentos dorsal y ventral (cara externa) de *T. infestans* adulto obtenida luego de la topicación dorsal con ^{14}C -C4000, disección y exposición sin previo lavado con acetona (1 hora de penetración a 25° C) (3.3x).

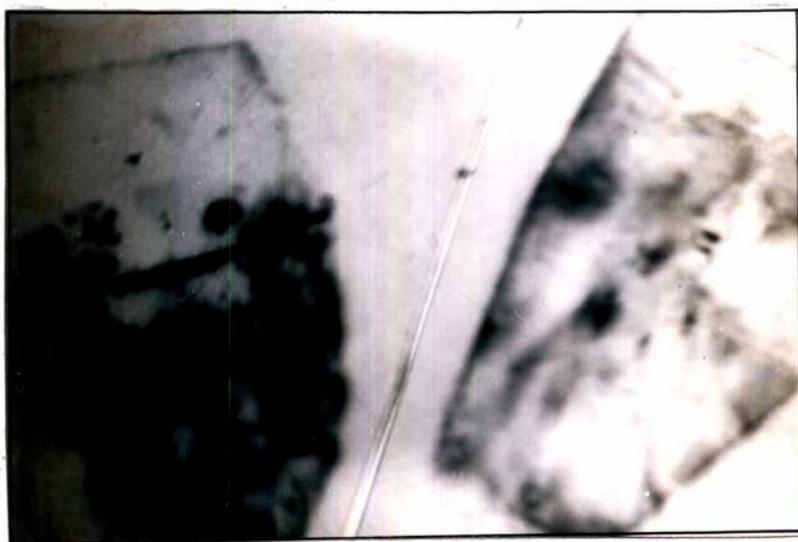


Figura 21: Autorradiografía de los tegumentos dorsal y ventral (cara externa) de *T. infestans* adulto obtenida luego de la topicación dorsal con ^{14}C -Dotriacontane, disección y exposición sin previo lavado con acetona (1 hora de penetración a 25° C) (3.3x).



respecto del ^{14}C -carbowax.

Las autorradiografías correspondientes a las Figuras 22 y 23 se obtuvieron en condiciones semejantes a las anteriores, pero previo a la disección, se realizó el lavado con acetona en iguales condiciones a las utilizadas para determinar la cinética de penetración.

Practicamente toda la radioactividad superficial asociada a tegumento se extrae con acetona en el caso de ^{14}C -carbowax, mientras que para ^{14}C -Dotriacontane aparece radioactividad asociada a tegumento que no es extraíble por este solvente. Por otra parte, el ^{14}C -carbowax asociado a membrana intersegmental también es removido por el lavado con acetona, ya que no se observa marca luego del mismo (comparación entre Figuras 18 y 22).

2) ^{14}C - malatión + carriers.

Las autorradiografías correspondientes a las Figuras 24 y 25 se obtuvieron luego del tópicico dorsal "in vivo" de ^{14}C -malatión formulado con carbowax 20M (carrier polar) ó 220-280 (carrier no polar) y disección sin previo lavado con acetona. El ^{14}C -malatión reproduce, en su distribución superficial, lo observado para los ^{14}C -carriers respectivos. Entonces, al formular con carrier no polar aparece una barrera en la migración por tegumento dorsal representada por la membrana intersegmental. La migración superficial por tegumento dorsal está favorecida en el caso de la formulación con carbowax, mientras que la migración superficial por tegumento ventral es más notable al formular con hidrocarburo.

Las autorradiografías de tegumento aislado luego del lavado con ace-

Figura 22: Autorradiografía del tegumento dorsal (cara externa) de *T. infestans* adulto obtenida luego de la topicación dorsal con ^{14}C -C4000, lavado con acetona, disección y exposición (1 hora de penetración a 25° C) (5x).



Figura 23: Autorradiografía del tegumento dorsal (cara externa) de *T. festans* adulto obtenida luego de la topicación dorsal con ^{14}C -Dotriacontane, lavado con acetona, disección y exposición (1 hora de penetración a 25° C) (5x).



Figura 24: Autorradiografía de los tegumentos dorsal y ventral (cara externa) de *T. infestans* obtenida luego de la topicación dorsal con ^{14}C -malatión formulado con C20M; disección y exposición sin previo lavado con acetona (1 hora de penetración a 25° C) (4x).



Figura 25: Autorradiografía de los tegumentos dorsal y ventral (cara externa) de *T. infestans* obtenida luego de la topicación dorsal con ^{14}C -malatión formulado con 220 - 280, disección y exposición sin previo lavado con acetona (1 hora de penetración a 25° C) (6x).



na aparecieron similares para el caso del ^{14}C -malatión (control) y ^{14}C -malatión + 220-280, excepto que en la formulación con hidrocarburo la migración hacia tegumento ventral es más acentuada. En estos casos, en tegumento dorsal la mayor concentración de compuesto radioactivo aparece en membranas intersegmentales. (Figura 26 y 27).

Cuando la formulación se realizó con carbowax 20M las autorradiografías revelaron sólo marca difusa en tegumento dorsal, no asociada en particular con membrana intersegmental. Esto avala nuestra hipótesis de que las membranas intersegmentales podrían ser sitios preferenciales de penetración considerando que el agregado de carrier polar disminuye notablemente la velocidad de penetración.

Figura 26: Autorradiografía de los tegumentos dorsal y ventral (cara externa) de *T. infestans* adulto obtenida luego de la topicación dorsal con ^{14}C -malatión formulado con 220-280, lavado con acetona, disección y exposición (1 hora de penetración a 25° C) (3.3x).



Figura 27: Autorradiografía de los tegumentos dorsal y ventral (cara externa) de *T. infestans* obtenida luego de la topicación dorsal con ^{14}C -malatión (control), lavado con acetona, disección y exposición (1 hora de penetración a 25° C) (3.3x).



V - RESUMEN Y CONCLUSIONES.

El proceso de penetración de insecticidas a través de tegumento representa el primer paso en la intoxicación de un insecto. El estudio del mismo y de las variables que influyen sobre su cinética tiene gran importancia en el entendimiento del modo de acción de insecticidas y en la optimización de su efecto letal sobre plagas. Por tal razón se consideró de interés realizar estos estudios en *T. infestans*, el vector más importante de la Enfermedad de Chagas en la Argentina.

En la primera parte de este trabajo se estudió el metabolismo degradante de insecticidas fosforados en tegumento dada su importancia como primer mecanismo bioquímico de defensa del insecto frente a la agresión con insecticidas.

Los resultados obtenidos indicaron lo siguiente:

- 1 - El tegumento de *T. infestans* adulto presenta actividad esterásica atribuible a carboxiesterasas, butirilesterasas y aril más acetilesterasas.
- 2 - Se encontró que la actividad enzimática se localiza principalmente en epidermis. Para este estudio de localización se identificó previamente cada parte constitutiva del tegumento mediante histología.
- 3 - La edad del insecto influye sobre la actividad de estererasas, observándose un pico de actividad una semana después de la muda.
- 4 - Esta actividad resultó dependiente del estado nutricional del insecto, decreciendo con el ayuno.
- 5 - Las estererasas tegumentales resultaron activas en la degradación de in-

insecticidas fosforados. En el caso del paratión la degradación fue atribuída a arilesterasas con actividad fosforotriesterásica que catalizarían la ruptura P-O-arilo.

En cambio para el malatión no se observó ruptura debida a fosforotriesterasas pero sí degradación del grupo carboxiéster promovida por carboxiesterasas. Mediante autorradiografía luego de la separación cromatográfica en placa delgada se identificaron el α y β -monoácidos del malatión como los metabolitos provenientes de la ruptura catalizada por carboxiesterasas.

La relevancia de esta vía metabólica degradante presente en tegumento está condicionada por la forma en que el insecticida ingresa. En efecto, si la penetración ocurre a través de todo el tegumento este metabolismo sería más operativo que si el ingreso ocurre por sitios preferenciales. Por tal razón se consideró de interés estudiar las vías de penetración de insecticidas a través del tegumento de *T. infestans*. De los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

1 - La membrana intersegmental y la unión dorso-ventral del tegumento aparecen como puntos preferenciales para el ingreso de insecticidas liposolubles en *T. infestans* adultos.

2 - Ambos sitios mostraron, a través de estudios histológicos, tener un mayor contenido relativo de endocutícula.

3 - Las ninfas V no parecen presentar sitios preferenciales de ingreso de insecticidas de acuerdo a los estudios autorradiográficos realizados.

4 - La estructura del tegumento de ninfas V resultó más rica en endocutícula que la de insectos adultos de acuerdo a los estudios histológicos reali

zados.

5 - La cinética de penetración de ^{14}C -malatión realizada en forma comparativa entre ninfas V y adultos indicó una mayor velocidad en el caso de ninfas V.

Lo expuesto permite concluir que existiría una correlación entre eficiencia de penetración y estructura del tegumento. En efecto, los tegumentos o las partes del mismo con mayor proporción de endocutícula serían más permeables a los insecticidas liposolubles.

Las conclusiones expuestas sobre el proceso de penetración permitieron tener un conocimiento del mismo, aunque no acerca de la forma de modificarlo a los fines de mejorar el control de la plaga. Con el objeto de complementar este trabajo a través de un aporte en esa dirección, se estudió el efecto de carriers sobre la velocidad y forma de penetración de insecticidas.

Las conclusiones obtenidas fueron las siguientes:

- 1 - La cinética de penetración del ^{14}C -malatión en *T. infestans* adulto fue modificada por diferentes carriers influyendo las propiedades de los mismos sobre este efecto.
- 2 - Un aumento en la polaridad del carrier produce una reducción en la velocidad de penetración. Esto podría deberse a una acumulación del carrier polar en las membranas intersegmentales, cuya estructura es más polar. Este fenómeno generaría en los sitios preferenciales de ingreso de insecticidas un verdadero "tapón lipofóbico" que dificultaría la penetración de compuestos lipofílicos como el malatión.

3 - Un aumento en la viscosidad de los carriers produce una reducción en la velocidad de penetración. Este fenómeno es más notable en el caso de los carriers no polares, resultado ya observado previamente en nuestro laboratorio. Se podría explicar esta influencia a través de dos hipótesis:

Si la penetración en parte, ocurre a través de un proceso de percolación se justificaría la mayor velocidad para los fluídos de menor viscosidad. Por otra parte, el proceso primario de distribución sobre la superficie del tegumento que influye sobre la velocidad de penetración estaría favorecido en los carriers de baja viscosidad.

Como resultado de este trabajo ha mejorado el conocimiento sobre la interacción entre insecticidas y tegumento de insectos. En general ésto se puede considerar un aporte al campo de la toxicología en insectos. Siendo nuestro sistema modelo el *T. infestans*, las conclusiones expuestas pueden ser consideradas un punto de partida que permita mejorar el control mediante insecticidas de esta plaga, cuya relevancia desde el punto de vista de la salud pública es ampliamente conocida.

Two handwritten signatures in black ink. The signature on the left is more compact and stylized, while the one on the right is more elongated and cursive.

BIBLIOGRAFIA

- 1 - Locke M., en "The physiology of insecta", 2da. ed. Vol. VI, editado por M. Rockstein, Academic Press, New York, 1974.
- 2 - Wigglesworth V.B., "The principles of insect physiology", 7ma. ed., Chapman and Hall, London, 1974.
- 3 - Lai Fook J. (1966). J. Insect Physiol., 12, 195-226.
- 4 - Hackman R.H., en "The physiology of insecta", 2da. ed. Vol. VI, editado por M. Rockstein, Academic Press, New York, 1974.
- 5 - Katzenellenbogen B.S. y Kafatos F.C. (1971a). J. Insect Physiol., 17, 823-832.
- 6 - Katzenellenbogen B.S. y Kafatos F.C. (1971b). J. Insect Physiol., 17, 775-800.
- 7 - Locke M. (1961). J. Biophys. & Biochem. Cytol., 10, 589-618.
- 8 - Kapin M. y Ahmad S., Insect Biochem., 10, 331-337.
- 9 - Sternburg J. y Kearns C.N. (1952). J. Econ. Entomol., 45, 497.
- 10 - Quraishi M.S. (1970), Can. Ent., 102, 1189-1195.
- 11 - Ahmed H. y Gardner B.G. (1970), Pestic. Sci., 1, 217-219.
- 12 - Fercovich S.M., Oliver J.E. y Dillard C. (1982). J. Chem. Ent., 8, 859-866.
- 13 - Ahmad S. (1970). Comp. Gen. Pharmac., 1, 273-279.
- 14 - Singh G.J.P. y Thornhill R.A. (1980). Gen. Pharmacol., 11, 283.
- 14 bis- Singh G.J.P. (1981), Pestic. Biochem. Physiol., 16, 256-266.

- 15 - Matsumura F., "Toxicology of Insecticides", 2da. edición, Plenum Press, New York, 1976.
- 16 - Krueger H.R. y O'Brien R.D. (1959). J. Econ. Entomol. 52, 1063.
- 17 - Matsumura F. y Brown A.W.A. (1961). J. Econ. Entomol. 54, 1176.
- 18 - Gomori G. (1952), "Microscopic histochemistry. Principles and Practice". Universidad de Chicago Press, Chicago.
- 19 - Aldridge W. (1953), Biochem. J., 53, 110.
- 20 - Aldridge W. (1953) Biochem. J., 53, 117.
- 21 - Holmes R. y Masters C., (1967). Biochem. Biophys. Acta. 132, 379.
- 22 - Olson W.P. y O'Brien R.D. (1963). J. Insect Physiol., 9, 777.
- 23 - Treherene J.E. (1957). J. Insect Physiol. 1, 178.
- 24 - Gerolt P. (1969). J. Insect Physiol., 15, 563.
- 25 - Gerolt P. (1970). Pestic. Sci., 1, 209.
- 26 - Gerolt P. (1972). Pestic. Sci., 3, 43.
- 27 - Gerolt P. (1975). Pestic. Sci., 6, 223.
- 28 - Olson W.P. (1973). Pestic. Biochem. Physiol., 3, 384.
- 29 - Yeager F.J. y Munson S.C. (1945). Science, 102, 305.
- 30 - Matsumura F. (1959). M.S. Thesis, University of Alberta, Edmonton, Canadá.
- 31 - Benezet H.J. y Forgash A.J. (1972). J. Econ. Entomol. 65, 895.
- 32 - Quraishi M.S. y Poonawalla Z.T. (1969). J. Econ. Entomol., 62, 988.
- 33 - Sellers L.G. y Guthrie F.E. (1971). J. Econ. Entomol., 64, 352.

- 34 - Welling W. (1977). *Ann. Rev. Entomol.* 22, 53.
- 35 - Polles S.G. y Vinson S.B. (1972). *J. Agric. Food Chem.*, 20, 38.
- 36 - Burt P.E. y Lord K.A. (1968). *Ent. Exp. Appl.*, 11, 55.
- 37 - Burt P.E., Lord K.A., Forrest J.M. y Goodchild R.E. (1971). *Ent. Exp. Appl.* 14, 255.
- 38 - Brooks G.T. en "Insecticide Biochemistry and Physiology", editado por Wilkinson C.F., Plenum Press, New York, 1976.
- 39 - Lehninger A.L. "Bioquímica", 4a. ed., Ediciones Omega, Barcelona, 1981.
- 40 - Welling W. y Paterson G.D. en "Comprehensive insect physiology, biochemistry and Pharmacology". Vol. 12, editado por Kerkut G.A. y Gilbert L. I., Pergamon Press, Oxford, 1984.
- 41 - Olson W.P. y O'Brien R.D. (1963). *J. Insec. Physiol.*, 9, 777.
- 42 - Elliot M., Ford M.G. y Janes N.F. (1970). *Pestic. Sci.*, 1, 220.
- 43 - Kurihara N. (1970), *Botyn Kagaku*, 35, 56.
- 44 - Matsumura F. (1963). *J. Ins. Physiol.*, 9, 207.
- 45 - Olson W.P. (1970), *Comp. Biochem. Physiol.*, 35, 273.
- 46 - Armstrong G., Bradbury F.R. y Standen H. (1951). *Nature*, 167, 319.
- 47 - Penniston J.T., Beckett L., Bentley D.L. y Hansch C., (1969). *Mol. Pharmacol.* 5, 333.
- 48 - Licastro S.A., Zerba E.N. y Casabé N.B. (1983). *Pestic. Biochem. Physiol.* 19, 53.
- 49 - Sawicki R.M. y Lord K.A. (1970). *Pestic. Sci.*, 1, 213.

- 50 - Poonawalla Z.T. y Quraishi M.S. (1970). *Can. Ent.*, 102, 1136.
- 51 - Hewlett P.S. (1958). *Ann. Appl. Biol.*, 46, 37.
- 52 - Hadaway A.B., Barlow F. y Flower L.S. (1976). Ministry of Overseas Development, Miscellaneous report n° 22, Centre for Overseas Pest Research, College House, Whrights Lane, London W8 5SJ, U.K.
- 53 - Kurihara N. (1973). *Pestic. Biochem. Physiol.* 4, 12.
- 54 - Ahmed H. y Gardiner B.G. (1967). *Nature*, 214, 1338.
- 55 - Schouest L.P. Jr., Umetsu N. y Miller T.A. (1983). *J. Econ. Entomol.*, 76, 973.
- 56 - Weismann R. . *Journees des Travaux* (1955), 69, 104.
- 57 - Patil V.L. y Guthrie F.E. (1979a). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 11, 13.
- 58 - Patil V.L. y Guthrie F.E. (1979b). *Pestic. Sci.* 10, 399.
- 59 - O'Kane W.C., Walker G.L., Guy H.G. y Smith O.J. (1933). *New Hampshire Univ. Agr. Expt. Sta. Tech. Bull.* 54, 1.
- 60 - Ebeling W. en "The Physiology of Insecta". 2da. ed., Vol. VI, editado por M. Rockstein, Academic Press, New York, 1974.
- 61 - Wigglesworth V.B. (1942). *Bull. Entomol. Res.*, 33, 205.
- 62 - Metcalf R.L. y McKelvey J.J. Jr., "The Future for Insecticides: Needs and Prospects". Vol. 6, John Wiley & sons, U.S.A., 1976.
- 63 - Locke M. en "The Future for Insecticides: Needs and Prospects", Vol. 6, editado por Metcalf R.L. y McKelvey J.J. Jr., John Wiley & sons, U.S.A., 1976.

- 64 - "Enfermedad de Chagas. Informe de un Grupo de Estudios". Informe técnico OMS n° 202 (1960).
- 65 - "Enfermedades Endémicas". Ministerio de Cultura y Educación, SECYT. Programas Nacionales. República Argentina. (1979).
- 66 - Di Fiore, "Diagnóstico Histológico". Vol. I. El Ateneo, Buenos Aires (1974)
- 67 - Ellman G., Courtney K., Andres V. y Featherstone R. (1961), *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88.
- 68 - Wood E.J. (1978). Tesis, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- 69 - Lowry O.H., Rosebrough N.J., Fan A.L. y Randall R. (1951). *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- 70 - Jameson G.W., MacFarlane J.R. y Hogan T.W. (1976). *Insect Biochem.*, 6, 59.
- 71 - Talcott R.E. (1979). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 47, 145.
- 72 - Wood E.J., de Villar M.I.P. y Zerba E.N. (1984). *Pestic. Biochem. Physiol.*, en prensa.
- 73 - Welling W. y Blaakmer P.T. (1971). Proc. 2nd. Int. IUPAC Congr. Pestic. Chem., II, 61, (Editado por Tahori A.), Gordon y Breach, New York.
- 74 - Welling W y de Vries J.W., Paterson G.D. y Duffy M.R. (1983). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 20, 360.
- 75 - Davis B.J. (1964). *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 404.
- 76 - de Kort C.A.D. y Granger N.A. (1981). *A. Rev. Entomol.*, 26, 1.
- 77 - Mitsui T., Riddiford L.M. y Bellamy G. (1979), *Insect Biochem.*, 9, 16.

- 78 - Hillerton J.E. (1978). J. Insect Physiol., 24, 399.
- 79 - Reynolds S.E. (1975). J. Exp. Biol., 62, 81.
- 80 - Devonshire A.L. y Moores G.D. (1982), Pestic. Biochem. Physiol., 18, 235.
- 81 - Dauterman W.C. en "Insecticide Biochemistry and Physiology", editado por C.F. Wilkinson, Plenum Press, New York, 1976.
- 82 - Malkenson N.C. de, Wood E.J. y Zerba E.N. (1984). Insect Biochem., 14, 481.
- 83 - Mc Reynolds W.O. (1970). J. Chromatog. Sci., 8, 685.