



Universidad Nacional del Comahue  
Centro Regional Universitario Bariloche

EFFECTOS SUBLETALES DE LOS INSECTICIDAS  
CLORPIRIFÓS Y ACETAMIPRID EN SISTEMAS  
ENZIMÁTICOS DE CYDIA POMONELLA (L.)  
(LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) DEL VALLE DE  
RÍO NEGRO Y NEUQUÉN

Tesis para optar al Título de  
Doctor en Biología

**Autora:**  
**Lic. Laura B. Parra Morales**

DIRECTOR:  
Dr. Raúl A. Alzogaray

CO-DIRECTORA:  
Dra. Mónica Montagna

Año: 2016

## *Agradecimientos*

A la Universidad Nacional del Comahue, Facultad de Ingeniería, Facultad de Ciencias del Ambiente y de la Salud y al Centro Regional Universitario Bariloche.

Al CITAAC-LIBIQUIMA por el lugar y el equipamiento que necesité para desarrollar durante estos años mi trabajo de tesis doctoral.

Al Conicet por otorgarme la beca de posgrado para poder realizar mi doctorado.

A mi Director, Raúl Alzogaray por haber aceptado ser mi director y por todos sus aportes a este trabajo.

A mi co-directora Mónica, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y confiar en mí, por brindarme su ayuda, conocimiento, su acompañamiento a lo largo de todas las etapas de este trabajo de tesis. Por ser tan generosa y por todos los momentos compartidos en el laboratorio y en los Congresos.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, Vale, Jime, Nati, Maru, Josefina, Seba, Vicky, Betsy, Marian, Ceci, Vero, Enrique por su compañerismo, sus aportes, buena onda, por las risas.

A Jime por ayudarme siempre desde que ingresé al laboratorio, por sus consejos, por su compañía.

A Nati, por sus consejos y por abrirme las puertas del laboratorio y presentarme a Mónica.

A mi familia política, que de alguna manera me alentaron, sobre todo en la última etapa de este trabajo. A Flor por su aporte a la presentación de la tesis.

A mi familia, a mi papá y a mi mamá por alentarme y por inculcarme los valores de la perseverancia y el esfuerzo para lograr mis objetivos personales y profesionales. A mis hermanas Virginia y Ángeles, que me acompañaron cada una a su manera en estos años.

Al amor de mi vida, mi compañero incondicional Daher, gracias por bancarme y apoyarme en la decisión de hacer mi doctorado y estar siempre a mi lado en los buenos y en los no tan buenos momentos.

## Índice

<b>Resumen</b>	1
<b>Abstract</b>	3
<b>Abreviaturas</b>	5
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	8
<b>1.1. CLASIFICACIÓN DE LOS INSECTICIDAS SEGÚN SU MECANISMO DE ACCIÓN</b>	8
<b>1.2. EFECTOS ADVERSOS SUBLETALES DE PLAGUICIDAS EN INSECTOS</b>	17
<b>1.2.1. Estrés oxidativo</b>	19
1.2.1.1. Efectos de las EROS sobre los lípidos	20
1.2.1.2. Efectos de las EROS sobre las proteínas	21
1.2.1.3. Efectos de las EROS sobre el ADN	22
<b>1.2.2. Efectos sobre el sistema inmune</b>	22
<b>1.2.3. Efectos sobre el desarrollo</b>	23
<b>1.2.4. Efectos sobre la longevidad del adulto</b>	23
<b>1.2.5. Efectos en la fecundidad</b>	23
<b>1.2.6. Efecto en la proporción de sexos</b>	23
<b>1.2.7. Efectos en la movilidad</b>	24
<b>1.2.8. Efecto sobre la alimentación</b>	24
<b>1.2.9. Efectos en el aprendizaje</b>	25
<b>1.3. MECANISMOS BIOQUÍMICOS DE DEFENSA</b>	25
<b>1.3.1. Sistema antioxidante enzimático</b>	26
1.3.1.1. Actividad superóxido dismutasa (SOD)	27
1.3.1.2. Actividad catalasa (CAT)	27
1.3.1.3. Actividad glutatión S-transferasa (GST)	28
1.3.1.4. Actividad ascorbato peroxidasa (APOX)	29
1.3.1.5. Actividad glutatión-S transferasa con actividad peroxidasa (GST-Px)	29
<b>1.3.2. Sistema antioxidante no enzimático</b>	30
1.3.2.1. Glutatión reducido (GSH)	30
1.3.2.2. Carotenoides	30

1.3.2.3. $\alpha$ -Tocoferol	30
1.3.2.4. Ácido ascórbico	31
<b>1.3.3. Metabolismo detoxificante</b>	<b>31</b>
1.3.3.1. Esterasas	32
1.3.3.1.1. Fosfotriesterasas	33
1.3.3.1.2. Carboxilesterasas (CarE)	33
1.3.3.2. Citocromo P450 monooxigenasas (CYP450)	35
<b>1.4. MECANISMOS DE RESISTENCIA A INSECTICIDAS</b>	<b>36</b>
<b>1.4.1. Mutaciones que modifican los sitios de acción</b>	<b>37</b>
1.4.1.1. Acetilcolinesterasa	37
1.4.1.2. Canal de sodio dependiente de voltaje	38
1.4.1.3. Receptor GABA	40
<b>1.4.2. Mutaciones que aumentan la actividad de enzimas detoxificantes</b>	<b>41</b>
1.4.2.1. Esterasas	41
1.4.2.2. GST	42
1.4.2.3. CYP450	42
<b>1.4.3. Mutaciones que modifican la cutícula</b>	<b>43</b>
<b>1.4.4. Cambios en el comportamiento</b>	<b>43</b>
<b>1.5. LA FRUTICULTURA EN LA REGIÓN DEL VALLE DE RÍO NEGRO Y NEUQUÉN</b>	<b>44</b>
<b>1.5.1. Biología de <i>C. pomonella</i></b>	<b>46</b>
<b>1.5.2. Situación regional de la resistencia a insecticidas en <i>C. pomonella</i></b>	<b>49</b>
<b>2. HIPÓTESIS</b>	<b>52</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>52</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>54</b>
<b>4.1. MATERIAL BIOLÓGICO</b>	<b>54</b>
<b>4.2. REACTIVOS Y BUFFERES</b>	<b>55</b>
<b>4.2.1. Reactivos</b>	<b>55</b>
<b>4.2.2. Bufferes</b>	<b>56</b>
<b>4.3. ENSAYOS DE TOXICIDAD</b>	<b>56</b>
<b>4.3.1. Exposición a concentraciones subletales de clorpirifós y acetamiprid</b>	<b>57</b>
<b>4.4. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS</b>	<b>58</b>

<b>4.4.1. Preparación de homogenatos</b>	58
4.4.1.1. Homogenatos para medición de la actividad AChE	58
4.4.1.2. Homogenatos para determinar las actividades, CarE GST CAT	
SOD y contenido de GSH.	59
<b>4.4.2. Determinación de parámetros bioquímicos</b>	60
4.4.2.1. Inhibición de AChE por propoxur	60
4.4.2.2. Actividad AChE en adultos expuestos a concentraciones subletales de clorpirifós	60
4.4.2.3. Actividad carboxilesterasa (CarE)	60
4.4.2.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) para la caracterización cualitativa de esterasas.	61
4.4.2.4. Actividad CYP450 en adultos expuestos a concentraciones subletales de clorpirifós y acetamiprid	62
4.4.2.5. Actividad glutatión S-transferasa (GST)	62
4.4.2.6. Actividad catalasa (CAT)	63
4.4.2.7. Actividad superóxido dismutasa (SOD)	63
4.4.2.8. Contenido de glutatión reducido (GSH)	63
<b>4.4.3. Determinación de la cantidad de proteínas</b>	63
<b>4.4.4. Análisis estadístico</b>	64
<b>5. RESULTADOS</b>	66
<b>5.1. TOXICIDAD DE CLORPIRIFÓS Y ACETAMIPRID EN ADULTOS DE C. POMONELLA.</b>	66
<b>5.1.1. Ensayos de toxicidad</b>	66
<b>5.2. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LA ACHE A PROPOXUR</b>	67
<b>5.3. EFECTOS SUBLETALES DE CLORPIRIFÓS Y ACETAMIPRID</b>	69
<b>5.3.1. Actividad AChE</b>	69
<b>5.3.2. Actividad CarE</b>	70
5.3.2.1. Caracterización cualitativa de CarE. Electroforesis en geles nativos de poliacrilamida.	71
<b>5.3.3. Actividad CYP450 (ECOD)</b>	73
<b>5.3.4. Actividad GST</b>	75
<b>5.3.5. Actividad CAT</b>	76

<b>5.3.6 Actividad SOD</b>	<b>78</b>
<b>5.3.7. Contenido de GSH</b>	<b>79</b>
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>83</b>
<b>6.1. TOXICIDAD DE CLORPIRIFÓS Y ACETAMIPRID EN ADULTOS DE <i>C. POMONELLA</i></b>	<b>83</b>
<b>6.2 ACTIVIDAD ACHE Y SENSIBILIDAD A ANTICOLINESTERÁSICOS</b>	<b>85</b>
<b>6.3. MECANISMOS BIOQUIMICOS DE DEFENSA</b>	<b>86</b>
<b>6.4. EFECTOS SUBLETALES DE CLORPIRIFÓS Y ACETAMIPRID</b>	<b>88</b>
<b>6.4.1. Actividad AChE</b>	<b>88</b>
<b>6.3.2. Actividad CarE</b>	<b>89</b>
<b>6.3.3. Actividad ECOD</b>	<b>89</b>
<b>6.4.4. Actividad GST</b>	<b>90</b>
<b>6.3.5. Actividad CAT</b>	<b>91</b>
<b>6.4.6. Actividad SOD</b>	<b>91</b>
<b>6.3.7. Contenido de GSH</b>	<b>92</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>95</b>
<b>8. RECOMENDACIONES</b>	<b>96</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>98</b>

## Resumen

Para el control de la principal plaga de los frutos de pepita, *Cydia pomonella* (Linneaus) (Lepidoptera: Tortricidae) y otros insectos plaga se utilizan diversas familias de insecticidas, entre ellas, los organofosforados (OFs) y los neonicotinoides (NNs). Al momento de controlar la plaga, el estadio fisiológico de la población de insectos puede ser heterogéneo y la dosis que es letal para un estadio puede resultar subletal para otro. Por lo tanto, una proporción de individuos resulta estresada por el insecticida pero es capaz de sobrevivir. El estrés puede causar un aumento tanto en la tasa de mutaciones como en la actividad del sistema detoxificante, lo cual conduce al desarrollo de resistencia. El estadio blanco de control químico de *C. pomonella* son las larvas neonatas, las cuales coexisten con los adultos al momento de la aplicación de insecticidas. Dado que las concentraciones necesarias para el control de neonatas es muy inferior al requerido para adultos, estos últimos quedan expuestos a concentraciones subletales. Los objetivos de este trabajo fueron evaluar en poblaciones de campo los mecanismos convencionales de resistencia y los efectos sobre los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo producido por el OF clorpirifós y el NN acetamiprid.

Se trabajó con adultos susceptibles a insecticidas de *C. pomonella* (CSL), cepa usada como referencia, provista por el insectario del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Alto Valle. También se estudiaron dos poblaciones de campo (PC1 y PC2), recolectadas en montes frutales de la localidad de Villa Regina (Río Negro, Argentina).

Los resultados no evidenciaron diferencias significativas en  $CL_{50}$  y  $CL_{95}$  de clorpirifós entre CSL y ambas poblaciones de campo. Tampoco se observaron diferencias significativas en la toxicidad de acetamiprid, a nivel de la  $CL_{50}$ , entre CSL y PC1. Sin embargo, la  $CL_{95}$  para acetamiprid fue significativamente superior a la determinada en CSL (seis veces mayor). En los estudios *in vitro*, no se encontraron diferencias en las actividades residuales AChE en presencia de propoxur entre CSL y PC1 que sugieran la existencia de mutaciones en la AChE ( $p > 0,05$ ). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en las actividades basales AChE en la CSL, PC1 y PC2 ( $p > 0,05$ ). En la exposición *in vivo* a concentraciones subletales de clorpirifós se inhibió la actividad AChE en una forma que dependió de la concentración.

En ambas poblaciones de campo, las actividades basales CarE y CYP450 fueron significativamente superiores a las determinadas en CSL ( $p < 0,05$ ). El resto de las enzimas estudiadas y el contenido de GSH no mostraron diferencias significativas entre los grupos controles de PC1 y PC2 con la cepa de referencia ( $p > 0,05$ ). Tanto CSL como PC1 y PC2 mostraron un aumento en la actividad CarE, con respecto a sus actividades basales, a las concentraciones subletales más bajas de clorpirifós. Sin embargo, este incremento solo fue significativo en CSL ( $p < 0,05$ ). La caracterización cualitativa de las CarE obtenida de la corrida electroforética de geles nativos de poliácridamida mostró la presencia de dos isoformas para CSL y cuatro isoformas para PC1. A partir de la concentración 3,9 mg/L de clorpirifós todas las isoformas de CarE fueron completamente inhibidas, coincidiendo con los resultados cuantitativos de actividad. La actividad CYP450 determinada en CSL no fue significativamente afectada por las concentraciones de clorpirifós ( $p > 0,05$ ). Por el contrario, todos los tratamientos con clorpirifós en adultos de PC1 y PC2 produjeron una disminución en la actividad de esta enzima, la cual fue significativa en algunas de las concentraciones más altas ( $p < 0,05$ ). La exposición *in vivo* de adultos de CSL y PC1 a acetamiprid produjo un aumento en la actividad CYP450 a las concentraciones más altas, con cambios significativos para los grupos de PC1 tratados con acetamiprid ( $p < 0,05$ ). Las actividades GST determinadas en la CSL y PC1 no fueron afectadas por el clorpirifós. Por el contrario, se observó una disminución significativa en la actividad de esta enzima en

adultos de PC2 expuestos a algunas concentraciones de clorpirifós, respecto al grupo control. En general, la actividad GST no fue afectada por la exposición a acetamiprid, tanto en CSL como PC1 ( $p > 0,05$ ). La actividad CAT no fue en general afectada por la exposición a clorpirifós, con la excepción de una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de la actividad en los adultos de PC2. De la misma manera, la exposición de CSL y PC1 a acetamiprid no produjo cambios significativos en la actividad CAT, con la excepción de adultos de PC1 tratados con el insecticida. La exposición de CSL y PC1 a clorpirifós no produjo cambios significativos en la actividad SOD ( $p > 0,05$ ). Por último, el contenido de GSH fue significativamente afectado en los adultos de CSL, PC1 y PC2 tratados con algunas concentraciones de clorpirifós y acetamiprid, en comparación a sus respectivos controles.

En conclusión, los resultados presentes indicaron susceptibilidad de adultos de PC1 y PC2 al OF clorpirifós y de PC1 al NN acetamiprid. Aun así, la actividad basal CarE y CYP450 fue entre 2 y 4 veces superior a la observada en CSL, ambos mecanismos previamente asociados a resistencia a metil azinfos, acetamiprid y tiacloprid en larvas neonatas de dichas poblaciones. Los resultados de este trabajo sugieren que las actividades AChE y CarE fueron las más afectadas por el clorpirifós en CSL y en las dos poblaciones de campo. En general, el sistema antioxidante de CSL, PC1 y PC2 no mostró cambios significativos por la exposición a clorpirifós y acetamiprid. La mayor actividad CarE en ambas poblaciones de campo podría poner en riesgo el uso actual de insecticidas que contienen grupos hidrolizables en sus estructuras como el novalurón, clorantraniliprole, spinetoram, metoxifenocide y abamectina.

## Abstract

Organophosphates (OPs) and neonicotinoids (NNs) have been the most important classes of insecticides used to control the main pest of pome fruits codling moth, *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Tortricidae) and other ones. At the time of pest control, the physiological state of an insect population might be non-uniform and therefore, a concentration that is lethal to one physiological state of the species might be sublethal to another. Among other differences, the detoxification capacity varies with developmental stage. Moreover, the stress caused by the pesticide might enhance both the mutation rates and the activity of the detoxification system, which might lead to pesticide resistance. The control program of codling moth is intended to neonate larvae. However, adults may be subjected to sublethal pesticide concentrations because they coexist all together at the application time. The objective of this study was to evaluate in field populations both conventional resistance mechanisms and defense mechanisms to the oxidative stress induced by the OP chlorpyrifos and the NN acetamiprid.

The study was carried out with susceptible adults from *C. pomonella* (CSL) which was used as reference strain, provided by the insectarium of the National Agricultural Technology Institute Alto Valle, and two field populations (PC1 and PC2) which were collected from a small-scale farmer in the valley at the locality of Villa Regina (Río Negro, Argentina).

The results showed no significant difference in chlorpyrifos  $LC_{50}$  and  $LC_{95}$  between CSL and both field populations. The acetamiprid toxicity did not showed significant differences comparing  $CL_{50}$  values from CSL and PC1. However,  $LC_{95}$  was significantly greater than determined in CSL (six fold). The residual AChE activities after *in vitro* inhibition with propoxur showed no significant differences between CSL and PC1 suggesting the absence of mutations in AChE ( $p > 0.05$ ). Moreover, AChE activities from control groups of CSL, PC1 and PC2 were not statistically significant ( $p > 0.05$ ). *In vivo* exposure showed a concentration-dependent inhibition of AChE by chlorpyrifos sublethal concentrations.

The CarE and CYP450 basal activities from both field populations were significantly higher than the one from CSL ( $p < 0.05$ ). The other enzymes studied and GSH content showed no significant differences between PC1 and PC2 controls groups to CSL ( $p > 0.05$ ). Fields populations and reference strain showed an increase in CarE basal activities when were exposed at lower chlorpyrifos sub-lethal concentrations. However, this increase was only significant in CSL ( $p < 0.05$ ). The use of native polyacrylamide gels for CarE qualitatively characterization CarE showed the presence of two isoforms from CSL and four isoforms from PC1. Moreover, all CarE isoforms were completely inhibited from the 3.9 mg/L chlorpyrifos concentration and this result is correlated with quantitative results. ECOD activities from CSL were not affected by chlorpyrifos concentrations ( $p > 0.05$ ). On the other hand, ECOD activities from PC1 and PC2 exposed to chlorpyrifos concentrations showed a trend towards a decrease, at the same time some of the activities were statistically significant especially at high chlorpyrifos concentrations ( $p < 0.05$ ). Adults from CSL and PC1 exposed *in vivo* to acetamiprid revealed an increase in the ECOD activities at high concentrations with significant changes in PC1 groups ( $p < 0.05$ ). GST activities from CSL and PC1 were not affected by chlorpyrifos. Conversely, a significant decrease in the enzyme activity from PC2 adults exposed to chlorpyrifos to some concentrations was observed. In general, GST activity was not affected by exposure to acetamiprid in both CSL and PC1 ( $p > 0.05$ ). In general, CAT activity was not affected by exposure to chlorpyrifos, with the exception of a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in the activity from PC2 adults. In the same way, exposure of CSL and PC1 to acetamiprid

exhibited no significant changes in CAT activity, except PC1 adults treated with this insecticide. SOD activity from PC1 and CSL were not affected by chlorpyrifos concentrations ( $p > 0.05$ ). Finally, GSH content was significantly affected in CSL, PC1 and PC2 adults treated with some chlorpyrifos and acetamiprid concentrations, compared to their respective controls.

In conclusion, the results from the current study indicate that adults from PC1 and PC2 were susceptible to chlorpyrifos and adults from PC1 to acetamiprid. Even so, the CYP450 and CarE basal activity was 2- to 4- fold higher than CSL. Previously, both mechanisms were associated with azinphos methyl, acetamiprid and thiacloprid resistance in neonate larvae from these populations. Furthermore, the results of this work suggested that AChE and CarE activities were the most affected by chlorpyrifos from CSL and the two field populations. In general, the antioxidant system of CSL, PC1 and PC2 did not showed changes to chlorpyrifos and acetamiprid exposure. The increase CarE activity in both field populations could cause exposure risk in the current use of insecticides such as novaluron, chlorantraniliprole, spynetoram, methoxyfenozide and abamectin which contain hydrolyzed groups in their chemical structures.

**Abreviaturas**

<b>AChE:</b> acetilcolinesterasa	<b>ECOD:</b> 7-etoxicoumarina-O-deetilasa
<b>ADN:</b> ácido desoxirribonucleico	<b>EDTA:</b> ácido etilendiaminotetraacético
<b>Ala:</b> alanina	<b>EE:</b> error estándar
<b>ANOVA:</b> análisis de la varianza	<b>EROs:</b> especies reactivas de oxígeno
<b>APOX:</b> ascorbato peroxidasa	<b>FAO:</b> Organizaciones de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<b>ARNm:</b> ácido ribonucleico mensajero	<b>FeSOD:</b> superóxido dismutasa de hierro
<b>ATP:</b> adenosín trifosfato	<b>FunBaPa:</b> Fundación Barrera Zoofitosanitaria Patagónica
<b>BFU:</b> benzoilfenil ureas	<b>GABA:</b> ácido gama-aminobutírico
<b>BSA:</b> albúmina sérica bovina	<b>gen ace:</b> gen de acetilcolinesterasa
<b>CAT:</b> catalasa	<b>gen Rdl:</b> gen de resistencia a dieldrin
<b>BW284C5:</b> dibromuro de 1,5-bis(4-allildimetilamoniofenil) pentano-3-1	<b>Gly:</b> glicina
<b>CarE:</b> carboxilesterasas	<b>GR:</b> grado de resistencia
<b>CBs:</b> carbamatos	<b>GR:</b> glutatión reductasa
<b>CCl<sub>3</sub>:</b> triclorometilo	<b>GSH:</b> glutatión reducido
<b>CDNB:</b> 1 -cloro-2,4-dinitrobenceno	<b>GSSG:</b> glutatión oxidado
<b>CI<sub>50</sub>:</b> concentración inhibitoria 50	<b>GST:</b> glutatión S-transferasa
<b>CL<sub>50</sub>:</b> concentración letal 50	<b>GST-Px:</b> glutatión S- transferasa con actividad peroxidasa
<b>CpGV:</b> virus de la granulosis de carpocapsa	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b> peróxido de hidrógeno
<b>CSL:</b> cepa susceptible de laboratorio	<b>HJ:</b> hormona juvenil
<b>CTEM:</b> cadena de transporte de electrones de la mitocondria	<b>HO<sup>•</sup>:</b> radical hidroxilo
<b>CuZnSOD:</b> superóxido dismutasa de cobre y zinc	<b>IATCh:</b> yoduro de acetiltiocolina
<b>CYP450:</b> citocromo P450 monooxigenasa	<b>IGR:</b> reguladores del crecimiento de insectos
<b>DDT:</b> dicloro difenil tricloroetano	<b>IRAC:</b> Insecticide Resistance Action Committee
<b>DEET:</b> dietiltoluamida	<b>ISO-OMPA:</b> tetraisopropil pirofosforamida
<b>DTNB:</b> ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico	<b>Kdr:</b> knockdown resistance
	<b>Kpb:</b> mil pares de bases

<b>Leu:</b> leucina	<b>TPP:</b> trifenil fosfato
<b>LOO•:</b> radical peroxilo	<b>α-N:</b> α-naftol
<b>LOOH:</b> hidroperóxidos lipídicos	<b>α-NA:</b> α-naftil acetato
<b>Met:</b> metionina	<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub>:</b> oxígeno molecular singlete
<b>MnSOD:</b> superóxido dismutasas que contienen manganeso	<b>7-EC:</b> epinefrina: 7-etoxicoumarina
<b>MDA:</b> malondialdehído	<b>7-OHC:</b> 7-hidroxycoumarina
<b>NADH:</b> nicotinamida adenina dinucleótido	
<b>NaOH:</b> hidróxido de sodio	
<b>NADH:</b> nicotinamida adenina dinucleótido	
<b>NNs:</b> neonicotinoides	
<b>NO•:</b> óxido nítrico	
<b>NTX:</b> nereistoxina	
<b>O<sub>2</sub><sup>-•</sup>:</b> radical anión superóxido	
<b>OCls:</b> organoclorados	
<b>OFs:</b> organofosforados	
<b>ONOO•:</b> peroxinitrito	
<b>PC1:</b> población de campo 1	
<b>PC2:</b> población de campo 2	
<b>Phe:</b> fenilalanina	
<b>RO•:</b> radical alcoxilo	
<b>ROO•:</b> radical peroxilo	
<b>ROOH:</b> hidroperóxidos	
<b>RnACh:</b> receptor nicotínico de la acetilcolina	
<b>Se-GPOX:</b> glutatión peroxidasa Se-dependiente	
<b>Ser:</b> serina	
<b>SOD:</b> superóxido dismutasas	
<b>TCA:</b> tricloro acético	
<b>TEMED:</b> tetrametiletiléndiamina	
<b>Thr:</b> treonina	

## *Introducción*

## 1. INTRODUCCIÓN

La Organización de Agricultura y Alimentos de las Naciones Unidas (FAO) define a los plaguicidas como “cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o de otra manera interfieren con la producción, transformación, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o sustancias que puedan administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos” (FAO 2003). Según los organismos a los cuales están dirigidos, los plaguicidas se clasifican en insecticidas, acaricidas, rodenticidas, avicidas, fungicidas y herbicidas, entre otros.

En todo el mundo se comercializan más de setecientos ingredientes activos que presentan unos noventa mecanismos de acción (Casida 2009). Sin embargo, la mayoría de los productos en venta contiene ingredientes activos que actúan sobre catorce funciones fisiológicas (cuatro corresponden a insecticidas, seis a herbicidas y cuatro a fungicidas) (Casida 2009).

Los insecticidas son plaguicidas de origen natural o sintético, destinados a controlar y eliminar plagas de insectos en la agricultura y ganadería, vectores de enfermedades humanas y veterinaria, e insectos que producen daño en los muebles e inmuebles, en las plantas ornamentales y en las mascotas animales. Sus mecanismos de acción son variados, pero la gran mayoría de los productos comerciales contienen ingredientes activos neurotóxicos (Gupta & Milatovic 2014). La comprensión de los mecanismos de acción ayuda a la selección de los insecticidas para lograr una estrategia eficaz y sostenible en el manejo de plagas.

### 1.1. CLASIFICACIÓN DE LOS INSECTICIDAS SEGÚN SU MECANISMO DE ACCIÓN

La IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) (<http://www.iraconline.org/documents/moa-classification>) clasifica a los insecticidas según el sitio y mecanismo de acción. El esquema de clasificación de la IRAC está basado en cuatro grupos primarios identificados con un color (Tabla 1). El color asocia estas grandes categorías de acuerdo a la función fisiológica afectada y sirve para comprender la sintomatología y velocidad de acción. Dentro de cada grupo, se clasifica a los subgrupos con números arábigos o números

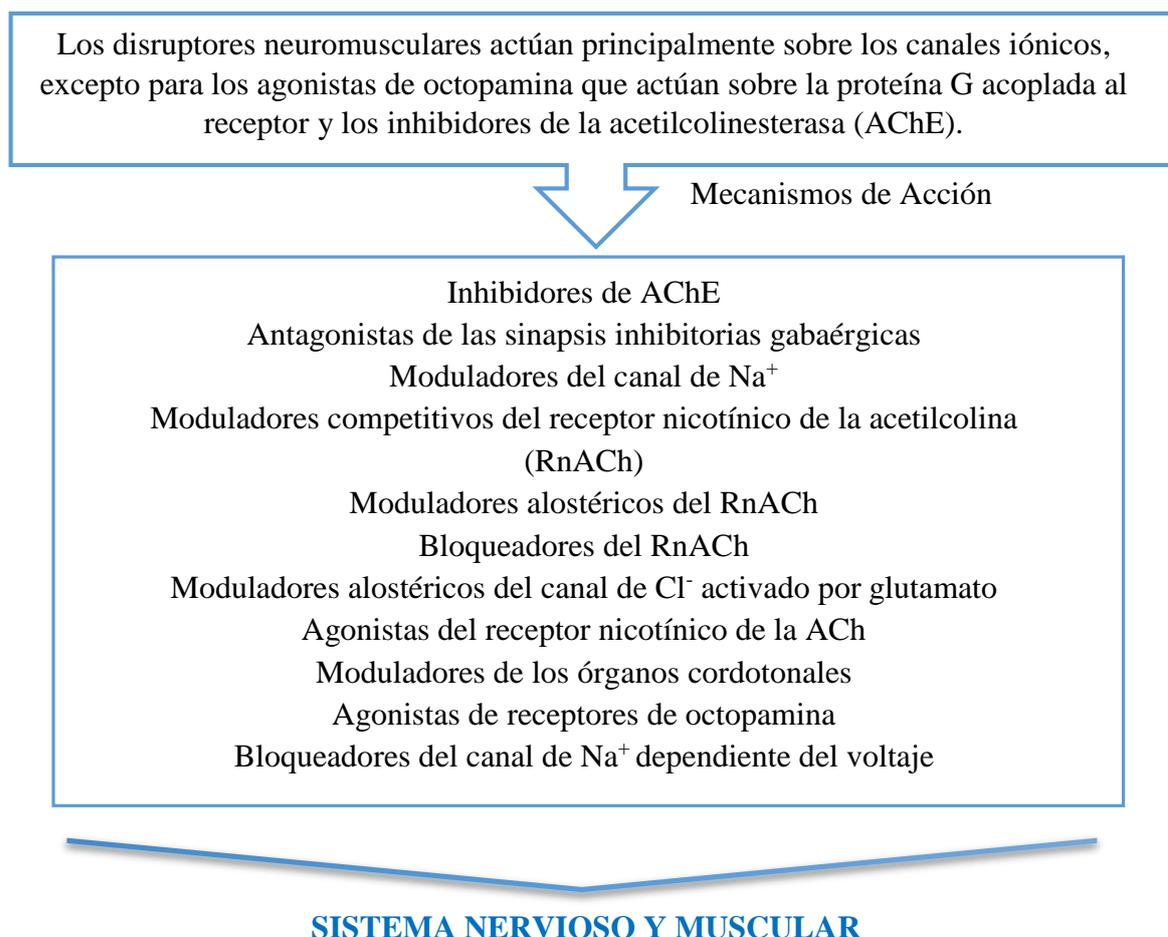
y letras mayúsculas según el mecanismo primario de acción. Dentro de cada grupo, la asignación de subgrupos usualmente involucra la identificación de la proteína blanco responsable del efecto biológico (Sparks & Nauen 2015).

**Tabla1:** Clasificación según el mecanismo y sitio de acción

EFECTOS FISIOLÓGICOS				
Sistema nervioso y muscular	Crecimiento y desarrollo	Sistema digestivo	Sistema respiratorio	No específicos

### SISTEMA NERVIOSO Y MUSCULAR

En este grupo se incluye a la mayoría de los insecticidas y comprende doce subgrupos de sustancias con rápida acción (Figura 1).



**Figura 1:** Mecanismos de acción de insecticidas que actúan en el sistema nervioso y muscular.

### **Grupo 1. Inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE)**

La AChE hidroliza el neurotransmisor acetilcolina (ACh) en las sinapsis nerviosas colinérgicas, interrumpiendo de esa manera la transmisión de impulsos nerviosos en la membrana post-sináptica (Fournier et al. 1992). Esta enzima es el sitio de acción de los organofosforados (OFs) y carbamatos (CBs). Los insecticidas que pertenecen a estos dos grupos se unen en forma covalente con un residuo de serina ubicado en el sitio activo de la enzima (Fukuto 1990). La enzima fosforilada o carbamilada queda completamente inhibida, causando la hiperexcitación del sistema nervioso. Clorpirifós, metil azinfos, azametifós, fenitrotión y triclofón son ejemplos de OFs. Carbaril, propoxur, carbofurán y fenoxicarb son ejemplos de CBs. Varios insecticidas de ambos grupos están prohibidos en muchos países por su alta toxicidad en organismos que no son plagas y sus efectos ambientales (Mostafalou & Abdollahi 2013). En nuestro país, está prohibido el uso de insecticidas OFs etil paratión, metil paratión (Resolución SAGPyA 606/93) y monocrotofós (Resolución SAGPyA 532/2011). El uso de clorpirifós se encuentra restringido (Resolución MSN 456/2009). Recientemente, el SENASA prohibió el uso del metamidofós y metil azinfos (Resolución 149/16).

### **Grupo 2. Antagonistas de las sinapsis inhibitorias gabaérgicas**

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor en las sinapsis inhibitorias de los insectos, tanto en el sistema nervioso central como en el periférico, donde regula el funcionamiento de los canales de cloruro en las membranas post-sinápticas gabaérgicas (Bloomquist 2001). Estos canales son el sitio de acción de los insecticidas organoclorados (OCIs) ciclodienos, hexacloro ciclo hexano y fenilpirazoles, que actúan como antagonistas del GABA y producen hiperexcitación nerviosa. Clordano, eldin y dieldrin son ejemplos de OCIs; el fipronil es ejemplo de fenilpirazol. Los OCIs están prohibidos en muchos países debido a sus efectos indeseables sobre el ambiente y los seres vivos en general (Camenzuli et al. 2015). En nuestro país, están prohibidos los insecticidas OCIs como aldrín (Decreto 2121/90), clordano (Ley 18073/69, Decreto 2678/69), DDT (Decreto 2121/90), HCH (Ley 22289/80) y metoxicloro (Resolución SAGPyA 750/00).

### **Grupo 3. Moduladores o activadores del canal de sodio**

En las membranas celulares de las neuronas, la actividad de los canales de sodio dependientes de voltaje controla el intercambio de iones sodio involucrado en la transmisión de los impulsos nerviosos (Bruce et al. 2002). El dicloro difenil tricloroetano

(DDT), sus análogos, las piretrinas y sus análogos sintéticos, los piretroides, se unen a estos canales y alteran su función, hiperexcitando el sistema nervioso (Casida & Durkin 2013). El DDT y sus análogos han dejado de usarse en buena parte del mundo (Camenzuli et al. 2015), mientras que piretroides como deltametrina y cipermetrina son los insecticidas más efectivos y más usados (Casida & Durkin 2013).

#### **Grupo 4. Moduladores competitivos del RnACh**

La ACh es el principal neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central del insecto. Los receptores nicotínicos de ACh (RnACh) cumplen un rol importante en varios procesos cognitivos, además de mediar la transmisión sináptica colinérgica (Gauthier 2010). Los insecticidas nicotínicos, neonicotinoides (NNs), sulfoximinas y butenólidos actúan como agonistas de la ACh causando un amplio rango de síntomas, desde hiperexcitación hasta letargia y parálisis (Tomizawa & Casida 2005). La nicotina y sus análogos se usaron en el pasado con fines insecticidas, pero su alta toxicidad en mamíferos condujo a su reemplazo por otras sustancias (Costa et al. 2008). Sus análogos sintéticos, los NNs, son los moduladores del RnACh más usados.

#### **Grupo 5. Moduladores alostéricos del RnACh**

Las espinosinas son una gran familia de compuestos producidos por la fermentación de dos especies del actinomicete del suelo pertenecientes al género *Saccharopolyspora* (Kirst 2010). Actúan como activadores alostéricos del RnACh y provocan hiperexcitación del sistema nervioso. Los productos comerciales contienen una mezcla de espinosinas A y D, y aun no se conoce el sitio exacto del RnACh al cual se une la espinosina A (Salgado 1998). El spinetoram y el spinosad son derivados semi sintéticos de las espinosinas.

#### **Grupo 6. Moduladores alostéricos del canal de cloro activado por glutamato**

Los canales de cloro activados por glutamato se encuentran en la mayoría de los invertebrados y, entre otras funciones, controlan la locomoción y la alimentación, y participan en la percepción de estímulos sensoriales (Wolstenholme 2012). Las avermectinas y las milbemicinas son dos familias de lactonas macrocíclicas sintetizadas por actinomicetes del género *Streptomyces* (Wolstenholme & Rogers 2005). Estas moléculas bloquean la transmisión nerviosa cuando se unen a los canales de cloro activados por glutamato (Forrester et al. 2004). Son representantes de este grupo la abamectina, emamectina, milbemectina, etc.

### **Grupo 9. Moduladores de los órganos cordotonaes y canales iónicos RPT**

Los órganos cordotonaes son órganos sensoriales subcuticulares en miniatura, presentes en insectos y crustáceos, formados por repeticiones de una unidad multicelular característica llamada escolopidium (Field & Matheson 1998). La mayoría de los órganos cordotonaes son propioceptores. Estos órganos detectan estímulos táctiles y vibraciones. En la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, la pimetrozina y el pirifluquinazon, únicos representantes de este subgrupo, alteran la coordinación y la audición al actuar sobre receptores cordotonaes de estiramiento. Esta acción requiere de dos receptores de potencial transitorio (RPT) los cuales se encuentran exclusivamente en estas células (Nesterov et al. 2015). En la langosta, *Locusta migratoria*, la pimetrozina afecta los órganos cordotonaes dentro de los que se incluye el órgano responsable del control femoral (Ausborn et al. 2005). Estos insecticidas han recibido considerable atención ya que interfieren en la coordinación y alimentación de insectos chupadores como los áfidos, son efectivos contra insectos que han desarrollado resistencia a otros insecticidas y presentan bajo grado de toxicidad en abejas (Maienfisch 2012).

### **Grupo 14. Bloqueadores del canal del RnACh**

La abundancia de RnACh en el sistema nervioso central del insecto propició el desarrollo de insecticidas dirigidos a estos receptores (Liu et al. 2008). La nereistoxina (NTX), insecticida de origen natural del gusano marino *Lumbriconereis heteropoda*, fue el primer compuesto optimizado para los insecticidas sintéticos cartap y bensultap. El cartap y su éster ditiol son proinsecticidas que, al bioactivarse metabólicamente a NTX, compiten con la ACh y bloquean la señal mediada por los RnACh causando parálisis (Richter et al. 1989).

### **Grupo 19. Agonistas del receptor de la octapamina**

La octopamina en insectos, equivalente a la adrenalina, es la neurohormona del vuelo (Metcalf 2000). Las formamidinas o amidinas activan los receptores de octopamina lo que resulta en temblores y convulsiones. A niveles subletales afectan la alimentación y puesta de huevos (Orr et al. 1990). El amitraz es el único representante de este subgrupo.

### **Grupo 22. Inhibidores del canal de sodio dependiente del voltaje**

Los canales de sodio dependientes de voltaje controlan las señales eléctricas en el sistema nervioso regulando la excitabilidad de las membranas (Dong et al. 2014). La oxadiazina

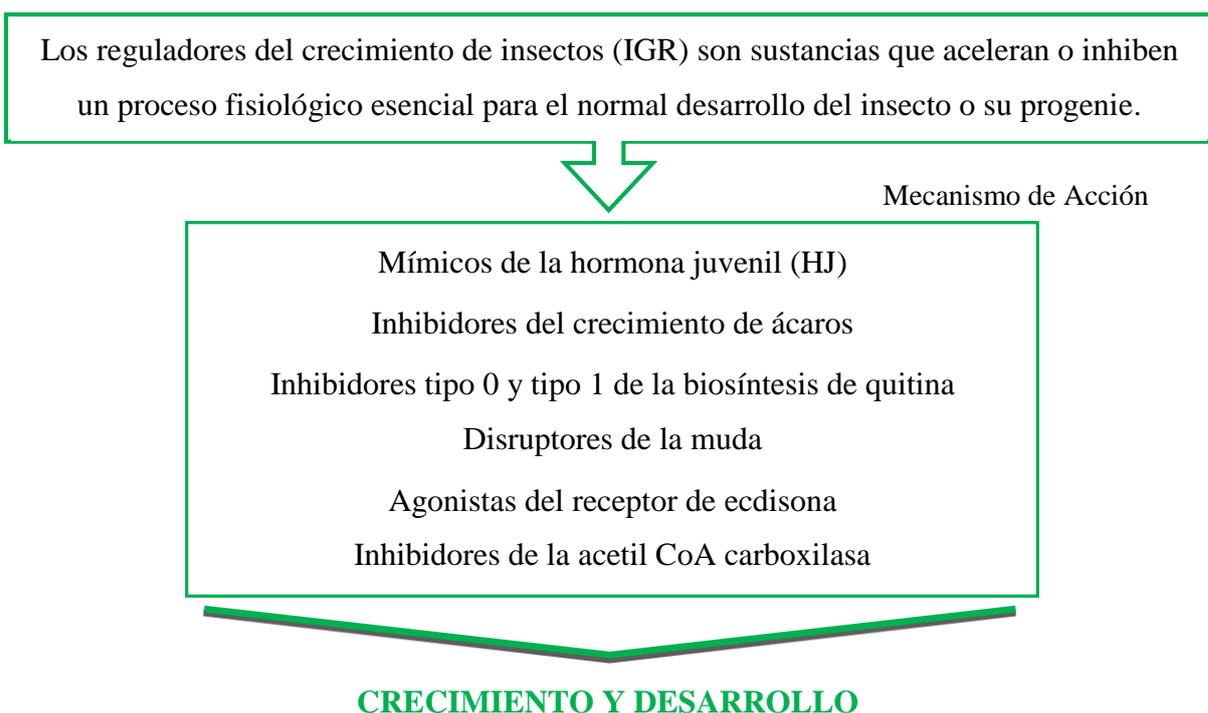
(indoxacarb) y la semicarbazona (metaflumizoma) inhiben la función del canal de sodio lo cual produce el colapso del sistema nervioso y parálisis (Wing et al. 2005).

### Grupo 28 Moduladores del receptor de rianodina

Los receptores de rianodina son canales iónicos responsables de la liberación de calcio del retículo endoplásmico (Van Petegem 2012). Las diamidas, diamidas antranílicas y el ácido ftálico activan los receptores musculares de rianodina alterando la regulación de la contracción muscular (Cordova et al. 2006). El clorantraniliprole, comercialmente denominado Rynaxypyr® es un nuevo insecticida diamida antranílico.

### ACCIÓN SOBRE CRECIMIENTO Y DESARROLLO

El desarrollo de los insectos se regula por el balance de la hormona juvenil (HJ) y ecdisona, ambas controladas por neurohormonas (Riddiford 2008). Los insecticidas que actúan sobre el crecimiento y desarrollo están clasificados en siete subgrupos (Figura 2).



**Figura 2: Clasificación de insecticidas con efectos en el crecimiento y desarrollo.**

### Grupo 7. Análogos de la HJ

La HJ, sintetizada y secretada por la corpora allata (glándula endocrina), regula una gran diversidad de procesos durante el desarrollo post embrionario y reproducción en los insectos adultos (Riddiford 2008). En estados larvales o ninfales, la HJ previene la

metamorfosis (Riddiford et al. 2003). Hacia el final del desarrollo larvario, los niveles de HJ disminuyen permitiendo que la ecdisona promueva la metamorfosis. Los insecticidas de este grupo imitan la acción biológica de la HJ (Wilson 2004). En la mayoría de los insectos, la adición de HJ causa la formación de larvas supernumerarias (Truman & Riddiford 2002). Algunos representantes de este grupo son el fenoxicarb, pyriproxifen, etc.

### **Grupo 10. Inhibidores del crecimiento de ácaros**

La quitina es esencial para los insectos y ácaros, ya que es un componente de las cutículas que protegen la superficie interior y exterior de insectos (Muthukrishnan et al. 2012). La inhibición de la quitina sintetasa 1 es el mecanismo de acción propuesto para los acaricidas clofentezina, hexitiazox y etoxazole (Demaeght et al. 2014). Una de las especies más importantes de ácaros es la arañuela roja *Tetranychus urticae* con gran capacidad de desarrollar rápidamente resistencia a los acaricidas debido a su alto potencial reproductivo y corto ciclo de vida (Piraneo et al. 2015).

### **Grupo 15. Inhibidores de la síntesis de quitina Tipo 0**

Las benzoilfenil ureas (BFU) producen la deposición anormal de la endocutícula y muda abortiva por inhibición de la síntesis de quitina (Soltani et al. 2009). En la langosta *Schistocerca gregaria*, el diflubenzurón reduce significativamente los niveles de ecdisteroides en la hemolinfa durante el desarrollo larval causando alteraciones durante la muda (Tail et al. 2015). Otros representantes de este grupo son clorfluazurón, teflubenzurón, hexaflumurón, y novalurón.

### **Grupo 16. Inhibidores de la síntesis de quitina Tipo I**

Dentro de este grupo se encuentra el compuesto denominado buprofezin, que actúa como un inhibidor de la síntesis de quitina tipo I. Su modo de acción es similar a las BFU, aunque su estructura no es análoga. Su acción resulta de la inhibición de la incorporación de 3H-glucosamina en la quitina. Como resultado de la deficiencia de quitina, la procutícula de las ninfas pierde su elasticidad y el insecto es incapaz de completar el proceso de muda (De Cock & Degheele 1998).

### **Grupo 17. Disruptores de la muda**

La ciromazina, único representante de este grupo, afecta la cutícula en larvas y pupas de dípteros y algunos otros insectos. Se desconoce el modo de acción, pero si se demostró que

no inhibe la síntesis de quitina o de proteínas cuticulares. Se hipotetiza que podría actuar en algún paso de la esclerotización de la cutícula (Bel et al. 2000).

### **Grupo 18. Agonistas del receptor de ecdisona**

La liberación de 20-hidroxi-ecdisona inicia una cascada de reacciones bioquímicas que conducen a la formación de una nueva cutícula y a la ecdisis al final del proceso de muda. Las diacilhidrazinas son análogos no esteroides de la hormona que actúan directamente sobre los receptores de ecdisona. El metoxifenocide y cromafenozone inducen una muda precoz en larvas de lepidópteros. Otros compuestos pertenecientes a este grupo son tebufenozone, halofenozone, etc. (Nauen & Bretschneider 2002).

### **Grupo 23. Inhibidores de acetil CoA carboxilasa**

La Acetil CoA carboxilasa posee un rol esencial en la regulación de la síntesis y degradación de ácidos grasos. El ácido tetrónico y sus derivados son inhibidores de la acetil-coenzima A carboxilasa y causan una reducción significativa en la biosíntesis de lípidos totales (Nauen 2005). Pertenecen a este grupo el spirodiclofen, spiromesifen y spirotetramat, éste último es particularmente eficaz en los estadios juveniles de algunas plagas. En el caso de las hembras adultas, el compuesto reduce significativamente la fecundidad y la fertilidad (Brück et al. 2009).

## **DISRUPTORES MICROBIANOS DE LA MEMBRANA INTESTINAL DE INSECTOS**

En este grupo se incluyen las toxinas bacterianas y cultivos transgénicos que expresan las toxinas de las bacterias *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus sphaericus*.

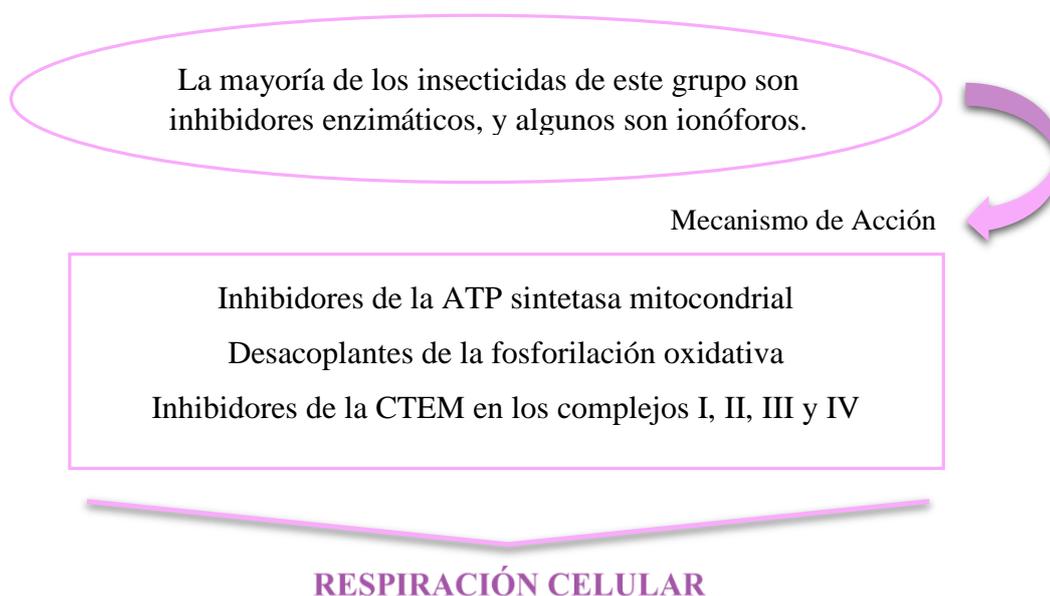
### **Grupo 11. Agentes microbianos disruptores de la membrana intestinal de insectos**

La patogenicidad del *B. thuringiensis* se ha atribuido a la expresión de proteínas tóxicas que se producen en forma cristalina y causan la destrucción de las células epiteliales del intestino de las larvas. Las proteínas cristalinas, luego de activarse bajo la combinación de pH alcalino y proteinasas, se unen a receptores específicos de las microvellosidades apicales de las células del intestino medio. Posteriormente, la toxina se inserta en la bicapa lipídica de la membrana y forma un canal iónico que conduce a la entrada de agua y la

salida de iones y otros componentes más grandes, dando lugar a la hinchazón y lisis de la célula por un mecanismo de lisis coloidal-osmótica (Aronson & Shai 2001).

## ACCIÓN SOBRE LA RESPIRACIÓN

La respiración mitocondrial produce ATP, la molécula que da energía a todos los procesos celulares vitales. En las mitocondrias, la cadena de transporte de electrones (CTEM) almacena la energía generada por la oxidación en forma de un gradiente de protones, lo que genera la síntesis de ATP. Los insecticidas de este grupo son generalmente de acción rápida a moderadamente rápida (Figura 3).



**Figura 3: Clasificación de insecticidas con efectos sobre la respiración.**

### Grupo 12. Inhibidores de la ATP sintetasa mitocondrial

La ATP sintetasa posee un doble rol en las células, participando no solo de la síntesis de ATP sino también en la regulación del gradiente de protones a través de la membrana por la hidrólisis del ATP (Metcalf 2000). Los organotins, diafentiurón y propargite son algunos representantes de este grupo.

### Grupo 13. Desacoplantes de la fosforilación oxidativa vía interrupción del gradiente de protones

Los desacoplantes son compuestos con la capacidad de alterar el gradiente de protones a través de las membranas celulares mitocondriales (Metcalf 2000). La sulfluramida y el

clorfenapir son algunos de los insecticidas que actúan como potentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa.

### **Grupos 20, 21, 24 y 25. Inhibidores de la CTEM**

Los insecticidas/acaricidas pertenecientes a estos grupos inhiben la CTEM impidiendo a las células utilizar la energía. El insecticida hidrametilnona y los acaricidas acequinocilo y fluacripirim (Grupo 20) inhiben el complejo III (citocromo C reductasa). Los acaricidas piridaben y tebufenpirad (Grupo 21) inhiben la actividad de la ubiquinona oxidoreductasa del complejo I, interfiriendo con la reducción de la ubiquinona. La rotenona (Grupo 21), es un inhibidor específico de la enzima NADH deshidrogenasa, interfiriendo con la oxidación del NADH a NAD. La fosfina y el cianuro de hidrógeno (Grupo 24) son inhibidores del complejo IV de la CTEM. Por último, los acaricidas cienopirafen y ciflumetofen (Grupo 25) inhiben al complejo II de la CTEM (Metcalf 2000).

### **MODO DE ACCIÓN DESCONOCIDO O INCIERTO**

En esta categoría se encuentran varios insecticidas que actúan inespecíficamente sobre varias moléculas blanco.

#### **Grupo 8. Miscelánea de inhibidores de sitios múltiples no específicos**

Entre ellos se encuentran los alquil haluros (bromuro de metilo), fluorados (criolita), boratos (ácido bórico), etc.

#### **NC \*. Compuestos con modos de acción inciertos o no conocidos**

Para numerosos insecticidas, los sitios de acción no son bien conocidos o actúan de forma no específica sobre numerosos sitios. Dentro de este grupo se encuentran productos de origen botánico como la sabadilla y la azaridactina. Este último actúa como regulador del crecimiento. Incluidos dentro de los insecticidas de origen químico se encuentra la criolita (fluoraluminato de sodio), pirifluquinazon, etc.

## **1.2. EFECTOS ADVERSOS SUBLETALES DE PLAGUICIDAS EN INSECTOS**

Cuando se aplica un insecticida sobre una población de insectos plaga, el estadio fisiológico de los individuos que la componen puede ser heterogéneo y la dosis que es letal para algunos puede resultar subletal para otros (Gressel 2011). Además, la capacidad de detoxificación puede variar en los diferentes estadios de la especie y esto implica una

variación en la susceptibilidad a los insecticidas a lo largo del ciclo de vida (Terriere & Yu 1974; Bouvier et al. 2002). Por otra parte, diversos factores pueden contribuir a que los insectos estén expuestos a dosis de insecticidas inferiores a las deseadas (Cutler 2013). Entre estos factores se cuentan la deriva que incluso una leve brisa puede causar en el momento de la aplicación, la volatilización, y la degradación biótica y abiótica. Todo esto conduce a que una proporción de la población plaga resulte expuesta a dosis subletales de los insecticidas y por lo tanto sobreviva.

El estudio de los efectos de los plaguicidas en artrópodos se basó históricamente en los efectos agudos producidos por altas dosis. Más recientemente se empezó a prestar atención a los efectos subletales. La mayoría de los estudios sobre los efectos subletales de los insecticidas en los insectos se refieren a modificaciones que afectan negativamente la fisiología o el comportamiento: disminución de la fecundidad o la fertilidad, retardo en el desarrollo, reducción de la longevidad, etc. (Desneux et al. 2007) (Figura 4). Aunque recibieron mucha menor atención, también se reportaron efectos estimulatorios ocasionados por bajas dosis de insecticidas. Este fenómeno, llamado hormesis, ocurre como consecuencia del comportamiento bifásico de algunas sustancias: en bajas concentraciones producen efectos benéficos, mientras que en altas dosis causan efectos perjudiciales (Cutler 2013). La hormesis ha sido señalada como la causa subyacente del resurgimiento de plagas y la aparición de plagas secundarias (Guedes et al. 2009).



**Figura 4: Efectos subletales de los plaguicidas en los insectos.** Adaptado de Desneux et al. (2007).

Los estudios sobre efectos subletales de plaguicidas en la bioquímica de insectos se ha llevado a cabo principalmente en abejas y enemigos naturales (Desneux et al. 2007).

### 1.2.1. Estrés oxidativo

Un radical libre es un átomo o molécula que contiene uno o más electrones desapareados, características que los hace muy reactivos. La molécula de oxígeno ( $O_2$ ) se puede considerar como un radical libre porque contiene dos electrones desapareados, pero no es particularmente reactiva debido a una distribución electrónica especial (Halliwell & Gutteridge 1990). Sin embargo, en los pasos intermedios de la reducción del  $O_2$  a agua se pueden formar el radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ). Además, el  $O_2$  en su estado fundamental puede ser excitado electrónicamente hacia el oxígeno molecular singlete ( $^1O_2$ ). Cuando el oxígeno se combina con otros átomos o moléculas, es posible la formación de otras especies reactivas como los radicales alcoxilo ( $RO^{\cdot}$ ) y peroxilo ( $ROO^{\cdot}$ ), óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ), y triclorometilo ( $CCl_3^{\cdot}$ ), entre otros. Estos radicales son llamados en conjunto Especies Reactivas de Oxígeno (EROS), grupo que incluye también a los no radicales derivados del  $O_2$  (Rice-Evans & Burdon 1993).

El aumento en la producción de EROS se origina a partir de fuentes endógenas y exógenas. Existe una creciente evidencia de que los insecticidas OFs generan radicales libres que llevan a la alteración de la homeostasis de los insectos (Büyükgüzel 2009). El incremento de EROS puede ser independiente del mecanismo primario de acción del insecticida y estar vinculado al metabolismo oxidativo de los mismos catalizado por enzimas detoxificantes de Fase I, como el sistema citocromo P450 monooxigenasa (CYP450). Por lo tanto, si bien las EROS se producen durante el metabolismo aeróbico normal en los seres vivos, el incremento en su producción por exposición a contaminantes puede llevar a la célula a un estado de estrés oxidativo. Este estrés resulta de reacciones metabólicas que utilizan  $O_2$  y representa una alteración en el estado de equilibrio de las reacciones prooxidantes y antioxidantes en los organismos vivos. Además, genera efectos adversos en macromoléculas biológicas esenciales. Al ser las EROS moléculas altamente inestables reaccionan con moléculas cercanas, dañando sus estructuras y funciones (Krishnan & Kodrík 2011). Los sistemas vivos se adaptaron a coexistir con los radicales libres y desarrollaron varios mecanismos para su uso en diversas funciones fisiológicas (Migdal & Serres 2011).

### 1.2.1.1. Efectos de las EROS sobre los lípidos

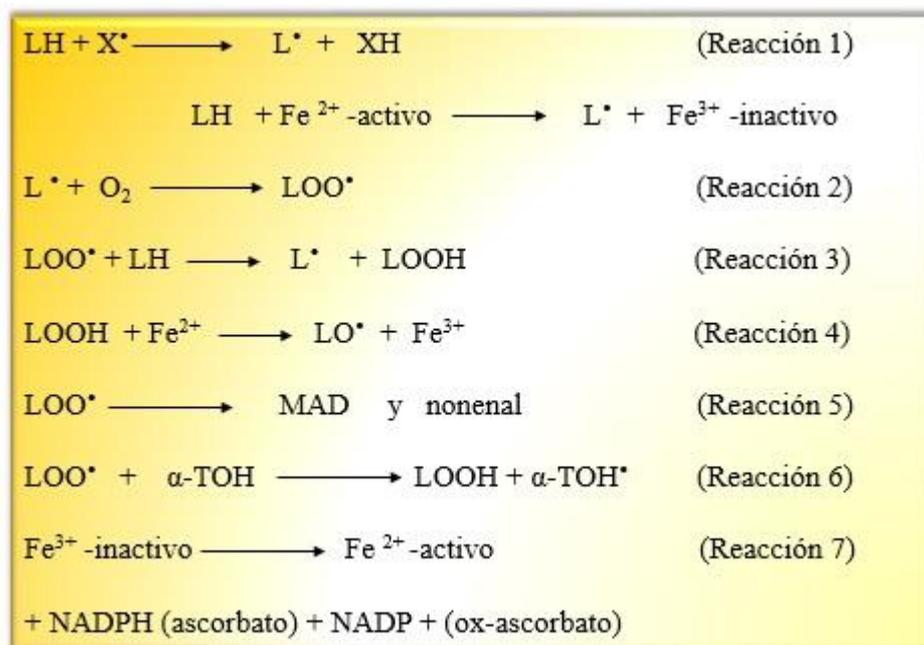
La peroxidación lipídica es el deterioro oxidativo que afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados (Rice-Evans & Burdon 1993). Puede ser desencadenada por cualquier radical libre con la suficiente reactividad como para extraer un átomo de hidrógeno de un grupo metilo reactivo de un ácido graso insaturado, como los radicales hidroxilo, alcoxi, peroxilo, alquilo, etc.

Las membranas celulares son un blanco altamente vulnerable al ataque de los radicales libres (Rice-Evans & Burdon 1993). Esto se debe a que las cadenas laterales de los ácidos grasos poliinsaturados y los fosfolípidos son muy susceptibles a la oxidación, lo que conlleva a la formación de hidroperóxidos lipídicos (LOOH). Esto induce cambios en la permeabilidad de la membrana y la capacidad de mantener gradientes iónicos transmembrana, entonces se altera la fluidez de los lípidos y se modifican las interacciones lípido-proteína.

El proceso de peroxidación lipídica tiene lugar en tres etapas: iniciación, propagación y terminación (Yu 1994) (Figura 5). La secuencia peroxidativa se inicia cuando las EROS sustraen un átomo de hidrógeno de un grupo metileno ( $=\text{CH}_2$ ) de un lípido insaturado (LH). Esto deja un electrón desapareado en el átomo de carbono (reacción 1). Los grupos metileno de la bicapa lipídica son particularmente susceptibles al ataque, ya que su presencia debilita el enlace C-H contiguo. El radical de carbono resultante se estabiliza por un reagrupamiento molecular que produce un dieno conjugado, capaz de reaccionar rápidamente con una molécula de  $\text{O}_2$  y formar el radical peroxilo ( $\text{LOO}^\bullet$ ) (reacción 2). Estos radicales sustraen átomos de H de otras moléculas de LH, convirtiéndolas en LOOH. Cuando el radical lipídico  $\text{L}^\bullet$  se forma desde un segundo LH (reacción 3), la peroxidación lipídica se propaga. Un LOOH puede ser luego degradados a otro radical  $\text{LO}^\bullet$  (reacción 4) por la reacción de Fenton en presencia de  $\text{Fe}^{++}$ . Los  $\text{LOO}^\bullet$  son inestables y se degradan a productos como malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (reacción 5). El MDA y sus aldehídos relacionados son los productos más utilizados para evaluar la peroxidación lipídica.

La peroxidación lipídica puede terminar por múltiples reacciones. La principal involucra la reacción de  $\text{LOO}^\bullet$  ó  $\text{LO}^\bullet$  con antioxidantes (reacción 6). La más efectiva es con el  $\alpha$ -tocoferol, que da lugar al radical más estable fenoxilo tocoferol, que a su vez puede ser reciclado por otro antioxidante celular, como ascorbato o glutatión (reacción 7). Si el suministro de oxígeno y las cadenas de ácidos grasos no oxidadas están disponibles,

la activación de un evento inicial de peroxidación lipídica se amplifica siempre y cuando el suministro de  $O_2$  y las cadenas de ácidos grasos no oxidadas estén disponibles (Devasagayam et al. 2003).



**Figura 5: Proceso de peroxidación lipídica.** Extraído de Devasagayam et al. (2003).

En los invertebrados, y particularmente en los insectos, la peroxidación de lípidos es muy dañina. Además de ser componentes integrales de las membranas celulares, los lípidos son esenciales para los insectos para prevenir la desecación y para la síntesis de ecdisoma, HJ, isoprenoides y feromonas. Así, la peroxidación de lípidos afecta seriamente las funciones fisiológicas críticas que dependen de lípidos y conducen a alteraciones en el desarrollo y a una disminución de la supervivencia. El efecto principal es por lo tanto no específico y se atribuye al envejecimiento (Prestwich 1994).

#### 1.2.1.2. Efectos de las EROS sobre las proteínas

Las EROS provocan en las proteínas fragmentación química, aumento en la susceptibilidad a la proteólisis y cambios funcionales (Rice-Evans & Burdon 1993). Las proteínas pueden ser directamente dañadas por interacciones específicas de los radicales libres con aminoácidos, o ser modificadas por los productos aldehídicos de la peroxidación de lípidos o la oxidación de monosacáridos. Son particularmente susceptibles al ataque de radicales libres intermediarios de la peroxidación lipídica, tal como los radicales alcoxi y peroxilo. Existen otras modificaciones en las proteínas como la generación de derivados de

carbonilo que se producen por diferentes mecanismos. La carbonilación de proteínas es ampliamente utilizada como un marcador de daño oxidativo (Stadtman & Levine 2003).

#### 1.2.1.3. Efectos de las EROS sobre el ADN

Las EROS interactúan también con el ADN, produciendo modificaciones y consecuencias potencialmente serias para las células (Dizdaroglu et al. 2002). El HO<sup>•</sup> reacciona con el ADN por adición a dobles enlaces de las bases y por la abstracción del átomo de H del grupo metilo de la timina y de cada uno de los enlaces C-H. Además de las alteraciones estructurales de las bases nativas como la oxidación de dG a 8-OH-dG, estas reacciones inducen cambios conformacionales en el ADN. El daño oxidativo del ADN, tanto mitocondrial como nuclear, incluye la formación de aductos en las bases y en los azúcares, la ruptura de cadenas simples y dobles, y la unión con otras moléculas. El O<sub>2</sub><sup>•-</sup> es relativamente poco reactivo con el ADN (Henle & Linn 1997). Las mutaciones en el ADN mitocondrial son mucho más rápidas que en el ADN nuclear, probablemente porque el primero no está cubierto por histonas y está localizado cerca de la cadena respiratoria, que es una importante fuente de EROS (Richter & Schweizer 1997).

#### 1.2.2. Efectos sobre el sistema inmune

Los insecticidas pueden afectar la capacidad de reacción del sistema inmunitario de los insectos (Desneux et al. 2007). Según el insecticida, la capacidad de respuesta del sistema inmune aumenta o disminuye. Por ejemplo, con la aplicación de metil paratión en la chinche *Rhynocoris kumarii* disminuye el número de plasmocitos en la hemolinfa; mientras que el OCl endosulfan incrementa su capacidad inmunitaria. Esta respuesta inmunológica se produce mediante la encapsulación de cuerpos extraños, es así que los plasmocitos tienen un rol directo en la respuesta inmune de los insectos. La disminución de los plasmocitos se asoció con un aumento en el número de hemocitos granulares, que desempeñan un papel importante a través de la fagocitosis (George & Ambrose 2004). En larvas de la mariposa *Caligo memnon* se observó una disminución significativa en la melanización en los individuos alimentados con hojas tratadas con terbufos (OF) respecto a aquellos alimentados con hojas libre de insecticidas (Smilanich & Dyer 2012). La melanización es un mecanismo de defensa de los insectos frente a organismos invasores (Söderhäll & Cerenius 1998).

### 1.2.3. Efectos sobre el desarrollo

Los efectos subletales de sustancias neurotóxicas durante el desarrollo larval pueden resultar de alteraciones en el desarrollo del tejido neuronal (Desneux et al. 2007). El fenoxicarb prolonga el tiempo de desarrollo de la crisopa *Chrysoperla rufilabris* en todos los estadios, con la excepción del pupal (Liu & Chen 2001). Se reportaron aumentos en los tiempos de desarrollo en depredadores expuestos a insecticidas neurotóxicos (Galvan et al. 2005). El impacto de los plaguicidas en el período de desarrollo depende del sexo de los insectos. En la chinche *Supputius cincticeps*, la exposición a permetrina disminuyó el tiempo de desarrollo en las hembras, pero lo incrementó en los machos (Zanuncio et al. 2003). Las malformaciones en los machos dan lugar a una fuerte reducción de su condición física, ya que su capacidad de aparearse se correlaciona con el tamaño corporal.

### 1.2.4. Efectos sobre la longevidad del adulto

Dosis subletales de spinosad en la micro avispa *Trichogramma chilonis* (Şimşek & Özkan 2015), y de propoxur y deltametrina en la cucaracha *Blattella germanica* (Lee et al. 1998) disminuyeron la longevidad de los adultos. Sin embargo, según el insecticida, la longevidad puede aumentar, disminuir o permanecer inalterada (Lee 2000).

### 1.2.5. Efectos en la fecundidad

Concentraciones subletales de imidacloprid y bifentrin redujeron la oviposición en la mosca blanca *Bemisia tabaci* (He et al. 2013). Efectos reproductivos similares se reportaron en el ácaro *T. urticae* (Iftner et al. 1986) y en el trips *Frankliniella occidentalis* (Kontsedalov et al. 1998) tratados con dosis subletales de piretroides.

### 1.2.6. Efecto en la proporción de sexos

Los plaguicidas producen efectos fisiológicos que incluyen la alteración en la proporción de sexos en los insectos (Alix et al. 2001) e inducción de deformaciones de ovarios y de testículos (Medina et al. 2004), entre otros. Sin embargo, muy pocos estudios documentaron los mecanismos potenciales de la alteración en la proporción de sexos como consecuencia de la exposición a plaguicidas en los artrópodos.

Además de los efectos subletales de los plaguicidas sobre la fisiología, los efectos en el comportamiento en organismos unicelulares (Tahedl & Häder 2001), insectos (Jensen et al. 1997) y peces (Little & Finger 1990) está adquiriendo un papel protagónico en las

evaluaciones de toxicidad. Estos efectos incluyen cambios en la movilidad, alimentación, aprendizaje, etc.

### **1.2.7. Efectos en la movilidad**

El sistema nervioso de los insectos es el blanco de los insecticidas más usados en todo el mundo (CBs, OFs y piretroides). Su acción provoca síntomas característicos que surgen de la alteración de las funciones nerviosas: temblores y parálisis de las patas, incoordinación motora, volteo (Alix et al. 2001; Suchail et al. 2001). El primer síntoma que se observa en los insectos intoxicados con piretroides y ciertos monoterpenos vegetales es un aumento de la actividad locomotora (Gammon 1978; Alzogaray et al. 1997; Moretti et al. 2013). En otros casos, como cucarachas expuestas al repelente dietiltoluamida (DEET) o la avispa *T. chilonis* tratada con spinosad, ocurre una disminución de dicha actividad (Şimşek & Özkan 2015). La movilidad también se puede ver afectada en forma secundaria como consecuencia de efectos sobre el comportamiento ante sustancias atrayentes, repelentes o irritantes (Salerno et al. 2002; Karise et al. 2007; de Castro et al. 2013). La locomoción puede ser una medida sensible del estrés tóxico para una amplia gama de contaminantes ambientales (Little 1990).

En organismos expuestos a monocrotófos, se observó una relación entre el aumento de los niveles de las actividades de enzimas antioxidantes y la locomoción (Kavitha & Venkateswara Rao 2007). En larvas del cuarto estadio del mosquito *Aedes aegypti* expuestas a concentraciones subletales de imidacloprid y spinosad se observó una disminución en la distancia de nado, mayores tiempos de reposo y menor velocidad de nado en los organismos (Tomé et al. 2014).

### **1.2.8. Efecto sobre la alimentación**

Los plaguicidas pueden interferir en la alimentación de los insectos de tres maneras. En primer lugar, algunos plaguicidas que producen efectos repelentes pueden afectar la alimentación. En segundo lugar, algunos plaguicidas se utilizan específicamente por sus propiedades antialimentarias (He et al. 2013) con la posibilidad de que los insectos benéficos también pueden ser inducidos a rechazar la alimentación cuando se los expone al plaguicida. En tercer lugar, la interrupción en la capacidad de localizar los alimentos puede ocurrir por la capacidad olfatoria reducida luego de la exposición a los plaguicidas (Pham-Delégue & Decourtye 2002). Dosis subletales de tiacloprid y rynaxypyr, administrados a

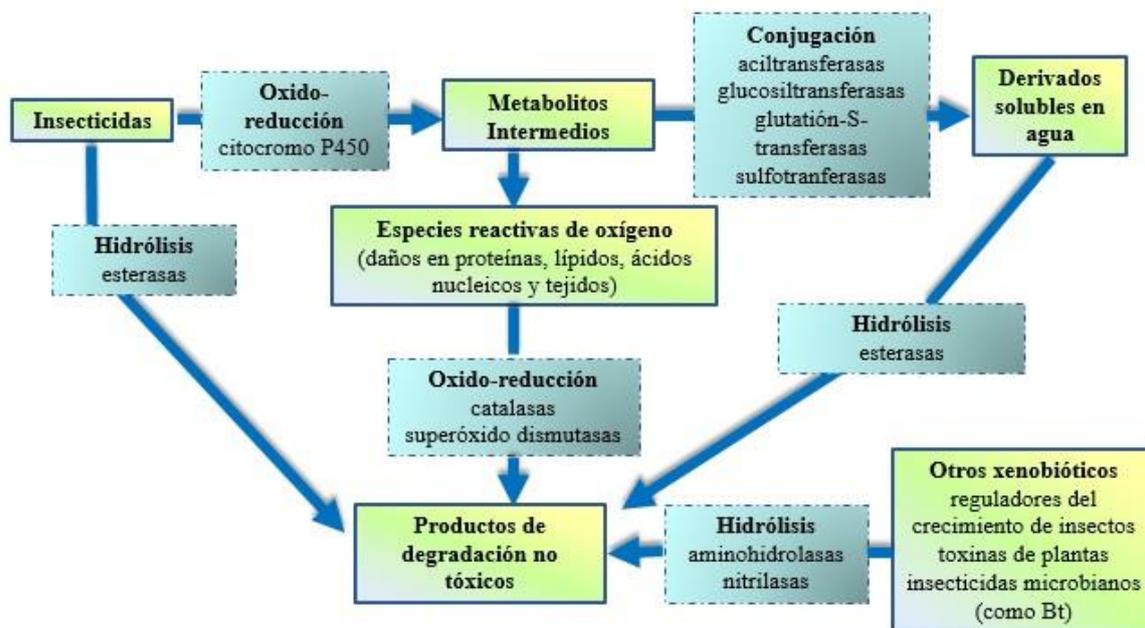
través del alimento a la chinche *Macrolophus pygmaeus*, produjeron una disminución en el consumo respecto al grupo control (Martinou et al. 2014).

### **1.2.9. Efectos en el aprendizaje**

Los efectos de los plaguicidas en los procesos de aprendizaje de los artrópodos se han estudiado principalmente en insectos polinizadores como *Apis mellifera*, debido a la importancia del aprendizaje en el proceso de búsqueda de alimento en esta especie (Müller 2002). Por ejemplo, se observó una reducción en el proceso de memorización de señales florales en abejas que sobrevivieron once días al tratamiento oral con imidacloprid, 5-OH-imidacloprid, fipronil, deltametrina, endosulfán, y procloraz (Decourtye et al. 2005).

## **1.3. MECANISMOS BIOQUÍMICOS DE DEFENSA**

En general, la respuesta al estrés y la detoxificación de xenobióticos incluye tres vías principales e interrelacionadas (Figura 6): óxido-reducción, conjugación e hidrólisis (Xu et al. 2013). Las reacciones de óxido-reducción, catalizadas principalmente por el sistema del CYP450 son las principales vías de detoxificación de los insecticidas. Sin embargo, estas reacciones pueden producir EROS como metabolitos intermedios. Estos metabolitos pueden ser detoxificados por antioxidantes o por la conjugación con componentes endógenos. La detoxificación puede también ocurrir a través de la hidrólisis.



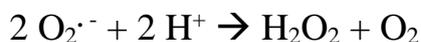
**Figura 6: Vías de detoxificación.** Los cuadros sólidos indican los compuestos químicos ambientales o productos de los procesos metabólicos. Los cuadros de guiones y puntos indican las tres vías de detoxificación principales. Modificado de Xu et al. (2013).

### 1.3.1. Sistema antioxidante enzimático

Para minimizar los daños celulares, los organismos han desarrollado un complejo sistema antioxidante que, de acuerdo a su naturaleza, se divide en defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas. Según Halliwell & Gutteridge (1989), un antioxidante es una sustancia que retrasa significativamente o inhibe la oxidación del sustrato, estando presente en bajas concentraciones comparadas con las de este último. Al igual que otros animales, los insectos poseen un conjunto de enzimas que contrarresta los daños producidos por las EROS (Ahmad 1992; Felton & Summers 1995). En este grupo se incluyen las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión S- transferasas (GST), ascorbato peroxidasa (APOX), glutatión S- transferasa con actividad peroxidasa (GST-Px), entre otras. La mayoría de las enzimas antioxidantes se encuentra en altos niveles en tejidos metabólicamente activos como el cuerpo graso, el intestino medio y los túbulos de Malpighi (Felton & Duffey 1991).

#### 1.3.1.1. Actividad superóxido dismutasa (SOD)

La actividad SOD cataliza la reacción de dismutación de los radicales superóxido, proporcionando la primera línea de defensa antioxidante contra la toxicidad del oxígeno. Estas enzimas catalizan la siguiente reacción:



Existen tres tipos de SOD que podrían derivar de dos familias (Fridovich 1989): las que contienen manganeso (MnSOD) y se encuentran en las mitocondrias de procariotas y eucariotas, y las que contienen hierro (FeSOD) y se hallan en procariotas y unas pocas familias de plantas. La conservada secuencia de aminoácidos de las integrantes de estas dos familias indica su estrecha relación (Fridovich 1989). Una tercera familia, al parecer más lejanamente relacionada con las anteriores, corresponde a las SOD que contienen cobre y zinc (CuZnSOD), las cuales se encuentran en el citosol de los eucariotas, en los cloroplastos de las plantas y en unas pocas bacterias. La actividad SOD varía ampliamente en los invertebrados, pero es generalmente más baja que en los vertebrados, con unas pocas excepciones notables (Livingstone et al. 1992). Las CuZnSOD de los invertebrados son similares a las enzimas de mamíferos.

Las CuZnSOD y las MnSOD desempeñan un rol importante en la respuesta al estrés oxidativo celular de los insectos lepidópteros (Ahmad et al. 1988). Muchos lepidópteros son particularmente susceptibles a pro-oxidantes dietéticos como los ortodihidroxifenólicos por ejemplo, ácido cafeico, quercetina, etc. Esto se debe a la fuerte alcalinidad de sus intestinos (pH 8,0 a 12,4) que favorece la auto-oxidación de esos compuestos (Felton & Duffey 1991). Por su relación con las sustancias ingeridas, no debe sorprender que las SOD y otras enzimas antioxidantes (CAT, GST, y DHA-reductasa) se encuentran en niveles más altos en el sistema digestivo que en muchos otros tejidos (Felton & Duffey 1991; Ahmad 1992).

#### 1.3.1.2. Actividad catalasa (CAT)

Las CAT son enzimas homotetraméricas localizadas dentro de los peroxisomas, que también contienen enzimas productoras de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (del Río et al. 1992). Su función principal es descomponer el  $\text{H}_2\text{O}_2$  según la siguiente reacción (Halliwell 1989):



En los insectos, la actividad CAT es inducida por el estrés oxidativo causado por los insecticidas (Büyükgüzel 2009; Aslanturk et al. 2011; Kayis et al. 2015). Aparte de los pocos casos en que está ausente, generalmente la actividad CAT es mayor en los invertebrados que en los vertebrados (Livingstone et al. 1992).

La actividad CAT se ha estudiado en varios órdenes de insectos incluyendo Diptera, Coleoptera y Lepidoptera (Aucoin et al. 1991; Ahmad 1992). Esta enzima ha sido purificada en *D. melanogaster* (Nahmias & Bewley 1984), la polilla de la col *Trichoplusia ni* (Mitchell et al. 1991) y la lagarta de las vainas *Spodoptera eridania* (Ahmad 1992). Además de los peroxisomas, la actividad CAT presente en el citosol y en las mitocondrias (Ahmad et al. 1988) sugiere que esta amplia distribución intracelular es una adaptación evolutiva como consecuencia de la ausencia de glutatión peroxidasa Se-dependiente (Se-GPOX). La distribución tisular de la actividad CAT ha sido examinada en unas pocas especies de insectos. Se detectó actividad CAT en tejidos del intestino medio de varias plagas de lepidópteros como por ejemplo en larvas de *Helicoverpa zea*, *Spodoptera exigua*, *Manduca sexta* y *Heliothis virescens* (Felton & Duffey 1991).

#### 1.3.1.3. Actividad glutatión S-transferasa (GST)

Las GST son una superfamilia de enzimas que se encuentran tanto en organismos procariotas como eucariotas. Son multifuncionales y catalizan las conjugaciones de glutatión (GSH) con un amplio espectro de compuestos electrófilos (Habig et al. 1974). También participan en la reducción de hidroperóxidos (ROOH), pero no de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Mannervik et al. 1985). Catalizan el ataque nucleofílico del GSH en los centros electrofílicos de los xenobióticos, incluyendo insecticidas, metabolitos secundarios de plantas e hidroperóxidos orgánicos (Ranson & Hemingway 2005).

Según su distribución dentro de la célula, las GST se dividen en tres categorías: citosólicas, microsomales y mitocondriales. En los insectos, solo se conocen citosólicas y microsomales (Shi et al. 2012). Las GST citosólicas de los insectos se pueden clasificar en seis clases principales. Entre ellas,  $\sigma$ ,  $\Omega$ , Z, y  $\theta$  tienen representantes en todos los metazoarios; mientras que  $\delta$  y  $\epsilon$  son específicas de los insectos (Ding et al. 2003; Enayati et al. 2005). De acuerdo a la comparación de secuencias de aminoácidos, se agrupan en las clases I y II. Mientras que algunos miembros de una misma clase muestran un alto grado de similitud (> 90%), otros pueden compartir menos de un 40%. La clase I de GST de insectos parece estar más cerca de las GST de la clase  $\theta$  de mamíferos, mientras que la

clase II de GST está más cerca de las GST de clase  $\sigma$  (Feng et al. 1999). La primera GST de clase  $\theta$  fue reportada para la mosca *Lucilia cuprina* (Wilce et al. 1995). A la fecha, numerosos genes de GST fueron clonados en numerosos insectos, la mayoría de ellos dípteros (Shi et al. 2012; Zhang et al. 2014; Yamamoto et al. 2016). Solo un gen de GST que pertenece a la clase  $\delta$  fue clonado en carpocapsa *Cydia pomonella* (Liu et al. 2014).

#### 1.3.1.4. Actividad ascorbato peroxidasa (APOX)

Estas enzimas catalizan la oxidación del ácido ascórbico con la consiguiente reducción del  $H_2O_2$ . La enzima reductasa dehidroascorbato es la encargada de la regeneración del ascorbato, una molécula que remueve el oxígeno singlete y numerosos radicales solubles en agua como peroxilo e hidroxilo. Además de la actividad peroxidasa, el reciclado eficiente de ascorbato le otorga un fuerte rol antioxidante. La actividad de APOX ha sido determinada en plantas, algunas cianobacterias y ocasionalmente en tejidos de mamíferos, pero no ha sido muy estudiada en invertebrados. En el gusano elotero *H. zea*, la APOX mostró actividad hacia un gran número de sustratos modelos, incluyendo el  $H_2O_2$  (Mathews et al. 1997).

#### 1.3.1.5. Actividad glutatión-S transferasa con actividad peroxidasa (GST-Px)

Los vertebrados contienen la enzima GST-Px dependiente de selenio, la cual remueve  $H_2O_2$  y peróxidos lipídicos. En los insectos, en cambio, esta enzima solo metaboliza los peróxidos lipídicos de acuerdo a la siguiente reacción (Ahmad 1992).



Las GPOX y las glutatión reductasas (GR) son enzimas complementarias. Las primeras reducen hidroperóxidos tóxicos que se forman como resultado del estrés oxidativo, mientras las GR convierten glutatión oxidado (GSSG) a su forma reducida. En los lepidópteros *T. ni*, *Papilio polyxenes* y *S. eridania*, los niveles de actividad GPOX son muy bajos en comparación con los mamíferos (Ahmad et al. 1988).

Además de las defensas antioxidantes enzimáticas, hay un grupo de compuestos de bajo peso molecular y químicamente diverso que se subdivide en antioxidantes solubles en lípidos (vitamina E o  $\alpha$ -tocofenol, tocotrienoles, vitamina A o trans-retinol/  $\beta$ -caroteno) y antioxidantes solubles en agua (GSH, vitamina C o ácido ascórbico) (Felton & Summers

1995). Estas moléculas cumplen un rol importante en presencia de las EROS y actúan contra los efectos deletéreos del estrés oxidativo.

### 1.3.2. Sistema antioxidante no enzimático

#### 1.3.2.1. Glutatión reducido (GSH)

Constituido por los aminoácidos cisteína, glutamato y glicina, el GSH es uno de los tioles de bajo peso molecular más abundante entre los seres vivos. El GSH presenta un grupo tiol reactivo que cumple un rol importante en los procesos de detoxificación. Esta molécula interactúa con los radicales libres y compuestos oxidantes como  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO^{\cdot}$  y radicales de carbono, interviniendo en la protección contra el daño de los peróxidos lipídicos (Felton & Summers 1995; Krishnan et al. 2009). En presencia de radicales, la forma reducida de GSH se oxida a GSSG y puede ser reciclada en una reacción dependiente de NADPH catalizada por GR o por los sistemas tiorredoxina reductasa (Kanzok 2001). Además de mantener un entorno intracelular reductor (Meister 1992), el GSH está implicado en muchos procesos incluyendo la síntesis de ADN y de proteínas, el transporte, la actividad enzimática y la conjugación de xenobióticos (Meister & Anderson 1983) y mantiene al ascorbato, tocoferoles y otros agentes reductores en su estado reducido (Felton & Summers 1995).

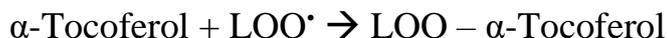
#### 1.3.2.2. Carotenoides

Los carotenoides, una familia de polienos conjugados, pueden ser precursores de la vitamina A y son capaces de reaccionar con el oxígeno singlete y con radicales peroxilo (Krishnan & Kodrík 2011). En las plantas, su papel en la eliminación de radicales libres está bien documentado, pero el papel específico como antioxidante en los insectos permanece en estudio (Ahmad 1992).

#### 1.3.2.3. $\alpha$ -Tocoferol

El  $\alpha$ -tocoferol es una vitamina lípido-soluble que actúa en las membranas y puede reaccionar con radicales peróxilos lipídicos para formar un radical relativamente estable, como se representa en la siguiente reacción. En los insectos, los estudios sobre las propiedades antioxidantes de  $\alpha$ -tocoferol se limitan al efecto de la administración exógena mediante la dieta. Se ha estudiado en larvas de la polilla *M. sexta*, el papel de los antioxidantes en la dieta. Los niveles dietéticos elevados de moléculas antioxidantes como el  $\beta$ -caroteno y  $\alpha$ -

tocoferol (vitamina E) resultaron en una reducción dependiente de la concentración asociada a la mortalidad por el fototóxico tiofeno  $\alpha$ -tertienilo (Aucoin et al. 1991).



#### 1.3.2.4. Ácido ascórbico

El ácido ascórbico es un antioxidante esencial que los insectos obtienen a través de la alimentación, ya que no lo pueden sintetizar (Barbehenn et al. 2001). En presencia de EROS, el ácido ascórbico (o su base conjugada, el ascorbato) es donante de un electrón y se oxida en el radical semi-dehidroascorbato, siendo una molécula estable por la deslocalización de los electrones entre los tres átomos de oxígeno. El semi-dehidroascorbato es convertido de nuevo a ácido ascórbico en presencia de GSH y dehidroascorbato reductasa (Felton & Summers 1995).



Además de los mecanismos antioxidantes y los sistemas descritos, los insectos poseen varias moléculas solubles en agua (ácido úrico, carbohidratos, polioles) y proteínas de unión a metales (ferritina y transferrina) que también sirven para las funciones antioxidantes cruciales (Felton & Summers 1995).

### 1.3.3. Metabolismo detoxificante

Continuamente, en forma accidental o intencional, distintas sustancias ingresan al organismo de cada ser vivo. Estas sustancias son llamadas xenobióticos y a lo largo de la evolución han surgido procesos enzimáticos que participan en su eliminación, impidiendo que el organismo se intoxique. La detoxificación de los xenobióticos es llevada a cabo por enzimas que catalizan cuatro tipos de reacciones: oxidaciones, reducciones, hidrólisis y conjugaciones. Los tres primeros tipos corresponden a lo que tradicionalmente se denomina metabolismo de Fase I, mientras que las conjugaciones constituyen el metabolismo de Fase II (Josephy et al. 2005). El metabolismo de Fase I implica la exposición o la adición al sustrato de un grupo polar (oxhidrilo, carboxilo, sulfhidrilo, amino). El de Fase II consiste en la unión al sustrato de una molécula endógena pequeña (GSH, aminoácidos, sulfato, glucosa y otros). Los productos de las reacciones metabólicas

de Fase I y II son más polares que sus respectivos sustratos, y por lo tanto más fácilmente eliminables a través de la excreción. En la mayoría de los casos, los productos son también menos tóxicos que los sustratos, pero existen excepciones (activación). Según la especie, el momento del ciclo de vida y el tejido u órgano donde ocurre la reacción, un xenobiótico puede ser transformado sucesivamente por reacciones de Fase I y II, solo por reacciones de Fase I o solo por las de Fase II.

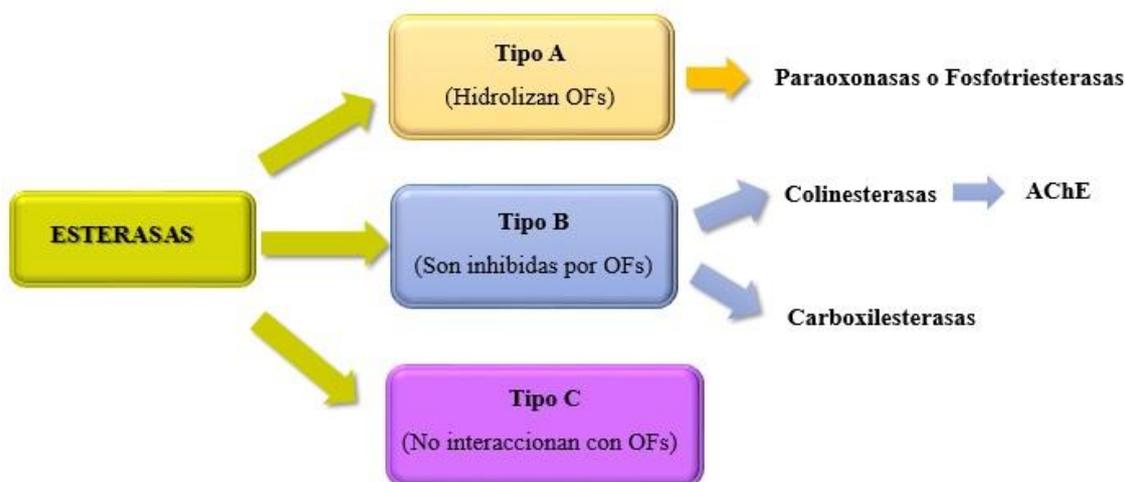
#### 1.3.3.1. Esterasas

En los últimos cincuenta años, las esterasas han sido una parte fundamental de la investigación bioquímica de insectos. Representan un componente importante del sistema de defensa frente a los xenobióticos y son foco de estudios en metabolismo de insecticidas y resistencia a los mismos. La reacción de las esterasas se define como la hidrólisis de un éster que da como producto un alcohol y un ácido, abarcando la hidrólisis de una amplia gama de sustratos. Esta reacción está comprendida dentro de un conjunto más amplio de reacciones de hidrólisis, que también incluye lipasas, proteasas, epóxido hidrolasas y muchas otras (Montella et al. 2012).

Existen varias clasificaciones basadas en la sensibilidad de las esterasas a distintos inhibidores (Figura 7). Una clasificación ampliamente aceptada reconoce tres tipos de esterasas (A, B, y C) en base a su interacción con los OFs (Aldridge & Reiner 1972):

- Las esterasas de tipo A hidrolizan OFs, pero no son inhibidas por ellos.
- Las esterasas de tipo B son irreversiblemente inhibidas por los OFs.
- Las esterasas de tipo C no reaccionan con los OFs.

La mayoría de las esterasas estudiadas en los insectos pertenecen al tipo B, y dentro de éstas las CarE están involucradas en el metabolismo detoxificante.



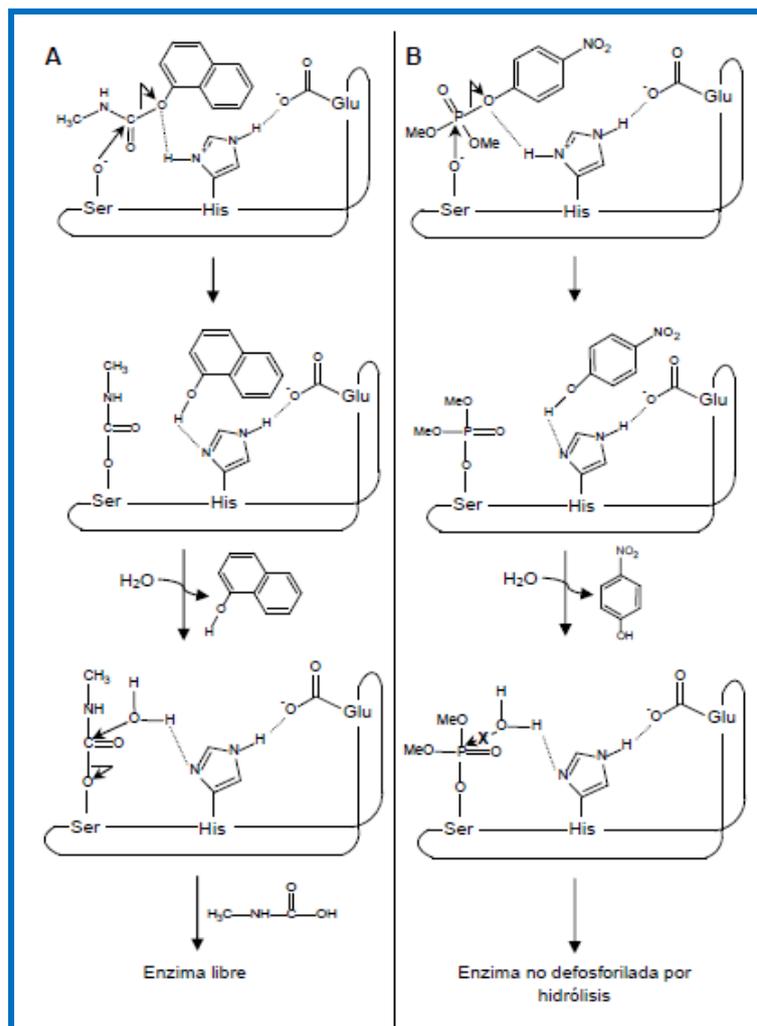
**Figura 7: Esquema de la clasificación de las esterasas.**

#### 1.3.3.1.1. Fosfotriesterasas

Estas enzimas hidrolizan triésteres de fosfato y requieren iones divalentes por lo que son inhibidas por agentes quelante (Reiner 1993). Los estudios de actividad fosfotriesterasas son limitados en insectos, probablemente como consecuencia de su baja actividad en esta clase taxonómica (Guedes et al. 1997). Para otros autores, estas enzimas no están presentes en insectos (Vilanova & Sogorb 1999). Recientemente, en el gusano de seda *Bombyx mori* se clonó un gen que codifica para una proteína con una secuencia similar a la familia de proteínas relacionadas con las fosfotriesterasas (Wang et al. 2011).

#### 1.3.3.1.2. Carboxilesterasas (CarE)

En insectos, las CarE hidrolizan numerosas moléculas endógenas y exógenas (Montella et al. 2102). Entre las funciones fisiológicas se puede citar la degradación de neurotransmisores y metabolismo de hormonas y feromonas específicas, desempeñando un papel fundamental en el desarrollo y el comportamiento de los insectos (Oakeshott et al. 1999). También participan del proceso de detoxificación de numerosos plaguicidas que poseen ésteres carboxílicos, entre ellos, CBs y piretroides. Además, proporcionan protección contra la toxicidad de los OFs y los CBs al actuar como sitios de fosforilación/carbamilación estequiométricas alternativos (Figura 8), reduciendo la biodisponibilidad de estas moléculas (Dettbarn et al. 1999).



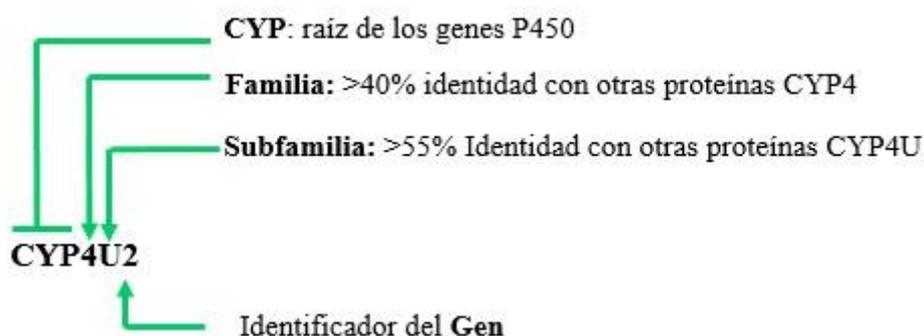
**Figura 8: Inhibición de CarE por el CB carbaril (A) y por el OF metil paraoxón (B).** Extraído de Lascano y Anguiano (2011).

Los genes que codifican las CarE pertenecen a la familia carboxil/colinesterasa, incluida dentro de la superfamilia de las  $\alpha/\beta$  hidrolasas (Hotelier et al. 2004; Hotelier et al. 2010; Punta et al. 2012). Las proteínas de esta familia no comparten un alto grado de similitud en la secuencia de ADN y difieren ampliamente en la especificidad de sustrato. Sin embargo, el conservado arreglo de residuos en el centro catalítico sugiere que provienen de un ancestro común (Nardini & Dijkstra 1999; Oakeshott et al. 2005). Los genes que codifican para las CarE parecen evolucionar muy rápido y cada especie posee un único complemento de genes con unos pocos genes ortólogos entre especies (Ranson et al. 2002; Claudianos et al. 2006; Strode et al. 2008; Oakeshott et al. 2010).

### 1.3.3.2 Citocromo P450 monooxigenasas (CYP450)

Las CYP450 son un sistema enzimático muy importante, capaz de metabolizar compuestos estructuralmente diferentes, también denominado como el catalizador biológico más versátil conocido (Porter & Coon 1991). Las CYP450 de los insectos tienen varias funciones relacionadas con el crecimiento, el desarrollo, la alimentación, y la tolerancia a las toxinas de plantas (Feyereisen 1999; Scott & Scott 2008). Además, están implicadas íntimamente en la síntesis y degradación de hormonas y feromonas incluyendo la 20-hidroxiecdisona y HJ (Hunt & Smirle 1988; Reed et al. 1994). Los organismos eucariontes poseen múltiples CYP450 que se encuentran tanto en el retículo endoplásmico como en las mitocondrias (Omura 2006). Las oxidaciones catalizadas por CYP450 son reacciones de monooxigenación dependientes de NADPH y O<sub>2</sub>. Las CYP450 de insectos pueden ser detectadas en una amplia variedad de tejidos, con mayor actividad en el intestino medio, tejido graso y los tubos de Malpighi (Hodgson 1983). En los insectos, el número de CYP450 varía de 47 en *A. mellifera* a 164 en *A. aegypti* (Scott & Scott 2008). Se hipotetiza que todas las CYP450 provienen de un gen ancestral común por duplicación génica y diversificación adaptativa (Aguiar et al. 2005).

El sistema de nomenclatura actual, basado en la secuencia de aminoácidos fue primero introducido por Nebert et al. (1989) y ha estado bajo constante revisión por la rápida acumulación de nuevas secuencias (Nelson et al. 1996). Los genes que codifican para las CYP450 se denominan con un número arábigo y una letra mayúscula para asignar una familia y subfamilia específicas, respectivamente. Otro número a continuación de la letra designa el gen individual (Figura 9).



**Figura 9:** Esquema de la nomenclatura de un gen CYP. Extraído de Feyereisen (2005).

Inicialmente, muchas CYP450 de insectos fueron agrupadas arbitrariamente en las familias CYP6 y CYP4, a pesar de que tenían menos de 40% de identidad de aminoácidos con CYP6A1 o con proteínas de CYP4 de vertebrados. Por ejemplo, CYP6L1 se aisló de *B. germanica* (Wen & Scott 2001) y es la primera subfamilia de CYP450 llamada L dentro de la familia 6. Si bien hay excepciones, las CYP450 son generalmente agrupadas dentro de la misma familia o subfamilias cuando comparten más del 40% o del 55% de similitud de aminoácidos, respectivamente (Feyereisen 2005).

Si bien esta familia de enzimas es la más importante en la detoxificación de xenobióticos, también es responsable de la biotransformación que convierte a los OFs en oxones, generando productos más tóxicos que los respectivos sustratos (Feyereisen 1999). Además, algunas enzimas del CYP450 se han asociado con aumento del estrés oxidativo celular (Strolin-Benedetti et al. 1999) y son a menudo reguladas en respuesta a factores de estrés oxidativo (Morel & Barouki 1998).

#### **1.4. MECANISMOS DE RESISTENCIA A INSECTICIDAS**

La resistencia es una “disminución de origen genético en la susceptibilidad a un plaguicida” (Tabashnik et al. 2014). Otra definición que destaca sus consecuencias prácticas, describe a la resistencia como “un cambio heredable en la sensibilidad de la población plaga que se refleja en repetidas fallas de control de un producto, el cual es usado de acuerdo a lo recomendado para esa especie” (IRAC 2016). Los principales mecanismos de resistencia a insecticidas en los insectos se agrupan en cuatro clases: (I) mutaciones que modifican los sitios de acción, disminuyendo la afinidad que por ellos presentan los insecticidas (II) sobreexpresión<sup>1</sup> que aumenta la actividad de enzimas detoxificantes, lo cual aumenta la tasa de biotransformación de los insecticidas, (III) mutaciones que modifican la cutícula, disminuyendo la velocidad de ingreso al organismo de los insecticidas y (IV) cambios de origen genético en el comportamiento (Ranson et al. 2011).

---

<sup>1</sup> Sobreexpresión génica: aumento en la transcripción del número de copias regulares del gen para una especie. Esto ocurre, generalmente, por mayor estabilidad del (ARNm) o por mutaciones e inserciones/deleciones en secuencias de promotores o locus regulatorios (Li et al. 2007).

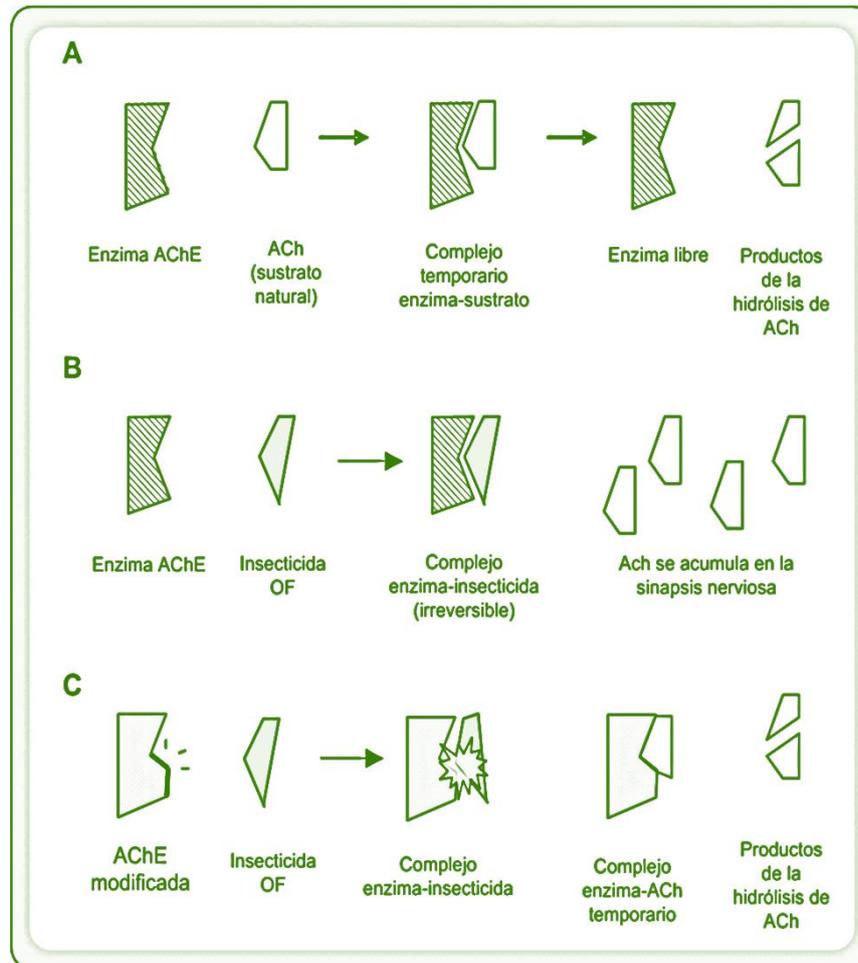
### 1.4.1. Mutaciones que modifican los sitios de acción

#### 1.4.1.1. Acetilcolinesterasa

La AChE de los insectos, codificada por el gen *ace*, es una proteína homodimérica globular anclada por su extremo C-terminal al glicosil-fosfatidil inositol de las membranas post-sinápticas. La AChE desempeña un papel muy importante en la neurotransmisión colinérgica al hidrolizar el neurotransmisor ACh liberando ácido acético y colina (Mutero & Fournier 1992). En varias especies de insectos se han identificado dos loci para AChE (*ace-1* y *ace-2*, este último es el único reportado en *Drosophila*) (Nabeshima et al. 2004; Cassanelli et al. 2006; Revuelta et al. 2009). Es probable que ambos genes estén presentes en la mayoría de los insectos (Weill et al. 2002). El árbol filogenético construido con la secuencia de AChE de treinta y tres especies de insectos indica que los dos genes de *Anopheles* derivan de una duplicación génica ocurrida muy temprano en la evolución y, que la pérdida de uno de ellos ocurrió al menos dentro de la familia Drosophilidae.

La AChE es el sitio de acción primario de los OFs y los CBs, que inhiben esta enzima en las sinapsis colinérgicas. Muchos casos de resistencia a estos insecticidas se ha asociado a la sensibilidad reducida de la AChE (Figura 10), ocasionada por mutaciones puntuales que producen sustituciones de aminoácidos cercanos al sitio activo de la enzima, pero que no afectan su capacidad de hidrolizar el sustrato fisiológico (Mutero et al. 1994; Menozzi et al. 2004; Weill et al. 2004).

En las moscas *D. melanogaster* y *Musca domestica* se determinó que las mutaciones que confieren resistencia a OFs y CBs ocurren en *ace-2* (Mutero et al. 1994; Walsh et al. 2001). Por otro lado, la resistencia a anticolinesterásicos en *C. pomonella*, el mosquito *Culex pipiens*, la polilla *Plutella xylostella* y el pulgón *Myzus persicae* se asoció a *ace-1* (Weill et al. 2002; Nabeshima et al. 2004; Baek et al. 2005; Cassanelli et al. 2006). Estos resultados indican que *ace-1* y *ace-2* cumplen la misma función fisiológica en las sinapsis colinérgicas, al menos en los dípteros (Weill et al. 2002).



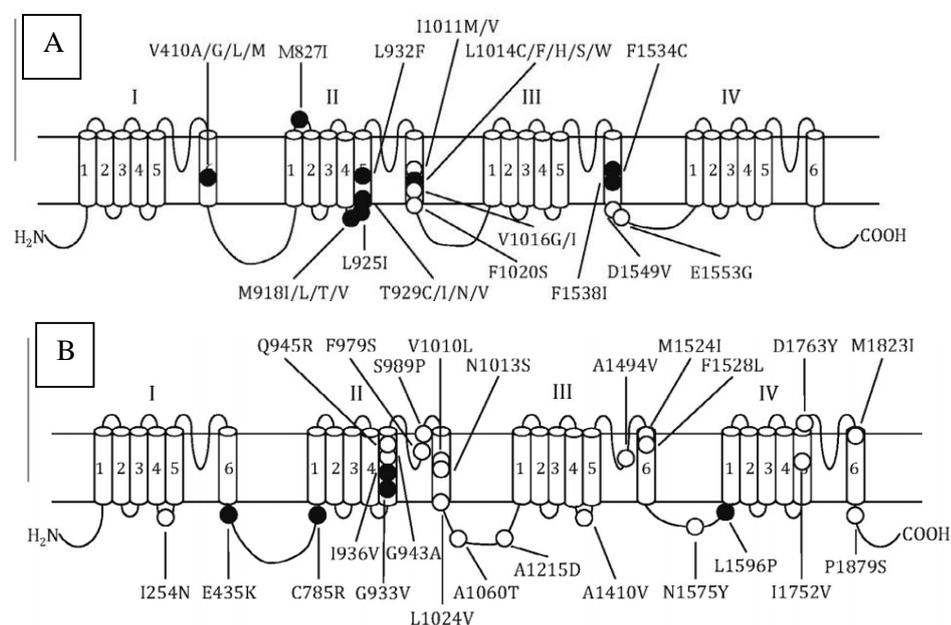
**Figura 10: Alteraciones en el sitio activo de la enzima AChE.** (A) Hidrólisis de acetilcolina (ACh), el sustrato fisiológico, por la enzima AChE. (B) Inhibición de AChE por un OF, resultando en la acumulación de ACh en el espacio sináptico. (C) Disminución de la afinidad de la AChE modificada en su sitio activo por el OF sin originar cambios en la capacidad hidrolítica de ACh. Extraído de Soleño (2011).

También se observaron casos de resistencia a OFs debida a un mayor título de AChE, que compensaría la pérdida de moléculas inhibidas por los insecticidas (Charpentier & Fournier 2001). El mayor título de AChE se relacionó con un aumento de ARNm, atribuido a un aumento en la transcripción del gen *ace* o a una mayor estabilidad del ARNm (Gao & Zhu 2002).

#### 1.4.1.2. Canal de sodio dependiente de voltaje

Uno de los principales mecanismos de resistencia a DDT y piretroides es la resistencia al volteo (*knockdown resistance* o *kdr*), ocasionada por una o más mutaciones en el sitio de

acción de estos insecticidas, el canal de sodio dependiente de voltaje (Kushwah et al. 2015). La resistencia por *kdr* se documentó inicialmente para la mosca doméstica, en la cual se determinó la sustitución de Leu por Phe (L1014F), dentro del segmento IIS6 del canal (Williamson et al. 1993). Una segunda sustitución de Met por Thr (M918T) en el dominio citoplasmático entre los segmentos IIS4 y IIS5 de la proteína, en conjunción con L1014F, conduce a niveles mayores de resistencia a piretroides y se denomina *super-kdr* (Ingles et al. 1996). A la fecha, se han identificado más de treinta mutaciones que confieren este tipo de resistencia, y muchas de ellas han sido determinadas en más de una especie (Figura 11).

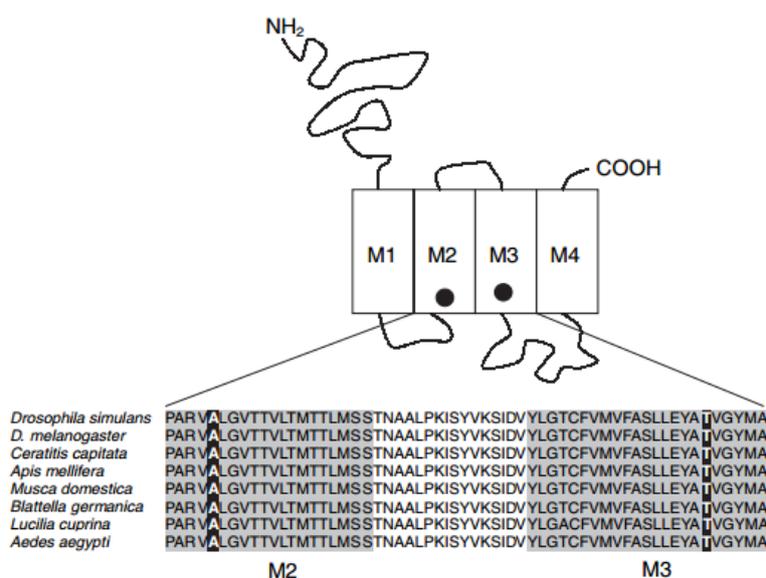


**Figura 11: Posición de las mutaciones en el canal de sodio que ocasionan resistencia a piretroides y DDT determinadas en más de una especie (A) o en una sola especie (B).** La subunidad alfa del canal de sodio es una proteína transmembrana, formada por cuatro dominios (I–IV), cada uno con seis segmentos hidrofóbicos que permanecen dentro de la membrana celular de las neuronas (S1–S6). Extraído de Rinkevich (2013).

La mayoría de las mutaciones funcionalmente confirmadas se encuentran en los segmentos IIS5, IIS6 e IIIS6 (Rinkevich et al. 2013). En *C. pomonella*, la sustitución de un solo aminoácido (L1014F) se relacionó con la insensibilidad del canal de sodio en poblaciones de campo (Franck et al. 2012).

## 1.4.1.3. Receptor GABA

El gen *Rdl* (*resistance to dieldrin*) codifica para el receptor GABA asociado al canal de cloruro, blanco de los insecticidas ciclodienos y fenil pirazoles (Remnant et al. 2013). El gen *Rdl* fue primero caracterizado en *D. melanogaster*, donde se observó el reemplazo de Ala a Ser (A302S) en el dominio M2 del canal (Figura 12) (French-Constant & Rocheleau 1993). Esta sustitución (Ala a Gly) fue subsecuentemente identificada en un amplio rango de insectos resistentes a ciclodienos (Andreev et al. 1999; Bass et al. 2004; Wang et al. 2013). Estudios electrofisiológicos mostraron que el reemplazo de Ala 302 afecta la sensibilidad a ciclodienos mediante dos mecanismos: (a) la mutación debilita la unión con el antagonista (insensibilidad del sitio al tóxico) por un cambio estructural en el sitio activo y, (b) la mutación desestabiliza alostéricamente la unión con el antagonista (Zhang et al. 1994).



**Figura 12: Esquema de las mutaciones en los dominios M2 y M3 de una de las subunidades del receptor GABA.** El receptor GABA consiste de cinco subunidades, cada una de las cuales contiene cuatro dominios transmembrana (M1-M4). En *D. simulans*, Ala 301 y Thr 350 son reemplazados por Gly y Met (resaltado en negro). Extraído de Le Goff et al. (2005).

Esta mutación confiere altos niveles de resistencia a dieldrin y bajos niveles de resistencia a fipronil (Bloomquist 2001), lo cual sugiere que el sitio de unión al receptor GABA o el mecanismo de acción entre estos compuestos podrían ser diferentes. En una cepa de *Drosophila simulans* altamente resistente a fipronil se determinó la presencia de dos mutaciones: A301G y T350M (Le Goff et al. 2005).

### 1.4.2. Mutaciones que aumentan la actividad de enzimas detoxificantes

La resistencia a insecticidas ocasionada por detoxificación puede desarrollarse en las poblaciones de campo en tres maneras diferentes: mutaciones en la región de codificación, mutaciones en secuencias reguladoras de la expresión génica, y amplificación génica (Hemingway et al. 1998).

#### 1.4.2.1. Esterasas

Como componente del sistema de detoxificación de xenobióticos en los insectos, las CarE están frecuentemente implicadas en la resistencia a los OFs, CBs y piretroides por cambios cualitativos o cuantitativos de las enzimas, o una combinación de estos mecanismos (Hemingway et al. 2004). Existen muchos alelos de esterases asociados con la resistencia. En Diptera, Hymenoptera y Lepidoptera se determinaron dos mutaciones puntuales en el gen que codifica para CarE y, en algunos casos, estas mutaciones conducen a un aumento de la capacidad de hidrolizar a los OFs y/o el secuestro (Hotelier et al. 2010; Li et al. 2013). La primera mutación involucra la sustitución, en el sitio activo, de Trp por Leu, Ser o Gly. La segunda mutación sustituye en el sitio activo a Gly por Asp (Newcomb et al. 1997). Aunque el grado de expresión de las fosfotriesterasas nativas en insectos se desconoce, se ha determinado que una enzima homóloga a una fosfotriesterasa de salmón estaría presente en el perfil transcripcional de la polilla, *H. virescens* (Zhu et al. 2011). La sobreexpresión de CarE, como una respuesta evolutiva a la presión de selección de los insecticidas OFs y CBs, se documentó en numerosas especies de artrópodos (Alon et al. 2008; Zhang et al. 2010; Cui et al. 2011). La causa predominante de este incremento en la síntesis de la enzima es la amplificación del gen o genes dentro del genoma (Vaughan & Hemingway 1995). La amplificación génica y la regulación positiva transcripcional de las CarE, solas o combinadas, suelen ser la principal causa de sobreproducción de esta enzima en insectos y ácaros resistentes a OFs y CBs (Vontas et al. 2007; Pan et al. 2009). El primer descubrimiento de amplificación génica fue en *M. persicae*, donde los individuos resistentes presentaban hasta ochenta copias del gen de esterases E4, mientras que los susceptibles poseían una sola (Devonshire & Sawicki 1979). La sobreexpresión de E4 en *M. persicae* se correlacionó con resistencia a varios insecticidas, a través de procesos de hidrólisis o de secuestro, producto de la gran cantidad de enzima presente en cada individuo. También se observó que mediante la metilación de los genes amplificados, algunos clones perdían el fenotipo resistente (Field et al. 1989). En el mosquito *Culex*

*quinquefasciatus* el genotipo más común es la co-amplificación de dos genes de esterasas ( $\text{est}\alpha 2$  y  $\text{est}\beta 2$ ) en un amplicón de aproximadamente 28 Kpb, que se reitera hasta ochenta veces en los individuos altamente resistentes (Paton et al. 2000). También se reportó resistencia a OFs y CBs debido a la sobreproducción de CarE en *C. pipiens* y *A. aegypti* (Guillemaud et al. 1997; Poupardin et al. 2014).

#### 1.4.2.2. GST

Una elevada actividad de una o más GST fue asociada en insectos con resistencia a OFs en *M. domestica* (Wei et al. 2001), a DDT en *D. melanogaster* (Tang & Tu 1994), y a piretroides en la chinche *Nilaparvata lugens* (Vontas et al. 2001). La detoxificación por GST es el principal mecanismo de resistencia a DDT en mosquitos (Hemingway & Ranson 2000). El mecanismo molecular responsable por la elevada actividad GST en mosquitos se relacionó con cambios de regulación que aumentan los niveles de transcripción. Tanto mutaciones en elementos reguladores en *cis* como en *trans* pueden conducir a la sobreexpresión de GST en *A. aegypti* (Grant & Hammock 1992) y *Anopheles gambiae* resistentes a DDT (Ranson et al. 2001). Por otro lado, la mayor actividad GST en *D. melanogaster* se debió a una mayor estabilidad del ARNm (Tang & Tu 1995); mientras que la amplificación génica se observó en *M. domestica* (Wang et al. 1991) y *N. lugens* (Vontas et al. 2002). En *C. pomonella*, se asoció una mayor actividad GST con resistencia a OFs (Fuentes-Contreras et al. 2007; Rodríguez et al. 2010; Reyes et al. 2015) y piretroides (Bouvier et al. 2002). Además, los niveles de expresión de CpGSTd1 parecen estar regulados positivamente luego de la exposición a metil clorpirifós y lambdacialotrina (Liu et al. 2014).

#### 1.4.2.3. CYP450

El aumento de la actividad CYP450 es el resultado de la sobreexpresión transcripcional constitutiva y, la misma es vinculada al desarrollo de resistencia a numerosos insecticidas, entre ellos DDT (Mitchell et al. 2012), piretroides (Ishak et al. 2016); NNs (Karunker et al. 2008), al inhibidor del desarrollo diciclamil (Daborn et al. 2007) y el análogo de la HJ pyriproxifen (Karatolos et al. 2012), entre otros. Este fenómeno, se ha reportado en varios artrópodos como en *M. domestica* (Gao et al. 2012), *C. quinquefasciatus* (Liu et al. 2011), *C. pipiens* (Hardstone et al. 2010), *Drosophila* (Daborn et al. 2007), *A. gambiae* (Mitchell et al. 2012), *Aedes albopictus* (Ishak et al. 2016), *Helicoverpa armigera* (Yang et al. 2006), *Tribolium castaneum* (Zhu et al. 2010), *B. tabaci* (Karunker et al. 2008) y

*Trialeurodes vaporariorum* (Karatolos et al. 2012). Asimismo, la expresión puede ser inducida tanto por compuestos endógenos como exógenos (Tompkins & Wallace 2007). Tanto el aumento constitutivo de la expresión por la inducción de uno o más genes CYP450 son responsables de los mayores niveles de detoxificación enzimática de insecticidas (Poupardin et al. 2010; Liu et al. 2011; Gong et al. 2013). El nivel de inducción de CYP450 varía según la especie, estado fisiológico, poblaciones susceptibles y resistentes (Terriere 1984). Con respecto a *C. pomonella*, se observó que tanto los datos moleculares como los bioquímicos indican que CYP9A61 está fuertemente inducida por la exposición a lambdacialotrina (Yang et al. 2013).

#### **1.4.3. Mutaciones que modifican la cutícula**

Un aumento en el grosor de la cutícula puede conferir resistencia al modificar el ingreso de los insecticidas al organismo, porque una incorporación más lenta del tóxico podría optimizar la eficiencia de su detoxificación metabólica (Lin et al. 2012; Koganemaru et al. 2013). La resistencia a piretroides se asoció a un aumento en el grosor de la cutícula en *Anopheles funestus* (Wood et al. 2010), y a la sobreexpresión de un gen que codifica para una proteína cuticular en *A. albopictus* (Ishak et al. 2016). También se encontró una reducida penetración cuticular en *H. armigera* resistente a piretroides, si bien no se investigó la causa de este fenómeno (Ahmad et al. 2006).

#### **1.4.4. Cambios en el comportamiento**

La resistencia ocasionada por cambios en el comportamiento se refiere a la habilidad de los insectos de alejarse de las áreas tratadas con insecticidas. Este tipo de resistencia, observada *P. xylostella* (Nansen et al. 2016) y en varias especies de mosquitos (Chareonviriyaphap et al. 2013; Ritthison et al. 2014), se clasifica como estímulo dependiente o independiente (Roberts et al. 2000). En el primer caso, los insectos entran en contacto con el insecticida; mientras que en el segundo, los insectos evitan las áreas tratadas. Los insectos simplemente dejan de alimentarse si se encuentran con ciertos insecticidas o salen de la zona tratada. Por ejemplo, pasan a la parte inferior de una hoja pulverizada o vuelan lejos de la zona (Mouchet et al. 2008).

La resistencia a varias clases de insecticidas, incluyendo OCl, OFs, CBs y piretroides, se reportó en diferentes especies (Lockwood et al. 1985; Ross 1992; 1998; Mathenge et al. 2001; Potikasikorn et al. 2005).

## 1.5. LA FRUTICULTURA EN LA REGIÓN DEL VALLE DE RÍO NEGRO Y NEUQUÉN

Argentina produce 1,8 millones de toneladas de frutas pomáceas, distribuidas casi por partes iguales entre manzana y pera. Mientras que el mayor porcentaje de la producción de peras se destina a la exportación, solo se exporta un 25% de las manzanas. El 85% de la producción de manzana y el 75% de pera se concentra en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén, y en el Valle Medio de Río Negro. El resto se genera en el Valle de Uco (Mendoza), 25 de Mayo (La Pampa) y el Valle del Tulum (San Juan), entre otros puntos (Sanchez & Villareal 2010).

En el valle de Río Negro se distinguen tres sectores principales bajo riego. Cada uno de estos posee una actividad productiva principal diferente, siendo el Alto Valle la zona productora de peras y manzanas por excelencia. La actividad frutícola se concentra en cuatro zonas distintas (Figura 13): el Alto Valle, el Valle Medio, General Conesa y Río Colorado (Valle Inferior).

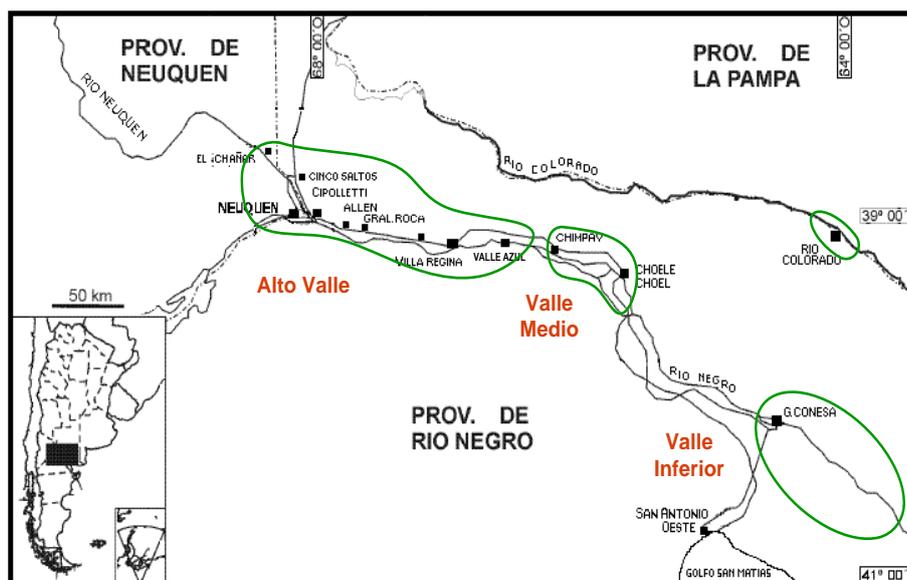


Figura 13: Zonas productoras de frutas de las provincias de Río Negro y Neuquén.

La superficie total con frutales de pepita y carozo es de 50.993 ha, donde el 93% corresponde a manzana y pera. La provincia de Río Negro participa con el 85% del total de superficie implantada en la Región Patagonia Norte, y el 15% restante corresponde a la provincia de Neuquén. El promedio en la producción comercial de peras y manzanas para el período 2008/2012 alcanzó 1.460.000 toneladas (FunBaPa 2012).

Considerando que la fruticultura de la región norpatagónica se desarrolló en un marco fuertemente orientado a la exportación, las estrategias en el control de plagas están

condicionadas por las exigencias de los mercados compradores (Sanchez & Villareal 2010). La carpocapsa o gusano de la manzana, *C. pomonella* (Linneaus) (Lepidoptera; Tortricidae) es la principal plaga de los cultivos de manzanos y perales y constituye el principal problema debido a los niveles de daño que provoca en las frutas (Figura 14).



**Figura 14: Daños internos y externos producidos por la larva de *C. pomonella*.**

Durante la década del ´80 e inicios de los ´90, los piretroides (esfenvalerato, detametrina, lambdacialotrina, entre otros) fueron utilizados en el valle en forma masiva para el control de *C. pomonella*. El uso indiscriminado (de ocho a once pulverizaciones por temporada) provocó diferentes efectos secundarios sobre las plagas y sus enemigos naturales. Como ejemplo, el psílido del peral alcanzó una densidad poblacional muy baja en el Alto Valle, mientras que aumentó la incidencia de arañuelas, especialmente por el efecto negativo sobre sus enemigos naturales. Por otra parte, las numerosas aplicaciones provocaron una disminución de individuos de carpocapsa susceptibles a esta familia de insecticidas, seleccionando progresivamente una mayor cantidad de individuos resistentes (Cichón et al. 2006).

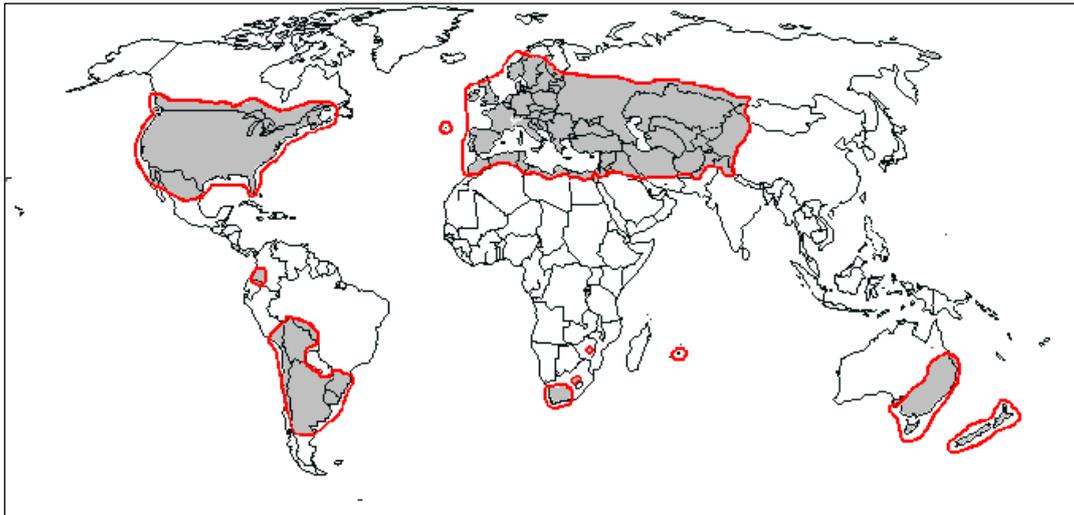
A partir del año 2000, debido a fallas del control con piretroides, se empezaron a usar OFs (metil azinfos, metidatión, fosmet y clorpirifós) y CBs (carbaril). Este esquema dejó de ser sostenible por las restricciones del mercado, su impacto en el medio ambiente (Loewy et al. 2011) y los efectos adversos sobre la salud humana (Rivero Osimani et al. 2016). También comenzaron a implementarse estrategias no convencionales mediante el uso del virus de la granulosis de carpocapsa (CpGV), insecticidas botánicos (riania, rotenona), entre otros.

En el año 2006 se implementó el “Programa Nacional de Supresión de Carpocapsa” que planteó un cambio en el modo de la lucha fitosanitaria mediante la aplicación de la Técnica de Confusión Sexual (TCS), combinado con el control químico, cultural y legal. Entre los insecticidas químicos recomendados por el INTA (Cichón et al. 2013a) se encuentran: I) los OFs clorpirifós, metil azinfós, metidatió, mercaptotió, fosmet; II) los CBs carbaril y metomil III) los NN acetamiprid, tiacloprid; IV) la BFU novalurón; V) el agonista de ecdisoma metoxifenocida; VI) el modulador de los receptores de rianodina clorantraniliprole; VII) el antagonista del receptor nicotínico spinetoram; VIII) el activador de los canales de cloro abamectina y el análogo de la HJ pyriproxifen. Este cambio tecnológico no solo aseguró un mejor control de la plaga por la reducción del nivel de daño a 0,1% luego de la ejecución del proyecto, sino también la sustentabilidad sanitaria, ambiental y comercial (FunBaPa 2012).

Actualmente, a causa de las restricciones crecientes de Estados Unidos y la Comunidad Europea en cuanto a los residuos de plaguicidas en las frutas, los OFs y NNs se limitaron a una sola aplicación para el control de carpocapsa al inicio de la temporada productiva (Cichón, comunicación personal).

### **1.5.1. Biología de *C. pomonella***

La carpocapsa es una especie nativa del sudeste europeo, con una amplia distribución mundial acompañando al manzano (*Malus domestica*), su hospedero más importante (Sheldeshova 1967) (Figura 15). Su distribución geográfica está relacionada tanto a factores climáticos como a la disponibilidad de alimento. Probablemente, esta plaga se haya dispersado entre los diferentes países y continentes a través del transporte de fruta, materiales de empaque o importación de partes vegetales contaminados.

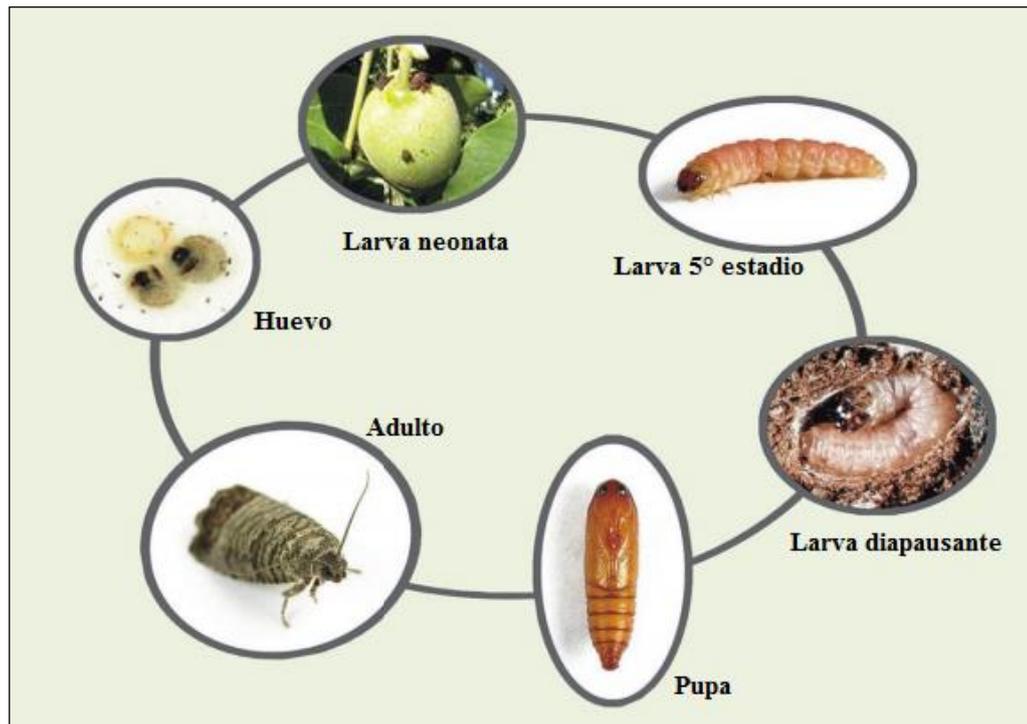


**Figura 15: Distribución geográfica de *C. pomonella*.** Extraído de Codling Moth Information Support System (1997).

La carpocapsa se ha adaptado exitosamente a las condiciones agro-ecológicas imperantes en varias regiones de Argentina, particularmente en la zona productora del Alto Valle del Río Negro y Neuquén. En esta región, las temperaturas son propicias para el desarrollo de al menos tres generaciones, lo que determina la necesidad de efectuar las actividades de control en forma precisa a fin de evitar porcentajes de daño que comprometan la producción (Cichón & Fernández 1993).

#### ➤ **Ciclo de vida de la carpocapsa**

Como es propio del orden Lepidoptera, la carpocapsa cumple una metamorfosis completa a lo largo de su ciclo de vida. Esto significa que atraviesa cuatro etapas diferentes de desarrollo en los que las formas juveniles poseen una apariencia muy diferente a la del adulto. Los cuatro estadios son: huevo, larva, pupa y adulto (Figura 16). La hembra adulta deposita entre 50 y 80 huevos sobre la superficie de las hojas o frutos, los cuales tardan de 5 a 12 días en emerger como larva neonata (primer estadio). Este es el momento crucial en el que se deben tomar las medidas apropiadas para combatir la plaga y evitar que ingrese al fruto ocasionando daños irreversibles. Una vez que la larva penetra en el fruto, completa su desarrollo larvario alimentándose de las semillas. Después de 25-40 días, en el quinto y último estadio larvario, la larva abandona el fruto (INTA 2006). En los siguientes estadios de pupa y adulto, carpocapsa no produce daños (Metcalf & Flint 1965).



**Figura 16: Ciclo biológico de *C. pomonella* (no a escala).**

Cada uno de estos ciclos se denomina “generación” y se completa entre 49 y 59 días aproximadamente, de acuerdo a las condiciones de temperatura. En la República Argentina, este ciclo se repite entre tres y cuatro veces entre octubre y febrero. Generalmente, las larvas de la última generación se refugian en las cortezas de los árboles, ramas y frutos caídos para pasar el invierno en estado de diapausa (Figura 17). Sin embargo, larvas de generaciones intermedias también pueden entrar en diapausa. Ésta se induce por las bajas temperaturas y la disminución de las horas de luz, y se caracteriza por presentar niveles metabólicos extremadamente bajos (Brown 1991). Al aumentar la temperatura y las horas de luz en la primavera, las larvas finalizan el período de diapausa y dentro de su capullo se transforman en pupa para emerger luego como adultos y reiniciar el ciclo.



**Figura 17: Tronco de manzano con larvas diapausantes de carpocapsa.**

### **1.5.2. Situación regional de la resistencia a insecticidas en *C. pomonella***

Durante la década del 90, el uso masivo de piretroides condujo a la aparición de resistencia a estos insecticidas en poblaciones de *C. pomonella* del Alto Valle de Río Negro y Neuquén. (Soleño 2009).

Larvas diapausantes recolectadas entre 2003 y 2005 en chacras de la región con historial de control químico mostraron menor susceptibilidad al tratamiento con una dosis discriminante<sup>2</sup> de metil azinfós, en comparación con larvas de una cepa susceptible de laboratorio (CSL) (Soleño et al. 2008). En dicho estudio, las poblaciones con mayor tolerancia al OF mostró una correlación positiva con la actividad esterasas y una débil correlación con la actividad GST.

Durante el año 2006, se evaluó la relación dosis-respuesta de numerosas poblaciones de carpocapsa procedentes de localidades situadas en un amplio rango geográfico de la región del Valle de Río Negro y Neuquén (Soleño et al 2012). El 70% de las poblaciones mostraron grado de resistencia<sup>3</sup> (GR) superiores a dos, con un GR máximo de 11. La mayoría de las poblaciones con los menores niveles de resistencia fueron colectadas en chacras localizadas en los extremos geográficos del valle productivo (El Chañar, Conesa y

---

<sup>2</sup> Dosis discriminante: dosis de insecticida que en un bioensayo mata a todos o casi todos los individuos susceptibles y pocos o ningún individuo resistente (Tabashnik et al.2014).

<sup>3</sup> Grado de resistencia: índice de magnitud de la resistencia que suele ser calculado como la CL<sub>50</sub> de la población resistente dividida por la CL<sub>50</sub> de una población susceptible (Tabashnik et al.2014).

Río Colorado). Tanto las CarE como el CYP450 fueron significativa y positivamente correlacionados con las CL<sub>50</sub>.

En 2010 se realizaron ensayos de toxicidad con concentraciones discriminantes de metil azinfós (2 mg/L), acetamiprid (0,7 mg/L) y tiacloprid (1 mg/L) en neonatas provenientes de diferentes montes frutales (Cichón et al 2013b). La mayoría de las poblaciones evaluadas mostró bajos porcentajes de mortalidad tanto al OF como a los dos NNs. También se determinó una correlación positiva significativa entre las mortalidades producidas por tiacloprid y metil azinfós. Más del 70% de las poblaciones de campo presentaron actividad CYP450 significativamente mayores (1,4-4,6 veces) que CSL.

## *Hipótesis y Objetivos*

---

## 2. HIPÓTESIS

- Poblaciones naturales de *C. pomonella* del Alto Valle de Río Negro y Neuquén han desarrollado resistencia a los insecticidas usados para su control.
- La resistencia a insecticidas en *C. pomonella* se debe a un aumento en la actividad basal de enzimas detoxificantes, a modificaciones en los sitios de acción o a ambas.
- Poblaciones de campo de *C. pomonella*, continuamente expuestas a plaguicidas y aleloquímicos, presentan niveles basales de los componentes antioxidantes mayores que los de una cepa susceptible de laboratorio.
- Los insecticidas clorpirifós y acetamiprid producen efectos subletales que modifican las actividades de enzimas detoxificantes de insecticidas y componentes antioxidantes.

## 3. OBJETIVOS

### Objetivo general

Aportar información sobre los mecanismos de defensa en poblaciones de campo de *C. pomonella* que pueda resultar útil para alcanzar un control más eficiente de la plaga.

### Objetivos específicos

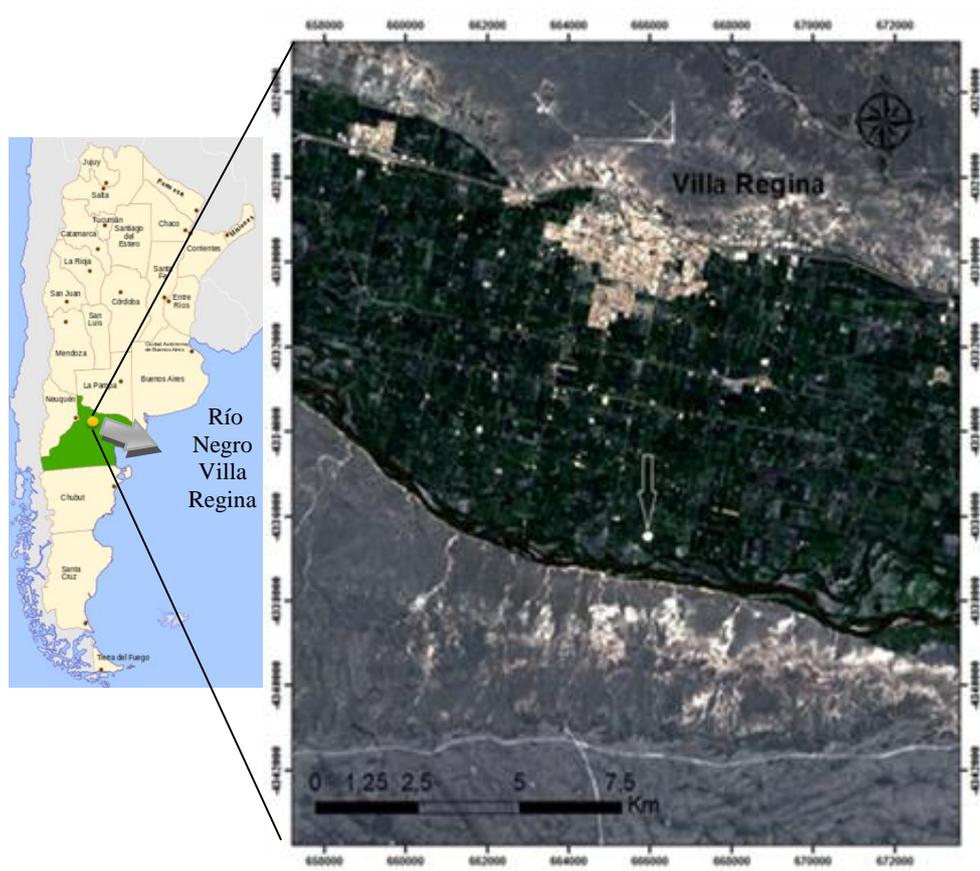
1. Determinar el estado de la resistencia a clorpirifós y acetamiprid en adultos de *C. pomonella* provenientes de poblaciones de campo.
2. Determinar la actividad y sensibilidad de AChE a propoxur.
3. Determinar los niveles basales de las actividades de enzimas metabolizantes (CarE, CYP450 y GST) y de componentes del sistema antioxidante (actividades CAT, SOD y contenido de GSH).
4. Evaluar los efectos subletales de los insecticidas clorpirifós y acetamiprid sobre las actividades de las enzimas detoxificantes de insecticidas y los componentes del sistema antioxidante mencionados en el objetivo anterior.

## *Materiales y Métodos*

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

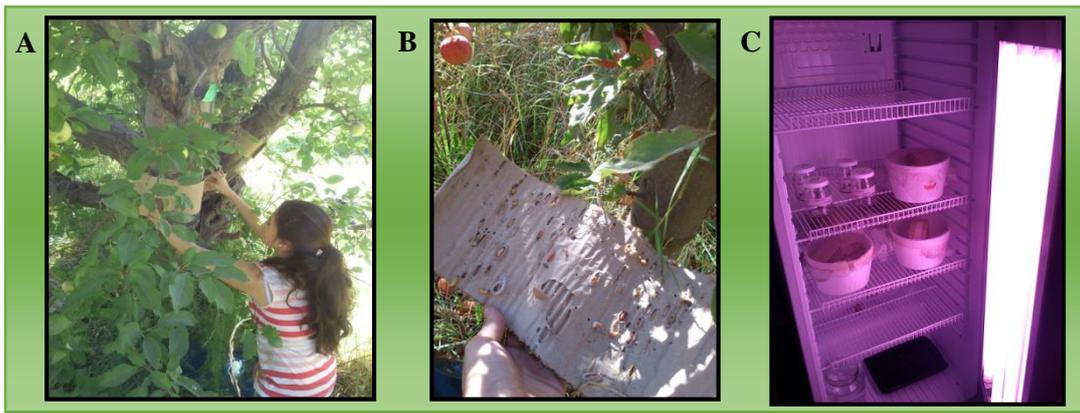
### 4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Se trabajó con adultos de la especie *C. pomonella*. Los individuos de una cepa susceptible a insecticidas usada como referencia (CSL) fueron provistos por el insectario del INTA Alto Valle. Esta cepa fue establecida en junio de 1991, a partir de 7.000-8.000 larvas diapausantes recolectadas en una chacra de manzanos abandonada. Desde entonces, la cría se mantuvo en condiciones controladas de temperatura (25 °C), fotoperíodo (16:8 h L:O) y 70% de humedad relativa, siempre en ausencia de plaguicidas. Ocasionalmente se introducen en la cría individuos provenientes de montes frutales abandonados u orgánicos para disminuir la endogamia. Las dos poblaciones de campo PC1 y PC2 usadas en el presente trabajo se recolectaron en montes frutales ubicados en la localidad de Villa Regina (Río Negro) (39° 09' 41" S, 67° 04' 45" O y 39° 7' 41" S 67° 6' 37" O (Figura 18).



**Figura 18:** Imagen satelital de la localidad de Villa Regina (Río Negro, Argentina). La flecha indica el sitio de recolección de los individuos de *C. pomonella* (PC1 y PC2) utilizadas en esta tesis. 80 × 92 mm (300 x 300 ppp).

Las larvas diapausantes se recolectaron en fajas de cartón corrugado colocadas en los troncos y ramas de árboles frutales durante los meses de diciembre y enero. Las larvas fueron transferidas a fajas de papel corrugado, el cual se colocó en una caja de telgopor y se almacenó a 4 °C durante tres meses. Para la emergencia de adultos, las larvas fueron colocadas en una cámara cría (25 °C, un fotoperíodo de 16:8 h L:O y 70% de humedad relativa ) (Figura 19).



**Figura 19:** A) Colocación de fajas de cartón corrugado en árboles frutales. B) Obtención de larvas de *C. pomonella*. C) Cámara climatizada para permitir el desarrollo de los adultos.

## 4.2. REACTIVOS Y BUFFERES

### 4.2.1. Reactivos

El OF clorpirifós (99,08% de pureza) y el NN acetamiprid (99,90% de pureza) se obtuvieron de AccuStandard Inc., (New Haven, CT, USA). Glutación reducido (GSH), epinefrina, 7-etoxicumarina (7-EC), 7-hidroxicoumarina (7-OHC), 1-cloro-2,4-dinitro benceno (CDNB),  $\alpha$ -naftil acetato ( $\alpha$ -NA),  $\alpha$ -naftol ( $\alpha$ -N), Fast Garnet GBC, Tritón X-100, ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), tetrametil etilén diamina (TEMED), yoduro de acetil tiocolina (IATCh), dibromuro de 1,5-bis(4-allildimetilamoniofenil)pentano-3-1 (BW284C5), tetraisopropil pirofosforamida (ISO-OMPA), trifenil fosfato (TPP), propoxur, glicina y albúmina de suero bovina fueron comprados a Sigma-Aldrich, Argentina S.A. (Buenos Aires). La solución Folin Ciocalteu, los ácidos etilén diamino tetra-acético (EDTA), tricloro acético (TCA), tiobarbitúrico y el peróxido de hidrógeno fueron provistos por Anedra, Argentina (Buenos Aires).

#### 4.2.2. Bufferes

- A) Buffer de fosfato de sodio (100 mM), con Tritón X-100 0,5%; pH = 7,5.
- B) Buffer de fosfato de potasio (143 mM), EDTA 6,3 mM; pH 7,5.
- C) Buffer de fosfato de sodio (0,1 M); pH 6,5.
- D) Buffer de muestra Tris HCl 0,5 M; pH 6,8.
- E) Buffer de muestra Tris HCl 0,5 M, glicerol y de azul de bromofenol al 1%; pH 6,8.
- F) Buffer de Tris HCl (0,025 M) y glicina (192 mM); pH 8,8.
- G) Buffer de fosfato de sodio (0,05 M), con Fast Garnet GBC (0,5 g) y  $\alpha$ - y  $\beta$ -naftil acetato 2% en acetona (2 mL).
- H) Buffer de fosfato de sodio (50 mM); pH 7,2.
- I) Buffer de fosfato de sodio (50 mM), con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 25 mM (como sustrato); pH 7,0.
- J) Buffer de glicina (50 mM); pH 10,2.

#### 4.3. ENSAYOS DE TOXICIDAD

Se prepararon dos soluciones madre de clorpirifós (500 mg/L) y acetamiprid (200 mg/L) en acetona. A partir de estas soluciones se realizaron diluciones seriadas para la exposición de los adultos de *C. pomonella*. Se aplicó de manera uniforme un mL de cada solución sobre la superficie interna de un vaso de cristal (212 mL), incluida la tapa. La aplicación del insecticida en las paredes del vial se realizó de forma manual. El mililitro de solución insecticida se depositó dentro del vial. Luego se cerró el vial con la correspondiente tapa, se lo colocó de forma horizontal y se lo hizo rotar unos minutos para lograr una cobertura uniforme. Posteriormente se lo dejó secar durante 1 h a temperatura ambiente para permitir la evaporación completa del solvente (Knight 2010a). Los grupos control se colocaron en vasos de cristal tratados únicamente con 1 mL de acetona. En cada vaso se colocaron diez adultos, de ambos sexos, de 1-2 días de edad. La exposición duró 24 h y se realizó a 25 °C y fotoperíodo de 16:8 h L:O. Se utilizaron al menos cuatro concentraciones de cada insecticida por bioensayo. Una vez finalizado el ensayo, se registró la mortalidad. Se consideraron muertos los individuos incapaces de volar al momento de la observación. Se realizaron al menos tres réplicas independientes de cada tratamiento para cada uno de los grupos de insectos estudiados (CSL, PC1 y PC2).

**Tabla 1:** Concentraciones de clorpirifós (mg/L) con sus correspondientes dosis (ng/cm<sup>2</sup>) utilizadas en los bioensayos de adutlos de *C. pomonella*.

Insectos		Clorpirifós							
CSL	Concentración	0,0625	0,25	0,35	0,625	1	1,5	2	3
	Dosis	0,42	1,70	2,38	4,25	6,80	10,20	13,60	20,41
PC1	Concentración	0,0625	0,25	0,625	1	1,5	2	3	3,9
	Dosis	0,42	1,7	4,25	6,80	10,20	13,60	20,41	26,53
PC2	Concentración	0,0625	0,25	0,35	0,625	1	2	3	-
	Dosis	0,42	1,70	2,38	4,25	6,80	13,60	20,41	-

**Tabla 2:** Concentraciones de acetamiprid (mg/L) con sus correspondientes dosis (ng/cm<sup>2</sup>) utilizadas en los bioensayos de adultos de *C. pomonella*.

Insectos		Acetamiprid					
CSL	Concentración	0,195	0,39	0,78	1,56	3,12	6,25
	Dosis	1,33	2,65	5,30	10,61	21,22	42,51
PC1	Concentración	0,78	1,56	3,12	6,25	12,5	25
	Dosis	5,30	10,61	21,22	42,51	85,03	170,06

#### 4.3.1. Exposición a concentraciones subletales de clorpirifós y acetamiprid

La exposición a concentraciones subletales se realizó de igual manera que los bioensayos. Se aplicaron ocho concentraciones de clorpirifós disuelto en acetona: 0,0625; 0,25; 1; 3,9; 15,62; 62,5; 250 y 500 mg/L. Esta última es la máxima concentración de ingrediente activo recomendada a campo para el control de *C. pomonella* (corresponde a 1,2 kg de ia/ha). La exposición de individuos a la menor concentración tuvo como objetivo lograr una inhibición de AChE menor del 50%.

Las concentraciones aplicadas de acetamiprid fueron 6,25; 25; 50; 100 y 200 mg/L. La concentración de este ingrediente activo utilizado a campo es 35 mg/L, pero se trabajó con concentraciones mayores porque la exposición a esta última no produjo síntomas visibles de intoxicación en los insectos.

#### 4.4. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS

En los estudios bioquímicos se usaron individuos no tratados (controles) y expuestos que sobrevivieron a los tratamientos con clorpirifós y acetamiprid (incluidos los que presentaban síntomas de intoxicación). Los individuos sobrevivientes de cada concentración fueron suficiente para realizar al menos cuatro repeticiones de 4 individuos cada una. Cada grupo de cuatro individuos fue almacenado en freezer, dentro de un tubo Eppendorf. La Figura 20 ilustra el procesamiento del material biológico.



Figura 20: Esquema general del procesamiento del material biológico.

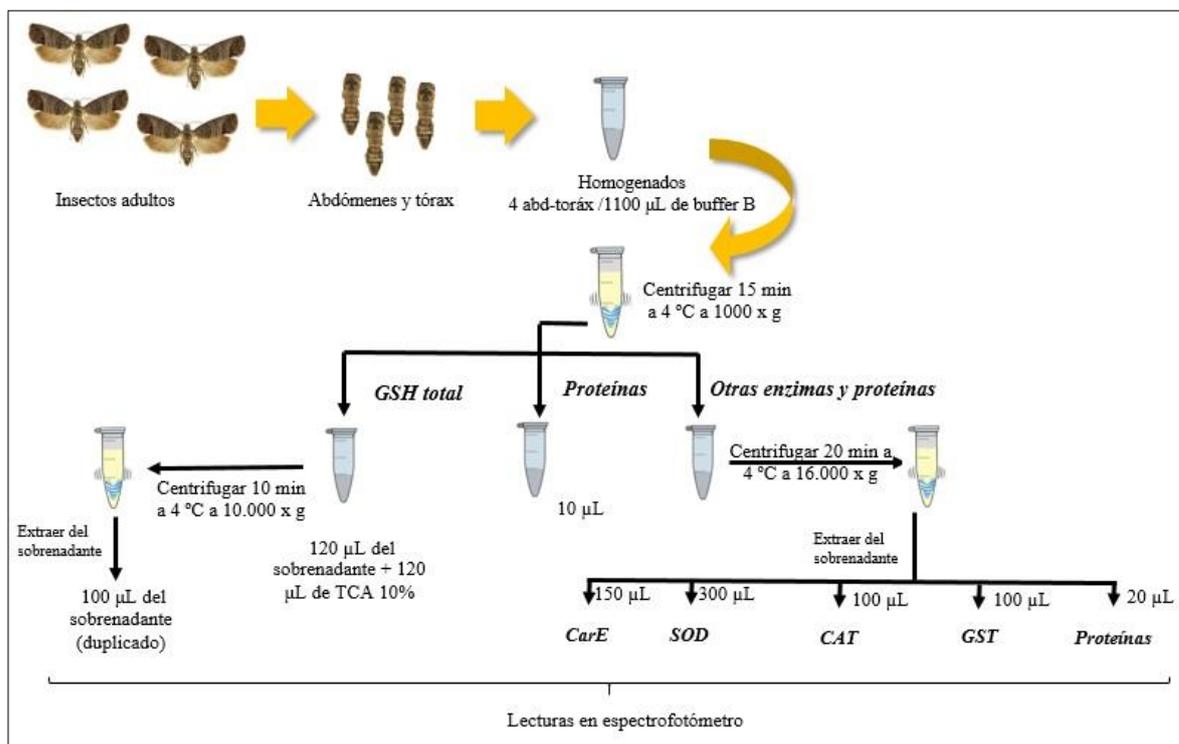
##### 4.4.1. Preparación de homogenatos

###### 4.4.1.1. Homogenatos para medición de la actividad AChE

Para el estudio de la inhibición *in vitro* de la enzima AChE con el CB propoxur, las cabezas fueron homogenizadas individualmente en 1200  $\mu\text{L}$  del buffer (A), usando un homogeneizador PRO eléctrica 200. Por otro lado, se realizaron 4-5 homogenatos de cuatro cabezas cada uno en 1100  $\mu\text{L}$  de buffer (A) para la determinación de la actividad remanente de AChE en adultos expuestos a clorpirifós (estudio *in vivo*). En ambos estudios, los homogenatos se centrifugaron a 5.204 x g durante 10 min a 4 °C.

#### 4.4.1.2. Homogenatos para determinar las actividades, CarE GST CAT SOD y contenido de GSH.

Los tórax y abdómenes fueron homogeneizados en el buffer (B) con un homogeneizador PRO eléctrica 200 (Figura 21). Los homogenatos se centrifugaron a 1000 x g durante 15 min a 4 °C. De cada sobrenadante se separaron alícuotas de 120 y 10 µL para cuantificar los contenidos de GSH y proteínas, respectivamente. El volumen restante de cada homogenato se centrifugó a 16.000 x g durante 20 min a 4 °C y los sobrenadantes resultantes se distribuyeron en alícuotas para la determinación de las actividades GST (100 µL), CAT (100 µL), SOD (300 µL), CarE (150 µL) y para la determinación del contenido de proteínas (20 µL). El contenido de GSH se determinó de inmediato, mientras que la fuente de las actividades enzimáticas y el homogenato para la determinación del contenido de proteína se congelaron a -80 °C hasta el momento de las pruebas bioquímicas.



**Figura 21: Esquema del diseño experimental para las mediciones enzimáticas y contenido de GSH.**

#### **4.4.2. Determinación de parámetros bioquímicos**

##### 4.4.2.1. Inhibición de AChE por propoxur

La inhibición de AChE por propoxur fue evaluada a través de la actividad enzimática residual en presencia de este insecticida (French-Constant & Bonning 1989). Las muestras procesadas (ver 4.4.1.1.) se mantuvieron siempre en hielo. Se añadieron 100  $\mu$ L buffer (A) en cada uno de los pocillos externos de la placa de microtitulación. A partir de la segunda columna, se colocaron 100  $\mu$ L del sobrenadante de cada muestra en tres pocillos consecutivos. Al primero se le agregaron 5  $\mu$ L de etanol (control); al segundo, 5  $\mu$ L de propoxur (2mM); y al tercero, 5  $\mu$ L de BW284C5 (0,08 mM). Después de 10 min, se adicionaron con pipeta múltiple 100  $\mu$ L de la solución de desarrollo a todos los pocillos. Esta solución contenía 9,4 mL agua destilada, 80  $\mu$ L de IATCh y 400  $\mu$ L de DTNB. Las concentraciones finales de estos últimos fueron 1 mM y 0,24 mM, respectivamente. Las absorbancias se registraron en un espectrofotómetro Microplate Reader a 405 nm y 25 °C a 0, 15 y 30 min a partir de la colocación de la solución de desarrollo.

Por otro lado, se determinó la concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) de la AChE por propoxur. El rango de concentraciones estudiadas fue entre  $6,09 \times 10^{-6}$  y  $2,43 \times 10^{-4}$ .

La actividad AChE (expresada en  $\mu$ moles de IATCh hidrolizado/min x mg de proteína) fue calculada a partir del coeficiente de extinción molar  $13,6 \times 10^{-3}$  mol/L x cm.

##### 4.4.2.2. Actividad AChE en adultos expuestos a concentraciones subletales de clorpirifós

La actividad remanente de AChE (ver 2.4.1.1) se midió en el sobrenadante de los homogenatos de cabeza mediante el método de Ellman (Ellman et al. 1961). Las absorbancias se registraron en un espectrofotómetro SHIMAZU UV-visible a 405 nm y 25 °C. Las lecturas se realizaron a 0, 15 y 30 minutos a partir de la colocación de la solución de desarrollo.

##### 4.4.2.3. Actividad carboxilesterasa (CarE)

La actividad CarE, evaluada solo para individuos no tratados y tratados con clorpirifós, se determinó según el procedimiento descrito por Dary (Dary et al. 1990). Este método se basa en la hidrólisis de  $\alpha$ -naftil acetato por la enzima presente en el homogenato, en presencia de Tritón X-100 y un inhibidor específico de AChE (BW284C5). El  $\alpha$ -naftol,

producto de la hidrólisis, fue determinado colorimétricamente mediante su reacción con Fast Garnet GBC.

Se tomaron alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  de cada homogenato, y se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  del buffer (C). Luego se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de una solución que contenía dicho buffer,  $\alpha$ -naftil acetato y BW284C5 en concentraciones finales de 2 mM y 0,002 mM, respectivamente. Luego de la incubación durante 15 minutos a 25 °C se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de Fast Garnet en agua destilada, en una concentración final de 1 mM. A los 10 minutos se registraron los valores de absorbancia a 550 nm en un lector de microtitulación. Las lecturas de absorbancia del blanco (50  $\mu\text{L}$  de buffer en lugar de la muestra) fueron restadas a los valores de las muestras. La actividad ( $\mu\text{moles de } \alpha\text{-naftol hidrolizado/ minuto} \times \text{mg de proteína}$ ) fue determinada mediante una curva estándar de  $\alpha$ -naftol (2-20 nmoles).

#### 4.4.2.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) para la caracterización cualitativa de esterasas.

La separación electroforética de las proteínas se realizó en geles no desnaturizantes de poliacrilamida de acuerdo con la técnica de Davis (1964), utilizando un equipo Mini PROTEAN® para geles verticales de 1,5 mm de espesor. La composición del gel de separación al 7% fue: 2,3 mL de acrilamida/bisacrilamida al 3% p/v, 2,5 mL de Tris HCl 1,5 M (pH 8,8), 200  $\mu\text{l}$  de persulfato de amonio al 10% y 5  $\mu\text{l}$  de TEMED. La composición del gel de concentración al 4% fue: 0,65 mL de acril/bisacrilamida al 3% p/v, 1,25 mL de Buffer (D), 5  $\mu\text{L}$  de persulfato de amonio al 10% y 5  $\mu\text{L}$  de TEMED.

La muestra se preparó en un tubo eppendorf, el cual contenía un volumen suficiente de homogenato para una concentración final de 60  $\mu\text{g}$  de proteína, e igual volumen del buffer (E).

En cada calle del gel se sembraron 20  $\mu\text{l}$  de muestra, previa colocación del buffer de electrodos (F), y se aplicó una corriente 75 V durante 15 minutos para permitir el ingreso en el gel de separación; entonces se aplicaron 150 V durante 60 minutos. A continuación, los geles fueron incubados por unos minutos con 100 ml de buffer (G). Luego se descartó la solución de sustratos y colorante, se lavó cada gel dos veces con agua corriente y se lo conservó en ácido acético.

#### 4.4.2.4. Actividad CYP450 en adultos expuestos a concentraciones subletales de clorpirifós y acetamiprid

La actividad CYP450 se determinó, inmediatamente luego de la exposición de adultos, por fluorimetría a través de la medición de la actividad 7-etoxicumarina-O-deetilasa (ECOD) (Bouvier et al. 2002). Se extrajeron las cabezas, patas y alas de los adultos, y cada cuerpo fue cortado en tres partes y colocado en un pocillo de microplaca con 50  $\mu$ L de buffer (H) a temperatura ambiente.

La reacción se inició con el agregado de 50  $\mu$ L de una mezcla de 7-EC en buffer (H) (concentración final: 0,2 mM). Después de 4 h de incubación a 30 °C, se detuvo la reacción con el agregado de 100  $\mu$ L de una mezcla glicina/etanol (pH 10,4) en relación 1:1, hasta una concentración final de glicina de 0,017 mM. Se evaluaron entre 8 y 16 controles para cada población en cada microplaca, los cuales recibieron la mezcla glicina/etanol desde el inicio de la incubación.

Antes de cada medición, las placas fueron centrifugadas durante 1 min a 1.500 x g para precipitar el material biológico. La fluorescencia de las muestras se midió a 380 nm de excitación y 460 nm de emisión en un fluorómetro Wallac 1420 Multilabel Counter. La actividad fue expresada como pg de 7-OHC/adulto x min, utilizando una curva estándar de 7-OHC como referencia en cada placa de medición. Dependiendo del número disponible, se utilizaron entre 76 y 92 adultos de cada población.

#### 4.4.2.5. Actividad glutatión S-transferasa (GST)

La determinación de la actividad GST se basó en la conjugación de GSH y CDNB (Habig et al. 1974). La mezcla de reacción consistió en 930  $\mu$ L del buffer (D), 50  $\mu$ L de GSH, 10  $\mu$ L de CDNB (CDNB 0,5 mM en acetonitrilo) alcanzando una concentración final en la cubeta de medición de 2,5 y 0,5 mM, respectivamente. Luego de registrar la línea de base, se adicionaron 10  $\mu$ L de la fuente enzimática. Durante un minuto se registraron los cambios en la absorbancia a 340 nm. En todos los casos, cada determinación fue realizada por duplicado. La actividad fue expresada como  $\mu$ moles de CDNB conjugado/min x mg proteína, utilizando el coeficiente de extinción molar 9,6 mM/cm.

#### 4.4.2.6. Actividad catalasa (CAT)

La actividad CAT se determinó por espectrofotometría de acuerdo a la técnica de Beers & Sizer (1952), basada en la descomposición de  $H_2O_2$ . La reacción se realizó en 3 mL del buffer (I) con 25 mM de  $H_2O_2$  como sustrato, con una absorbancia de valor inicial de la mezcla de reacción de 1. Para iniciar la reacción se añadieron 10  $\mu$ L del sobrenadante a la mezcla de reacción y se registró en forma continua la caída de absorbancia a 240 nm y 25 °C. Los datos obtenidos fueron transformados a unidades internacionales (UI) utilizando un coeficiente de extinción molar de 40 mM/cm.

#### 4.4.2.7. Actividad superóxido dismutasa (SOD)

La actividad SOD se determinó por su capacidad de inhibir la auto-oxidación de epinefrina a pH alcalino (en una reacción que tiene al anión superóxido como intermediario) (Misra & Fridovich 1972). El volumen de reacción (1 mL) contenía el buffer (J), 60 mM de epinefrina (pH 2,0) y diferentes volúmenes del sobrenadante (10, 20,40 y 60  $\mu$ L). Durante 2 min se midió la absorbancia a 480 nm. Se definió una unidad de actividad SOD como la cantidad de enzima (mg proteína) necesaria para disminuir el 50% de la auto-oxidación de la epinefrina.

#### 4.4.2.8. Contenido de glutatión reducido (GSH)

Se determinó el contenido de GSH por el método de Ellman (1959), utilizando como sustrato DTNB. A 120  $\mu$ L del sobrenadante se le agregaron 120  $\mu$ L de TCA 10% y la mezcla se centrifugó a 10.000 x g durante 10 min a 4 °C. A 100  $\mu$ L de este último sobrenadante se le adicionó 1 mL del reactivo de Ellman, y luego de 5 minutos a temperatura ambiente se midieron las absorbancias a 412 nm. El GSH fue cuantificado a partir de una curva estándar (1- 8 nmoles).

### **4.4.3. Determinación de la cantidad de proteínas**

La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Lowry (Lowry et al. 1951). Se tomaron 15  $\mu$ L de la muestra y se llevó a 200  $\mu$ L con NaOH 0,1 N. Se agregó a cada tubo 1 mL de  $Na_2CO_3$  2% en NaOH 0,1 N con  $CuSO_4$  0,5% y tartrato de sodio y potasio 1%. Se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se añadió 0,1 mL

del reactivo de Folin-Ciocalteu. Luego de 30 minutos se registró la absorbancia a 750 nm. Para obtener la curva estándar se utilizó albúmina bovina.

#### **4.4.4. Análisis estadístico**

Los valores de  $CL_{50}$  y  $CL_{95}$  se calcularon con el programa PriProbit NM (<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=11281>). Se consideró que no había diferencia significativa entre los valores cuyos intervalos de confianza del 95% se superponían.

Los resultados de las determinaciones enzimáticas se sometieron a las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y de Levene para comprobar si reunían las condiciones para realizar el ANOVA (normalidad y homocedasticidad, respectivamente). Los resultados que cumplían estos requisitos fueron analizados con ANOVA de una vía, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Cuando no se cumplieron las condiciones del ANOVA, aun luego de transformar los datos, se usó la prueba no-paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn.

La  $CI_{50}$  de clorpirifós sobre la AChE y CarE se determinó por regresión no lineal (log inhibidor vs respuesta) análisis estadístico GraphPad y se consideró que no había diferencia significativa entre los valores cuyos intervalos de confianza del 95% se superponían.

Por último, las diferencias entre las variables de actividad basal y población (CSL, PC1 y PC2) se analizaron con la prueba de ANOVA simple.

Los análisis se realizaron con los programas estadísticos STATISTICA versión 7 (SattSoft In. 2004) y GraphPad Prism version 4.0 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).

## *Resultados*

## 5. RESULTADOS

### 5.1. TOXICIDAD DE CLORPIRIFÓS Y ACETAMIPRID EN ADULTOS DE *C. POMONELLA*.

#### 5.1.1. Ensayos de toxicidad

La Tabla 3 muestra los valores de  $CL_{50}$  y  $CL_{95}$  para clorpirifós en CSL, PC1 y PC2, y para acetamiprid en CSL y PC1. En ninguno de los ensayos ocurrió mortalidad en los grupos controles, de modo que no fue necesario realizar la corrección de Abbott. En todos los experimentos, la relación concentración-respuesta se ajustó al modelo probit ( $p \geq 0,05$ ).

La toxicidad de clorpirifós en PC1 y PC2 no difirió significativamente de la toxicidad en la cepa susceptible CSL ( $p > 0,05$ ). Tampoco se evidenciaron diferencias significativas entre las pendientes de las rectas de las poblaciones de campo y CSL (Prueba  $\chi^2$  de paralelismo; CSL vs PC1:  $\chi^2 = 3,45$ ,  $gl = 1$ ,  $p = 0,063$ ; CSL vs PC2:  $\chi^2 = 1,96$ ,  $gl = 1$ ,  $p = 0,16$ ). Sin embargo, la  $CL_{50}$  en PC2 fue significativamente mayor que la determinada en PC1 ( $p < 0,05$ ) al igual que el valor de la pendiente (Prueba  $\chi^2$  de paralelismo; PC1 vs PC2:  $\chi^2 = 13,05$ ,  $gl = 1$ ,  $p = 0,00030$ ).

No se observaron diferencias significativas entre los valores de  $CL_{50}$  de acetamiprid en CSL y PC1 ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, la  $CL_{95}$  en PC1 fue casi seis veces mayor que la  $CL_{95}$  en CSL y la diferencia fue significativa ( $p < 0,05$ ). Las pendientes de las relaciones concentración-respuesta de acetamiprid entre CSL y PC1 fueron significativamente diferentes (Prueba  $\chi^2$  de paralelismo; CSL vs PC1:  $\chi^2 = 6,62$ ,  $gl = 1$ ,  $p = 0,010$ ).

**Tabla 3:** Toxicidad de clorpirifós y acetamiprid en adultos de *C. pomonella*.

Insecticida	Insectos	N	$CL_{50}$ (LC 95%) (mg/L)	$CL_{95}$ (LC 95%) (mg/L)	p	Pendiente ± EE
Clorpirifós	CSL	217	0,65 (0,35-1,00)a	3,85 (1,97-31,49)a	0,05	2,12 ± 0,46ab
	PC1	321	0,36 (0,24 - 0,48)a	4,80 (3,10 - 9,42)a	0,33	1,42 ± 0,18a
	PC2	350	0,66 (0,57 - 0,78)a	2,65 (1,97 - 4,16)a	0,44	2,75 ± 0,31b
Acetamiprid	CSL	201	0,90 (0,72-1,15)a	4,72 (3,04-9,89)a	0,90	2,29 ± 0,31a
	PC1	306	1,49 (0,82-2,15)a	29,00 (14,5-141)b	0,75	1,26 ± 0,25b

Para cada insecticida, letras distintas dentro de cada columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

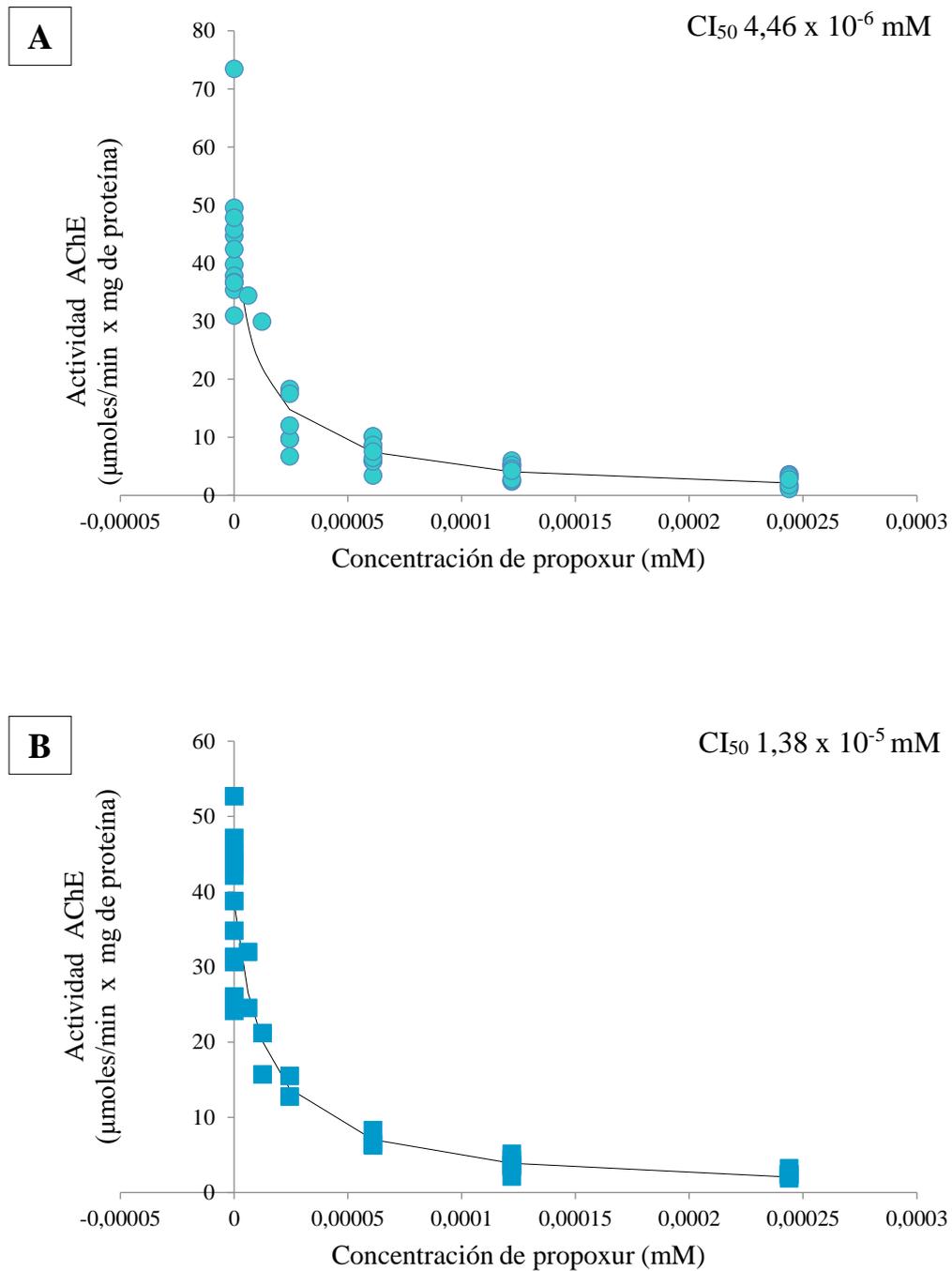
## 5.2. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LA ACHE A PROPOXUR

Se determinó la actividad AChE en ausencia y presencia de propoxur en CSL y en PC1 (Tabla 4). La actividad AChE en ausencia de inhibidor en CSL y PC1 fue 0,037 y 0,043  $\mu$ moles de IACH hidrolizada/minuto x mg de proteína, respectivamente. La diferencia entre estos dos valores no fue significativa (Prueba de Student;  $t = 1,20$ ,  $p = 0,23$ ). Cuando las muestras se incubaron con una concentración final de propoxur de 0,05 mM, la inhibición fue ligera pero significativamente mayor en CSL que en PC1 (Prueba de Student;  $t = 2,03$ ,  $p = 0,049$ ).

**Tabla 4:** Actividad específica AChE y actividad residual en presencia de propoxur de la CSL y PC1 de adultos *C. pomonella*. En una misma columna, los valores seguidos por las mismas letras no presentan diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

Insectos	N	Actividad sin propoxur $\pm$ EE ( $\mu$ moles de IACH hidrolizada/min x mg de proteína)	Actividad con propoxur $\pm$ EE ( $\mu$ moles de IACH hidrolizada/min x mg de proteína)
CSL	44	0,037 $\pm$ 0,0037a	0,0090 $\pm$ 0,0011a
PC1	78	0,043 $\pm$ 0,0030a	0,012 $\pm$ 0,0089b

Al realizar incubaciones con distintas concentraciones de propoxur, se comprobó que la inhibición aumentaba al aumentar la concentración del insecticida (Figura 22A y B). Los valores de  $CI_{50}$  fueron  $4,46 \times 10^{-6} \pm 3,78 \times 10^{-6}$  y  $1,38 \times 10^{-5} \pm 1,96 \times 10^{-5}$  mM para la CSL y PC1, respectivamente.

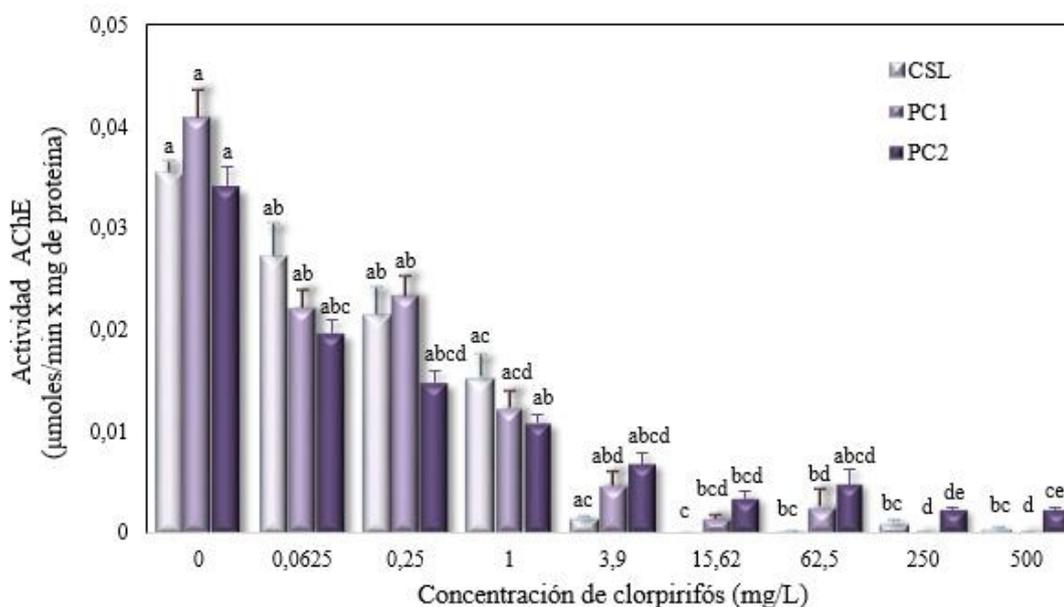


**Figura 22: Actividad AChE en homogenatos de cabezas de CSL (A) y PC1 (B) incubados con distintas concentraciones de propoxur.**

### 5.3. EFECTOS SUBLETALES DE CLORPIRIFÓS Y ACETAMIPRID

#### 5.3.1. Actividad AChE

La Figura 23 muestra la actividad AChE en adultos de CSL, PC1 y PC2 controles y expuestos a concentraciones subletales de clorpirifós. Las actividades promedio de los respectivos controles (adultos no expuestos al insecticida) fueron  $0,036 \pm 0,003$ ;  $0,041 \pm 0,0027$  y  $0,034 \pm 0,0019$   $\mu\text{moles}/\text{min} \times \text{mg}$  de proteína, respectivamente. Los valores de las poblaciones de campo no fueron significativamente diferentes que el observado en CSL (ANOVA simple;  $F = 0,89$ ,  $gl = 2-55$ ,  $p = 0,41$ ).



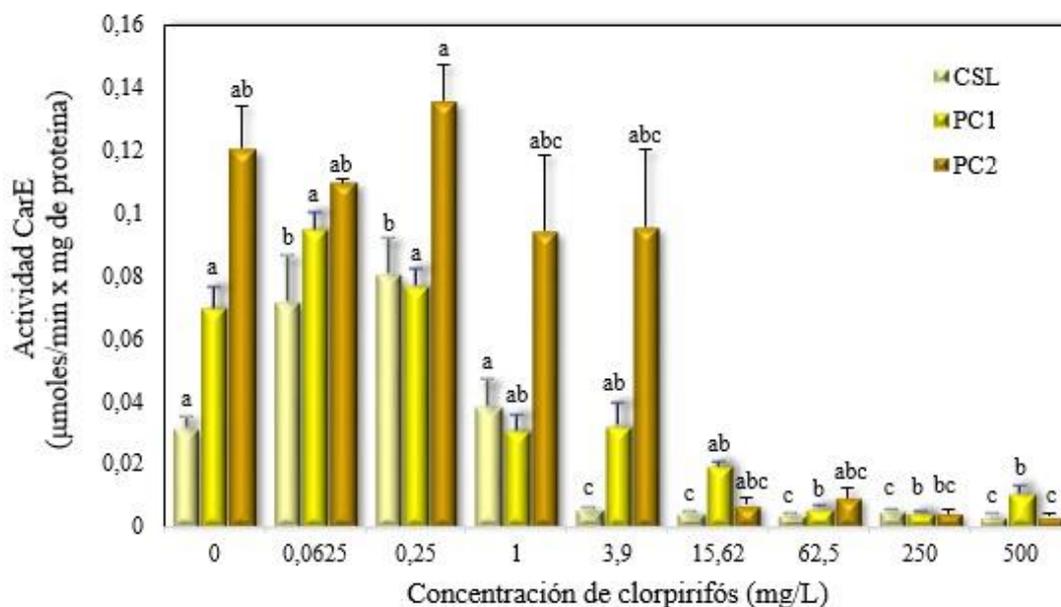
**Figura 23: Actividad AChE en adultos de *C. pomonella* de CSL, PC1 y PC2 expuestos a concentraciones subletales de clorpirifós.** Cada barra representa los valores de actividad enzimática promedio de al menos cuatro réplicas independientes. Las líneas verticales representan los EE. Las actividades AChE tanto para CSL como para PC1 y PC2 fueron analizadas por la Prueba de Kruskal-Wallis seguido la Prueba de comparación múltiple de Dunn. En cada población, letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En comparación con los respectivos controles, el clorpirifós inhibió en forma significativa la actividad enzimática de los adultos en una forma dependiente de la concentración (Kruskal-Wallis; CSL:  $H = 36,78$ ,  $gl = 8$ ,  $p = 0,0001$ ; PC1:  $H = 39,88$ ,  $gl = 8$ ,  $p = 0,0001$ ; PC2:  $H = 38,47$ ,  $gl = 8$ ,  $p = 0,0001$ ). En ambas poblaciones de campo y CSL, la actividad enzimática comenzó a ser significativamente menor que en los

controles a partir de 15,62 mg/L de clorpirifós. Las concentraciones de 250 y 500 mg/L del insecticida inhibieron casi por completo la actividad AChE en CSL y PC1. Los valores de  $CI_{50}$  para CSL, PC1 y PC2 fueron  $0,39 \pm 0,10$ ;  $0,35 \pm 0,094$  y  $0,10 \pm 0,019$  mg/L, respectivamente. Los valores de  $CI_{50}$  para CSL y PC1 no mostraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ); mientras que la  $CI_{50}$  para PC2 fue significativamente menor que las correspondientes a CSL y PC1 ( $p < 0,05$ ).

### 5.3.2. Actividad CarE

Las actividades CarE para grupos controles y tratados con clorpirifós determinados en adultos de *C. pomonella* se muestran en la Figura 24. Las actividades promedio CarE en los controles de CSL, PC1 y PC2 fueron  $0,031 \pm 0,0034$ ;  $0,070 \pm 0,0068$  y  $0,12 \pm 0,013$   $\mu$ moles/min x mg de proteína, respectivamente. Los valores de ambas poblaciones de campo fueron significativamente mayores que el de CSL (ANOVA simple;  $F = 18,04$ ,  $gl = 2-11$ ,  $p = 0,0003$ ). Por otra parte, la actividad promedio de PC2 fue un 70% superior a la actividad promedio de PC1 ( $p < 0,05$ ).



**Figura 24: Actividad CarE en adultos de *C. pomonella* de CSL, PC1 y PC2 expuestos a concentraciones subletales de clorpirifós.** Cada barra representa los valores de actividad enzimática promedio de al menos cuatro réplicas independientes. Las líneas verticales representan los EE. Las actividades CarE de CSL fueron transformadas a logaritmo y analizadas por ANOVA simple seguido la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Las actividades CarE de PC1 y PC2 fueron analizadas por la prueba no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido la prueba de

comparación múltiple de Dunn. En cada población, letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Las actividades CarE de adultos de CSL expuestos a las concentraciones de 0,0625 y 0,25 mg/L de clorpirifós fueron significativamente mayores que la de su control (ANOVA simple;  $F = 130,6$ ,  $gl = 8-30$ ,  $p = 0,0001$ ). Respecto a los controles, los aumentos observados correspondieron a un 127,44 y un 156,16% para las concentraciones de 0,0625 y 0,25 mg/L, respectivamente. A partir de 3,9 mg/L de clorpirifós, la actividad CarE en CSL fue significativamente inhibida en más de un 82%.

Si bien las diferencias no fueron significativas, los adultos de PC1 expuestos a las concentraciones de 0,0625 y 0,25 mg/L mostraron, respecto al grupo control, un aumento de la actividad CarE del 35,62% y del 10,37%, respectivamente. A partir de la concentración de 62,5 mg/L se observó una inhibición significativa (Kruskal-Wallis;  $H = 36,07$ ,  $gl = 8$ ,  $p < 0,0001$ ).

La actividad CarE en PC2 mostró un pequeño y no significativo aumento en los adultos expuestos a 0,25 mg/L de clorpirifós, con respecto al grupo control. A diferencia de CSL y PC1, la inhibición de CarE fue significativamente diferente del control para los grupos tratados con 500 mg/L (Kruskal-Wallis;  $H = 30,37$ ,  $gl = 8$ ,  $p = 0,0001$ ).

Los valores de  $CI_{50}$  de clorpirifós en CSL ( $2,21 \pm 1,24$  mg/L), PC1 ( $4,33 \pm 2,6$  mg/L) y PC2 ( $6,01 \pm 3,02$  mg/L) no fueron significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

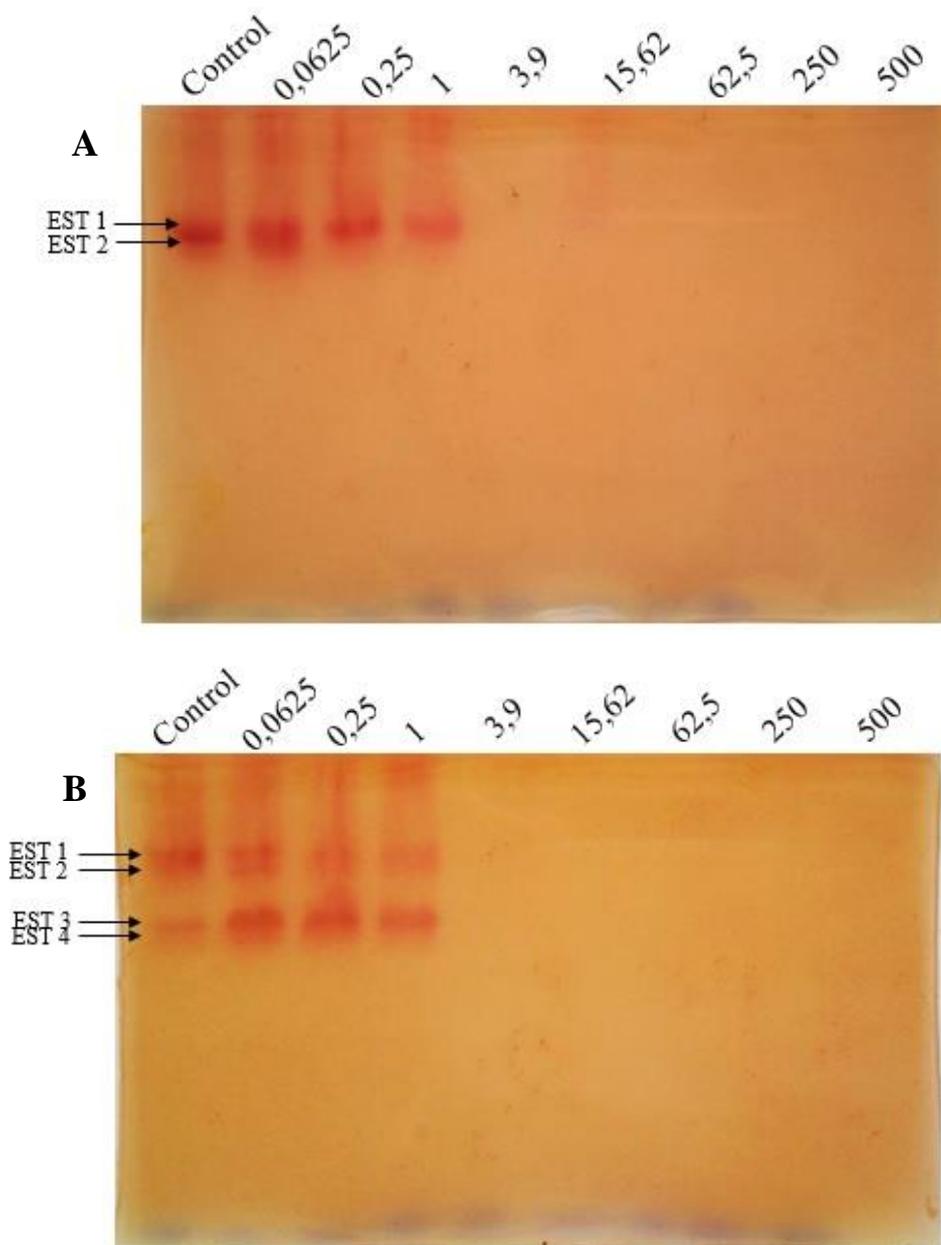
#### 5.3.2.1 Caracterización cualitativa de CarE. Electroforesis en geles nativos de poliacrilamida.

La corrida electroforética de homogenatos en geles no desnaturalizantes permitió identificar las isoformas de CarE en adultos de *C. pomonella* de CSL y PC1 (Figura 25). A partir de la concentración 3,9 mg/L de clorpirifós, la actividad CarE fue imperceptible, lo cual coincide con los resultados espectrofotométricos.

En CSL se detectaron dos isoformas, con una mayor intensidad en la tinción de EST1. Además, la isoforma EST1 mostró mayor actividad en los organismos expuestos a 0,0625 y 0,25 mg/L de clorpirifós.

Las dos bandas presentes en CSL también se observaron en PC1, junto con otras dos bandas adicionales (EST3 y EST4). A diferencia de CSL, la isoforma EST3 de PC1 fue la que presentó mayor actividad en los organismos expuestos a 0,0625 y 0,25 mg/L de clorpirifós. Más aun, la exposición a 1 mg/L de clorpirifós produjo en PC1 una

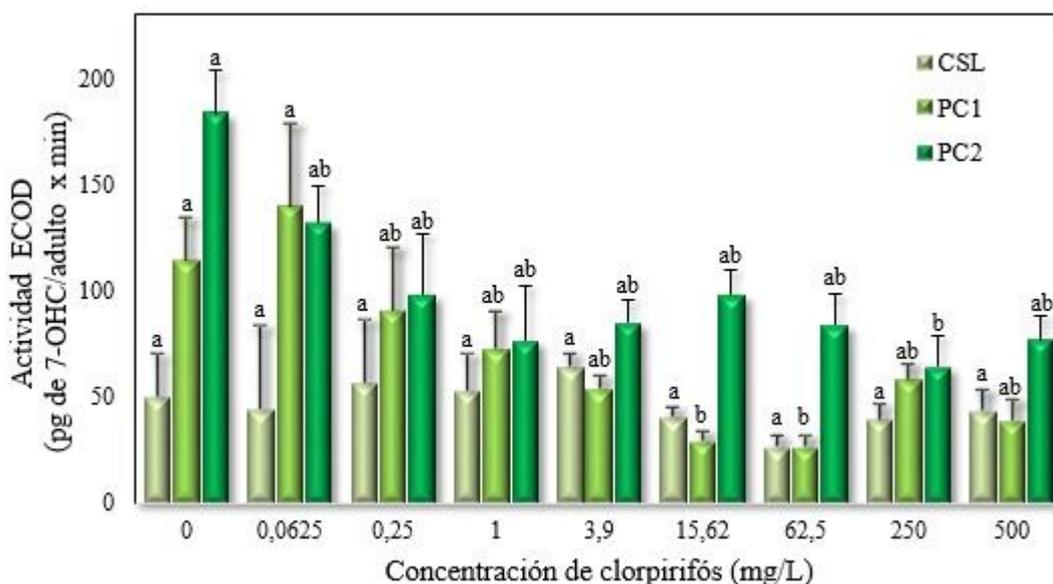
disminución en la actividad de las isoformas EST1 y EST2, con un concomitante aumento de la isoforma EST3.



**Figura 25:** Geles nativos de poliacrilamida de la actividad CarE de homogenatos de *C. pomonella* de CSL (A) y PC1 (B). Cada una de las calles indica la concentración de clorpirifós, expresadas en mg/L, a la que fueron expuestos los individuos de CSL y PC1.

### 5.3.3. Actividad CYP450 (ECOD)

La Figura 26 muestra las actividades promedio ECOD para CSL, PC1 y PC2 controles y tratados con concentraciones subletales de clorpirifós. Las actividades basales de ECOD para CSL, PC1 y PC2 fueron  $50,26 \pm 8,03$ ;  $113,90 \pm 19,80$  y  $183,30 \pm 20,31$  pg de 7-OHC/adulto x min, respectivamente. Las diferencias de actividad entre el control de CSL y los controles de las poblaciones de campo fueron estadísticamente significativas (ANOVA simple;  $F = 15,96$ ,  $gl = 2-98$ ,  $p = 0,0001$ ). Por otro lado, la actividad basal de ECOD determinada en PC1 fue aproximadamente un 60% de la observada en PC2 ( $p < 0,05$ ).



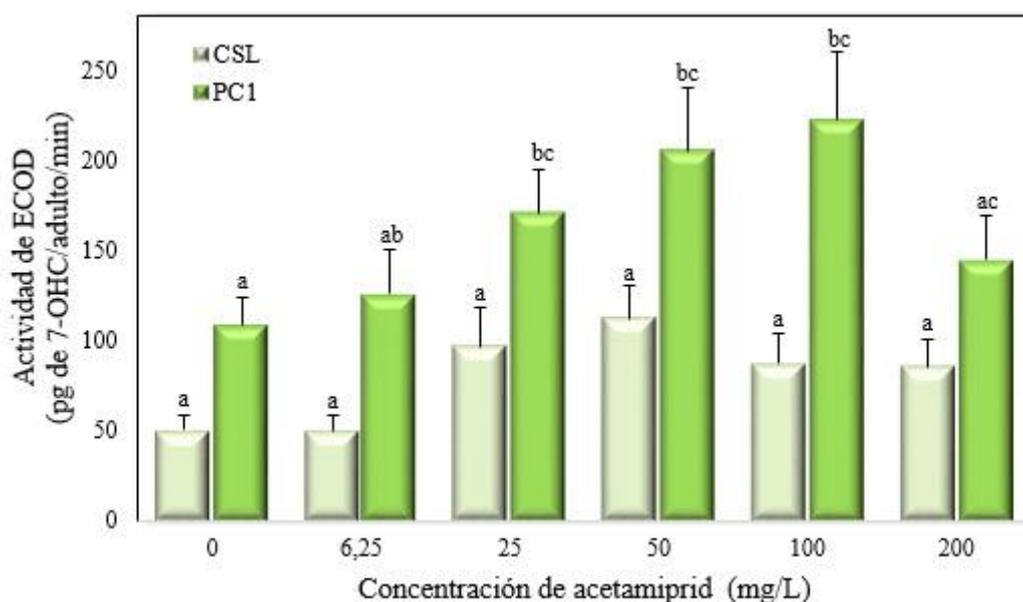
**Figura 26: Actividad ECOD en adultos de *C. pomonella* de CSL, PC1 y PC2 expuestos a concentraciones subletales de clorpirifós.** Las barras representan la media de las actividades ECOD ( $n = 99$  para CSL;  $n = 201$  para PC1 y  $n = 173$  para PC2). Las líneas verticales representan los EE. Las actividades ECOD para la CSL fueron analizadas por ANOVA simple seguido la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Las actividades ECOD para PC1 y PC2 fueron analizadas por la prueba de Kruskal-Wallis seguido de Prueba de comparación múltiple Dunn. En cada población, letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En CSL, el tratamiento con clorpirifós no modificó en forma significativa la actividad ECOD respecto de los controles (ANOVA simple;  $F = 0,73$ ,  $gl = 8-90$ ,  $p = 0,66$ ). En PC1 y PC2, la actividad ECOD tendió a disminuir en función del incremento de las concentraciones de clorpirifós. La disminución de la actividad ECOD, con respecto a sus respectivos controles, fue significativa para adultos de PC1 tratados con 15,62 y 62,5 mg/L

de clorpirifós (Kruskal-Wallis;  $H = 30,58$ ,  $gl = 8$ ,  $p = 0,0001$ ) y adultos de PC2 tratados con 250 mg/L del insecticida (Kruskal-Wallis;  $H = 27,84$ ,  $gl = 8$ ,  $p = 0,0005$ ).

En la Figura 27 se muestran los promedios de actividad ECOD determinadas en adultos controles y expuestos a concentraciones subletales de acetamiprid, provenientes de CSL y PC1.

En CSL, la actividad ECOD no fue significativamente modificada por el tratamiento con acetamiprid (ANOVA simple;  $F = 2,39$ ,  $gl = 5-69$ ,  $p = 0,045$ ). En PC1, en cambio, la actividad tendió a aumentar al aumentar la concentración de insecticida y fue significativamente diferente del control para los tratamientos con 25, 50 y 100 mg/L de acetamiprid (ANOVA simple;  $F = 4,02$ ,  $gl = 5-109$ ,  $p = 0,045$ ).



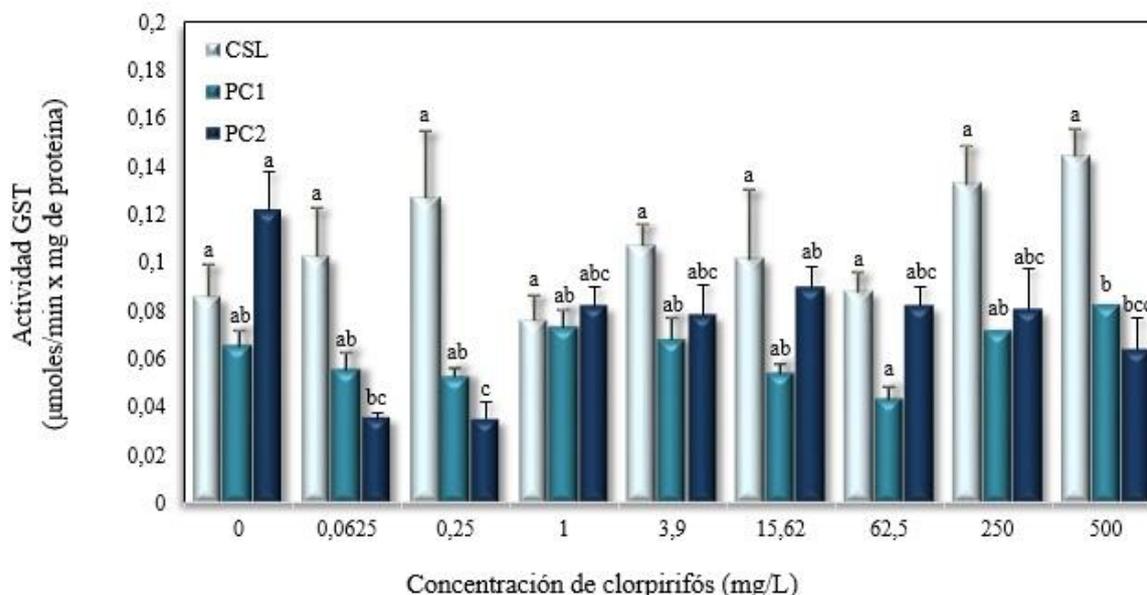
**Figura 27: Actividad ECOD en adultos de *C. pomonella* de CSL y PC1 expuestos a concentraciones subletales de acetamiprid.** Las barras representan la media de las actividades de ECOD en CSL ( $n = 75$ ) y PC1 ( $n = 115$ ). Las líneas verticales corresponden a los EE. Las actividades ECOD de la CSL fueron analizadas por ANOVA simple seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Las actividades ECOD de PC1 fueron transformadas a logaritmo y analizadas por ANOVA simple seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. En cada población, letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 5.3.4. Actividad GST

La actividad GST, determinada en adultos de CSL, PC1 y PC2 controles y expuestos a concentraciones subletales de clorpirifós se muestra en la Figura 28. La actividad GST promedio para los grupos controles de CSL, PC1 y PC2 fueron  $0,086 \pm 0,013$ ;  $0,065 \pm 0,0066$  y  $0,12 \pm 0,016$   $\mu\text{moles de CDNB conjugados/min} \times \text{mg de proteína}$ , respectivamente. Si bien se determinaron diferencias significativas en la actividad basal GST entre PC1 y PC2, éstas actividades no fueron significativamente diferentes al control de CSL (ANOVA simple;  $F = 4,61$ ,  $gl = 2-11$ ,  $p = 0,03$ ).

Ninguna de las concentraciones de clorpirifós produjo efectos significativos en la actividad GST en CSL y PC1 respecto a los controles (ANOVA simple; CSL:  $F = 1,87$ ,  $gl = 8-33$ ,  $p = 0,098$ ; PC1:  $F = 3,48$ ,  $gl = 8-34$ ,  $p = 0,049$ ).

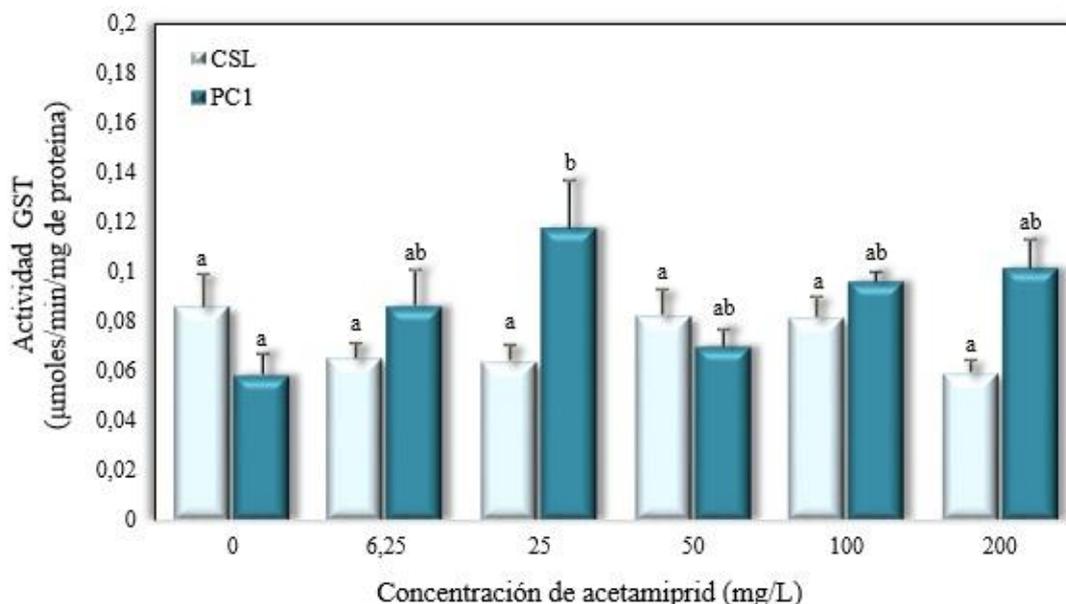
En PC2, la actividad GST disminuyó en forma significativa en adultos expuestos a 0,0625; 0,25 y 500 mg/L de clorpirifós con respecto a su control (ANOVA simple; PC2:  $F = 5,85$ ,  $gl = 8-36$ ,  $p < 0,0001$ ).



**Figura 28: Actividades GST en adultos de *C. pomonella* de CSL, PC1 y PC2 expuestos a concentraciones subletales de clorpirifós.** Las barras representan el promedio de las actividades GST de al menos cuatro réplicas independientes. Las líneas verticales corresponden a los EE. La comparación de las actividades GST dentro de cada población fue analizada por ANOVA simple seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. En cada población, letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

La actividad GST determinada en adultos de CSL y PC1 controles y expuestos a concentraciones subletales de acetamiprid se muestra en la Figura 29. En CSL, la exposición a acetamiprid no modificó en forma significativa la actividad enzimática (ANOVA simple;  $F = 1,91$ ,  $gl = 5-24$ ,  $p = 0,13$ ).

En PC1, el insecticida produjo un aumento de la actividad GST, pero éste solo fue significativo para la concentración de 25 mg/L (ANOVA simple;  $F = 3,49$ ,  $gl = 5-24$ ,  $p = 0,016$ ).



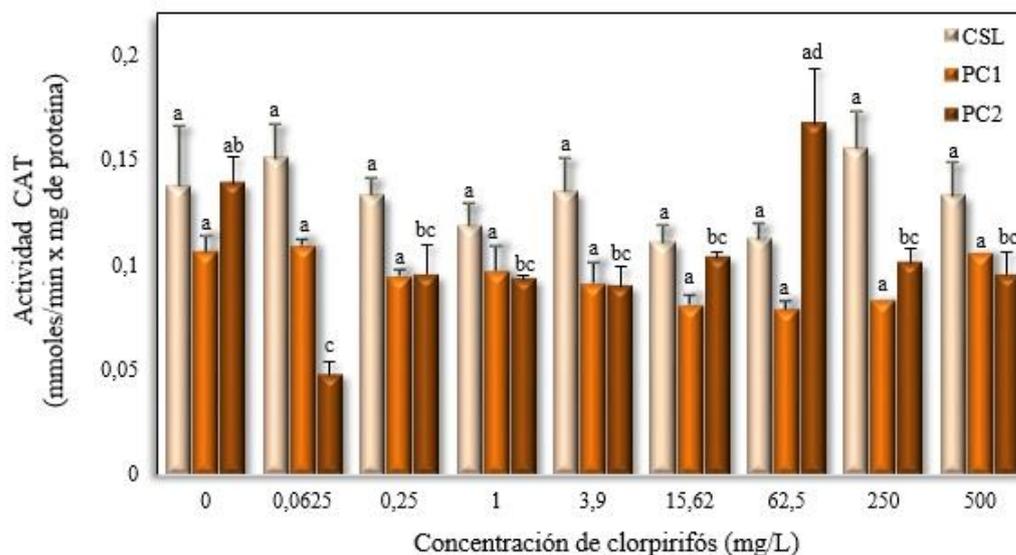
**Figura 29: Actividad GST en adultos de *C. pomonella* de CSL y PC1 expuestos a concentraciones subletales de acetamiprid.** Las barras representan el promedio de las actividades GST en al menos cuatro réplicas independientes. Las líneas verticales corresponden a los EE. Las actividades GST para ambas poblaciones fueron analizadas por ANOVA simple seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. En cada población, letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 5.3.5. Actividad CAT

La actividad CAT en individuos de CSL, PC1 y PC2 controles tratados con concentraciones subletales de clorpirifós se muestra en la Figura 30. La actividad CAT promedio en los grupos controles de CSL, PC1 y PC2 fue  $0,14 \pm 0,028$ ;  $0,11 \pm 0,0075$  y  $0,14 \pm 0,012$  mmoles/min x mg proteína, respectivamente. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas (ANOVA simple;  $F = 1,06$ ,  $gl = 2-12$ ,  $p = 0,37$ ).

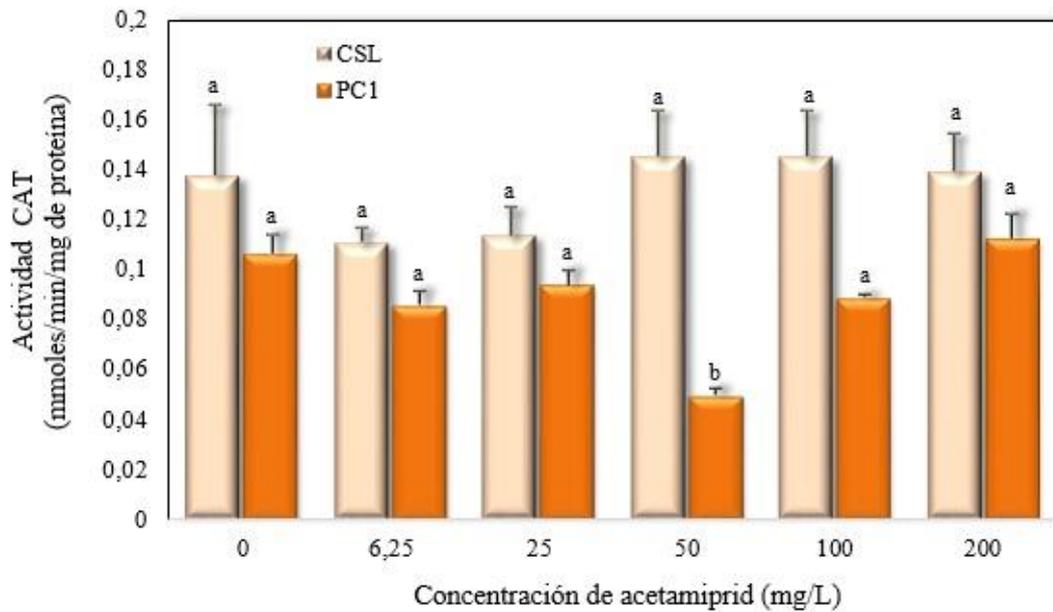
En CSL y PC1, el clorpirifós no modificó la actividad CAT en forma significativa (ANOVA simple; CSL:  $F = 0,94$ ,  $gl = 8-32$ ,  $p = 0,49$ ; PC1:  $F = 2,97$ ,  $gl = 8-34$ ,  $p = 0,012$ ).

En PC2 es importante mencionar que si bien la actividad CAT no resultó en general afectada con el aumento de las concentraciones de clorpirifós, se observó una disminución significativa en el grupo tratado con 0,0625 mg/L de clorpirifós (ANOVA simple;  $F = 7,55$ ,  $gl = 8-36$ ,  $p < 0,0001$ ).



**Figura 30: Efecto del clorpirifós en la actividades CAT en adultos de *C. pomonella* de CSL, PC1 y PC2.** Las barras representan el promedio de las actividades CAT de al menos 4 réplicas independientes. Las líneas verticales corresponden a los EE. Las diferencias dentro de cada población fueron analizadas por ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. En cada población, letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

La Figura 31 muestra la actividad CAT en individuos de CSL y PC1 controles y tratados con concentraciones subletales de acetamiprid. La exposición de CSL a acetamiprid no produjo efectos significativos en la actividad CAT (ANOVA simple;  $F = 0,81$ ,  $gl = 5-24$ ,  $p < 0,55$ ). Solo la concentración de 50 mg/L de acetamiprid produjo una disminución significativa de la actividad CAT en los individuos de PC1 (ANOVA simple:  $F = 13,43$ ,  $gl = 5-24$ ,  $p < 0,0001$ ).

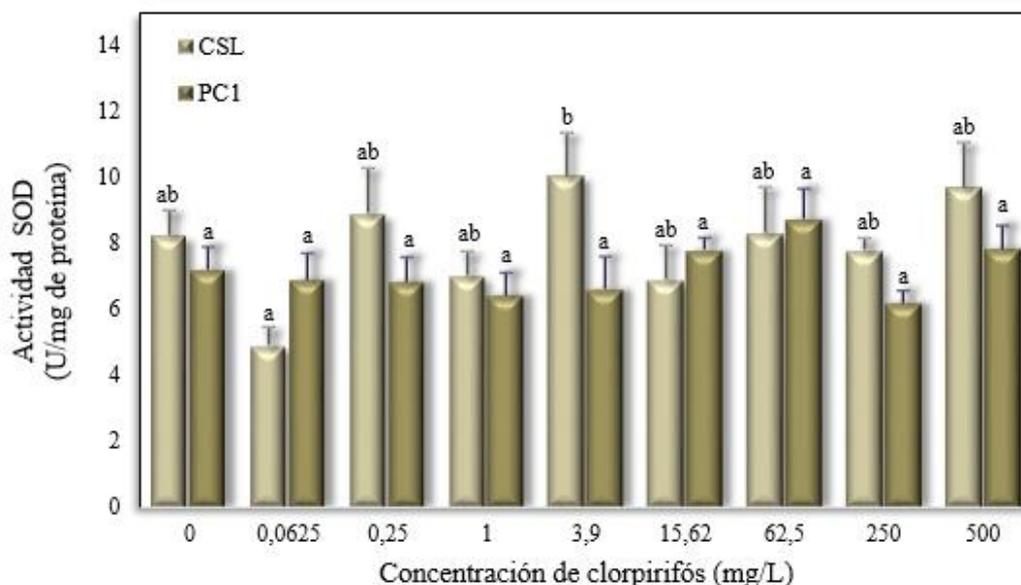


**Figura 31: Actividades CAT en adultos de *C. pomonella* de la CSL y la PC1 expuestos a concentraciones subletales de acetamiprid.** Las barras representan el promedio de las actividades de CAT de al menos 4 réplicas independientes. Las líneas verticales corresponden a los EE. Las actividades CAT para ambas poblaciones fueron analizadas por ANOVA simple seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. En cada población, letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 5.3.6 Actividad SOD

La actividad SOD en individuos de CSL y PC1 controles y tratados con concentraciones subletales de clorpirifós se muestran en la Figura 32. La actividad SOD basal determinada en CSL ( $8,20 \pm 0,74$  U/mg de proteína) y PC1 ( $7,20 \pm 0,68$  U/mg de proteína) no mostró diferencias significativas (Prueba de Student;  $t_6 = 0,95$ ,  $p = 0,37$ ).

Tampoco hubo diferencias significativas ni atribuibles al tratamiento con el insecticida en CSL y PC1 (ANOVA simple; CSL:  $F = 2,91$ ,  $gl = 8-29$ ,  $p = 0,016$ ; PC1:  $F = 1,34$ ,  $gl = 8-31$ ,  $p = 0,26$ ).

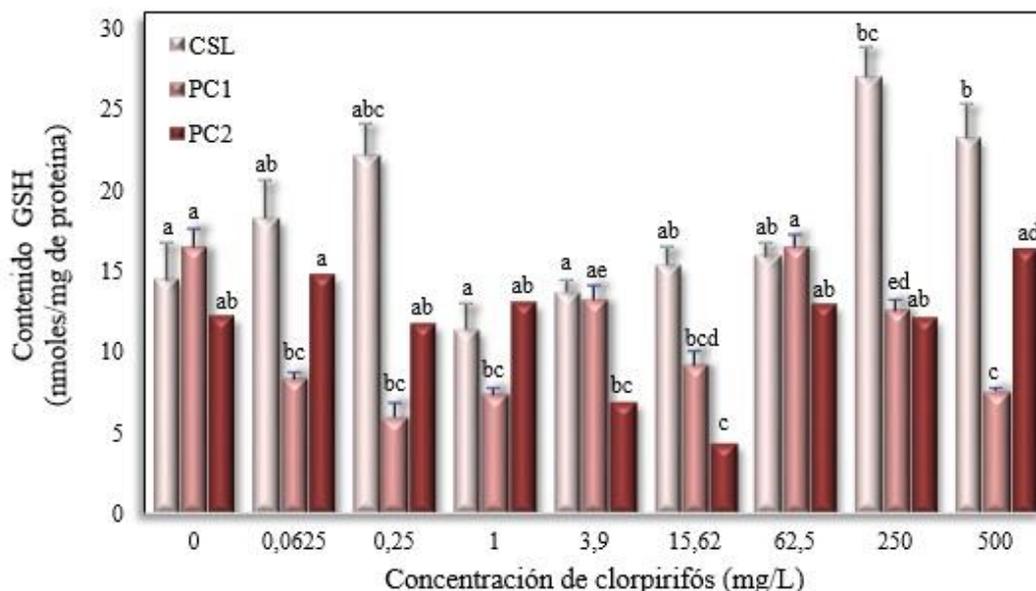


**Figura 32:** Actividad SOD en adultos de *C. pomonella* de CSL y PC1 expuestos a concentraciones subletales de clorpirifós. Una unidad de SOD (U SOD) se define como la cantidad de muestra que causa el 50% de inhibición de la auto-oxidación de la epinefrina. Las barras representan la actividad promedio de cuatro réplicas independientes. Las líneas verticales representan los EE. Las diferencias dentro de cada población fueron analizadas por ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. En cada población, letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 5.3.7. Contenido de GSH

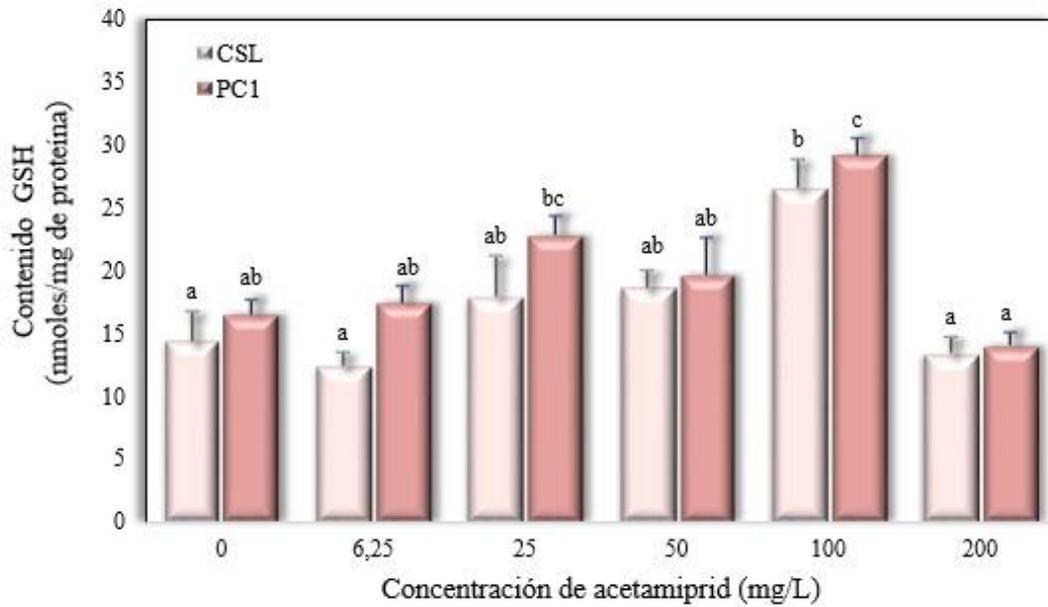
El contenido de GSH en individuos de CSL, PC1 y PC2 controles y tratados con concentraciones subletales de clorpirifós se muestran en la Figura 33. Los promedios del contenido basal de GSH en CSL ( $14,45 \pm 2,30$  nmoles/mg proteína), PC1 ( $16,47 \pm 1,15$  nmoles/mg de proteína) y PC2 ( $12,16 \pm 1,74$  nmoles/mg proteína) no presentaron diferencias significativas (ANOVA simple;  $F = 1,44$ ,  $gl = 2-12$ ,  $p = 0,27$ ). En CSL, los tratamientos con 250 y 500 mg/L de clorpirifós aumentaron en forma significativa el contenido de GSH (ANOVA simple;  $F = 9,24$ ,  $gl = 8-32$ ,  $p < 0,0001$ ).

Por el contrario, el contenido de GSH en PC1 disminuyó significativamente en la mayoría de los tratamientos con clorpirifós (ANOVA simple;  $F = 26,56$ ,  $gl = 8-35$ ,  $p < 0,0001$ ). En PC2, solo la concentración de 15,62 mg/L produjo una disminución significativa en el contenido de GSH (ANOVA simple;  $F = 8,25$ ,  $gl = 8$ ,  $p < 0,0001$ ).



**Figura 34: Contenido de GSH endógeno en adultos de *C. pomonella* de CSL, PC1 y PC2 expuestos a concentraciones subletales de clorpirifós.** Las barras representan el contenido promedio de cuatro réplicas independientes. Las líneas verticales representan los EE. Las diferencias dentro de cada población fueron analizadas por ANOVA simple seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. En cada población, letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

El contenido de GSH endógeno determinado en adultos de CSL y PC1 controles y expuestos a concentraciones subletales de acetamiprid se muestra en la Figura 35. Tanto en CSL como en PC1 se evidenció una tendencia de aumento de GSH en función de las concentración de acetamiprid (6,25-100 mg/L del insecticida), con una posterior disminución para el tratamiento de mayor concentración. Sin embargo, tanto en CSL como PC1 las diferencias solo fueron significativas para los adultos expuestos a 100 mg/L de acetamiprid (ANOVA simple; CSL:  $F = 6,59$ ,  $gl = 5-24$ ,  $p = 0,0005$ ; PC1:  $F = 10,36$ ,  $gl = 5-24$ ,  $p < 0,0001$ ).



**Figura 35: Contenido de GSH endógeno en adultos de *C. pomonella* de CSL y PC1 expuestos a concentraciones subletales de acetamiprid.** Las barras representan el contenido promedio de al menos cuatro réplicas independientes. Las líneas verticales representan los EE. El contenido de GSH para ambas poblaciones fueron analizadas por ANOVA simple seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. En cada población, letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

## *Discusión*

---

## 6. DISCUSIÓN

La resistencia a insecticidas en las poblaciones de insectos se origina en mutaciones que modifican la estructura molecular de los sitios de acción, aumentan la actividad de los sistemas enzimáticos detoxificantes o producen cambios cuticulares que reducen el ingreso de los insecticidas al organismo (Rosario-Cruz & Domínguez-García 2016). En un ambiente con insecticidas, los genes de resistencia confieren una ventaja a los organismos que los poseen, quienes sobreviven en forma selectiva respecto de aquellos que no los poseen.

### 6.1. TOXICIDAD DE CLORPIRIFÓS Y ACETAMIPRID EN ADULTOS DE *C. POMONELLA*

En monitoreos previos realizados en distintos sitios del valle de Río Negro y Neuquén, se detectó resistencia a insecticidas en larvas diapausantes y neonatas de *C. pomonella*. En larvas diapausantes, se encontró una correlación positiva entre los valores de  $DL_{50}$  para metil azinfós y las actividades esterasas y CYP450. En esta investigación, también se encontró una asociación entre el origen geográfico de las larvas y los niveles resistencia. Los individuos más resistentes provenían del corazón del valle (áreas con más antigua e intensa actividad productiva), mientras que las larvas colectadas en los extremos geográficos de la zona productiva eran menos resistentes o no presentaban diferencias con la cepa susceptible de referencia (Soleño et al. 2012). En otro trabajo, la exposición de larvas neonatas recolectadas en diferentes montes frutales a dosis discriminantes de tiacloprid, acetamiprid y metil azinfós produjeron, en general, bajos porcentajes de mortalidad (Cichón et al. 2013). En los individuos provenientes de catorce montes frutales de ocho localidades del valle, la mortalidad varió entre 14,8 y 88,2% para tiacloprid; entre 24,8 y 68,8% para acetamiprid; y entre 8,0 y 90,2% para metil azinfós. En los tres casos, la resistencia se correlacionó en forma positiva con la actividad CYP450. Los montes frutales en los cuales se colectaron los individuos de PC1 y PC2 de la presente tesis estuvieron incluidos en dicho estudio. En larvas neonatas de PC1, las dosis discriminantes de tiacloprid, acetamiprid y metil azinfós produjeron 14,8; 51,1; y 16,9% de mortalidad, respectivamente; y en larvas neonatas de PC2, 40,8; 43,4; y 29,5%, respectivamente (Cichón et al. 2013). Estos resultados sugieren la existencia de resistencia a estos insecticidas en ambas poblaciones.

En la presente tesis, los adultos de las poblaciones PC1 y PC2 fueron tan susceptibles a clorpirifós como los de la cepa de referencia CSL, tanto a nivel de la CL<sub>50</sub> como de la CL<sub>95</sub>. Los resultados presentes indicarían que los individuos de PC1 y PC2, cuyas larvas neonatas presentaron resistencia a tiacloprid, acetamiprid y metil azinfós (Cichón et al. 2013), no presentan resistencia cruzada<sup>4</sup> a clorpirifós.

Es bien conocido que la resistencia a un insecticida confiere resistencia a otros insecticidas que comparten tanto el sitio de acción a través de la insensibilidad de la molécula blanco (Liming et al. 2016; Rinkevich et al. 2013) o la/las enzimas que lo detoxifican (Nardini et al. 2012; Mesut İ̇sci & Recep Ay 2017). Específicamente en *C. pomonella*, hay reportes de resistencia cruzada dentro de la familia de OFs y entre OFs y otras familias de insecticidas (Reyes et al. 2007; Mota-Sánchez et al. 2008; Reyes et al. 2015). Sin embargo, también se han detectado casos de resistencia cruzada negativa<sup>5</sup>. Por ejemplo, adultos de *C. pomonella* provenientes de California, resistentes a metil azinfós eran, más susceptibles a clorpirifós que la cepa de referencia susceptible a insecticidas (Dunley & Welter 2000). Otro ejemplo lo constituyen las larvas del tercer estadio del escarabajo *Diabrotica virgifera* que presentaban altos niveles de resistencia a metil paratión fueron susceptibles a clorpirifós (Wright et al., 2000). Además, las polillas *Choristoneura rosaceana* y *Pandemis pyrusana* también mostraron resistencia a metil azinfós y susceptibilidad a clorpirifós (Dunley et al 2006).

Por otro lado, la susceptibilidad de adultos a clorpirifós observada en el presente estudio y la resistencia previamente observada a metil azinfós en neonatas (Cichón et al. 2013), podría adjudicarse al estadio evaluado. En general, la resistencia se expresa tanto en larvas como adultos (Rust et al. 2014; Pourmirza 2005), aún con notables diferencias en la metodología de los bioensayos entre los diferentes estadios. Sin embargo, en algunos casos, los niveles de resistencia a diferentes insecticidas son significativamente superiores en larvas que en adultos (Rawlins 1998; Lima et al. 2003; Nkya et al. 2014). También se observó que mientras las larvas del primer estadio del escarabajo *Leptinotarsa leceplineata* eran resistentes a metil azinfós, los adultos eran completamente susceptibles a este insecticida (Tisler & Zehnder 1990).

---

<sup>4</sup> Resistencia cruzada: ocurre cuando una población se vuelve resistente a un insecticida al que estuvo expuesta y también presenta resistencia a uno o más insecticidas a los que no estuvo expuesta (Tabashnik et al. 2014).

<sup>5</sup> Resistencia cruzada negativa: ocurre cuando individuos resistentes a un insecticida muestran mayor susceptibilidad a otro que la cepa susceptible al primero (Tabashnik et al. 2014).

En el presente estudio, la  $CL_{50}$  de acetamiprid en adultos de CSL y PC1 fueron similares. Sin embargo, la  $CL_{95}$  en PC1 fue seis veces superior a la de CSL (Tabla 3). Estos resultados son coincidentes con lo observado en estudio previos (Cichón et al. 2013), donde la aplicación de la dosis discriminante de acetamiprid en neonatas de PC1 resultó letal para el 51,1% de las larvas tratadas. Estos resultados podrían ser indicativos de estadios tempranos de desarrollo de resistencia. La frecuencia de genotipos resistentes aumenta en una población bajo presión de selección con insecticidas y las líneas de la relación dosis respuesta se desplazan hacia la derecha con valores de pendientes menores (Brown & Pal 1971).

La evolución de la resistencia en una población es un proceso escalonado (Forgash 1984). Durante la temprana exposición a un insecticida existe un período de latencia, en el cual los genes que generan resistencia son segregados y asociados con otros genes que gobiernan características favorables para la supervivencia de la plaga. A continuación ocurre un período donde la resistencia se desarrolla gradualmente, seguida de otro período de evolución rápida, donde múltiples factores contribuyen a la resistencia en la población.

En una población japonesa de *P. xylostella*, monitoreada en varios años sucesivos, los valores de  $DL_{50}$  para acetamiprid variaron ligeramente a través del tiempo, pero en igual período, la  $DL_{95}$  aumentó 21 veces (Ninsin & Miyata 2003). La interpretación de los autores es que la resistencia a acetamiprid se encuentra en una etapa temprana de su evolución poblacional, y que podría conducir a más elevados niveles de resistencia en el futuro si se sigue aplicando el mismo insecticida.

Algunas características del área productiva del Alto Valle favorecen una lenta evolución de la resistencia a insecticidas. Una de las características más importantes es la presencia de montes frutales tanto familiares como abandonados u orgánicos intercalados con aquellos bajo control integrado, los cuales sirven como reservorios de individuos susceptibles. Además, la reducción en los últimos años del uso tanto de clorpirifós u otros OFs debido a las restricciones de países importadores de fruta como de NNs por sus efectos adversos en la fauna benéfica, contribuiría a retardar la evolución de la resistencia a estos insecticidas.

## 6.2 ACTIVIDAD ACHE Y SENSIBILIDAD A ANTICOLINESTERÁSICOS

Los OFs, cuyo sitio de acción primario es la AChE, han sido usados de forma masiva durante dos décadas en la región para el control del carpocapsa. Los resultados de

los niveles basales de actividad AChE no mostraron diferencias significativas entre la CSL y las poblaciones de campo (Figura 23 y Tabla 4). No obstante, en *D. melanogaster* se reportó aumento en los niveles basales de actividad AChE como mecanismo para compensar la pérdida de moléculas inhibidas por anticolinesterásicos (Charpentier & Fournier 2001).

En el presente estudio se observó una actividad residual ligeramente mayor en PC1 en los estudios *in vitro* en presencia de propoxur. Sin embargo, esta pequeña diferencia no sería indicativa de la presencia de mutaciones en la AChE de individuos de esta población. El limitado número de individuos utilizados en dicho estudio y restringido a una sola población de campo podría encubrir la presencia de una muy baja frecuencia de individuos con mutaciones en la enzima.

### 6.3. MECANISMOS BIOQUIMICOS DE DEFENSA

Los mecanismos metabólicos más comunes que confieren resistencia a insecticidas involucran a las esterasas, CYP450 y GST. En la mayoría de los casos, la resistencia metabólica puede ser detectada a través de la determinación de un aumento en la actividad basal de estas enzimas en comparación con poblaciones de referencia (Hemingway et al., 2000).

La actividad basal CarE en PC1 y PC2 fue mayor que en CSL (2 y 4 veces, respectivamente) (Figura 24). Además, en PC1 se encontraron isoformas de esterasas que no estaban presentes en CSL (Figura 25). También se encontró mayor actividad de esta enzima en larvas diapausantes colectadas en numerosos sitios del valle de Río Negro y Neuquén en comparación a CSL (Soleño et al. 2008; 2012).

En estudio previos, la actividad CarE fue positivamente correlacionada con la resistencia a metil azinfós en poblaciones de larvas diapausantes de la región (Soleño et al. 2012). Varios autores asociaron la resistencia a OFs en poblaciones de campo de *C. pomonella* con el aumento (Reyes et al. 2007; Rodríguez et al. 2011; Voudouris et al. 2011) o disminución en la actividad esterasas (Reyes et al. 2015). La expresión de esterasas con reducida afinidad por sustratos no específicos como  $\beta$ -naftil acetato y mayor actividad hacia insecticidas explicaría la asociación negativa entre resistencia a clorpirifós y disminución en la actividad esterasas (Bush et al. 1993).

En el presente trabajo, los adultos de PC1 y PC2 mostraron actividades basales ECOD mayores a las registradas en CSL. Un resultado similar se registró previamente en

larvas neonatas de estas poblaciones de campo (Cichón et al. 2013) y en larvas diapausantes de la localidad de Villa Regina (Soleño et al. 2012).

En numerosos estudios se correlacionó la resistencia a OFs en *C. pomonella* con una mayor actividad ECOD (Reyes et al. 2007; Rodríguez et al. 2010; Soleño et al. 2012; Cichón et al. 2013). Sin embargo, según Scott (1991) la asociación de actividad CYP450 con la resistencia a OFs debe considerarse circunstancial a menos que se acompañe de estudios toxicológicos con sinergistas o estudios metabólicos. Por ejemplo, en una cepa de laboratorio de *C. pomonella* resistente a metil azinfós (con mutaciones en *ace* y elevada actividad CYP450), no se evidenció sinergismo luego del tratamiento simultáneo con este insecticida y piperonil butóxido (inhibidor de CYP450) (Reyes et al. 2011). Los autores concluyeron que la actividad CYP450 no desempeña un rol importante en la detoxificación del insecticida y que la sobreexpresión de estas enzimas se conserva en esta cepa de laboratorio por ligamiento genético, a pesar de su costo biológico. Por otro lado, la evidencia sugiere múltiples formas de CYP450 en insectos con capacidad de bioactivación y detoxificación de OFs (Feyereisen 1999).

La resistencia a NNs en *C. pomonella* se correlacionó con mayor actividad CYP450 (Voudouris et al. 2001; Reyes et al. 2007; Rodríguez et al. 2011), incluso en larvas neonatas de PC1 y PC2 (Cichón et al. 2013). La resistencia a NNs en varias especies de insectos se atribuye principalmente al metabolismo oxidativo y a una menor afinidad del insecticida por los RnACh (Nauen 2005; Jeschke & Nauen 2008; Minakuchi et al. 2013). El aumento de actividad CYP450 parece ser el principal mecanismo de detoxificación de NNs en *B. tabaci* (Rauch & Nauen, 2003, Karunker et al., 2008), *N. lugens* (Zewen et al. 2003), y *M. domestica* (Markussen & Kristensen 2010). Del mismo modo, el piperonil butóxido aumentó la toxicidad tanto de acetamiprid como de tiacloprid en *A. mellifera* (Iwasa et al. 2004).

Las enzimas GST son miembros de una superfamilia involucrada tanto en la detoxificación como en la protección contra el daño oxidativo causado por EROS (Yan et al. 2013). Los resultados del presente estudio no presentaron diferencias en la actividad basal GST entre CSL y ambas poblaciones de campo. Estudios previos en poblaciones de larvas diapausantes de *C. pomonella* del Valle de Río Negro y Neuquén mostraron una gran variabilidad en la actividad GST, con una débil correlación entre la actividad de esta enzima y la resistencia a metil azinfós (Soleño et al. 2008). Por otra parte, hay evidencia que el aumento en la actividad GST se correlaciona con la resistencia a OFs en otras poblaciones de campo de *C. pomonella* (Rodríguez, Bosch, & Avilla 2011). También,

Fuentes Contreras et al. (2007) detectaron una elevada actividad GST en una población de *C. pomonella* resistente a metil azinfós.

Por último, las actividades basales CAT y SOD y el contenido de GSH entre CSL y las poblaciones de campo evaluadas en el presente estudio no mostraron diferencias significativas. Una extensa búsqueda bibliográfica no mostró reportes sobre diferencias en los niveles basales de componentes del sistema antioxidante, con la excepción de actividad GST, entre poblaciones de campo expuestas a insecticidas y cepas de laboratorio.

#### **6.4. EFECTOS SUBLETALES DE CLORPIRIFÓS Y ACETAMIPRID**

Actualmente, está cobrando importancia el estudio de los efectos subletales de los plaguicidas en artrópodos tanto plagas como benéficos (Desneux et al. 2007). Como se mencionó anteriormente, los insecticidas producen una amplia gama de efectos subletales tanto fisiológicos como de comportamiento. Por ejemplo, en *C. pomonella* se observó que dosis subletales de fosmet, esfenvalerato y acetamiprid disminuyen la longevidad de adultos y que tanto el esfenvalerato como el acetamiprid reducen también la tasa de apareamiento y la fecundidad (Knight 2010b). En dicho estudio, los efectos fueron observados a concentraciones hasta cien veces menores a las máximas recomendadas para su uso a campo. Si bien el control de esta plaga va dirigido a las neonatas, en base a estos resultados, este autor ha sugerido como complemento para los programas de manejo la aplicación conjunta de microencapsulados de feromonas E,E-8,10-dodecadien-1-ol (codlemone) con bajas concentraciones de plaguicidas convencionales como OFs, NNs y piretroides.

En el presente trabajo se estudian los efectos subletales de clorpirifós y acetamiprid sobre los parámetros bioquímicos.

##### **6.4.1. Actividad AChE**

La actividad AChE por la exposición *in vivo* a diferentes concentraciones clorpirifós no mostro, en general, diferencias significativas entre CSL y las poblaciones de campo de *C. pomonella* (Figura 23). Estos resultados al igual que los obtenidos por la exposición *in vitro* a propoxur son indicativos de que no existen cambios en la sensibilidad de la enzima debido a mutaciones puntuales. Si bien la insensibilidad de la AChE a anticolinesterásicos se determinó en numerosos lepidópteros (Li et al. 2010; Carvalho et al. 2013), no se

reportaron aún mutaciones en poblaciones de campo de *C. pomonella*, a pesar del uso masivo de OFs a nivel mundial para el control de esta plaga.

### 6.3.2. Actividad CarE

La exposición *in vivo* de adultos a concentraciones subletales de clorpirifós disminuyó la actividad CarE en CSL, PC1 y PC2 (Figura 24). En los tres casos, las mayores concentraciones de clorpirifós estudiadas inhibieron un 80% o más la actividad enzimática. También se observó un aumento significativo en la actividad CarE en adultos de CSL tratados con 0,0625 y 0,25 mg/L de clorpirifós, aproximándose a las actividades de PC1 y PC2 expuestas a estas concentraciones. Se reconoce que las CarE protegen a la AChE, dado que actúan como sitios de fosforilación alternativos para los insecticidas OFs (Jokanović 2001). Considerando el rol protector de las CarE, la inducción diferencial de esta enzima observada en el rango del bioensayo (0,0625–3 mg/L clorpirifós) podría en parte explicar la toxicidad comparable de clorpirifós en CSL y las poblaciones de campo. De acuerdo con Plapp y Wang (1983), la inducción enzimática en insectos susceptibles es en general mayor que en individuos resistentes. Resultados similares fueron observados en el pulgón *M. persicae* expuesto al anticolinesterásico pirimicarb (Silva et al. 2012). En este insecto, la exposición al pirimicarb indujo a nivel transcripcional la sobreexpresión de diferentes genes según el genotipo de los insectos susceptibles y resistentes. En el genotipo susceptible fueron inducidos 183 genes; en el genotipo de insectos resistentes con mutaciones en el canal de sodio dependiente de voltaje, 17; y en el genotipo de insectos resistentes con mutaciones en el canal de sodio y en la AChE, 7. La anotación de los genes sobreexpresados en los individuos susceptibles reveló que estaban relacionados con el metabolismo energético, enzimas detoxificantes, proteínas de transporte extracelular, peptidasas y proteínas cuticulares. Finalmente, en los individuos con genotipos resistentes se determinó una regulación negativa de genes involucrados en la detoxificación. Los autores concluyeron que los genotipos susceptibles exhiben una mayor plasticidad transcripcional que los resistentes.

### 6.3.3. Actividad ECOD

Los estudios de exposición *in vivo* a concentraciones subletales de clorpirifós evaluadas en este estudio no modificaron la actividad ECOD de CSL. Sin embargo, en los adultos de PC1 y PC2 se observó una tendencia a disminuir la actividad de esta enzima en

función del incremento de las concentraciones del insecticida. Se ha propuesto que durante la activación de paratión a paraoxón por CYP450, el sulfuro formado reacciona con sulfhidrilos de las cisteínas de la enzima produciendo su inhibición (De Matteis 1974).

La exposición *in vivo* a concentraciones subletales de acetamiprid no modificó la actividad ECOD de CSL. Sin embargo, en PC1 se observó una tendencia al aumento en la actividad CYP450 en función del incremento de las concentraciones del insecticida.

La expresión de genes CYP450 en insectos puede ser inducida tanto por compuestos endógenos como exógenos (Feyereisen 1999). Por ejemplo, la exposición de larvas de *C. pomonella* durante 36 h a la CL<sub>10</sub> del NNs imidacloprid aumentó significativamente los niveles de transcripción de CYP450 en comparación al grupo control (Yang et al. 2015). Más aún, la exposición del mosquito *C. quinquefasciatus* a la CL<sub>50</sub> de permetrina (piretroide) promovió la inducción en 7 de 19 genes CYP450 en la población resistente, los cuales estaban constitutivamente sobreexpresados. Por el contrario, la exposición a permetrina no alteró la expresión de genes CYP450 en la población susceptible (Gong et al. 2013).

#### 6.4.4. Actividad GST

La exposición *in vivo* de CSL y ambas poblaciones de campo a concentraciones subletales de clorpirifós no mostró, en general, efectos sobre la actividad GST. Del mismo modo, la exposición de la langosta *Oxya chinensis* durante 24 horas a CL<sub>10</sub> y CL<sub>50</sub> de clorpirifós no influyó en la actividad de esta enzima (Wu et al., 2011). Por el contrario, en larvas de *C. pomonella* la actividad GST aumentó luego de 24 h de exposición a metil clorpirifós, pero disminuyó 48 y 60 h post-tratamiento (Liu et al., 2014). Por otro lado, la exposición de la langosta *L. migratoria* a clorpirifós produjo una disminución significativa y dosis dependiente en las actividades GST hacia 1,2-dicloro-4-nitrobenzono (DCNB) y cloruro de p-nitro-bencilo (PNBC), sin verse afectada la actividad por CDNB (Qin et al. 2014). En el mismo trabajo, luego de la exposición clorpirifós aumentó el ARNm de algunas clases de GST mientras que disminuyó para otras. La conclusión de los autores fue que el insecto regula diferencialmente la expresión de las enzimas involucradas en la detoxificación de insecticidas.

Al igual que con clorpirifós, la exposición *in vivo* de CSL y PC1 a concentraciones subletales de acetamiprid no produjo, en general, efectos significativos en la actividad GST. Por otro lado, la exposición de larvas de *C. pomonella* durante 36 h a la CL<sub>10</sub> de

acetamiprid disminuyó los niveles de transcripción de GST en comparación con el grupo control (Yang et al. 2015). Por el contrario, en el gorgojo *Ceutorchynhus assimilis*, la resistencia a acetamiprid se correlacionó con la actividad GST y enzimas hidrolíticas, sinergizadas por dietil maleato y S,S,S-tributilfosforotritioato, respectivamente (Zamojska & Wegoreck 2014).

Algunas GST de insectos contienen glutatión peroxidasas (GSTPX) no dependientes de selenio capaces de eliminar hidroperóxidos (Fang 2012) disminuyendo el estrés oxidativo originado por los insecticidas. Por ejemplo, en la abeja *Apis cerana* se observó un aumento significativo en los niveles de ARNm de GSTS1 después de una inyección de 50  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el abdomen de las obreras (Yan et al. 2013). Los niveles de ARNm de GST también disminuyeron significativamente luego del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Además, la actividad GST en la abeja *A. mellifera* aumentó hasta 186% luego de la exposición a concentraciones subletales de acetamiprid, lo cual se atribuyó a una respuesta al estrés oxidativo producida por el insecticida (Badawy et al. 2015).

### 6.3.5. Actividad CAT

La actividad CAT no fue significativamente afectada por la exposición *in vivo* a la mayoría de las concentraciones subletales de clorpirifós o acetamiprid, tanto para adultos de CSL como PC1 y PC2. La actividad CAT es directamente regulada por la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fornazier et al. 2002). Sin embargo, la exposición de la polilla *Lymantria dispar* al OF metidatión (Aslanturk et al. 2011) y de la polilla *Galleria mellonella* al OF diclorvós (Kayış et al. 2015) indujeron aumentos en la actividad CAT. También se observó un aumento en la actividad CAT en *Pimpla turionella* a varias concentraciones subletales del OF diazinón, aunque los aumentos no fueron concentración dependiente (Kayış et al. 2012). Otros autores también reportaron cambios no consistentes en la actividad CAT luego de la exposición de *Oxya chinensis* a diferentes concentraciones de malatión y clorpirifós (Wu et al., 2011). Muchos insectos poseen peroxidasas generales que convierten el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en agua al oxidar un sustrato como GSH o ascorbato (Felton & Summers, 1995).

### 6.4.6. Actividad SOD

En el presente trabajo, no se encontraron diferencias significativas en las actividades SOD de CSL y PC1 expuestos a dosis subletales de clorpirifós. Por el contrario, la exposición aguda a concentraciones subletales de diclorvós aumentó la actividad SOD en

*G. mellonella* en forma dependiente de la concentración (Kayaş et al. 2015). Además, en *Spodoptera exigua* expuesta a las CL<sub>10</sub> y CL<sub>30</sub> del OF fenitrotión se observó una correlación positiva entre la actividad SOD y la supervivencia (Adamski et al. 2003). Los autores concluyeron que la toxicidad del insecticida puede ser beneficiada por el desequilibrio entre los radicales libres y antioxidantes. También se sugirió que la tolerancia a los piretroides en *Anopheles arabiensis* estaría asociada a un aumento de la expresión de genes de SOD (Muller et al. 2008).

### 6.3.7. Contenido de GSH

La exposición *in vivo* a clorpirifós produjo variaciones en el contenido de GSH, tanto en CSL como las poblaciones de campo, pero no se observó una clara dependencia con la concentración del insecticida. Los aumentos significativos en el contenido de GSH observados en CSL a las dos concentraciones más altas podrían indicar que el GSH es regenerado de su forma oxidada (GSSG) por la GR. A estas concentraciones, también se observó en adultos de CSL un aumento en la actividad GST, si bien las diferencias con el grupo control no fueron significativas. A diferencia de CSL, el contenido de GSH en las poblaciones de campo fue en general menor en los grupos tratados con clorpirifós comparados con el grupo control. La disminución en el contenido de GSH sugiere que esta molécula es utilizada como antioxidante o de que ocurrió un mal funcionamiento de su reciclado por GR.

Tanto en CSL como PC1, la exposición *in vivo* a concentraciones subletales de acetamiprid produjo una tendencia de aumento en el contenido de GSH, seguido de una disminución en la concentración más alta del insecticida. Los efectos de acetamiprid sobre la actividad ECOD mostraron una tendencia similar, tanto en CSL como PC1. Dado que CYP450 es capaz de generar EROS, estos resultados sugieren que el GSH estaría cumpliendo un mecanismo de protección frente al daño oxidativo generado por el aumento en la actividad de esta enzima.

En resumen, los resultados aquí presentados indican susceptibilidad de adultos de PC1 y PC2 al OF clorpirifós y de PC1 al NN acetamiprid. Aun así, la actividad basal de CarE y CYP450 fue entre dos y cuatro veces superior a la de CSL, ambos mecanismos previamente asociados a resistencia a metil azinfós, acetamiprid y tiacloprid en larvas neonatas de dichas poblaciones. La susceptibilidad de los adultos a dichos insecticidas

podría ser utilizada como complemento del control de neonatas. Más aún, el hecho de que las poblaciones de campo, en relación a CSL, no mostraron en general ventajas metabólicas en las exposiciones a concentraciones subletales de clorpirifós y acetamiprid, sería otro punto a favor de esta medida de control complementaria. Una o dos aplicaciones de la mezcla de feromonas e insecticida durante la temporada productiva disminuiría la presión de selección ejercida contra las neonatas. Por otro lado, los niveles mayores de actividad CarE en ambas poblaciones de campo podría poner en riesgo el uso actual de insecticidas que contienen grupos hidrolizables en sus estructuras como el novalurón, clorantraniliprole, spinetoram, metoxifenocide y abamectina.

## *Conclusiones*

---

## 7. CONCLUSIONES

- ✓ A nivel de la CL<sub>50</sub>, los adultos de las dos poblaciones de campo de *C. pomonella* aquí estudiadas fueron tan susceptibles al clorpirifós como la cepa de referencia CSL.
- ✓ A nivel de la CL<sub>95</sub>, los adultos de PC1 fueron casi seis veces más resistentes a acetamiprid que los de CSL.
- ✓ Los resultados de los ensayos de toxicidad y de inhibición *in vitro* sugieren que no hay diferencias en la actividad AChE de CSL, PC1 y PC2.
- ✓ No se encontraron evidencias de mutaciones que modifiquen el sitio de acción de los OFs en adultos de PC1.
- ✓ Las actividades basales de CarE y ECOD fueron significativamente mayores en ambas poblaciones de campo que en CSL.
- ✓ La exposición a bajas concentraciones de clorpirifós produjo un aumento en la actividad CarE, el cual fue significativamente superior en CSL.
- ✓ La actividad ECOD fue afectada por la exposición a clorpirifós y acetamiprid. En general, el clorpirifós produjo una disminución en la actividad de la enzima en función del incremento de la concentración del insecticida. Por el contrario, el acetamiprid causó un aumento en la actividad ECOD en función del incremento de la concentración.
- ✓ En general, las enzimas del sistema antioxidante evaluadas no fueron afectadas por la exposición a clorpirifós y acetamiprid.

## **8. RECOMENDACIONES**

Se recomienda para un manejo futuro de la plaga:

- ❖ Evitar o limitar el uso abusivo de plaguicidas con grupos hidrolizables.
  
- ❖ Realizar durante la temporada productiva una o dos aplicaciones de los microencapsulados de feromonas e insecticidas para el control de los individuos adultos.
  
- ❖ Profundizar estudios sobre efectos subletales relacionados con aspectos que disminuyan la reproducción.

## *Bibliografía*

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Adamski Z., Ziemnicki K., Fila K., Žikić, R. & Štajn A., 2003. Effects of long-term exposure to fenitrothion on *Spodoptera exigua* and *Tenebrio molitor* larval development and antioxidant enzyme activity. *Biological Letters*, 40: 43–52.
- Aguiar M., Masse R. & Gibbs B.F., 2005. Regulation of cytochrome P450 by posttranslational modification. *Drug Metabolism Reviews*, 37(2): 379–404.
- Ahmad M., Denholm I. & Bromilow R.H., 2006. Delayed cuticular penetration and enhanced metabolism of deltamethrin in pyrethroid-resistant strains of *Helicoverpa armigera* from China and Pakistan. *Pest Management Science*, 62(9): 805–10.
- Ahmad S., 1992. Biochemical defence of pro-oxidant plant allelochemicals by herbivorous insects. *Biochemical Systematics and Ecology*, 20(4): 269–296.
- Ahmad S., Pritsos C.A., Bowen S.M., Heisler C.R., Bloomquist G.J. & Pardini R.S., 1988. Antioxidant enzymes of larvae of the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*: Subcellular distribution and activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase. *Free Radical Research Communications* 4: 403–408.
- Aldridge W. N., & Reiner E., 1972. Enzyme inhibitors as substrates. Interactions of esterases with esters of organophosphorus and carbamic acids. Amsterdam: North-Holland Pub. Co. 281-295.
- Alix A., Cortesero A.M., Nénon J.P. & Anger J.P., 2001. Selectivity assessment of chlorfenvinphos reevaluated by including physiological and behavioral effects on an important beneficial insect. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 20(11): 2530–2536.
- Alon M., Alon F., Nauen R. & Morin S., 2008. Organophosphates' resistance in the B-biotype of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) is associated with a point mutation in an *ace1*-type acetylcholinesterase and overexpression of carboxylesterase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(10): 940–949.
- Alzogaray R.A., Fontán A. & Zerba E.N., 1997. Evaluation of hyperactivity produced by pyrethroid treatment on third instar nymphs of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 35(3): 323–333.

- Andreev D., Kreitman M., Phillips T.W., Beeman R.W. & French-Constant R.H., 1999. Multiple origins of cyclodiene insecticide resistance in *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Molecular Evolution*, 48(5): 615–624.
- Aronson A.I. & Shai Y., 2001. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiology Letters*, 195(1): 1-8.
- Aslanturk A., Kalender S., Uzunhisarcikli M. & Kalender Y., 2011. Effects of methidathion on antioxidant enzyme activities and malondialdehyde level in midgut tissues of *Lymantria dispar* (Lepidoptera) larvae. *Journal of the Entomological Research Society*, 13(3): 27–38.
- Aucoin R.R., Philogéne B.J.R. & Arnason J.T., 1991. Antioxidant enzymes as biochemical defenses against phototoxin-induced oxidative stress in three species of herbivorous lepidoptera. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 16(2): 139–152.
- Ausborn J., Wolf H., Mader W. & Kayser H., 2005. The insecticide pymetrozine selectively affects chordotonal mechanoreceptors. *Journal of Experimental Biology*, 208(23): 4451–4466.
- Badawy M.E.I, Nasr H.M. & Rabea E.I., 2014. Toxicity and biochemical changes in the honey bee *Apis mellifera* exposed to four insecticides under laboratory conditions. *Apidologie*, 46 (2): 177-193.
- Baek J.H., Kim J.I., Lee W.D., Chung B.K., Miyata, T. & Lee H.S., 2005. Identification and characterization of *ace-1*-type acetylcholinesterase likely associated with organophosphate resistance in *Plutella xylostella*. *Pesticide Biochemistry Physiology*, 81(3): 164–175.
- Barbehenn R.V., Bumgarner S.L., Roosen E.F. & Martin M.M., 2001. Antioxidant defenses in caterpillars: role of the ascorbate-recycling system in the midgut lumen. *Journal of Insect Physiology*, 47: 349–357.
- Bass C., Schroeder I., Turberg A., Field L.M., Williamson M.S., 2004. Identification of the Rdl mutation in laboratory and field strains of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *Pest Management Science*, 60(12): 1157–1162.

- Beers R.F. & Sizer I.W., 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, 195(1): 133–140.
- Bel Y., Wiesner P. & Kayser H., 2000. Candidate target mechanisms of the growth inhibitor cyromazine: studies of phenylalanine hydroxylase, puparial amino acids, and dihydrofolate reductase in dipteran insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 45(2): 69-78.
- Bloomquist J.R., 2001. GABA and glutamate receptors as biochemical sites for insecticide action. En *Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance*. Editor Ishaaya I. Springer. Berlin Heidelberg: 17–41.
- Bouvier J.C., Boivin T., Beslay D. & Sauphanor B., 2002. Age-dependent response to insecticides and enzymatic variation in susceptible and resistant codling moth larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 51(2): 55–66.
- Brown AWA, Pal K., 1971. The nature and characterization of resistance. En *Insecticide resistance in arthropods*. World Health Organization Monograph Series 38, Geneva, Switzerland: 9-44.
- Brown J.J., 1991. Diapause. En: *Tortricid pests, their biology, natural enemies and control*. Eds. Van der Geest L.P.S. & H.H. Evehuis. Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York-Tokio: 175-185.
- Bruce A., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., & Walter P., 2002. Membrane transport of small molecules and the electrical properties of membranes. En *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science .4th edition: 300-312.
- Brück E., Elbert A., Fischer R., Krueger S., Kühnhold J., Klueken M., Nauen R., Niebes F., Reckmann U., Schnorbach H., Steffens R., Waetermeulena X., 2009. Movento®, an innovative ambimobile insecticide for sucking insect pest control in agriculture: Biological profile and field performance. *Crop Protection*, 28(10): 838–844.
- Bush M.R., Abdel-Aal Y.A.I., & Rock G.C., 1993. Parathion resistance and esterase-activity in codling moth (Lepidoptera, Tortricidae) from North-Carolina. *Journal of Economic Entomology*, 86: 660–666.

- Büyükgüzel E., 2009. Evidence of oxidative and antioxidative responses by *Galleria mellonella* larvae to malathion. *Journal of Economic Entomology*, 102(1): 152–159.
- Camenzuli L., Scherlinger M. & Hungerbühler K., 2015. Local organochlorine pesticide concentrations in soil put into a global perspective. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 1-8
- Carvalho R.A., Omoto C., Field L.M., Williamson M.S., Bass C., 2013. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *PLoS One*, 17; 8 (4): e62268.
- Casida J.E. & Durkin, K.A., 2013. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual Review of Entomology*, 58(1): 99–117.
- Casida J.E., 2009. Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action. *Chemical research in toxicology*, 22(4): 609–619.
- Cassanelli S., Reyes M., Rault M., Manicardi C. & Sauphanor B., 2006. Acetylcholinesterase mutation in an insecticide-resistant population of the codling moth *Cydia pomonella* (L.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(8): 642–653.
- Chareonviriyaphap T., Bangs M. J., Suwonkerd W., Kongmee M., Corbel V. & Ngoen-Klan N., 2013. Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases in Thailand. *Parasites & vectors*, 6: 280.
- Charpentier A. & Fournier D., 2001. Levels of total acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster* in relation to insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 70(2): 100–107.
- Cichón L. & Fernández D. 1993. Susceptibilidad varietal de diferentes cultivares de pera en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén. Argentina. Ediciones INTA Alto Valle, Cmte. Guerrico.
- Cichón L., Fernández D. & Montagna M., 2006. Evolución del control de carpocapsa en los últimos veinticinco años. *Revista Fruticultura & Diversificación*, 51: 22-29.
- Cichón L., Garrido S., Lago J. & Fernández D. 2015. *Cydia pomonella* Linnaeus (Gusano de la pera y la manzana o carpocapsa). En Plagas cuarentenarias de frutales de la República Argentina. Ediciones INTA: 74-105.

- Cichón L., Rossini M., Garrido S., 2013a. Guía para el diseño de programas fitosanitarios en manzanos. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Cichón L.B., Soleño J., Anguiano O.L., Garrido S.A.S. & Montagna C.M., 2013b. Evaluation of cytochrome P450 activity in field populations of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) resistant to azinphosmethyl, acetamiprid, and thiacloprid. *Journal of Economic Entomology*, 106(2): 939–944.
- Claudianos C., Ranson H, Johnson R.M., Biswas S., Schuler M., Berenbaum M.R., Feyereisen R. & Oakeshott J. G., 2006. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology*, 15(5): 615–36.
- Cordova D., Benner E.A., Sacher M.D., Rauh J.J., Sopa J.S., Lahm G.P., Selby T.P., Stevenson T.M., Flexner L., Gutteridge S., Rhoades D.F., Wu L., Smith R.M. & Tao Y., 2006. Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 84(3): 196–214.
- Costa L.G, Giordano G., Guizzetti M. & Vitaloneet A., 2008. Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Frontiers in bioscience : a Journal and Virtual Library*, 13 (4): 1240–1249.
- Cui F., Lin Z., Wang H., Liu S., Chang H., Reeck G., Qiao C., Raymond M. and Kang L., 2011. Two single mutations commonly cause qualitative change of nonspecific carboxylesterases in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(1): 1–8.
- Cutler G.C., 2013. Insects, insecticides and hormesis: evidence and considerations for study. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*, 11(2): 154–77.
- Daborn P.J., Lumb C., Boey A., Wong W., Ffrench-Constant R.H. & Batterham P., 2007. Evaluating the insecticide resistance potential of eight *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes by transgenic over-expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(5): 512–519.

- Dary O., Georghiou G. P., Parsons E. & Pasteur N., 1990. Microplate adaptation of Gomori's assay for quantitative determination of general esterase activity in single insects. *Journal of Economic Entomology*, 83(6): 2187–2192.
- Davis B. J., 1964. Disc electrophoresis. Method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121:404-427.
- de Castro A.A., Correa A.S., Legaspi J.C., Guedes R.N., Serrao J.E. & Zanuncio J.C., 2013. Survival and behavior of the insecticide-exposed predators *Podisus nigrispinus* and *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae). *Chemosphere*, 93(6): 1043-1050
- De Cock A. & Degheele D., 1998. Buprofezin: A novel chitin synthesis inhibitor affecting specifically planthoppers, whiteflies and scale insects. En *Insecticides with Novel Modes of Action*. Editors Ishaaya I., Degheele D. Springer Berlin Heidelberg: 74–91.
- De Matteis F., 1974. Covalent binding of sulfur to microsomes and loss of cytochrome P-450 during the oxidative desulfuration of several chemicals. *Molecular Pharmacology*, 10: 849–854.
- Decourtye A., Devillers J., Genecque E., Le Menach K., Budzinski H., Cluzeau S. & Pham-Delégue M.H., 2005. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48(2): 242–50.
- del Río L.A., Sandalio L.M., Palma J.M., Bueno P. & Corpas F.J., 1992. Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radical Biology and Medicine*, 13: 557–580.
- Demaeght P., Osborne E.J., Odman-Naresh J., Grbić M., Nauen R., Merzendorfer H., Clark R.M. & Van Leeuwen T., 2014. High resolution genetic mapping uncovers chitin synthase-1 as the target-site of the structurally diverse mite growth inhibitors clofentezine, hexythiazox and etoxazole in *Tetranychus urticae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 51: 52–61.
- Desneux N., Decourtye A. & Delpuech J.M., 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology*, 52(1): 81–106.

- Dettbarn W.D., Yang Z.P. & Milatovic D., 1999. Different role of carboxylesterases in toxicity and tolerance to paraoxon and DFP. *Chemico-Biological Interactions*, 119-120: 445–454.
- Devasagayam T.P.A., Bolor K.K. & Ramasarma T., 2003. Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 40(5): 300–308.
- Devonshire A.L. & Sawicki R.M., 1979. Insecticide-resistant *Myzus persicae* as an example of evolution by gene duplication. *Nature*, 280 (5718): 140–141.
- Ding Y., Ortelli F., Rossiter L.C., Hemingway J. & Ranson H., 2003. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *BMC Genomics*, 4(1): 35.
- Dizdaroglu M., Jaruga P., Birincioglu M. & Rodriguez H., 2002. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(11): 1102–1115.
- Dong K., Du Y., Rinkevich F., Nomura Y., Xu P., Wang L., Silver K. & Zhorov B.S., 2014. Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 50: 1–17.
- Dunley J.E. & Welter S.C., 2000. Correlated insecticide cross-resistance in azinphos-methyl resistant codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Economic Entomology*, 93: 955–962.
- Dunley J.E., Brunner J.F., Doerr M.D. & Beers E.H., 2006. Resistance and cross-resistance in populations of leafrollers, *Choristoneura rosaceana* and *Pandemis pyrusana*, in Washington apples. *Journal of Insect Science*, 6 (14): 1-7.
- Ellman G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1): 70–7.
- Ellman G.L., Courtney D.K., Andres Jr. V. & Featherstone R. M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2): 88–95.
- Enayati A.A., Ranson H. & Hemingway J., 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*, 14(1):3–8.

- Fang S.M., 2012. Insect glutathione S-transferase: a review of comparative genomic studies and response to xenobiotics. *Bulletin of Insectology*, 65 (2): 265-271.
- Felton G.W. & Duffey S.S., 1991. Protective action of midgut catalase in lepidopteran larvae against oxidative plant defenses. *Journal of Chemical Ecology*, 17(9): 1715–1732.
- Felton G.W. & Summers C.B., 1995. Antioxidant systems in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 29(2): 187–197.
- Feng Q.-L., Davey K.G., Pang A.S.D., Primavera M., Ladd T.R., Zheng S.-C., Sohi S.S., Retnakaran A. & Palli S.R., 1999. Glutathione S-Transferase from the *Spruce Budworm*, *Choristoneura Fumiferana*: Identification, characterization, localization, cDNA cloning, and expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(9): 779–93.
- Feyereisen R., 1999. Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology*, 44: 507–533.
- Feyereisen R., 2005. Insect cytochrome P450. En *Comprehensive Molecular Insect Science*. Editors Gilbert L.I., Iatrou K, Gill S.S. Elsevier: 1–77.
- French-Constant R.H. & Bonning B.C., 1989. Rapid microtitre plate test distinguishes insecticide resistant acetylcholinesterase genotypes in the mosquitoes *Anopheles albimanus*, *An.nigerrimus* and *Culex pipiens*. *Medical and Veterinary Entomology*, 3(1): 9–16.
- French-Constant R.H. & Rocheleau T.A., 1993. *Drosophila* -Aminobutyric acid receptor gene rdl shows extensive alternative splicing. *Journal of Neurochemistry*, 60(6): 2323–2326.
- Field L.H. & Matheson T., 1998. Chordotonal organs of insects. *Advances in Insect Physiology*, 27: 1–228.
- Field L.M., Devonshire A.L., French-Constant R.H. & Forde B.G., 1989. Changes in DNA methylation are associated with loss of insecticide resistance in the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Sulz.). *FEBS Letters*, 243(2): 323–327.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2003. International code of conduct on the distribution and use of pesticides (revised version): adopted by the

- hundred and twenty-third session of the FAO Council in November 2002, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Forgash A.J., 1984. History, evolution and consequences of insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 22:178-186.
- Fornazier R.F., Ferreira R.R., Vitória A.P., Molina S.M.G., Lea P.J. & Azevedo R.A., 2002. Effects of cadmium on Antioxidant Enzyme Activities in Sugar Cane. *Biologia Plantarum*, 45 (1): 91–97.
- Forrester S.G., Beech R.N. & Prichard R.K., 2004. Agonist enhancement of macrocyclic lactone activity at a glutamate-gated chloride channel subunit from *Haemonchus contortus*. *Biochemical Pharmacology*, 67(6): 1019–1024.
- Fournier D., Bride J.M., Hoffmann F. & Karch F., 1992. Acetylcholinesterase. Two types of modifications confer resistance to insecticide. *Journal of Biological Chemistry*, 267(20): 14270–14274.
- Franck P., Siegwart M., Olivares J., Toubon J-F. & Lavigne C., 2012. Multiple origins of the sodium channel *kdr* mutations in codling moth populations. *PLoS ONE*, 7(8): e43543.
- Fridovich I., 1989. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(14): 7761–7764.
- Fuentes-Contreras E., Reyes M., Barros W. & Sauphanor B., 2007. Evaluation of azinphos-methyl resistance and activity of detoxifying enzymes in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) from central Chile. *Journal of Economic Entomology*, 100 (2): 551–556.
- Fukuto T.R., 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives*, 87: 245–254.
- FunBaPa, 2012. Memoria institucional [www.funbapa.org.ar/wp-content/uploads/2013/11/MEMORIA-2012-FINAL.pdf](http://www.funbapa.org.ar/wp-content/uploads/2013/11/MEMORIA-2012-FINAL.pdf)
- Galvan T.L., Koch R.L. & Hutchison W.D., 2005. Effects of spinosad and indoxacarb on survival, development, and reproduction of the multicolored Asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae). *Biological Control*, 34(1): 108–114.

- Gammon D.W., 1978. Neural effects of allethrin on the free walking cockroach *Periplaneta Americana*: An investigation using defined doses at 15 and 32°C. *Pesticide Science*, 9(1): 79–91.
- Gao J.-R. & Zhu K.Y., 2002. Increased expression of an acetylcholinesterase gene may confer organophosphate resistance in the greenbug, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 73(3): 164–173.
- Gao Q., Li M., Sheng C., Scott J.G. & Qiu X., 2012. Multiple cytochrome P450s overexpressed in pyrethroid resistant house flies (*Musca domestica*). *Pesticide Biochemistry Physiology*, 104:252–260.
- Gauthier M., 2010. State of the art on insect nicotinic acetylcholine receptor function in learning and memory. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 683: 97–115.
- George E. P.J. & Ambrose D.P., 2004. Impact of insecticides on the haemogram of *Rhynocoris kumarii* Ambrose & Livingstone (Hem. Reduviidae). *Journal of Applied Entomology*, 128(9-10): 600–604.
- Gong Y., Li T., Zhang L., Gao X. & Liu N., 2013. Permethrin induction of multiple cytochrome p450 genes in insecticide resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. *International Journal of Biological Sciences*, 9(9): 863-871.
- Grant D.F. & Hammock B.D., 1992. Genetic and molecular evidence for a trans-acting regulatory locus controlling glutathione S-transferase-2 expression in *Aedes aegypti*. *Molecular and general genetics: MGG*, 234(2): 169–176.
- Gressel J., 2011. Low pesticide rates may hasten the evolution of resistance by increasing mutation frequencies. *Pest Management Science*, 67(3): 253–257.
- Guedes R.N.C., Magalhães L.C. & Cosme L. V., 2009. Stimulatory sublethal response of a generalist predator to permethrin: hormesis, hormoligosis, or homeostatic regulation? *Journal of Economic Entomology*, 102(1): 170–176.
- Guedes R.N.C., Zhu K.Y., Dover B.A. & Kambhampati S., 1997. Partial characterization of phosphotriesterases from organophosphate-susceptible and resistant populations of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 57(2): 156-164.

- Guillemaud T., Makate N., Raymond M., Hirst B. & Callaghan A., 1997. Esterase gene amplification in *Culex pipiens*. *Insect Molecular Biology*, 6(4): 319–327.
- Gupta R.C & Milatovic D., 2014. Insecticides. En *Biomarkers in Toxicology*. Editor Gupta R. C. Elsevier. Academic Press: 389-407.
- Habig W.H., Pabst M.J. & Jakoby W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(22): 7130–7139.
- Halliwell B. & Gutteridge J.M., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology*, 186: 1–85.
- Halliwell B., 1989. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *British Journal of Experimental Pathology*, 70(6): 737–57.
- Hardstone M.C., Komagata O., Kasai S., Tomita T. & Scott G.J., 2010. Use of isogenic strains indicates CYP9M10 is linked to permethrin resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Insect Molecular Biology*, 19: 717–726.
- He Y., Zhao J., Zheng Y., Weng Q., Biondi A., Desneux N. & Wu K., 2013. Assessment of potential sublethal effects of various insecticides on key biological traits of the tobacco whitefly, *Bemisia tabaci*. *International Journal of Biological Sciences*, 9(3): 246-255.
- Hemingway J. & Ranson H., 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*, 45(1): 371–391.
- Hemingway J., Hawkes N.J., McCarroll L. & Ranson H., 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(7): 653–65.
- Hemingway J., Hawkes N.J., Prapanthadara L., Jayawardenal K.G. & Ranson H., 1998. The role of gene splicing, gene amplification and regulation in mosquito insecticide resistance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 353: 1695-1699.
- Henle E.S. & Linn, S., 1997. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, 272(31): 19095–19098.

- Hodgson E., 1983. Microsomal mono-oxygenases. En *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Editors Kerkut G. A. & Gilbert L. I. Pergamon Press, Oxford: 206-321.
- Hotelier T., Négre V., Marchot P. & Chatonnet A., 2010. Insecticide resistance through mutations in cholinesterases or carboxylesterases: data mining in the ESTHER database. *Journal of Pesticide Science*, 35(3): 315–320.
- Hotelier T., Renault L., Cousin X., Negre V., Marchot P. & Chatonnet A., 2004. ESTHER, the database of the alpha/beta-hydrolase fold superfamily of proteins. *Nucleic Acids Research*, 32(Database issue): D145–147.
- <http://www.rionegrotur.gob.ar/index.php?catID=117>
- Hunt D.W.A. & Smirle M.J., 1988. Partial inhibition of pheromone production in *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae) by polysubstrate monooxygenase inhibitors. *Journal of Chemical Ecology*, 14(2): 529–536
- Iftner D.C., Hall F.R. & Sturm M.M., 1986. Effects of residues of fenvalerate and permethrin on the feeding behaviour of *Tetranychus urticae* (Koch). *Pesticide Science*, 17(3): 242–248.
- Ingles P.J., Adams P.M., Knipple D.C. & Soderlund D.M., 1996. Characterization of voltage-sensitive sodium channel genecoding sequences from insecticide-susceptible and knockdown-resistant house fly strains. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 26(4): 319–326.
- INTA, 2006. Evolución del control de carpocapsa en los últimos veinticinco años. Revista Fruticultura & Diversificación N° 51. <http://inta.gob.ar/documentos/evolucion-del-control-de-carpocapsa-en-los-ultimos-veinticinco-anos>
- IRAC, Insecticide Resistance Action Committee, 2016. <http://www.iraconline.org> (accessed 22.09.16)
- Ishak I.H., Riveron J.M., Ibrahim S.S., Stott R., Longbottom J., Irving H. & Wondji C.S., 2016. The Cytochrome P450 gene CYP6P12 confers pyrethroid resistance in kdr-free Malaysian populations of the dengue vector *Aedes albopictus*. *Scientific Reports*, 6: 24707.

- Iwasa T., Motoyama N., Ambrose J.T. & Roe M.R., 2004. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection*, 23 (5):371–378.
- Işci M., Ay R., 2017. Determination of resistance and resistance mechanisms to thiacloprid in *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) populations collected from apple orchards in Isparta Province, Turkey. *Crop Protection*, 91 (1): 82-88.
- Jensen C.S., Garsdal L. & Baatrup E., 1997. Acetylcholinesterase inhibition and altered locomotor behavior in the carabid beetle *Pterostichus cupreus*. A linkage between biomarkers at two levels of biological complexity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(8): 1727–1732.
- Jeschke P. & Nauen R., 2008. Neonicotinoids-from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Management Science*, 64(11):1084-1098.
- Jokanovic M., 2001. Biotransformation of organophosphorus' compounds. *Toxicology*, 166: 139–160.
- Joseph P.D., Guengerich P.F. & Miners J.O., 2005. “Phase I and Phase II” drug metabolism: terminology that we should phase out? *Drug Metabolism Reviews*. 37(4):575-80.
- Kanzok S.M., 2001. Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 291(5504): 643–646.
- Karatolos N., Williamson M.S., Denholm I., Gorman K., French-Constant R. H. & Bass C., 2012. Over-expression of a cytochrome P450 is associated with resistance to pyriproxyfen in the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. *PLoS ONE*, 7(2): e31077.
- Karise R., Viik E. & Mänd M., 2007. Impact of alpha-cypermethrin on honey bees foraging on spring oilseed rape (*Brassica napus*) flowers in field conditions. *Pest Management Science*, 63(11): 1085–1089.
- Karunker I., Benting J., Lueke B., Ponge T., Nauen R., Roditakis E., Vontas J., Gorman K., Denholm I. & Morin S., 2008. Over-expression of cytochrome P450 CYP6CM1 is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of *Bemisia*

- tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 38: 634–634.
- Kavitha P. & Venkateswara Rao J., 2007. Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87(2): 182–188.
- Kayis, T., Coskun M., Dursun O. & Emre I., 2015. Alterations in antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation, and ion balance induced by dichlorvos in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 108(4): 570–574.
- Kirst H.A., 2010. The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research. *The Journal of Antibiotics*, 63(3): 101–111.
- Knight A.L., 2010a. Cross-resistance between azinphos-methyl and acetamiprid in populations of codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae), from Washington State. *Pest Management Science*, 66(8): 865–874.
- Knight A.L., 2010b. Targeting *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) adults with low-volume applications of insecticides alone and in combination with sex pheromone. *Pest Management Science*, 66(7): 709-717.
- Koganemaru R., Miller D.M. & Adelman Z.N., 2013. Robust cuticular penetration resistance in the common bed bug (*Cimex lectularius* L.) correlates with increased steady-state transcript levels of CPR-type cuticle protein genes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 106(3): 190–197.
- Kontsedalov S., Weintraub P.G., Horowitz A.R. & Ishaaya I., 1998. Effects of insecticides on immature and adult western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) in Israel. *Journal of Economic Entomology*, 91(5): 1067-1071.
- Krishnan N. & Kodrík D., 2011. Endocrine Control of Oxidative Stress in Insects. En *Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecular Aspects of Cell Signaling*. Editors Farooqui T., Farooqui A.A. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA: 259–270.

- Krishnan N., Kodrík D., Kłudkiewicz B. & Sehnal F., 2009. Glutathione-ascorbic acid redox cycle and thioredoxin reductase activity in the digestive tract of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(3): 180–188.
- Kushwah R.B.S., Dykes C.L., Kapoor N., Adak T. & Singh O.P., 2015. Pyrethroid-resistance and presence of two knockdown resistance (*kdr*) mutations, F1534c and a novel mutation T1520I, in Indian *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(1): e3332
- Lascano C.I. & Anguiano O.L., 2011. Modo de acción de los plaguicidas. En *Clasificación y Toxicología de Plaguicidas*. Eds. Anguiano O.L. & Montagna C.M. Educo, Editorial de la Universidad Nacional del Comahue. Neuquén Argentina.187-233.
- Le Goff G., Hamon A., Berge J.B. & Amichot M., 2005. Resistance to fipronil in *Drosophila simulans*: influence of two point mutations in the RDL GABA receptor subunit. *Journal of Neurochemistry*, 92(6): 1295-1305.
- Lee C.Y., 2000. Sublethal effects of insecticides on longevity, fecundity and behaviour of insect pests: a review. *Journal of Bioscience*, 11: 107-12
- Lee C.Y., Yap H.H. & Chong N.L., 1998. Sublethal effects of deltamethrin and propoxur on longevity and reproduction of German cockroaches, *Blattella germanica*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 89: 137-145.
- Li B., Wang D., Zhao H. & Shen W., 2010. Comparative analysis of two acetylcholinesterase genes of *Bombyx mandarina* and *Bombyx mori*. *African Journal of Biotechnology*, 9(49): 8477-8485.
- Li X., Schuler M.A. & Berenbaum M.R., 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology* 52: 231-253.
- Li Y., Farnsworth C.A., Coppin C.W., Teese M.G., Liu J.W., Scott C., Zhang X., Russell R.J. & Oakeshott J.G., 2013. Organophosphate and pyrethroid hydrolase activities of mutant esterases from the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. *PloS one*, 8(10): e77685.
- Liming T., Mingan S., Jiangzhong Y., Peijun Z., Chuanxi Z. & Zhenhua T., 2006. Resistance pattern and point mutations of insensitive acetylcholinesterase in a

- carbamate-resistant strain of housefly (*Musca domestica*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86(1):1-6.
- Lin Y., Jin T., Zeng L. & Lu Y., 2012. Cuticular penetration of  $\beta$ -cypermethrin in insecticide-susceptible and resistant strains of *Bactrocera dorsalis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103(3): 189–193.
- Little E.E. & Finger S.E., 1990. Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9(1): 13–19.
- Little E.E., 1990. Behavioral toxicology: Stimulating challenges for a growing discipline. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9(1):1–2.
- Liu J., Yang, X. & Zhang, Y., 2014. Characterization of a lambda-cyhalothrin metabolizing glutathione S-transferase CpGSTd1 from *Cydia pomonella* (L.). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(21): 8947–62.
- Liu N., Li T., Reid W.R., Yang T., Zhang L., 2011. Multiple cytochrome P450 genes: Their constitutive overexpression and permethrin induction in insecticide resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. *PLoS ONE*, 6(8): e23403.
- Liu T.-X. & Chen, T., 2001. Effects of the insect growth regulator fenoxycarb on immature *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptera: Chrysopidae). *The Florida Entomologist*, 84(4): 628-633.
- Liu Z., Yao X., & Zhang Y., 2008. Insect nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs): Important amino acid residues contributing to neonicotinoid insecticides selectivity and resistance. *African Journal of Biotechnology*, 7(25): 4935–4939.
- Livingstone D.R., Lips F., Garcia Martinez P. & Pipe R. K., 1992. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 112(2): 265–276.
- Lockwood J.A., Byford R.L., Story R.N., Sparks T.C. & Quisenberry S.S., 1985. Behavioral resistance to the pyrethroids in the horn fly, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *Environmental Entomology*, 14(6): 873–880.
- Loewy R.M., Monza L.B., Kirs V.E. & Savini M.C., 2011. Pesticide distribution in an agricultural environment in Argentina. *Journal of Environmental Science and*

- Health. Part B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 46(8): 662–670.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265–275.
- Maienfisch P., 2012. Selective feeding blockers: pymetrozine, flonicamid, and pyrifluquinazon. En *Modern Crop Protection Compounds*. Editors Krämer W., Schirmer U., Jenschke P., & Witschel M. New York: John Wiley and Sons: 1327–1346.
- Mannervik B., Alin P., Guthenberg C., Jensson H. & Warholm M., 1985. Microsomes and drug oxidations. Boobis A. R., Caldwell, J., de Matteis, F. & Elcombe C. R., eds. En *Biological Oxidation Systems*. Taylor & Francis, London: 221-228.
- Markussen M.D.K. & Kriestensen M., 2010. Cytochrome P450 monooxygenasemediated neonicotinoid resistance in the house fly *Musca domestica* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 98(1):50-58.
- Martinou A.F., Seraphides N. & Stavrinos M.C., 2014. Lethal and behavioral effects of pesticides on the insect predator *Macrolophus pygmaeus*. *Chemosphere*; 96:167-173.
- Mathenge E.M., Gimnig J.E., Kolczak M., Ombok M., Irungu L.W. & Hawley W.A., 2001. Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behavior, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in western Kenya. *Journal of Medical Entomology*, 38(4): 531–6.
- Mathews M.C., Summers C.B. & Felton G.W., 1997. Ascorbate peroxidase: A novel antioxidant enzyme in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 34(1): 57–68.
- Medina P., Budia F., del Estal P. & Viñuela E., 2004. Influence of azadirachtin, a botanical insecticide, on *Chrysoperla carnea* (Stephens) reproduction: toxicity and ultrastructural approach. *Journal of Economic Entomology*, 97(1): 43–50.
- Meister A. & Anderson M.E., 1983. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52: (7)11–760.
- Meister A., 1992. Biosynthesis and function of glutathione, an essential biofactor. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 1–6.

- Menzio P., Shi M.A., Lougarre A., Tang Z.H., & Fournier D, 2004. Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations. *BMC Evolutionary Biology*, 4: 4.
- Metcalf C.L. & Flint W.P., 1965. Insectos destructivos e insectos útiles, sus costumbres y su control. Ed. Compañía Editorial Continental S.A., México: 1208.
- Metcalf R.L., 2000. Insect Control. En *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 703-769.
- Migdal C. & Serres M., 2011. Reactive oxygen species and oxidative stress. *Médecine Sciences: M/S*, 27(4):405-412.
- Minakuchi C., Inano Y., Shi X., Song D., Zhang Y., Miura K., Miyata T., Gao X., Tanaka T., Sonoda S., 2013. Neonicotinoid resistance and cDNA sequences of nicotinic acetylcholine receptor subunits of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Applied Entomology and Zoology*, 48 (4): 507–513.
- Misra H.P. & Fridovich I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 247(10): 3170–3175.
- Mitchell M.J., Ahmad S. & Pardini R.S., 1991. Purification and properties of a highly active catalase from cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. *Insect Biochemistry*, 21(6): 641–646.
- Mitchell S.N., Stevenson B.J., Müller P., Wilding C.S., Egyir-Yawson A., Field S.G., Hemingway J., Paine M.J., Ranson H. & Donnelly M.J., 2012. Identification and validation of a gene causing cross-resistance between insecticide classes in *Anopheles gambiae* from Ghana. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*, 109:6147–6152.
- Montella I.R., Schama R. and Valle D., 2012. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance - A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107 (4): 437–449.

- Morel Y. & Barouki R., 1998. Down-regulation of cytochrome P450 1A1 gene promoter by oxidative stress: critical contribution of nuclear factor 1. *Journal of Biological Chemistry*, 273(41): 26969–26976.
- Moretti A.N., Zerba E.N. & Alzogaray R.A., 2013. Behavioral and toxicological Responses of *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) to 10 Monoterpene alcohols. *Journal of Medical Entomology*, 50(5): 1046–1054.
- Mostafalou S. & Abdollahi M., 2013. Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 268(2): 157–177.
- Mota-Sanchez D., Wise J.C., Poppen R.V., Gut L.J. & Hollingworth R.M., 2008. Resistance of codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae), larvae in Michigan to insecticides with different modes of action and the impact on field residual activity. *Pest Management Science*, 64: 881– 890.
- Mouchet J., Carnevale P. & Manguin S., 2008. Biodiversity of malaria in the world. Editor John Libbey Eurotext. Montrouge, France. p. 464
- Muller P., Chouaibou M., Pignatelli P., Etang J., Walker E.D., Donnelly M.J., Simard F. & Ranson H., 2008. Pyrethroid tolerance is associated with elevated expression of antioxidants and agricultural practice in *Anopheles arabiensis* sampled from an area of cotton fields in Northern Cameroon. *Molecular Ecology*, 17: 1145–1155.
- Müller U., 2002. Learning in honeybees: from molecules to behaviour. *Zoology (Jena)*, 105(4):313–320.
- Mutero A. Pralavorio M., Bride J.M., & Fournieret D., 1994. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(13): 5922–5926.
- Mutero A. & Fournier D., 1992. Post-translational modifications of *Drosophila* acetylcholinesterase. In vitro mutagenesis and expression in *Xenopus* oocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(3): 1695–700.
- Muthukrishnan S., Merzendorfer H., Arakane Y. & Kramer K.J., 2012. Chitin metabolism in insects. En *Comprehensive Molecular Insect Science* .Ed.Gilberts L.I.. Academic Press, London: 193–235.

- Nabeshima T., Mori A., Kozaki T., Iwata Y., Hidoh O., Harada S., Kasai S., Severson D.W., Kono Y. & Tomita T., 2004. An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(3): 794–801.
- Nahmias J.A. & Bewley G.C., 1984. Characterization of catalase purified from *Drosophila melanogaster* by hydrophobic interaction chromatography. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 77(2): 355–364.
- Nansen C., Baissac O., Nansen M., Powis K. & Baker G., 2016. Behavioral avoidance - will physiological insecticide resistance level of insect strains affect their oviposition and movement responses? *PLoS ONE*, 11(3) e0149994.
- Nardini M. & Dijkstra, B.W., 1999. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current opinion in structural biology*, 9(6): 732–737.
- Nardini L., Christian R. N., Coetzer N., Ranson H., Coetzee M. & Koekemoer L.L., 2012. Detoxification enzymes associated with insecticide resistance in laboratory strains of *Anopheles arabiensis* of different geographic origin. *Parasites & Vectors*, 5(1):1-12.
- Nauen R. & Bretschneider T., 2002. New modes of action of insecticides. *Pesticide Outlook*, 13(6): 241–245.
- Nauen R., 2005. Spirodiclofen: Mode of action and resistance risk assessment in Tetranychid pest mites. *Journal of Pesticide Science*, 30(3):272
- Nebert D.W., Nelson D.R. & Feyereisen R., 1989. Evolution of the cytochrome P450 genes. *Xenobiotica*, 19(10): 1149–1160.
- Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J.J., Feyereisen R., Waxman D.J., Waterman M.R., Gotoh O., Coon M.J., Estabrook R.W., Gunsalus I.C. & Nebert D.W., 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6(1): 1–42.
- Nesterov A., Spalthoff C., Kandasamy R., Katana R., Rankl N.B., Andres M., Jahde P., Dorsch J.A., Stam L.F., Braun F.J., Warren B., Salgado V.L. & Gopfert M.C., 2015. TRP Channels in Insect Stretch Receptors as Insecticide Targets. *Neuron*, 86(3): 665-671.

- Newcomb R.D., Campbell P.M., Ollis D.L., Cheah E., Russell R.J. & Oakeshott J.G., 1997. A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(14): 7464–7468.
- Ninsin K.D. & Miyata T., 2003. Monitoring acetamiprid resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Applied Entomology and Zoology*, 38(4):517-521.
- Oakeshott J.G., Claudianos C., Campbell P.M., Newcomb R.D. & Russell R.J., 2010. Biochemical genetics and genomics of insect esterases. In: *Insect Pharmacology: Channels, Receptors, Toxins and Enzymes*. Editors Gilbert L.I., Gill S.S. London, U.K. Elsevier: 229–301.
- Oakeshott J.G., Claudianos C., Russell R.J. & Robin G.C., 1999. Carboxyl/cholinesterases: a case study of the evolution of a successful multigene family. *BioEssays*, 21(12): 1031–1042.
- Oakeshott J.G., Claudianos P.M., Campbell R.D., Newcomb & Russell R. J., 2005. Biochemical genetics and genomics of insect esterases. En *Comprehensive Molecular Insect Science*. Ed. Gilbert L.I., Iatrou K. & Gill S.S. Amsterdam, The Netherlands. Elsevier. pp. 309–381
- Omura T., 2006. Mitochondrial P450s. *Chemico-Biological Interactions*, 163(1-2): 86–93.
- Orr G.L., Orr N., Cornfield L., Gole J.W.D. & Downer R.G.H., 1990. Interaction of formamidine pesticides with insect neural octopamine receptors: effects on radioligand binding and cyclic AMP production. *Pest Management Science*, 30(3): 285-294.
- Pan Y., Guo H. & Gao X., 2009. Carboxylesterase activity, cDNA sequence, and gene expression in malathion susceptible and resistant strains of the cotton aphid, *Aphis gossypii*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 152(3): 266-270.
- Paton M.G., Karunaratne S.H., Giakoumaki E., Roberts N., & Hemingway J., 2000. Quantitative analysis of gene amplification in insecticide-resistant *Culex* mosquitoes. *Biochemical Journal*, 346: 17–24.

- Pham-Delégue M. & Decourtye A., 2002. The proboscis extension response. In Honey Bees. *CRC Press*, 67–84.
- Piraneo T.G., Bull J., Morales M.A., Lavine L.C., Walsh D.B. & Zhu F., 2015. Molecular mechanisms of *Tetranychus urticae* chemical adaptation in hop fields. *Scientific Reports*, 5, 17090.
- Plapp F.Jr. & Wang T.C., 1983. Genetic origins of insecticide resistance. *Pest Resistance to Pesticides* Eds. Georghiou G.P. & Saito T., Plenum Press, New York. 47–70.
- Porter T.D. & Coon M.J., 1991. Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(21): 13469–13472.
- Potikasikorn J., Chareonviriyaphap T., Bangs M.J. & Prabaripai A., 2005. Behavioral responses to DDT and pyrethroids between *Anopheles minimus* species A and C, malaria vectors in Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(2): 343–349.
- Poupardin R., Riaz M.A., Vontas J., David J.P. & Reynaud S., 2010. Transcription profiling of eleven cytochrome P450s potentially involved in xenobiotic metabolism in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*, 19(2): 185–193.
- Poupardin R., Srisukontarat W., Yunta C. & Ranson H., 2014. Identification of carboxylesterase genes implicated in temephos resistance in the dengue vector *Aedes Aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(3): e2743.
- Prestwich G.D., 1994. Insect Lipids: Chemistry, Biochemistry and Biology. Stanley-Samuels David W., Nelson Dennis R. *The Quarterly Review of Biology*, 69(2): 264-265.
- Punta M., Penny C., Coghill R., Eberhardt Y., Mistry J., Tate J., Boursnell C., Pang N., Forslund K., Ceric G., Clements J., Heger A., Holm L., Sonnhammer E.L. L., Eddy S.R., Bateman A. & Finn R.D., 2012. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 40 (Database issue): D290–301.
- Qin G.H., Liu T., Guo Y.P., Zhang X.Y., Ma E.B. & Zhang J.Z., 2014. Effects of chlorpyrifos on glutathione S transferase in migratory locust, *Locusta migratoria*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 109: 1–5.

- Ranson H., Claudianos C., Ortelli F., Abgrall C., Hemingway J., Sharakhova M.V., Unger M.F., Collins F.H. & Feyereisen R., 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science*, 298 (5591): 179–81.
- Ranson H. & Hemingway J., 2005. Glutathione transferases. En: Comprehensive molecular insect science – Pharmacology. Ed. Gilbert L.I., Iatrou K., Gill S.S. Amsterdam: Elsevier. pp. 383–402.
- Ranson H., N'guessan R., Lines J., Moiroux N., Nkuni Z & Corbel V., 2011. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends in Parasitology*, 27(2):91-98.
- Ranson H., Rossiter L., Ortelli F., Jensen B., Wang X., Roth C.W., Collins F.H., & Hemingway J., 2001. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *The Biochemical Journal*, 359(2): 295–304.
- Rauch N. & Nauen R., 2003. Identification of biochemical markers linked to neonicotinoid cross resistance in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 54(4):165-176.
- Reed J.R., Vanderwel D., Choi S., Pomonis J.G., Reitz R.C. & Blomquist G.J., 1994. Unusual mechanism of hydrocarbon formation in the housefly: Cytochrome P450 converts aldehyde to the sex pheromone component (Z)-9-tricosene and CO<sub>2</sub>. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 91(21): 10000–10004.
- Reiner E., 1993. Recommendations of the IUBMB Nomenclature Committee: comments concerning classification and nomenclature of esterases hydrolysing organophosphorus compounds. *Chemico-Biological Interactions*, 87(1-3): 15-16.
- Remnant E.J., Good R.T., Schmidt J.M., Lumb C., Robin C., Daborn P.J. & Batterham P., 2013. Gene duplication in the major insecticide target site, Rdl, in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(36): 14705-14710.
- Revuelta L., Piulachs M.D., Belles X., Castanera P., Ortego F., Diaz-Ruiz J.R., Hernandez-Crespo P. & Tenllado F., 2009. RNAi of *ace1* and *ace2* in *Blattella germanica*

- reveals their differential contribution to acetylcholinesterase activity and sensitivity to insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(12): 913-919.
- Reyes M., Barros-Parada W., Ramírez C.C., Fuentes-Contreras E., 2015. Organophosphate resistance and its main mechanism in populations of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) from central Chile. *Journal of Economic Entomology*, 108(1): 277–285.
- Reyes M., Collange B., Rault M., Casanelli S. & Sauphanor B., 2011. Combined detoxification mechanisms and target mutation fail to confer a high level of resistance to organophosphates in *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99: 25–32.
- Reyes M., Franck P., Charmillot P.J., Ioriatti C., Olivares, J., Pasqualini E. & Sauphanor B., 2007. Diversity of insecticide resistance mechanisms and spectrum in European populations of the codling moth, *Cydia pomonella*. *Pest Management Science*, 63: 890–902.
- Rice-Evans C. and Burdon R., 1993. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Progress in Lipid Research*, 32(1): 71–110.
- Richter C. & Schweizer M., 1997. Oxidative Stress in Mitochondria. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 34: 169–200.
- Richter R., Otto D. & Mengers H.J., 1989. Insecticide compounds, acting on the acetylcholine receptor of the insect nervous system. En *Degradation of pesticides, desiccation and defoliation, Ach-receptors as targets*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 157-197.
- Riddiford L.M., 2008. Juvenile hormone action: a 2007 perspective. *Journal of Insect Physiology*, 54(6): 895–901.
- Riddiford L.M., Hiruma K., Zhou X. & Nelson C.A., 2003. Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(12): 1327–1338.
- Rinkevich F.D., Du Y. & Dong K., 2013. Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 106: 93–100.

- Ritthison W., Tainchum K., Manguin S., Bangs M.J. & Chareonviriyaphap T., 2014. Biting Patterns and Host Preference of *Anopheles epiroticus* in Chang Island, Trat Province, eastern Thailand. *Journal of Vector Ecology*, 39(2):361-371.
- Rivero Osimani V.L., Valdez S.R., Guiñazú N. & Magnarelliet G., 2016. Alteration of syncytiotrophoblast mitochondria function and endothelial nitric oxide synthase expression in the placenta of rural residents. *Reproductive Toxicology*, 61: 47–57.
- Roberts D. R., Alecrim W.D., Hshieh P., Grieco J.P., Bangs M., Andre R.G., & Chareonviriyaphap T., 2000. A probability model of vector behavior: effects of DDT repellency, irritability, and toxicity in malaria control. *Journal of Vector Ecology*, 25(1): 48–61.
- Rodríguez M.A., Bosch D. & Avilla J., 2011. Resistance of Spanish codling moth (*Cydia pomonella*) populations to insecticides and activity of detoxifying enzymatic systems. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 138: 184–192.
- Rodriguez M.A., Bosch D., Sauphanor B. & Avilla J., 2010. Susceptibility to organophosphate insecticides and activity of detoxifying enzymes in Spanish populations of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Economic Entomology*, 103(2): 482–491.
- Rosario-Cruz R. & Domínguez-García D. I., 2016. Biological and Biochemical Bases of Pesticides Resistance in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. En *Insecticides Resistance*. Editor. Prof. Stanislav Trdan, InTech: 307-320.
- Ross M.H., 1992. Differences in the response of German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) field strains to vapors of pyrethroid formulations. *Journal of Economic Entomology*, 85(1): 123–129.
- Ross M.H., 1998. Response of behaviorally resistant German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) to the active ingredient in a commercial bait. *Journal of Economic Entomology*, 91(1): 150–152.
- Salerno G., Colazza S. & Conti E., 2002. Sub-lethal effects of deltamethrin on walking behaviour and response to host kairomone of the egg parasitoid *Trissolcus basalis*. *Pest Management Science*, 58: 663–668.

- Salgado V.L., 1998. Studies on the Mode of Action of Spinosad: Insect Symptoms and Physiological Correlates. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 60(2): 91–102.
- Sanchez E.E. & Villareal P., 2010. Programa Nacional de Frutales. INTA. Cadena de Pepita. [http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta\\_programa\\_nacional\\_frutales\\_cadena\\_frutales\\_de\\_pe.pdf](http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_programa_nacional_frutales_cadena_frutales_de_pe.pdf)
- Scott J.G. & Scott J.G., 2008. Insect cytochrome P450s: Thinking beyond detoxification. Research Signpost India Recent Advances. *Insect Physiology Toxicology and Molecular Biology*, 37661(2): 117–124.
- Scott J.G., 1991. Insecticide resistance in insects. En *Handbook of Pest Management in Agriculture*. Ed. Pimentel D. CRC Press, Boca Raton, 2: 663.
- Sheldeshova G., 1967. Ecological factors determining distribution of codling moth, *Laspeyresia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) in northern and southern hemispheres. *Entomological Review*, 46:349-361.
- Shi H., Pei L., Gu S., Zhu S., Wang Y., Zhang Y. & Li B., 2012. Glutathione S-transferase (GST) genes in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and comparative analysis with five additional insects. *Genomics*, 100(5): 327-335.
- Silva A.X., Jander G., Samaniego H., Ramsey J.S., Figueroa C.C., 2012. Insecticide resistance mechanisms in the green peach aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) I: A transcriptomic survey. *PLoS One*, 7(6):e36366.
- Şimşek M. & Özkan C., 2015. The side effects of insecticide efficient biocidals to beneficial insects. *Turkish Journal of Occupational / Environmental Medicine and Safety*, 1(2) 2.
- Smilanich A.M. & Dyer L.A., 2012. Effects of banana plantation pesticides on the immune response of lepidopteran larvae and their parasitoid natural enemies. *Insects*, 3(4): 616–628.
- Söderhäll K. & Cerenius L., 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 10(1): 23–28.
- Soleño J., 2011. Resistencia a insecticidas. En *Clasificación y Toxicología de Plaguicidas*. Eds. Anguiano O.L. & Montagna C.M. Educo, Editorial de la Universidad Nacional del Comahue. Neuquén Argentina.341-371.

- Soleño J., 2009. Evaluación de la toxicidad de insecticidas en poblaciones de *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) provenientes del Valle de Río Negro y Neuquén. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas Orientación Biológica. Universidad Nacional Del Comahue. Neuquén.
- Soleño J., Anguiano L., Pechen de D'Angelo A.M., Cichón L., Fernandez D. and Montagna C., 2008. Toxicological and biochemical response to azinphos-methyl in *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) among orchards from the Argentinian Patagonia. *Pest Management Science*, 64: 964–970.
- Soleño J., Anguiano O.L., Cichón L.B., Garrido S.A. & Montagna C.M., 2012. Geographic variability in response to azinphos-methyl in field-collected populations of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) from Argentina. *Pest Management Science*, 68(11): 1451-1457.
- Soltani N., Lechekhab H. & Smaghe G., 2009. Impact of the insect growth regulator diflubenzuron on biochemical composition of cuticle of the shrimp *Penaeus kerathurus*. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 74(1): 137-141.
- Sparks T.C. & Nauen R., 2015. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121: 122–128.
- Stadtman E.R. & Levine R.L., 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino acids*, 25(3-4): 207–18.
- Strode C., Wondji C.S., David J.P., Hawkes N.J., Lumjuan N., Nelson D.R., Drane D.R., Karunaratne S.H., Hemingway J., Black W.C. & Ranson H., 2008. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(1): 113–23.
- Strolin-Benedetti M., Brogin G., Bani M., Oesch F. & Hengstler J.G., 1999. Association of cytochrome P450 induction with oxidative stress in vivo as evidenced by 3-hydroxylation of salicylate. *Xenobiotica*, 29(11): 1171-1180.
- Suchail S., Guez D. & Belzunces L.P., 2001. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 20(11): 2482–2486.

- Tabashnik B.E., Mota-Sanchez D., Whalon M.E., Hollingworth R.M., Carrière Y., 2014. Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides. *Journal of Economic Entomology*, 107(2): 496–507.
- Tahedl H. & Häder D.P., 2001. Automated biomonitoring using real time movement analysis of *Euglena gracilis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 48(2): 161–169.
- Tail G., Kara F.Z., Doumandji-Mitiche B. & Porcheron P., 2015. The effects of diflubenzuron on the cuticle and on hemolymphatic ecdysteroids of fifth instar nymphs of the Desert Locust, *Schistocerca Gregaria* (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Orthoptera Research*, 24(2): 77-81.
- Tang A.H. & Tu C.P., 1994. Biochemical characterization of *Drosophila* glutathione S-transferases D1 and D21. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(45): 27876–84.
- Tang A.H. & Tu C.P., 1995. Pentobarbital-induced changes in *Drosophila* glutathione S-transferase D21 mRNA stability. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(23): 13819–13825.
- Terriere L.C. & Yu S.J., 1974. Induction of detoxifying enzymes in insects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22(3): 366–373.
- Terriere L.C., 1984. Induction of detoxication enzymes in insects. *Annual Review of Entomology*, 29:71–88.
- Tisler A.M. & Zehnder G.W., 1990. Insecticide resistance in the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) on the eastern shore of Virginia. *Journal of Economic Entomology*. 83: 666–671.
- Tomé H.V., Pascini T.V., Dângelo A.C., Guedes N.C. & Martins G.F., Tales V., 2014. Survival and swimming behavior of insecticide-exposed larvae and pupae of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*, 7(1): 195.
- Tomizawa M. & Casida J.E., 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45(1): 247–268.
- Tompkins L.M. & Wallace A.D., 2007. Mechanisms of cytochrome P450 induction. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 21(4):176–181.

- Truman J.W. & Riddiford L.M., 2002. Endocrine insights into the evolution of metamorphosis in insects. *Annual Review of Entomology*, 47: 467–500.
- Van Petegem F., 2012. Ryanodine receptors: structure and function. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(38): 31624–31632.
- Vaughan A. & Hemingway J., 1995. Mosquito carboxylesterase est alpha 2(1) (A2). Cloning and sequence of the full-length cDNA for a major insecticide resistance gene worldwide in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(28): 17044–17049.
- Vilanova E. & Sogorb M.A., 1999. The role of phosphotriesterases in the detoxication of organophosphorus compounds. *Critical Reviews in Toxicology*; 29(1): 21-57.
- Vontas J., David J.P., Nikou D., Hemingway J., Christophides G.K., Louis C. & Ranson H., 2007. Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensi* using cross-species microarray hybridization. *Insect Molecular Biology*, 16(3): 315-324.
- Vontas J.G., Small G.J. & Hemingway J., 2001. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *The Biochemical Journal*, 357: 65-72.
- Vontas J.G., Small G.J., Nikou D.C., Ranson H., Hemingway J., 2002. Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *The Biochemical Journal*, 362: 329-337.
- Voudouris C.C., Sauphanor B., Franck P., Reyes M., Mamuris Z., Tsitsipis J.A., Vontas J., Margaritopoulos J.T., 2011. Insecticide resistance status of the codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) from Greece. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100: 229–238.
- Walsh S.B., Dolden T.A., Moores G.D., Kristensen M., Lewis T., Devonshire A.L. & Williamson M.S., 2001. Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *The Biochemical Journal*, 359(1):175–81.

- Wang H., Coates B.S., Chen H, Sappington T.W., Guillemaud T. & Siegfried B.D., 2013. Role of a gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor mutation in the evolution and spread of *Diabrotica virgifera virgifera* resistance to cyclodiene insecticides. *Insect Molecular Biology*, 22(5): 473-484.
- Wang J.Y., McCommas S. & Syvanen M., 1991. Molecular cloning of a glutathione S-transferase overproduced in an insecticide-resistant strain of the housefly (*Musca domestica*). *Molecular and General Genetics, MGG*, 227(2): 260–266.
- Wang X, Gao K., Wu P., Qin G., Liu T. & Guo X., 2011. Molecular cloning of a phosphotriesterase-related protein gene of silkworm and its expression analysis in the silkworm infected with *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus. *Agricultural Sciences*, 2(4): 406-412.
- Wei S.H., Clark A.G. & Syvanen M., 2001. Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31 (12): 1145-1153.
- Weill M., Fort P., Berthomieu A., Pierre Dubois M., Pasteur N. & Raymondet M., 2002. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila*. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 269(1504): 2007–2016.
- Weill M., Malcolm C., Chandre F., Mogensen K., Berthomieu A., Marquine M. & Raymond M., 2004. The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Molecular Biology*, 13(1): 1–7.
- Wen Z. & Scott J.G., 2001. Cytochrome P450 CYP6L1 is specifically expressed in the reproductive tissues of adult male German cockroaches, *Blattella germanica* (L.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 179–187.
- Wilce M.C., Board P.G., Feil S.C., & Parker M.W., 1995. Crystal structure of a theta-class glutathione transferase. *The EMBO Journal*, 14(10): 2133–2143.
- Williamson M.S., Denholm I., Bell C.A., Devonshire A.L., 1993. Knockdown resistance (kdr) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene locus in the housefly (*Musca domestica*). *Molecular & General Genetics : MGG*, 240(1): 17–22.

- Wilson T.G., 2004. The molecular site of action of juvenile hormone and juvenile hormone insecticides during metamorphosis: how these compounds kill insects. *Journal of Insect Physiology*, 50(2-3): 111–121.
- Wing K.D., Andaloro J.T., McCann S.F. & Salgado V.L., 2005. Indoxacarb and the sodium channel blocker insecticides: chemistry, physiology, and biology in insects. *Comprehensive Molecular Insect Science*, 6: 31–53.
- Wolstenholme A.J. & Rogers A.T., 2005. Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology*, 131: 85–95.
- Wolstenholme A.J., 2012. Glutamate-gated chloride channels. *The Journal Of Biological Chemistry*, 287(48): 40232–8.
- Wood O., Hanrahan S., Coetzee M., Koekemoer L.L. and Brooke B.D., 2010. Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Parasites and vectors*, 3:67.
- Wu H., Zhang R., Liu J., Guo Y. & Ma E., 2011. Effects of malathion and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and antioxidant defense system in *Oxya chinensis* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae). *Chemosphere*, 83(4):599-604.
- Xu, J., Strange J. P., Welker D.L. & James R.R., 2013. Detoxification and stress response genes expressed in a western North American bumblebee, *Bombus huntii* (Hymenoptera: Apidae). *BMC Genomics*, 14(1): 874.
- Yamamoto, K. & Yamada N., 2016. Identification of a diazinon-metabolizing glutathione S-transferase in the silkworm, *Bombyx mori*. *Scientific Reports*, 6: 30073.
- Yan H., Jia H., Gao H., Guo X., Xu B., 2013. Identification, genomic organization, and oxidative stress response of a sigma class glutathione S-transferase gene (AccGSTS1) in the honey bee, *Apis cerana cerana*. *Cell Stress Chaperones*, 18(4): 415-426.
- Yang X., Li X. & Zhang Y., 2013. Molecular Cloning and Expression of CYP9A61: A chlorpyrifos-ethyl and lambda-cyhalothrin-inducible cytochrome P450 cDNA from *Cydia pomonella*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(12): 24211–24229.

- Yang Y., Chen S., Wu S., Yue L. & Wu Y., 2006. Constitutive overexpression of multiple cytochrome P450 genes associated with pyrethroid resistance in *Helicoverpa Armigera*. *Journal of Economic Entomology*, 99 (5):1784–1789.
- Yang X.Q., Wu Z.W., Zhang Y.L., Barros-Parada W., 2015. Toxicity of six insecticides on codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) and effect on expression of detoxification genes. *Journal of Economic Entomology*, 109(1):320-326.
- Yu B.P., 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological reviews*, 74(1): 139–162.
- Zamojska J. & Węgorzek P., 2014. Preliminary studies on the susceptibility level of *Ceutorchynhus assimilis* (Coleoptera: Curculionidae) to acetamiprid and chlorpyrifos in Poland and resistance mechanisms of the pest to acetamiprid. *Journal of Insect Science*, 1 (14): 265.
- Zanuncio T.V., Serrão J.E., Zanuncio J.C., Narciso R. & Guedes C., 2003. Permethrin-induced hormesis on the predator *Supputius cincticeps* (Stål, 1860) (Heteroptera: Pentatomidae). *Crop Protection*, 22(7): 941–947.
- Zewen L., Zhaojun H., Yinchang W., Lingchun Z, Hongwei Z. & Chengjun L., 2003. Selection for imidacloprid resistance in *Nilaparvata lugens*: cross-resistance patterns and possible mechanisms. *Pest Management Science*, 59 (2)1355-1359.
- Zhang H.G., French-Constant R.H. & Jackson M.B., 1994. A unique amino acid of the *Drosophila* GABA receptor with influence on drug sensitivity by two mechanisms. *Journal of Physiology*, 479(1): 65-75.
- Zhang L. Shi J., Shi X., Liang P., Gao J. & Gao X., 2010. Quantitative and qualitative changes of the carboxylesterase associated with beta-cypermethrin resistance in the housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 156(1): 6–11.
- Zhang X., Wang J., Zhang M., Qin G., Li D., Zhu K.Y., Ma E. & Zhang J., 2014. Molecular cloning, characterization and positively selected sites of the glutathione s-transferase family from *Locusta migratoria*. *PLoS One*, 9(12): e114776.
- Zhu F., Parthasarathy R., Bai H., Woithe K., Kausmann M., Nauen R., Harrison D.A., & Palli SR., 2010. A brain-specific cytochrome P450 responsible for the majority of

deltamethrin resistance in the QTC279 strain of *Tribolium castaneum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(19): 8557–8562.

Zhu Y.C., Parthasarathy R., Bai H., Woithe K., Kausmann M., Nauen R., Harrison D.A., & Palli S.R., 2011. Major putative pesticide receptors, detoxification enzymes, and transcriptional profile of the midgut of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 106(2): 296–300.