

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

COMPOSICIÓN Y METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS
GRASOS EN EL TRIATOMA INFESTANS

TESIS

MIGUEL ANSEL TIERRA

1979

Padrino de tesis:

Prof. Dr. Rodolfo R. Brenner

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas fue realizado en la Cátedra de Bioquímica del Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata.

A mis Maestros

Mi agradecimiento:

Al Dr. Rodolfo R. Brenner por su orientación y ejemplo.

A la Dra. Elsa Segura y a la Sra. Magdalena de Deffis del Instituto de Investigación y Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas "Fatala Chaben" por sus valiosas sugerencias y suministro permanente de insectos.

Al Dr. Ricardo Ronderos de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo por su asesoramiento entomológico.

A la Srta. María C. Estivariz del mismo lugar, por su eficaz colaboración en las disecciones de los insectos.

Al personal de la Cátedra de Bioquímica del Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas por su colaboración.

Al Departamento Audiovisual de la Facultad de Ciencias Médicas por la realización de los dibujos de este trabajo.

FE DE ERRATAS

Pág.	Renglón	Dice	Debe decir
36	31	página siguiente	página 49
41	16	A continuación 3 lavados del crisol filtrante con 3, 2 y 2 ml respectivamente	A continuación 3 lavados del crisol filtrante con 3, 2 y 2 ml de solución de Folch respectivamente
52	Fig. 14	Falta leyenda	Se utilizaron 3 lotes de cada estadio. Los de Huevo y Ninfa I contenían 150 individuos, los de Ninfa II, 50; los de Ninfa III, 10; los restantes estadios 5 individuos por lote. Los puntos corresponden a valores promedio y las barras señalan valores extremos.
54	Fig. 15	Falta leyenda	Insectos obtenidos en Agosto. Valores promedio del análisis de 2 y 3 lotes de 5 individuos. Las barras señalan valores extremos.
66	Tabla IX	12.000 x g	10.000 x g - 30 min.
67	Tabla X	12.000 x g	10.000 x g - 30 min.
73	32	pudiendo ocurrir alimentaciones	pudiendo ocurrir que alimentaciones
75	2	fosfatidiletanolamina, una mayor...	fosfatidiletanolamina, tiene una mayor...

INDICE

<u>INTRODUCCION</u>	<u>Página</u>
1) Los insectos. Generalidades.	1
2) Desarrollo y crecimiento.	1
3) Hormonas y su acción sobre el desarrollo de los insectos.	2
4) Las feromonas: un lenguaje químico en los insectos.	3
5) Bioquímica de los insectos.	
a) Digestión y absorción.	4
b) El músculo volador.	5
c) Algunos aspectos diferenciales del metabolismo de los hidratos de carbono en los insectos.	5
d) Algunos aspectos propios de insectos en el metabolismo de aminoácidos.	9
e) La cadena respiratoria.	12
f) Los lípidos y su metabolismo en insectos.	
f ₁) Lípidos en insectos.	13
f ₂) Contenido lipídico y composición.	13
f ₃) Absorción de lípidos de la dieta y su incorporación a los lípidos del cuerpo graso.	15
f ₄) Degradación de los lípidos por el cuerpo graso.	16
f ₅) Biosíntesis de lípidos.	18
Insecto entero.	19
Cuerpo graso.	21
Biosíntesis a partir de precursores no lipídicos.	22
Control hormonal de la biosíntesis de lípidos.	24
6) <i>Triatoma infestans</i> . Relación con la enfermedad de Chagas.	25
7) <i>Triatoma infestans</i> . Ubicación sistemática.	26
8) Anatomía externa e interna.	26

9) Biología del <i>Triatona infestans</i>	29
10) Fundamento del trabajo.	30

MATERIALES Y METODOS

1) Crianza de los insectos.	31
2) Disección de los insectos.	31
3) Sistema para la alimentación artificial de los insectos.	
a) Aparato.	32
b) Solución alimenticia artificial	32
4) Inyección de precursores marcados.	33
5) Extracción de los lípidos.	34
6) Obtención de ésteres metílicos	34
a) Del extracto lipídico.	35
b) De las mezclas de incubación.	35
7) Cromatografía gas-líquida.	36
a) Corrida cromatográfica.	36
b) Identificación de los ácidos grasos.	36
b ₁) Comparación con standards.	36
b ₂) Relaciones de Ackman.	37
b ₃) Hidrogenación.	37
c) Cuantificación de ácidos grasos.	38
d) Los ácidos grasos marcados.	38
8) Análisis cuali- cuantitativo de lípidos. Cromatografía en capa fina.	
a) Preparación y corrida de las placas.	39
b) Identificación de los lípidos	
b ₁) Lípidos neutros.	39
b ₂) Lípidos polares.	40
c) Cuantificación de los lípidos por densitometría.	41
9) Análisis de la distribución de ácidos grasos en las clases lipídicas más importantes.	43
10) Métodos analíticos.	
a) Homoginización de tejidos.	43
b) Fraccionamiento subcelular.	44
c) Determinación de proteínas.	45

- d) Ensayo de actividad de ácido graso sinte
tasa. 46

RESULTADOS

- 1) Contenido lipídico. 47
- 2) Composición de ácidos grasos.
- a) Composición de ácidos grasos totales. 47
 - b) Variación de la composición de los ácidos grasos durante el ciclo evolutivo. 50
 - c) Composición de ácidos grasos en diferentes épocas del año. 52
 - d) Relación de la composición de ácidos grasos con la dieta. 54
- 3) Composición de clases de lípidos totales. 55
- 4) Composición de ácidos grasos de las principales clases de lípidos. 59
- 5) Una solución para la alimentación del *Triatoma infestans*. 61
- 6) Biosíntesis de ácidos grasos "in vivo".
- a) Alimentación con $1-^{14}\text{C}$ acetato 62
 - b) Inyección de $1-^{14}\text{C}$ acetato 63
 - c) Inyección de $1-^{14}\text{C}$ palmitato y $1-^{14}\text{C}$ este
arato. 63
- 7) Biosíntesis de ácidos grasos "in vitro" 64
- 8) Estudio de las fracciones subcelulares. 69
- a) Glucosa-6-fosfatasa 69
 - b) NADPH-citocromo c reductasa 70
 - c) Succinato-citocromo c reductasa 70

DISCUSION 72

CONCLUSIONES 80

BIBLIOGRAFIA 82

I N T R O D U C C I O N

1) Los insectos. Generalidades.

Los insectos constituyen dentro del Reino animal la clase más abundante en especies y en número. Hay descritas aproximadamente un millón de especies. Su antigüedad sobre el planeta y la diversidad de nichos ecológicos que ocupan nos indican una gran capacidad de adaptación.

2) Desarrollo y crecimiento.

La mayoría de los insectos eclosionan (rompen el corión que es una cubierta que envuelve al huevo) dando lugar a un estado morfológico que difiere del imago o insecto adulto. En consecuencia, para llegar a adulto el insecto debe pasar a través de cambios profundos tanto morfológicos como fisiológicos, que se conocen como metamorfosis.

Los insectos alados (Pterigota) pueden dividirse en dos grandes grupos de acuerdo al grado de metamorfosis que sufren: Hemimetábola y Holometábola.

En los Hemimetábola los insectos inmaduros (ninfas) se parecen a los adultos difiriendo de ellos por no tener alas, gónadas y genitales externos, además del tamaño. Los órdenes que pertenecen a este grupo son los Exopterigota, en los que las alas en desarrollo son vistas externamente como "esbozos alares". Puesto que el exoesqueleto de los insectos es rígido el crecimiento gradual les está impedido. Todo aumento de tamaño se lleva a cabo a través de una "muda" o "ecdisis" que no es más que el abandono del viejo exoesqueleto ("exubio") estrecho por uno nuevo más amplio. En los Hemimetábola se producen 5 mudas desde ninfa de estadio I hasta adulto. Aunque existe una transición gradual hasta llegar a adulto alado en condiciones de reproducirse, hay una metamorfosis notoria entre el estadio ninfal V y el adulto. En este momento tiene lugar la deposición de una nueva cutícula de naturaleza diferente, con extensa Histólisis de órganos internos caducos y crecimiento de otros nuevos adecuados a la vida adulta, como músculos alares y gónadas.

Evolutivamente los hemimetábolos son más primitivos que los holometábolos. El "Triatoma infestans" es un hemimetábol

lo. El desarrollo holometábolo es observado en los Endopterigota, en los que las alas se desarrollan internamente. En este caso la metamorfosis comprende 2 mudas especiales. La eclosión del huevo da lugar a la larva que crece por su cesivas mudas, pasando en la última al estado de "pupa". Es entonces cuando se producen profundos cambios en los cu les los tejidos larvales son destruidos y se forman los del adulto adaptando a éste a un nicho ecológico y función distintos. (1)

3) Hormonas y su acción sobre el desarrollo de los insectos.

Las mudas y la metamorfosis que ocurren en los insectos están bajo control hormonal. El sistema neuroendócrino en insectos comprende al cerebro y las glándulas asociadas e inervadas por él: la "corpora cardíaca" y la "corpora allata" (productora de hormona juvenil); además en el protórax, un par de glándulas ("protorácicas") producen la hormona de muda o ecdisona. Estímulos diversos: cambios de temperatura, fotoperíodo, distensión del intestino por la alimentación inducen a las células neurosecretoras del cerebro a producir hormona protorácicotrófica que pasa a la hemolinfa (medio líquido que baña los órganos internos de los insectos). Esta hormona estimula a su vez a las glándulas protorácicas que responden con la síntesis y/o liberación de hormona de muda. Bajo control cerebral directo la "corpora allata" secreta la hormona juvenil. (2)

La hormona de muda es la iniciadora de la muda, en tan to que la hormona juvenil determina la salida morfológica de ella (larva, pupa o imago en holometábolos; ninfa o imago en hemimetábolos). Así el conjunto de ambas hormonas definen cuál ha de ser el siguiente estadio. En los hemimetábolos, un nivel alto de hormona juvenil con un nivel inductor de hormona de muda producen mudas a estadios ninfales.

La disminución de la hormona juvenil en circulación con un nivel inductor de hormona de muda producen muda a estadio adulto.

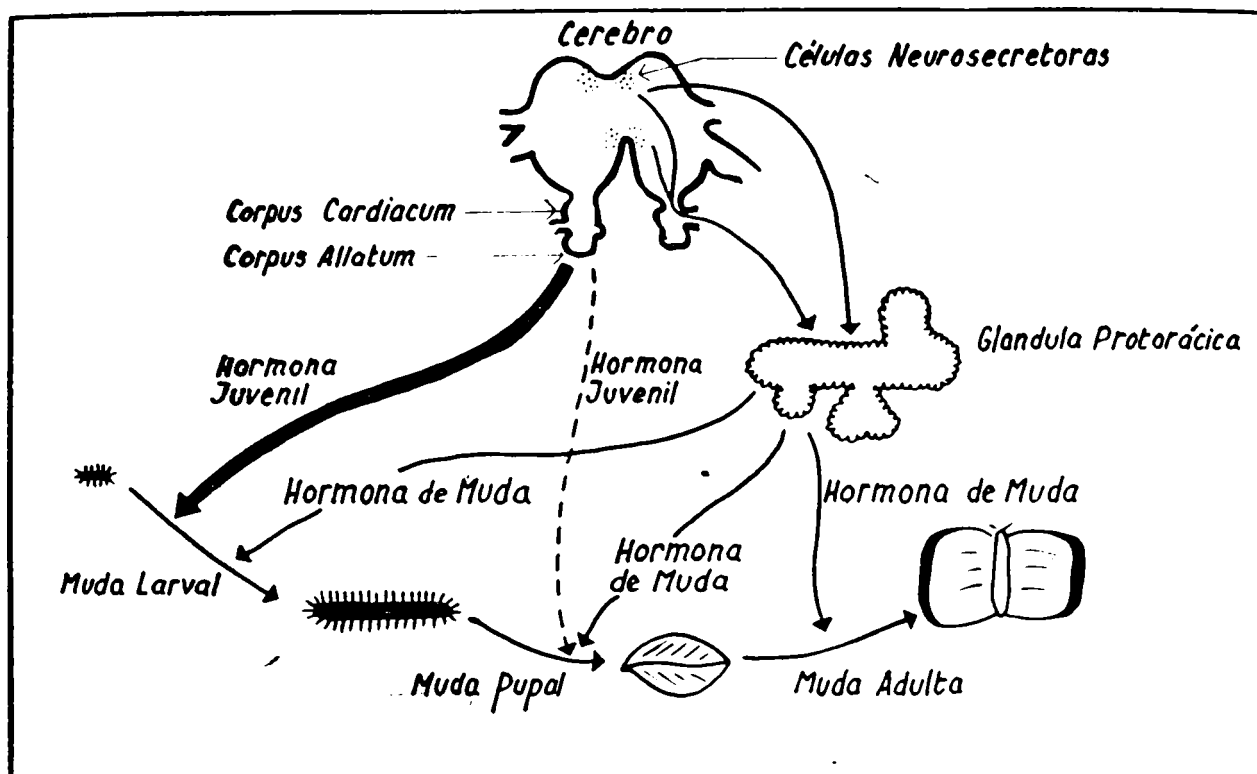


Fig.1 Esquema clásico del control hormonal de la muda y la metamorfosis en un insecto holometábolo.

4) Las feromonas: un lenguaje químico en los insectos.

Se llaman feromonas a compuestos químicos que transmiten señales entre individuos de la misma o distinta especie originando cambios en el comportamiento. Se conocen dos tipos de feromonas: "liberadoras" e "iniciadoras". Son "liberadoras" aquellas que ocasionan cambios inmediatos del comportamiento. Son "iniciadoras" cuando luego de su recepción se producen cambios fisiológicos que finalmente causan alteración del comportamiento. (3) Puesto que el medio que separa a los insectos terrestres es el aire se requiere que estos compuestos sean volátiles. La mayoría de las feromonas conocidas son derivados de terpenos y ácidos grasos. (4)

Los receptores para las mismas generalmente están ubicados en las antenas. Butenandt(5) demostró que la resección de éstas eliminaba toda respuesta sexual del macho de la mariposa emperador. Además de las adaptaciones metabólicas, el lenguaje químico ha sido un valioso medio para la prosperidad de los insectos en el planeta favoreciendo su reproducción y la conservación de las especies.

Entre las feromonas liberadoras están: las de alarma que alertan sobre un peligro; las de reclutamiento que reúnen al grupo (en los insectos sociales) para la defensa, o para señalar el camino a casa o al alimento. Entre las feromonas iniciadoras tenemos el ejemplo bien estudiado de la abeja reina: tiene una feromona que inhibe el desarrollo de los ovarios en las obreras. (3)

5) Bioquímica de los insectos.

a) Digestión y absorción.

Los insectos cuentan con enzimas digestivas que les permiten degradar el alimento. A veces son microorganismos simbióticos los que realizan la tarea.(1) Las larvas del escarabajo agujereador de la madera tienen enzimas celulásicas y junto a algunos miembros de Mollusca son hasta ahora los únicos animales con estas actividades.(6) En general se encuentra una buena correlación entre la composición del alimento y las actividades enzimáticas que permiten degradarlo: un insecto omnívoro como la cucaracha segrega proteasas, lipasas, amilasas, invertasa y maltasa que hidrolizan proteínas, grasas, almidón, sacarosa y maltosa respectivamente, sustancias que pueden encontrarse en su dieta (7,8); en *Glossina morsitans* que es hematófaga se han encontrado proteasas muy activas(9).

Los mecanismos de absorción varían con las especies. A diferencia de los mamíferos los pocos insectos estudiados no muestran transporte activo de monosacáridos a través de la pared intestinal. Aparentemente los monosacáridos serían absorbidos por difusión pasiva, ésta se vería facili-

///

tada por la rápida conversión a trehalosa que realiza el cuerpo graso que envuelve el intestino(10). En la hemolinfa de los insectos se encuentran gran cantidad de aminoácidos libres(hasta 50 veces la concentración en sangre de vertebrados). Esto es una dificultad para un mecanismo activo de absorción puesto que sería muy costoso desde el punto de vista energético. En la langosta *Schistocerca gregaria* se ha observado difusión de aminoácidos a través del intestino medio a la hemolinfa, pudiendo este proceso estar vinculado con una mayor extracción de agua desde el mismo, con lo que se produciría un gradiente de entrada(10).

b)El músculo volador.

Una característica de los insectos es el gran consumo de energía que realizan ciertos tejidos en ciertas circunstancias. En consecuencia es conveniente mencionar algunas características fisiológicas de uno de los tejidos más estudiados en insectos: el músculo volador. Su consumo de O_2 en actividad puede llegar a ser 50 a 100 veces mayor al del reposo(11). El alto consumo de O_2 por unidad de peso y el alto grado de control han hecho de este tejido el de elección para el estudio de las oxidaciones biológicas y el transporte electrónico. Una profusa cantidad de traqueolas llega hasta muy cerca de las mitocondrias suministrando adecuadamente el O_2 . El combustible de vuelo usado(glúcidos, lípidos o aminoácidos) varía con las especies y suele estar indicado por el cociente respiratorio.

c)Algunos aspectos diferenciales del metabolismo de los hidratos de carbono en insectos.

Los hidratos de carbono más importantes como reserva energética en insectos son el glucógeno y el disacárido trehalosa. El glucógeno se almacena principalmente en el cuerpo graso, músculo volador e intestino. La trehalosa es el glúcido más importante en la hemolinfa de muchos insectos, aunque también está presente en el cuerpo graso dónde ///

se sintetiza y en el músculo(12). Puesto que la trehalosa ocupa una posición central como forma de transporte de glúcidos a los distintos tejidos, la regulación de la síntesis y degradación del glucógeno en el cuerpo graso debe acusar esta peculiaridad. En el siguiente gráfico se esquematizan las interconversiones entre glucosa, trehalosa y glucógeno.

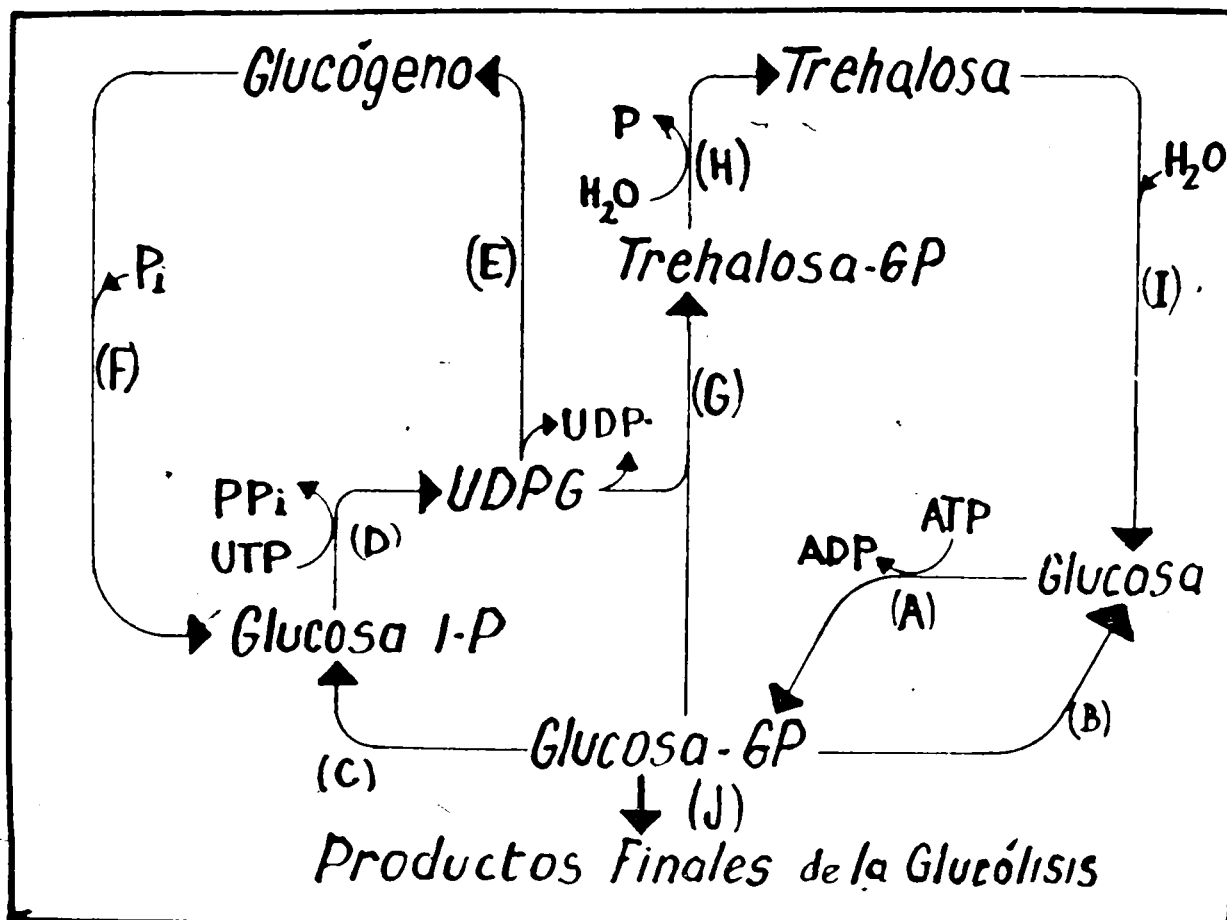


Fig. 2 Interconversión de glucosa, glucógeno y trehalosa. A-Hexokinasa; B-Glucosa-6-fosfatasa; C-Fosfoglucomutasa; D-UDP-glucosa pirofosforilasa; E-Glucógeno sintetasa; F-Glucógeno fosforilasa; G-Trehalosa-6-P sintetasa; H-Trehalosa-6-P fosfatasa; I-Trehalasa; J-Glucólisis.

El metabolismo de los hidratos de carbono parece seguir en líneas generales el modelo conocido en vertebrados, al menos en los tejidos de insectos hasta ahora estudiados (12). Por las razones arriba apuntadas, en el músculo volador se han observado variantes de interés. La glucólisis en insectos transcurre por la vía conocida, pero en este tejido está adecuada para permitir realizar la oxidación de hexosas con alta eficiencia a CO₂ y H₂O(11). Esto es concretado por las altas actividades citosólicas de gliceraldehído-3-P deshidrogenasa (G-3-PD-NAD dependiente), la que oxida el NADH formado ///

en la glucólisis (Las mitocondrias de insectos al igual que las de vertebrados, son impermeables al NADH y al NADPH), produciendo glicerol-3-P estequiométricamente. Este atravesando la membrana externa de la mitocondria es oxidado en la interna por una actividad homóloga (G-3-PD-FAD dependiente) con lo que los equivalentes de reducción resultan transferidos del citosol a la mitocondria. Por otro lado la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) que es alta en músculos muy activos durante poco tiempo (músculos de patas de insectos) con largos períodos de recuperación, es baja en los músculos voladores de langosta que son muy activos durante mucho tiempo: la relación de actividades específicas G-3-PD/LDH alcanza el valor de 100 (13). Así los productos finales de la glucólisis en este tejido son glicerol-3-P y ácido pirúvico que la adecúan a una completa oxidación mitocondrial, especialmente en insectos con alta frecuencia de movimiento de alas: Díptera, Hymenóptera.

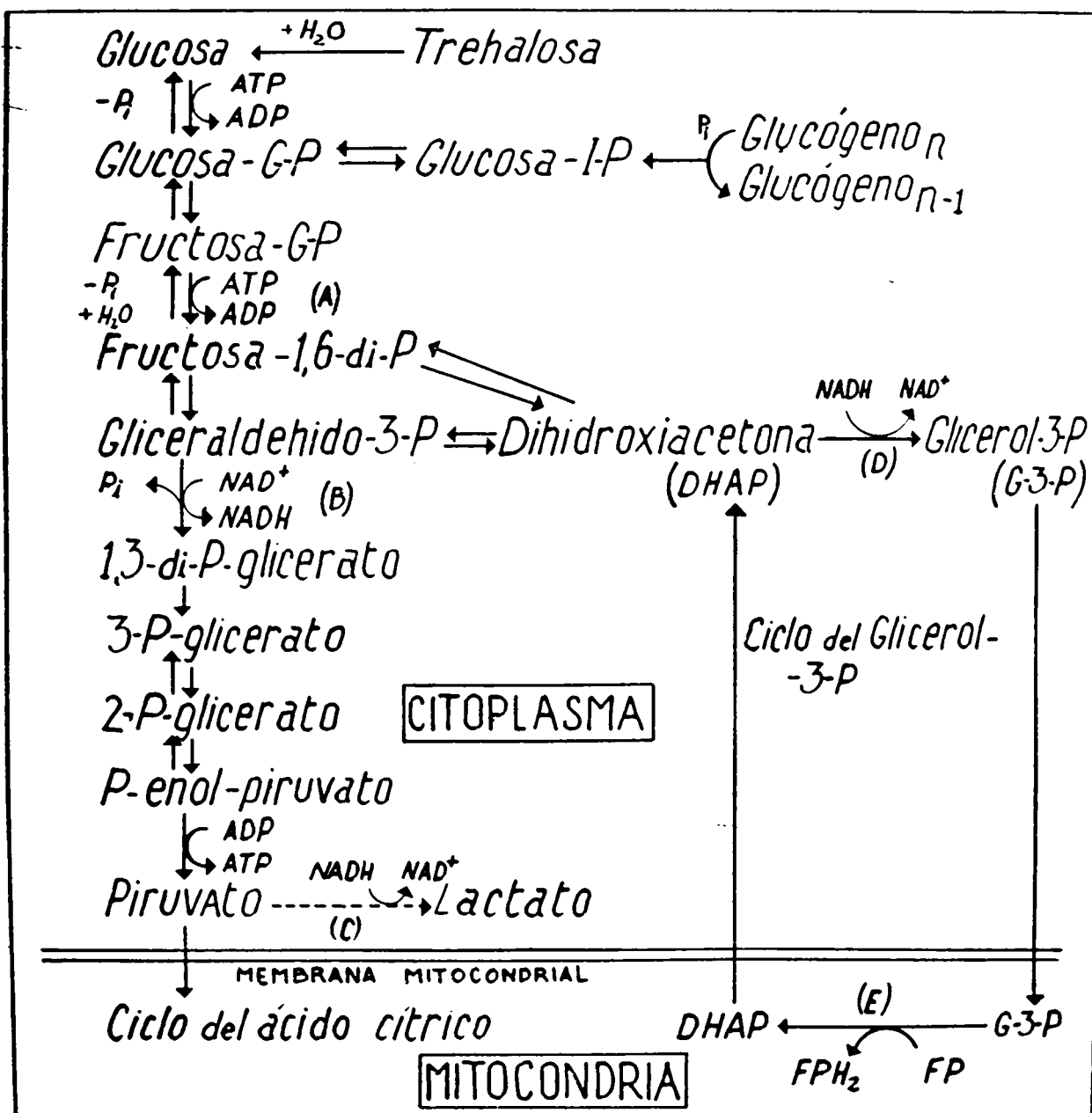


Fig. 3 Glucólisis y ciclo del glicerol-3-P en el músculo volador
 A-Fosfofructocinasa; B-Glicerualdehído-3-P deshidrogenasa; C-Lactato deshidrogenasa; D-Glicerol-3-P deshidrogenasa citoplasmática; E-Glicerol-3-P deshidrogenasa mitocondrial.

La comparación del potencial glucolítico del músculo volador de insectos (dado por la actividad máxima de fosfofructoquinasa) con la actividad máxima de G-3-PD mitocondrial indica que la operación de esta lanzadera probablemente daría cuenta de la reoxidación de todo el NADH formado extramitocondrialmente(14).

La glucólisis como en mamíferos, reveló un control primario a nivel de la fosfofructoquinasa que es inhibida por el ATP y desinhibida por AMP, AMP_c y P_i. Al comienzo del vuelo el ATP disminuye y concomitantemente aumentan AMP y P_i. Sin embargo, la relación del descenso de ATP al incremento de AMP y P_i no permite explicar el aumento de 100 veces observado en la glucólisis al comienzo del vuelo. Esto hace suponer que puede haber otros factores involucrados en la regulación de la fosfofructoquinasa(14).

Para evitar un gasto inútil, en mamíferos existe regulación de la glucólisis por intermedio del ciclo de Krebs; más concretamente: la fosfofructoquinasa es inhibida alostéricamente por el ácido cítrico. Esta regulación no se pudo encontrar en el músculo volador de la langosta(15).

Los productos de la glucólisis deben oxidarse en las mitocondrias. Se ha observado que el músculo volador de *Phormia regina* contiene cantidades excepcionalmente elevadas de glicerol-3-P, permaneciendo constante durante el vuelo. De aquí resulta que todo excedente de glicerol-3-P formado por la oxidación del NADH extra producido por el aumento de la glucólisis es oxidado inmediatamente. Esto sugiere que la oxidación mitocondrial del glicerol-3-P en la transición reposo-vuelo del músculo es activada(16).

Estos estudios realizados "in vivo" también demostraron una brusca elevación en la concentración de piruvato acompañada por acumulación de alanina y acetilcarnitina en el mismo momento. El aumento de piruvato y acetil-carnitina cuando el vuelo comienza, está indicando que el piruvato no es oxidado por el ciclo con la misma velocidad con que es producido. El aumento de alanina se produce con un decremento

///

simultáneo y estequiométrico de la prolina desde las altas concentraciones en que se halla en reposo(16).

Relacionado con esto último está la permeabilidad de las mitocondrias del músculo volador de la moscarda. Estudios "in vitro" indican que éstas sólo oxidan glicerol-3-P exógeno, piruvato y acetilcarnitina, en menor proporción prolina. Ningún intermediario del ciclo de Krebs, ni glutamato, ni aspartato constituyen un sustrato respiratorio efectivo. Esto sería debido a la escasa permeabilidad de las mismas a estos compuestos. Las translocasas específicas de ácidos di- y tricarbónicos de mitocondrias de mamíferos, parecen estar ausentes(17). Una razón postulada para que esto sea así estaría en el hecho de que teniendo el tejido estudiado un cociente respiratorio muy alto, la ausencia de permeasas más bien impediría la pérdida de intermediarios, que la entrada. Además en dicho tejido la biosíntesis de productos extramitocondriales no sería el objetivo como ocurre en mitocondrias de hígado de rata(17).

d) Algunos aspectos propios de insectos en el metabolismo de aminoácidos.

Se ha observado que las mitocondrias aisladas de músculo volador de insectos pierden rápidamente su capacidad para oxidar el piruvato. En la mitocondria de moscarda esta situación puede revertirse con prolina, pero no con intermediarios del ciclo de Krebs, ni glutamato. Esto está de acuerdo con las propiedades ya mencionadas de la mitocondria y sugieren que el papel de la oxidación de prolina en las mitocondrias del músculo volador de la moscarda, al comienzo del vuelo, es el de proveer intermediarios del ciclo para adecuarlas a la mayor cantidad de piruvato, proveniente de la glucólisis, que debe oxidar(18). La oxidación de prolina transcurre en insectos(todos los mayores órdenes) del mismo modo que en los tejidos de mamíferos: formación de glutamato pasando por Δ -pirrolín-5-carboxilato.

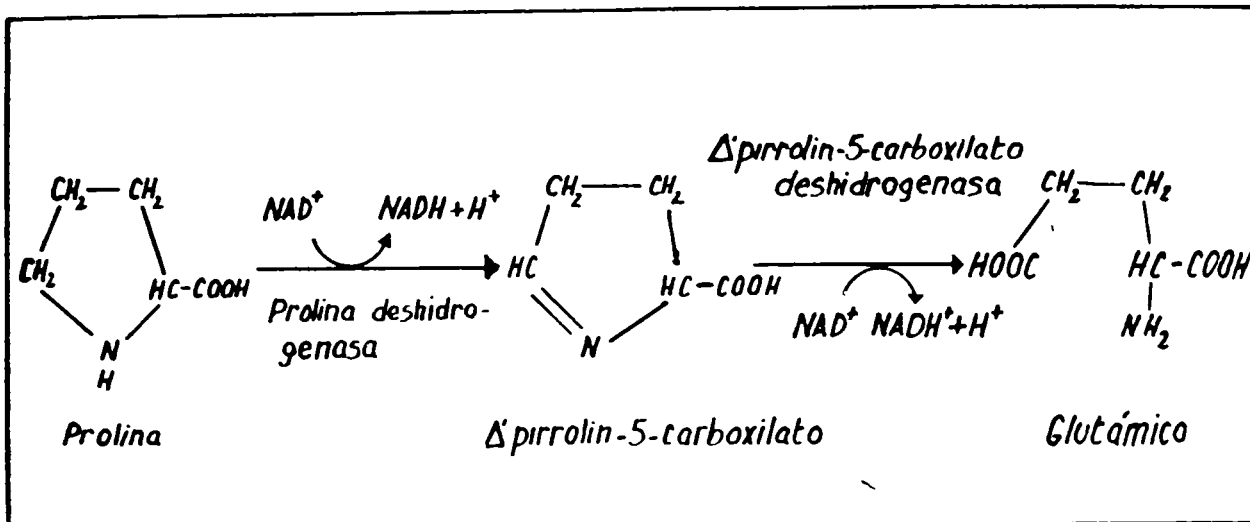


Fig. 4. Oxidación de prolina.

La transaminación del glutamato con el piruvato da alanina y α -cetoglutarato que es oxidado a oxalacetato en el ciclo de Krebs. Así entonces, la prolina origina oxalacetato que permitiría una mayor oxidación del piruvato, el exceso del cuál por transaminación con el glutamato daría alanina y por oxidación parcial, acetilcarnitina.

El rol de la oxidación de prolina en la mosca hematófaga tsé-tsé *Glossina morsitans* es aparentemente más importante: Bursell(19) mostró que la concentración de prolina caía abruptamente durante el vuelo, mientras simultánea y estequiométricamente ascendía el nivel de alanina. Los estudios de marcación resultaron congruentes con la operación de un ciclo como el que se muestra en la página siguiente. De acuerdo a este ciclo la transformación de 1 mol de prolina en 1 de alanina provee 14 moles de ATP. Si a esto se le agrega el hecho de que la tsé-tsé posee poca cantidad de glucógeno y mínimas cantidades de trehalosa y glucosa, es lícito pensar que la oxidación de prolina ocupa un "sitio central" en el suministro de energía. Confirmando esta hipótesis están las bajas actividades glucolíticas halladas en tsé-tsé si se las compara con las de la moscarda y que la

///

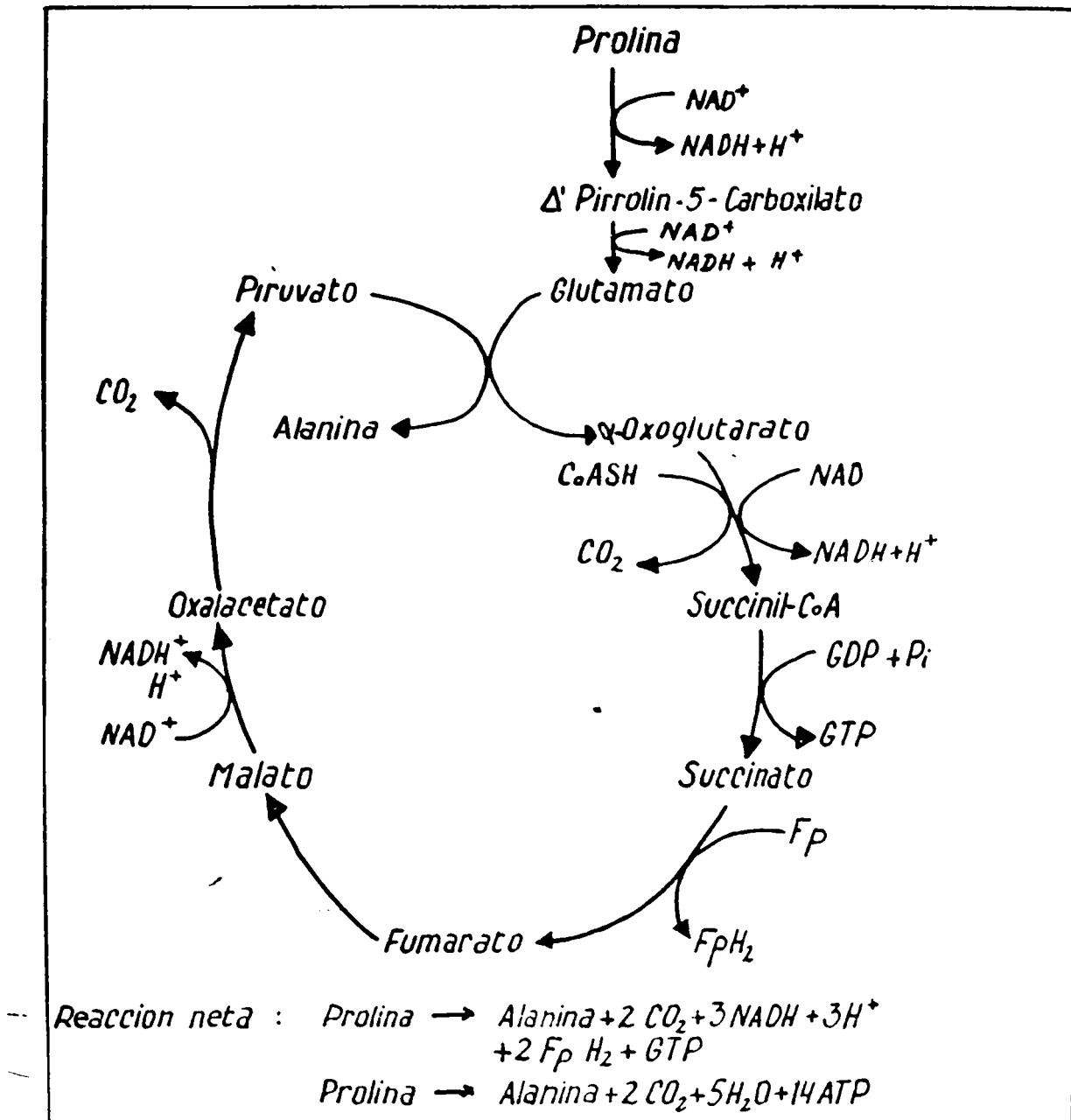


Fig. 5 Oxidación de prolina durante el vuelo en la mosca tsé-tse "Glossina morsitans".

succínico deshidrogenasa (enzima participante de ciclo propuesto) presenta actividades semejantes en ambos insectos. La importancia de la oxidación de prolina tal vez surja como consecuencia del tipo de ingesta (sangre) con baja cantidad de glúcidos. El hecho de haberse hallado actividades importantes de prolina deshidrogenasa en músculos voladores de otros insectos sugiere que el caso de la tsé-tse tal vez no sea único(11).

Los insectos tienen los mismos requerimientos que los mamíferos en cuanto a aminoácidos esenciales con el agregado de arginina(20).

El triptofano sirve de precursor de un grupo de pigmentos: los "ommocromos", que son responsables del color profundo de los ojos de los insectos y que además contribuyen a la coloración brillante en muchas especies. Justamente fueron elegantes experimentos en las rutas que conducen a los "ommocromos", los que en mutantes de *Drosophila* y *Ephesia* con color de ojos anormal demostraron bloqueos genéticos. Este fue uno de los trabajos pilares en el desarrollo del concepto de que los genes controlan la síntesis de enzimas(20).

e) La cadena respiratoria.

Este concepto fue introducido por Keilin en 1925 cuando trabajaba con músculo volador de insectos.

Cuando se estudia el espectro diferencial de las mitocondrias reducida y oxidadas (de músculo volador de moscarda) a -190°C (Temperatura a la cuál resulta un agudo adelgazamiento de las bandas de absorción de los citocromos) se observan diferencias en la composición de los citocromos respecto a la de mitocondrias de mamíferos. Un esquema de la secuencia de los transportadores, basada en estudios cinéticos y con inhibidores se da a continuación:

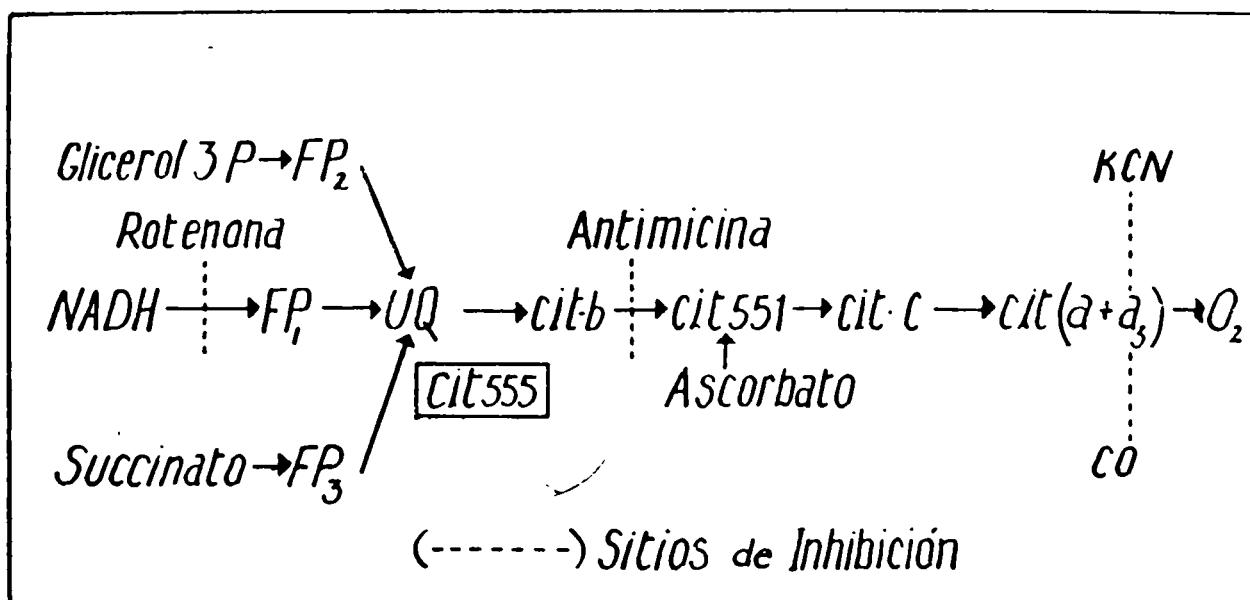


Fig. 6 Posible ordenamiento de los componentes de la cadena respiratoria (21).

f) Los lípidos y su metabolismo en insectos.

f₁) Lípidos en insectos.

Entre las funciones más importantes de estas sustancias en los organismos vivos están las de constituir sus membranas celulares y servir como combustible de reserva. En la grasa se puede almacenar en pequeño volumen por su naturaleza hidrófoba, una cantidad de energía muy superior a la del mismo volumen de glucógeno. Este aspecto es de apreciable importancia sobre todo en aquellos insectos que deben volar por largos períodos de tiempo. Hay también otras circunstancias en que los insectos recurren a formar abundantes reservas lipídicas: así antes de la "pupación" o la "diapausa"; también las hembras maduras en período de oviposición. Algunos insectos que se alimentan durante el estadio adulto los acumulan durante esta etapa (langosta del desierto); otros que no se alimentan en este estadio lo hacen en estadios previos (Sitotroga cerealella) (22). Los lípidos en insectos derivan directamente de la dieta o son sintetizados a partir de precursores no lipídicos como proteínas y glúcidos que de ella provienen.

f₂) Contenido lipídico y composición.

Hay gran variación en el contenido lipídico de insectos de distintos órdenes e inclusive dentro de una misma familia. Fast (23) con la base de una abundante recopilación de resultados, ha indicado que el contenido graso de los insectos puede alcanzar valores tan altos como el 40% del peso húmedo. Sin embargo, la mayoría de las especies estudiadas contienen cantidades de lípidos inferiores al 10% del peso húmedo.

Como ha sido discutido por Scoggin y Tauber (24) son muchos los factores que influyen sobre el contenido lipídico de los insectos: estadio de desarrollo, nutrición, temperatura ambiental, sexo, ayuno, diapausa, si es migratorio o no y por supuesto su ubicación taxonómica. Resulta notable la influencia del sexo sobre la cantidad de depósitos grasos: en general la hembra recién mudada tiene niveles mayores a

///

los del macho en la misma condición. Esto tal vez guarde relación con el desarrollo de los huevos. En algunas mariposas gusanos también ocurre la situación inversa, pudiendo tener el macho al momento de la emergencia, un contenido lipídico hasta 10 veces superior al de la hembra(25). En este caso la razón podría ser el comportamiento de apareo de la especie(*Hyalophora cecropia*), ya que el macho debe volar grandes distancias en búsqueda de la hembra y puesto que como adulto no se alimenta sus reservas deben ser abundantes(26).

Los ácidos grasos mayoritarios en insectos como en otras formas de vida son los de 16 y 18 carbonos saturados y no saturados. De las especies relacionadas con *Triatoma infestans* se citan(27) las composiciones cuantitativas de:

INSECTO	ESTADIO	ACIDOS GRASOS (% en peso)				
		14:0	16:0	18:0	16:1	18:1
<i>Triatoma</i>						
phyllosama	adulto	1,3	52,6	4,4	3,8	32,7
<i>Rhodnius</i>						
prolixus	adulto	1,3	40,9	5,6	4,1	39,8

Del contenido lipídico de los insectos en todas sus etapas de desarrollo probablemente la mayor parte la constituyen los triglicéridos(28). La presencia de diglicéridos, monoglicéridos, esteroides y ésteres de esteroides además de fosfolípidos está generalizada en ellos. De los lípidos de cutícula resultan importantes los hidrocarburos y las ceras que disminuyen la permeabilidad al agua impidiendo su evaporación. De los fosfolípidos mayoritarios se observa en casi todos los insectos estudiados mayor cantidad de fosfatidilcolina que de fosfatidiletanolamina al igual que en vertebrados(27).

f₃) Absorción de lípidos de la dieta y su incorporación a lípidos del cuerpo graso.

Treherne(29) alimentó a *Periplaneta americana* con tri-¹⁴C-palmitilglicérido y concluyó que la absorción se producía únicamente en el intestino medio. Weintraub y Tietz(30) observaron que en *Locusta migratoria*(langosta) el tri-¹⁴C-oleilglicérido era fácilmente hidrolizado a monoglicérido, diglicérido y ácidos grasos libres en la luz intestinal; en cambio el tri-¹⁴C-palmitilglicérido era excretado sin cambios. Los mismos autores han mostrado que lipoproteínas de la hemolinfa pueden incorporar y transportar ácidos grasos libres y que éstos eran fácilmente aprovechables por el cuerpo graso. También dieron evidencias de que a partir de los productos de absorción había resíntesis en analogía a lo que ocurre en mamíferos. Así sería posible que durante la absorción de la grasa, los ácidos grasos entraran a las células intestinales y que convertidos en diglicéridos(mayor forma circulante de los lípidos en este insecto) fueran liberados a la hemolinfa, posiblemente como lipoproteínas, desde dónde serían tomados por el cuerpo graso para almacenamiento como triglicéridos(lípido más importante de las reservas). El lípido circulante sería accesible al músculo volador como combustible para el vuelo. Si la formación de diglicéridos ocurre en las células intestinales, es posible que los fosfolípidos estén involucrados como intermediarios ya que Weintraub y Tietz(30) han mostrado que mucha de la radiactividad de los lípidos marcados ingeridos es incorporada en los fosfolípidos intestinales y que cuando ³H-gliceril-tri-¹⁴C-oleato es ingerido la razón ³H/¹⁴C es muy similar en los diglicéridos de la hemolinfa y en los fosfolípidos intestinales. La formación de los diglicéridos puede entonces ocurrir a través de la acción de una fosfolipasa sobre los lípidos formados. En contraste con la langosta, en la cucaracha *Periplaneta americana* los lípidos son transportados en la hemolinfa como triglicéridos y son convertidos a diglicéridos previamente a su entrada al cuerpo graso.

El complejo "corpus cardiacum=allatum" contiene un factor que estimula la captación de lípidos por el cuerpo graso(31). Para el pasaje de triglicéridos a diglicéridos se requiere la presencia de una lipasa y tal enzima ha sido encontrada(32).

Ha sido demostrada la captación de ácidos grasos(¹⁴C-palmitato) en lípidos del cuerpo graso tanto "in vivo" como "in vitro" en distintos insectos(33, 34, 35, 36). Martin(37) usando *Pyrrhocoris apterus* mostró que los lípidos eran tomados en este orden, desde la hemolinfa al cuerpo graso cuando eran incubados: diglicéridos, ácidos grasos y triglicéridos.

f₄) Degradación de los lípidos por el cuerpo graso.

El cuerpo graso además de liberar lípidos a la circulación que son combustibles para otros órganos, los utiliza oxidándolos para obtener energía para llevar a cabo funciones tales como la gluconeogénesis.

Oxidación de ácidos grasos. Hay pocos datos sobre la degradación de los lípidos en el cuerpo graso, a pesar de que ésta es la etapa inicial en la preparación para su oxidación. Los triglicéridos por acción de lipasas originan ácidos grasos y glicerol. Gilbert y col.(38) demostraron considerable actividad de esterases en el cuerpo graso de *Hyalophora cecropia*, pero no de lipasas al menos por los métodos habituales de ensayo. Sin embargo usando ¹⁴C-trioleína el cuerpo graso mostró ligera actividad de lipasa. A diferencia de los anteriores otros autores han demostrado actividad de lipasas en cuerpo graso, así Wlodawer y Baranska(39) la encontraron en el cuerpo graso de la larva del gusano de cera; Chang y Friedman(40), en el de *Manduca sexta*. La actividad lipolítica del cuerpo graso de *Galleria mellonella* ha sido estudiada durante el desarrollo(41,42).

Los ácidos grasos liberados por la acción de lipasas pueden entonces ser oxidados por la acción de enzimas del cuerpo graso. Esto fue demostrado en la moscarda *Lucilia cuprina* en base a estudios sobre los cambios que sufrían lípi

///

dos, hidratos de carbono y aminoácidos: los ácidos grasos proveían la principal fuente de energía(43,44). Martin(37) demostró que el l-¹⁴C-palmitato era fácilmente oxidado por el cuerpo graso de las hembras adultas de *Pyrrocoris apterus*, aunque parece que los ácidos grasos se almacenan principalmente, en tanto la glucosa es usada preferencialmente. En cuerpo graso de *Schistocerca gregaria* Walker y col.(45) demostraron que los ácidos grasos eran los sustratos preferidos en todas las edades del macho adulto. Walker y Bailey(46) sugirieron que la degradación de ácidos grasos podría estar bajo control hormonal ya que la "allatectomía"(resección de la corpora allata) incrementaba notablemente la capacidad de oxidación del ¹⁴C-palmitato a ¹⁴CO₂ por el cuerpo graso del mismo insecto, sin afectar la formación de productos con solubilidad de ácidos.

Aunque se sabe que el cuerpo graso oxida ácidos grasos se ignora al presente los mecanismos involucrados. La mayor parte del trabajo realizado toma como sistema al músculo volador. Nada se conoce acerca de la oxidación de ácidos grasos de diferente longitud de cadena carbonada y de distinto grado de insaturación. Se supone que la β-oxidación transcurre por los mecanismos conocidos en mamíferos, pero las actividades de varias enzimas involucradas ha sido poco investigada. Se ha detectado 3-cetoacil-CoA tiolasa en *Locusta migratoria*(47) y habría evidencia de 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa en *Periplaneta americana*(48).

Cuerpos cetónicos. Walker y Bailey(49) indicaron que grandes cantidades de ácidos grasos pueden ser degradados a sustancias ácido-solubles en el cuerpo graso de la langosta del desierto. Posiblemente estas sustancias sean cuerpos cetónicos. Como es sabido, en mamíferos la β-oxidación de los ácidos grasos produce acetilCoA, ésta puede seguir a CO₂ y H₂O en el ciclo de Krebs, o puede originar cuerpos cetónicos por vía del hidroximetilglutaril-CoA. Trabajos de Bailey y col.(50,51) y Hill y col.(52) han demostrado que en cuerpo graso de *Schistocerca gregaria* hay formación de cuerpos ce-

///

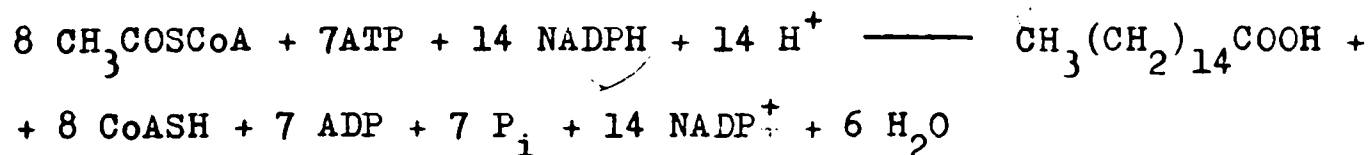
tónicos que son oxidados por cuerpo graso, músculo volador y testículos. La capacidad de oxidar cuerpos cetónicos en este último órgano no es afectada ni aún por el ayuno.

Ciclo de Krebs. El acetil-CoA producido por β -oxidación de ácidos grasos, degradación de glúcidos y proteínas puede ser oxidado a CO_2 y H_2O en este ciclo. El conjunto de enzimas necesarias han sido encontradas en polvos del extracto acetónico de preparaciones mitocondriales y homogenados de larvas enteras de *Prodenia eridania*(53). La mayor parte del trabajo sobre el ciclo de Krebs ha sido realizado en músculo volador de insectos(ver pág. 5). Sin embargo, la información sobre diversas actividades del ciclo en cuerpo graso de distintas especies permiten suponer que el ciclo completo se llevaría a cabo en el cuerpo graso.

Estudios sobre el control de la respiración en el cuerpo graso han sido realizados por Keeley(54)Es conocido que la respiración se ve afectada en vertebrados por acción de la hormona tiroidea. En insectos la búsqueda de alguna hormona que afectara el metabolismo basal, llevó al reconocimiento de la modulación del mismo por la "corpora cardiaca".

f₅) Biosíntesis de lípidos.

La síntesis de ácidos grasos ha sido bien estudiada en vertebrados. De allí ha surgido que la biosíntesis "de novo" se realiza fundamentalmente en el citoplasma celular, realizándose en mitocondrias los procesos de elongación y en microsomas, la desaturación y elongación de los ácidos grasos. En la siguiente ecuación se resume el proceso de biosíntesis "de novo":



Como en ella queda indicado el principal ácido graso producido es el palmítico que en la célula puede ser desaturado y/o elongado para producir un espectro de ácidos grasos muy variado y fluctuante con las condiciones a que dicha célula

///

se halla sometida. Si se compara el conocimiento existente sobre la biosíntesis de ácidos grasos en bacterias y vertebrados con el que se tiene sobre insectos, este último resulta fragmentario.

Insecto entero. Está bien demostrado que los insectos son capaces de sintetizar lípidos a partir de precursores no lipídicos. Ya Wigglesworth en 1942 (55) ayunó larvas del mosquito *Aedes aegypti* hasta que las reservas grasas en el cuerpo graso estuvieran agotadas. La alimentación entonces, con proteínas, aminoácidos y azúcares llevó a la reaparición de gotitas de grasa. La mariposa *Danaus plexipus* acumula grsa antes de la migración aunque su alimentación es néctar que no contiene lípidos. Hay insectos que desarrollan bien sin otros lípidos en la dieta además de esteroides(56). Walker y col.(45) mostraron que en el macho adulto de la langosta del desierto los lípidos del cuerpo graso derivan de los hidratos de carbono de la dieta.

Los ácidos grasos polietilénicos linoleico(18:2 ω 6) y linolénico(18:3 ω 3) son requerimientos nutricionales esenciales para los vertebrados y según parece para la mayor parte de los insectos(57). Parece probable que la función de los "ácidos grasos esenciales" esté relacionada con la permeabilidad de las membranas celulares como en mamíferos ya que constituyen la mayor parte de los fosfolípidos, no siendo constituyentes importantes de los triglicéridos(58).

La biosíntesis de los lípidos en insectos "in vivo" ha sido estudiada por alimentación o inyección de ^{14}C -acetato y en algunos casos ^{14}C -glucosa. La conversión de ^{14}C -acetato a ácidos grasos ha sido investigada en la mosca *Musca do*mestica(59), la cucaracha *Periplaneta americana*(60), la moscarda *Calliphora erythrocephala*(61), el gusano de seda *Bom*bix mori(62) y en otros insectos. El resultado de estos estudios es que los insectos tienden a sintetizar preferentemente palmítico(16:0), palmitoleico(16:1), esteárico(18:0), y oleico(18:1 Δ 9), variando la proporción en que se produce la incorporación a cada uno con la especie. La ^{14}C -glucosa también se convierte en ácidos grasos en *Hyalophora cecropia* (63), *Bombix mori*(64). Todos estos trabajos excepto el de

Loulouides y col.(60), indican incapacidad de los insectos para sintetizar los ácidos grasos esenciales. La excepción puede atribuirse a la acción de simbiosis intestinales.

Aunque algunos autores han sugerido que los ácidos grasos saturados y monoetilénicos se originarían por 2 vías distintas(61)^q, esto no ha logrado confirmación y más aún, los ensayos de desaturación de ácidos grasos saturados han resultado positivos en algunos insectos(65,66). Estos mismos trabajos señalan que es posible en alguna medida la desaturación y elongación de ácidos grasos saturados, pero no de insaturados.

Municio y col.(67) estudiaron los cambios que con el desarrollo ocurren en la biosíntesis de ácidos grasos desde ¹⁴C-acetato por homogenados del insecto entero *Ceratitis capitata*. Los estadios de larva y pupa mostraron mayor incorporación de radiactividad que los estadios de huevo y adulto. También Municio y col.(68) siguieron estudiando la biosíntesis de ácidos grasos y lípidos "in vitro" en el desarrollo. Encontraron notables cambios en la biosíntesis a partir de ¹⁴C-acetato en el pasaje de larva a adulto. Los homogenados larvales lo incorporaban a ácido decanoico(10:0), láurico(12:0), mirístico(14:0), palmítico(16:0) y palmitoleico(16:1ω7), siendo el decanoico el de más alta actividad específica. La incorporación era mayor en triglicéridos, en tanto que en adulto se hacía principalmente en fosfolípidos. Cuando estudiaron la elongación y la desaturación(69) de ácidos grasos observaron que el decanoico, láurico, mirístico y palmítico eran desaturados a los correspondientes monoetilénicos y también elongados. El grado de desaturación se incrementaba con la longitud de la cadena carbonada, mientras disminuía la elongación. Los homogenados de adulto no desaturaban ni elongaban.

Fue estudiada la conversión de glucosa, palmitato y acetato en lípidos de *Hyalophora cecropia*(pupa y adulta)(63).

^qexcluyendo la desaturación o deshidrogenación,...

Se observó que la radiactividad era rápidamente incorporada en diglicéridos.

Se ha estudiado el control de la biosíntesis de lípidos en trabajos con insecto entero. Van Handel y Lum(70) mostraron que la hembra del mosquito *Aedes aegypti* puede sintetizar grandes cantidades de triglicéridos cuando se la alimenta con glucosa, mientras que el macho no lo puede hacer. Además en el momento de la emergencia ambos contienen igual cantidad de lípidos, luego aumenta mucho en la hembra pero disminuye en el macho. Van Handel y Lea(71) usando hembras de mosquitos, encontraron que las células neurosecretoras mediales pueden restringir la síntesis de glucógeno y estimular la síntesis de triglicéridos puesto que la remoción de estas células incrementaban la capacidad de almacenamiento de glucógeno a costa del almacenamiento de triglicéridos. Tal reversión de la síntesis no ocurre en los insectos alimentados con sangre(72). La reimplantación de las células neurosecretoras mediales en los mosquitos hembras desde las cuales habían sido removidas, restringía la síntesis de glucógeno pero no restablecía la síntesis de grasa, de donde los autores concluyeron que dichas células ejercían una influencia sobre la síntesis de glucógeno(73). En *Hyalophora cecropia* se ha relacionado el título de hormona juvenil con la composición y biosíntesis de ácidos grasos tanto en el macho como en la hembra durante el desarrollo(74). Para concluir es importante señalar que los estudios sobre biosíntesis realizados "in vitro" con homogenados de insectos enteros pueden orientar sobre lo que sucede en órganos específicos, pero esto debe ser convalidado en experiencias posteriores con los mismos.

Cuerpo graso. Síntesis de ácidos grasos desde acetato.

El cuerpo graso intacto de *Prodenia eridania* incorporó ¹⁴C-acetato en ácidos grasos de cadena larga(75). La marca se incorporó principalmente a palmitato aunque también se detectó estearato, oleato, miristato y laurato. Homogenados de cuerpo graso también sintetizan ácidos grasos en presen-

///

cia de ATP, malónico, CoASH y glutatión. Tietz(76) obtuvo resultados similares trabajando con homogenados y sobrenadante de 20000g-20' de cuerpo graso de *Locusta migratoria*. Según parece las enzimas encargadas de la síntesis de ácidos grasos estarían presentes en la fracción soluble como ocurre en vertebrados. Sin embargo es importante señalar que Goldin y Keith(77) dieron evidencias sobre la biosíntesis de ácidos grasos por mitocondrias de larvas de *Drosophila melanogaster*. Tietz y Stern(78) han mostrado que microsomas obtenidos de cuerpo graso de *Locusta migratoria* desaturaban esteárico a oleico, en tanto que las mitocondrias no mostraron tal actividad. En contraste, en mitocondrias de *Drosophila melanogaster* se observó conversión de esteárico en oleico, pero no de palmítico en palmitoleico(77).

Biosíntesis a partir de precursores no lipídicos. Preparaciones del cuerpo graso de *Prodenia eridania* incorporaron la marca de ^{14}C -glucosa en ácidos grasos(75). Cuerpos grasos intactos de *Schistocerca gregaria* podían convertir aminoácidos y carbohidratos en ácidos grasos(79). La conversión de glúcidos a lípidos en el cuerpo graso ha sido investigada por Walker y Bailey(80,81,82,83,46,49). Los autores sobre la base de los cambios en la conversión de sustratos marcados con ^{14}C a lípidos y las actividades de enzimas claves de la lipogénesis durante el desarrollo del macho adulto de la langosta del desierto *Schistocerca gregaria*, han propuesto el esquema que se muestra en la página siguiente, para la vía metabólica recorrida. Los glúcidos recorren la vía glucolítica en el citoplasma hasta piruvato que, penetrando en la mitocondria es oxidado a acetil-CoA. La lipogénesis es extramitocondrial por lo tanto el acetil-CoA sustrato de la misma debe atravesar en alguna forma atravesar la membrana interna mitocondrial(la cuál en mamíferos se ha demostrado impermeable al paso de acetil-CoA). Por su conversión a citrato se efectuaría el pasaje(84). En el citoplasma actuaría la citrato-liasa(ATP) para dar oxalacetato y acetil-CoA.

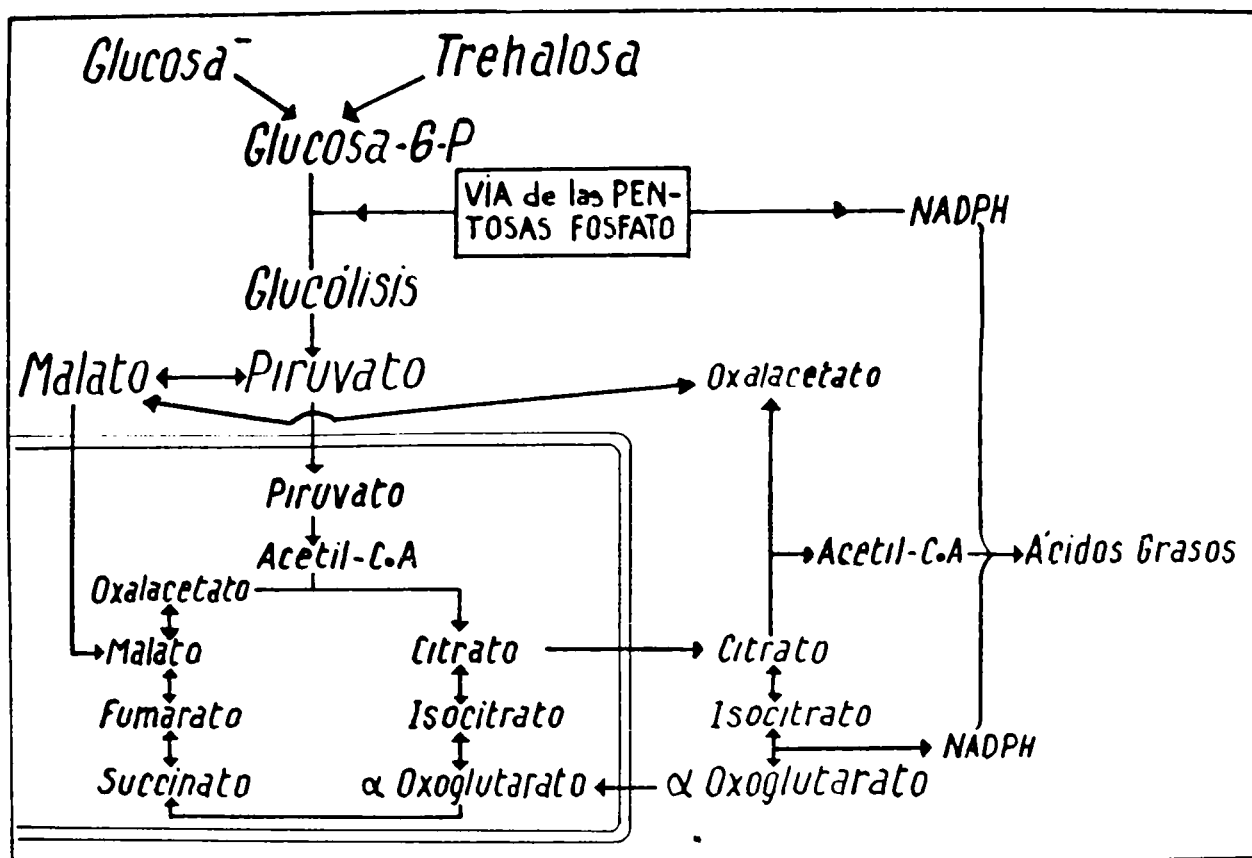


Fig. 7 Esquema para la conversión de carbohidratos a lípidos en el cuerpo graso en macho adulto *Schistocerca greg.*

El oxalacetato podría retornar a la mitocondria en la forma de malato y por transaminación a aspártico. Este esquema ha sido propuesto para mamíferos(85). Los citados estudios de Walker y Bailey lo ratificarían en insectos. Una de las exigencias de este mecanismo sería la provisión de oxalacetato a la mitocondria. En tejido adiposo(86,87) y glándula mamaria de mamíferos(87) estaría realizada por la piruvato carboxilasa mitocondrial; sin embargo esta enzima no cumpliría el mismo rol en cuerpo graso(82). El paralelismo de los cambios con el desarrollo de las enzimas glucolíticas claves: fosfofructoquinasa y piruvatoquinasa con la enzima "málico" sugirieron la formación del oxalacetato mitocondrial por acción de esta última.

Se ha sugerido que la provisión de NADPH en los sistemas de mamíferos, requerido para la síntesis de ácidos grasos sería la ruta de las pentosasfosfato y el enzima "málico" actuando en el sentido de la formación de piruvato(85). Según Walker y Bailey(81,88) la glucosa-6-P-deshidrogenasa (ruta de las pentosas) y la isocitrato-deshidrogenasa cito-

///

plasmática(NADP-dependiente) serían las encargadas de la misma función en cuerpo graso de *Schistocerca gregaria*. Que el NADPH es requerido dependiendo del consumo de malonil-CoA y acetil-CoA en la biosíntesis de ácidos grasos por el citosol de cuerpo graso de *Bombix mori*, fue demostrado por Horie(89).

Biosíntesis de triglicéridos. En el cuerpo graso se depositan los lípidos de reserva como triglicéridos. Los ácidos grasos sintetizados "in situ" son por lo tanto incorporados en su mayor parte al glicerol para formar triglicéridos. Estudios con insectos enteros ya mencionados, indican que la marcación proveniente de ^{14}C -acetato o ^{14}C -glucosa es incorporada principalmente a triglicéridos. Los estudios de Walker y Bailey(49) con preparaciones de cuerpo graso arrojaron idénticas conclusiones.

Tietz(90,91) ha indicado que la biosíntesis de triglicéridos ocurre por vías semejantes a las de vertebrados. Microsomas provenientes de cuerpo graso de *Locusta migratoria* puestos en presencia de adecuados sustratos sintetizan ácido fosfatídico. La adición de sobrenadante de 140.000g produce la desaparición de dicho ácido a la vez que formación de diglicéridos y triglicéridos. Si el sobrenadante es incubado con ácido fosfatídico, el resultado es la formación de diglicéridos. Luego los microsomas contienen glicerolfosfato- y diglicérido-aciltransferasas y el soluble fosfatídico fosfohidrolasa. Se observó además que homogenados del cuerpo graso podían efectuar la síntesis de glicéridos ya a partir de α -glicerolfosfato como a partir de glicerol. En mitocondrias se encontró la glicerolquinasa para que pudiera suceder así.

Control hormonal de la biosíntesis de lípidos. Se han dado diversas evidencias de que la biosíntesis de lípidos está bajo control hormonal. Así la remoción de la "corpora allata" en insectos adultos se sigue de una acumulación de lípidos en el cuerpo graso(92,93,94). La composición lipídica de la langosta "allatectomizada" es parecida a la de los controles aunque está aumentada la proporción de fos-

///

folípidos(94). La capacidad para la lipogénesis desde ^{14}C -acetato y ^{14}C -glucosa en los cuerpos grasos de langostas del desierto "allatectomizadas" fue medida(46). Fue observado que la capacidad lipogenética por unidad de peso fresco de cuerpo graso permanecía sin alteración a pesar de la "allatectomía"; lo que si se incrementó fue la capacidad lipogenética total ya que los cuerpos grasos de los insectos "allatectomizados" eran mayores a los de los controles(94). Estos resultados sugirieron que la acumulación de lípidos que seguía a la "allatectomía" era debida al incremento de la actividad biosintética. De las enzimas claves señaladas por Walker y Bailey en la lipogénesis sólo la (ATP)citrato-liasa tenía aumentada su actividad específica debido a la "allatectomía"(83). A pesar de lo anterior, los autores sugirieron(94) que la principal función de la "corpora allata" en la langosta del desierto era regular el grado de diferenciación y crecimiento de los tejidos. Los efectos de la "allatectomía" sobre la lipogénesis serían pues secundarios al incremento de tamaño del cuerpo graso y la hormona de la "corpora allata" no tendría efectos directos sobre la lipogénesis. Contrastan con lo anterior las observaciones de Gilbert(95) que obtuvo un 30% de supresión de la lipogénesis por agregado de hormona juvenil(hormona de la "corpora allata") a incubaciones de cuerpo graso de *Leucophaea maderae*.

6) Triatoma infestans. Relación con la enfermedad de Chagas.

El *Triatoma infestans* es el agente vector del mal de Chagas en nuestro país. Se alimenta sobre el hombre pudiendo hacerlo también sobre animales de sangre caliente que se encuentren en su habitat: el rancho(vivienda precaria de nuestro campo con techo de paja y paredes de adobe). Las grietas de paredes y recobecos ocultos del techo son el sitio adecuado para su prosperidad. Cuando se alimenta si no es molestado llega a la repleción y defeca en la misma zona donde efectuó la picadura. Si el insecto está infestado por

///

y el resto membranosa; el par posterior totalmente membranoso). El abdomen también será dividido en somitas. Su parte terminal está modificada en genitales, que permiten la distinción de la hembra del macho.

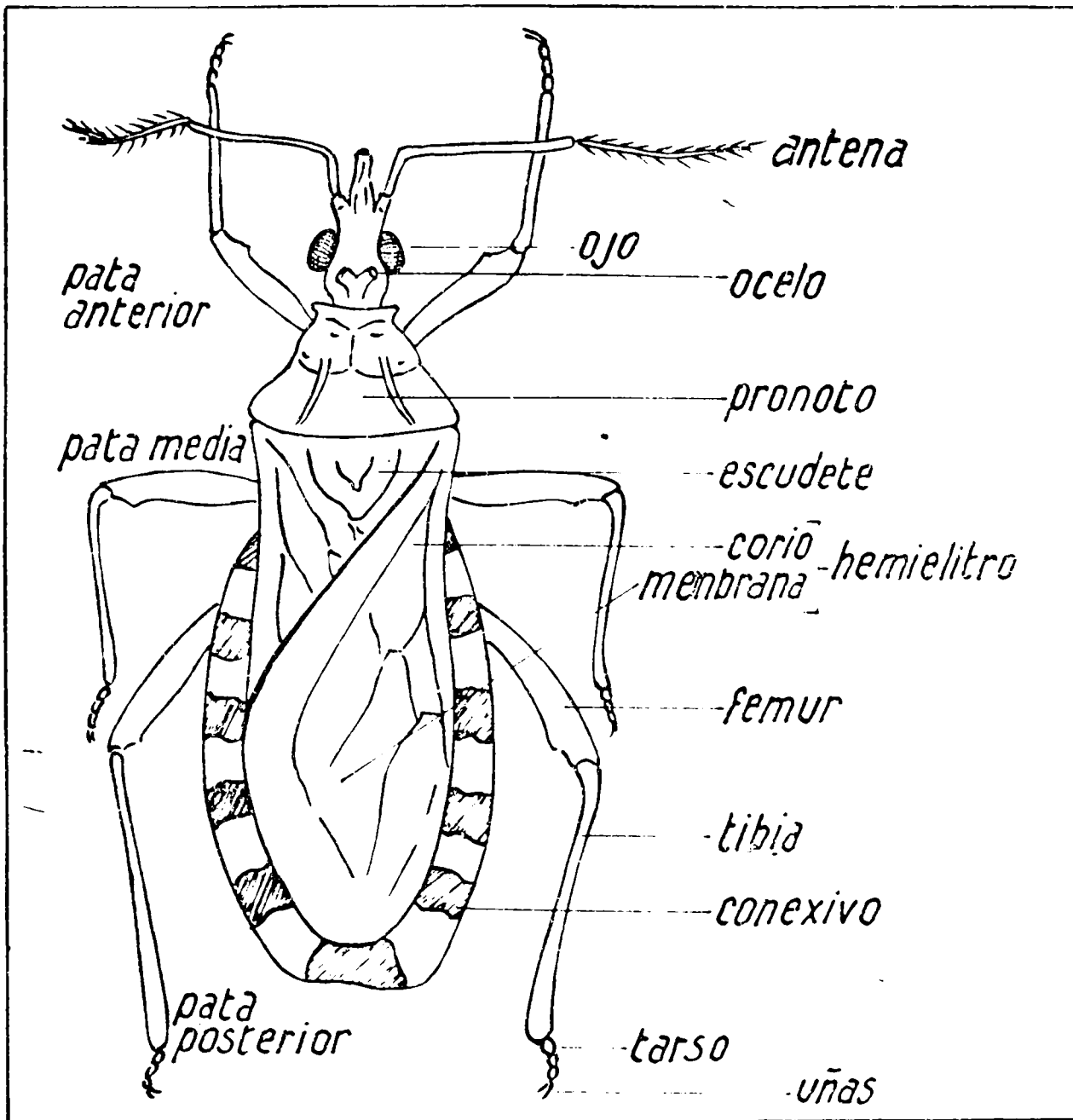


Fig. 8 Anatomía externa del macho de Triatoma infestans.

El tubo digestivo está formado por un intestino anterior uno medio y otro posterior. El anterior se une a la boca en la que desembocan las glándulas salivales. El posterior se une al ano.

El sistema circulatorio está constituido por un corazón alargado (llamado aorta o vaso dorsal) sin capilares ni venas, que impulsa la hemolinfa hacia la cavidad general del cuerpo: hemocele (celoma reducido).

La respiración se efectúa a través de tráqueas ramificadas, tapizadas por una cutícula, que llevan el oxígeno de los espiráculos pares, situados a los lados del abdomen, directamente a los tejidos dejando un trayecto muy corto a la difusión.

La excreción se efectúa por tubos de Malpighi, que desembocan en el extremo anterior del intestino posterior. Su función depuradora de la hemolinfa es comparable a la del riñón de vertebrados.

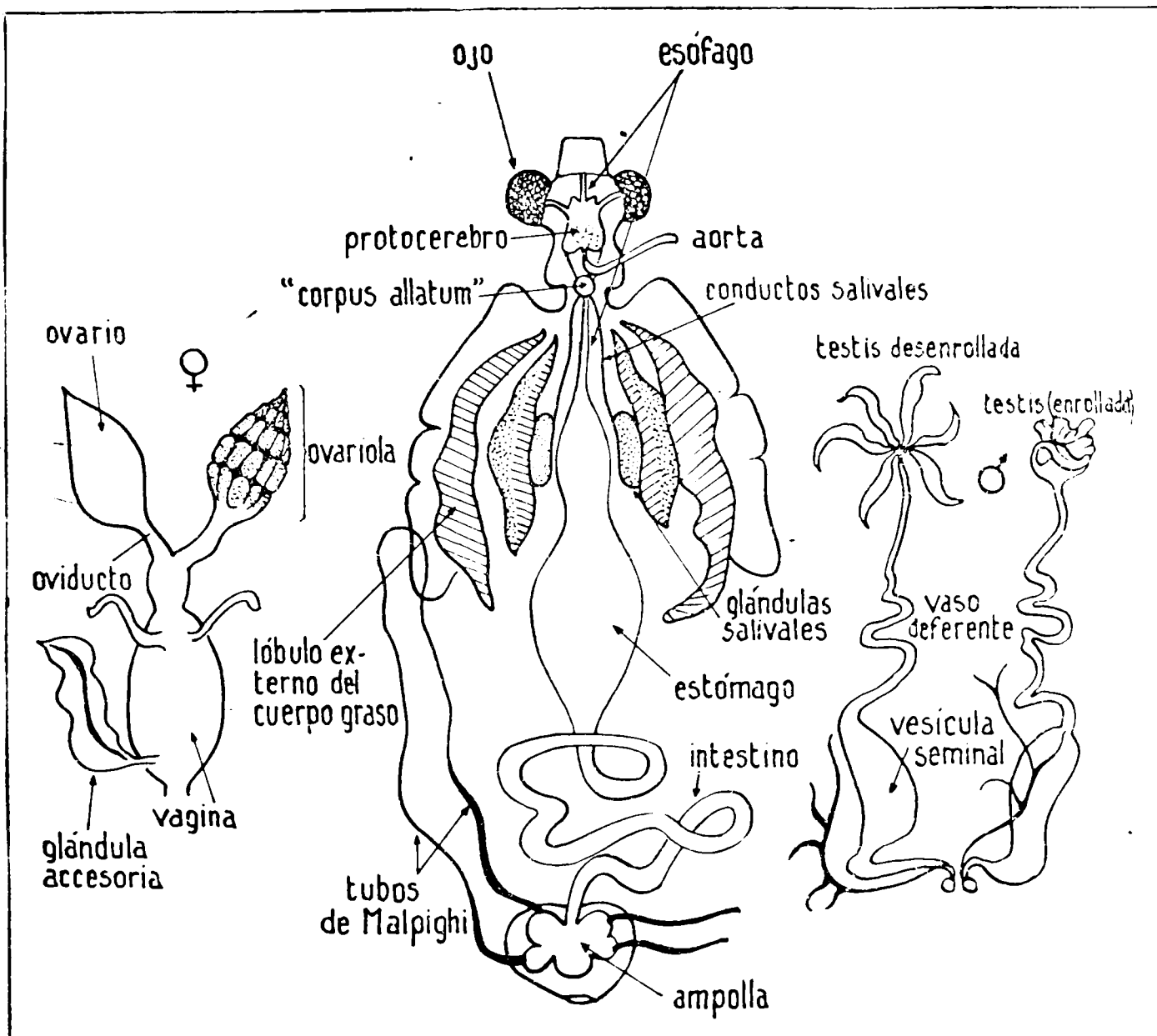


Fig. 9 Anatomía interna del Triatoma infestans.

•La hemolinfa al no contener proteínas transportadoras de gases de importancia, no realiza el papel de la sangre de vertebrados en lo que a esta función se refiere.

El sistema nervioso está formado por ganglios supra e infraesofágico que se comunican con un doble cordón ventral, que tiene un par, o menos de ganglios por somita; los órganos de los sentidos son ojos simples y compuestos, quimiorreceptores para el olfato en las antenas, o para el gusto alrededor de la boca y pelos táctiles.

Los sexos son separados. Gónadas abdominales(ovarios y testículos) formadas por numerosos tubitos con un conducto medio posteriormente. La fecundación es interna(98).

Un órgano importante y característico de los insectos es el cuerpo graso que es señalado a veces por su actividad metabólica como equivalente del hígado de los vertebrados. En ellos desempeña además un rol significativo como tejido de reserva. Está bañado como todos los órganos del insecto por la hemolinfa con la cuál realiza un importante intercambio de metabolitos(10).

9) Biología del Triatoma infestans.

El *Triatoma infestans* es por su desarrollo un hemimetálo. Es hematófago estricto, requiere sangre como alimento para cumplir su ciclo evolutivo. Se han realizado estudios en los que se han demostrado influencias de la temperatura, humedad y frecuencia de la alimentación sobre la oviposición, frecuencia de las mudas, longevidad(99,100).

Sobre la base de estos y otros estudios en el Instituto Fátala-Chaben se ha desarrollado un método para la crianza de los insectos en que se redujo el tiempo requerido para el cumplimiento de su ciclo evolutivo y se obtuvo la máxima capacidad reproductora obteniéndose así grandes cantidades de insectos(101). En el diagrama que sigue se grafica el tiempo para el cumplimiento del ciclo evolutivo y puede observarse la duración de cada estadio(sobre datos de 101).

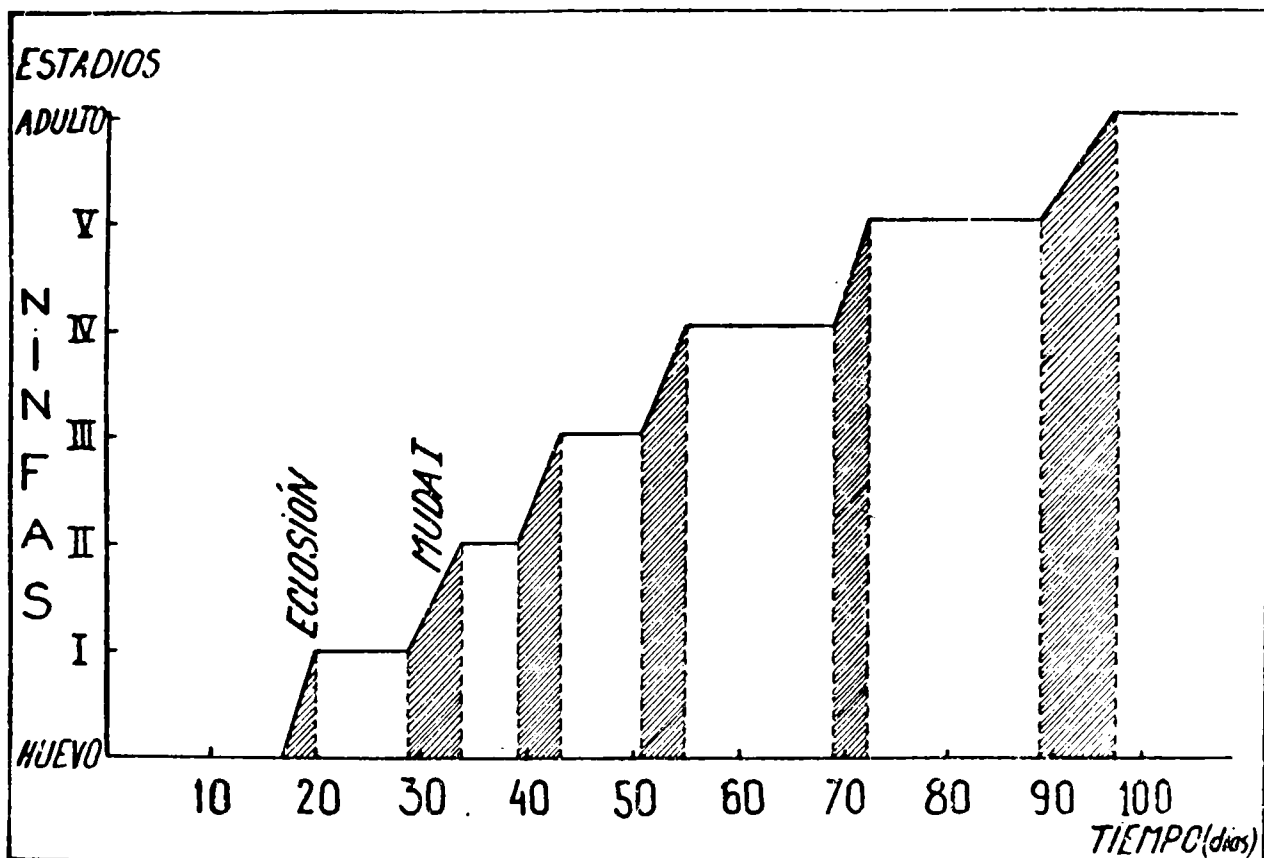


Fig.10 Evolución del *Triatoma infestans* en función del tiempo.

10) Fundamento del trabajo.

-- Este trabajo tiene por objeto conocer:

a) la composición de los ácidos grasos en los lípidos totales del *Triatoma infestans* entero y las variaciones de la misma con el desarrollo;

b) los lípidos constituyentes más importantes y la distribución de los ácidos grasos en los mismos;

c) la biosíntesis de ácidos grasos en el insecto "in vivo";

d) la biosíntesis de ácidos grasos "in vitro" por homogenados y por fracciones subcelulares de extractos abdominales extraintestinales.

M A T E R I A L E S Y

M E T O D O S

1) Crianza de los insectos.

Los insectos utilizados para la realización de este trabajo fueron suministrados por el Instituto Fatała Chaben. Allí son criados dentro de un cuarto estufa en cajas jaulas diseñadas para ello. La temperatura (30°C) es mantenida constante y uniforme en todo el cuarto. La humedad relativa oscila entre 60-70%. La jaula consiste en una caja de acrílico de 30x30x38 cm cubierta con una tapa con malla de acero inoxidable, de 4 mm de abertura que permite una fácil ventilación del interior. El piso está constituido por una malla del mismo material de 1 mm (para ninfas pequeñas) o de 4 mm (para ninfas de 5º estadio y adultas). Por debajo de este piso hay una bandeja en la que se recogen los huevos. Un papel de filtro sobre ella absorbe las deyecciones de los insectos. Dentro de la jaula se coloca un soporte desarmable de cartón con agujeros donde se ubican los insectos. Papeles de filtro colocados entre las divisiones de cartón facilitan el movimiento de los insectos cuando se los alimenta.

Se sabe que las ninfas de *Triatoma infestans* nacen libres de infección por el *Tripanosoma cruzi*. Además es aceptado que la enfermedad de Chagas es patrimonio de los mamíferos siendo las aves refractarias. Por tal razón en el Instituto, los insectos son alimentados 2 veces por semana sobre palomas. Estas son colocadas previa inmovilización sobre el soporte de cartón. La figura de la página 30 muestra el ciclo evolutivo del *Triatoma infestans* cuando se lo cría en las condiciones mencionadas.

2) Disección de los insectos.

El objeto de la misma fue tener acceso a los órganos abdominales del *Triatoma infestans*. Para ello con una pinza histológica se los sostenía por el tórax y con unas tijeritas de cirugía ocular se realizaba un corte transversal cerca del nacimiento de las alas quedando de este modo libre el dorso del insecto. Un par de cortes longitudinales a ambos lados del abdomen (en el conxivo) permitía el acceso

///

con la misma a la cavidad interna. Esta era descubierta por un corte transversal del dorso del abdomen: arriba cerca de la unión con el tórax y otro abajo a la altura del último par de somitas. Quedaban así accesibles todos los órganos del abdomen.

3) Sistema para la alimentación artificial de los insectos.

a) Aparato.

Para realizar la alimentación de los insectos con material marcado, se diseñó un pequeño aparato (adecuado a los pequeños volúmenes a usarse). El aparato consistió en un pequeño tubo de vidrio con capacidad para 1 ml aproximadamente, de una solución de alimentación; estaba cerrado en un extremo con una película de látex o "Parafilm". El espesor de la película elegida permitía que esta fuera atravesada por la lanceta del insecto en su proceso de succión. El tubo se adaptaba a un dedo de vidrio termostatzado a 37°C para aprovechar el termotropismo positivo (102) de estos insectos e inducir su alimentación. Los insectos se colocaron en pequeños vasos de precipitados tapados con un tul y provistos de papel de filtro plegado colocado verticalmente para permitir su ascenso hasta el nivel de la película de látex. (véase figura en la página siguiente)

b) Solución alimenticia artificial.

Para la preparación de una solución alimenticia artificial que fuera ingerida por los insectos y permitiera la realización de experimentos en períodos cortos, se efectuaron distintos ensayos. Finalmente se demostró que una solución de 5 g% de glucosa, 0,9 g% de NaCl, 10 mg% de estreptomicina y 6,34 mg% de penicilina a pH 7, a la que se le agregó 0,15 mCi/ml de l-¹⁴C-acetato de sodio era aceptada por Triatoma infestans y fue utilizada en los experimentos. El agregado de los antibióticos tuvo por objeto reducir al mínimo la flora intestinal del insecto. La duración de la ingesta fue de 10 a 15 minutos y luego, los insectos fueron mantenidos a 28°C por un período de 24 hs., que en algunos casos

///

se extendió a 48 y 72 hs. A esos tiempos se extrajeron los lípidos totales de los insectos y se obtuvieron los ésteres metílicos de sus ácidos grasos.

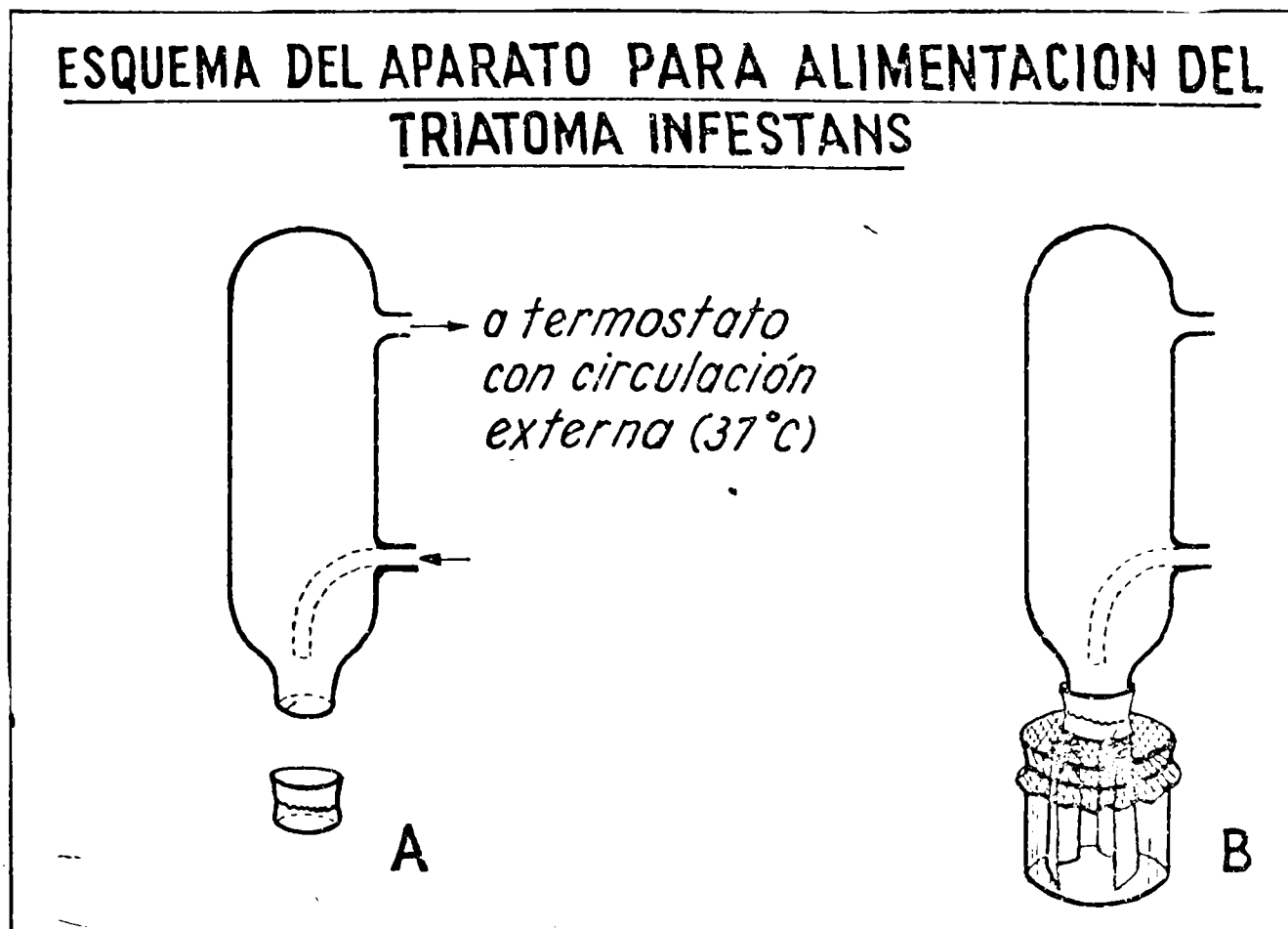


Figura 11

4) Inyección de precursores marcados.

La inyección de precursores radiactivos se realizó directamente en el medio interno del insecto en condiciones de esterilidad. La aguja se aplicó bajo lupa ventralmente en el 4º espacio intersegmental del abdomen manteniéndola tangencial al mismo para evitar daño a los órganos. Los volúmenes inyectados variaron (de acuerdo al estadio del insecto) entre 0,7 y 2,5 μl de solución de acetato- $1\text{-}^{14}\text{C}$ de sodio (0,15 mCi/ml), o de ácidos $1\text{-}^{14}\text{C}$ -palmítico (2×10^5 dpm/ μl) o esteárico- $1\text{-}^{14}\text{C}$ ($3,5 \times 10^5$ dpm/ μl), éstos dos últimos pegados a albúmina. La inyección se realizó lentamente con lo que se logró una buena mezcla de la misma con la hemolinfa que

///

es continuamente bombeada por el vaso dorsal. La herida se taponó inmediatamente para evitar la pérdida del líquido inyectado. A los tiempos de 6, 12 y 24 hs. se los procesó como en 3).

Para el pegado de los ácidos grasos a albúmina estos fueron neutralizados para obtener su sal sódica y luego agregados muy lentamente a una solución de albúmina en "buffer" fosfato pH 7,2(c.=0,02M) agitada mecánicamente a 60°C hasta alcanzar una relación molar de 2:1 del ácido marcado a la albúmina.(103)

5) Extracción de los lípidos.

Se utilizó el método de Folch y col.(104): se homogenizaron los insectos en una solución de cloroformo:metanol(2:1) en una relación de 20 volúmenes de la misma por g de muestra. Dada la dureza del material(exoesqueleto quitinoso) se utilizó un homogeneizador manual con vaso y pistón esmerilado. El homogenado resultante se filtró a través de papel de filtro Whatman 541, que antes y después de la filtración fue lavado con Cloroformo:metanol(2:1), para evitar pérdidas del extracto lipídico. Luego se agregó al filtrado un cuarto de su volumen de agua destilada y se dejó decantar 24 hs. en heladera a 4°C. La fase superior(acuosa) fue removida por aspiración quedando la fase inferior(clorofórmica) con los lípidos extraídos. Para remover restos que pudieran quedar en la interfase y algún remanente de fase superior se filtró a través de papel de filtro humedecido con solución de Folch al cual se le había agregado Na_2SO_4 anhidro. Este filtrado fue llevado a sequedad evaporando el solvente bajo corriente de N_2 o con trompa de agua y retomado en éter de petróleo(30-60) y guardado en congeladora bajo N_2 hasta el momento de estudio.

6) Obtención de ésteres metílicos.

Puesto que los ácidos grasos eran analizados por cromatografía gas-líquido o por radiocromatografía debían primero

///

ser convertidos en sus correspondientes ésteres metílicos.

a) Del extracto lipídico.

Alternativamente se utilizó la interesterificación de lípidos o la saponificación y posterior esterificación de los ácidos grasos. Para la interesterificación se siguió el método de Böttcher y Van Gant(105). Se evaporó el éter en el cuál estaban los lípidos disueltos, se agregó 2 ml de metanol-HCl 3N por tubo y previo gaseado con N₂ para evitar oxidaciones, se mantuvo tapado por 3 hs. a 64°C. Los ésteres metílicos ya preparados se extrajeron por agregado de 3 ml de cloroformo y 1,5 ml de agua destilada. Se agitó enérgicamente, se centrifugó y previa separación de la fase superior, se realizaron 2 lavados más de la fase clorofórmica con el mismo volumen de agua.

Para saponificar, el extracto lipídico fue llevado a seco y luego de agregar 2 ml de una solución metanólica de KOH al 5%(p/v) por tubo y de gasearlo con N₂ se colocó tapado en un baño a 80°C durante 45 minutos. Se extrajo entonces el insaponificable por agregado de 3 ml de éter etílico y 2 ml de agua. Se agitó enérgicamente y se centrifugó. Se repitió 2 veces más con igual volumen de éter etílico la extracción del insaponificable. Luego se agregó 0,5 ml de HCl concentrado a la fase acuosa alcalina para llevar el medio a pH ácido y se efectuaron 3 extracciones con 3 ml c/u de éter de petróleo(P. eb. 30-60°C). El extracto etéreo que contenía los ácidos grasos libres fue llevado a seco y luego de agregarse 2 ml de metanol-HCl 3N se siguió como arriba se indica para la obtención de los ésteres metílicos, reduciéndose el tiempo de esterificación a 1 hora.

b) De las mezclas de incubación.

Las incubaciones se detenían por agregado de 2/3 del volumen de incubación, de una solución metanólica de KOH al 10%(p/v). Luego se llevaba previo gaseado con N₂ y tapado a un baño a 80°C durante 45 minutos. Se acidificaba con 0,5 ml HCl conc., se extraía con éter de petróleo y se esterificaba como anteriormente se indicó. En todos los casos, los ésteres

///

metílicos se tomaban finalmente en éter de petróleo y se guardaban a -20°C hasta el momento de su análisis.

7) Cromatografía gas-líquido.

Esta técnica permitió la separación, identificación y cuantificación de los ácidos grasos. Estos no fueron inyectados como tales, sino como ésteres metílicos de modo que aumentara su volatilidad y disminuyera su polaridad.

a) Corrida cromatográfica.

Se utilizó un cromatógrafo Packard (model 420) con detector de llama de H_2 . Mediante una inyección "puntual" (rápida y en pequeño volumen) la mezcla de los ésteres metílicos en un solvente muy volátil (éter de petróleo) se puso en contacto con la cabeza de la columna ($T=230^{\circ}\text{C}$). El gas carrier (N_2) la transportó a lo largo de la misma ($T=180^{\circ}\text{C}$; longitud 1,80 m; diámetro externo 6 mm). La columna estaba rellena con un soporte inerte: Cromosorb W 80-100 mesh, que estaba cubierto por una fase estacionaria de dietilenglicolsuccinato al 15%. La distinta partición de los ésteres metílicos entre las 2 fases permitió su resolución al variar la velocidad con que la recorrían. Al cabo de la misma un detector de llama de H_2 ($T=225^{\circ}\text{C}$) reconocía cambios en la corriente de ionización cuando las moléculas de la muestra lo atravesaban. Estos cambios son proporcionales a la concentración. Un electrómetro amplificaba y convertía la señal del detector en milivolts. A la salida de éste había un registrador potenciométrico que mediante una aguja inscriptora dibujaba el perfil de elución (cromatograma) de las muestras sembradas. En él la distancia entre el punto de inyección y la perpendicular por el vértice de cada pico a la horizontal indicaba el tiempo de retención del éster correspondiente (t_r). (Véase figura en la página siguiente)

b) Identificación de los ácidos grasos.

b₁) Comparación con standards. La identificación se realizó por corrida de standards en las mismas condiciones. Si los tiempos de retención eran iguales se consideró muy

///

probable que el ácido fuera el mismo. Sin embargo puesto que puede haber ligeras variaciones en las condiciones de trabajo, para la comparación de la muestra con los standards resultó muy útil el uso de los tiempos de retención relativos. Estos se definen como el cociente entre el tiempo de retención de un componente dado y el ^{de} uno conocido que es tomado como referencia. El tiempo de retención relativo depende sólo de la temperatura y de la fase estacionaria (105). Luego la comparación de éstos resulta una herramienta útil para la identificación, en este caso de los ácidos grasos.

b₂) Relaciones de Ackman. Como no siempre es posible disponer de standards de todos los ácidos grasos resultan útiles ciertas correlaciones que pueden establecerse entre ácidos grasos con igual N° de dobles ligaduras de la misma familia (107, 108). Dos ácidos grasos se dicen de la misma familia cuando tienen igual N° de C entre el metilo terminal y el centro del doble enlace más cercano. Así graficando el logaritmo decimal de los tiempos de retención relativos contra la longitud de la cadena de C de los ácidos grasos se observa: que todos los que reúnen esas condiciones determinan una línea recta y además que las líneas rectas así obtenidas son paralelas entre sí. De este modo se logran identificaciones presuntivas.

b₃) Hidrogenación. Un método auxiliar en la identificación de ácidos grasos es la hidrogenación de las muestras. De este modo todos los ácidos grasos no saturados pasan a los saturados de idéntica longitud de cadena. Se pueden descartar así las presencias de ácidos extraños (hidroxilados, ramificados, etc.) cuando la hidrogenación es completa.

Para la hidrogenación se tomó una alícuota de la muestra de ésteres metílicos ya analizada por cromatografía gas-líquido, se llevó a seco y se redisolvió en 2 ml de metanol absoluto. Se agregó 5 mg de óxido de platino (catalizador) y se agitó continuamente en atmósfera de H₂ durante 3 hs. (109) Luego se filtró para eliminar el catalizador y previa evaporación del metanol se retomó en éter de petróleo.

Se recromatografió la muestra y luego la comparación de los tiempos de retención relativos, como así también la sumatoria de las distribuciones porcentuales para cada longitud de cadena "testeó" la validez de las identificaciones presuntivas.

c) Cuantificación de ácidos grasos.

La respuesta del detector de ionización de llama dada por el área del pico cromatográfico, es proporcional a la masa del componente. Luego es posible calcular el porcentaje en masa de un componente por la siguiente expresión:

$$x\% = \frac{A_x}{\sum_{i=1}^n A_i} \times 100$$

dónde "i" es un componente cualesquiera de los "n" componentes de la muestra y "x" es el componente cuyo % se quiere calcular. "A" es el área bajo el pico que señala el subíndice calculada por triangulación. Para ello se trazan un par de tangentes a los lados del pico y la intersección de las mismas con la prolongación de la línea de base del cromatograma determinará la base del triángulo que se multiplica por la altura determinada por la distancia entre la intersección de las 2 tangentes y la base.

d) Los ácidos grasos marcados.

Para la detección de ácidos grasos marcados se utilizó un radiocromatógrafo Packard con contador proporcional. La columna realizaba la separación de los componentes de la muestra como antes se indicó. En este caso el gas "carrier" era Ar. A la salida de la misma, un horno de combustión (T=900°C) en presencia de O₂ convierte la muestra orgánica en CO₂ y H₂O. El agua es retenida por Mg(ClO₄)₂ en tanto que el CO₂ y el Ar penetran en la cámara de conteo, mezclándose con propano seco (propano:Ar+CO₂ 1:9) que actúa como gas "quenching" o de apagado de la radiación que atraviesa la cámara permitiendo una línea de base más estable. El alto potencial existente entre un filamento central y un tubo metálico en la

///

cámara de conteo origina por aceleración de la radiación emitida por el $^{14}\text{CO}_2$, pares iónicos. Estos producen corrientes de pulsos que son amplificadas y contadas. El registro diferencial de los mismos es el radiocromatograma. De él pueden calcularse los tiempos de retención relativos y los porcentajes de distribución de la radiactividad de la misma forma en que se indicó arriba para compuestos no marcados. Los ácidos grasos se identificaron igual que antes (7b).

8) Análisis cuali-cuantitativo de lípidos. Cromatografía en capa fina.

a) Preparación y corrida de las placas.

Para la preparación de las placas de cromatografía en capa fina se utilizó un equipo Desaga. El adsorbente utilizado en cada caso fue suspendido en agua en una relación 1:2(p/v). El extendedor del equipo permitió la obtención de capas uniformes de 0,25 o 0,5 mm de espesor sobre placas de vidrio bien desengrasadas y secas de 20x20 cm o de 20x40 cm. Las placas recién preparadas se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 hs. Fueron luego activadas por calentamiento durante 1 hora a 120°C y después de enfriadas, sembradas con la muestra a resolver por medio de una microjeringa Hamilton. La muestra a sembrar estaba disuelta en solución de Folch. Las placas listas para ser corridas, fueron llevadas a una cuba cromatográfica, ya saturada con el sistema de solventes usado en cada caso, donde se realizó la cromatografía ascendente. Cuando el frente de solvente hubo avanzado convenientemente, la placa fue retirada de la cuba y luego de secada en el ambiente o por succión con bomba de vacío, se utilizó un método adecuado para el revelado.

b) Identificación de los lípidos.

b₁) Lípidos neutros. Se utilizaron placas cubiertas con sílica-gel G de 20x20x0,025 cm. La siembra fue de 50-200 µg. El sistema de solventes fue éter de petróleo:éter etílico (libre de peróxidos):ácido acético (80:20:1 v/v/v). La identificación se realizó por corrida paralela en la misma placa de

///

una mezcla adecuada de standards. El revelado de la placa se realizó con vapores de I_2 bisublimado: manchas amarillas o pardas según la cantidad de lípidos presentes sobre fondo blanco de la sílica. Con el objeto de aumentar la sensibilidad de detección también se utilizó el "charring", técnica ésta que es descripta más adelante.

b_2) Lípidos polares. Para la resolución de los mismos se utilizó: $b_{2,1}$) Cromatografía monodimensional,

$b_{2,2}$) Cromatografía bidimensional.

$b_{2,1}$) Se usaron placas iguales a las indicadas en b_1) y el sistema de solventes fue cloroformo:metanol:agua (65:25:4 v/v/v). La identificación se realizó por comparación con standards previo revelado con reactivos generales: vapores de I_2 , 2'-7'-diclorofluoresceína y "charring". La confirmación de estas identificaciones provino del uso de reactivos específicos (110): $b_{2,1,1}$) rociando con ninhidrina al 0,2% en butanol saturado con agua y llevando a estufa a 100-105°C en atmósfera saturada con agua, los lípidos con grupos amino libres dan color rojo violáceo o rojo contra el fondo blanco de la sílica; $b_{2,1,2}$) para la detección de los lípidos que contienen colina se emplearon:

Reactivo I: 1,7 g de nitrato básico de bismuto disueltos en 100 ml de ácido acético al 20%.

Reactivo II: 40 g de KI disueltos en 100 ml de agua.

Reactivo III: 20 ml del Reactivo I se mezclaron con 5 ml del Reactivo II y 70 ml de agua se agregan poco antes de usar.

Procedimiento: Luego de rociar el cromatograma con el Reactivo III los lípidos que contienen colina se ven como manchas color naranja o naranja rojizo enseguida o luego de ligero calentamiento; $b_{2,1,3}$) Para la detección de fosfolípidos se siguió a Rouser(111).

$b_{2,2}$) Dado que las mezclas de lípidos polares suelen ser de difícil resolución en placas monodimensionales, se efectuó una corrida bidimensional utilizando placas de sílica-gel H que contenía silicato de magnesio al 10%(p/p). El sistema

///

de solventes empleado para correrla en la primera dirección fue cloroformo:metanol:amoníaco al 28%(65/35/5 v/v/v) y para la segunda dirección: cloroformo:acetona:metanol:ácido acético:agua(10:4:2:2:1 por volumen)(112). Antes de sembrar, los lípidos neutros fueron separados de los polares para evitar que por la masa de los primeros se viera afectada la corrida de los segundos. Para ello los lípidos totales(40 mg) obtenidos como se indicó en 5), y tomados en 3 ml de cloroformo, se agitaron con ácido silícico que había sido activado durante 24 hs. a 120°C. La relación de ácido silícico a lípidos se mantuvo por encima de 20 a 1 para no saturar el poder adsorbente del ácido silícico(113). Luego se filtró a través de crisol filtrante lavándose un par de veces con 2 ml de cloroformo. El filtrado clorofórmico estaba enriquecido con lípidos neutros. A continuación 3 lavados del crisol filtrante con 3, 2 y 2 ml respectivamente, permitió la elución de los fosfolípidos. Este filtrado fue el utilizado para la cromatografía bidimensional.

Se corrieron 3 placas: 2 con siembras puntuales de 150 μg c/u y una conteniendo standards de fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, esfingomielina, fosfatidilserina y sulfátidos(10 μg de c/u). La de los standards y una de muestra se revelaron por "charring". Otra, con vapores de I_2 y luego previa evaporación del I_2 con ninhidrina.

c) Cuantificación de las clases de lípidos por densitometría(114).

En esta metodología los cromatogramas en capa fina son revelados por "charring"(carbonización). Para ello se realiza un rociado de la placa previamente corrida y secada al vacío, con una mezcla sulfocrómica preparada saturando una solución de H_2SO_4 al 70%(p/v) con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Luego se coloca en estufa a 180°C durante 30 minutos. Se observan manchas grises o negras(carbón) correspondientes a cada clase de lípidos contra un fondo blanco de sílica. La intensidad de las mismas es proporcional a la cantidad de los lípidos hasta los 20 μg de carbono.

En el análisis de los cromatogramas se utilizó un fotodensitómetro Zeiss que midió la absorción a 540 nm producida por cada una de las manchas por reflexión. Mientras la placa se desplaza según la dirección de la corrida frente a una ranura luminosa, un registrador inscribió sobre el papel distintos picos el cuadrado de cuyas áreas es proporcional a la intensidad de la absorción y por tanto a la masa del lípido presente. Se sembraron 3 cantidades distintas de cada muestra promediándose luego de la lectura por el fotodensitómetro los cuadrados de las áreas de cada pico (clase de lípidos). Se hizo lo mismo con un standard de ácido esteárico corrido simultáneamente en la misma placa y de concentración perfectamente conocida. La relación de los cuadrados de las áreas de la clase lipídica con el standard permitió conocer la cantidad de μg de carbono de aquella. Es importante señalar que los cuadrados de las áreas se promediaron sólo cuando mostraron una respuesta lineal, esto es cuando los valores de los cuadrados de las áreas de cada pico (cada clase lipídica) guardaban entre sí una relación igual a la de las cantidades respectivamente sembradas. Distintos factores para cada clase lipídica permitieron el cálculo de los μg de lípidos a partir de los μg de C:

Triacilgliceroles	1,30	Fosfatidiletanolamina	1,52
Colesterol	1,19	Fosfatidilcolina	1,50
Esteres del colesterol	1,17	Lisofosfátidos	1,64
Diacilgliceroles	1,33	Acidos grasos libres	1,27

A partir de los valores así obtenidos pueden calcularse los porcentajes (p/p) de cada clase lipídica en la muestra.

La densitometría se realizó sobre placas de sílicagel G y se utilizaron los siguientes sistemas de solventes: éter de petróleo:éter etílico:ácido acético (80/20/1 v/v/v) para lípidos neutros y cloroformo:metanol:agua (65/25/4 v/v/v) para lípidos polares.

9) Análisis de la distribución de ácidos grasos en las clases lipídicas más importantes.

Se emplearon placas preparativas de 20x40x0,05 cm de sílica gel G. Se las activó por calentamiento durante una hora a 120°C. La muestra se sembró en bandas de 1,5 cm hasta totalizar una masa de 2 mg. A los lados de la misma se sembraron standards de los lípidos mayoritarios. Luego se colocó en una cuba saturada con el primer sistema de solventes: cloroformo:metanol:agua:ácido acético(65:25:3:1,5 por volumen). Cuando el frente de solvente alcanzó la mitad de la placa, ésta se secó en una cámara de vacío y luego de una hora se colocó en otra cuba saturada con el segundo sistema de solventes: éter de petróleo:éter etílico(libre de peróxidos):ácido acético(80:20:1 por volumen). Cuando el frente de solvente alcanzó un cm por debajo del borde superior de la placa, ésta se colocó nuevamente en la cámara de vacío. Luego se reveló con vapores de I₂ las zonas recorridas por los standards. Con una hoja de acero se barrieron las zonas correspondientes por dónde había corrido la muestra recogiendo la sílica en tubos de base redonda conteniendo las distintas fracciones. Se les agregó metanol:HCl 3 N para transesterificarlos. Los ésteres metílicos se extrajeron de la sílica por agregado de 1 ml de agua 2 ml de éter de petróleo. Luego se agitó energicamente y se centrifugó, separándose la capa etérea. El extracto etéreo se analizó por cromatografía gas líquido

10) Métodos analíticos.

a) Homogeinización de tejidos.

Para cada experimento se seleccionaron 40 o 60 insectos hembras adultas jóvenes(a 15 días de la muda), habiendo estas realizado una alimentación sobre palomas. Fueron entonces disecadas bajo lupa. Cuidadosamente se extrajeron con una pinza los órganos abdominales con excepción del intestino. Estos eran inmediatamente recogidos en una solución helada: 0,25 M sacarosa, 0,1 mM EDTA, 1,5 mM cisteína y 62 mM de "buffer" fosfato(pH 7,0). El material fue homogeneizado por medio de

///

6 golpes a máxima velocidad del triturador en un aparato Potter Elvehjem. En otros experimentos los mismos órganos fueron homogeneizados en una solución 0,25 M sacarosa, 0,15 M KCl, 5 mM de $MgCl_2$, 4 mM de N-acetil cisteína, 0,1 mM EDTA y 62 mM de "buffer" fosfato (pH 7,0).

b) Fraccionamiento subcelular.

El homogenado así obtenido (véase punto anterior) se centrifugó a 700 g durante 10 minutos descartándose un precipitado que contenía restos celulares y núcleos. El sobrenadante I se centrifugó a velocidades que se indicarán oportunamente obteniéndose un precipitado que se llamó "fracción mitocondrial" y un sobrenadante II. Estas dos centrifugaciones fueron realizadas en una centrifuga refrigerada Sorvall (Super-speed RC-2) a 2-4°C. El sobrenadante II se filtró a través de gaza previamente humedecida con solución de homogenización, para separar los lípidos. Luego se lo centrifugó a 105.000 g durante 60 minutos en una centrífuga Spinco Modelo L2. Se obtuvo un precipitado ("fracción microsomal") y un sobrenadante III (fracción soluble). Cuando los precipitados se utilizaron en los ensayos enzimáticos fueron previamente resuspendidos en la solución de homogenización.

En el análisis de las distintas fracciones obtenidas se ensayaron las actividades enzimáticas de: I) Glucosa-6-fosfatasa, II) NADPH-citocromo c reductasa y III) Succinato-citocromo c reductasa.

I) Ensayo de actividad de Glucosa-6-fosfatasa.

En este caso la solución de homogenización usada fue sacarosa 0,25 M. El fraccionamiento subcelular se realizó como se indica arriba. Se llamó "fracción mitocondrial" a la obtenida entre 700 g- 10 min y 12.000 g- 30 min.

En el ensayo se determinó el fósforo liberado al medio de reacción cuando la fracción subcelular era puesta en contacto con Glucosa-6-fosfato (115). La medición se realizó en un espectrofotómetro Zeiss PMQ II a 700 nm.

El medio de incubación estaba compuesto por: glucosa-6-P 25 mM, solución "buffer" cacodilato pH 6,5 25 mM y la "fracción" a ensayar en sacarosa/EDTA (0,25 M/1 mM) en un volumen final de 0,4 ml. El tiempo de incubación fue de 10 minutos y

y la temperatura de 37°C. Paralelamente se realizó un control en él que la muestra se agregó después del agregado de la solución de ácido ascórbico y ácido tricloracético; también un blanco de reactivos en el que se agregó sacarosa/EDTA (0,25 M/1 mM) en lugar de la muestra y un testigo que contenía solución de fosfato en lugar de la muestra. La incubación se detuvo por agregado de 2 ml de solución de ácido ascórbico/ácido tricloracético (2%/10% p/v). Se mezcló bien y se centrifugó durante 3 minutos a 3.000 g. Se tomó 1 ml del sobrenadante claro y se le agregó 0,5 ml de solución de molibdato de amonio (1% p/v). Luego de agitar se agregó 1 ml de solución de arsenito-citrato (2%/2% p/v). Se agitó nuevamente y se dejó reposar 15 minutos. Luego se leyó la densidad óptica a 700 nm.

II) Ensayo de NADPH-citocromo c reductasa y III) de succinato-citocromo c reductasa.

Estos ensayos fueron adaptados de Sottocasa y col. (116). La homogeneización se realizó en sacarosa 0,25 M, "buffer" fosfato pH 7,5 10 mM. Las fracciones ensayadas fueron obtenidas por sucesivas centrifugaciones a 700 g - 10 min.; 10.000 g - 20 min.; 105.000 g - 1 h.

Ambas actividades se midieron espectrofotométricamente por seguimiento de la reducción del citocromo c a 550 nm hasta los dos minutos de haberse agregado el sustrato. La mezcla de incubación contenía en 300 µl: NADPH 0,1 mM o succinato 3 mM; citocromo c 0,1 mM; KCN 0,3 mM; "buffer" fosfato pH 7,5 50 mM y de 2 a 30 µg de proteínas en cada "fracción" ensayada.

c) Determinación de proteínas. (117)

Fue realizada por el método de Lowry (microtécnica) que permitió cuantificar proteínas cuando las concentraciones eran inferiores a 1 mg/ml. La elección del método fue hecha con el objeto de reducir al mínimo la derivación de material ya que éste era escaso.

Reactivos

Solución A: CO_3Na_2 al 4% en NaOH 0,1 N

Solución B: Tartrato de Na y K al 2% y $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1%

Solución C: Solución A : Solución B (50:1 v/v)

Solución D: Reactivo de Folin Cicolteau

Procedimiento: Se toma un volumen de muestra menor o igual a 0,1 ml y se completa cuando es necesario a 0,1 ml con NaOH 0,1 N. Se agregan 0,5 ml de reactivo C mientras se agita enérgicamente. Se deja reposar durante 30 minutos al cabo de los cuales se agregan 50 μ l del reactivo D mientras se agita. Luego de 30 minutos se mide la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro Zeiss PMQ II contra un blanco de reacción en el que el volumen de la muestra es reemplazado por NaOH 0,1 N. De observarse turbiedad debido a la presencia de lípidos, estos se eliminan extrayéndolos con un volumen igual al de la mezcla de reacción, de cloroformo. Como testigo se usa una solución de albúmina bovina (Armour, fracción V), de una concentración 0,3 mg/ml en NaOH 0,1 N.

d) Ensayo de actividad de ácido graso sintetasa.

El sobrenadante de 10.000 g - 30 min fue incubado aeróbicamente en un baño a 35°C. La solución de incubación utilizada tenía la siguiente composición: "buffer" fosfato pH 7,0 0,1 M, $MnCl_2$ 1 mM, cisteína 2 mM, $NaHCO_3$ 10 mM, ATP 1,2 mM, NADPH 0,1 mM, NADH 0,08 mM, $1-^{14}C$ acetil-CoA 20 μ M. La cantidad de proteínas agregadas por tubo fue de 0,93 mg. El volumen final fue de 1 ml. La reacción se detuvo a distintos tiempos por agregado de KOH al 10% en metanol (1,33 ml).

El sobrenadante de 105.000 g - 1 h. (2/3 superiores) fue incubado en la misma solución, en la que se reemplazó la cisteína por N-acetil cisteína 1,4 mM. La concentración de ATP se elevó 1,5 mM, la de NADPH a 0,2 mM, la de NADH a 0,16 mM. La cantidad de proteínas agregadas por tubo fue de 1 mg y el volumen final 1 ml. La temperatura de incubación fue de 30°C. La reacción se detuvo igual que en el caso anterior luego de 1 h.

R E S U L T A D O S

1) Contenido lipídico.

Toda vez que se estudió el contenido lipídico o la composición de ácidos grasos y lípidos, hubo que considerar el problema de las cuantiosas ingestas que estos insectos realizan (Pueden en una alimentación hasta quintuplicar su peso inicial). Si bien la sangre no es un alimento rico en lípidos su contribución en un extracto lipídico total puede no ser despreciable. Por lo tanto los insectos fueron tomados sin ninguna alimentación entre los 2 y 7 días después de la muda y previa disección, extraído su tubo digestivo. Este luego de varios lavados con una solución de "buffer" fosfato pH 7,0 0,2 M, hasta eliminación de su contenido se incorporó junto al resto del insecto, a la solución extrayente de lípidos (solución de Folch). En la Tabla I se indican los pesos promedio y el contenido de lípidos de cada estadio desde huevos a adultos de ambos sexos.

Se observa que el peso promedio del huevo es mayor que el de ninfa de estadio I como consecuencia de la pérdida del corión durante la eclosión del huevo. El peso individual del estadio I, $1,31 \pm 0,02$ mg se incrementa hasta valores de 100 a 200 mg en los individuos adultos. El contenido lipídico es muy elevado en el huevo y en ninfa I. Los valores llegan a $7,0 \pm 1,0\%$ y $8,4 \pm 0,5\%$ respectivamente. El contenido absoluto de lípidos disminuye en el pasaje de huevo a ninfa I, lo que resulta razonable puesto que no media ninguna ingesta. En ninfa II el contenido lipídico cae bruscamente a valores del $1,5 \pm 0,6\%$ y sigue descendiendo hasta el penúltimo estadio ninfal. En los insectos adultos esta cifra puede llegar a duplicarse. Diversos lotes estudiados en distintas épocas del año mostraron variación en su contenido lipídico.

2) Composición de ácidos grasos.

a) Composición de ácidos grasos totales.

En la figura 12 se reproducen los cromatogramas gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos grasos totales de insectos machos adultos, antes y después de su hidrogenación y el del correspondiente a la sangre de paloma que le

///

Tabla I

Variaciones del peso y contenido lipídico del *Triatoma infestans* durante su ciclo evolutivo. (1)

Estadio	Nº de lotes	Nº de individuos por lote	Peso promedio (mg)	Lípidos (% p/p)
Huevo	3	150	2,05 ± 0,75	7,0 ± 1,0
Ninfa I	3	150	1,31 ± 0,02	8,4 ± 0,5
Ninfa II	3	30	12,6 ± 4,4	1,5 ± 0,6
Ninfa III	3	10	34,7 ± 6,4	1,4 ± 0,2
Ninfa IV	3	6	67,1 ± 6,8	1,1 ± 0,1
Ninfa V	3	3	71,9 ± 9,3	1,7 ± 0,3
Adulto ♂(2)3		3	102 ± 12	1,5 ± 0,4
Adulto ♀(3)3		3	145 ± 16	1,9 ± 1,0

(1) Insectos recolectados en Febrero de 1.976.

(2) Recolectados 2 días después de la muda.

(3) Recolectados 7 días después de la muda.

Adultos machos y hembras recolectados en Agosto de 1.976 pesaban 206 ± 49 mg y 149 ± 19 mg y contenían $3,36 \pm 0,05$ y $3,19 \pm 0,25$ % de lípidos respectivamente. Los valores están expresados como promedio \pm d.s. (desviación standard).

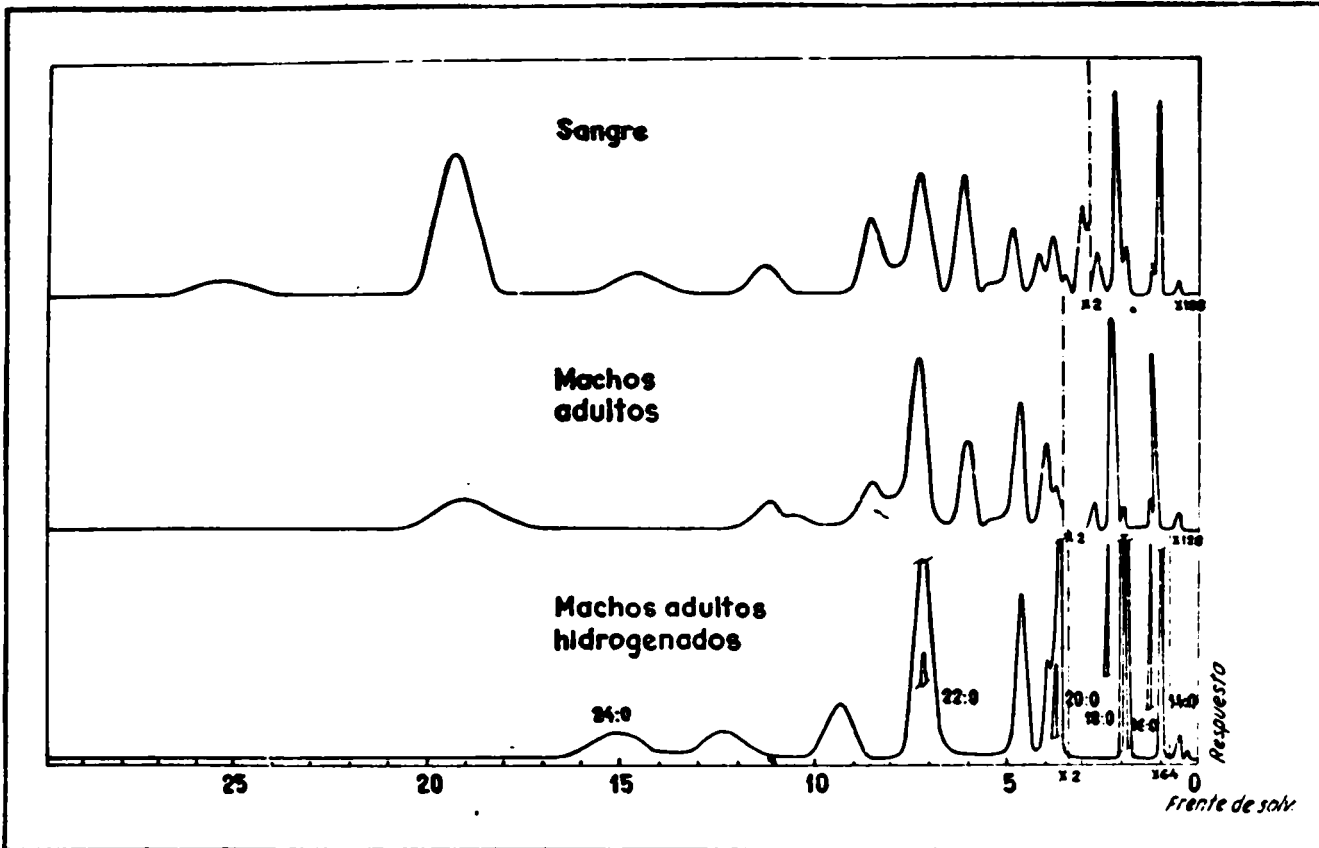


Fig. 12 Cromatogramas gas-líquido

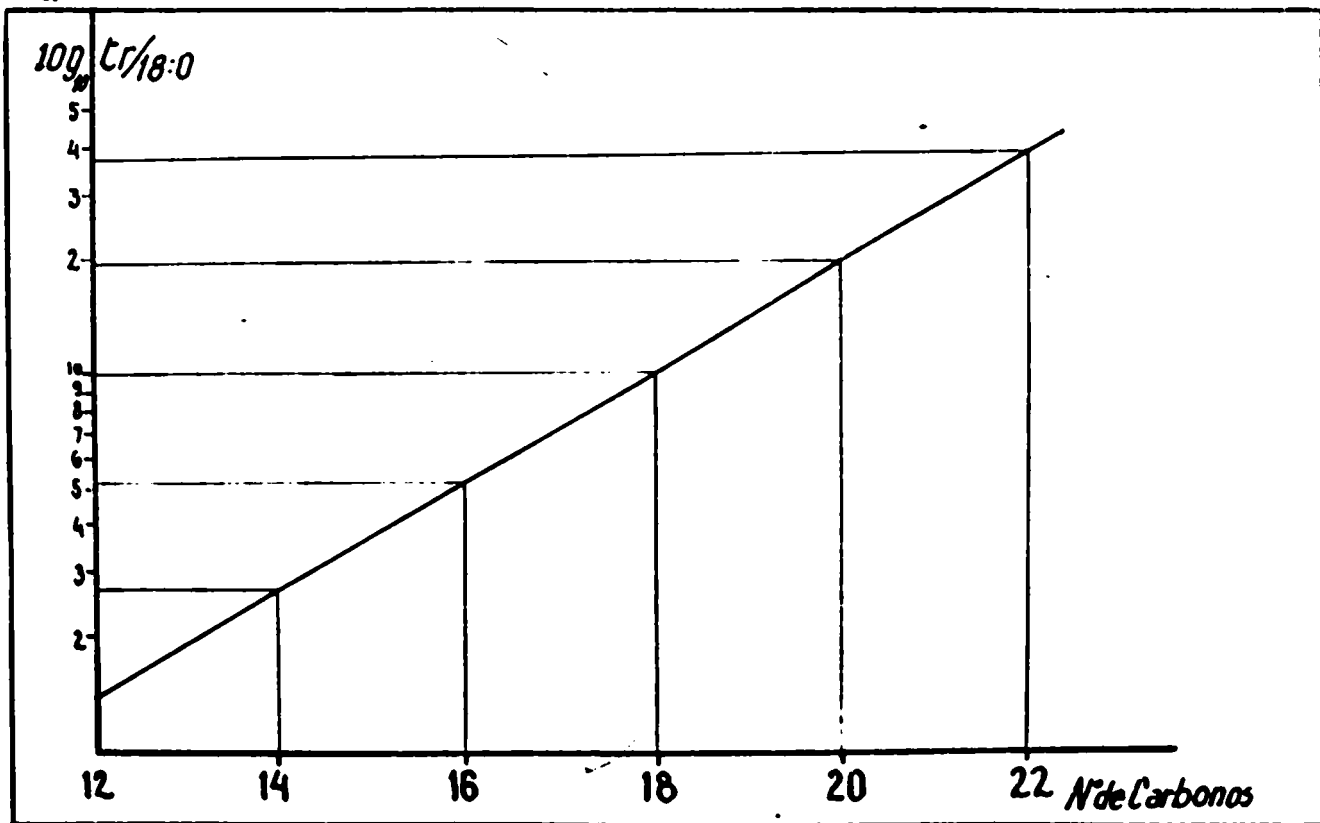


Fig. 13 Gráfico de los logaritmos de los tiempos de retención relativos a ácido esteárico vs. longitud de cadena carbonada de los distintos ácidos grasos saturados.

sirvió de alimento. La obtención de un extracto lipídico de ésta última se realizó sobre el contenido intestinal del insecto. Es fácil comprobar la existencia de los siguientes ácidos grasos pares saturados: trazas de láurico, palmítico, esteárico, araquídico y behénico. Al hidrogenar desaparecen los picos correspondientes a ácidos grasos no saturados que se convierten en los saturados de igual longitud de cadena carbonada. Es importante señalar que los valores % de los ácidos saturados pares identificados en el cromatograma de la muestra hidrogenada correspondían a: 0,4% de 14:0, 26,5% de 16:0, 66,2% de 18:0, 1,3% de 20:0 y 2,4% de 22:0. La sumatoria de los picos no saturados y saturados de igual longitud de cadena de la muestra sin hidrogenar concordó bastante bien con estos valores dando 0,5% para 14 carbonos, 25,8% para 16, 69,3% para 18, 0,7% para 20 y 2,3% para 22. Se comprobó así que el palmitoleico se convierte en palmítico; el oleico y linoleico con $tr/18:0$ 1,11 y 1,36 respectivamente se transforman en esteárico. Se comprueba la existencia de pequeñas cantidades de ácidos no saturados de 20 carbonos. A este grupo pertenece el ácido de $tr/18:0$ 3,23 que corresponde por su ubicación cromatográfica a $20:4\omega6$ (araquidónico). Entre los ácidos de 22 carbonos se reconoce el pico de $tr/18:0$ 10,15 que se hidrogena a behénico y correspondería a un ácido $22:6\omega3$. En la tabla II se da un ejemplo de la composición de ácidos grasos del *Triatoma infestans* en estadios extremos de su ciclo evolutivo: huevo y adultos de ambos sexos. Predominan los ácidos oleico, palmítico, linoleico y esteárico. En cambio son componentes minoritarios: palmitoleico, araquidónico, mirístico, araquídico, behénico y otros no identificados. Para la identificación de los ácidos grasos se graficaron los $\log_{10} tr/18:0$ vs. longitud de cadena carbonada como se muestra en la fig. 13.

b) Variación de la composición de los ácidos grasos durante el ciclo evolutivo.

En la fig. 14 se representa la variación de los componentes más importantes durante el ciclo evolutivo del *Triatoma infestans*.

Tabla II

Composición por ciento de los ácidos grasos del *Triatoma infestans* en sus estadios de huevo y adultos.

ácido graso	tr/18:0 (1)	Huevos	Macho	Hembra
12:0	0,14	rastros	rastros	rastros
14:0	0,27	0,5	0,5	0,6
16:0	0,52	24,7	21,5	23,8
16:1	0,61	5,9	4,4	6,2
18:0	1,00	7,1	7,2	8,0
18:1	1,11	51,4	53,1	49,2
18:2	1,36	6,8	8,9	8,8
18:3	1,56	0,3	rastros	0,2
x ₁	1,79	0,1	rastros	0,1
20:0	1,95	0,1	0,2	0,2
x ₂	2,13	0,2	0,4	0,1
x ₃	2,50	0,6	0,7	0,5
x ₄	2,84	rastros	rastros	rastros
20:4	3,23	0,3	0,5	0,4
22:0	3,89	1,1	1,3	0,7
x ₅	4,47	0,3	0,4	0,3
x ₆	5,96	0,3	0,2	0,2
x ₇	7,70	rastros	-	-
22:6	10,15	0,3	0,7	0,7

(1) tr/18:0 es el tiempo de retención relativo al ácido esteárico de cada uno de los ácidos grasos.

Los resultados corresponden al análisis de 3 grupos de insectos (5 individuos en c/u) y 150 huevos. Los valores expresan el por ciento de ácidos grasos totales. Las muestras se recolectaron en Agosto de 1.976.

Composición de ácidos grasos totales más importantes a lo largo del ciclo evolutivo del "Triatoma infestans"

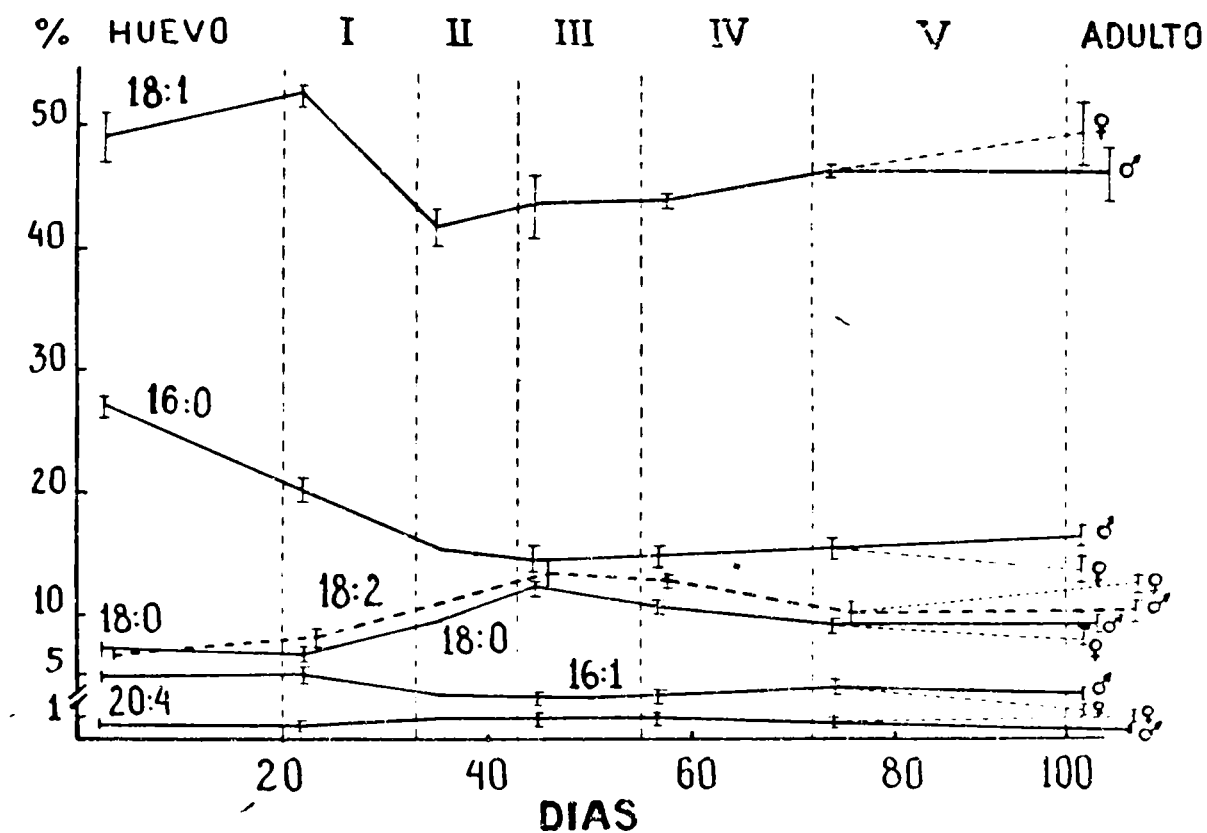


Figura 14

Es notorio el descenso relativo de los ácidos palmítico y palmitoleico en la transformación de huevo a ninfa II. A partir de ese momento la proporción de ambos se mantiene casi constante en los restantes estadios. También es notable la permanencia y hasta ligero aumento de la proporción de oleico en la transición de huevo a ninfa I, y el brusco descenso del mismo en ninfa II. Luego se observa un aumento ligero y gradual hasta el estadio adulto en el que la hembra alcanza una proporción semejante a la del huevo. Mientras estos ácidos disminuyen en el pasaje de huevo a ninfa II, se incrementa la proporción de linoleico y esteárico. El contenido de ácidos polietilénicos superiores tales como el araquidónico es sumamente bajo y sufre pequeñas variaciones.

c) Composición de ácidos grasos en diferentes épocas del año.

Las composiciones del huevo e insectos adultos fueron analizadas en los meses de Diciembre, Marzo y Agosto y se mues

///

TABLA III

Composición % de los ácidos grasos principales de nuevos e insectos adultos en diversas épocas del año.

Acidos ¹	HUEVOS					MACHOS					
	Dic.	Marzo	Agosto	Dic.	Marzo	Agosto	Dic.	Marzo	Agosto	Marzo	Agosto
16:0	24,3 ²	27,3	23,4	20,6	14,3	18,8	15,7	17,5	20,8		
	(22,8-26,4)	(26,6-27,9)	(22,1-24,7)	(19,1-21,7)	(13,2-15,7)	(14,8-23,9)	(14,9-16,5)	(17,2-18,1)	(20,1-21,5)		
16:1	4,6	4,9	5,5	3,0	2,4	5,4	2,6	3,1	4,3		
	(4,0-5,6)	(4,8-5,0)	(5,4-5,8)	(2,4-3,5)	(2,0-2,7)	(4,7-6,2)	(1,8-3,4)	(2,8-3,3)	(4,3-4,4)		
18:0	7,5	7,4	6,9	8,1	9,2	7,6	9,1	10,2	7,6		
	(7,5-7,6)	(7,2-7,7)	(6,6-7,1)	(8,0-8,3)	(8,3-10,1)	(7,0-8,0)	(8,5-9,7)	(9,6-11,2)	(7,2-8,0)		
18:1	49,6	49,2	51,8	44,2	49,5	51,3	43,4	46,8	51,2		
	(47,6-51,2)	(47,2-51,2)	(51,3-52,4)	(42,5-45,6)	(45,3-51,6)	(49,2-52,6)	(41,3-45,5)	(45,3-49,0)	(50,5-53,3)		
18:2	5,7	7,4	7,2	9,2	12,7	9,2	11,3	10,7	9,1		
	(5,6-5,9)	(7,2-7,5)	(6,8-7,6)	(7,8-10,0)	(12,0-13,3)	(8,8-9,7)	(10,1-12,6)	(9,4-12,0)	(8,9-9,3)		
20:4	0,4	0,4	0,3	0,9	1,1	0,6	0,9	0,5	0,6		
	(0,2-0,6)	(0,3-0,5)	(0,3-0,3)	(0,6-1,2)	(1,0-1,3)	(0,4-0,9)	(0,8-1,1)	(0,3-1,0)	(0,5-0,7)		

1.- Otros ácidos completan el 100%.

2.- Corresponden al análisis de 150 nuevos y tres grupos de 2 a 5 insectos por grupo. Los resultados están expresados por el valor promedio y entre paréntesis los valores extremos.

tran en la Tabla III. Se observa la tendencia del palmítico a estar en proporciones mayores en el huevo respecto de adultos en las épocas del año estudiadas, en tanto que con el linoleico y esteárico sucede a la inversa.

d) Relación de la composición de ácidos grasos con la dieta.

Los insectos fueron alimentados con sangre de paloma. La composición de esa sangre obtenida del intestino y la de los insectos tanto machos como hembras luego de eliminarse el contenido intestinal fue estudiada comparativamente a los 3 o 4 días de la ingesta (véase fig. 15)

COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS
TOTALES DE ADULTOS Vs. ALIMENTO

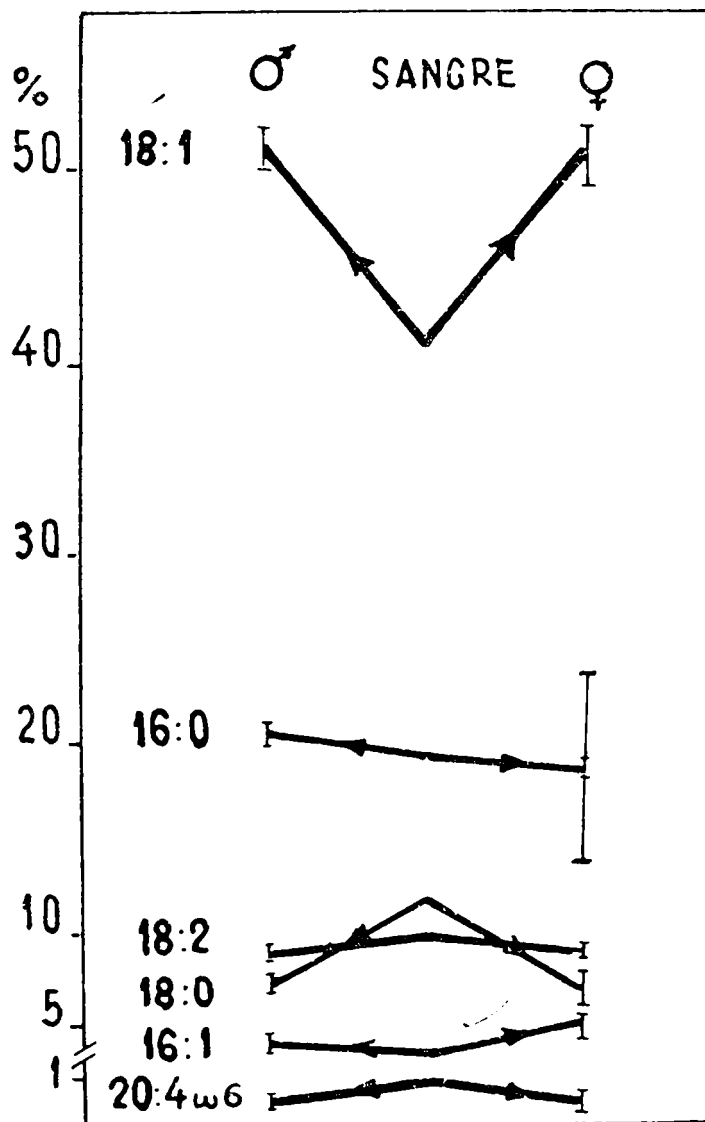


Fig. 15

Ambas composiciones de sangre e insecto son similares pero no iguales. Es claro el aumento de oleico a expensas principalmente de una disminución de esteárico.

3) Composición de clases de lípidos totales.

Las clases de lípidos y la proporción de los mismos en los lípidos totales del *Triatoma infestans* fue determinada por cromatografía en capa fina y densitometría (figs. 16 y 17) (Tabla IV).

Fig. 16 Cromatograma en capa fina de lípidos polares y reacciones de los mismos.

Frente de solvente ?					Reacciones				
					-	-	+	-	T.G.
					-	-	+	-	A.G.
					-	+	+	+	P.E.
					+	-	+	+	P.C.
					-	+	+	+	L.P.E.
					+	-	+	+	Sph.
					+	+	+	+	L.P.C. ?
Standard PC+Liso-PC	Hembra adulta	Huevo	Standard de higado de rata	Standard de P.E.	Dragendorff	Ninhydrina	Iodo	Fósforo	

Tanto en huevo como en insectos adultos se reconoció la presencia de lípidos comunes. Los lípidos polares se separaron con cloroformo:metanol:agua (65/25/4 v/v/v) en corrida monodimensional (fig. 16). Se reconocieron cantidades importantes de fosfatidilcolina y de fosfatidiletanolamina que fueron identificadas por sus R_f en comparación con los de los standards respectivos, por su contenido de fósforo y por dar coloración con los reactivos de Dragendorff y ninhidrina respectivamente. En forma similar se detectaron pequeñas cantidades de los lípidos derivados de fosfatidilcolina (l-PC) y fosfatidiletanolamina (l-PE) y también de esfingomielina (Sph.)

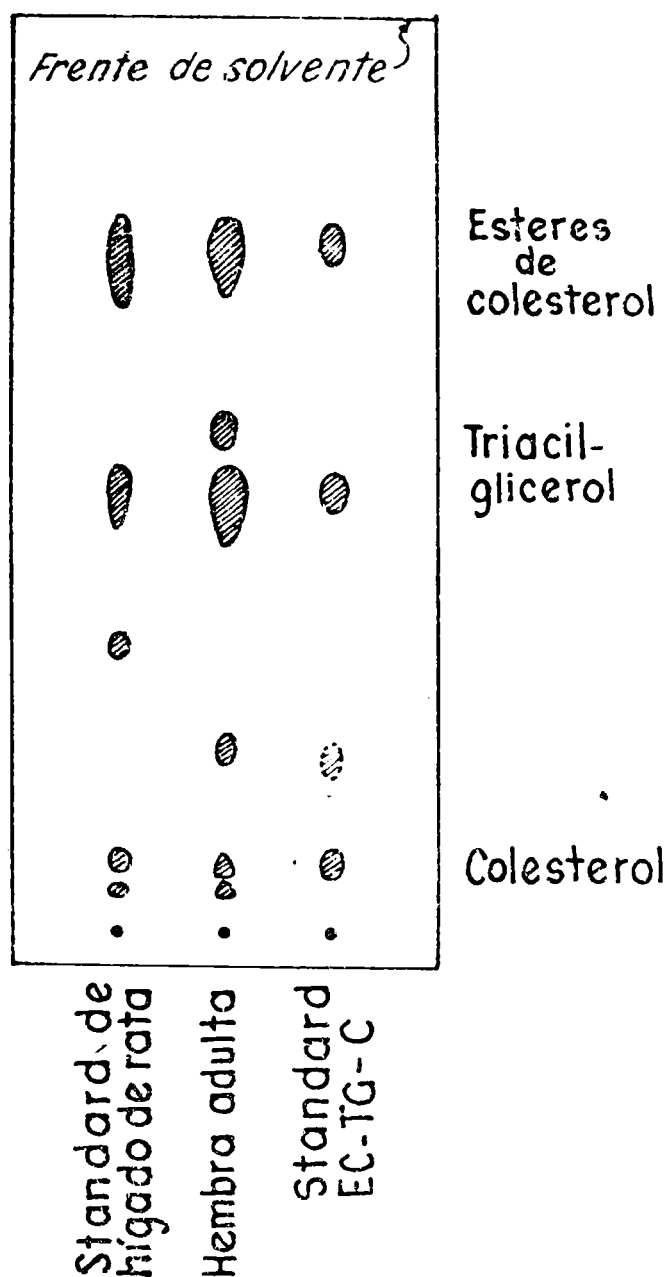


Fig. 17 Cromatograma en capa fina de lípidos neutros.

Para corroborar las identificaciones anteriores se utilizó cromatografía bidimensional. El sistema de solventes para la primera dirección fue cloroformo:metanol:amoníaco al 28% (65:35:5 v/v/v) y para la segunda dirección cloroformo:acetona:metanol:ácido acético:agua (10:4:2:2:1 por volumen). Las identificaciones se hicieron nuevamente por comparación con standards (figs. 18 y 19) y por reacciones específicas. Como la corrida fue hecha luego de la separación de lípidos neutros pudo sembrarse una cantidad mayor de muestra y se pudieron reconocer además de los fosfolípidos mayoritarios ya mencionados, los lisoderivados correspondientes, esfingomielina, fosfatidilserina, y sulfolípidos todos en muy baja proporción como lo reveló la carbonización por rociado con mezcla sulfocrómica de la placa y calentamiento de la misma a 180°C durante 30 minutos.

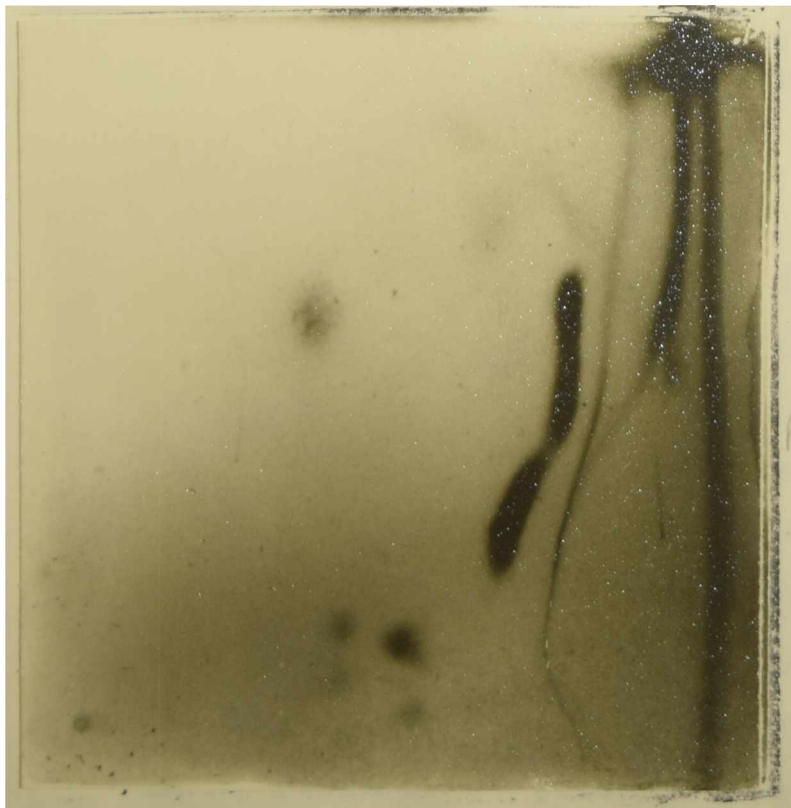
Fig. 18 Cromatograma
bidimensional

de lípidos polares usa-
dos como standard. La
mezcla sembrada conte-
nía 10 μ g de cada uno
de los siguientes lí-
pidos: fosfatidileta-
nolamina, fosfatidil-
colina, esfingomieli-
na, lisofosfatidilco-
lina (todos ellos y en

ese orden sobre la diagonal del cromatograma que une el punto de siembra con el sitio donde se cruzan los 2 frentes de sol-
ventes), sulfolípidos (por encima de la citada diagonal) y fos-
fatidilserina (por debajo).



Fig. 19 Cromatograma bidimensional de lípidos polares del *Triatoma infestans* efectuado en las mismas condiciones que el anterior. (Insectos hembras y adultas). Pueden apreciarse



cantidades importantes de:
fosfatidiletanolamina y de
fosfatidilcolina, y bastan-
te inferiores de: esfingo-
mielina, lisofosfatidilco-
lina (en ese orden sobre
la línea principal de lí-
pidos que une el primero
con el punto de siembra),
lisofosfatidiletanolamina
(sobre el anterior), sulfo-
lípidos y fosfatidilserina
(como en la fig. 18)

Tabla IV

Composición lipídica de huevos e insectos adultos.

Lípidos	Huevos	Hembras	Machos
	%	%	%
Esteres de colesterol	5,8	4,9	2,7
X	0,5	-	0,5
Triacilglicerol	86,5	82,5	84,6
Acidos grasos	0,2	0,2	0,3
Colesterol	2,1	4,1	1,6
Diacilglicerol	0,6	0,2	0,2
Fosfatidiletanolamina	1,9	3,7	3,9
Fosfatidilcolina	2,2	4,0	5,8
Lisofosfatidiletanolamina		0,3	0,3
Esfingomiolina	0,1	0,1	0,1
Lisofosfatidilcolina		-	-

Muestras de insectos recién mudados y en ayunas tomadas en Diciembre de 1.976.

Utilizando éter de petróleo:éter etílico:ácido acético(80:20:1 v/v/v) se pudieron separar y reconocer varios componentes no polares(fig. 17). El componente mayoritario es el triacilglicerol. También están presentes aunque en bastante menor proporción colesterol, ésteres de colesterol, diacilglicerol y un componente identificado presuntivamente como alquildiacilglicerol(X) que con el sistema de solventes utilizado tiene un R_f un poco mayor al del triacilglicerol.

En la Tabla IV es posible observar que si bien las clases

///

de lípidos son comunes para huevos e individuos adultos, las proporciones relativas son algo, diferentes. En huevo es notable el predominio de los triacilgliceroles y aunque contiene también una cantidad elevada de ésteres del colesterol, es muy baja la de fosfolípidos. En hembras y machos adultos se observan en cambio valores elevados de fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina que están acompañados por niveles también elevados de colesterol y ésteres del colesterol. El contenido de triacilglicerol es alto pero inferior al hallado en huevos. Otras muestras de hembras adultas analizadas en otra época presentaron una relación de fosfatidiletanolamina/fosfatidilcolina mayor a uno.

4) Composición de ácidos grasos de las principales clases de lípidos.

Los lípidos constitutivos de huevos e insectos adultos fueron fraccionados por cromatografía en capa fina. Los lugares correspondientes a los lípidos neutros y polares más significativos sobre la placa: triacilglicerol, fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina fueron extraídos y la composición de ácidos grasos estudiada por cromatografía gas-líquido (Tabla V).

Se observa que en triacilglicéridos predominan los ácidos palmítico y oleico tanto en adultos como en huevo. En ambos estadios es también apreciable la proporción de palmitoleico, esteárico y linoleico.

En los fosfolípidos, principalmente en fosfatidiletanolamina, se observan variaciones de la proporción en que se encuentran estos ácidos mayoritarios. Hay además una diversidad mayor en la composición de ácidos grasos respecto a triacilglicéridos (véase Tabla V). Muchos todavía permanecen sin identificar. Entre los reconocidos figuran los mayoritarios: oleico, palmítico, esteárico y linoleico. En fosfatidiletanolamina hay en general menor proporción de palmitoleico y palmítico que en triacilglicéridos y mayor de esteárico y linoleico. Aparecen ácidos de mayor peso molecular en las zonas de

///

TABLA V

Composición % de los ácidos grasos de triacilglicerol, fosfatidil-etanolamina y fosfatidil-colina de huevos e insectos adultos machos y hembras.

Ácidos grasos	tr 18:0	Huevos			Macho			Hembra		
		T.G.	P.E.	P.C.	T.G.	P.E.	P.C.	T.G.	P.E.	P.C.
14:0	0,27	0,5	Rastros	0,5	Rastros	1,2	0,5	0,3	Rastros	Rastros
16:1	0,46	---	1,0	---	0,9	0,6	---	0,2	0,8	0,8
16:0	0,52	28,1	27,5	20,0	17,7	21,2	27,0	18,7	23,8	23,8
16:1	0,61	5,9	3,5	4,8	2,9	2,6	4,7	1,2	4,4	4,4
16:2	0,73	Rastros	1,4	0,7	---	---	---	Rastros	Rastros	Rastros
18:1	0,90	---	3,6	0,9	Rastros	0,9	---	0,4	3,4	3,4
18:0	1,00	7,6	24,7	8,0	19,4	9,4	8,6	25,5	8,9	8,9
18:1	1,11	50,0	21,0	43,9	40,6	40,5	48,9	31,1	37,3	37,3
18:2	1,36	7,2	5,4	7,6	9,6	9,7	6,8	11,7	8,6	8,6
18:3	1,54	---	1,3	1,6	1,0	---	---	Rastros	Rastros	Rastros
20:0	1,86	0,1	2,7	1,9	1,0	1,7	0,1	0,9	1,5	1,5
X ₂	2,18	Rastros	3,2	4,5	3,2	5,4	0,4	2,1	5,6	5,6
X ₃	2,54	0,1	1,4	1,5	0,3	2,1	0,5	2,2	Rastros	Rastros
X ₄	2,94	Rastros	1,8	2,2	1,1	2,2	---	1,1	1,4	1,4
20:4	3,18	0,2	0,3	0,3	0,6	0,4	0,3	0,2	0,1	0,1
22:0	3,89	0,3	1,2	0,9	0,7	1,9	0,4	0,5	0,8	0,8

Análisis de un "pool" de 150 huevos y dos lotes de 5 insectos obtenidos en agosto de 1976. Componentes menores completan el 100%.

En T.G. y P.E. de hembras se halló un pico no identificado X₆ de $\frac{tr}{tr 18:0} = 5,94$ en la proporción de 1,4% y 3,4 respectivamente.

20 y más carbonos, entre ellos araquidónico. En las manchas de fosfatiletanolamina y fosfatidilcolina además de ácidos grasos se hallaron dos pequeños picos con tr algo inferior a palmítico y esteárico que se identificaron tentativamente como derivados de palmitaldehído y estearaldehído. El tipo de solvente usado en el fraccionamiento de los lípidos polares no resuelve la mezcla de fosfolípidos de los correspondientes plasmalógenos de etanolamina y colina. Ambos dan las mismas reacciones de coloración. Cuando estos lípidos son interesterificados con metanol-HCl los ácidos grasos se convierten en ésteres metílicos y los ésteres vinílicos del plasmalógeno en dimetilacetales de los aldehídos correspondientes. Los dimetilacetales en las condiciones empleadas para cromatografía gas-líquido (Fase estacionaria polar) tienen tr ligeramente inferiores a los ésteres metílicos de igual longitud de cadena carbonada.

5) Una solución para la alimentación del Triatoma infestans.

Se ensayaron varias soluciones con el objeto de sustituir la sangre (118) o el suero (119) en la alimentación artificial de la vinchuca. Conocida la composición química de la sangre se prepararon soluciones de composición semejante don de el aporte proteico era caseína. No hubo resultados positivos ni aún con una simple solución de caseína. Se probó suero de vaca, observándose que para la alimentación artificial era necesaria una presión de hambre mayor que para la alimentación sobre animales. Se ayunó por treinta días niñas de estadio I y luego se les ofreció agua. Se observó una muy pequeña ingesta. Finalmente el ensayo de la solución glucosada cuya composición se detalla en materiales y métodos, aportó resultados positivos. Dado lo incompleto de su constitución se la destinó a experimentos de tiempos cortos, sin pretensión de que la misma sirviera en modo alguno a la evolución de los insectos.

6) Biosíntesis de ácidos grasos "in vivo".

a) Alimentación con 1-¹⁴C acetato.

La alimentación de todos los estadios ninfales e individuos adultos del *Triatoma infestans* con acetato marcado radiactivamente permitió reconocer la capacidad y el tipo de ácidos grasos sintetizables "de novo" por los insectos en condiciones bastante similares a las naturales.

Todos los estadios ninfales y los insectos adultos excepto la ninfa I sintetizaron en forma similar los ácidos grasos palmítico, palmitoleico, esteárico y oleico (Tabla VI).

Tabla VI

Porcentajes de distribución de la radiactividad entre los ácidos grasos de los insectos alimentados con 1-¹⁴C acetato. (1)

Estadios	Tiempo (2) hs.	Ácidos grasos			
		16:0 (3)	18:0	16:1	18:1
Ninfa I	24	33,8	66,2	---	---
Ninfa II	24	50,2	15,2	11,1	23,5
Ninfa II	48	41,2	18,3	10,9	29,6
Ninfa IV	24	45,0	20,3	13,0	21,7
Ninfa V	24	33,7	33,3	16,3	16,7
Adulto	24	39,5	16,3	20,1	24,1

(1) Los insectos utilizados fueron seleccionados entre los 15 y 20 días después de la muda y mantenidos en ayuno durante este intervalo. Realizaron una única ingesta "ad libitum" con el material marcado que duró entre 10 y 15 min.

(2) Tiempo transcurrido desde la alimentación con sustrato marcado hasta la muerte del insecto.

(3) Identifica a los ácidos grasos: El primer número indica el número de carbonos, el segundo, el número de dobles ligaduras.

El porcentaje de incorporación de la marcación en los lípidos osciló entre el 4 y el 30%.

En los períodos estudiados la radiactividad mayor fue hallada en el ácido palmítico. En este tipo de experimentos no se puede descartar totalmente la posible contribución de la flora microbiana intestinal del insecto en la síntesis "de novo" de ácidos grasos pese al agregado de penicilina y estreptomina.

b) Inyección de $1-^{14}\text{C}$ acetato de sodio.

En un segundo grupo de experimentos el acetato radiactivo fue inyectado parenteralmente evitándose de esta manera la posible contribución de la flora intestinal del insecto. Los resultados obtenidos se reseñan en la Tabla VII y confirman los obtenidos anteriormente en los experimentos de alimentación (Tabla VI). Pese a las variaciones previsibles con tal tipo de técnica, son muy concordantes. El tamaño de los 2 primeros estadios impidió la realización del experimento en ellos. En los demás estadios, se observó nuevamente la biosíntesis "de novo" de palmítico, palmitoleico, esteárico y oleico. La formación de ácidos monoetilénicos palmitoleico y oleico principalmente, fue particularmente elevada. Además en algunos casos se pudo observar no sólo la síntesis de los saturados palmítico y esteárico, sino también de mirístico. No se observó sin embargo, formación y depósito de ácidos de menor peso molecular.

c) Inyección de $1-^{14}\text{C}$ palmitato y $1-^{14}\text{C}$ estearato.

Cuando se inyectaron en los insectos adultos machos y hembras los ácidos grasos palmítico y esteárico se observó que el primero era convertido en esteárico y oleico, en tanto que el segundo era convertido en oleico (Tabla VIII). Esto demuestra la existencia de una enzima elongante de palmítico a esteárico y una desaturante de esteárico a oleico. En todos los estudios "in vivo" se extrajeron los lípidos totales sin disección previa.

Tabla VII

Distribución de la radiactividad (%) ^{14}C entre los ácidos grasos del insecto luego de la inyección de 3×10^5 dpm/ μl de ^{14}C acetato. (1)

Estadio	Vol. de inyec. (1)	Tiempo hs.	Acidos grasos				
			14:0	16:0	16:1	18:0	18:1
Ninfa II ⁺	0,7	12	-	44,0	13,8	7,5	34,7
Ninfa IV	1	6	-	34,0	13,7	11,7	40,6
Ninfa V	2	12	-	40,0	6,7	18,6	34,7
Ninfa V	2	24	-	43,1	8,7	9,7	38,5
Ninfa V	2	27	-	24,9	8,4	14,4	52,3
Macho adulto	2	10	3	48,3	11,4	8,5	28,9
Macho adulto	2	12	-	41,0	5,8	12,8	40,4
Macho adulto	2	24	2,5	32,6	5,7	12,4	46,8
Macho adulto	2	24	-	33,4	13,8	10,5	42,3
Hembra adulta	2	6	-	40,7	6,2	15,3	37,8
Hembra adulta	2	27	-	42,7	8,6	11,5	37,2

(1) Los insectos fueron seleccionados en condiciones iguales a las descritas en la Tabla VI e inyectados a los 15 o 20 días de la muda.

El porcentaje de incorporación de la radiactividad en los ácidos grasos osciló entre el 28 y el 73%.

7) Biosíntesis de ácidos grasos "in vitro".

Por centrifugación diferencial a $10.000 \times g$ se separó del homogeneizado total de tejidos extraintestinales una fracción sobrenadante no mitocondrial que tenía capacidad de sintetizar ácidos grasos a partir de ^{14}C acetyl-CoA. En las Tablas IX y X se observa que esa fracción fue capaz de sintetizar "de novo" no sólo ácidos grasos saturados de 10 a 18 carbonos, si no también monoetilénicos de 10, 12, 16 y 18 carbonos.

Tabla VIII

Distribución porcentual de la radiactividad entre los ácidos grasos del insecto a las 18 hs. de la inyección de 2,5 μ l de ácido palmítico (200.000 dpm/ l) o esteárico (375.000 dpm/ l)

Sexo	Acido inyectado	Acidos grasos		
		16:0	18:0	18:1
	16:0	88,6	8,7	2,7
	16:0	89,1	7,0	3,9
	16:0	85,9	10,0	4,1
	16:0	95,6	4,4	-
	16:0	92,6	7,4	-
	18:0	-	82,5	17,5
	18:0	-	90,7	9,3
	18:0	-	77,7	22,3

Los insectos fueron tomados en las mismas condiciones experimentales que en la Tabla VII.

Inesperadamente se detectó también usando esta fracción, una importante marcación en un pico cromatográfico de tiempo de retención elevado que tentativamente podría ser identificado como eicosenoico (20:1). Este pico a su vez estaba seguido de otro que podría identificarse tentativamente por su tiempo de retención como el ácido eicosadienoico (20:2). Luego de hidrogenar la muestra estos dos picos se unificaron en uno solo identificable como ácido eicosanoico (20:0) por su tr (Tabla X).

Cuando se separó del homogenado de tejidos abdominales extraintestinales una fracción sobrenadante de 105.000 x g y se incubó con 1-¹⁴C acetil CoA, se observó la biosíntesis "de novo" de ácidos grasos saturados (Tabla XI). Estos ácidos formados fueron los mismos sintetizados por el sobrenadante de 10.000 x g.

Tabla IX

Distribución de la marcación del 1-¹⁴C acetil CoA incorporado en los ácidos grasos por el sobrenadante de 12.000 x g⁽¹⁾.

Acidos grasos	tr/18:0 ⁽²⁾	%
10:0	0,17	3,2
10:1	0,21	1,8
12:0	0,25	5,5
12:1	0,29	1,4
14:0	0,37	13,2
16:0	0,60	21,5
16:1	0,73	3,6
18:0	1,00	9,6
18:1	1,13	6,6
x ₁ (20:1?)	1,94	24,3
x ₂ (20:2?)	2,33	9,3

(1) Proveniente de un homogenado de órganos extraintestinales del abdomen de 60 hembras adultas de *Triatoma infestans* mudadas entre 10 y 15 días antes del experimento y con una alimentación. El tiempo de incubación fue de 3 hs. en las condiciones descritas en la parte experimental.

(2) tr/18:0 representa el tiempo de retención relativo del pico separado en la columna de cromatografía gas-líquido respecto al ácido 18:0.

Tabla X

Distribución de la marcaión del $1-^{14}\text{C}$ acetyl CoA incorporado por el sobrenadante de 12.000 x g en los ácidos grasos de la Tabla IX luego de ser hidrogenados.

Acido graso	tr/18:0	Hidrogenada	Sin hidrogenar ⁽¹⁾
10:0	0,15	1,5	5,0
12:0	0,27	3,1	6,9
14:0	0,39	13,9	13,2
16:0	0,62	25,7	25,1
18:0	1,00	20,1	16,2
20:0 ?	1,69	35,7	33,6

(1) Sumatoria de los porcentajes de los ácidos de igual número de carbonos tomados de la Tabla IX.

Tabla XI

Distribución de la marcación de $1-^{14}\text{C}$ acetyl CoA entre los ácidos grasos luego de incubado con el sobrenadante de $105.000 \times g^{(1)}$.

Acido graso	tr/18:0	%
x	0,06	1,8
10:0	0,15	1,4
12:0	0,23	5,1
14:0	0,36	15,3
16:0	0,58	57,5
18:0	1,00	9,5
x_1 (20:1?)	1,98	9,4
x_2 (20:2?)	2,33	rastros

(1) Se utilizó un homogenado de órganos abdominales extra-intestinales, obtenido e incubado durante 1 h. en las condiciones descriptas en la parte experimental.

8) Estudio de las fracciones subcelulares.

El fracaso en los ensayos de actividad desaturante en la "fracción microsomal" aislada motivó el cuidadoso estudio de las fracciones subcelulares de homogenados de órganos extraintestinales del abdomen del *Triatoma infestans*. Se emplearon para ello las enzimas marcadoras: a) Glucosa-6-fosfatasa b) NADPH-citocromo c reductasa, y c) Succinato-citocromo c reductasa.

a) Glucosa-6-fosfatasa.

Esta enzima mostró en todas las fracciones subcelulares ensayadas muy baja actividad específica (a.e.) comparada a la que presenta en la fracción microsomal de hígado de rata (a.e. del orden de los 100 nmol/mg/min en las mismas condiciones experimentales). A pesar de las bajas a.e. medidas es posible observar que en "mitocondrias" se obtuvieron las más altas (véase Tablas XII y XIII).

Tabla XII

Actividad de glucosa-6-fosfatasa en fracciones subcelulares de órganos extraintestinales de *Triatoma infestans* (hembra).

Fracción subcelular		Proteínas (mg)	Actividad específica (nmol de P/mg/min)
"homogenado"	S ^{10 min} 700 g	54,9	4,1
"mitocondrias"	P ^{30 min} 12000 g	3,0	6,7
"microsomas"	P ^{60 min} 105000 g	8,0	3,3
"citosol"	S ^{60 min} 105000 g	24,0	1,5

S indica sobrenadante. P indica precipitado. El superíndice indica el tiempo de centrifugación en minutos. El subíndice indica la fuerza gravitacional en gravedades. El ordenamiento de arriba-abajo en la segunda columna precisa el modo en que se obtuvieron las distintas fracciones.

La temperatura de incubación fue de 30°C.

Tabla XIII

Actividad de glucosa-6-fosfatasa en fracciones subcelulares de órganos extraintestinales de *Triatoma infestans* (hembra).

Fracción subcelular	Proteínas (mg)	Actividad específica (nmol de P/mg/min)
"mitocondrias"	12,1	7
"microsomas"	9,4	3,4
"citosol"	23,5	0

Las fracciones subcelulares fueron obtenidas del mismo modo que se indicó en la Tabla XII e incubadas a 30°C.

b) NADPH-citocromo c reductasa.

Esta enzima junto a la que sigue, a diferencia de la anterior, resultaron más definitivas de la localización de "microsomas" y "mitocondrias" respectivamente. Como puede observarse en la Tabla XIV la actividad específica fue mayor en "microsomas" que en las restantes fracciones.

c) Succinato-citocromo c reductasa.

La actividad específica resultó claramente superior en la fracción mitocondrial como se aprecia en la Tabla XV.

Tabla XIV

Actividad de NADPH-citocromo c reductasa en fracciones subcelulares de órganos extraintestinales de *Triatoma infestans* (hembra). Temperatura de incubación = 37°C.

Fracción Subcelular		Proteínas (mg)	Actividad específica (nmol de cit. c reducido/mg/min)
"homogenado"	S ^{10 min} 700 g	68,8	43,4
"mitocondrias"	P ^{20 min} 10000 g	5,8	68,7
"microsomas" (1)	P ^{60 min} 105000 g	3,8	131,8
"citosol"	S ^{60 min} 105000 g	8,5	87,7

(1) Promedio de 3 determinaciones.

Explicación de la segunda columna en la Tabla XII.

Tabla XV

Actividad de succinato-citocromo c reductasa en fracciones subcelulares de órganos extraintestinales de *Triatoma infestans* (hembra). Temperatura de incubación = 20°C.

Fracción subcelular	Proteínas (mg)	Actividad específica (nmol de cit. c reducido/mg/min)
"homogenado"	68,8	20,7
"mitocondrias" (1)	5,8	112
"microsomas"	3,8	26,6
"citosol"	8,5	0

(1) Promedio de 3 determinaciones.

Las fracciones subcelulares ensayadas fueron las mismas que en el ensayo de NADPH-citocromo c reductasa (Tabla XIV).

DISCUSSION

El contenido de lípidos del *Triatoma infestans* es variable a lo largo del ciclo evolutivo. Los lípidos cumplen una importante función de reserva energética en el huevo y en la ninfa I, demostrada por la notable resistencia al ayuno de este primer estadio. Las voluminosas ingestas del insecto que son lentamente absorbidas hacen del estómago del mismo un importante órgano de reserva en aquellos estadios en que la alimentación se realiza.

Los ácidos grasos fundamentales son en líneas generales los mismos hallados en otros insectos. Sin embargo, muestra algunas notables diferencias con los de especies relacionadas: *Triatoma phyllosoma* y *Rhodnius prolixus*, dónde no aparecen cantidades apreciables de ácido linoleico (véase Introducción pág.14). Las diferencias en composición de ácidos grasos entre machos y hembras no resultaron significativas.

Se observa que la proporción de los diversos ácidos grasos se modifica durante la evolución del huevo a adulto. La disminución de los ácidos palmítico, palmitoleico y oleico en la transición de huevo a ninfa II (fig. 14) que son por lo general componentes de los lípidos de reserva, puede correlacionarse bien con el consumo de la reserva lipídica del huevo que se manifiesta claramente en la caída del contenido lipídico en el mismo pasaje (Tabla I). El aumento simultáneo de linoleico y esteárico que son importantes componentes por lo general de los lípidos de membrana y por consiguiente sin función energética secundaria, podría ser consecuencia de un incremento de la proporción relativa de esos lípidos al disminuir el material de reserva. A pesar de que el contenido de araquidónico es sumamente bajo sus variaciones en el ciclo evolutivo son correlativas en el linoleico. Esto hace sospechar que su ubicación en las moléculas lipídicas es similar a la del linoleico y que podría también variar como consecuencia de los procesos de utilización de las reservas lipídicas y membranogénesis. Es de destacar que el insecto en el estadio de ninfa II parece haber adquirido ya el modelo de distribución de ácidos grasos (fig. 14) y el contenido lipídico (Tabla I)

///

que lo caracterizará hasta su edad adulta, puesto que de allí en más no se observan cambios significativos. En adultos si bien se observa un aumento en el contenido lipídico no va acompañado por un cambio importante en la composición comparado con ninfa V. Hay algunas diferencias con el sexo. Pero las diferencias no resultan significativas en estas condiciones experimentales, especialmente si se las compara con los resultados que se muestran en las Tablas II y III y las figs. 14 y 15. No se detectaron apreciables diferencias estacionales en la composición dentro de los estadios analizados (Tabla III) aunque son notorias las diferencias interestadios para cada época. Así el palmítico es significativamente superior en huevos que en adultos y el linoleico viceversa. Se observa también una marcada constancia en la composición de ácidos grasos del huevo en las distintas épocas, que resulta notable si se la compara con las hembras adultas donde se forman. Esto tal vez sea debido a mecanismos regulatorios que en éstas determinan de modo estrecho las proporciones que de los distintos ácidos grasos deben hallarse en el huevo en formación. Al respecto conviene hacer resaltar la baja dispersión del contenido lipídico % respecto a la de los pesos promedio del huevo en la Tabla I. Esta constancia porcentual también abonaría la misma hipótesis en lo que respecta al contenido % de lípidos que el huevo debe tener.

Por otra parte la "vinchuca" adulta indudablemente incorpora los ácidos grasos de la sangre como lo demuestran las similitudes de composición, pero modifica la proporción relativa de algunos ácidos grasos mayoritarios (oleico y esteárico principalmente). No obstante conviene tener en cuenta que el alimento por ser un producto biológico también es susceptible de sufrir modificaciones con la alimentación y demás variables individuales que afecten a las palomas, pudiendo ocurrir alimentaciones anteriores a la experimental hubieran sido efectuadas con sangre de composición distinta.

En cuanto a las clases de lípidos constituyentes de los estadios analizados resulta evidente la importancia del tri-

///

acilglicerol, el componente más abundante, cuya función en los organismos es la de constituir la reserva energética. Este papel parece ser muy importante en los insectos y según Gilbert y Chino (120) son muchas las especies que dependen casi exclusivamente de los lípidos para sus requerimientos energéticos.

Se reconoció también la presencia de colesterol y ésteres de colesterol. Sin embargo, los insectos carecen de capacidad para sintetizar esteroides (121). Si el *Triatoma infestans* no discrepa con esta regla entonces el colesterol hallado proviene de la sangre ingerida. Entre los ésteres de colesterol es probable que se hallen incluidos los hidrocarburos que con el sistema de solventes empleado para separar lípidos neutros corren en la misma posición. En los insectos, los hidrocarburos disminuyen la permeabilidad al agua de la exocutícula.

Los diacilglicéridos están presentes en bajas proporciones tanto en adultos como en huevos. En algunos insectos se ha reconocido que los diacilglicéridos son los principales transportadores de ácidos grasos en la hemolinfa (120). En el *Triatoma infestans* aún no se tiene información al respecto pero conviene destacar que los tenores hallados no son demasiado diferentes entre huevos e insectos adultos.

La proporción de triacilglicéridos es algo superior en huevos que en adultos, pero el contenido absoluto de los mismos por unidad de peso resulta muy superior en el huevo como se deduce de su mayor contenido lipídico. Esto concuerda bien con la hipótesis de que los triacilglicéridos desempeñan un importante papel como única reserva energética en el huevo, en tanto que el adulto dispone de la reserva adicional alternativa que le provee la alta capacidad del intestino para almacenar sangre. La proporción de fosfolípidos es inferior en huevos que en adultos.

Los ácidos grasos constituyentes de triacilglicéridos nos muestran a estos como la clase lipídica más simple de las analizadas (Tabla V). El predominio de los ácidos palmítico y oleico junto a la apreciable proporción de palmitoleico es típico de esta clase de lípidos. Llama la atención el tenor

///

elevado de linoleico.

Los fosfolípidos en especial la fosfatidiletanolamina, una mayor variedad estructural como lo demuestra la amplia gama de ácidos encontrados en proporciones significativas. En la fosfatidiletanolamina se encuentra un modelo de distribución de ácidos grasos claramente distinto del que presentan los triacilglicéridos. Los ácidos linoleico y araquidónico provienen sin dudas de la dieta (fig.15) y aunque no se descarta la posibilidad de una transformación de linoleico en araquidónico tal como ocurre en animales, esto parece improbable a la luz de estudios realizados en otros insectos (65, 66).

Los estudios realizados en otros insectos han llevado a la conclusión de que estos organismos poseen una ácido graso sintetasa activa (59,60,61,62,67,68,75,76). El *Triatoma infestans* no es la excepción y tanto en los experimentos en que se los alimentó con $1-^{14}\text{C}$ acetato (Tabla VI), como en aquellos en que se los inyectó con el mismo precursor (Tabla VII), probó tener una ácido graso sintetasa activa en todos los estadios de su ciclo evolutivo desde ninfa I. Tal como ocurre en otros organismos la marcación se realizó preferencialmente en ácido palmítico. Sin embargo se encontró también marcación importante en los ácidos palmitoleico, esteárico y oleico. Esto permitió suponer que también se hallaban presentes actividades elevadas de desaturasas y elongasas de ácidos grasos. En el estadio ninfal I no se encontraron ácidos monoetilénicos por lo que la $\Delta 9$ -desaturasa estaría aún ausente, inactiva o débilmente activa. Puesto que se encontró palmítico y esteárico la síntesis "de novo" de ácidos grasos saturados es ya activa en este estadio. Resulta interesante observar que sólo hay pequeñas diferencias en cuanto a la distribución de la marcación con los dos métodos distintos empleados, por lo cual la contribución a la síntesis "de novo" de ácidos grasos por la flora intestinal del insecto no parece tener significación.

En los experimentos en los que se inyectaron palmítico y esteárico marcados se demostró cabalmente que el insecto po-

see una enzima capaz de convertir palmítico a esteárico y otra que desatura esteárico a oleico (Tabla VIII). Sin embargo no se pudo detectar desaturación de palmítico a palmitoleico. Estos resultados comparados con los de las Tablas VI y VII podrían ser explicados por una compartamentación que permitiera al ácido palmítico sintetizado "de novo" ponerse en contacto directo con la enzima desaturante, lo que no ocurriría con el palmítico inyectado directamente. A diferencia de éste, el ácido esteárico inyectado es desaturado normalmente a oleico. Puesto que generalmente se admite que en los animales la misma $\Delta 9$ -desaturasa convierte el palmítico en palmitoleico y el esteárico en oleico (122, 123), los resultados obtenidos (Tabla VIII) insinúan ciertas dudas sobre si esta aseveración se cumple en el *T. infestans* y podrían indicar la existencia de mecanismos diferentes de desaturación y luego elongación de precursores de bajo peso molecular, en lugar de una desaturación directa de palmítico y a la vez acción de una desaturasa muy específica de esteárico. O por lo menos una compartamentación diferente.

En los experimentos realizados "in vitro" con sobrenadante de 10.000 x g de un homogenado de órganos extraintestinales, se observó la biosíntesis "de novo" a partir de ^{14}C acetil CoA de ácidos grasos tanto saturados como monoetilélicos (Tablas IX y X). Si bien una importante marcación se acumuló en los ácidos mirístico y palmítico, se formaron también palmitoleico y oleico confirmando los resultados "in vivo" (Tablas VI y VII). Llama la atención la gran variedad de ácidos formados cuando se utilizó este sistema enzimático aislado en comparación con la simplicidad resultante de la actividad del animal entero a partir de acetato marcado. Esto demostraría que el insecto posee capacidad para orientar o seleccionar los productos potencialmente sintetizables por las enzimas.

Por otro lado resulta curioso dentro del amplio espectro de ácidos grasos producidos por esta fracción, la importante

marcación encontrada en eicosenoico (20:1) cuyo origen puede ser alternativamente o por desaturación de eicosanoico (20:0) o por elongación de oleico (18:1). El hecho de no haber encontrado eicosanoico sugiere esta última posibilidad. La proporción hallada de este ácido es notablemente alta en relación a los niveles que del mismo se observaron en los estudios de composición (Tabla II). El eicosadienoico (20:2) también podría haberse formado por elongación del linoleico (18:2).

Cuando se incubó el sobrenadante de 105.000 x g del homogenado de órganos extraintestinales, se observó biosíntesis "de novo" de ácidos grasos saturados solamente (Tabla XI). Las proporciones mayores correspondieron a los ácidos mirístico y palmítico principalmente en muy buena concordancia con los productos de las ácido graso sintetasas animales. Puesto que no se encontraron los ácidos grasos monoetilénicos hallados cuando se incubó el sobrenadante de 10.000 x g, esto induce a pensar que dicha capacidad está ubicada en el precipitado de 105.000 x g ("fracción microsomal"). De ser esto así, también coincidiría con lo que ocurre en las fracciones subcelulares de hígado de rata, donde los microsomas contienen los sistemas desaturantes. Los ensayos tendientes a corroborar esta localización han resultado infructuosos, tal vez debido a problemas técnicos o de labilidad de este sistema enzimático. Nuevamente el sobrenadante de 105.000 x g se mostró capaz de producir los picos cromatográficos que tentativamente se identificaran como 20:1 y 20:2 en la Tabla IX, aunque en mucha menor proporción. Esto da fuerza a la sugerencia hecha anteriormente de que es muy poco probable que su biosíntesis se produzca por reacciones de desaturación y lo sea más bien por elongación, dado que en el sobrenadante de 105.000 x g no hay normalmente enzimas desaturantes. Sin embargo sabemos también que generalmente en los animales hay sistemas elongantes en microsomas y mitocondrias. La resolución final del problema podría haberse realizado estudiando la posición de las dobles ligaduras, pero lamentablemente la falta de material impidió esta determinación.

Cuando se estudió el fraccionamiento subcelular se emplearon enzimas de reconocida ubicación dentro de las células de hígado de rata. Los ensayos de Glucosa-6-fosfatasa sorprendieron con sus extremadamente bajas actividades (Tablas XII y XIII). No obstante, la homogénea distribución de actividades específicas interensayos está indicando que la "fracción mitocondrial" es más rica en esta enzima. El hecho de que estas fracciones no hayan sido purificadas por lavados y recentrifugaciones impide discriminar el auténtico origen de esta actividad (mitocondrial o microsomal), pero lo que sí resulta claro es que la actividad de Glucosa-6-fosfatasa en los órganos estudiados es prácticamente despreciable no siendo por lo tanto muy útil en el análisis de las fracciones. Por otra parte algunos autores han concluido que la membrana externa mitocondrial posee esta actividad (124). De ser así en los tejidos estudiados, la mayor riqueza en esta actividad de la "fracción mitocondrial" podría ser explicada por ausencia de la misma en la "fracción microsomal" en las condiciones experimentales utilizadas.

El ensayo de NADPH-citocromo c reductasa resultó más conveniente y la localización de la misma era microsomal (Tabla XIV). Esto está de acuerdo con el uso de la misma como enzima marcadora. La mayor actividad específica fue encontrada en la "fracción microsomal". La actividad específica de la "fracción mitocondrial" fue también significativa indicando que en las centrifugaciones a 10.000 x g una parte importante de los "microsomas" podrían haber quedado atrapados en el precipitado. La actividad específica hallada en el "citosol" hace sospechar la existencia de "microsomas livianos". Esto último es coincidente con la observación de actividad elongante remanente encontrada cuando se estudió la biosíntesis de ácidos grasos "de novo" en el sobrenadante de 105.000 x g.

En cuanto a la actividad de Succinato-citocromo c reductasa se comprobó que su localización preferencial era en la "fracción mitocondrial" (Tabla XV), lo que estaba de acuerdo con su localización en otros sistemas y que ha hecho de la mis

ma es un buen marcador de mitocondrias. También se observó que había algo de esta actividad en la "fracción microsomal" y su ausencia en el "soluble".

Del análisis de este conjunto de resultados surge que con el fraccionamiento simple utilizado no es posible obtener fracciones subcelulares de alta pureza; que la Glucosa-6-fosfatasa no es un marcador adecuado para optimizar las condiciones de fraccionamiento de este sistema; que las actividades estudiadas están de acuerdo con una distribución en las fracciones subcelulares análoga a la de hígado de rata (excepto la poco activa Glucosa-6-fosfatasa); que la "fracción microsomal" es razonablemente activa al menos en cuanto a NADPH-citocromo c reductasa en los tiempos comunes empleados para la obtención de la preparación. A la luz de este último dato, el fracaso en la demostración de actividad de desaturasas en la "fracción microsomal" no se podría atribuir a daños del sistema de transporte electrónico o al menos sería bastante improbable. Es importante señalar que en insectos son muy importantes los mecanismos microsomales de oxidación de tóxicos e insecticidas. Por último, la variación en la cantidad de proteínas en cada fracción como la de las recuperaciones se atribuye a las pequeñas cantidades de material con que se ha debido trabajar.

CONCLUSIONES

- 1) El contenido de lípidos del *Triatoma infestans* se modifica a lo largo de su ciclo evolutivo. La función de reserva energética de los mismos es máxima en el estadio de huevo durante el cuál el insecto no se alimenta de una fuente externa.
- 2) Los ácidos grasos más importantes a lo largo de su ciclo evolutivo son palmítico, esteárico, oleico y linoleico.
- 3) La distribución porcentual de los mismos varía durante su ciclo evolutivo. En los estadios de huevo y ninfa I la relación palmítico+oleico/esteárico+linoleico es muy grande y decae notoriamente en el segundo estadio ninfal manteniéndose luego casi constante. La causa puede estar relacionada con el alto contenido de lípidos de reserva en aquellos primeros estadios.
- 4) En las condiciones del insectario no hay variaciones significativas con el cambio estacional de las composiciones de ácidos grasos en los estadios estudiados.
- 5) La composición de ácidos grasos en insectos adultos de ambos sexos refleja con algunas modificaciones la composición de su dieta.
- 6) La clase lipídica más abundante tanto en huevo como en adultos es triacilglicéridos. Los fosfolípidos más importantes son fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina en una relación entre ambos que se aproxima a la unidad.
- 7) Los ácidos grasos predominantes en triacilglicéridos son palmítico y oleico.
- 8) En la fosfatidiletanolamina palmítico, palmitoleico y oleico están disminuídos y esteárico y linoleico aumentados respecto a su distribución en triacilglicéridos.
- 9) El *Triatoma infestans* tiene desde el estadio ninfal I de su ciclo evolutivo hasta adulto la capacidad de sintetizar "de novo" a partir de acetato ácidos grasos saturados y desde el estadio ninfal II hasta adulto, también monoetilénicos.
- 10) En los insectos adultos quedó demostrada la capacidad de elongar palmítico a esteárico y de desaturar éste a oleico.

- 11) El sobrenadante de 10.000 x g de un homogenado de órganos extraintestinales del abdomen de hembras adultas jóvenes mostró poseer capacidad para sintetizar "de novo" a partir de acetil CoA, ácidos grasos saturados de 10 a 18 carbonos, monoetilénicos: 10:1, 12:1, 16:1 y 18:1 y presuntamente de 20:1 y 20:2.
- 12) En el sobrenadante de 105.000 x g del mismo preparado que de demostrada la presencia de una ácido graso sintetasa cuyo producto principal era el ácido palmítico. La aparición entre los productos de incubación de cantidades medibles de los ácidos tentativamente identificados como 20:1 y 20:2 y la ausencia de 20:0, como de los demás monoetilénicos permiten descartar que su formación sea a través de la desaturación del 20:0 y sugieren como probable su origen por elongación de oleico y linoleico respectivamente.
- 13) De las conclusiones anteriores se deduce como muy probable la existencia de por lo menos una desaturasa activa capaz de convertir ácidos grasos saturados en los correspondientes monoetilénicos en el precipitado de 105.000 x g ("fracción microsomal").
- 14) "In vivo", la incapacidad de formación de palmitoleico a partir de palmítico junto a la producción de oleico a partir de esteárico cuando estos ácidos fueron inyectados sugieren que la formación de palmitoleico (observada cuando se estudió la biosíntesis "de novo" a partir de acetato) no sería realizada por la misma enzima que origina al oleico o por lo menos que la compartamentación de los dos ácidos saturados es distinta.
- 15) La Glucosa-6-fosfatasa tiene en el "pool" de órganos extraintestinales del abdomen, muy baja actividad siendo por tanto inadecuada como enzima marcadora de "microsomas".
- 16) Las actividades de NADPH- y Succinato-citocromo c reductasas sí resultaron buenas indicadoras de las fracciones "microsomal" y "mitocondrial" respectivamente en la misma preparación.

J. D. C.

B I B L I O G R A F I A

- 1) Rees, H.H. en "Insect biochemistry". Chapman y Hall. Londres pág. 7 (1.977)
- 2) Rees, H.H. op. cit. pág. 34.
- 3) Regnier, F.E., Low, J.H. J. Lipid Res. 9, 541, (1968)
- 4) Rees, H.H. op. cit. pág. 57.
- 5) Butenandt, A. Endocrinology 27, 9, (1963)
- 6) House, H.L. en "The Physiology of Insecta" 2º edición. Ed. M. Rockstein. Academic Press. Nueva York. Vol. V págs. 63-117 (1974). (Citado por 1)
- 7) Wigglesworth, V.B. Biochem. J. 21, 791, (1929)
- 8) Wigglesworth, V.B. Biochem. J. 22, 150, (1930)
- 9) Wigglesworth, V.B. Parasitology 21, 288, (1929)
- 10) Rees, H.H. op. cit. pág. 9.
- 11) Sacktor, B. en "Insect Biochemistry and Function". Ed. Candy, D.J. y Kilby, B.A. Chapman y Hall. Londres. pág. 3 (1975)
- 12) Rees, H.H. op. cit. pág. 12.
- 13) Friedman, S. en "Chemical Zoology". Ed. Florkin, M. y Scheer, B.T. Academic Press. Nueva York. Vol. V págs. 167-197 (1970) (Citado por 1)
- 14) Crabtree, B., Newsholme, E.A. en "Insect muscle". Ed. Usherwood, P.N.R. Academic Press. Londres. págs. 405-500. (Citado por 1)
- 15) Rees, H.H. op. cit. pág. 15.
- 16) Sacktor, B. Adv. Insect Physiology 7, 267, (1970) (Citado por 1)
- 17) Sacktor, B. en "The Physiology of Insecta" 2º edición. Ed. M. Rockstein. Academic Press. Nueva York. Vol. IV págs. 271-353, (1974).
- 18) Rees, H.H. op. cit. pág. 17.
- 19) Bursell, E. Comp. Biochem. Physiol. 23, 825, (1967)
- 20) Rees, H.H. op. cit. pág. 24.
- 21) Hansford, R.G. y Sacktor, B. en "Chemical Zoology". Ed. Florkin, M. y Scheer, R.T. Academic Press. Nueva York. Vol. VI págs. 233-247, (1971) (Citado por 1)
- 22) Chippendale, G.M. Insect Biochem. 3, 1, (1973)
- 23) Fast, P.G. en "Progress in the Chemistry of Fats and other lipids". Ed. Holman, R.T. Pergamon Press. Oxford. Vol. XI pág. 181-242.

- 24) Scoggin, J.K. y Tauber, O.E. Iowa State Coll. J. Sci. 25, 99, (1950) (Citado por 23)
- 25) Gilbert, L.I. y Schneiderman, H.A. Gen. Comp. Endocrin. 1, 453, (1961)
- 26) Gilbert, L.I. Adv. Insect Physiol. 4, 69, (1967)
- 27) Fast, P.G. op. cit. pág. 191
- 28) Bailey, E. en "Insect Biochemistry and Function" Ed. Candy, D.J. y Kilby, B.A. Chapman y Hall. Londres. pág. 97, (1975)
- 29) Treherne, J.E. J. Exp. Biol. 35, 862, (1958)
- 30) Weintraub, H. y Tietz, A. Biochim. biophys. Acta 306, 31, (1973)
- 31) Downer, R.G.H. y Steele, J.E. Gen. Comp. Endocrin. 19, 259, (1972)
- 32) Downer, R.G.H. y Steele, J.E. J. Insect Physiol. 19, 523, (1973)
- 33) Tietz, A. J. Lipid Res. 3, 421, (1962)
- 34) Peled, Y. y Tietz, A. Biochim. biophys. Acta 296, 499, (1973)
- 35) Chino, H. y Gilbert, L.I. Science 143, 359, (1964)
- 36) Chino, H. y Gilbert, L.I. Biochim. biophys. Acta 98, 94, (1965)
- 37) Martin, J.S. J. Insect Physiol. 15, 2319, (1969)
- 38) Gilbert, L.I., Chino, H. y Domroese, K.A. J. Insect Physiol. 11, 1057, (1965)
- 39) Wlodawer, P. y Baranska, J. Acta biochem. pol. 12, 39, (1965) (Citado por 28)
- 40) Chang, F. y Friedman, S. Insect Biochem. 1, 63, (1971)
- 41) Dutkowski, A.B. y Ziajka, B. J. Insect Physiol. 18, 1351, (1972)
- 42) Dutkowski, A.B. y Zarzala-Drabikowska, M.G. J. Insect Physiol. 19, 1341, (1973)
- 43) D'Costa, M.A. y Birt, L.M. J. Insect Physiol. 12, 1377, (1966)
- 44) Crompton, M. y Birt, L.M. J. Insect Physiol. 13, 1575, (1967)
- 45) Walker, P.R., Hill, L. y Bailey, E. J. Insect Physiol. 16, 1001, (1970)
- 46) Walker, P.R. y Bailey, E. J. Insect Physiol. 17, 813, (1971)
- 47) Zebe, E. Z. vergl. Physiol. 36, 290, (1959) (Citado por 28)
- 48) Young, R.C. Ann. Entomol. Soc. Am. 52, 567, (1959) (Citado por 28)
- 49) Walker, P.R. y Bailey, E. J. Insect Physiol. 16, 499, (1970)
- 50) Bailey, E., Horne, J.A., Izatt, M.E.G. y Hill, L. Life Sci. 10, 1415, (1971)

- 51) Bailey, E., Horne, J.A., Izatt, M.E.G. y Hill, L. *Biochem. J.* 128, 79 P, (1972)
- 52) Hill, L., Izatt, M.E.G., Horne, J.A. y Bailey, E. *J. Insect Physiol.* 18, 1265, (1972)
- 53) Levenbook, L. *Arch. Biochem. Biophys.* 92, 114, (1961)
- 54) Keeley, L.L. *J. Insect Physiol.* 17, 1501, (1971)
- 55) Wigglesworth, V.B. *J. Exp. Biol.* 19, 56, (1942)
- 56) Taylor, M.W. y Medici, J.C. *J. Nutr.* 88, 176, (1966)
- 57) Dadd, R.H. *Ann. Rev. Ent.* 18, 381, (1973)
- 58) Fast, P.G. *Lipids* 1, 209, (1966)
- 59) Robbins, W.E., Kaplanis, J.E., Louloudes, S.J. y Monroe, R.E. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 53, 128, (1960) (Citado por 28)
- 60) Louloudes, S.J., Kaplanis, J.N., Robbins, W.E. y Monroe, R.E. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 54, 99, (1961) (Citado por 28)
- 61) Sedee, P.D.S.W. *Arch. int. Physiol. Chem.* 69, 295, (1961) (Citado por 28)
- 62) Sridhara, S y Bhat, J.V. *Biochem. J.* 91, 120, (1964)
- 63) Chino, H. y Gilbert, L.I. *J. Insect Physiol.* 11, 287, (1965)
- 64) Horie, Y., Nakasone, S., Ito, T. *J. Insect Physiol.* 14, 971, (1968)
- 65) Stephen, W.F. y Gilbert, L.I. *J. Insect Physiol.* 15, 1833, (1969)
- 66) Sridhara, S., Rao, U.R. y Bhat, J.V. *Biochem. J.* 98, 260, (1966)
- 67) Municio, A.M., Odriozola, J.M. y Pineiro, A. *Comp. Biochem. Physiol.* 37, 387, (1970)
- 68) Municio, A.M., Odriozola, J.M., Pineiro, A. y Ribera, A. *Biochim. biophys. Acta* 248, 212, (1971)
- 69) Municio, A.M., Odriozola, J.M., Pineiro, A., Ribera, A. *Biochim. biophys. Acta* 280, 248, (1972)
- 70) Van Handel, E. y Lum, P.T.M. *Science* 134, 1979, (1961)
- 71) Van Handel, E. y Lea, A.O. *Science* 149, 298, (1965)
- 72) Van Handel, E. y Lea, A.O. *Gen. Comp. Endocrinol.* 14, 381, (1970)
- 73) Lea, A.O. y Van Handel, E. *J. Insect Physiol.* 16, 319, (1970)
- 74) Stephen, W.F. y Gilbert, L.I. *J. Insect Physiol.* 16, 851, (1970)
- 75) Zebe, E. y Mc. Shan, W.H. *Biochim. biophys. Acta* 31, 513, (1959)
- 76) Tietz, A. *J. Lipid Res.* 2, 182, (1961)
- 77) Goldin, H.H. y Keith, A.D. *J. Insect Physiol.* 14, 887, (1968)
- 78) Tietz, A. y Stern, N. *Febs Letters* 2, 286, (1969)
- 79) Clements, A.N. *J. Expt. Biol.* 36, 665, (1959)

- 80) Walker, P.R. y Bailey, E. *Biochem. J.* 115, 50 P, (1969)
- 81) Walker, P.R. y Bailey, E. *Biochim. biophys. Acta* 187, 591, (1969)
- 82) Walker, P.R. y Bailey, E. *Comp. Biochem. Physiol.* 36, 623, (1970)
- 83) Walker, P.R. y Bailey, E. *J. Insect Physiol.* 17, 1359, (1971)
- 84) Daikuhara, Y., Tsumeni, T., Takeda, V. *Biochim. biophys. Acta* 158, 51, (1968)
- 85) Kornacker, M.S., Ball, E.G. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 54, 899, (1965)
- 86) Ballard, F.J., Hanson, R.W. *J. Lipid Res.* 8, 73, (1967)
- 87) Gul, B. y Dils, R. *Biochem. J.* 111, 263, (1969)
- 88) Walker, P.R. y Bailey, E. 16, 679, (1970)
- 89) Horie, Y. *J. Insect Physiol.* 14, 417, (1968)
- 90) Tietz, A. *J. Insect Physiol.* 2, 236, (1967)
- 91) Tietz, A. *Israel J. Chem.* 5, 135, (1967)
- 92) Orr, C.W.M. *J. Insect Physiol.* 10, 103, (1964)
- 93) Odhiambo, T.R. *J. Expt. Biol.* 45, 45, (1966)
- 94) Walker, P.R. y Bailey, E. *J. Insect Physiol.* 17, 1125, (1971)
- 95) Gilbert, L.I. *Comp. Biochem. Physiol.* 21, 237, (1967)
- 96) Wigodzinsky, P. y Avalos, J.W. en "Las Triatominae Argentinas" Instituto de Med. Reg. Tucumán. Publ. N° 601. Monog. N° 2 (1951)
- 97) Zeledón, R. en "Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas" Soc. Argentina de Parasit. Bs.As. pág. 327, (1972)
- 98) Storer, T.I. y Usinger, R.L. en "Zoología General" Ediciones Omega. Barcelona. pág. 621, (1961)
- 99) Perlowagora-Szumlewicz, A. *Rev. Bras. Malar. e Doenc. Trop.* 5, 1, (1953)
- 100) Hack, W.H. *An. Inst. Med. Reg. Tucumán.* 4, 125, (1955)
- 101) Cerisola, J.A., Rohwedder, R., Segura, E.L., Del Prado, C.E., Alvarez, M., de Martini, G.J.W. en "El Xenodiagnóstico" INIC Bs. As. pág. 32, (1974)
- 102) Nicolle, P. y Mathis, M. *C.R. Soc. Biol.* 135, 25, (1941)
- 103) Spector, A.A., Steinberg, D.S. y Tanaka, A. *J. Biol. Chem.* 240, 1032, (1965)
- 104) Folch, J., Lees, M. y Sloane Stanley, G.H. *J. Biol. Chem.* 226, 497, (1957)

- 105) Comunicación personal.
- 106) Ackman, R.G. en "Methods in Enzymology" Ed. Lowenstein, J.M. Academic Press. Nueva York. Vol. XIV, pág. 329, (1969)
- 107) Ackman, R.G. Nature 194, 970, (1962)
- 108) Ackman, R.G. J. Am. Oil Chemists' Soc. 40, 558, (1963)
- 109) Farquhar, J.W., Insull, W. (Jr), Rosen, P., Stoffel, W. y Ahrens. E.H. (Jr) Nutrition Rev. 17, Suppl. 1-30, (1959)
- 110) Skipsky, V.P. y Barclay, M. en "Methods in Enzymology" Vol. XIV, pág. 546, (1969)
- 111) Rouser, G., Fleischer, S. y Yamamoto, A. Lipids 5, 494, (1970)
- 112) Rouser, G., Kritchevsky, G. y Yamamoto, A. en "Lipid Chromatographic Analysis" Ed. Marinetti, G.V. Edward Arnold Ltd. Londres. Vol. I, pág. 99, (1967)
- 113) Wren, J.J. J. Chromatog. 4, 173, (1960)
- 114) Nutter, L.J. y Privett, O.S. J. Chromatog. 35, 519, (1968)
- 115) Baginski, E.S., Faà, P.P. y Zak, B. en "Methods of Enzymatic Analysis". Ed. Biergmeier, H.U. Verlag Chemie, Academic Press Vol. 2, pág. 876, (1974)
- 116) Sottocasa, G.L., Kuylenstierna, B., Ernster, L. y Bergstrand, A. J. Cell Biol. 32, 415, (1967)
- 117) Lowry, O., Rosebrough, N., Harr, A.S. y Randall, R.J. J. Biol. Chem. 193, 265, (1951)
- 118) Nicolle, P. y Lwof, M. Bull. Soc. Path. exot. 36, 154, (1943)
- 119) Lwof, M. y Nicolle, P. Bull. Soc. Path. exot. 37, 38, (1944)
- 120) Gilbert, L.I. y Chino, H. J. Lipid Res. 15, 439, (1974)
- 121) Thompson, M.J., Kaplanis, J.N., Robbins, N.E., Svodova, J.A. Adv. Lipid Res. 11, 219, (1973)
- 122) Brett, D., Howling, D., Morris, L.J., James, A.T. Archs. Biochem. Biophys. 143, 535, (1971)
- 123) Enoch, H.C., Catalá, A. y Strittmatter, P. J. Biol. Chem. 251, 5095, (1976)
- 124) Donaldson, W.E., Arion, W.J., Depierre, J.W., Dallner, G. y Ernster, L. Eur. J. Biochem. 82, 627, (1978)