

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA FUNCIONAL I
ANTROPOLOGIA FÍSICA

EVALUACIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A
INSECTICIDAS EN *FRANKLINIELLA OCCIDENTALIS*
(PERGANDE): IMPLICACIÓN DE CARBOXILESTERASAS
Y ACETILCOLINESTERASAS

NEUS LÓPEZ SOLER

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 26 de juny de 2008 davant un tribunal format per:

- D. Rafael Martínez Pardo
- D. Félix Ortego Alonso
- D. Juan Ferré Manzanero
- D. Francisco José Beitia Crespo
- D. Juan Javier Díaz Mayans

Va ser dirigida per:

D^a. M^a Dolores Garcerá Zamorano

D^a. Amelia Cervera Olagüe

©Copyright: Servei de Publicacions
Neus López Soler

Depòsit legal:

I.S.B.N.: 978-84-370-7227-2

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115



VNIVERSITAT^{IS} VALÈNCIA
Facultat de Ciències Biològiques

Departament de Biologia Funcional i Antropologia Física

**Evaluación de mecanismos de resistencia a
insecticidas en *Frankliniella occidentalis*
(Pergande): implicación de carboxilesterasas y
acetilcolinesterasas**

Neus López Soler
Burjassot, València
2008

Tesis presentada por *Neus López Soler* para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la Universitat de València.

Fdo. Neus López Soler

Tesis dirigida por:

M^a Dolores Garcerá Zamorano, Doctora en Ciencias Biológicas y Catedrática de Fisiología de la Universitat de València.

Amelia Cervera Olagüe, Doctora en Ciencias Biológicas.

Fdo. M^a Dolores Garcerá Zamorano

Fdo. Amelia Cervera Olagüe

La investigación presentada en esta Tesis se realizó en la Unidad de Fisiología Animal del Departament de Biologia Funcional i Antropologia Física de la Facultat de Ciències Biològiques de la Universitat de València, gracias al disfrute de una Beca del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia.

A Mari i Santi

Agradecimientos

Encara no sé ben cert perquè vaig decidir fer el doctorat, però supose que en part per inquietud i en part per atzar. En aquell moment tan sols em plantejava si m' agradaria treballar en un laboratori, però finalment he acabat esbrinant moltíssimes més coses d' aquest món que anomenem *Ciència*, i també d' altres.

Primerament vaig descobrir el que volia dir un dia de treball "frenètic" al laboratori, per descomptat, de la mà de les meues companyes (quasi sempre han estat companyes). A poc a poc vaig ser capaç de suportar-los, assumir-los i inclús organitzar-los i gaudir-los.

Després vaig començar a saber per a que servia això de "fitxar la bibliografia", i per descomptat la seua cerca, lectura, enteniment, etc. Això em va conduir a donar un pas més enllà i tractar de dissenyar experiments, millorar altres, començar amb alguna nova tècnica (llegint prèviament les "tedioses" instruccions dels aparells), anàlisi estadístic de dades, escriptura de treballs, i un llarg etcètera, incloent coses no tant directament relacionades (encara que en certs moments, inclús, més importants) com qüestions burocràtiques, d'informàtica, i un altre llarg etcètera.

A banda he pogut gaudir del privilegi d' haver treballat a altres centres d' investigació (Rothamsted Research, Anglaterra, i Bayer CropScience, Alemanya), aprenent formes diferents de treball, organització, direcció, etc. De la mateixa manera, he pogut participar en projectes duts a terme en col·laboració amb altres grups, amb una major complexitat i diversitat.

Paral·lelament, he pogut saber que vol dir això de tenir companys de treball, amb els quals aprens a compartir espais, treball, inquietuds, problemes, moments de descans... i fins i tot, una amistat. I també el procés a la inversa, compartint amb els meus amics i sobretot amb la meua família, tot allò relacionat amb el treball. És a dir, he començat a tenir nocions del

que vol dir barrejar les facetes laboral i personal, ambdues tant importants a les nostres vides. I encara que els que em coneixen saben que per a mi estar a l' estranger no és una predilecció, també ha resultat ser una molt bona experiència personal per haver pogut conèixer gent "diferent", situacions "estranyes", etc.

Tot en conjunt ha estat un llarg i intens camí, ple d' esdeveniments, sentiments, i per descomptat, també, algun que altre entrebanc. Però el més important de tot heu estat totes les persones que m' heu acompanyat en aquesta trajectòria, en totes les seues facetes i en tots els seus aspectes. Tot açò no haguera sigut possible sense la inestimable ajuda que he rebut. I com que aquest manuscrit és fonamentalment científic, vull agrair especialment a Ame i Loles la seua confiança i dedicació.

Aquest treball és també de tots *Vosaltres*.

Índice

1. Introducción	1
1.1. El trips occidental de las flores, <i>Frankliniella occidentalis</i>	6
1.1.1. Taxonomía y biogeografía	6
1.1.2. Biología de <i>Frankliniella occidentalis</i>	7
1.1.3. El trips como plaga: aspectos biológicos que inciden en las estrategias de control	11
1.1.4. Incidencia de la plaga en España	13
1.2. Clasificación de los insecticidas	15
1.2.1. Inhibidores de acetilcolinesterasas (AChE)	16
1.2.2. Antagonistas de los canales de cloro dependientes del ácido γ -aminobutírico (GABA)	18
1.2.3. Moduladores de los canales de sodio	18
1.3. Resistencia a insecticidas	19
1.3.1. Aspectos generales	19
1.3.2. Mecanismos de resistencia a insecticidas	23
1.3.2.1. Resistencia por comportamiento	24
1.3.2.2. Reducción de la penetración	24
1.3.2.3. Incremento de la destoxificación metabólica	25
1.3.2.4. Alteración de los puntos de acción de los insecticidas	30
1.3.3. Procedimientos experimentales usuales en el estudio de la resistencia	34
1.4. Objetivos	37
2. Estudio de isoenzimas de esterasas en poblaciones de campo de <i>Frankliniella occidentalis</i> y su relación con la resistencia	39
2.1. Introducción	41
2.2. Material y métodos	44

2.2.1. Insectos	44
2.2.2. Preparación de las muestras	45
2.2.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y tinción para actividad esterasa	45
2.2.4. Optimización del ensayo α -naftil butirato	49
2.2.5. Actividad esterasa total	50
2.2.6. Determinación de proteína	51
2.2.7. Análisis estadístico	51
2.3. Resultados	53
2.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida: tinción con α -naftil acetato	53
2.3.2. Optimización del ensayo α -naftil butirato	59
2.3.3. Actividad esterasa total: α -naftil acetato y α -naftil butirato	61
2.3.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida: tinción con α -naftil acetato y α -naftil butirato	63
2.4. Discusión	64

3. Análisis del efecto de diversos compuestos sinergistas

sobre la actividad esterasa en *Frankliniella occidentalis*

3.1. Introducción	73
3.2. Material y métodos	76
3.2.1. Insectos	76
3.2.2. Preparación de las muestras	77
3.2.3. Compuestos químicos utilizados	77
3.2.4. Inhibición de la actividad esterasa total por sinergistas ..	78
3.2.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) nativos e inhibición de estererasas por sinergistas	79
3.2.6. Inhibición de la actividad esterasa mediante bioensayos de sinergistas	80
3.2.7. Determinación de proteína	81
3.2.8. Análisis estadístico	81

3.3. Resultados	83
3.3.1. Análisis de inhibición de la actividad esterasa total por sinergistas	83
3.3.2. Análisis de inhibición de isoenzimas de esterases por sinergistas	86
3.3.3. Bioensayo de efectividad de sinergistas sobre la inhibición de la actividad esterasa total	90
3.4. Discusión	94

4. Caracterización de acetilcolinesterasas en *Frankliniella*

***occidentalis*. Análisis de insensibilidad frente a insecticidas**.....101

4.1. Introducción	103
4.2. Material y métodos	108
4.2.1. Insectos	108
4.2.2. Preparación de las muestras	110
4.2.3. Ensayo de actividad colinesterasa	110
4.2.4. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad colinesterasa	111
4.2.5. Inhibición de la actividad colinesterasa	112
4.2.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) nativos y tinción para actividad colinesterasa	114
4.2.7. Determinación de proteína	115
4.2.8. Análisis estadístico	115
4.3. Resultados	117
4.3.1. Caracterización de la actividad colinesterasa en <i>Frankliniella occidentalis</i>	117
4.3.1.1. Preferencia de sustrato e inhibición a altas concentraciones	117
4.3.1.2. Respuesta a inhibidores específicos de colinesterasas	119
4.3.1.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida nativos y tinción para actividad colinesterasa.	123

4.3.2. Análisis de insensibilidad de acetilcolinesterasas frente a insecticidas organofosforados y carbamatos ...	124
4.3.2.1. Determinación de concentraciones discriminantes	124
4.3.2.2. Estudio de insensibilidad de acetilcolinesterasas en insectos individuales de distintas poblaciones	126
4.4. Discusión	134
5. Discusión general	139
6. Conclusiones	149
Bibliografía	153

Abreviaturas

α -NA: α -naftil acetato
 α -NB: α -naftil butirato
AChE: acetilcolinesterasa
ANOVA: análisis de la varianza
ATCI: yoduro de acetiltiocolina
BChE: butirilcolinesterasa
BSA: albúmina de suero bovino
BTCI: yoduro de butiriltiocolina
BW 284c51: 1,5 bis(4-alildimetilamoniofenil)-pentano-3-ona dibromuro
ChE: colinesterasa
CI₅₀: concentración inhibitoria 50
CL₅₀: concentración letal 50
DDT: 1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano
DE: desviación estándar
DEF: S,S,S-tributilfosforotritioato
DEM: dietilmaleato
DMSO: dimetil sulfóxido
DTNB: ácido 5-5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico)
FAO: Food and Agriculture Organization
FBB: sal de zinc o-dianisidina bis diazotizada
FBRR: cloruro de zinc 4-benzoilamino-2,5-dimetoxibenzodiazonio
FR: factor de resistencia
FS: factor de sinergismo
GABA: ácido γ -amino butírico
GST: glutatión S-transferasa
IC: intervalo de confianza
IRAC: Insecticide Resistance Action Committee
Iso-OMPA: tetraisopropilo pirofosforamida

IUBMB: Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular

Kdr: knockdown resistance

K_m: constante de Michaelis-Menten

MFO: oxidasa de función múltiple

NADPH: nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato

OMS: Organización Mundial de la Salud

OP: organofosforado

PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida

PBO: butóxido de piperonilo

R_f: movilidad relativa al frente de migración

SDS: dodecil sulfato sódico

TSWV: Tomato Spotted Wilt Virus

U: unidad enzimática

UPCT: Universidad Politécnica de Cartagena



1. Introducción

1. Introducción

Los entomólogos calculan que el daño causado por las plagas de insectos sobre los cultivos se ha doblado en los últimos 50 años, en parte debido a los esfuerzos de la agricultura intensiva por alimentar a la creciente población mundial (figura 1.1) (IRAC, 2007a), ya que los insectos y los ácaros compiten con los humanos y otros animales por la fuente de alimentación. Otro hecho importante que contribuye al desarrollo de las plagas es el incremento en el movimiento internacional de material vegetal con el consecuente transporte accidental de muchas especies, incluso entre continentes.

Año	Población mundial (x 10 ³ millones)	Tierra cultivable (x 10 ³ millones de hectáreas)	Terreno agrícola por persona (hectáreas)
1950	2,5	1,3	0,5
1975	4,0	1,4	0,4
2000	6,0	1,5	0,3
2020	7,5	1,5	0,2

Figura 1.1. Evolución del crecimiento de la población y la superficie de tierra cultivable a nivel mundial entre 1950 y 2000, con una proyección al 2020.

La industria asociada a la agricultura ha tratado de reducir este daño en los cultivos mediante la utilización de productos químicos noveles y nuevas aplicaciones biotecnológicas. Como resultado, más de 200 insecticidas diferentes componen los ingredientes activos de más de 40.000 productos químicos comerciales, todos destinados a reducir el daño de los

insectos. Pero, pese a la cantidad de productos disponibles, más de 500 especies de artrópodos en todo el mundo han desarrollado resistencia a los insecticidas, evitando su efecto tóxico. La resistencia a los insecticidas por parte de las plagas es uno de los problemas económicamente más perjudiciales, tanto para los agricultores como para la industria, y no hay región que se encuentre exenta de este fenómeno (IRAC, 2007a).

En España, Andalucía, Murcia y Comunidad Valenciana (por este orden) son las regiones con un mayor consumo de insecticidas (Collar, 2005). En la actualidad, la regulación relativa a la comercialización de productos fitosanitarios viene dada por la Directiva 91/414/CE, transpuesta al Estado Español por el Real Decreto 2163/90, que sienta las bases para la inclusión de una “Lista Única Comunitaria” de las sustancias activas destinadas a la formulación de productos fitosanitarios. El objetivo es unificar a nivel de la Unión Europea los criterios para la evaluación de los productos fitosanitarios, con un alto nivel de exigencias toxicológicas y ecotoxicológicas, a fin de minimizar su impacto sobre la salud humana y el medio ambiente. Como resultado, se han visto afectados un importante número de productos insecticidas que se estaban comercializando en el Estado Español. Esta reducción crea nuevos problemas para la lucha contra determinadas plagas, especialmente en los cultivos de las zonas mediterráneas (<http://europa.eu/scadplus/leg/es/lvb/l13002a.htm>, 2007).

Por tanto, el diseño de estrategias para prevenir o minimizar el desarrollo de la resistencia es un hecho capital, tanto para la introducción de nuevos productos, como para la correcta utilización de los ya existentes. Para ello es necesario conocer los mecanismos por los cuales los insectos adquieren y reproducen dicha resistencia. Estos mecanismos se agrupan en cuatro categorías diferentes: resistencia metabólica, resistencia por modificación de dianas, resistencia por reducción de la penetración y resistencia por comportamiento, citados en orden de importancia.

Frankliniella occidentalis (Pergande), o trips occidental de las flores, es una especie introducida accidentalmente en el norte de Europa, y posteriormente en España, como consecuencia de la importación de material vegetal contaminado desde Norteamérica. En la actualidad es una especie establecida en los campos de las regiones del sur de toda Europa. Si bien la resistencia en *F. occidentalis* es un problema ampliamente extendido, los mecanismos subyacentes que confieren dicha resistencia han sido estudiados tan solo en unas pocas poblaciones. En dichos estudios se ha manifestado que tanto la reducción de la penetración, el incremento en el metabolismo por diversas enzimas, así como la modificación de las dianas, son posibles mecanismos de resistencia en el trips occidental de las flores. La información sobre los mecanismos implicados en la resistencia, así como la posibilidad de establecer ensayos bioquímicos de diagnóstico, rápidos y sensibles, para detectarla y combatirla, son herramientas enormemente valiosas para poder llegar a predecir el espectro de resistencia a desarrollar por las poblaciones de trips.

El presente trabajo se enmarca dentro de un proyecto denominado “Estrategias de prevención de resistencia a insecticidas en *Frankliniella occidentalis* (Pergande)”, llevado a cabo en colaboración con la Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). En él se pretende analizar el grado de resistencia a distintos insecticidas en poblaciones de trips recogidas en campo y seleccionadas en el laboratorio, así como estudiar los mecanismos desarrollados por dichas poblaciones para adquirir la resistencia.

La determinación del nivel de resistencia fue llevada a cabo por el Departamento de Producción Vegetal de la UPCT. Los insecticidas que utilizaron fueron los comúnmente utilizados en los programas de control de *F. occidentalis*: deltametrina y acrinatrina, ambos piretroides; metamidofos, un organofosforado (OP); endosulfán, un organoclorado; y metiocarb y formetanato, ambos carbamatos. Tres de ellos son específicos contra trips (acrinatrina, formetanato y metiocarb), mientras que los otros tres son de

amplio espectro (en la actualidad el endosulfán es una sustancia revocada de la “Lista única europea de productos fitosanitarios” y por tanto, prohibida su comercialización y utilización).

Así pues, los insectos utilizados en los diversos ensayos fueron proporcionados por la UPCT y en todos los casos se trataba de animales no expuestos directamente a los insecticidas, sino la primera generación filial obtenida en el laboratorio, con el fin de evitar fenómenos de inducción.

1.1. El trips occidental de las flores, *Frankliniella occidentalis*

1.1.1. Taxonomía y biogeografía

Los trips pertenecen a la Clase Insecta, y se incluyen en un único orden (Thysanoptera). Se conocen cerca de 5.000 especies, de las cuales el 93% se agrupa en tan solo dos familias, Thripidae y Phlaeothripidae (tabla 1.1) (Mound y Teulon, 1995).

Tabla 1.1. Distribución por familias del orden Thysanoptera.

Suborden	Familia	Nº de especies	Subfamilias
Terebrantia	Uzelothripidae	1	
	Fauriellidae	4	
	Adiheterothripidae	5	
	Merothripidae	15	
	Heterothripidae	70	
	Aelothripidae	250	
	Thripidae	1700	Thripinae
		Panchaetothripinae	
		Dendrothripinae	
		Sericothripinae	
Tubulifera	Phlaeothripidae	3000	Phlaeothripinae
			Idolothripinae

De todas las especies de trips solo unos pocos cientos son consideradas como plaga agrícola, y la mayor parte de ellas pertenecen a la familia Thripidae. Una característica común a todas las especies descritas

como plaga es la polifagia. Desde principios de los años 80, las diversas especies se encuentran distribuidas a lo largo de todo el mundo como resultado de su expansión desde sus hábitats naturales hacia nuevos ambientes. La mayor parte de ellas se ha dispersado debido a la actuación accidental del hombre (Mound y Teulon, 1995).

Frankliniella occidentalis (Pergande, 1895), o trips occidental de las flores, pertenece a la familia Thripidae y, dentro de ésta, a la subfamilia Thripinae. Se trata de una especie originaria del oeste de Norteamérica (California), por lo que también se le conoce con el nombre de trips californiano. Desde Norteamérica se ha propagado hacia Sudamérica, Oceanía, Asia, Europa y África (figura 1.2) (EPPO, 2006).

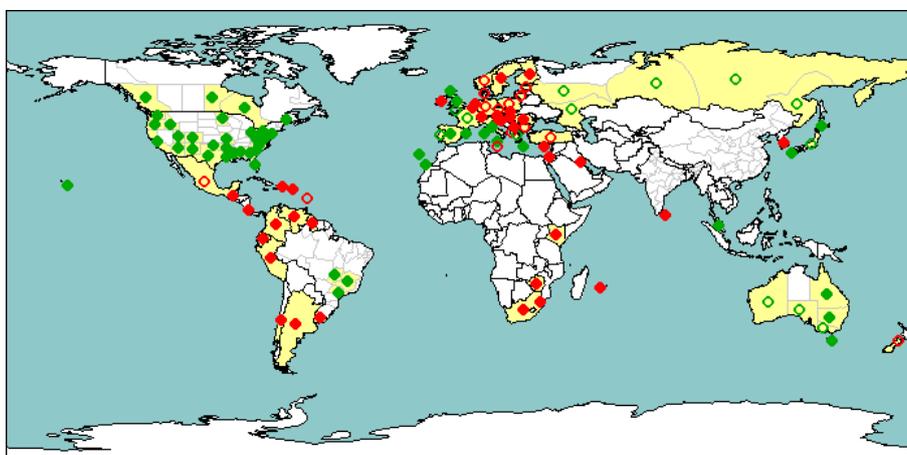


Figura 1.2. Distribución mundial actual de *Frankliniella occidentalis*. El color rojo indica presencia a nivel nacional y el verde, provincial. Los círculos sin fondo indican presencia en tan solo ciertas áreas de la nación o provincia.

1.1.2. Biología de *Frankliniella occidentalis*

F. occidentalis es un insecto de pequeño tamaño. Los adultos miden aproximadamente 1 mm de longitud, siendo un poco más grandes las hembras que los machos (figura 1.3). Presentan dos pares de alas

estrechas, cubiertas por largos y finos pelos a modo de flecos. Las hembras invernantes son oscuras, presentando más clara la cabeza que el abdomen. Las estivales son claras, aunque parte del abdomen se va oscureciendo a medida que envejecen. Los machos son siempre claros y más delgados (Tommasini y Maini, 1995).

Su ciclo de vida (figura 1.3) se inicia con la inserción de los huevos en el tejido tierno de la planta, debajo de la epidermis, siendo el periodo de incubación de 2 a 4 días en condiciones favorables. De ellos eclosionan las ninfas, ápteras, blanquecinas, de 0,6 mm de longitud, que pronto comienzan a alimentarse picando los tejidos. Después de una muda se forman las ninfas de segundo estadio que se alimentan intensamente, alcanzando pronto el tamaño máximo y tomando coloración amarillenta cerosa. Luego descienden al suelo en un lugar protegido de la luz donde pasan al siguiente estadio ninfal, teniendo lugar en ese momento la formación de las alas. En esta última etapa no se alimentan y se desplazan con dificultad al no tener desarrolladas las articulaciones de las patas. Cuando se forman los adultos son muy claros y en poco tiempo van tomando coloración marrón cada vez más oscura. Pronto vuelan para alimentarse, haciéndolo preferentemente

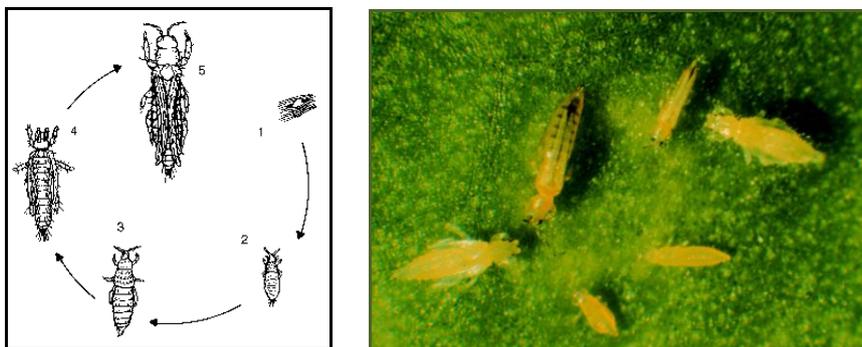


Figura 1.3. *Frankliniella occidentalis*. Izquierda: fases del ciclo de vida: 1, huevo. 2-4, diferentes estadios ninfales. 5, adulto. Derecha: fotografía de trips en diferentes estadios de desarrollo.

sobre las flores, ya que el polen es uno de los alimentos más completos. Pocos días después las hembras inician la puesta (Lacasa y Contreras, 1993).

El tiempo empleado en el desarrollo es variable, dependiendo de la temperatura, la alimentación y algunos otros factores ambientales, sobre todo las condiciones en las que se desarrollan las ninfas (Robb, 1989; Lacasa, 1990). El umbral mínimo de desarrollo fisiológico del trips se encuentra alrededor de los 10°C, y a temperaturas por encima de 35°C se producen importantes mortalidades de los estadios inmaduros. El desarrollo óptimo tiene lugar a temperaturas entre 25 y 30°C, con una duración del ciclo completo de aproximadamente 12 días. La duración del estadio adulto depende también de la temperatura: se alarga a temperaturas bajas (70 días a 15°C) y se acorta mucho a temperaturas por encima de 30°C (10 días a 35°C) (Lacasa et al., 1992).

Los trips presentan reproducción bisexuada y partenogénica de tipo arrenotóquico, siendo haploides los machos y diploides las hembras (Moritz, 1997). La fecundidad de las hembras depende en gran medida de la calidad y cantidad de alimento ingerido, pudiendo variar entre 30 y 300 huevos por hembra puestos a lo largo de la vida activa (Pickett et al., 1988). Por tanto, en condiciones climáticas óptimas, con sustratos alimenticios adecuados y en ambientes propicios para el insecto, los trips presentan una alta tasa multiplicativa (Bournier y Bournier, 1987; Robb et al., 1988).

Los adultos manifiestan una clara tendencia a colonizar las flores, aunque no en todas las plantas su localización corresponde a tal preferencia; las ninfas suelen situarse en lugares protegidos de la planta. Tanto en estadio adulto como de ninfa, los trips se alimentan picando el tejido vegetal con los estiletes bucales. Inyectan saliva y luego aspiran el contenido celular mediante la bomba hipofaríngea, hasta el tubo digestivo (Bournier, 1983).

En los cultivos, la diseminación del trips tiene lugar a través del material vegetal. Los adultos realizan vuelos activos cortos de planta a planta, aunque sin elevarse demasiado, pero pueden ser arrastrados sobre el nivel del cultivo por las corrientes ascendentes de aire que se producen al calentarse la tierra y la cubierta vegetal, o ser desplazados por el viento.

De forma global, en las zonas cálidas las poblaciones de trips son abundantes desde mediados de la primavera hasta finales del otoño, y en las zonas frías se produce hibernación de la plaga (Lacasa et al., 1991, 1993). En cualquier caso, las oscilaciones en los niveles poblacionales de un cultivo concreto y en un lugar determinado están sometidas a factores de multiplicación y de inmigración, relacionados con los hospedantes próximos. En Europa, poblaciones permanentes de *F. occidentalis* en el campo solo han sido encontradas en el área mediterránea debido a la climatología de la zona.

F. occidentalis se revela como uno de los tisanópteros más polípagos, capaz de colonizar plantas herbáceas y arbóreas, siendo sus hospedadores tanto cultivos como plantas silvestres. Por lo que se refiere a las hortalizas, el trips ha sido citado sobre casi todas aquellas cultivadas en el área mediterránea, aunque con connotaciones diferentes de unos cultivos a otros. Por el momento se han descrito en 244 plantas correspondientes a 62 familias diferentes (Tommasini y Maini, 1995). Además, en las poblaciones colonizadoras se han encontrado preferencias diferentes atendiendo a las variedades de las plantas. La presencia en algunas de esas plantas es ocasional, sin que se alimenten o se multipliquen sobre ellas; en otras los adultos acuden a las flores solamente para alimentarse, y finalmente, sobre una parte importante de ellas los trips se alimentan y multiplican.

1.1.3. El trips como plaga: aspectos biológicos que inciden en las estrategias de control

La dificultad para el control de esta especie comienza por la circunstancia de que la fecundidad de la hembra a lo largo de su vida es muy alta, y que el tiempo de incubación de los huevos es muy corto. Otro hecho importante que influye en la dificultad para su control es el originado por la forma y ciclo de vida del insecto. Los huevos están insertados dentro de los tejidos vegetales, la población de ninfas y adultos vive alimentándose sobre hojas (haz y envés), frutos y sobre todo flores, refugiándose en las hendiduras, resultando todos ellos lugares inaccesibles a los tratamientos insecticidas.

La facilidad de dispersión que muestra la plaga es un factor que influye también de forma decisiva sobre la invasión de los cultivos. La capacidad para vivir en la gran mayoría de las plantas silvestres y cultivadas (son enormemente polípagos) y la facilidad de su transporte por el viento y material vegetal, favorece la invasión de los cultivos “limpios” e invernaderos y el aumento paulatino de su área de distribución. Además, en los inicios de la invasión la plaga es difícil de detectar y los daños difíciles de observar.

También hay que tener en cuenta que no existe un control natural de las poblaciones de trips mediante predadores o parásitos, ya que aunque se han citado varias especies depredadoras de *F. occidentalis* (especies de *Orius* (Riudavets y Castañé, 1998), de ácaros (Sabelis y van Rijn, 1997) y de parásitos (Hunter, 1997)) sus poblaciones en los cultivos hortícolas son casi anecdóticas y muy presionadas por las numerosas aplicaciones de insecticidas.

F. occidentalis presenta, además, las características idóneas para el desarrollo de resistencia a insecticidas: generaciones cortas, fecundidad elevada y sistema reproductivo haplodiploide, en el que los genes resistentes en los machos se encuentran directamente expuestos a la selección por los insecticidas. Como consecuencia, la selección de la resistencia se produce más rápidamente que en las especies diploides,

siendo esta diferencia especialmente importante en aquellos casos en los que la resistencia se encuentra ligada a genes recesivos (Denholm et al., 1998).

La primera vez que se observó una reducción en la eficacia de un insecticida en el control de *F. occidentalis*, fue en los campos de algodón de Nuevo Méjico (Race, 1961), aunque el primer estudio realizado demostrando el desarrollo de resistencia en esta especie fue llevado a cabo en 1989 (Robb, 1989). Desde entonces han sido numerosos los casos documentados al respecto y frente a OP, carbamatos, piretroides y organoclorados (Brodsgaard, 1994; Zhao et al., 1995a; Jensen, 1998, 2000; Herron y Gullick, 2001; Maymó et al., 2002, 2006).

Los problemas que crea esta especie en los cultivos hortícolas se traducen en daños producidos por la alimentación de ninfas y adultos sobre los tejidos vegetales, afectando al desarrollo normal de las plantas y/o produciendo daños de distinta consideración en los productos objeto de comercialización, creando un elevado porcentaje de productos de baja calidad, que disminuyen de forma notable el valor de la producción.

Por otro lado, esta especie es uno de los vectores más importantes en la transmisión de virus del género tospovirus, causando daños indirectos mucho más preocupantes que los efectos directos ocasionados por el desarrollo de la plaga (Belda y Rodríguez-Rodríguez, 1989). El virus del bronceado del tomate (*Tomato Spotted Wilt Virus*, TSWV) del género tospovirus, puede ser transmitido con mayor o menor eficacia por diferentes especies de trips, todas ellas pertenecientes al suborden Terebrantia. El insecto adquiere el virus al alimentarse en tejidos virosados, pero para que pueda transmitirlo éste ha de ser adquirido por el insecto en el estadio de ninfa (Sakimura, 1961a, b; 1963; Bournier, 1983). Los daños causados por el virus consisten en decoloraciones y necrosis, así como deformaciones y distorsiones de las plantas y frutos (figura 1.4).



Figura 1.4. Daños producidos en hojas, flores y frutos de diferentes cultivos infectados con el virus TSWV, transmitido por *F. occidentalis*.

1.1.4. Incidencia de la plaga en España

F. occidentalis se introdujo en España en 1986, probablemente a través de esquejes de plantación de cultivos florales importados desde Holanda hasta invernaderos de Almería (Lacasa, 1990). Con el tiempo se ha producido una dispersión continua del insecto por la geografía nacional, primero por las regiones costeras más cálidas y más tarde por las del interior. En buena parte de las comarcas costeras de las regiones cálidas españolas los trips encuentran condiciones ambientales y de vegetación apropiadas para desarrollarse y multiplicarse a lo largo de todo el año, tanto al aire libre como en los invernaderos. Por el contrario, en las regiones del interior su actividad se detiene en el invierno. Si originalmente su presencia se circunscribía a cultivos hortícolas y florales, pronto se amplió la asociación a cultivos arbóreos e industriales, donde además encontraba sustratos y soportes adecuados para su multiplicación en una gran cantidad de malas hierbas (Lacasa, 1990).

Posteriormente, en 1989, se detectó por primera vez en España el virus TSWV en cultivos florales. A partir de ese momento la enfermedad se

extendió por las regiones previamente colonizadas por dicho vector (Lacasa y Contreras, 1993).

Las medidas y estrategias para el control de plagas de *F. occidentalis* pasan por prácticas culturales (eliminar restos de cultivos y malas hierbas), medios físicos (utilización de mallas y tejidos como barreras), medios biológicos (mediante uso de enemigos naturales: predadores, parásitos y patógenos) y medios químicos (utilización de insecticidas).

De forma general, los medios químicos son los más ampliamente utilizados en el control de la plaga mediante diversas materias activas, formulaciones, formas de aplicación, momentos de intervención, programas de aplicación en relación a otras plagas, etc. Estos medios proporcionan respuestas satisfactorias en algunos cultivos (Grasselly et al., 1991; Helyer y Brobyn, 1992; Pasini et al., 1993). Sin embargo, en otros cultivos y en otras condiciones los resultados no son totalmente satisfactorios, necesitando de su conjugación o integración con otros medios y métodos. Por ello se tiende a buscar materias activas selectivas que permitan la acción simultánea de enemigos naturales, y por otra parte, a alternar estratégicamente la utilización de esas materias con el fin de evitar la aparición de poblaciones resistentes.

Actualmente, datos recogidos por IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) en España (Collar, 2005) ponen de manifiesto que las plagas que muestran mayor dificultad para su control en nuestro país son *Tetranychus urticae*, *Bemisia tabaci* y *F. occidentalis*, por este orden. Pero la especie que muestra una mayor problemática es *F. occidentalis*, especialmente, en cultivos de pimientos, tomates, lechugas, habas y alcachofas. Para su control se requieren reiteradas intervenciones con insecticidas a lo largo de un ciclo de cultivo, sobretodo en invernaderos, aunque también se hacen necesarias en cultivos sensibles al TSWV realizados al aire libre, tanto en ciclo de invierno (alcachofas, habas,

lechugas) como de verano (tomate, pimiento para pimentón), ya que los umbrales poblacionales de trips vectores admitidos son extremadamente bajos. La necesidad de aplicaciones químicas reiteradas, junto al hecho de que la gama de materias activas y formulados para el control de esta plaga es bastante reducida, ha supuesto una pérdida de la eficacia de los mismos con la consecuente dificultad para el control de la plaga, desde su introducción (Bielza y Contreras, 2005).

1.2. Clasificación de los insecticidas

La FAO (Food and Agriculture Organization) y la OMS (Organización Mundial de la Salud) definen el término plaguicida como «cualquier sustancia o mezcla de ellas destinada a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades animales o humanas, las especies no deseadas de plantas o animales, que causan perjuicio o que interfieren de algún modo en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera, alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos». El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes o agentes para reducir la densidad de fruta o para evitar la caída prematura de ésta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante su almacenamiento y transporte (FAO, 1989; OMS, 1990).

Así, se integran en esta definición: insecticidas, acaricidas, nematocidas, fungicidas, herbicidas, etc., en función del organismo plaga contra el que se pretenda luchar. En el presente trabajo son de interés los plaguicidas empleados en la agricultura para la lucha contra los insectos: los insecticidas. Éstos, a su vez, pueden ser clasificados en función de su

estructura química, modo de acción, etc. Globalmente, los insecticidas más utilizados son los que actúan a nivel del sistema nervioso de los insectos (tabla 1.2). De todos ellos, tan solo los tres primeros grupos son de interés para este estudio, pues corresponden a los utilizados para el control de *F. occidentalis* en nuestras poblaciones.

Tabla 1.2. Clasificación de los insecticidas neurotóxicos más importantes, según su punto de acción (IRAC, 2007b).

Grupo	Subgrupo	Punto de acción primario	Subgrupo químico o ingrediente activo representativo
1	A	Inhibidores de acetilcolinesterasa	Carbamatos
	B		Organofosforados
2	A	Antagonistas de canales de cloro dependientes de GABA	Organoclorados
	B		Fenilpirazoles
3		Moduladores de canales de sodio	Piretroides, Piretrinas DDT
4	A	Agonistas/antagonistas de receptores nicotínicos	Neonicotinoides
	B		Nicotina
	C		Cartap, Bensultap
5		Agonistas/antagonistas de receptores nicotínicos (diferentes al grupo 4)	Spinosines
6		Activadores de canales de cloro	Abamectinas, Milbemicinas

1.2.1. Inhibidores de acetilcolinesterasas (AChE)

Dentro de este grupo de insecticidas encontramos dos subgrupos químicos diferentes, los OP y los carbamatos. Los insecticidas OP son un grupo muy importante de compuestos que varían enormemente en estructura y propiedades químicas. Todos son ésteres derivados del ácido fosfórico con diferentes combinaciones de oxígeno, carbono, azufre y nitrógeno. Del conjunto de los insecticidas, suelen ser los que presentan una mayor toxicidad sobre los organismos vertebrados, aunque la mayoría de ellos son químicamente inestables o poco persistentes. En nuestro estudio usamos el metamidofos (figura 1.5).

Los insecticidas carbamatos son ésteres del ácido carbámico y típicamente presentan como grupo alguna clase de anillo arilo. A menudo,

también resultan altamente tóxicos para los mamíferos. En nuestro estudio utilizamos el metiocarb y el formetanato (figura 1.5).

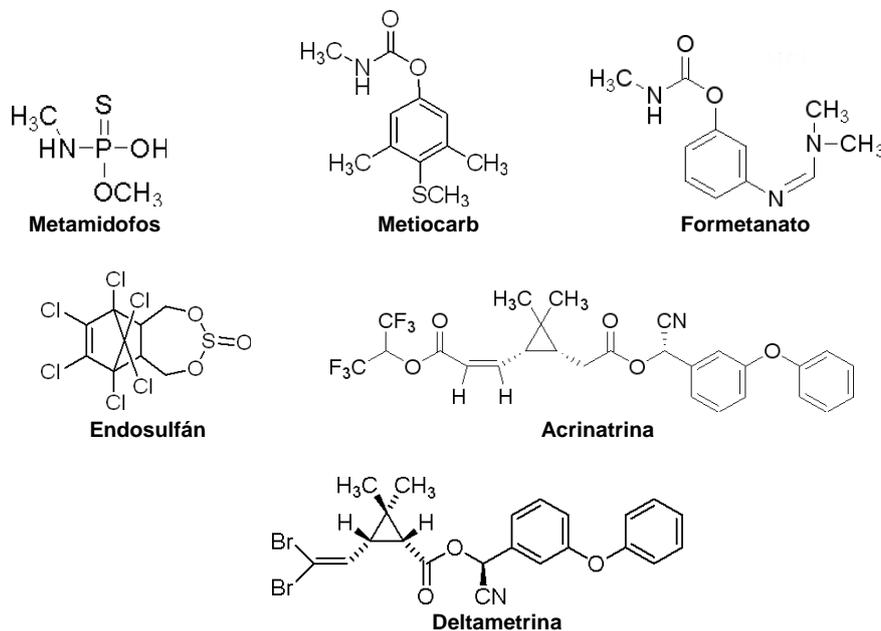


Figura 1.5. Estructura química de las moléculas de insecticidas utilizados en nuestro estudio: metamidofos, un organofosforado; metiocarb y formetanato, ambos carbamatos; endosulfán, un organoclorado; acrinatrina y deltametrina, ambos piretroides.

Estos dos grupos químicos actúan sobre ciertas enzimas del sistema nervioso, concretamente las AChE. La función de la enzima AChE es la de hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina hasta acetato y colina en el espacio sináptico (Zubay, 1983).

Los OP y carbamatos son potentes inhibidores de la AChE, ya que al unirse a la enzima forman un complejo covalente y estable, impidiendo la hidrólisis de la acetilcolina (Eldefrawi, 1985). Una acumulación de acetilcolina provoca que los canales catiónicos estén permanentemente abiertos, causando una hiperexcitación que se traduce en temblores, convulsiones y finalmente parálisis, provocando la muerte del animal. En los

insectos, la acción de esta clase de insecticidas está confinada al sistema nervioso porque es donde se encuentran las sinapsis colinérgicas. Entre los dos grupos químicos existe una diferencia importante: la fosforilación de la AChE por parte de los OP es muy persistente, mientras que la carbamilación por parte de los carbamatos lo es en menor medida (Barberá, 1989; Ware y Whitacre, 2004).

1.2.2. Antagonistas de los canales de cloro dependientes del ácido γ -aminobutírico (GABA)

El grupo químico de los organoclorados representa uno de los grupos más antiguos de insecticidas comerciales. Originalmente fueron policlorocicloalcanos lipofílicos ambientalmente estables. De todos ellos, los materiales más biodegradables son el lindano y el endosulfán (utilizado en nuestro estudio; figura 1.5). Los esfuerzos de síntesis química dieron como resultado la llegada de los fenilpirazoles, con un modo de acción similar pero con toxicidad más selectiva hacia los insectos.

Con los organoclorados, el envenenamiento del sistema nervioso ocurre a causa del antagonismo de esta clase de insecticidas con el neurotransmisor inhibitor GABA. La función de este neurotransmisor es la apertura de los canales de cloro para deprimir los impulsos nerviosos en la célula postsináptica. Estos insecticidas bloquean la apertura de dichos canales, lo que conduce nuevamente a una hiperexcitación del sistema nervioso central que se traduce en convulsiones y posterior muerte del animal (Barberá, 1989; Bloomquist, 1993; Ware y Whitacre, 2004).

1.2.3. Moduladores de los canales de sodio

Dentro de este grupo podemos diferenciar dos subgrupos químicos diferentes, los piretroides y el 1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano (DDT).

El DDT pertenece al grupo químico de los organoclorados y es una molécula muy lipofílica, altamente biopersistente, aunque su toxicidad aguda es baja.

Los compuestos originales del grupo de los insecticidas piretroides fueron aislados de las flores del crisantemo y se denominaron piretrinas. Los piretroides sintéticos han sido desarrollados con el objetivo de mejorar la especificidad y actividad de los insecticidas piretroides naturales. Son ésteres con un grupo alcohol y uno ácido; el grupo ácido generalmente contiene un anillo dimetilciclopropano con un radical variable. En nuestro estudio empleamos la acrinatrina y la deltametrina (figura 1.5).

Los piretroides y el DDT comparten el lugar de acción, los canales de sodio dependientes de voltaje. Estos canales iónicos se encuentran en las membranas de las neuronas y su apertura es responsable de la transmisión del impulso nervioso (Zlotkin, 1999). La intoxicación por parte de estos insecticidas se debe al impedimento del cierre de los canales de sodio tanto dentro del sistema nervioso central como del periférico, afectando a la propagación del impulso nervioso e incrementando además la liberación de neurotransmisores en los terminales nerviosos. Todo ello se traduce en hiperexcitabilidad, convulsiones y descoordinación, causando finalmente la muerte del insecto. La sinapsis neuromuscular de los insectos es un blanco especialmente importante para los piretroides y su efecto tóxico es mucho más pronunciado que el del DDT (Barberá, 1989; Ware y Whitacre, 2004).

1.3. Resistencia a insecticidas

1.3.1. Aspectos generales

El desarrollo de resistencia a los insecticidas por parte de los insectos es el mayor obstáculo en el control de plagas, tanto agrícolas como domésticas o sanitarias (Georghiou, 1990). Como resultado de la aparición de resistencia

se incrementa la dosis y frecuencia de aplicación de los insecticidas, produciendo una disminución en la eficacia de los mismos y, consecuentemente, daños ambientales y aparición de enfermedades animales y humanas (Szczepanski, 1990). Por ello es primordial llegar a entender los mecanismos por los cuales los insectos adquieren dicha resistencia, y poder así diseñar nuevas estrategias que resulten seguras y efectivas, ayudando al mismo tiempo a frenar y evitar la aparición de dicho fenómeno.

La OMS (1957) definió la resistencia como «el desarrollo, en una población de insectos, de la habilidad de tolerar dosis de tóxicos que resultarían letales a la mayoría de los individuos de una población normal o sensible (S) de la misma especie». Según la FAO (1970) la resistencia «es una respuesta disminuida de la población de una especie de animales o plantas a un plaguicida o agente de control como resultado de su aplicación». En la actualidad, se define como «un cambio heredable en la sensibilidad de una población de una plaga que se refleja en repetidos fallos de eficacia de un producto al ser usado de acuerdo con las recomendaciones de la etiqueta para esa plaga» (IRAC, 2007b).

A esta situación puede llegarse por un uso abusivo o mal uso del insecticida en el control de una plaga, lo que resulta en la selección de formas resistentes que transmiten esta característica a la descendencia, con la consiguiente evolución de las poblaciones que se convierten en resistentes (R). Es decir, es un proceso de microevolución que se produce como resultado de la presión de selección ejercida por la acción de un tóxico sobre la variabilidad genética intrínseca de la población (Matsumura, 1985) y no porque se produzcan mutaciones (Oppenoorth, 1985); de hecho, la mayor parte de los insecticidas comerciales son poco mutagénicos (Roush y McKenzie, 1987). Los insectos resistentes se multiplican en la población, mientras que los sensibles son eliminados progresivamente por la acción de los insecticidas. Ahora bien, hay que tener en cuenta que los

genes asociados a la resistencia pueden variar desde dominantes, pasando por semi-dominantes, hasta recesivos. Si se trata de un gen dominante o semi-dominante, tan solo es necesario un parental para que se exprese total o parcialmente en la descendencia. Si es recesivo, ambos parentales deben poseer dicha característica. Afortunadamente, la mayoría de los mecanismos de resistencia están controlados por genes recesivos o semi-dominantes (IRAC, 2006). En el caso de resistencia genéticamente dominante, ésta se establece rápidamente en la población y dificulta enormemente su control (figura 1.6).

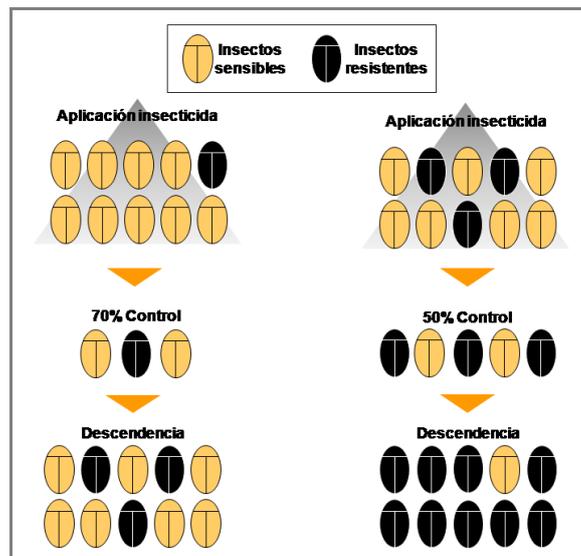


Figura 1.6. Esquema del desarrollo de la resistencia a los insecticidas en las poblaciones de insectos. En la parte izquierda se observa la aparición del fenómeno de resistencia, y en el lado derecho se representa su evolución.

En una población no expuesta a insecticidas, los genes asociados a la resistencia suelen ser muy poco frecuentes, debido a que normalmente suponen un coste adaptativo o biológico, ya que los insectos que presentan la característica de resistentes suelen carecer de alguna otra cualidad que

supone una ventaja para el resto de los insectos (sensibles) en ausencia de la presión causada por los insecticidas.

La rapidez del desarrollo de la resistencia depende a su vez de muchos otros factores, entre los cuales se encuentran:

- La frecuencia de aplicación de los insecticidas.
- La dosis y persistencia del efecto del insecticida: la duración del efecto de un insecticida depende de sus propiedades fisicoquímicas, el tipo de formulación y la frecuencia de aplicación.
- La reproducción de los insectos: las especies que presentan un ciclo de vida corto y una alta velocidad de reproducción son más propicias a desarrollar la resistencia.
- Aislamiento poblacional: la inmigración de individuos con alelos sensibles desde áreas no tratadas diluye beneficiosamente los alelos resistentes.

Por otro lado, hay que considerar que cuando una población es resistente a un determinado insecticida se puede comportar de forma diferencial frente a otro insecticida, con lo que distinguimos entre resistencia simple, múltiple y cruzada. Hablamos de resistencia simple cuando un mecanismo de resistencia confiere resistencia a un solo insecticida. La resistencia múltiple se define como la resistencia a más de un tipo de insecticidas, con diferente punto de acción, normalmente como resultado de la selección con distintos insecticidas. La resistencia cruzada es aquella en la que la resistencia a un compuesto también la confiere a otro por presentar ambos un modo de acción común. Existe también la resistencia cruzada negativa, donde la resistencia a un insecticida se correlaciona con la susceptibilidad a otro, aunque raramente se produce (Oppenoorth, 1985).

El primer caso documentado de resistencia a insecticidas en artrópodos data del año 1908, y fue encontrado en el "Piojo de San José"

(*Quadraspidiotus perniciosus*) frente al polisulfuro de calcio (Melander, 1914). A partir de ese momento el número de especies de artrópodos resistentes creció gradualmente en una proporción de aproximadamente una nueva especie resistente cada dos a cinco años. Posteriormente se produjo el desarrollo de los insecticidas orgánicos, tales como el DDT, lo que supuso una relajación para la industria agrícola al pensar que la resistencia a insecticidas era ya un problema del pasado, puesto que se solucionaba mediante la introducción continuada de nuevos insecticidas. Pero desafortunadamente esa tranquilidad se desvaneció rápidamente. En los años 50 se documentó resistencia al DDT en la mosca doméstica (Busvine, 1951), y con la introducción de cada nuevo tipo de insecticida (carbamatos, OP, piretroides, etc.) los casos de resistencia tardaban de 2 a 20 años en aparecer. Además, en los años 70 la introducción de nuevos compuestos sufrió un pronunciado declive. En los 80 la proporción de aparición de casos de resistencia era ya de más de 15 nuevas especies resistentes por año, y en los 90 eran catalogadas como resistentes más de 500 especies de artrópodos, al menos a un insecticida. Este proceso condujo al abandono de la estrategia de luchar mediante nuevos compuestos y fue reemplazada por un nuevo paradigma de control de resistencia: detección temprana junto con tácticas que procuraran la prevención, retraso e incluso reversión de los niveles de resistencia aparecidos y considerados deletéreos (Soderlund, 1997).

Sin embargo, a pesar de todas estas circunstancias, los insecticidas se encuentran todavía entre las herramientas más eficientes para mantener las poblaciones de plagas bajo control.

1.3.2. Mecanismos de resistencia a insecticidas

Los mecanismos de resistencia a insecticidas se pueden dividir en dos niveles: de comportamiento y fisiológicos. El primer nivel se produce cuando el insecto altera su comportamiento de manera que se reduce o se evita el

contacto con el insecticida. Los mecanismos fisiológicos se dividen, a su vez, en tres subniveles: reducción de la penetración de los plaguicidas mediante barreras tisulares, incremento de la destoxificación de los insecticidas mediante procesos metabólicos y alteraciones de los puntos de acción (dianas) de los agentes tóxicos.

1.3.2.1. Resistencia por comportamiento

En el año 1989 Sparks definió esta forma de resistencia como «el desarrollo de comportamientos que reducen la exposición a compuestos tóxicos en los insectos, o que permiten la supervivencia de éstos, sin los cuales la presencia del tóxico resultaría letal». Subdividió estos comportamientos en estímulo-dependientes y estímulo-independientes. Los primeros incluyen repelencia e irritación, mecanismos que desarrolla el insecto para evitar el insecticida antes y después del contacto, respectivamente. Los comportamientos estímulo-independientes incluyen evitar el insecticida por el hecho de ocupar hábitats que minimizan el contacto del insecto con el tóxico (Sparks et al., 1989).

Estos mecanismos son difíciles de estudiar. Aun así, han sido documentados en más de 30 especies de insectos, con lo que se pone de manifiesto que se trata de un mecanismo generalizado en este grupo animal. Se conocen pocas estrategias para su control, pero la rotación o alternancia de insecticidas podría retrasar su aparición (Sparks et al., 1989).

1.3.2.2. Reducción de la penetración

La reducción de la penetración a través de las barreras tisulares es un modo efectivo de reducir la dosis de insecticida que llega al lugar de acción, aunque no se evite la reducción en la totalidad del cuerpo del insecto. La cantidad de insecticida que penetra a través de la cutícula u otras barreras (como el tracto digestivo) depende fundamentalmente de las propiedades

fisicoquímicas del insecticida y de las propiedades del tegumento del insecto (la barrera), de modo que este mecanismo está encaminado a seleccionar cambios en las propiedades fisicoquímicas de las barreras tisulares, debidos fundamentalmente a alteraciones en su composición.

Como mecanismo aislado confiere bajos niveles de resistencia (Scott et al., 1990), pero normalmente se presenta combinado con otros tipos de mecanismos, intensificando su efecto. Su mayor potencial se debe a que evita o reduce el riesgo de que los mecanismos de detoxificación se saturen, además de que protege frente a un amplio rango de insecticidas. Este tipo de resistencia ha sido documentado en varias especies de insectos (Plapp y Hoyer, 1968; Oppenoorth, 1985).

1.3.2.3. Incremento de la detoxificación metabólica

Anteriormente la detoxificación de xenobióticos se atribuía a un efecto lateral de enzimas con alguna función fisiológica desconocida, pero esta idea fue descartada al reconsiderar que la mayoría de las enzimas implicadas en este proceso, si no todas, están presentes precisamente para defender a los organismos contra los muchos productos nocivos que se encuentran en su ambiente. Diversas enzimas constituyen un sistema integrado para la degradación de estos compuestos y se encuentran presentes como resultado de una larga historia evolutiva, tanto en vertebrados como en invertebrados. En este aspecto, muchos insectos polípagos se encuentran expuestos a un amplio rango de toxinas naturales procedentes de las plantas y por ello a menudo están bien capacitados para detoxificar compuestos extraños, entre ellos también los insecticidas.

Cuando un xenobiótico penetra por ingestión, inhalación o absorción, sufre una serie de reacciones metabólicas detoxificantes que lo convierten en un producto menos tóxico y más fácilmente eliminable. Los procesos mediante los cuales se metabolizan los xenobióticos se dividen en

dos fases (figura 1.7). En la fase I, se introduce un grupo funcional polar en la molécula por oxidación, reducción, hidrólisis, etc. Si el metabolito resultante es suficientemente hidrofílico, éste es excretado por el organismo. De lo contrario, actúa como sustrato de la fase II (metabolismo sintético), donde otras enzimas catalizan su conjugación con otros sustratos endógenos hidrofílicos, incrementando su polaridad y facilitando con ello su excreción (B-Bernard y Philogène, 1993).

La mayor parte de los insecticidas utilizados para combatir las plagas (OP, piretroides, carbamatos, organoclorados) suelen ser sustancias lipófilas con la finalidad de facilitar su penetración a través de la cutícula, por lo que su metabolismo está encaminado a aumentar su polaridad. Generalmente, en la degradación de los insecticidas se encuentran implicados tres sistemas enzimáticos: las esterasas, las oxidasas de función múltiple (MFO), ambos sistemas correspondientes a la fase I, y las glutatión S-transferasas (GST), correspondientes a la fase II del metabolismo (Soderlund y Bloomquist, 1990).

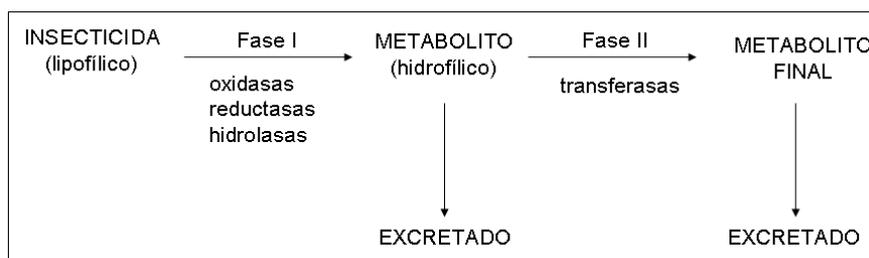


Figura 1.7. Representación de las fases del metabolismo de destoxificación de los insecticidas que tienen lugar en el interior del insecto.

Un incremento en la capacidad de destoxificar los insecticidas confiere, por tanto, un grado variable de resistencia a los insectos. Esta mayor capacidad de degradación puede ser debida bien a un cambio cuantitativo o bien a un cambio cualitativo. El primero es el resultado de un incremento en la expresión de enzimas de destoxificación (sobreexpresión),

que podría ser debido a su vez a una amplificación génica o a una alteración a nivel de la regulación. El segundo caso se produce por la presencia de enzimas con una mayor capacidad de detoxificación, que generalmente corresponden a isoenzimas diferentes (Li et al., 2007).

El incremento en la detoxificación metabólica suele ser el mecanismo de resistencia más común. No hay que olvidar que muchos de los insecticidas son una imitación de los tóxicos presentes en las plantas, frente a los cuales los insectos han desarrollado estos mecanismos de detoxificación (Oppenoorth, 1985).

❖ Esterasas

En la reacción catalizada por las esterasas (figura 1.8) se produce la hidrólisis de un amplio rango de sustratos éster en sus componentes alcohol y ácido.

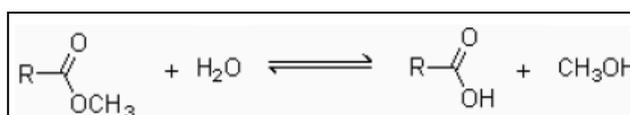


Figura 1.8. Representación de la reacción de hidrólisis catalizada por las esterasas.

Muchos insecticidas (OP, carbamatos y piretroides) presentan un éster carboxílico asociado. En lo que concierne a este trabajo son de interés las enzimas que hidrolizan dicho éster, que son conocidas con el nombre de carboxilesterasas. En la actualidad se utilizan múltiples sistemas de nomenclatura para la clasificación de estas enzimas, sin que se haya establecido todavía alguno como preferente. De acuerdo con la nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB), las carboxilesterasas se localizan en el grupo de las

hidrolasas (3), subgrupo 1, y dentro de éste, en el subtipo 1 (Enzyme Commission 3.1.1.1, EC 3.1.1.1). Otra clasificación común es la nomenclatura propuesta por Aldridge (1953a, b), que divide las esterasas en tres grupos en función de la naturaleza de sus interacciones con insecticidas OP. Las carboxilesterasas pertenecen, según esta clasificación, al grupo de las ali-esterasas o B-esterasas. En el presente trabajo se hará mención a este grupo simplemente como esterasas, las cuales constituyen una larga familia de enzimas en insectos (Oakeshott et al., 2005a).

❖ Oxidasas de función múltiple (MFO)

En la reacción catalizada por las MFO (EC 1.14.14.1) un átomo de una molécula de oxígeno se incorpora al sustrato, mientras que el otro se reduce a agua (figura 1.9). Por ello requiere nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y O_2 para su funcionamiento.

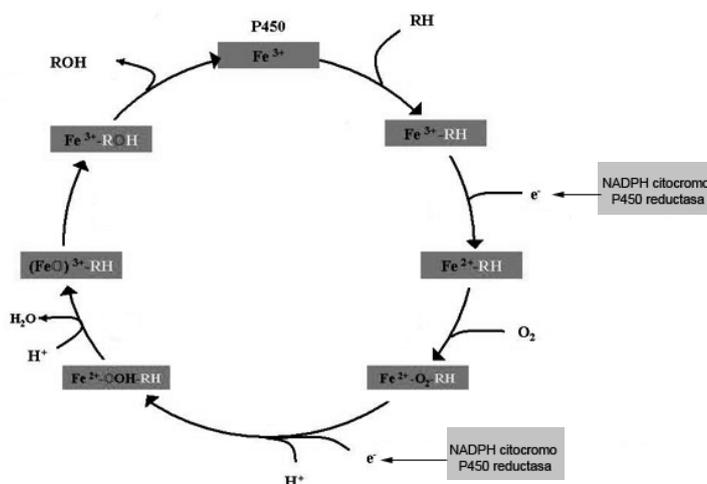


Figura 1.9. Representación de la reacción de oxidación catalizada por las oxidasas de función múltiple (MFO).

Se trata de un sistema enzimático compuesto por dos enzimas, la citocromo P450 y la NADPH-citocromo P450 reductasa, ambas proteínas de membrana. También son conocidas como monooxigenasas dependientes del citocromo P-450 o como sistema P450. Los genes que codifican las diferentes isoenzimas comprenden una superfamilia de más de 200 genes, agrupados en 36 familias en base a la similitud de sus secuencias (Soderlund, 1997).

En insectos, las MFO se encuentran en el retículo endoplásmico y en las mitocondrias (Guengerich, 1991) y están implicadas en un amplio número de procesos, tales como el crecimiento, el desarrollo, la reproducción, la detoxificación, etc. Es decir, participan tanto en el metabolismo de sustancias endógenas como exógenas, las cuales promueven su inducción (Feyereisen, 1999). Debido a su elevada inespecificidad, metabolizan un amplio rango de compuestos tales como: OP, carbamatos, piretroides, DDT, inhibidores de la síntesis de quitina, miméticos de la hormona juvenil, etc. (Wilkinson, 1983). De hecho, es el único sistema enzimático capaz de mediar en la resistencia frente a todas las clases de insecticidas (tanto los que actúan a nivel del sistema nervioso, como del digestivo, reproductor, etc.). Por ello resulta frecuente verlas implicadas en resistencia cruzada a más de un tipo de insecticida.

❖ Glutación S-transferasas (GST)

Las GST (EC 2.5.1.18) son un grupo de enzimas que catalizan la conjugación de componentes hidrofóbicos con el

tripéptido glutatión (figura 1.10). En la reacción, el grupo tiol del glutatión reacciona con un lugar electrofílico del compuesto para formar el conjugado que puede ser metabolizado o excretado (Jakoby y Habig, 1980).

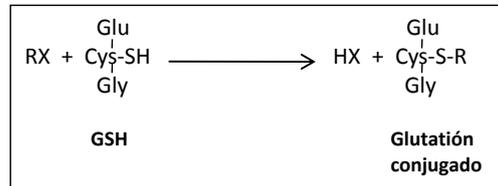


Figura 1.10. Representación de la reacción de conjugación catalizada por las glutatión S-transferasas (GST).

Las GST se encuentran en los insectos en una amplia variedad de isoformas y, a menudo, se inducen por xenobióticos (Soderlund y Bloomquist, 1990). Son de gran importancia en la detoxificación de OP, pero debido a su baja especificidad también se han relacionado con la resistencia a otros insecticidas, como los carbamatos. Las GST fueron el último mecanismo de resistencia reconocido como importante en la resistencia a insecticidas.

1.3.2.4. Alteración de los puntos de acción de los insecticidas

Como ya hemos mencionado anteriormente, las tres clases más importantes de insecticidas, OP, carbamatos y piretroides, tienen como diana o lugar de acción proteínas del sistema nervioso. Los OP y los carbamatos poseen como diana la enzima AChE, mientras que los piretroides se unen a los canales de sodio dependientes de voltaje de las membranas de las células nerviosas. Las alteraciones en las dianas implican una disminución en la sensibilidad de éstas a los insecticidas neurotóxicos y son un mecanismo importante de resistencia en los insectos.

De hecho, este mecanismo es el segundo más común tras el incremento en la capacidad de detoxificación.

Otros sitios de acción de los insecticidas neurotóxicos son los receptores dependientes de GABA y los receptores nicotínicos, pero éstos son de menor relevancia que los anteriores.

❖ Acetilcolinesterasas (AChE)

Como ya hemos mencionado anteriormente, la diana para OP y carbamatos es la enzima AChE (EC 3.1.1.7) (figura 1.11), también perteneciente a la familia de las aliesterasas o B-esterasas. Una modificación en las AChE que suponga una menor sensibilidad frente a la acción de los insecticidas, puede conferir resistencia a estos dos grupos de compuestos (Bourguet et al., 1997). En la AChE modificada, se produce una disminución de la reacción con el insecticida, perdiendo éste su efectividad. En ocasiones también se ve disminuida la función catalítica de la enzima, pero debido a su función vital, nunca lo hace por debajo de un valor umbral compatible con la supervivencia.

También puede darse el caso de que la resistencia se deba a un incremento de la actividad, causada a su vez por una mayor efectividad catalítica o por un incremento en la cantidad de enzima, pero este hecho suele ser menos frecuente (Fournier y Mutero, 1994).

La resistencia asociada con modificación de AChE ha sido identificada en muchas especies de artrópodos (Fournier y Mutero, 1994; Zhu et al., 1996; Devonshire et al., 1998).

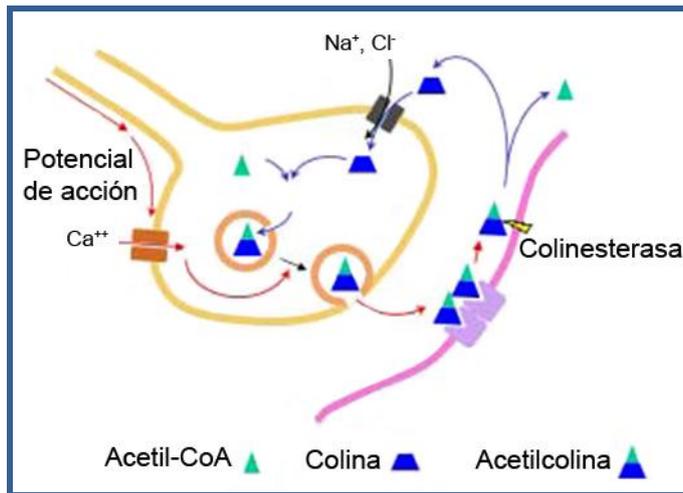


Figura 1.11. Representación de la función de las acetilcolinesterasas en la sinapsis colinérgica.

❖ Resistencia *knockdown* (*kdr*)

El principal lugar de acción de los piretroides y el DDT es el canal de sodio dependiente de voltaje. La resistencia al DDT y a los piretroides se caracteriza por una reducción de la sensibilidad de los canales de sodio dependientes de voltaje, como consecuencia de una modificación en su cinética (Bloomquist, 1996). Este mecanismo fue visto por primera vez en *Musca domestica* (Busvine, 1951) y al gen causante de ésta se le denominó *knockdown resistance* (*kdr*). Milani y Travaglino (1957) mostraron que se trataba de un gen recesivo.

La resistencia *kdr* o insensibilidad del canal de sodio es un mecanismo de resistencia bastante extendido y ha sido demostrado en especies de Diptera, Lepidoptera, Coleoptera y Dictyoptera (Soderlund y Bloomquist, 1990; Schuler et al., 1998).

Algunos indicativos que responsabilizan a los canales de sodio en la resistencia son: resistencia cruzada entre DDT y piretroides, naturaleza recesiva del factor de resistencia, insensibilidad en preparaciones nerviosas y ausencia de otros mecanismos, además de las evidencias de modificaciones genéticas.

Con frecuencia se produce una combinación de varios mecanismos de resistencia, cuyo resultado es una multiplicación de los niveles de resistencia (Mullin y Scott, 1992). El análisis de la contribución de varios mecanismos de detoxificación puede ser bastante complejo, en particular en aquellos casos en los que diferentes mecanismos pueden producir los mismos productos de degradación.

La resistencia se debe, mayoritariamente, a un incremento de la capacidad de los sistemas de detoxificación, o bien a una reducción de la sensibilidad de los puntos de acción o dianas. En las proteínas diana tan solo son posibles modificaciones en unos pocos puntos, que además se encuentran enormemente conservados, probablemente porque sus funciones son tan vitales que solo esos cambios pueden reducir su sensibilidad a los insecticidas sin alterar sus funciones normales. Por el contrario, los genes asociados con resistencia metabólica median funciones de respuesta ambiental que tienen relativamente pocas restricciones intrínsecas y tienden a ser más tolerantes a cambios genómicos, que alteran su expresión, sus propiedades cinéticas, o ambos, por amplificación y sobreexpresión en el primer caso, o por variación de las secuencias que codifican para los tres grupos más importantes de enzimas metabólicas, en el segundo. Por ello, la resistencia por modificación de las dianas se ha asociado siempre a unas pocas mutaciones repetidas en diferentes especies de insectos, no siendo así en el caso de los sistemas de detoxificación (Li et al., 2007).

1.3.3. Procedimientos experimentales usuales en el estudio de la resistencia

Históricamente, los bioensayos convencionales han sido la herramienta de diagnóstico primario de la resistencia. Sin embargo, se han adaptado técnicas bioquímicas rápidas y sensibles para controlar la intensidad y frecuencia de la resistencia entre las poblaciones de ciertas especies de insectos (Zhou et al., 2002). Los sustratos modelo han sido utilizados con éxito para identificar un gran número de casos en los que un incremento de la actividad de alguna de las enzimas de destoxificación era responsable de la resistencia observada en poblaciones de diferentes especies de insectos (Devonshire y Moores, 1982; Byrne y Devonshire, 1991; Rose et al., 1995).

Las técnicas utilizadas en nuestro estudio para demostrar que una determinada enzima o sistema enzimático es responsable en mayor o menor medida del desarrollo de la resistencia, se detallan a continuación.

❖ Bioensayos convencionales

Mediante la aplicación conjunta de insecticidas y sinergistas. Un sinergista es un compuesto que incrementa la letalidad de los insecticidas cuando es administrado en una dosis subletal (Brindley y Selim, 1984), por inhibir la destoxificación metabólica, por favorecer la penetración de los insecticidas a través de la cutícula, y por actuar en los sitios de unión de los insecticidas.

En nuestro estudio, los inhibidores de los sistemas de destoxificación metabólica son herramientas útiles para identificar tales mecanismos. Un procedimiento estándar de diagnóstico es probar el efecto de una batería de sinergistas, inhibiendo a las diferentes enzimas de destoxificación, en poblaciones resistentes y sensibles. Entre los sinergistas

que actúan como inhibidores de esterasas se encuentra el S,S,S-tributilfosforotrioato (DEF) (Raffa y Priester, 1985) y el sinergista más empleado para los estudios de detección de resistencia debidos a las oxidasas es el butóxido de piperonilo (PBO; 3,4-metilendioxi-6-propilbenzil n-butil dietilenglicol éter) (Feyereisen, 1999) (figura 1.12).

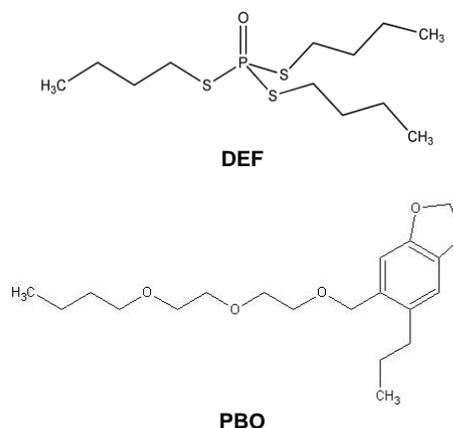


Figura 1.12. Estructura química de las moléculas de los sinergistas más importantes utilizados como inhibidores de esterasas (DEF) y MFO (PBO).

En el caso de la actividad GST es difícil obtener inhibidores específicos que permitan el estudio de su implicación en la resistencia. El sinergista más ampliamente utilizado es el dietilmaleato (DEM), pero presenta muy baja especificidad (Price, 1991).

La evaluación del efecto de los sinergistas se realiza mediante el factor de sinergismo (FS). Éste se calcula con los valores de CL₅₀ o DL₅₀ (concentración o dosis letal para el 50% de la población de insectos, respectivamente), dividiendo dichos valores para el insecticida por los hallados cuando se usa el sinergista junto con el insecticida

(B-Bernard y Philogène, 1993). No obstante, no hay que olvidar que los sinergistas juegan un papel indirecto en la identificación de los mecanismos de resistencia, así como el hecho de que a veces presentan baja especificidad hacia el sistema enzimático que inhiben, dificultando la interpretación de los resultados obtenidos (Scott et al., 1990).

❖ Estudios bioquímicos

Este tipo de estudios se ha realizado mediante técnicas espectrofluorimétricas y mediante electroforesis. En el primer caso, bien determinando algunos de los parámetros cinéticos propios de las enzimas ($V_{m\acute{a}x}$ y K_m) o bien midiendo la actividad enzimática frente a un sustrato modelo relacionado con la resistencia o frente al propio insecticida. En el caso de las técnicas electroforéticas, determinando las diversas isoformas. En todos los casos, siempre comparando entre poblaciones sensibles y resistentes. Los ensayos bioquímicos de sensibilidad de AChE son también un método rutinario, en el que se compara la actividad de los homogeneizados en presencia y ausencia de inhibidor.

Cuando se determina la actividad enzimática frente a un sustrato modelo hay que tener en cuenta que éste podría ser hidrolizado por isoenzimas no asociadas a resistencia, es decir, que fuesen capaces de romper dicho sustrato, pero no el insecticida. Ahora bien, las correlaciones halladas entre la actividad determinada con dichos sustratos y el nivel de resistencia de diferentes poblaciones es un buen indicador de la implicación de las enzimas estudiadas

en la resistencia. Sin embargo, los estudios con el propio insecticida son más seguros, aunque muy costosos.

Una combinación de ambos tipos de estudios, bioensayos y ensayos bioquímicos, es una herramienta importante para conocer los mecanismos implicados en la resistencia, pero para llegar a elucidar la responsabilidad última es necesario llegar a los mecanismos moleculares y genéticos subyacentes (Mullin y Scott, 1992; Soderlund, 1997).

1.4. Objetivos

En lo que concierne a esta tesis doctoral, el objetivo general es el estudio de los mecanismos responsables de la resistencia manifestada por los insectos frente a los insecticidas en poblaciones españolas de la especie *F. occidentalis*, una de las plagas agrícolas más importantes en nuestro país. Con ello se pretende validar la utilización de una serie de ensayos bioquímicos que permitan atribuir la implicación de mecanismos concretos en la resistencia, al tiempo que permitan evaluar el efecto de los insecticidas utilizados en el control de las plagas sobre la resistencia. Para ello se han abordado distintos aspectos de la resistencia, como son los mecanismos de detoxificación y la modificación de las dianas, tanto en poblaciones recogidas en campo como seleccionadas en el laboratorio, mediante los estudios detallados a continuación y desarrollados en los próximos capítulos:

- Estudio cualitativo y cuantitativo de la actividad esterasa como mecanismo de detoxificación implicado en la resistencia. Éste se establece como una continuación de otro estudio llevado a cabo previamente por nuestro grupo, en el que se determinó una relación entre la actividad esterasa y la resistencia. Se han utilizado poblaciones procedentes de

diferentes invernaderos comerciales, donde la plaga encuentra unas condiciones óptimas para su desarrollo.

- Análisis *in vitro* e *in vivo* del efecto producido por diversos compuestos sinergistas sobre la actividad esterasa. Los bioensayos permiten realizar una aproximación a los mecanismos responsables de la resistencia, ya que se puede determinar con mayor precisión lo que ocurre en el interior del insecto cuando estos compuestos son aplicados junto con los insecticidas. En este caso se han utilizado poblaciones seleccionadas en el laboratorio, las cuales presentan una mayor resistencia como resultado de la mayor presión de selección ejercida por los tratamientos con los insecticidas.

- Estudio cualitativo y cuantitativo de la actividad acetilcolinesterasa (AChE), como posible mecanismo implicado en la resistencia por modificación de las dianas. Después de los sistemas de detoxificación, la modificación de las dianas es el segundo mecanismo más común como responsable de la resistencia. El estudio se ha llevado a cabo en poblaciones recogidas en campo y seleccionadas en laboratorio, ya que en ambos casos se han encontrado poblaciones cuya resistencia no podía ser explicada únicamente por efecto de las enzimas de detoxificación.

2. Estudio de isoenzimas de esterasas en poblaciones de campo de *Frankliniella occidentalis* y su relación con la resistencia

2. Estudio de isoenzimas de esterasas en poblaciones de campo de *Frankliniella occidentalis* y su relación con la resistencia

2.1. Introducción

Como un componente importante del sistema de defensa de los insectos frente a xenobióticos, las esterasas han jugado un papel clave en la investigación bioquímica de los últimos 50 años, siendo el centro de interés en los estudios del metabolismo de los insecticidas y de la resistencia (Oakeshott et al., 2005a). Las carboxilesterasas hidrolizan numerosos compuestos tanto endógenos como exógenos que contienen ésteres, por lo que juegan un papel importante en la detoxificación de muchos insecticidas, incluyendo piretroides, organofosforados (OP) y carbamatos.

La resistencia asociada con esterasas es un hecho muy frecuente y documentado en una gran variedad de insectos (Soderlund y Bloomquist, 1990; Soderlund, 1997; Wheelock et al., 2005). La forma más común de relacionarlas es por incremento de la actividad, producida, a su vez, bien por aumento de los niveles de esterasas o bien por diferencias en isoenzimas relativas. La forma más habitual de analizar la actividad suele ser mediante ensayos espectrofotométricos o electroforéticos, utilizando sustratos artificiales como el naftil acetato o el *p*-nitrofenilacetato. Estos sustratos son muy útiles debido a su bajo coste y fácil disponibilidad, además de que los instrumentos de análisis requeridos son relativamente baratos. Sin embargo, el mayor obstáculo en la identificación bioquímica y caracterización de carboxilesterasas es la elección de un sustrato adecuado para determinar la actividad cuando se trabaja en presencia de múltiples isoenzimas (Oakeshott et al., 2005a; Wheelock et al., 2005).

El hecho de que las esterasas de muchos insectos sean altamente polimórficas (Wagner y Selander, 1974) conduce a que aquellos que presentan esterasas particularmente eficientes en su unión a los insecticidas, muestren una mayor probabilidad de supervivencia cuando se ejerce una importante presión de selección con tales compuestos. Por ello, cambios tanto en la frecuencia de estas enzimas de destoxificación como en su actividad, son uno de los mecanismos implicados en la resistencia a los insecticidas (Parker y Callaghan, 1997).

Esencialmente, el incremento de la actividad esterasa responsable del desarrollo de la resistencia puede ser debido a tres causas distintas (Wheelock et al., 2005). Primero, por un aumento en la cantidad de esterasas debido a una amplificación del gen/es en el genoma, como es el caso del áfido o pulgón verde del melocotonero *Myzus persicae* (Devonshire et al., 1998), de mosquitos del género *Culex* (Vaughan y Hemingway, 1995), y del saltamontes marrón *Nilaparvata lugens* (Small y Hemingway, 2000). En la mayoría de estos casos la resistencia está causada por secuestro de los insecticidas debido a la elevada cantidad de enzima, y no por un incremento en la hidrólisis. No obstante, en el caso de la enzima descrita como E4 en *M. persicae* se ha visto que ésta sí metaboliza los insecticidas (Devonshire y Moores, 1982). La segunda de las causas mencionadas sería un aumento en la cantidad de esterasas debido en este caso a una alteración a nivel de la regulación de la transcripción, produciéndose ésta con mayor frecuencia de lo habitual. Este mecanismo ha sido descrito en mosquitos de la especie *Culex pipiens* (Rooker et al., 1996), aunque resulta ser menos común que el anterior. Finalmente, la resistencia también puede ser debida a la selección de insectos que poseen esterasas con alguna mutación que les confiere una mayor capacidad para metabolizar los insecticidas, como ha sido descrito en moscas de la especie *Musca domestica* (Oppenoorth y van Asperen, 1960), en la mosca de la oveja, *Lucilia cuprina* (Newcomb et al., 1997; Campbell et al., 1998) y en el

parasitoide *Anisopteromalus calandrae* (Zhu et al., 1999). Inicialmente este caso de resistencia se asoció con un incremento de la resistencia a los insecticidas y, simultáneamente, con una disminución de la capacidad de metabolizar los sustratos modelo, lo que se denominó como “teoría de la aliesterasa mutante”. Recientemente se ha descrito una hipótesis alternativa, en la que el punto de mutación del gen de la esterasa puede activar la transcripción de enzimas no hidrolíticas (P450) reprimidas que catalizan la división éster y confieren resistencia (Sabourault et al., 2001).

En poblaciones de *F. occidentalis* también ha sido descrito un incremento en la detoxificación debido a las esterases. Normalmente, la evidencia que ha llevado a responsabilizar a tal mecanismo en el desarrollo de la resistencia ha sido una asociación entre los niveles elevados de actividad esterasa hacia sustratos modelo y el nivel de resistencia. Concretamente, en un estudio realizado por Jensen (1998) en una población de *F. occidentalis* resistente a metiocarb, se encontró un ligero incremento de la actividad esterasa frente al sustrato modelo α -naftil acetato (α -NA), en comparación con la población sensible. En estudios posteriores realizados por este mismo autor (Jensen, 2000) se puso de manifiesto que el S,S,S-tributilfosforotritioato (DEF) disminuía levemente la resistencia a metiocarb en las 3 poblaciones más resistentes y, además, ensayos *in vitro* de actividad esterasa mostraron que dos de esas poblaciones presentaban un incremento de dicha actividad en comparación con la población sensible, poniendo de manifiesto que las esterases estaban implicadas en la resistencia a metiocarb.

En un estudio previo llevado a cabo en nuestro laboratorio, se encontró que los niveles medios de la actividad esterasa en poblaciones de campo eran mayores en aquellas más resistentes comparadas con la de referencia. Además se estableció una correlación significativa entre la actividad esterasa detectada y el nivel de resistencia frente a acrinatrina y metiocarb mostrada por las poblaciones (Maymó et al., 2006).

Así pues, en este estudio, se ha analizado la frecuencia de las isoenzimas de esterases presentes en diferentes poblaciones de campo de *F. occidentalis*, cuyo valor de CL_{50} para varios insecticidas era conocido. Para ello, se ha realizado un estudio electroforético utilizando geles de poliacrilamida en condiciones nativas y teñidos posteriormente para actividad esterasa con dos sustratos modelo: α -NA y α -naftil butirato (α -NB). Posteriormente, estas poblaciones se han comparado con la población sensible para determinar las diferencias en las bandas implicadas en la actividad esterasa y su posible relación con la resistencia a los insecticidas.

Nuestro objetivo era determinar si los trips expuestos a diferentes niveles de insecticidas y que presentaban un incremento de la actividad esterasa, mostraban diferencias en cuanto a sus isoenzimas tanto en intensidad como en frecuencia.

2.2. Material y métodos

2.2.1. Insectos

En este estudio se utilizaron 13 poblaciones de *F. occidentalis* recogidas en diferentes invernaderos comerciales localizados en la región de Murcia, así como en invernaderos experimentales. Estos últimos consistían en invernaderos comerciales en los cuales se realizó una serie de tratamientos intensivos con diferentes ensayos de reiteración para analizar la evolución de la resistencia de las poblaciones allí presentes. El régimen de insecticidas utilizado en los invernaderos en cada una de las poblaciones, así como el valor de CL_{50} frente a los 6 insecticidas estudiados, queda resumido en la tabla 2.1 (Espinosa et al., 2002; Bielza y Contreras, 2005).

Los insectos fueron proporcionados por el Departamento de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT) y mantenidos individualmente a -80°C hasta el momento de su utilización en los diversos ensayos.

2.2.2. Preparación de las muestras

En este estudio se realizaron tanto medidas en conjuntos de insectos como en individuos aislados. En el caso de medidas individuales, cada insecto se homogeneizó en 50 μ L de tampón fosfato sódico 100 mM (pH 7,5) en una microplaca de 96 pocillos mantenida en hielo, mediante un homogeneizador múltiple (Burkard Instruments, Richmansworth, UK). Los trips se homogeneizaron en un máximo de 15 individuos al mismo tiempo. Las fracciones de homogeneizado no utilizadas en el momento se almacenaron a -20°C para evitar su degradación, hasta su utilización en determinaciones posteriores. Cada muestra se utilizó para determinar el patrón de bandas de esterasas, la actividad esterasa total, así como la cantidad de proteína.

En el caso de medidas de conjuntos de trips, el homogeneizado se preparó en la misma proporción que en el caso anterior (1 trips por cada 50 μ L de tampón) y en las mismas condiciones, a excepción del recipiente (un tubo eppendorf) y el homogeneizador (manual para eppendorf) utilizados.

2.2.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y tinción para actividad esterasa

En un primer estudio de análisis de isoenzimas de esterasas se analizaron 48 insectos de cada población. Para ello, alícuotas de cinco microlitros del homogeneizado inicial de insectos individuales se mezclaban con 5 μ L de Triton X-100® al 1,6% (w/v) (Sigma Chemical Co. St Louis, MO), conteniendo sacarosa al 10% y una pequeña cantidad de azul de bromofenol y estos 10 μ L se cargaban en cada carrera del gel.

Tabla 2.1. Características de las poblaciones de *F. occidentalis* utilizadas en los ensayos de esteradas.

Origen	Población	CL ₅₀ (mg de ingrediente activo L ⁻¹) ^{a,b}							Régimen de insecticidas utilizado ^c
		Deltametrina	Acrinatrina	Metamidofos	Endosulfán	Metiocarb	Formetanato	Ninguno	
Sensible	MLFOM	131 (1)	9 (1)	1056 (1)	3206 (1)	15 (1)	765 (1)	Ninguno	
Invernadero comercial	PEPTF	126 (1)	51 (5,7)	618 (0,6)	15414 (4,8)	50 (3,3)	3395 (4,4)	Metomilo/endosulfán/acrinatrina/ formetanato/bifentrina/buprofezin (cada 2 semanas)	
	PIMVE	450 (3,4)	19 (2,1)	1062 (1,0)	2576 (0,8)	75 (5,0)	9910 (13,0)	Metiocarb/formetanato/acrinatrina (dudoso)	
	TOMBR	189 (1,4)	131 (14,6)	348 (0,3)	1624 (0,5)	65 (4,3)	3400 (4,4)	Endosulfán/cipermetrina/imidacloprid/ malatión/metomilo/acrinatrina/ formetanato/deltametrina/buprofezin	
	TOMPA	572 (4,4)	55 (6,1)	1434 (1,4)	9744 (3,0)	90 (6,0)	4260 (5,6)	Metiocarb/formetanato/acrinatrina	
	TOMSU	282 (2,1)	65 (7,2)	1014 (1,0)	6668 (2,1)	115 (7,7)	5665 (7,4)	Metiocarb /formetanato/acrinatrina	
	SALB	580 (4,4)	119 (13,2)	2040 (1,9)	903 (0,3)	85 (5,7)	-	9 años sin tratamiento (excepto uno accidental con acrinatrina 5 años antes)	
Invernadero experimental ^d	PITFA11	295 (2,2)	72 (8,0)	4164 (3,9)	6920 (2,2)	95 (6,3)	2820 (3,7)	Ninguno	
	PITFA14	-	6511 (723,4)	-	-	130 (8,7)	5800 (7,6)	Ensayo de estrategia de reiteración con acrinatrina cada 2 semanas (6 aplicaciones)	

^a Resultados de bioensayos tópicos (Espinosa et al., 2002; Bieiza y Contreras, 2005).

^b El factor de resistencia (FR₅₀), calculado como la CL₅₀ de la población resistente dividido por la CL₅₀ de la población de referencia MLFOM, aparece entre paréntesis.

^c Acrinatrina, bifentrina, cipermetrina y deltametrina, son insecticidas piretroides; endosulfán es un organoclorado; formetanato, metiocarb y metomilo son carbamatos; malatión y amidofos son organofosforados; imidacloprid es un nicotinoide, y buprofezin es un inhibidor de la síntesis de quitina.

^d La concentración de los insecticidas utilizados en la estrategia de reiteración fue la dosis máxima permitida en campo (mg de ingrediente activo litro⁻¹): 60 mg para acrinatrina y 1000 mg para formetanato y metiocarb.

- Insecticidas no ensayados.

Tabla 2.1. (Continuación).

Origen	Población	CL ₅₀ (mg de ingrediente activo L ⁻¹) ^{a,b}						Régimen de insecticidas utilizado ^c
		Deltametrina	Acrinatrina	Metamidofos	Endosulfán	Metiocarb	Formetanato	
Invernadero experimental ^d	PIPAF2	-	66 (7,3)	-	-	310 (20,7)	8790 (11,5)	Metomilo/malatió/imidacloprid/ensayo de estrategia de reiteración con formetanato cada 10 días (5 aplicaciones, más 1 tratamiento con metiocarb)
	PIPAF4	-	1563 (173,7)	-	-	325 (21,7)	50110 (65,5)	Metomilo/malatió/imidacloprid/ensayo de estrategia de reiteración con formetanato cada 7 días (9 aplicaciones, más 1 tratamiento con metiocarb y 2 con acrinatrina)
	PIPAM1	276 (2,1)	95 (10,6)	966 (0,9)	9170 (2,9)	120 (8,0)	1250 (1,6)	Metomilo/malatió/imidacloprid/ensayo de estrategia de reiteración con metiocarb cada 10 días (3 aplicaciones, más 1 tratamiento con formetanato)
	PIPAM3	421 (3,2)	581 (64,6)	9270 (8,8)	23695 (7,4)	440 (29,3)	37550 (49,1)	Metomilo/malatió/imidacloprid/ensayo de estrategia de reiteración con metiocarb cada 10 días (6 aplicaciones, más 1 tratamiento con formetanato y 1 con acrinatrina)

^a Resultados de bioensayos tópicos (Espinosa et al., 2002; Bielza y Contreras, 2005).

^b El factor de resistencia (FR₅₀), calculado como la CL₅₀ de la población resistente dividido por la CL₅₀ de la población de referencia MLFOM, aparece entre paréntesis.

^c Acrinatrina, bifentrina, cipermetrina y deltametrina, son insecticidas piretroides; endosulfán es un organoclorado; formetanato, metiocarb y metomilo son carbamatos; malatió y metamidofos son organofosforados; imidacloprid es un nicotinoide, y buprofezin es un inhibidor de la síntesis de quitina.

^d La concentración de los insecticidas utilizados en la estrategia de reiteración fue la dosis máxima permitida en campo (mg de ingrediente activo litro⁻¹): 60 mg para acrinatrín y 1000 mg para formetanato y metiocarb.

- Insecticidas no ensayados.

Los geles de poliacrilamida se prepararon en condiciones nativas a una concentración homogénea de 6% de acrilamida (T) y 10,6% de bis-acrilamida (C) para el gel de alineamiento, y de 8,5% T y 2,6% C para el gel de separación, con un grosor de 0,75 mm. La electroforesis se llevó a cabo en un sistema discontinuo de tampones Tris/Glicina según Ornstein y Davis (Davis, 1964), a excepción de algunas pequeñas variaciones, como la concentración del tampón en el gel de alineamiento (62,5 mM) y en el tampón de cubeta (5 mM Tris y 38,4 mM glicina), así como el contenido de 0,2% (w/v) de Triton X-100 en los geles. Las electroforesis se realizaron en un sistema Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad, Richmond, CA) a un voltaje constante de 250 V durante 90 minutos a 4°C. Después de la electroforesis los geles se incubaron en frío, durante 5 minutos, en tampón fosfato sódico 200 mM (pH 6,0) con la finalidad de facilitar el proceso de tinción.

La tinción para la actividad esterasa se realizó con una disolución 0,75 mM de α -NA y 0,2% de cloruro de zinc 4-benzoilamino-2,5-dimetoxibenzodiazonio (FBRR) en este mismo tampón, durante 30 minutos a 30°C y en oscuridad (Han et al., 1998). Posteriormente los geles se destiñeron con una disolución de ácido acético al 7% en varias repeticiones hasta eliminar el color de fondo del gel. Seguidamente se escanearon en un escáner AGFA Snap Scan 1236 y finalmente se analizaron con la ayuda del software Image Master 1D 2.0 (Pharmacia Biotech) para calcular la movilidad relativa al frente de migración (R_f) de las bandas de esterasa detectadas.

En segundo lugar, se llevó a cabo otro estudio mediante análisis electroforético, con el objetivo de comparar la tinción de las isoenzimas frente a diferentes sustratos. Para ello se homogeneizaron 5 trips en 250 μ L del mismo tampón de homogenización descrito anteriormente. Alícuotas de 5 μ L de esta preparación se mezclaron con 5 μ L de Triton al 1,6%, conteniendo sacarosa y azul de bromofenol en las mismas proporciones descritas anteriormente. La electroforesis se realizó con la misma

instrumentación y en las condiciones descritas previamente. Después de la carrera electroforética, y previo al paso de tinción, el gel se seccionó en dos mitades para ser teñida cada una de ellas con distintos sustratos. La tinción se realizó del mismo modo descrito para el ensayo anterior, con la particularidad de que una mitad del gel se tiñó con α -NA y la otra con α -NB, siendo en este segundo caso la concentración de sustrato de 0,3 mM.

2.2.4. Optimización del ensayo α -naftil butirato

La determinación de las condiciones óptimas para el ensayo de medida a punto final frente al sustrato α -NB, se realizó en homogeneizados de conjuntos de trips y en las mismas proporciones indicadas en el apartado 2.2.2. *Preparación de las muestras.*

Todas las medidas de actividad esterasa, tanto en este como en los demás ensayos descritos a continuación, se realizaron en un lector de placas SPECTRA-Fluor (TECAN, Salzburg, Austria).

❖ Determinación de la K_m

La velocidad de la reacción catalizada por la enzima se analizó frente a diversas concentraciones de sustrato α -NB, con el fin de determinar la concentración a partir de la cual se observaba la saturación de la enzima. Para este ensayo se adaptó la metodología descrita por Maymó y colaboradores (2006) para el sustrato α -NA, al sustrato α -NB. Para ello, 10 μ L de homogeneizado diluido 1:10, se añadieron a un pocillo de microplaca y se mezclaron con 40 μ L de α -NB disuelto en tampón fosfato sódico 100 mM (pH 7,5) para dar una concentración final de sustrato en el rango de 0,01 a 2 mM. La placa se incubaba a 30°C durante 15 minutos y transcurrido ese tiempo, se paraba la reacción

mediante la adición de 50 μL de una disolución 0,04% de sal de zinc o-dianisidina bis diazotizada (FBB) y 2% de dodecil sulfato sódico (SDS). Cinco minutos más tarde la absorbancia era medida a una longitud de onda de 595 nm.

La curva que expresa la relación entre la concentración de sustrato y la velocidad inicial consiste en una hipérbola rectangular, cuya expresión algebraica viene dada por la ecuación de Michaelis-Menten. Ajustando los datos a dicha ecuación (software EnzFitter 2.0, Biosoft, Cambridge, UK) se obtuvo la constante de Michaelis-Menten (K_m) indicativa de la afinidad de la enzima por el sustrato.

❖ Determinación del rango lineal del ensayo

Para determinar la respuesta del ensayo frente a las diferentes cantidades de enzima, se analizó una batería de diluciones de homogeneizado, equivalentes a un rango de 0,01 a 0,2 trips, a una concentración de 0,3 mM de sustrato α -NB y en las mismas condiciones detalladas en el ensayo anterior. Se confirma así la linealidad del ensayo hasta un valor máximo para la velocidad de la reacción, a partir del cual dejaría de darse dicha relación lineal.

2.2.5. Actividad esterasa total

La actividad esterasa total se midió frente a los dos sustratos modelo utilizados, el α -NA y el α -NB, también en insectos individuales de las mismas poblaciones. En ambos casos se utilizó la metodología descrita por Maymó y colaboradores (2006) detallada anteriormente. La cantidad de muestra utilizada fue de 10 μL de homogeneizado diluido 1:10 y como se ha mencionado anteriormente, todas las medidas de actividad se realizaron en

el lector de placas. La absorbancia resultante de las medidas con ambos sustratos (α -NA y α -NB) se comparó con una curva patrón de α -naftol (producto de la reacción) para poder expresar los valores obtenidos en unidades enzimáticas (U), definidas como μmol de producto formado por minuto, y expresarla finalmente como actividad específica al dividir U por la cantidad de proteína (expresada en mg).

2.2.6. Determinación de proteína

El contenido de proteína existente en los homogeneizados de trips se determinó siguiendo la metodología descrita por Lowry y colaboradores (1951), y modificada por Bio-Rad (Hemel Hempstead, UK) para microensayos en placas de 96 pocillos, utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como patrón. Las medidas se realizaron con el lector de placas a una longitud de onda de 750 nm.

2.2.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS 14.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) para Windows. Previo a los análisis de correlación, regresión y comparación entre grupos, los datos se analizaron para determinar la normalidad, así como la homogeneidad de sus varianzas. Para el parámetro de normalidad se utilizaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk con la corrección de Lilliefors, y para el segundo parámetro, la prueba de Levene de homogeneidad de varianzas.

Los datos correspondientes a la variable “porcentaje de insectos con determinada/s banda/s por población” se transformaron utilizando una transformación angular, el arcoseno, donde los valores se calcularon como el arcoseno de la raíz cuadrada de los datos expresados como proporciones ($\text{sen}^{-1}(\sqrt{Y})$), con el fin de mejorar las asunciones de normalidad, homogeneidad de varianzas y linealidad, requeridas para tal análisis. Esta

transformación resulta la más adecuada cuando los datos corresponden a porcentajes. A continuación se analizó la relación entre dicha variable y la resistencia mostrada por estas poblaciones, expresada como factor de resistencia (FR_{50} ; calculado como la CL_{50} de la población de campo/ CL_{50} de la de referencia), frente a los 6 insecticidas estudiados. En este caso se llevó a cabo un análisis de correlación de Pearson (bivariado). En los casos (combinación de banda e insecticida) en los que se estableció una correlación significativa, además se procedió al ajuste de los datos mediante análisis de regresión por reducción de los ejes mayores (RMA) debido a que ambas variables eran aleatorias (Modelo II de regresión).

Los datos obtenidos de las determinaciones de la actividad específica tampoco presentaban la asunción de igualdad de varianzas, y ésta no se alcanzó mediante ninguna transformación de los mismos. En este caso el interés versaba en analizar las posibles diferencias de actividad entre dos grupos de insectos, los que presentaban el triplete A frente a aquellos que no. Así pues, una vez hecha la distribución de insectos en base a este criterio, se analizaron las diferencias entre estos dos grupos utilizando una prueba t robusta, la prueba de Welch, puesto que los datos no mostraban igualdad de varianzas.

En todos los casos, las diferencias se determinaron a un nivel de confianza del 95%.

2.3. Resultados

2.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida: tinción con α -naftil acetato

Los resultados del estudio electroforético para la actividad esterasa se representan en la figura 2.1. De ellos se puede deducir que *F. occidentalis* muestra múltiples isoenzimas de esterases cuando se utiliza α -NA como sustrato y que, además, son expresadas de forma diferencial dentro de cada población y, a su vez, dentro de cada individuo. Sin embargo, pese a la gran variabilidad se pudo fijar un patrón de bandas general, representado en la figura 2.2. En él se indica el valor de R_f calculado para las 10 bandas resueltas utilizando esta metodología y en las poblaciones analizadas, para facilitar la referencia de cada una de ellas.

Del mismo modo, también se establecieron una serie de pautas en las poblaciones respecto a la presencia de determinadas bandas. Concretamente, la banda con una R_f de 0,76, así como el par de bandas con R_f de 0,64 y 0,68 (en conjunto y denominado doblete C), estaban presentes casi exclusivamente en la población sensible y además, en el caso del doblete, su frecuencia en los insectos de tal población era extraordinariamente alta (figura 2.1). Por otro lado, otros dos grupos de bandas se presentaban también con bastante frecuencia en las poblaciones de campo. Un grupo compuesto por las bandas con una R_f de 0,64, 0,66 y 0,69 y al que denominaremos a partir de ahora triplete A, y otro compuesto por las bandas con R_f de 0,78, 0,80 y 0,84, el triplete B (figura 2.2). Además, cabe destacar que el grupo de bandas asociado al triplete A aparecía siempre como el de mayor intensidad en la tinción respecto al resto, indicando una mayor actividad esterasa.

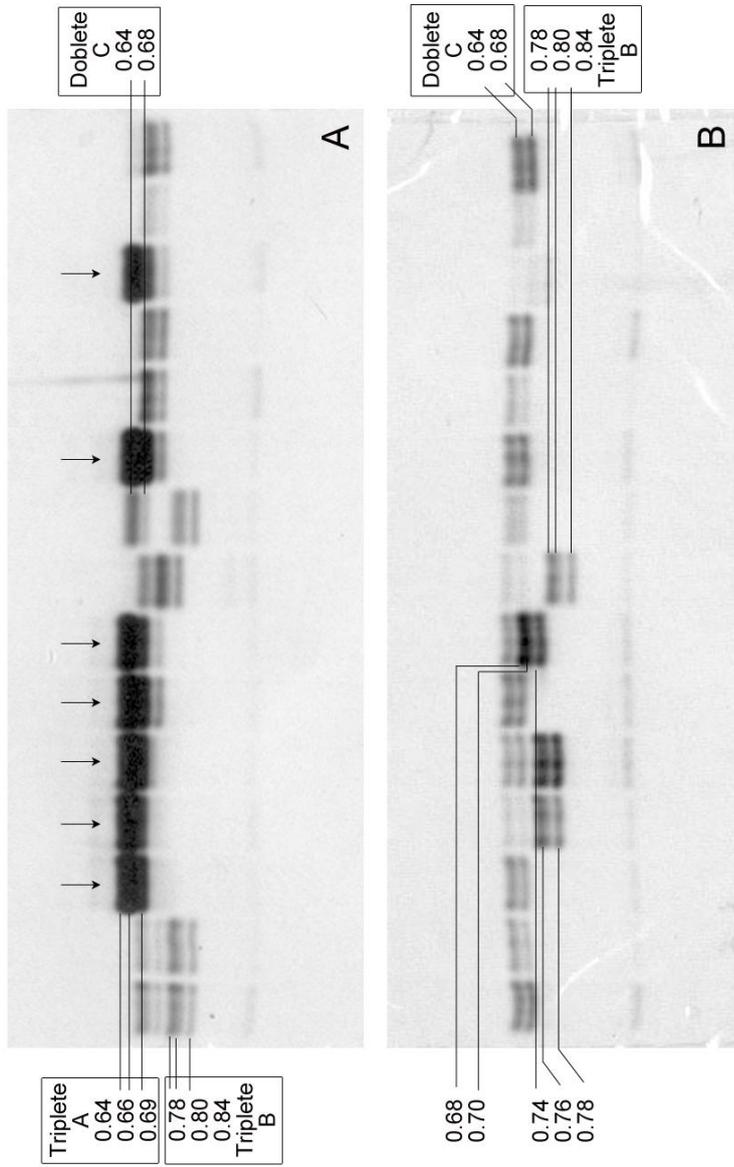


Figura 2.1. Geles nativos de poliacrilamida teñidos para la actividad esterasa con α -naftil acetato, indicando el valor de R_f calculado para las distintas bandas. Los grupos de bandas denominados triplete A, triplete B, y doblete C están señalados mediante casillas. Cada carrera del gel contiene el homogeneizado de un individuo de *F. occidentalis*, y cada gel corresponde a una población distinta: A es una población de campo, PIPAM1, y B es la población de referencia, MLFOM. Los insectos que presentan el triplete A están indicados con una flecha.

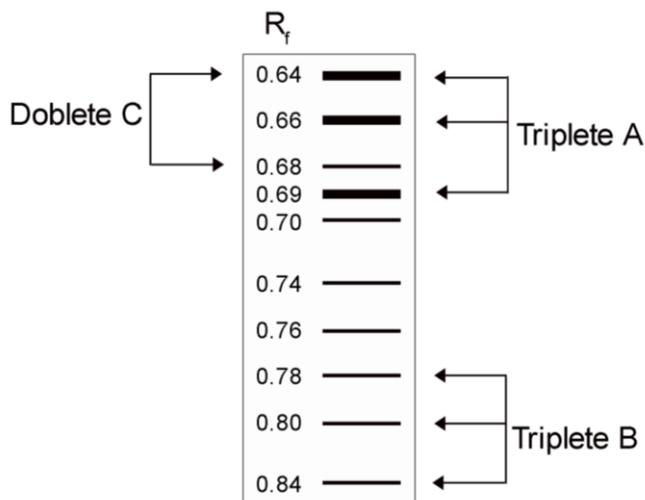


Figura 2.2. Esquema del patrón de bandas de esterasas de *F. occidentalis*, indicando el valor de R_f calculado para cada una de ellas, así como los grupos de mayor interés. Las bandas más gruesas indican las isoenzimas teñidas con mayor intensidad (la banda 0,64 aparece más teñida tan solo en el triplete A).

Así pues, para poder analizar los datos obtenidos de este estudio, se calculó el porcentaje de insectos que presentaba tanto cada una de las bandas individualmente, como cada uno de los grupos anteriormente descritos (en dobletes y tripletes), para cada una de las poblaciones ensayadas. Posteriormente se analizaron las correlaciones entre los porcentajes obtenidos y el FR_{50} también para cada uno de los insecticidas. Las correlaciones de los grupos daban prácticamente el mismo resultado que las correlaciones calculadas para las bandas pertenecientes a esos grupos individualmente, puesto que solían aparecer siempre formando dichos grupos, excepto en el caso de la banda 0,64 y 0,68, las cuales se asociaban a diferentes grupos de bandas. En la tabla 2.2 se presentan los resultados obtenidos, aunque solo se muestran la/s banda/s en las que se obtuvo una correlación significativa con la resistencia frente al menos a uno de los insecticidas.

Tabla 2.2. Análisis de correlación entre el patrón de bandas resuelto mediante PAGE (transformación arco seno del porcentaje de insectos presentando las bandas) y la resistencia a insecticidas (como FR₅₀) en poblaciones de *F. occidentalis*.

Bandas	Insecticida	N ^a	ρ^b	P-valor	Significación
Triplete A (0,64/0,66/0,69)	Acrinatrina	10 ^c	0,708	0,022	*
	Metiocarb	10 ^d	0,702	0,024	*
	Endosulfán	10	0,046	0,901	NS
	Deltametrina	10	0,398	0,255	NS
	Formetanato	10	-0,070	0,849	NS
	Metamidofos	10	0,237	0,509	NS
0,68	Acrinatrina	10	-0,611	0,060	NS
	Metiocarb	10 ^d	-0,663	0,036	*
	Endosulfán	10	-0,265	0,460	NS
	Deltametrina	10	-0,417	0,231	NS
	Formetanato	10	-0,117	0,748	NS
	Metamidofos	10	-0,459	0,182	NS

^a Número de poblaciones utilizadas en el análisis de correlación.

^b Coeficiente de correlación de Pearson.

^c Poblaciones ajustadas a la correlación: MLFOM, PEPTF, PIMVE, TOMBR, TOMPA, TOMSU, SALB, PITFA11, PIPAF2, PIPAM1.

^d Poblaciones ajustadas a la correlación: MLFOM, PEPTF, PIMVE, TOMBR, TOMPA, TOMSU, SALB, PITFA11, PITFA14, PIPAM1.

* Correlación significativa (P<0,05). NS, no significativo.

Estos resultados muestran que la presencia de ciertas bandas podía estar relacionada con la resistencia observada (estimada como el FR₅₀) en las poblaciones analizadas, para algunos de los insecticidas estudiados. Concretamente, el triplete A (bandas 0,64, 0,66 y 0,69) se correlacionó con los valores de FR₅₀ correspondientes a los insecticidas acrinatrina (figura 2.3 A) y metiocarb (figura 2.3 B), con un coeficiente de correlación de 0,71 y 0,70, respectivamente. Por otro lado, la presencia de la banda 0,68 se relacionó negativamente con los valores de FR₅₀ para esos mismos insecticidas, con un coeficiente de correlación de -0,61 para acrinatrina (figura 2.4 A) y de -0,66 para metiocarb (figura 2.4 B), es decir, a mayor número de insectos presentando la banda 0,68 por población, menor era la resistencia observada en las poblaciones frente a estos insecticidas. Sin embargo, en este caso tan solo la relación con el insecticida metiocarb fue significativa, aunque la misma tendencia era observada frente al insecticida acrinatrina.

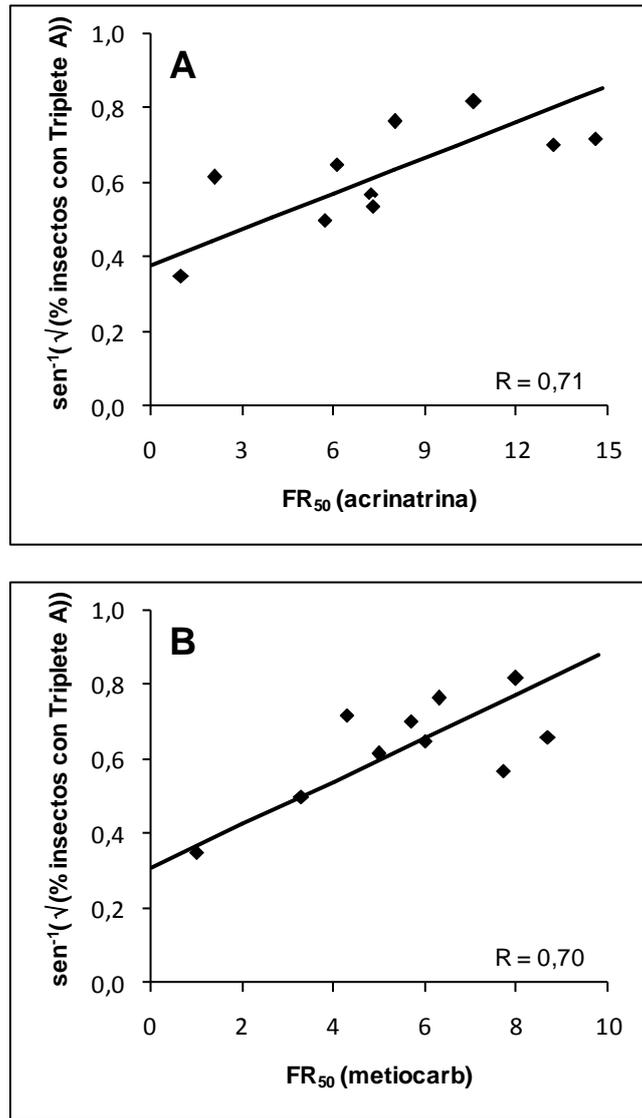


Figura 2.3. Correlación entre el porcentaje de insectos que presentan el triplete A (transformación del arco seno) para cada población y los valores de FR₅₀ para acrinatrina (A) y metiocarb (B). Cada punto corresponde a una población diferente y la línea indica el ajuste de los datos mediante reducción de los ejes mayores (RMA). La R indica el coeficiente de correlación de Pearson.

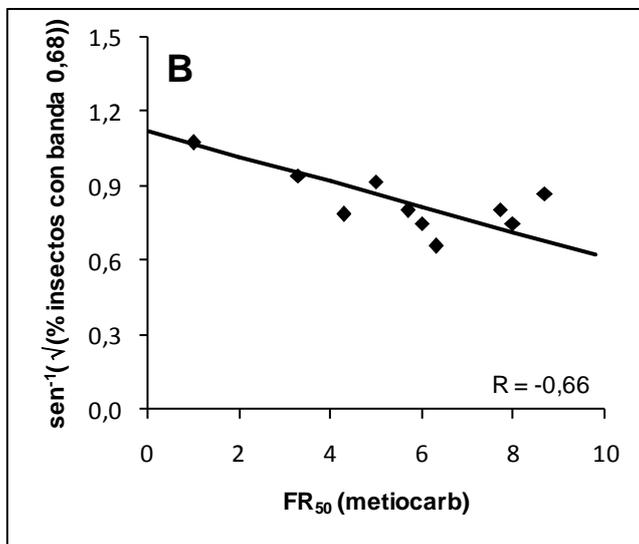
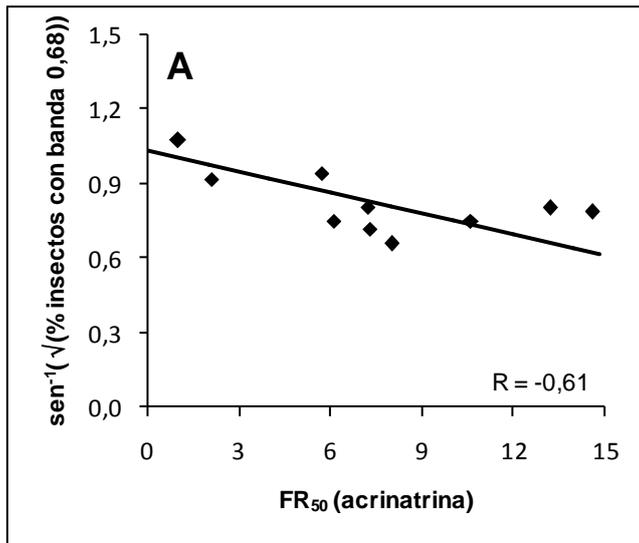


Figura 2.4. Correlación entre el porcentaje de insectos que presentan la banda de R_f 0,68 (transformación del arco seno) para cada población y los valores de FR_{50} para acrinatrina (A) y metiocarb (B). Cada punto corresponde a una población diferente y la línea indica el ajuste de los datos mediante reducción de los ejes mayores (RMA). La R indica el coeficiente de correlación de Pearson.

Sin embargo, aquellas poblaciones que mostraban FR_{50} superiores a los indicados en la figura 2.3 frente a los insecticidas acrinatrina (14,6) y metiocarb (8,7), no seguían la relación descrita, es decir, que a partir de ese umbral de FR la correlación con el porcentaje de insectos presentando el triplete A en las poblaciones se perdía.

2.3.2. Optimización del ensayo α -naftil butirato

Puesto que hasta el momento nunca habíamos utilizado el sustrato α -NB en nuestra especie de estudio, realizamos una serie de análisis (descritos en el punto 2.2.4 del apartado de Material y Métodos de este capítulo) para determinar las condiciones óptimas del ensayo de medida de actividad frente a dicho sustrato.

Por un lado se determinó la concentración de sustrato a utilizar posteriormente en las medidas de actividad. En la figura 2.5 se observa el efecto de las diferentes concentraciones de sustrato α -NB sobre la velocidad de reacción. El ajuste de los datos a la ecuación de Michaelis-Menten nos proporcionó un valor de K_m de $0,0351 \pm 0,0013$ mM ($R^2=0,9686$). En base a este resultado se estableció en 0,3 mM la concentración óptima de α -NB, ya que se aconseja utilizar valores entre 5 y 10 veces el valor de la K_m .

Por otra parte, se determinó el rango lineal válido para el ensayo, analizando el incremento de la velocidad de reacción en función de la cantidad de homogeneizado utilizado. El valor umbral de la velocidad de reacción válido en el ensayo se estableció en 0,015 μ mol de α -naftol (producto de la reacción) formado por minuto, ya que la respuesta se mantuvo lineal hasta este punto (figura 2.6).

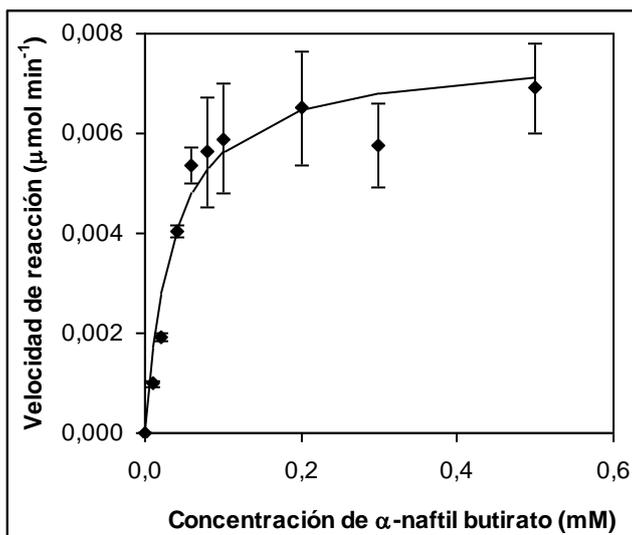


Figura 2.5. Efecto de la concentración de sustrato (α -naftil butirato) sobre la velocidad de reacción (como incremento de μmol de producto por minuto). Cada valor es la media \pm desviación estándar (DE) de 3 réplicas. La línea corresponde a la curva teórica obtenida mediante el ajuste de los datos a la ecuación de Michaelis-Menten ($R^2=0,9686$).

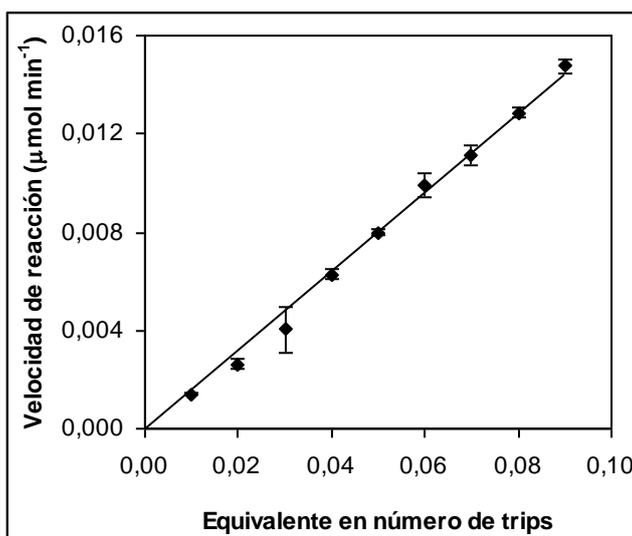


Figura 2.6. Velocidad de formación de producto ($\mu\text{mol min}^{-1}$) en función de la cantidad de proteína de trips. Cada valor corresponde a la media \pm DE de tres réplicas. La línea representa el ajuste de los datos a una regresión lineal ($R=0,993$).

2.3.3. Actividad esterasa total: α -naftil acetato y α -naftil butirato

A continuación se llevó a cabo un estudio para determinar la actividad esterasa total en insectos individuales con dos sustratos modelo distintos (α -NA y α -NB), con el objetivo de establecer alguna relación entre los insectos que presentaban el triplete A y la actividad esterasa frente a alguno de los sustratos seleccionados. El resultado se muestra en la figura 2.7, donde se puede observar una relación entre la actividad esterasa y la presencia de dicho triplete. En la figura 2.7 A se representa la relación entre la presencia del triplete y la actividad frente al sustrato α -NA. Se observa que los insectos que presentaban el triplete A mostraban 2,4 veces más actividad, y esta diferencia resultó ser altamente significativa (prueba de Welch, $P < 0,001$). En consecuencia, se pudo establecer un valor umbral de actividad ($4,6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$), sobrepasado el cual los insectos eran susceptibles de presentar el triplete A. Esta aproximación nos permitía distinguir entre insectos con o sin triplete con una precisión del 87% (5,2% de falsos positivos y 7,8% de falsos negativos; $n=115$ insectos de los cuales solo 41 presentaban el triplete A).

En la figura 2.7 B se representa la relación frente a la actividad medida con el sustrato α -NB. Contrariamente a lo observado en el caso anterior, en éste la mayor actividad se encontraba asociada a los insectos que no presentaban tal grupo de bandas, y aunque la diferencia encontrada entre los dos grupos de insectos era mucho menor, seguía siendo estadísticamente significativa (prueba de Welch, $P=0,016$). Pese a ello, no era posible establecer una aproximación que nos permitiese determinar de antemano si los insectos eran poseedores de dicho triplete.

Por último, en la figura 2.7 C se representa la ratio obtenida entre la actividad α -NA y la actividad α -NB. Por los resultados arriba descritos era obvio que los insectos que presentaban el triplete A mostraran una ratio 3 veces mayor, siendo esta diferencia altamente significativa (prueba de Welch, $P < 0,001$). Del mismo modo que en el caso de la actividad α -NA

también se pudo establecer un valor umbral (valor de 2,5) para determinar la presencia del triplete A en los insectos con una exactitud del 92,2% (2,6% de falsos positivos y 5,2% de falsos negativos; n=115 insectos, de los cuales solo 41 presentaban el triplete A).

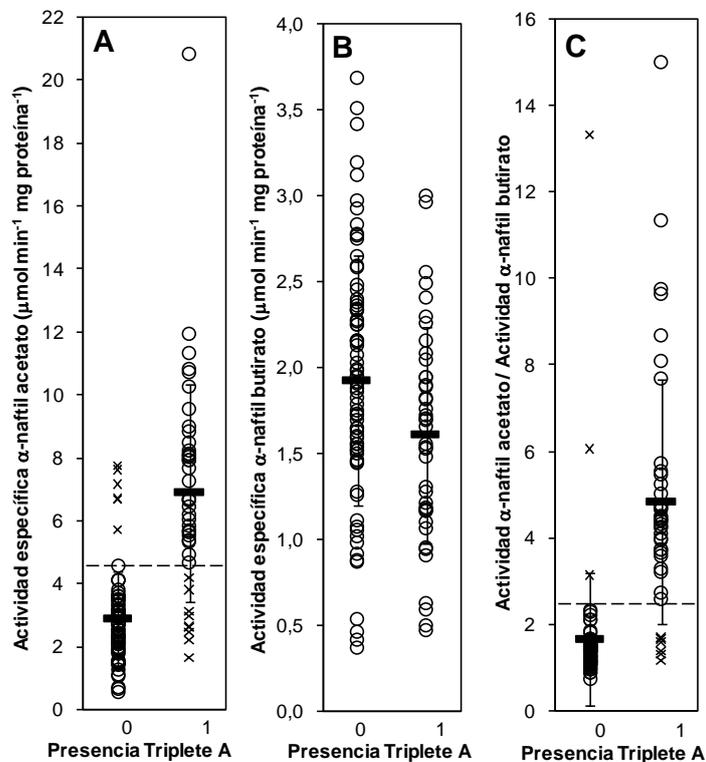


Figura 2.7. Distribución de la actividad específica α-naftil acetato (A), actividad específica α-naftil butirato (B), y la ratio actividad específica α-naftil acetato/α-naftil butirato (C), en individuos de *F. occidentalis* en función de la ausencia (0) o presencia (1) del triplete A. Mediante una barra se ha representado la media±DE de cada grupo. La línea discontinua horizontal en las gráficas A y C representa el valor umbral que discierne los insectos que presentan el triplete A del resto (A: 4,6 μmol min⁻¹ mg proteína⁻¹; C: valor de ratio de 2,5). Las cruces representan insectos mal clasificados bajo esta regla; el error para estos umbrales es de 13% para la actividad específica α-NA (A), y de 7,8% para la ratio (C). Los 115 insectos analizados proceden aleatoriamente de las diferentes poblaciones estudiadas, de los cuales tan solo 41 presentan el triplete A.

2.3.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida: tinción con α -naftil acetato y α -naftil butirato

Finalmente, llevamos a cabo también un estudio comparativo mediante PAGE, utilizando los sustratos α -NA y α -NB. Con ello se pretendía analizar la especificidad de las distintas isoenzimas para cada uno de los sustratos. Los resultados se muestran en la figura 2.8. En ella se puede apreciar que ambos sustratos teñían las mismas bandas; sin embargo, la tinción con el sustrato α -NA era más intensa que con el sustrato α -NB para todas ellas y, además, estas diferencias eran particularmente obvias para las bandas identificadas como 0,64, 0,66 y 0,69, correspondientes al triplete A.

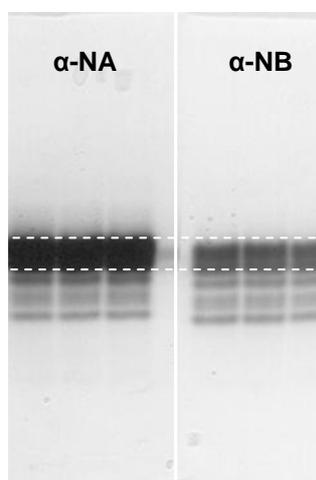


Figura 2.8. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) nativos teñidos para la actividad esterasa con los sustratos α -naftil acetato (α -NA) y α -naftil butirato (α -NB). Cada carrera contiene la misma cantidad de un único homogeneizado de un conjunto de trips. La línea discontinua delimita el grupo de bandas correspondiente al triplete A.

2.4. Discusión

Estudios realizados anteriormente por nuestro grupo con poblaciones de *F. occidentalis* de campo y seleccionadas en el laboratorio, mostraron que ambos grupos de poblaciones presentaban una mayor actividad esterasa respecto a la población de referencia (Maymó et al., 2002, 2006). Concretamente los estudios más recientes (Maymó et al., 2006) demostraron que en las poblaciones de campo los niveles medios de actividad esterasa, cuando eran utilizados α -NA y p-nitrofenilacetato como sustratos, eran mayores comparados con la población de referencia. Además, se estableció una correlación significativa entre la actividad esterasa α -NA y la resistencia frente a acrinatrina y metiocarb.

En este trabajo, el análisis de esterases mediante PAGE nativas revela un patrón de bandas característico, relacionado con el grado de resistencia de las poblaciones y la actividad esterasa total de esos insectos. En primer lugar, se determinó una correlación significativa entre el FR_{50} de diferentes poblaciones de campo para los insecticidas acrinatrina y metiocarb, y el porcentaje de insectos presentando el grupo de bandas denominado triplete A (figura 2.3). Las tres bandas del triplete A, con movilidad electroforética de 0,64, 0,66 y 0,69, se revelaban como las más gruesas y las más densamente teñidas en comparación con el resto de las isoenzimas. Así pues, los resultados obtenidos de los ensayos realizados mediante PAGE eran consecuentes con los encontrados en los trabajos previos que establecían una correlación entre la actividad esterasa y la resistencia (Maymó et al., 2006). En segundo lugar, se estableció que los insectos que poseían el triplete A presentaban de media 2,4 veces más actividad α -NA que los insectos que no lo tenían, estableciéndose una diferencia entre los dos grupos de insectos (con o sin triplete) altamente significativa (figura 2.7 A). Estos resultados sugieren que el incremento en la actividad esterasa indicado por Maymó y colaboradores (2006) es debido a las tres isoenzimas componentes del triplete A principalmente, las cuales

deben contribuir de forma significativa a la actividad esterasa total de los insectos resistentes. Esta interpretación es consistente con la hipótesis de que la presión de los insecticidas puede incrementar la frecuencia de determinadas esterasas, presentes normalmente en las poblaciones no seleccionadas en una baja frecuencia (Parker y Callaghan, 1997). Las isoenzimas de esterasas del triplete A serían por tanto las responsables de la resistencia observada en *F. occidentalis* a acrinatrina y metiocarb.

Por otro lado, los insectos que presentaban el triplete A nunca mostraban la banda de movilidad 0,68 y viceversa. Y la mayoría de los insectos, o presentaban el triplete o la banda 0,68, con lo que a mayor número de insectos de un tipo, menor habría del otro dentro de una población. Este hecho explicaría la correlación negativa de la banda 0,68 con la resistencia frente a acrinatrina y metiocarb. En poblaciones de *Heliothis virescens* resistentes a profenofos se realizó un estudio de isoenzimas de esterasas teñidas para α -NA, en el que encontraron un resultado muy similar. La intensidad de tinción de una de las bandas se correlacionaba negativamente con la intensidad de otra de ellas, por lo que sugirieron que podría tratarse de alternativas alélicas, existiendo alguna diferencia estructural entre ellas (Harold y Ottea, 1997, 2000).

Sin embargo, el análisis estadístico de los datos obtenidos del estudio mediante PAGE indicó que el mecanismo de resistencia basado en el triplete A descrito en este capítulo, no era el único presente en las poblaciones de *F. occidentalis* analizadas. La correlación entre el porcentaje de insectos presentando el triplete A y el FR_{50} a acrinatrina y metiocarb no era estadísticamente significativa cuando en las poblaciones se superaban valores de FR_{50} de 14,6 para acrinatrina y de 8,7 para metiocarb. No obstante, las poblaciones que no se ajustaban a la correlación resultaron pertenecer, en todos los casos, a los invernaderos experimentales utilizados para ensayos de estrategia de reiteración de insecticidas (Espinosa et al., 2002; Bielza y Contreras, 2005). Tales poblaciones mostraban valores muy

elevados de FR_{50} , que no podían ser explicados por la presencia del triplete A, sino por el hecho de que en las pruebas de estrategias de reiteración los trips estaban sujetos a una elevada presión de selección (por ejemplo, 12 aplicaciones de insecticida a la dosis máxima permitida en campo en 4 meses en PIPAF4, y 8 aplicaciones en tres meses en PIPAM3) (tabla 2.1). La alta presión causada por los insecticidas pudo haber seleccionado mecanismo/s de resistencia diferentes, tales como modificación de las dianas o incremento en el metabolismo por MFO. Esta idea se apoya en el hecho de que repetidos pasos de selección realizados en el laboratorio en poblaciones de *F. occidentalis*, también resultaron en FR_{50} moderados (40) y muy altos (1173) para los insecticidas metiocarb y acrinatrina, respectivamente (Espinosa et al., 2002; Bielza y Contreras, 2005). Sin embargo, en estas poblaciones no se produjo un cambio en el patrón de bandas de esterases (resultados no mostrados). De hecho, la estrategia de aplicar repetidamente un compuesto único, utilizado tanto en invernaderos experimentales como en la selección en el laboratorio, contrasta con la estrategia de rotación de insecticidas comúnmente utilizada para prevenir o retrasar la aparición de resistencia en el campo (Georghiou, 1983; Corbel et al., 2004), por lo que parece lógico esperar los elevados valores de resistencia obtenidos.

Por lo tanto, la presencia del triplete A parece conferir baja resistencia ($3,3 < FR_{50} < 8,7$) a metiocarb y resistencia moderada ($2,1 < FR_{50} < 14,6$) a acrinatrina. El hecho de que el triplete A estuviera correlacionado con la resistencia en seis poblaciones diferentes de *F. occidentalis* recogidas en invernaderos comerciales (con plantaciones diversas, como pepino, pimiento, tomate), sugiere que este es un mecanismo importante en los estados iniciales de la resistencia. De hecho, a menudo los sistemas enzimáticos de detoxificación suelen ser la primera línea de defensa de los insectos (Parker y Callaghan, 1997).

Como ya se ha comentado en la introducción de este capítulo, el incremento de la actividad esterasa responsable del desarrollo de la resistencia, puede ser debido a un aumento en la cantidad de esterasas, causado a su vez por una amplificación del gen/es en el genoma o por una alteración a nivel de la regulación de la transcripción, o a la selección de insectos que poseen esterasas con alguna mutación que les confiere una mayor capacidad en el metabolismo de los insecticidas (Wheelock et al., 2005). El incremento de actividad esterasa observado en las poblaciones de *F. occidentalis* analizadas en este trabajo, podría resultar tanto por una mayor cantidad de enzima/s ya presente/s en los insectos sensibles, como por selección de insectos presentando una enzima mutada más activa. Los resultados presentados aquí no permiten distinguir entre estas dos posibilidades. Una comparación entre geles nativos teñidos para esterasas y geles teñidos para proteína podría dar alguna indicación de si las bandas correspondientes al triplete A eran más abundantes que el resto, pero el contenido de proteína no permitió la detección de diversas bandas en esa zona del gel, incluso habiendo utilizado el método de tinción por plata, más sensible que el método de azul de Coomassie (datos no mostrados).

De acuerdo con los resultados obtenidos del estudio de PAGE, se establece que el triplete A confiere resistencia a dos insecticidas distintos, el piretroide acrinatrina y el carbamato metiocarb. Casos de resistencia cruzada entre estas dos clases de insecticidas han sido descritos en diferentes grupos de insectos: mosquitos de la especie *Anopheles* (Asidi y Curtis, 2001; Brooke et al., 2001; N'Guessan et al., 2003), en el áfido *M. persicae* (Devonshire y Moores, 1982), en la mosca *M. domestica* (Liu y Yue, 2000) y en la cucaracha *Blattella germanica* (Cochran, 1987; Pai et al., 2005). En estos casos la responsabilidad ha sido adscrita, por un lado, a oxidasas de función múltiple (en *Anopheles funestus* (Brooke et al., 2001) y *B. germanica* (Cochran, 1987)) debido al sinergismo observado por el butóxido de piperonilo (PBO) en la toxicidad frente a estas clases de

insecticidas; por otro, a un aumento en la cantidad de esterasas en el áfido *M. persicae* siendo esta la única diferencia detectada a nivel bioquímico entre las poblaciones (Devonshire y Moores, 1982); y finalmente, en el caso de *M. domestica* el PBO y el DEF reducían la resistencia, aunque en grado diferente, sugiriendo que las oxidasas de función múltiple jugaban un papel muy importante, mientras que las esterasas estaban solo parcialmente implicadas en la resistencia cruzada (Liu y Yue, 2000).

Debido al polimorfismo de las esterasas en insectos, la electroforesis proporciona una herramienta útil para clasificar a los insectos individualmente como resistentes o sensibles. Mediante ensayos espectrofotométricos se mide la actividad esterasa de todas las isoenzimas presentes en el insecto, pero debido a la contribución de esterasas no relacionadas con la resistencia, mediante este ensayo se hace más difícil diferenciar entre individuos sensibles y moderadamente resistentes, siendo precisamente estos fenotipos los más comunes en el campo. La tinción de esterasas en los geles después de la electroforesis permite aislar las diferentes isoenzimas y relacionar éstas con la resistencia observada en las poblaciones (Devonshire et al., 1986). Las electroforesis nativas han sido utilizadas extensamente como herramienta diagnóstica para la detección de isoenzimas asociadas a resistencia en: *M. persicae* (Devonshire, 1989), *Bemisia tabaci* (Byrne y Devonshire, 1991, 1993), *Helicoverpa* (Gunning et al., 1996, 1997; Srinivas et al., 2004), *Simulium equinum* (Parker y Callaghan, 1997), *Diabrotica virgifera virgifera* (Scharf et al., 1999; Zhou et al., 2002, 2004), *Oryzaephilus surinamensis* (Rossiter et al., 2001), *Locusta migratoria manilensis* (He et al., 2004), etc.

A pesar de su utilidad, el proceso de la electroforesis es lento y costoso. Como las bandas del triplete A eran las que revelaban una mayor actividad frente al sustrato α -NA, mucho más que cualquier otra banda, los insectos que presentaban dicho grupo mostraban a su vez una mayor actividad esterasa total. De acuerdo con estos resultados, la presencia del

triplete A puede ser alternativamente determinada mediante ensayos de actividad α -NA en homogeneizados individuales de *F. occidentalis*, bien normalizando por cantidad de proteína (actividad específica α -NA) o por actividad α -NB (ratio de actividad α -NA/ α -NB). El método basado en la ratio parece particularmente apropiado debido a que el error en ese caso es algo menor (7,8% frente a 13%), además de que la cantidad de muestra necesaria para medir actividad (0,02 trips) es también menor que la utilizada en las medidas de proteína (0,14 trips), con lo que es posible la realización de un mayor número de réplicas dentro de una misma muestra.

**3. Análisis del efecto de diversos compuestos
sinérgicos sobre la actividad esterase en
*Frankliniella occidentalis***

3. Análisis del efecto de diversos compuestos sinergistas sobre la actividad esterasa en *Frankliniella occidentalis*

3.1. Introducción

Los sinergistas son compuestos que incrementan la efectividad de los insecticidas cuando son utilizados en una dosis subletal (Brindley y Selim, 1984). La historia de los sinergistas y su relación con los insecticidas comienza como un intento de estabilizar las piretrinas como insecticidas competitivos; el primer sinergista comercializado verdaderamente efectivo fue el butóxido de piperonilo (PBO) (Wachs, 1974) introducido con el fin de reducir el coste de las piretrinas naturales. Como resultado de exhaustivas investigaciones en el modo de actuación de los insecticidas, los sinergistas se utilizaron específicamente para inhibir la detoxificación metabólica de los insecticidas, favorecer su penetración a través de la cutícula de los insectos, y facilitar la unión de los insecticidas a sus lugares de acción (B-Bernard y Philogène, 1993). Muchos de ellos se han convertido en útiles herramientas, tanto en el control como en la investigación sobre la resistencia. Por un lado, contribuyen a la atenuación e incluso supresión de la resistencia, porque aumentan la toxicidad de compuestos ya efectivos contra las plagas, ayudando a mantener el uso de insecticidas tóxicos en niveles mínimos y, en segundo lugar, juegan un papel importante en la identificación de los mecanismos responsables de la resistencia.

Ahora bien, la mayor parte de los sinergistas son inhibidores metabólicos, por lo que, a menudo, el término sinergista se utiliza haciendo referencia a este modo de acción específico. Particularmente, esta clase de sinergistas son ampliamente utilizados en el estudio de los mecanismos de

destoxificación implicados en la resistencia (Raffa y Priester, 1985; Brattsten et al., 1986). Además, aquellos que presentan una mayor eficacia son precisamente también los que interfieren en la destoxificación *in vivo* de los insecticidas (Raffa y Priester, 1985; Scott et al., 1990), inhibiendo su biotransformación en compuestos de menor toxicidad y mayor facilidad de excreción. Corresponden a diferentes grupos químicos; de hecho, algunos insecticidas pueden actuar también como sinergistas de otros insecticidas cuando son utilizados en dosis subletales. Este hecho se explica por la hipótesis de que “un tóxico interfiere en la destoxificación metabólica de un segundo tóxico potenciando así la toxicidad del compuesto más tardío” (Corbett, 1974). Asimismo, un solo sinergista puede actuar sobre más de una reacción de destoxificación, es decir, éstos pueden no ser enteramente específicos (Valles et al., 1997). Por ejemplo, el PBO es un inhibidor de las oxidasas de función múltiple (MFO), pero, a su vez, se ha descrito como inhibidor moderado de las esterasas en algunos insectos (Gunning et al., 1998; Young et al., 1998). También el S,S,S-tributilfosforotritioato (DEF) es un potente inhibidor de las esterasas pero en algunos casos presenta una capacidad, aunque limitada, para inhibir las MFO (Sánchez-Arroyo et al., 2001). En consecuencia, resulta difícil la utilización de sinergistas específicos, los cuales serían tremendamente útiles en la investigación de los procesos metabólicos implicados en la resistencia.

Por otro lado, cabe destacar que la inhibición del metabolismo de un insecticida por un compuesto considerado sinergista no necesariamente resulta en tal efecto, ya que en algunos casos, los insecticidas son activados a través de los sistemas de destoxificación en metabolitos más tóxicos que los compuestos parentales (Brattsten, 1988). En este caso, el sinergista previene esta activación y actúa como un antagonista de los insecticidas.

En cualquier caso, el efecto *in vivo* producido por un sinergista depende de su efecto inhibitorio intrínseco sobre las enzimas de

destoxificación (medible en estudios *in vitro*), de su habilidad para resistir a la destoxificación, y, de igual forma, de su capacidad para alcanzar su sitio de acción. Además, la efectividad del sinergista se incrementa a medida que aumenta su cantidad, pero en el momento que se sobrepasa un umbral deja de actuar como sinergista porque entonces resulta tóxico por sí mismo (B-Bernard y Philogène, 1993).

El conocimiento tanto del metabolismo de un insecticida por parte de un insecto como de las posibles variaciones de unas especies a otras, es necesario para el uso apropiado de los insecticidas y, en este sentido, los sinergistas son también una herramienta muy valiosa. Cuando la resistencia se debe a una mayor velocidad de destoxificación, lo cual es un hecho muy común, los sinergistas son más efectivos en las poblaciones resistentes que en las sensibles (Scott et al., 1990). En los estudios de evaluación de los mecanismos de resistencia, los resultados combinados de análisis *in vitro* e *in vivo* con sinergistas seleccionados conducen a la identificación de las rutas de destoxificación de los distintos xenobióticos y ayudan a identificar la acción del metabolito (B-Bernard y Philogène, 1993).

Ahora bien, diagnosticar los mecanismos de resistencia mediante el uso de inhibidores comporta también una serie de inconvenientes, como son la dificultad de selección de un verdadero inhibidor específico de un único sistema enzimático (Scott et al., 1990), así como el hecho de que se trata de herramientas indirectas en la identificación de dichos procesos.

En este capítulo se ha realizado un análisis de inhibición *in vitro* de varios compuestos sinergistas sobre la actividad esterasa. Concretamente se han utilizado el PBO y el DEF, que, como se ha descrito anteriormente, pueden interaccionar sobre dicha actividad. Además, se ha analizado el efecto inhibitor del insecticida metiocarb sobre la misma actividad. Puesto que la especificidad de los sinergistas varía de unas especies a otras, se hacía necesaria tal determinación ya que no existe conocimiento de estos datos en *F. occidentalis*. Por otro lado, se ha realizado un análisis *in vivo* de

inhibición de estos mismos compuestos y sobre la misma actividad. Este estudio nos permitía realizar una mejor aproximación a los mecanismos responsables de la resistencia, ya que se puede determinar con mayor precisión lo que ocurre en el insecto cuando estos compuestos son utilizados en combinación con los insecticidas.

3.2. Material y métodos

3.2.1. Insectos

En los estudios del efecto de los compuestos sinergistas se utilizaron cuatro poblaciones, tres seleccionadas en el laboratorio frente a distintos insecticidas (acrinatrina, formetanato y metiocarb), y la población sensible o de referencia MLFOM. Las características (CL_{50} y régimen frente al insecticida al que habían sido seleccionadas) de las poblaciones utilizadas quedan reflejadas en la tabla 3.1 (Bielza y Contreras, 2005).

Tabla 3.1. Características de las poblaciones utilizadas en los ensayos.

Origen	Población	CL_{50} (mg de ingrediente activo L^{-1}) ^{a,b}			Régimen de insecticida utilizado ^c
		Acrinatrina	Formetanato	Metiocarb	
Sensible	MLFOM	9 (1)	765 (1)	15 (1)	Ninguno
Seleccionadas en laboratorio	ACR	12870 (1430)	-	-	Selección en el laboratorio con acrinatrina
	FOR	-	20160 (26)	-	Selección en el laboratorio con formetanato
	MET	-	-	620 (41)	Selección en el laboratorio con metiocarb

^a Resultados de bioensayos tópicos (Bielza y Contreras, 2005).

^b El factor de resistencia (FR_{50}), calculado como la CL_{50} de la población resistente dividido por la CL_{50} de la población de referencia MLFOM, aparece entre paréntesis.

^c Acrinatrina es un insecticida piretroide; formetanato y metiocarb son carbamatos.

- Insecticidas no ensayados.

Los insectos fueron proporcionados por el Departamento de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT) y

mantenidos individualmente a -80°C hasta el momento de su utilización en los diversos ensayos.

3.2.2. Preparación de las muestras

En este estudio todas las medidas se realizaron en conjuntos de trips. El homogeneizado se preparó en la proporción de 1 trips por cada 50 µL de tampón fosfato sódico 100 mM (pH 7,5), en un tubo eppendorf mantenido en hielo y con la ayuda de un homogeneizador manual.

En el estudio de inhibición de la actividad esterasa total, se analizaron las 4 poblaciones diferenciadamente, por lo que los homogeneizados se prepararon por separado para cada una de ellas.

En el análisis electroforético se pretendía obtener el patrón completo de bandas presentes en *F. occidentalis* en un mismo gel, por lo que el homogeneizado se preparó en conjuntos de insectos sin diferenciar entre poblaciones.

El análisis de inhibición de los sinergistas aplicados tópicamente, sobre la actividad esterasa, se realizó en conjuntos de trips pero diferenciando poblaciones y grupos de estudio (combinación de tiempo y tratamiento).

3.2.3. Compuestos químicos utilizados

Los sinergistas e insecticidas empleados se obtuvieron en grado técnico: DEF (Chem Service Inc, West Chester, PA), PBO (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI) y metiocarb (Bayer Agrochem, Leverkusen, Germany).

En los análisis de inhibición *in vitro* se realizó una serie de pruebas con el fin de determinar los disolventes más apropiados para cada uno de los compuestos sinergistas. Así, las disoluciones de PBO se realizaron en

dimetilsulfóxido (DMSO), mientras que las de metiocarb y DEF en etanol. Las series de diluciones para obtener las diferentes concentraciones se llevaron a cabo a partir de una única disolución madre.

En el análisis de inhibición realizado *in vivo*, las disoluciones de los sinergistas se prepararon en acetona en todos los casos, y a una concentración de 1000 mgL⁻¹ para el PBO y DEF, y de 30 mgL⁻¹ para el metiocarb, correspondientes en todos los casos a la máxima concentración que podía ser utilizada en adultos de trips de la población sensible sin observar ningún efecto deletéreo.

3.2.4. Inhibición de la actividad esterasa total por sinergistas

La actividad esterasa se analizó utilizando α -naftil acetato (α -NA) como sustrato siguiendo el ensayo descrito por Maymó y colaboradores (2006) y explicado brevemente en el apartado 2.2.4. *Optimización del ensayo α -naftil butirato* del capítulo anterior.

Previamente, diferentes diluciones de inhibidor se añadieron en igual cantidad (y siempre inferior al 5% del volumen total) a diferentes alícuotas de homogeneizado dando concentraciones finales de los diferentes compuestos en un rango de 10⁻⁴ a 100 mM en el caso del PBO y de 10⁻³ a 100 μ M en el caso del metiocarb y del DEF. Los controles se realizaron sin inhibidor y sustituyendo éste por el disolvente en la misma cantidad, para determinar su posible efecto sobre la actividad. En todos los casos la incubación se llevó a cabo a temperatura ambiente y durante un periodo de 15 minutos. Transcurrido ese tiempo se transfirieron alícuotas de homogeneizado (10 μ L, equivalentes a 0,02 trips) de cada una de las concentraciones a una microplaca en la que se determinó la actividad esterasa.

Los valores obtenidos se compararon con el control, calculando así el porcentaje de actividad para cada una de las concentraciones y

tratamientos. De las curvas de inhibición se determinó el valor de CI_{50} (concentración de inhibidor correspondiente al valor medio entre la inhibición mínima y máxima alcanzada) para cada sinergista, mediante ajuste de los datos utilizando una ecuación logística sigmoide (software EnzFitter 2.0, Biosoft, Cambridge, UK).

En el caso del PBO, se realizó, además, un estudio adicional en el que se evaluó también el efecto del tiempo de incubación (entre 10 y 90 minutos) sobre la inhibición, pero en este caso en un homogeneizado conjunto sin distinguir entre poblaciones.

3.2.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) nativos e inhibición de esterasas por sinergistas

Las isoenzimas de esterasas se analizaron utilizando como sustrato α -NA mediante electroforesis en geles de poliacrilamida nativos, siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.2.3. *Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y tinción para actividad esterasa* del capítulo anterior. El estudio de inhibición de las isoenzimas se llevó a cabo de dos formas. Una, incubando el inhibidor junto al homogeneizado durante 15 minutos, previamente a efectuar la electroforesis, y dos, incubando el gel en una disolución con el inhibidor una vez finalizada la electroforesis, durante el mismo periodo de tiempo.

En el primer caso, las diferentes diluciones de sinergistas se añadieron en igual cantidad (y siempre inferior al 5% del volumen total) a diferentes alícuotas de homogeneizado (equivalente a 0,1 trips), resultando en concentraciones finales de 0,01, 0,1, 1 y 10 mM para todos los compuestos. En el caso del control el homogeneizado se incubó con la misma proporción de disolvente utilizada en el resto de casos. La incubación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante un periodo de 15 minutos. Transcurrido este tiempo, las alícuotas de homogeneizado (5,2

μL) se mezclaron con 4,8 μL de una disolución conteniendo Triton, sacarosa y azul de bromofenol. Estos 10 μL se cargaron en el gel y la electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 250 V durante 90 minutos a 4°C. Una vez finalizada la electroforesis los geles se incubaron durante 5 minutos en tampón fosfato sódico 200 mM (pH 6,0) y posteriormente fueron teñidos para analizar la actividad esterasa con α-NA y FBRR. Seguidamente, se destiñeron con una disolución de ácido acético al 7% y finalmente fueron escaneados.

En el segundo caso, primero se llevó a cabo la electroforesis. Alícuotas de 5 μL del homogeneizado (equivalentes a 0,1 trips) se mezclaron con 5 μL de una disolución conteniendo Triton, sacarosa y azul de bromofenol. Estos 10 μL se cargaron en los geles y la electroforesis transcurrió en las mismas condiciones descritas previamente. Una vez finalizada ésta, los geles se cortaron en 5 partes iguales conteniendo 3 carreras cada una. Los sinergistas se disolvieron en tampón fosfato sódico 200 mM (pH 6,0), dando las concentraciones finales de 1, 2, 5 y 10 mM para el PBO y de 0,001, 0,01, 0,1 y 1 mM para metiocarb y DEF. Cada fragmento se sumergió en una de estas disoluciones de inhibidor, además de un control en una disolución de disolvente. La incubación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante un periodo de 15 minutos. Transcurrido ese tiempo se procedió a la tinción y posterior desteñido del gel del mismo modo que en el caso anterior.

3.2.6. Inhibición de la actividad esterasa mediante bioensayos de sinergistas

Los bioensayos se realizaron aplicando tópicamente los sinergistas y dejándolos actuar durante diferentes periodos de tiempo. En la medida de lo posible se reprodujo la metodología descrita por Espinosa y colaboradores (2005). Brevemente, los trips se introducían en viales situados sobre una superficie fría (10°C) con el fin de inmovilizarlos. Posteriormente se

trasladaban a un papel de filtro donde se realizaban las aplicaciones de sinergistas con la ayuda de una pipeta Pasteur, embebiendo por completo a los insectos. Transcurridos 5 segundos los trips se pasaban a otro papel de filtro, desde donde se aspiraban a nuevos viales de plástico (10 trips por tubo) con la ayuda de una pequeña bomba de vacío. Los viales cerrados se mantenían en posición vertical a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante un periodo de 10, 20, 30, 60 o 90 minutos. Transcurrido este tiempo se almacenaban a -80°C hasta el momento de la determinación enzimática. Estos tiempos se ensayaron para cada población y tratamiento. En todos los casos también se realizó un control con acetona.

Un paso previo a la realización de las medidas de actividad enzimática consistió en el lavado de los insectos mediante una disolución de acetona, con el fin de evitar la contaminación por posibles restos de sustancia inhibidora que hubiese podido quedar en la cutícula del insecto como resultado del tratamiento tópico. La actividad esterasa se midió utilizando como sustrato modelo el α -NA, y siguiendo la misma metodología mencionada en apartados anteriores (Maymó et al., 2006).

3.2.7. Determinación de proteína

El contenido de proteína existente en los homogeneizados de trips se determinó siguiendo la metodología descrita por Lowry y colaboradores (1951), y modificada por Bio-Rad (Hemel Hempstead, UK) para microensayos en placas de 96 pocillos, utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como patrón. Las medidas se realizaron con el lector de placas a una longitud de onda de 750 nm.

3.2.8. Análisis estadístico

Al igual que en el capítulo anterior, el análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS 14.0 (SPSS Inc.) para

Windows. Previo a los análisis de comparación de medias entre grupos, se analizó la normalidad y la homogeneidad de las varianzas de los residuos.

En el estudio de inhibición de la actividad esterasa total, se obtuvieron diferentes curvas de inhibición para cada población y sinergista analizado. Con el fin de poder compararlas se calculó el valor de la CI_{50} , así como los intervalos de confianza al 95% (IC 95%) asociados a tales valores, puesto que la CI_{50} determinada es el valor más probable dentro de dicho intervalo. Por tanto, se consideraron diferencias significativas entre curvas en aquellos casos en los que los intervalos no solapaban, dado que dentro de ese intervalo otro valor también sería posible.

Los datos del bioensayo *in vivo* sobre la inhibición de la actividad esterasa por sinergistas no mostraban las características de normalidad y homogeneidad requeridas por el análisis de la varianza (ANOVA). Para corregirlo se realizó una transformación logarítmica de los datos, con la que se alcanzaron ambas asunciones.

Posteriormente, los resultados se estudiaron mediante ANOVA, método estadístico que nos permitía evaluar el efecto individual y conjunto de los tres factores (*Población, Tratamiento y Tiempo*). En los casos en los que se observó un efecto significativo de la/s interacción/es, se recurrió a las comparaciones por pares basadas en las medias estimadas según el modelo y llevadas a cabo mediante la prueba *T*, utilizando la corrección de Bonferroni (que corrige la tasa de error).

En todos los casos las diferencias se determinaron a un nivel de confianza del 95%.

3.3. Resultados

3.3.1. Análisis de inhibición de la actividad esterasa total por sinergistas

El resultado del estudio de inhibición *in vitro* de la actividad esterasa total por los sinergistas PBO, metiocarb y DEF, para determinar su especificidad, se muestra en la figura 3.1. En ella se puede observar que la respuesta de inhibición de la actividad de las distintas poblaciones frente a los diferentes compuestos resultó muy similar. Sin embargo, el efecto producido por los diferentes inhibidores sí resultó variable. El PBO fue el compuesto que producía una menor inhibición de la actividad esterasa, puesto que en su caso se requería una mayor concentración (de tres órdenes de magnitud) para alcanzar la misma inhibición que con los otros compuestos, y, además, a la mayor concentración ensayada (100 mM) todavía existía entre un 15 y un 25% de actividad que no resultaba afectada por el sinergista. El sinergista DEF y el insecticida metiocarb producían una mayor inhibición, aunque también presentaban una cierta diferencia entre ellos, siendo mayor la inhibición observada con el primer compuesto. En ambos, a la mayor concentración ensayada (100 μ M) la actividad era inferior al 10%.

En la tabla 3.2 se muestran los valores obtenidos de CI_{50} para cada uno de los sinergistas en las diferentes poblaciones, así como los IC 95% asociados a tales valores.

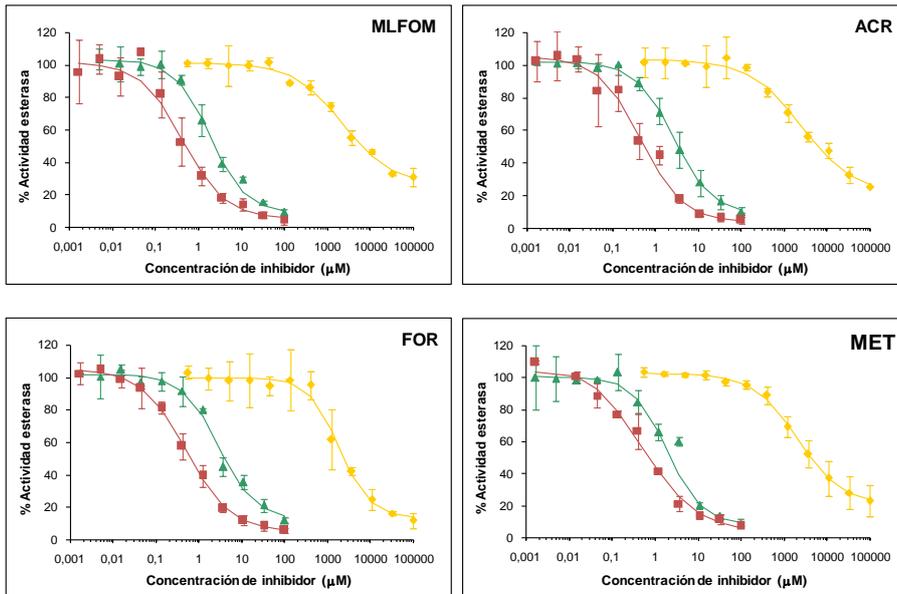


Figura 3.1. Inhibición de la actividad esterasa (expresada como porcentaje respecto al control) a concentraciones crecientes de los sinergistas PBO (◆), metiocarb (▲) y DEF (■), en la población de referencia (MLFOM) y en las seleccionadas frente a los insecticidas acrinatrina (ACR), formetanato (FOR) y metiocarb (MET). Los valores son medias de tres réplicas y las barras representan la desviación estándar. Las líneas corresponden al ajuste de los datos a una ecuación logística sigmoide.

Tabla 3.2. Concentración de inhibición del 50% (CI_{50}) de la actividad esterasa en poblaciones de *F. occidentalis* después de la incubación con PBO, metiocarb y DEF. Se han indicado los valores del intervalo de confianza al 95% para cada uno de ellos (IC 95%).

Población	PBO (mM)		Metiocarb (μ M)		DEF (μ M)	
	CI_{50}	IC 95%	CI_{50}	IC 95%	CI_{50}	IC 95%
MLFOM	2,41	[1,4382-4,0563]	1,92	[1,8114-2,0374]	0,45	[0,3043-0,6811]
ACR	2,67	[1,3149-5,4169]	2,71	[2,2196-3,3139]	0,45	[0,2961-0,6845]
FOR	1,91	[1,3353-2,7467]	2,93	[1,8078-4,7563]	0,51	[0,4407-0,6041]
MET	2,16	[1,7446-2,6868]	1,98	[1,7546-2,2370]	0,52	[0,3032-0,8941]

Se puede observar que los valores medios de CI_{50} más altos correspondían al sinergista PBO (2,3 mM), siendo mucho menores los obtenidos para el insecticida metiocarb (2,4 μ M), y algo más bajos en el caso del DEF (0,5 μ M), siendo las diferencias entre los tres compuestos estadísticamente significativas. Como ya se ha mencionado anteriormente,

las poblaciones mostraban una respuesta bastante similar entre ellas para un mismo sinergista. De hecho, no se observaron diferencias significativas, a excepción de la población ACR que presentó un valor significativamente mayor respecto a la población de referencia MLFOM para el insecticida metiocarb, lo que indicaba una menor sensibilidad de esta población hacia tal compuesto.

Dado que en el caso del PBO la concentración necesaria para observar la inhibición era tan elevada, se realizó un análisis idéntico al anterior, a excepción del tiempo de incubación, que se prolongó hasta los 90 minutos, y el homogeneizado, que se preparó de un conjunto de trips sin diferenciar entre poblaciones, debido a que en el estudio anterior se determinó que no existían diferencias significativas entre las mismas en su respuesta frente al PBO. El resultado de este estudio se muestra en la figura 3.2.

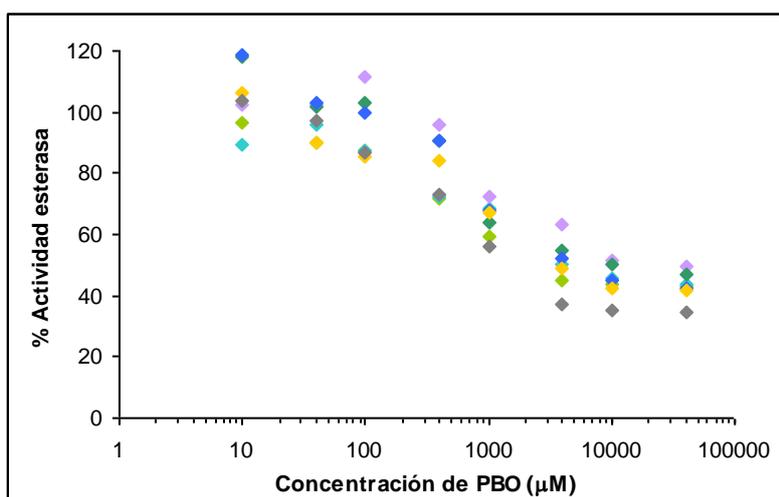


Figura 3.2. Inhibición de la actividad esterasa (expresada como porcentaje respecto al control) sobre homogeneizados de *F. occidentalis* frente al sinergista PBO después de un tiempo de incubación de 10 (◆), 20 (◆), 30 (◆), 45 (◆), 60 (◆), 75 (◆) y 90 (◆) minutos.

Se observó que las diferencias entre las curvas determinadas a los diferentes tiempos de incubación eran prácticamente inexistentes y en ningún caso mostraban ningún tipo de tendencia, sino que más bien todas ellas se ajustaban a una misma curva.

3.3.2. Análisis de inhibición de isoenzimas de esterasas por sinergistas

Los resultados del estudio anterior pusieron de manifiesto una diferencia considerable en la inhibición de la actividad esterasa por los diferentes compuestos. En consecuencia, se decidió evaluar la especificidad de los sinergistas sobre las distintas isoenzimas. Sin embargo, como no se habían observado diferencias entre las poblaciones, el estudio se realizó con homogeneizados de un único conjunto de trips sin diferenciar entre las cuatro poblaciones. Como se ha descrito en el apartado 3.2.5. *Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) nativos e inhibición de esterasas por sinergistas* de este capítulo, este estudio se llevó a cabo de dos formas. Una, sometiendo a electroforesis a las enzimas una vez unidas al inhibidor (incubación previa a la electroforesis) y, la segunda, aplicando el inhibidor a las isoenzimas ya separadas una vez transcurrida la electroforesis (incubación posterior a la electroforesis). En la figura 3.3 se muestra el resultado del primero de ellos.

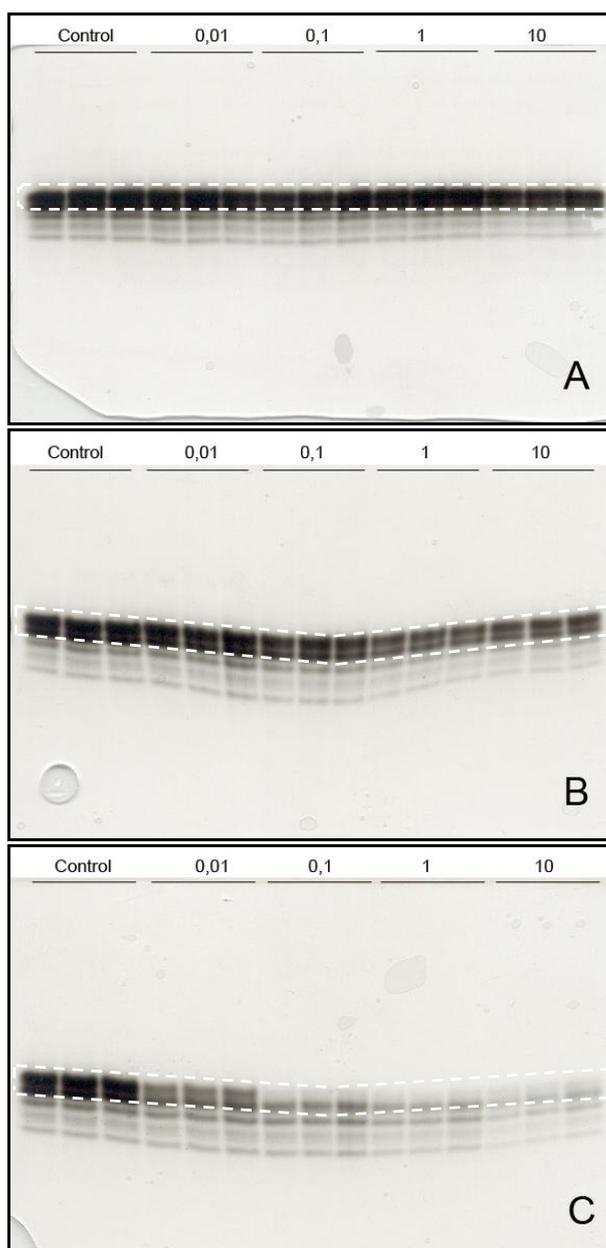


Figura 3.3. Geles de poliacrilamida (PAGE) nativos de homogeneizados de *F. occidentalis* incubados previamente con diferentes concentraciones (mM, indicadas en la parte superior del gel) de los sinergistas PBO (A), metiocarb (B) y DEF (C), y teñidos finalmente para la actividad esterasa con α -NA. Para cada concentración se realizaron 3 réplicas. Las líneas discontinuas delimitan el triplete A.

En el caso del PBO (figura 3.3 A) prácticamente no se observó inhibición, excepto a la mayor concentración utilizada (10 mM), aunque de forma muy tenue. El metiocarb (figura 3.3 B) tampoco parecía producir un efecto mucho mayor, aunque la inhibición observada fue ligeramente superior que en el caso anterior. Por contra, el DEF (figura 3.3 C) causaba una clara inhibición incluso a la concentración más baja ensayada (0,01 mM), y con un aumento de la inhibición proporcional a la concentración de inhibidor ensayada. Además, en este caso se observó también una inhibición diferenciada según las distintas isoenzimas. Concretamente, el mayor efecto de inhibición se producía sobre el grupo de bandas catalogado como triplete A en el capítulo anterior de esta tesis.

Los resultados del segundo estudio (incubación posterior a la electroforesis) se muestran en la figura 3.4. En este caso, la inhibición observada con el sinergista PBO sí resultó evidente y desde la primera concentración ensayada (1 mM), aunque no se observó un incremento de la inhibición con la concentración. Aparentemente, el efecto sobre todas las isoenzimas resultó similar. Del mismo modo, el efecto del insecticida metiocarb en este caso también resultó patente, igualmente desde la menor concentración ensayada (0,001 mM) y con un aumento de la inhibición proporcional al incremento de producto. El efecto sobre las distintas isoenzimas siempre parecía ser similar. Por último, los resultados observados con el DEF fueron prácticamente coincidentes a los del estudio anterior (incubación previa a la electroforesis), a excepción de las concentraciones, que en este caso fueron un orden de magnitud inferiores pero los resultados obtenidos similares: incremento de la inhibición proporcional a la concentración de inhibidor y mayor sensibilidad del triplete A frente a este compuesto. No obstante, hay que tener en cuenta que las concentraciones para los tres sinergistas no se utilizaron en un rango de concentraciones equivalente, siendo éste menor en el caso del PBO.

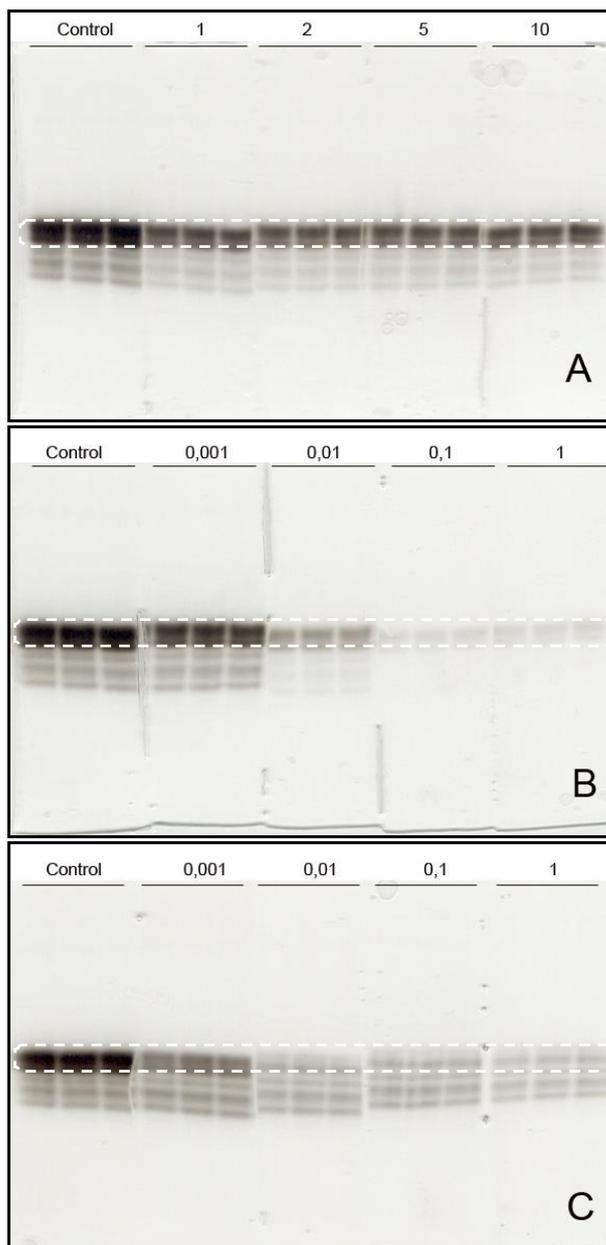


Figura 3.4. Geles de poliacrilamida (PAGE) nativos de homogeneizados de *F. occidentalis*, seccionados e incubados en diferentes concentraciones (mM, indicadas en la parte superior del gel) de los sinergistas PBO (A), metiocarb (B) y DEF (C), y teñidos finalmente para la actividad esterasa con α -NA. Para cada concentración se realizaron 3 réplicas (carreras). Las líneas discontinuas delimitan el triplete A.

3.3.3. Bioensayo de efectividad de sinergistas sobre la inhibición de la actividad esterasa total

Previamente a la realización de este bioensayo tal y como se describe en el correspondiente apartado de Material y Métodos, se había llevado a cabo un estudio similar en el que se aplicaron tópicamente los mismos sinergistas sobre insectos de las mismas poblaciones, pero dejándolos actuar hasta 5 horas. Puesto que en ningún caso el efecto de los compuestos fue mayor al observado a los 90 minutos tras su aplicación, se optó por modificar los tiempos de actuación de los sinergistas, utilizando los ya descritos previamente.

Este ensayo nos permitía analizar el efecto de la aplicación de sinergistas durante diferentes periodos de tiempo en los insectos vivos, sobre la actividad esterasa. Además, actuaría como punto de conexión entre los resultados obtenidos en los análisis anteriores y los observados por el grupo de la UPCT (Espinosa et al., 2005; Bielza et al., 2007). Los resultados de este bioensayo se muestran en las figuras 3.5 a y b, donde se han representado los valores de actividad esterasa como porcentaje respecto al control para cada tiempo y población, con el fin de facilitar su interpretación.

Al igual que ocurría en el ensayo de inhibición *in vitro* de la actividad esterasa total, la respuesta de las poblaciones resultó ser bastante similar. Sin embargo, los inhibidores mostraban un efecto diferente al observado en aquel estudio. En este caso, el sinergista PBO y el insecticida metiocarb prácticamente no producían inhibición de la actividad esterasa. No obstante, el DEF sí producía un importante efecto de inhibición de las esterasas en todas las poblaciones analizadas, alcanzándose valores de hasta el 90% de inhibición. Además, en este caso sí se observó una relación entre el grado de inhibición producido y el tiempo transcurrido desde la aplicación, durante la primera hora del ensayo. A los 90 minutos la inhibición fue algo menor, indicando la recuperación de la actividad por parte del insecto.

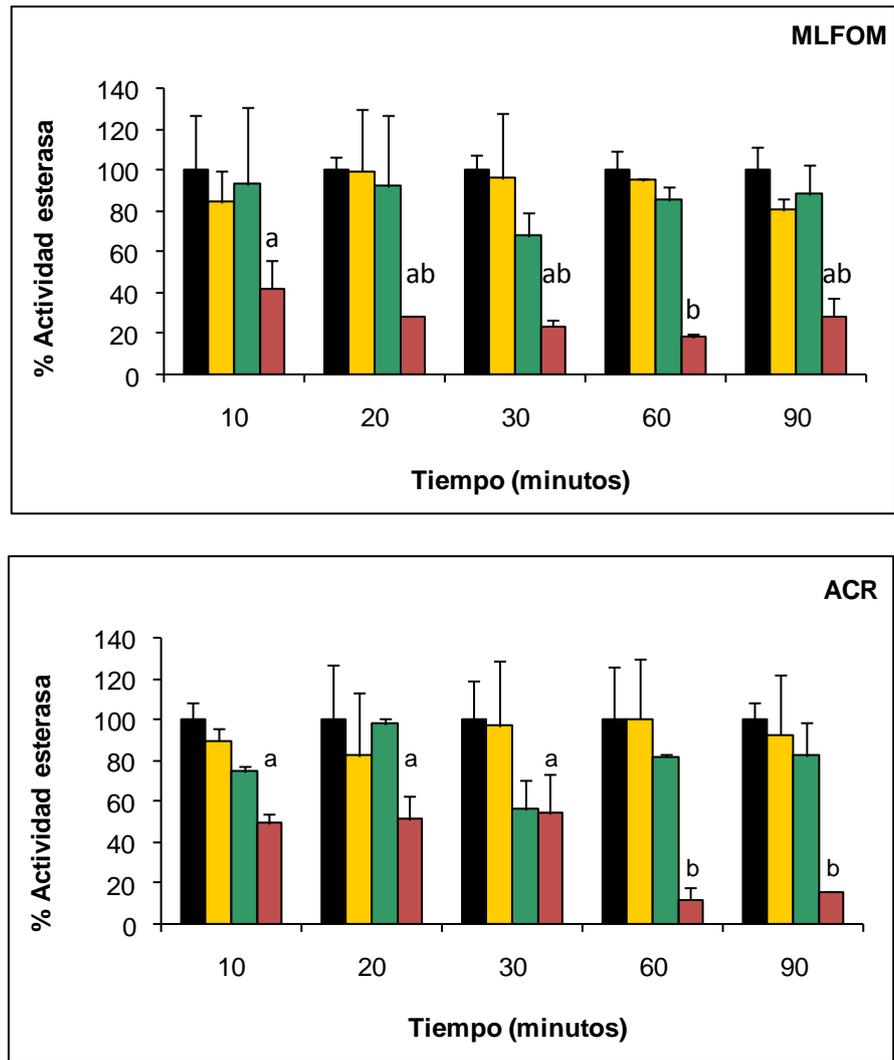


Figura 3.5 a. Inhibición de la actividad esterasa (expresada como porcentaje respecto al control) después de la aplicación de acetona (control, ■), PBO (■), metiocarb (■) y DEF (■) durante diferentes periodos de tiempo, en insectos de las poblaciones MLFOM y ACR. Las columnas representan el valor medio \pm desviación estándar (DE). Las columnas de un mismo color (tratamiento) indicadas con diferente letra son significativamente diferentes ($P < 0,05$; comparaciones por pares -prueba *T*- con la corrección de Bonferroni).

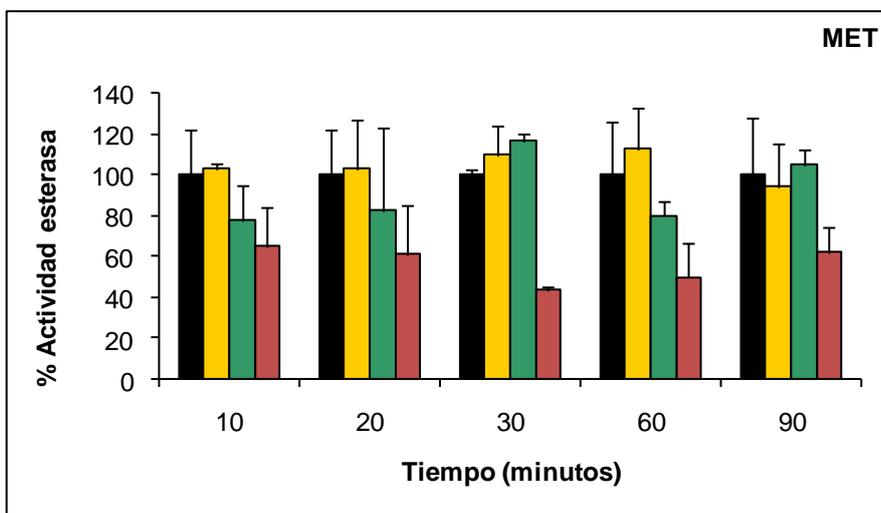
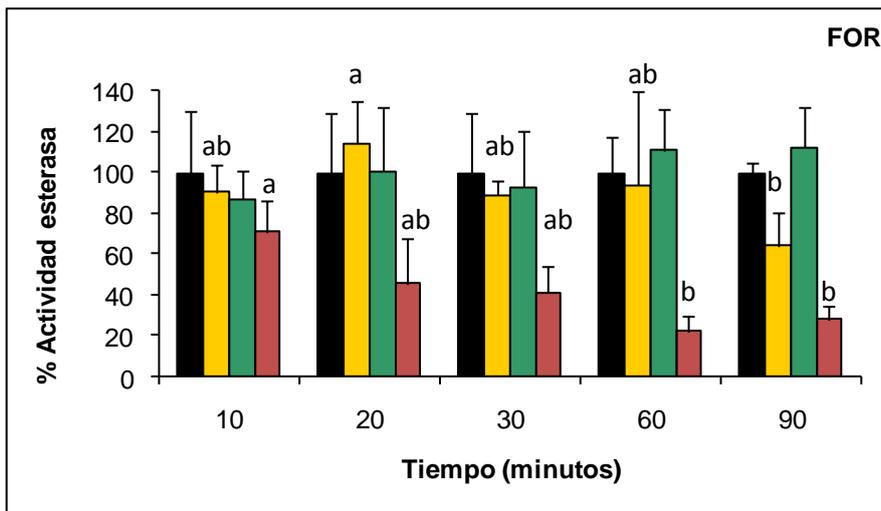


Figura 3.5 b. Inhibición de la actividad esterasa (expresada como porcentaje respecto al control) después de la aplicación de acetona (control, ■), PBO (■), metiocarb (■) y DEF (■) durante diferentes periodos de tiempo, en insectos de las poblaciones FOR y MET. Las columnas representan el valor medio \pm desviación estándar. Las columnas de un mismo color (tratamiento) indicadas con diferente letra son significativamente diferentes ($P < 0,05$; comparaciones por pares -prueba *T*- con la corrección de Bonferroni).

En la tabla 3.3 se muestra el resultado obtenido del análisis estadístico de los datos de actividad mediante ANOVA factorial.

Tabla 3.3. Resultado del ANOVA del bioensayo de efectividad de sinergistas sobre la inhibición de la actividad esterasa. Se han incluido los tres factores analizados en el estudio (*Población, Tratamiento y Tiempo*) y sus interacciones, dentro de un modelo de análisis cruzado.

Fuentes de variación	gl ^a	Media cuadrática	F ^b	P-valor
Población	3	0,17040	12,50	<0,001
Tratamiento	3	1,81474	133,10	<0,001
Tiempo	4	0,05229	3,84	0,007
Población*Tratamiento	9	0,04058	2,98	0,004
Población*Tiempo	12	0,01441	1,06	0,407
Tratamiento*Tiempo	12	0,05771	4,23	<0,001
Población*Tratamiento*Tiempo	36	0,02144	1,57	0,048
Error	80	0,01363		

^a gl (grados de libertad)

^b Estadístico F

La significación de la interacción correspondiente a los tres factores indicaba que el efecto de cada uno de ellos sobre la actividad esterasa variaba en función de los subniveles considerados en los otros factores, por lo que resultaba complejo evaluar el efecto de cada uno de ellos por separado. Los resultados de las comparaciones por pares para determinar los casos en los que se producían diferencias significativas se han indicado en las figuras 3.5 a y b.

Lo primero que cabe indicar es que no se obtuvieron diferencias significativas entre los controles a los diferentes tiempos, en cada una de las poblaciones (recordar que el análisis estadístico se realiza sobre los valores de actividad y no sobre los porcentajes). Además, se puede observar cómo en el caso del PBO y metiocarb, prácticamente no se produjo ninguna diferencia significativa, a excepción del PBO en la población FOR donde causó una disminución significativa de la actividad a los 90 minutos de su aplicación.

En cuanto al DEF, tal y como se ha indicado anteriormente, actuaba de forma muy diferente a los otros dos sinergistas. En general, a los 10 minutos de aplicación ya se había producido parte de inhibición, que

resultaba incrementada tras los 20-30 minutos, se hacía máxima tras una hora de aplicación, y parecía apreciarse una ligera recuperación de la actividad a los 90 minutos. Este comportamiento fue similar en todas las poblaciones analizadas, a excepción de la población MET donde no se observó un incremento significativo con el transcurso del tiempo en la inhibición de la actividad esterasa. De hecho, resultó ser la población más insensible frente al efecto de estos sinergistas.

En resumen, el tiempo resultó ser un factor importante tan solo en el caso del sinergista DEF, y el efecto de los distintos sinergistas no fue equivalente ni entre ellos, ni en todas las poblaciones analizadas.

3.4. Discusión

Pese a la utilidad de los compuestos sinergistas a la hora de estudiar los mecanismos metabólicos o vías de detoxificación que confieren resistencia frente a los insecticidas en insectos, las conclusiones a partir de los resultados obtenidos deben deducirse con precaución, ya que se trata de un procedimiento indirecto y, muchas veces, la especificidad de dichos compuestos es relativa. En la literatura se han descrito casos en los que se han obtenido resultados contradictorios al comparar entre los bioensayos y el análisis *in vitro* del metabolismo de insecticidas (Sánchez-Arroyo et al., 2001). En poblaciones resistentes a clorpirifos de *Blattella germanica* se observó una supresión parcial de la resistencia al utilizar el DEF como sinergista, pero no se pudo detectar indicios de hidrólisis de clorpirifos en fracciones citosólicas (Siegfried et al., 1990). En cambio, frente a la forma activa del insecticida, clorpirifos-oxon, sí se detectaron niveles elevados de hidrólisis, lo cual explicaba el sinergismo observado por el DEF. Kennaugh y colaboradores (1993) obtuvieron un resultado similar en *Helicoverpa armigera* con el PBO. En este caso, en poblaciones resistentes a permetrina se reducía la resistencia unas 20 veces utilizando PBO como sinergista en

los bioensayos, pero no encontraron evidencias de un incremento en la destoxificación por parte de las MFO. Los autores concluyeron que el sinergismo observado por parte del PBO, no era necesariamente un indicativo de resistencia debida a un incremento en la destoxificación mediada por las MFO.

Por otro lado, en lo que respecta a la especificidad, se ha descrito en varias ocasiones que compuestos sinergistas considerados inhibidores específicos de un sistema enzimático, también podían inhibir otros sistemas en algunas especies de insectos. El PBO (considerado inhibidor específico de MFO) se ha descrito también como inhibidor de esterasas relacionadas con la resistencia a piretroides en varias especies plaga que causan importantes daños en la agricultura: *Wiseana cervinata* (Chang y Jordan, 1983), *Pseudoplusia includens* (Dowd y Sparkes, 1987), *H. armigera* (Kennaugh et al., 1993; Gunning et al., 1998; Young et al., 2005, 2006), *Aphis gossypii* (Gunning et al., 1998), *Bemisia tabaci* (Young et al., 2006).

En este trabajo, los resultados obtenidos en los estudios realizados *in vitro* mostraron que el PBO también inhibía la actividad esterasa, aunque a concentraciones muy elevadas (CI_{50} media de 2,3 mM). En los resultados obtenidos de la bibliografía, los valores de CI_{50} obtenidos fueron inferiores, alrededor de 0,1 (Chang y Jordan, 1983; Dowd y Sparkes, 1987; Gunning et al., 1998) y 0,6 mM (Young et al., 2005, 2006).

Además, en el caso del PBO tampoco se observó una inhibición del 100% de la actividad, y el ajuste de los datos para las curvas de inhibición indicaba un resultado muy similar a mayores concentraciones. En otros estudios en los que se obtuvieron resultados similares se justificó por la posible presencia de isoenzimas que resultaran insensibles al efecto del PBO (Gunning et al., 1998; Young et al., 2006). En nuestro estudio, los resultados obtenidos tras el análisis electroforético (figuras 3.3 y 3.4) parecían indicar que el PBO actuaba de manera similar sobre todas las isoenzimas, con lo que se podría pensar que las esterasas presentes en *F.*

occidentalis muestran una baja sensibilidad a la inhibición causada por el PBO.

El insecticida carbamato metiocarb también se ha utilizado como compuesto sinergista por su capacidad para inhibir a los sistemas enzimáticos de detoxificación, incluidas las esterasas (Devonshire, 1991). Scharf y colaboradores (1997), realizaron un estudio electroforético de las esterasas de *B. germanica* y posteriormente analizaron el efecto inhibitorio de varios insecticidas sobre las mismas. En lo que respecta a los carbamatos, el propoxur inhibía parcialmente todas las isoenzimas, mientras que el bendiocarb las inhibía completamente (Scharf et al., 1997).

En nuestro estudio observamos que el metiocarb también inhibía casi completamente la actividad esterasa, así como a todas las isoenzimas. Las concentraciones requeridas en este caso fueron similares a las del tercer sinergista utilizado, DEF, que resultó ser el compuesto más efectivo en la inhibición de la actividad esterasa. En el caso de este último compuesto, resulta particularmente destacable que el grupo de bandas definido como triplete A, presentaba una mayor sensibilidad a la inhibición por el compuesto que el resto de bandas. Resulta importante el hecho de que este grupo de bandas se ha relacionado, en el capítulo anterior, con la resistencia a acrinatrina y metiocarb en poblaciones de campo de *F. occidentalis*.

El estudio electroforético del efecto de los sinergistas sobre las isoenzimas de esterasas se llevó a cabo de dos formas, incubándolas con los inhibidores previa o posteriormente a la electroforesis. Los resultados del segundo caso son los que reflejaron en mayor medida los datos obtenidos en el estudio de microplaca, en lo que respecta al grado de inhibición observado a las diferentes concentraciones. Las posibles variaciones entre los estudios en microplaca y los resultados de la incubación posterior a la electroforesis podrían deberse, además de al hecho de que los geles son semicuantitativos, a una baja permeabilidad de los compuestos en el gel, o

bien a la mayor cantidad de muestra utilizada en los ensayos electroforéticos (el equivalente a 0,1 trips, respecto a 0,02 en placa) (Park y Kamle, 1999). Por otro lado, las diferencias observadas entre los dos tipos de análisis electroforéticos (incubación previa o posterior con los sinergistas) podrían deberse al efecto del proceso de electroforesis mismo sobre el complejo enzima-inhibidor en el primer caso, ya que si la unión de las moléculas de inhibidor a la enzima fuera poco estable, éstos podrían quedar separados en el transcurso de la misma.

En los experimentos *in vivo*, las concentraciones de los sinergistas utilizadas se encontraban limitadas por el efecto tóxico sobre los insectos y no en función de su efectividad en la inhibición de la actividad esterasa. Además, en este estudio se pretendía reproducir en lo posible los bioensayos con sinergistas realizados por el grupo de la UPCT (Espinosa et al., 2005; Bielza et al., 2007). Así pues, las concentraciones utilizadas fueron 1000, 30 y 1000 mgL⁻¹ para el PBO, metiocarb y DEF, respectivamente, siendo los valores de CI₅₀ aproximadamente de 0,5 µM, 2,4 µM y 2,3 mM en cada caso. Es decir, el PBO era unas 4000 veces menos efectivo que el DEF pero en el bioensayo ambos se aplicaron a la misma dosis, y el metiocarb, que se podía considerar de efectividad similar a la del DEF, se aplicó en una dosis 30 veces inferior. Por tanto, los resultados obtenidos podrían responder a estas diferencias. A mayores concentraciones probablemente se habría obtenido un mayor efecto de los compuestos, pero entonces se habría traspasado el umbral de toxicidad. De hecho, en algunos de los estudios mencionados anteriormente sobre el efecto *in vivo* del PBO sobre la actividad esterasa, se indicaba que la concentración necesaria para observar la inhibición resultaba considerablemente elevada (Young et al., 2005).

El tiempo de acción de los sinergistas se encuentra limitado, fundamentalmente, por dos factores, la velocidad de penetración y su llegada al punto diana. El efecto gradual de la inhibición en relación al

tiempo, observado en el caso del DEF, debe responder a este fenómeno. El DEF produjo el máximo de inhibición de la actividad al cabo de una hora de aplicación del producto en *F. occidentalis*. Además, este resultado indicaba que los efectos observados eran consecuencia de un proceso *in vivo* y no debidos a un efecto posterior causado por los restos de producto adheridos a la cutícula y liberados en el momento de la homogeneización (Gunning et al., 1999); hay que recordar que, en nuestro caso, los insectos habían sido lavados con el disolvente previamente a la homogeneización, para evitar precisamente tal efecto.

Por lo tanto, en nuestro estudio se demuestra que es necesario un tiempo de espera que permita la máxima inhibición de las enzimas asociadas a la resistencia por parte de los sinergistas. En otros estudios se han descrito resultados similares para el PBO (Bingham et al., 2007), proponiéndose, además, su posible aplicación en campo. Sin embargo, la necesidad de dos aplicaciones sobre los cultivos espaciadas en el tiempo suponía un problema. No obstante, éste se resolvió mediante el desarrollo de una formulación en forma de microencapsulación de PBO y α -cipermetrina, que permitía una primera liberación del sinergista antes de la liberación del piretroide unas horas más tarde. El hecho de atacar los mecanismos de resistencia mediante la aplicación de sinergistas de forma previa a los insecticidas y espaciados en el tiempo, se conoce como "sinergismo temporal". Éste ofrece un potencial para recuperar los insecticidas que habían quedado inhabilitados por el desarrollo de resistencia metabólica por parte de los insectos, además de que permite reducir las concentraciones de sinergista utilizadas (Bingham et al., 2007). En el caso del DEF, su aplicación en campo como sinergista no se ha dado hasta el momento, pues se trata de un compuesto con efecto defoliante sobre las plantas. En el caso del insecticida metiocarb existen recomendaciones desaconsejando su utilización como sinergista, ya que esto podría acelerar el proceso de evolución de la resistencia a dicho

insecticida, siendo éste uno de los pocos insecticidas específicos que existen para trips, junto al formetanato y la acrinatrina (Bielza et al., 2007).

Por otro lado, en nuestro estudio se observó que MET era la población menos sensible frente al efecto de los sinergistas sobre la actividad esterasa. El máximo de inhibición (50%) se produjo a los 30 minutos desde la aplicación, mientras que en el resto de poblaciones (80-90% de inhibición) se alcanzó al cabo de una hora. Esto podría ser debido fundamentalmente a tres hechos: una mayor actividad esterasa, una menor penetración del sinergista y/o una mayor detoxificación del mismo. La población MET presenta mayor actividad que la de referencia (Maymó et al., 2002), pero similar a la observada en ACR, siendo ésta prácticamente tan sensible como la población de referencia, por lo que no se podría considerar este hecho como responsable de la menor sensibilidad hallada en MET.

Estudios anteriores realizados sobre estas mismas poblaciones seleccionadas en el laboratorio (Espinosa et al., 2005) y utilizando compuestos sinergistas junto a diversos insecticidas, pusieron de manifiesto que el único sinergista efectivo de todos los utilizados (PBO, DEF y DEM) era el PBO, y de forma más pronunciada con el insecticida piretroide acrinatrina (reducción de la resistencia unas 100 veces). Este hecho les hizo proponer la existencia de un incremento en el metabolismo del insecticida mediado por oxidasas de función múltiple. En estudios posteriores realizados por el mismo grupo (Bielza et al., 2007) se demostró el efecto sinergista del insecticida metiocarb, que también resultó ser extremadamente efectivo para la acrinatrina (unas 2000 veces), por lo que concluyeron que la responsabilidad de la resistencia podía residir en las oxidasas de función múltiple, tal y como ya se había descrito con otros carbamatos (Corbel et al., 2004). Ahora bien, en este último estudio, previamente se había determinado un incremento de las MFO en las poblaciones resistentes.

Los estudios bioquímicos aquí expuestos muestran un cierto efecto inhibitor, tanto del PBO como del metiocarb, sobre las esterasas, lo que podría llevar a pensar en su posible implicación en la resistencia mostrada por estas poblaciones. No obstante, en los ensayos *in vivo* no se producía tal efecto, a las concentraciones utilizadas, por lo que el sinergismo producido por ambos en bioensayos junto con insecticidas (Espinosa et al., 2005; Bielza et al., 2007), nunca podría ser atribuido a su efecto sobre esta actividad. Cabe señalar, que las poblaciones utilizadas tanto en este estudio como en los del grupo de la UPCT (Espinosa et al., 2005; Bielza et al., 2007) han sido seleccionadas en el laboratorio, no disponiéndose de análisis similares en poblaciones de campo.

4. Caracterización de acetilcolinesterasas en *Frankliniella occidentalis*. Análisis de insensibilidad frente a insecticidas

4. Caracterización de acetilcolinesterasas en *Frankliniella occidentalis*. Análisis de insensibilidad frente a insecticidas

4.1. Introducción

La acetilcolinesterasa (AChE) es una de las enzimas más conservadas en los eucariotas superiores. Aunque presenta más de un papel, como el desarrollo y maduración del sistema nervioso en vertebrados e invertebrados, su función principal es la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina después de que ésta se haya unido a su receptor en la sinapsis colinérgica. La hidrólisis es imprescindible para finalizar el impulso nervioso, restablecer la sinapsis y poder así responder a la siguiente molécula de neurotransmisor (Russell et al., 2004).

En el sistema nervioso, las AChE se expresan como dímeros asociados a una molécula de anclaje, el glucosilfosfatidilinositol (GPI), y, en los músculos, formando un complejo con colágeno. Los insectos utilizan la acetilcolina como neurotransmisor en su sistema nervioso central, pero en los músculos utilizan mayoritariamente el glutamato para esta función, por lo que sus AChE se expresan predominantemente como dímeros, y no se encuentran las formas con colágeno, halladas en los músculos de vertebrados y nematodos (Massoulie et al., 1999). La mayoría de especies de insectos parecen presentar dos genes codificando la AChE, aunque *Drosophila* y otros dípteros superiores tan solo poseen uno (Weill et al., 2002). Los artrópodos que poseen dos genes, uno de los sistemas gen/enzima (ace/AChE) es responsable de la hidrólisis de la acetilcolina en el sistema nervioso mientras que la función del otro sistema es desconocida (Oakeshott et al., 2005a).

El hecho de que la enzima AChE juegue un papel vital en los insectos, ha permitido el desarrollo de moléculas que inhiban su función, para ser utilizadas como insecticidas. Los insecticidas organofosforados (OP) y carbamatos actúan esencialmente como inhibidores irreversibles de las AChE (Oakeshott et al., 2005a). Su conformación es análoga al sustrato natural, la acetilcolina, pero producen una fosforilación o carbamilación, en vez de una acilación de la serina que se encuentra en el sitio activo de la enzima (figura 4.1). Las formas fosforiladas y carbamiladas resultan ser mucho más estables que las aciladas, por lo que la recuperación de la enzima libre prácticamente no se produce. Pese a ello, se ha observado que los insectos pueden sobrevivir con una proporción elevada de sus moléculas de AChE inhibidas por estos insecticidas (Devonshire et al., 2003), pero por encima de un umbral se produce la alteración de la transmisión nerviosa, con la consecuente muerte del animal.

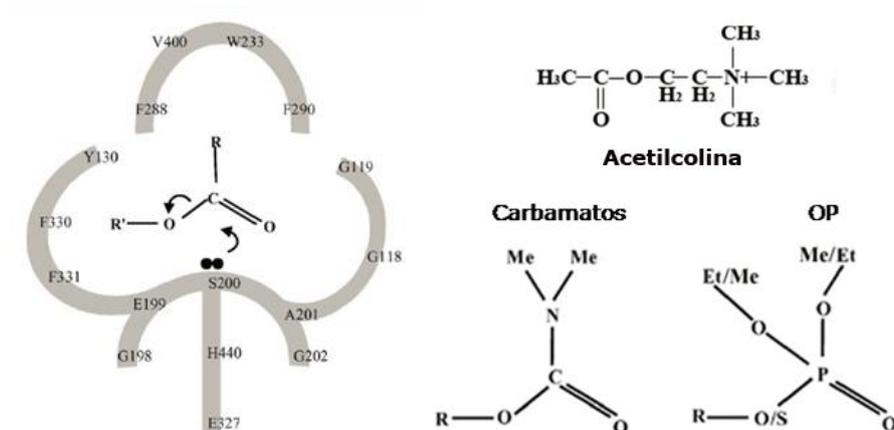


Figura 4.1. Representación del sitio activo de la acetilcolinesterasa (AChE) (izquierda) ocupado por un sustrato éster. A la derecha se muestra la estructura de la acetilcolina, sustrato natural de la enzima, y la estructura general de los insecticidas carbamatos y organofosforados (OP) (Me y Et indican grupos metilo y etilo, respectivamente).

La aplicación de los insecticidas en la agricultura incluye a ambos grupos, OP y carbamatos, desde hace más de 50 años y con un uso

extensivo para el control de plagas. Este hecho ha resultado en el desarrollo de resistencia a estos insecticidas por parte de los insectos, que se manifiesta como una reducción de la sensibilidad de la AChE a la inhibición por estos compuestos, y que ha sido observada en muchas especies de insectos y otros artrópodos (Fournier y Mutero, 1994; Zhu y Gao, 1999; Charpentier et al., 2000; Ma et al., 2004). Existen evidencias de que una mayor cantidad de enzima (por sobrerregulación) también puede aumentar la tolerancia a estos insecticidas, pero niveles elevados de resistencia tan solo se han asociado con sustituciones de aminoácidos en la parte catalítica de la enzima, las cuales le confieren insensibilidad hacia la inhibición por los OP y carbamatos. De hecho, también se ha observado que una combinación de varias mutaciones puntuales en la misma subunidad catalítica confiere todavía mayores niveles de resistencia (Mutero et al., 1994).

El hecho de que en las poblaciones resistentes se hayan identificado estas mutaciones puntuales que confieren insensibilidad hacia los insecticidas OP y carbamatos, supone una evidencia de que ese gen codifica realmente para una AChE funcional en la sinapsis colinérgica (Fournier y Mutero, 1994). Además, en algunos casos se han encontrado las mismas mutaciones puntuales en las AChE colinérgicas de diferentes especies, sugiriendo que las mutaciones posibles que conducen al desarrollo de la resistencia se encuentran muy limitadas (Russell et al., 2004). Este hecho se debe a que las mutaciones parecen comprometer en cierto grado la cinética de la hidrólisis de la acetilcolina y, en algunos casos, también puede producir un coste adaptativo o biológico en los genotipos resistentes en ausencia de insecticidas (Fournier y Mutero, 1994; Devonshire et al., 1998).

La AChE y la butirilcolinesterasa (BChE; EC 3.1.1.8) son dos colinesterasas (ChE) estrechamente relacionadas, capaces de hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina (Rosenberry, 1975a, b). Se pueden diferenciar

bioquímicamente basándose en la especificidad hacia diferentes sustratos e inhibidores, y por su inhibición a elevadas concentraciones de sustrato en el caso de la AChE (Toutant, 1989; Zhu y Clark, 1994). En vertebrados, ambas enzimas han sido ampliamente caracterizadas a nivel bioquímico y molecular. Sin embargo, en insectos tan solo la AChE ha sido investigada con detalle. De hecho se ha sugerido que los insectos podrían tener una sola enzima, AChE, con propiedades mixtas de las enzimas AChE y BChE propias de los vertebrados (Toutant, 1989).

Se han realizado muchos estudios sobre las AChE de diferentes especies de insectos, incluyendo *Musca domestica* (Dauterman et al., 1962), *Apis mellifera* (Guilbault et al., 1970), *Drosophila melanogaster* (Gnagey et al., 1987), *Lygus hesperus* (Zhu et al., 1991 ; Zhu y Brindley, 1992a, b), *Haematobia irritans* (Xu y Bull, 1994), *Leptinotarsa decemlineata* (Zhu y Clark, 1994, 1995), *Rhyzopertha dominica* (Guedes et al., 1997, 1998), *Diabrotica virgifera virgifera* (Gao et al., 1998), *Schizaphis graminum* (Gao y Zhu, 2001). En todos ellos, los resultados han mostrado que las AChE de insectos presentan características propias de las descritas en los vertebrados. No obstante, otros estudios sugieren que los áfidos, trips y probablemente algún otro insecto podrían tener ambas enzimas, AChE y BChE (Zahavi et al., 1972; Manulis et al., 1981; Brestkin et al., 1985; Novozhilov et al., 1989; Liu et al., 1994). En estos estudios, la AChE aparece asociada a membranas mientras que la BChE es soluble. La AChE de estos insectos también muestra una característica atípica, la inhibición irreversible por reactivos sulfhidrilos tales como el ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico) (DTNB) (Brestkin et al., 1985; Toutant, 1989; Liu et al., 1994). Esta característica no se encuentra entre las AChE de vertebrados o de otras especies de insectos (Toutant, 1989; Hall y Malcolm, 1991) (tabla 4.1). Ahora bien, nunca se ha purificado una BChE de una especie de áfido o de trips. Por tanto, existe todavía la controversia de si las propiedades observadas de las BChE son debidas a una verdadera BChE, a diferentes

AChE, o a AChE cuyo comportamiento cinético ha sido modificado significativamente por otras enzimas presentes en el homogeneizado (Gnagey et al., 1987; Gao y Zhu, 2001). Sin embargo, en otros trabajos (Oakeshott et al., 2005a) se afirma que no existe un gen ortólogo en nematodos o insectos del gen de BChE presente en vertebrados.

Tabla 4.1. Propiedades bioquímicas de las colinesterasas en diferentes grupos de animales.

Enzima	Característica	Vertebrados ^a	Insectos ^a	Áfidos/Trips ^b
AChE	- Hidrólisis preferente de sustrato ^c	ATCI	ATCI	Solo ATCI
	- Inhibición por sustrato a elevadas concentraciones	SI	SI	NO
	- Localización	Membrana Eserina	Membrana Eserina	Membrana Eserina
	- Sensibilidad 10 ⁻⁵ M	BW 284c51	BW 284c51	BW 284c51
	- Otras			Inhibición por DTNB
BChE	- Hidrólisis preferente de sustrato ^c	BTCI		Solo BTCI a altas concentraciones
	- Inhibición por sustrato a elevadas concentraciones	NO		NO
	- Localización	Soluble		Soluble Eserina
	- Sensibilidad 10 ⁻⁵ M	Eserina Iso-OMPA		Iso-Ompa a altas concentraciones

^a Toutant, 1989; Zhu y Clark, 1994.

^b Zahavi et al., 1972; Manulis et al., 1981; Brestkin et al., 1985; Novozhilov et al., 1989; Liu et al., 1994; Gao y Zhu, 2001.

^c ATCI: yoduro de acetiltiocolina; BTCI: yoduro de butiriltiocolina.

En lo que respecta a *F. occidentalis*, existen varios trabajos en los que se ha descrito insensibilidad de AChE, así como la existencia de una BChE. Zhao y colaboradores (1994) describieron que poblaciones resistentes a diazinón mostraban una AChE insensible a la inhibición de los insecticidas, y que el papel de la BChE, aunque desconocido, podría ser el de servir de sitio alternativo de fosforilación, reduciendo así el nivel de OP que podría alcanzar las AChE. Por otro lado, en un estudio realizado en poblaciones resistentes a metiocarb (Jensen, 1998) se encontró una mayor actividad AChE, así como una mayor actividad de varias enzimas de detoxificación (esterasas y GST). Posteriormente, este mismo autor (Jensen, 2000), y en otras poblaciones resistentes al mismo insecticida,

determinó un incremento en las mismas actividades analizadas en el estudio anterior, y además halló insensibilidad de AChE frente a la inhibición producida por metiocarb, diclorvos y eserina en algunas de las poblaciones resistentes.

La miniaturización de ensayos de AChE ha permitido detectar la actividad en muestras individuales y, a su vez, analizar los efectos producidos por la aplicación de insecticidas OP y carbamatos en el conjunto de la población. En los años 80 se desarrolló un ensayo en microplaca (Ashour et al., 1987; Doctor et al., 1987) y una de sus aplicaciones ha sido la detección de variantes genéticas de AChE en la resistencia desarrollada por los insectos frente a estos insecticidas, mediante análisis de insensibilidad (French-Constant y Bonning, 1989; Hemingway et al., 1990).

En este capítulo se han estudiado las propiedades bioquímicas de la actividad ChE en *F. occidentalis*. Asimismo, se ha realizado una comparación entre poblaciones, atendiendo a la actividad AChE e insensibilidad de la misma frente a insecticidas OP y carbamatos, en insectos individuales. El objetivo era, por un lado, caracterizar la actividad ChE en trips, y, por otro, comprobar si la resistencia observada en las poblaciones, y no explicada por mecanismos de detoxificación metabólica, podría deberse a insensibilidad de la diana.

4.2. Material y métodos

4.2.1. Insectos

En este estudio se utilizaron siete poblaciones de *F. occidentalis*. Dos de ellas, recogidas en diferentes invernaderos comerciales localizados en la región de Murcia, otras dos, en invernaderos experimentales (descritos en el apartado 2.2.1. *Insectos* del capítulo 2), otras dos seleccionadas en el laboratorio, y por último, la población sensible de referencia MLFOM. En la tabla 4.2 queda resumido el régimen de insecticidas utilizado en cada una

Tabla 4.2. Características de las poblaciones de *F. occidentalis* utilizadas en los ensayos de ChE.

Origen	CL ₅₀ (mg de ingrediente activo L ⁻¹) ^{a,b}							Régimen de insecticidas utilizado ^c
	Población	Deltametrina	Acrinatrina	Metamidofos	Endosulfán	Metiocarb	Formetanato	
Sensible	MLFOM	131 (1)	9 (1)	1056 (1)	3206 (1)	15 (1)	765 (1)	Ninguno
Invernadero comercial	MELAU	114 (0,9)	19 (2,1)	2274 (2,1)	4620 (1,4)	45 (3)	3510 (4,6)	Desconocido ^d
	CIRSTB	197 (1,5)	21 (2,3)	-	3196 (1)	20 (1,3)	380 (0,5)	Ninguno
Invernadero experimental ^e	PIPAM1	276 (2,1)	95 (10,5)	966 (0,9)	9170 (2,9)	120 (8,0)	1250 (1,6)	Metomilo/malati6n/imidacloprid/ ensayo de estrategia de reiteraci6n con metiocarb cada 10 d1as (3 aplicaciones, m1s 1 tratamiento con formetanato)
	PIPAM2	-	111 (12,3)	-	-	290 (19,3)	3900 (5,1)	Metomilo/malati6n/imidacloprid/ ensayo de estrategia de reiteraci6n con metiocarb cada 10 d1as (6 aplicaciones, m1s 1 tratamiento con formetanato)
Seleccionadas en laboratorio	FOR	-	-	-	-	-	20160 (26,3)	Selecci6n en el laboratorio con formetanato
	MET	-	-	-	-	620 (41,3)	-	Selecci6n en el laboratorio con metiocarb

^a Resultados de bioensayos t6picos (Espinosa et al., 2002; Bielza y Contreras, 2005).

^b El factor de resistencia (FR₅₀), calculado como la CL₅₀ de la poblaci6n resistente dividido por la CL₅₀ de la poblaci6n de referencia MLFOM; aparece entre par6ntesis.

^c Deltametrina y acrinatrina, son insecticidas piretroides; malati6n y metamidofos son organofosforados; endosulf1n es un organoclorado; formetanato, metiocarb y metomilo son carbamatos e imidacloprid es un nicotinoide

^d Desconocido. Sin aplicaci6n al menos 45 d1as antes del muestreo.

^e La concentraci6n de los insecticidas utilizados en la estrategia de reiteraci6n fue la dosis m1xima permitida en campo (mg de ingrediente activo litro⁻¹): 1000 mg para formetanato y metiocarb.

- Insecticidas no ensayados.

de las poblaciones, así como el valor de CL_{50} frente a los 6 insecticidas estudiados (Espinosa et al., 2002; Bielza y Contreras, 2005).

Los insectos fueron proporcionados por el Departamento de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT) y mantenidos individualmente a -80°C hasta el momento de su utilización en los diversos ensayos.

4.2.2. Preparación de las muestras

En el estudio de las AChE se realizaron tanto medidas en conjuntos de insectos, como en individuos separados. En el caso de medidas individuales, cada insecto se homogeneizó en 50 μL de tampón fosfato sódico 20 mM (pH 7,0) conteniendo 0,1% de Triton X-100, en una placa multipocillo mantenida en hielo y empleando un homogeneizador múltiple. Los trips se homogeneizaron en un máximo de 16 individuos al mismo tiempo. Las fracciones de homogeneizado no utilizadas en el momento se mantuvieron a -20°C , para evitar su degradación, hasta su utilización en el resto de determinaciones. En cada muestra se determinó la actividad AChE, la cantidad de proteína y la inhibición de actividad AChE por insecticidas OP y carbamatos.

En el caso de medidas en conjuntos de trips, el homogeneizado se preparó en la misma proporción que en el caso anterior y en las mismas condiciones, pero la homogeneización se llevó a cabo en tubos eppendorf y con la ayuda de un homogeneizador manual. Excepcionalmente, para el estudio electroforético, el homogeneizado se preparó mucho más concentrado, usando 60 trips por cada 50 μL de tampón.

4.2.3. Ensayo de actividad colinesterasa

La actividad colinesterasa se detectó utilizando como sustrato yoduro de acetiltiocolina (ATCI) y yoduro de butiriltiocolina (BTCl), mediante un ensayo

cinético basado en la metodología descrita por Ellman y colaboradores (1961) y modificada para microplaca. La absorbancia se registró utilizando un lector de placas SPECTRA-Fluor (TECAN, Salzburg, Austria).

Concretamente, el homogeneizado (10 μ L, equivalentes a 0,2 trips) se añadía al pocillo de la microplaca y se llevaba hasta 100 μ L con el mismo tampón de homogeneización. A continuación se mezclaban con 100 μ L de sustrato ATCI o BTCl (concentración final 0,5 mM) y 100 μ L de DTNB (concentración final 0,05 mM) disueltos en el mismo tampón. El DTNB se utilizó a una concentración baja porque se ha visto que tiene un efecto inhibitor en la hidrólisis de ATCI en *F. occidentalis* (Liu et al., 1994). A partir de ese momento la reacción se seguía mediante la lectura de absorbancia a 415 nm de forma continua, durante 60 minutos y la velocidad de reacción se calculaba mediante regresión lineal de las curvas.

4.2.4. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad colinestertasa

La velocidad de la reacción catalizada por la enzima se analizó frente a diversas concentraciones de los sustratos ATCI y BTCl. Para este ensayo se utilizó la metodología descrita en el punto anterior, a excepción de la concentración de sustrato que se utilizó en un rango variable. Por un lado se realizó un ensayo para determinar la concentración de sustrato a partir de la cual se observaba la saturación de la enzima. En este caso el sustrato se utilizó en un rango de 0,002 a 0,5 mM para el ATCI y de 0,003 a 1 mM para el BTCl. La constante de Michaelis-Menten (K_m) se calculó por ajuste de los datos mediante regresión no-lineal, utilizando la ecuación de Michaelis-Menten (software EnzFitter 2.0, Biosoft, Cambridge, UK).

Por otro lado, se realizó otro estudio para analizar el efecto de concentraciones altas de sustrato sobre la actividad ChE con el fin de

determinar una posible inhibición en tales condiciones, utilizando un rango de concentraciones entre 0,01 y 70 mM.

4.2.5. Inhibición de la actividad colinesterasa

El ensayo de determinación de la inhibición se realizó del mismo modo que se describe en el apartado 4.2.3. *Ensayo de actividad colinesterasa*, a excepción del inhibidor presente en los 100 µL de homogeneizado iniciales. Se preparó una serie de diluciones de los diferentes inhibidores, y posteriormente se añadieron en igual cantidad, y en proporción inferior al 5% del volumen total, a diferentes alícuotas de homogeneizado. Los controles se realizaron sin inhibidor, y sustituyendo éste por el disolvente, para determinar su efecto sobre la actividad. La incubación del homogeneizado en presencia del inhibidor se llevó a cabo a temperatura ambiente y durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo, se añadió el sustrato (ATCI o BTCI) y el DTNB en las condiciones descritas anteriormente. Los valores obtenidos se compararon con el control calculando así el porcentaje de actividad para cada una de las poblaciones y tratamientos.

En el estudio con inhibidores específicos se utilizó eserina como inhibidor general de colinesterasas, 1,5-bis-(4-alildimetilamoniofenil) pentano-3-ona dibromuro (BW 284c51) como inhibidor específico de AChE e tetraisopropilo pirofosforamida (iso-OMPA) como inhibidor específico de BChE. Todos ellos se obtuvieron en grado técnico de la casa Sigma Chemical Co. (St Louis, MO). Inicialmente, se realizaron una serie de pruebas para determinar los disolventes más apropiados para cada uno de los compuestos, tras las cuales se prepararon las disoluciones de eserina e iso-OMPA en etanol y la de BW 284c51 en agua desionizada (MilliQ, Millipore). Las series de diluciones se realizaron en cada caso a partir de una única disolución madre, para obtener concentraciones finales desde

0,0339 a 670 μM para eserina, desde 0,0017 a 100 μM para BW 284c51 y desde 0,0339 a 2000 μM para iso-OMPA. En este estudio, además, se comprobó el efecto de estos mismos inhibidores sobre la actividad carboxilesterasa. Para ello se siguió el mismo procedimiento explicado en el apartado 3.2.4. *Inhibición de la actividad esterasa total por sinergistas* del capítulo anterior, a excepción de que, en este caso, se añadieron los inhibidores indicados en lugar de los sinergistas, y en las mismas concentraciones.

En un segundo estudio se analizó la sensibilidad de las AChE frente a los insecticidas OP y carbamatos a los que habían estado expuestas las poblaciones. Los insecticidas utilizados se obtuvieron en grado técnico: metiocarb (Bayer Agrochem, Leverkusen, Germany), formetanato (AgrEvo, Frankfurt, Germany) y metamidofos (Riedel-de-Haën, Seelze, Germany). Inicialmente, se realizaron una serie de análisis para determinar los disolventes más apropiados para cada uno de los compuestos, tras los cuales se realizaron las disoluciones de metiocarb y metamidofos en etanol, y las de formetanato en metanol. Las series de diluciones para obtener las diferentes concentraciones se realizaron a partir de una única disolución madre, para obtener concentraciones finales desde 0,0034 a 200 μM para el formetanato y metiocarb, y desde 1,0161 a 6700 μM para el metamidofos. El valor de concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) para cada insecticida se determinó mediante ajuste no-lineal de los datos, utilizando una ecuación logística sigmoide (software EnzFitter 2.0, Biosoft, Cambridge, UK).

Finalmente, se ensayó la insensibilidad de AChE en insectos individuales. Se utilizaron 32 individuos de trips de cada una de las poblaciones descritas para cada uno de los insecticidas utilizados. Las fracciones de homogeneizado se dividieron en tres alícuotas, para las medidas de actividad enzimática, inhibición frente al insecticida y contenido de proteína.

4.2.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) nativos y tinción para actividad colinesterasa

En el estudio de análisis de isoenzimas de ChE se utilizó un homogeneizado de trips muy concentrado, con el fin de poder detectar las isoenzimas de AChE. A los 50 μ L de homogeneizado inicial se añadieron 10 μ L de tampón conteniendo Triton X-100 al 1,6%, sacarosa al 10% y una pequeña cantidad de azul de bromofenol. Alícuotas de 10 μ L (equivalentes a 10 trips) se cargaban en cada carrera del gel.

Los geles de poliacrilamida se prepararon en condiciones nativas a una concentración homogénea de 7,5% para el gel de separación y de 4% para el gel de alineamiento, con un grosor de 3 mm. La electroforesis se llevó a cabo en un sistema discontinuo de tampones Tris/Glicina según Ornstein y Davis (Davis, 1964), a excepción de algunas pequeñas variaciones, como el contenido de 0,2% (w/v) de Triton® x-100 en los geles. Las electroforesis se realizaron en un sistema vertical refrigerado SE 600 Standard (Hoefer-Pharmacia Biotech, San Francisco, CA) a un voltaje constante de 250 V durante 120 minutos a 4°C. Una vez finalizada, los geles se incubaron durante 15 minutos en agua desionizada para facilitar el proceso de tinción y posteriormente se cortaron en secciones para teñir cada una de ellas con un sustrato diferente, ATCI, BTCl y α -NA. La tinción para la actividad α -NA se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.2.3. *Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y tinción para actividad esterasa* del capítulo 2.

La tinción para la actividad AChE y BChE se basó en la metodología de Karnovsky y Roots (1964), modificada por Bunyan y Taylor (1966) y adaptada a nuestras condiciones experimentales. Por un lado, el sustrato (ATCI o BTCl) se disolvía en 4 mL de agua desionizada (MilliQ) a una concentración de 0,086 M, y a la que se añadían 7 mL de sulfato de cobre 0,1 M. Por otro lado se preparaba una disolución de glicina 0,03 M (20 mL) a la que se añadían 2 mL de una disolución de acetato de sodio 1,0 M, todo

ello también en agua desionizada. Posteriormente se mezclaban ambas disoluciones y se añadía agua desionizada para obtener un volumen final de 40 mL. Los geles se sumergían en esta disolución durante 1 hora y en agitación constante. A continuación se aclaraban con agua destilada varias veces, y finalmente se fotografiaban con una cámara digital.

4.2.7. Determinación de proteína

El contenido de proteína existente en los homogeneizados de trips se determinó siguiendo la metodología descrita por Lowry y colaboradores (1951), y modificada por Bio-Rad (Hemel Hempstead, UK) para microensayos en placas de 96 pocillos, utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como patrón. Las medidas se realizaron con el lector de placas a una longitud de onda de 750 nm.

4.2.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS 14.0 (SPSS Inc.) para Windows. Previo a los estudios de análisis de la varianza (ANOVA) y correlación, los datos se estudiaron para determinar la normalidad, así como la homogeneidad de sus varianzas. Para el primer parámetro se utilizaron los tests de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk con la corrección de Lilliefors, y para el segundo, el test de Levene de homogeneidad de varianzas.

En el estudio de sensibilidad de la actividad AChE a los insecticidas, se obtuvieron las curvas de inhibición para cada insecticida analizado en la población sensible MLFOM. Se calculó el valor de la CI_{50} , así como los intervalos de confianza al 95% (IC 95%) asociados a tales valores.

Los resultados de la determinación de la actividad enzimática en insectos individuales no mostraban una distribución normal respecto a la media y además sus varianzas resultaron ser heterogéneas. La normalidad

de los datos se consiguió mediante su transformación con la función raíz cuadrada. Los resultados del porcentaje de inhibición de la actividad AChE en insectos individuales tampoco presentaban ninguna de estas dos condiciones, por lo que se realizó una transformación angular, concretamente el arco-seno, por tratarse de porcentajes. Al igual que en el caso anterior, se obtuvo así la normalidad de los datos.

Los resultados obtenidos del estudio de la actividad AChE en las diferentes poblaciones, se estudiaron utilizando un ANOVA considerando como factor fijo *Población*. Para determinar los casos que resultaban diferentes, se realizaron comparaciones múltiples *post hoc* de las medias obtenidas en las diferentes poblaciones utilizando MLFOM como control, mediante un test T3 de Dunnet, adecuado cuando los datos no presentan homogeneidad de varianzas. En el caso del estudio de inhibición frente a los insecticidas, el factor incluido en el ANOVA fue, además de *Población*, *Insecticida*. En los casos en los que se obtuvo un efecto significativo de la interacción, se recurrió a las comparaciones por pares basadas en las medias estimadas en el modelo, utilizando la corrección de Bonferroni con el fin de contrastar en qué grupo/s se observaban dichas diferencias.

El estudio de correlación entre la actividad y el porcentaje de inhibición, datos transformados en ambos casos, con el factor de resistencia (FR_{50}) se realizó mediante análisis de correlación de Pearson, de forma separada para cada insecticida. En los casos en los que se determinó una correlación significativa, se realizó posteriormente un análisis de regresión mediante ajuste de reducción de los ejes mayores (RMA, Modelo II).

En todos los casos las diferencias se determinaron a un nivel de significación del 95%.

4.3. Resultados

4.3.1. Caracterización de la actividad colinesterasa en *Frankliniella occidentalis*

4.3.1.1. Preferencia de sustrato e inhibición a altas concentraciones

Como ya se ha mencionado en la introducción de este capítulo, la actividad AChE puede ser diferenciada de la actividad BChE basándose en ciertas características bioquímicas. En primer lugar, por la especificidad hacia el sustrato. Así pues, se analizó la relación entre la velocidad de reacción y la concentración de sustrato, en el caso del ATCI (figura 4.2) y del BTCl (figura 4.3). En el primero, la relación se ajustó a la ecuación de Michaelis-Menten. La K_m resultante fue de $0,00762 \pm 0,00086$ mM ($R^2=0,97360$).

En cambio, en el caso del BTCl (figura 4.3) la relación entre la velocidad de reacción y la concentración de sustrato, respondía prácticamente a un ajuste lineal, por lo que no se pudo llegar a determinar un valor de K_m . A concentraciones bajas parecía que la actividad tendía a una cinética de Michaelis-Menten, sin embargo, conforme aumentaba el BTCl, la relación pasaba a ser prácticamente lineal. De hecho, la saturación empezaba a observarse a concentraciones de sustrato de 20 mM (figura 4.4).

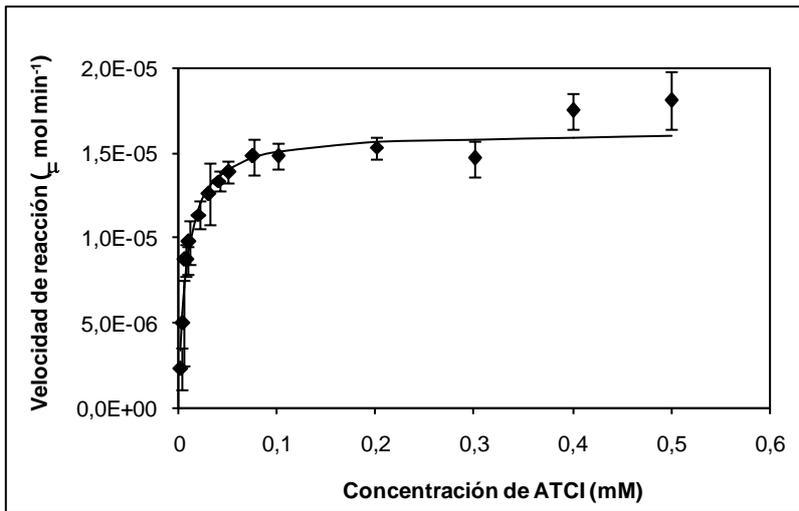


Figura 4.2. Efecto de la concentración del sustrato ATCI sobre la velocidad de reacción (μmol de producto formado por minuto). Cada punto representa la media de tres réplicas y la barra corresponde a su desviación estándar (DE). La línea resulta del ajuste de los datos a la ecuación de Michaelis-Menten.

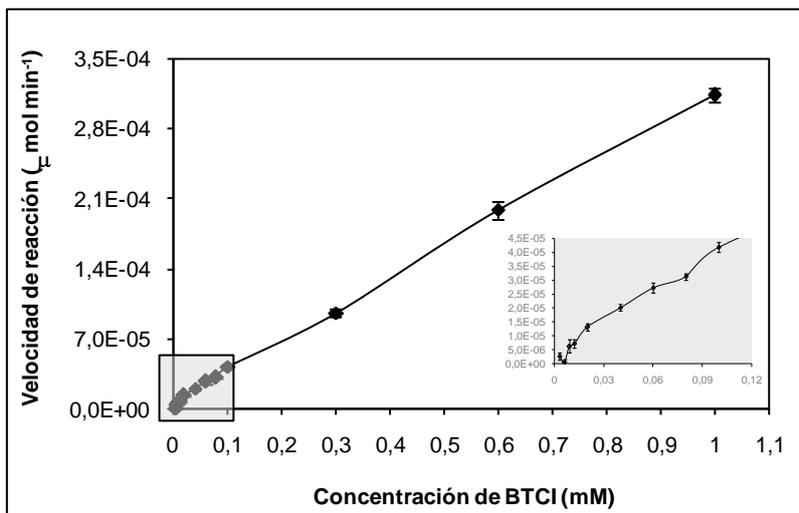


Figura 4.3. Efecto de la concentración del sustrato BTCI sobre la velocidad de reacción (μmol de producto formado por minuto). Cada punto representa la media de tres réplicas y la barra corresponde a su DE. La gráfica más pequeña corresponde a una ampliación de la zona sombreada.

Otra de las características bioquímicas que caracterizan la actividad AChE es su inhibición a altas concentraciones de sustrato. En este estudio (figura 4.4) se observó inhibición tanto en el caso de la actividad AChE como en el de la BChE, pero tan solo a la mayor concentración ensayada (alrededor de 70 mM), siendo ésta considerablemente elevada.

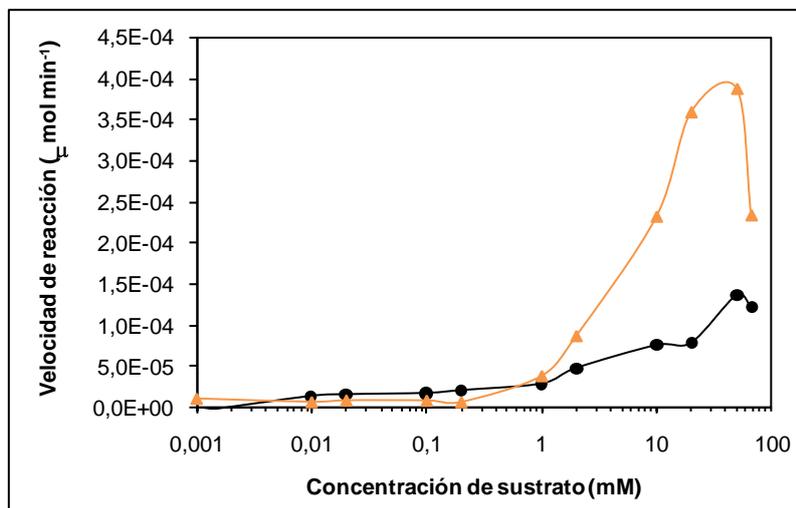


Figura 4.4. Efecto de concentraciones elevadas de sustrato sobre la actividad acetil (●) y butirilcolinesterasa (▲). Se ha representado la velocidad de reacción (μmol de producto formado por minuto) frente a las diferentes concentraciones de sustrato (en escala logarítmica).

4.3.1.2. Respuesta a inhibidores específicos de colinesterasas

La respuesta frente a inhibidores específicos es otra herramienta que nos permite diferenciar entre ambas actividades, AChE y BChE. Los resultados de este estudio se muestran en la figura 4.5.

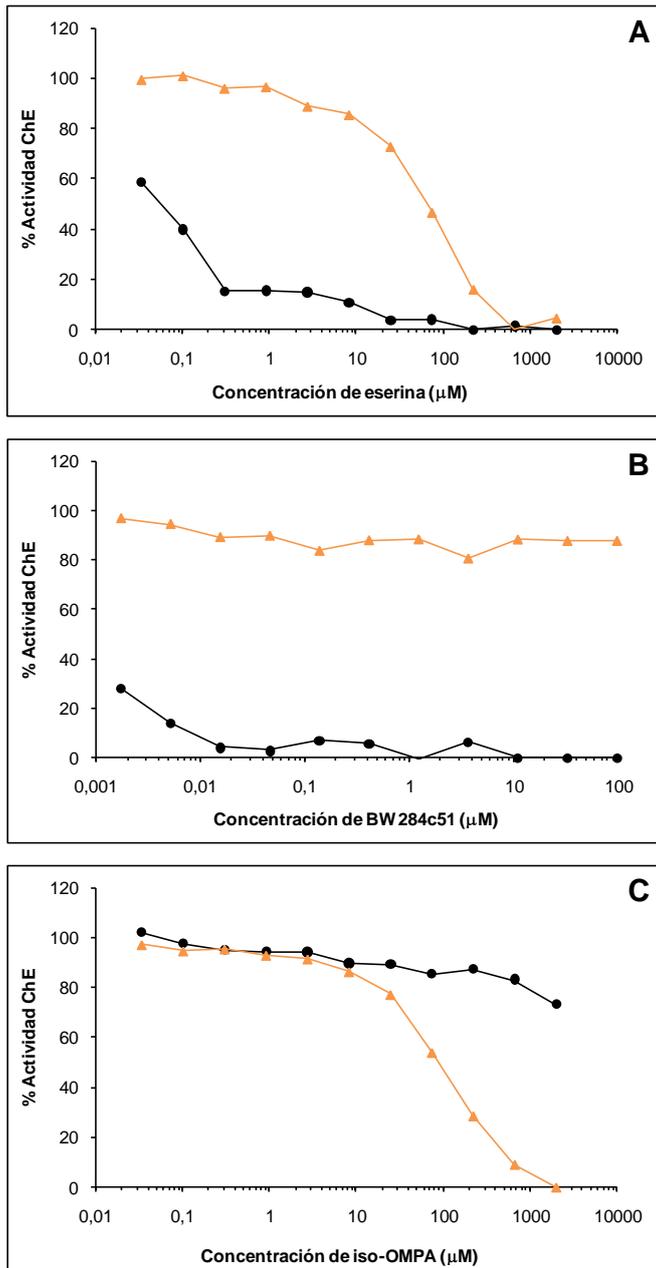


Figura 4.5. Inhibición de la actividad acetil (●) y butirilcolinesterasa (▲) (expresada como porcentaje respecto al control) a concentraciones crecientes de eserina (A), BW 284c51 (B) e iso-OMPA (C) en homogeneizados de *F. occidentalis*.

En el caso de la eserina (figura 4.5 A), inhibidor general de ChE, se observó una mayor sensibilidad al utilizar el sustrato ATCI. Para alcanzar una sensibilidad similar con el sustrato BTCl, se hacía necesario utilizar concentraciones de inhibidor 1000 veces superiores a las utilizadas con el otro sustrato. Frente a BW 284c51 (figura 4.5 B), inhibidor específico de AChE, prácticamente se observó una inhibición total de la actividad desde la menor concentración analizada. En cambio, frente al sustrato BTCl el inhibidor resultó ineficaz, incluso a la mayor concentración ensayada (100 μM), como era de esperar. Por último, iso-OMPA (figura 4.5 C), inhibidor específico de BChE, presentó una mayor eficacia al utilizar el sustrato BTCl; no obstante, la concentración a la que se producía prácticamente la totalidad de la inhibición, se encontraba alrededor de 500 μM , un valor bastante elevado. En este caso, y como también era de esperar, fue la actividad AChE la que resultó prácticamente insensible incluso a la mayor concentración ensayada (2000 μM).

Puesto que los resultados obtenidos frente al sustrato BTCl no resultaron del todo coincidentes con lo descrito en la literatura, en lo que respecta a las concentraciones a las que se debería haber observado la inhibición por los inhibidores específicos, se procedió a determinar el efecto de estos mismos inhibidores sobre la actividad carboxilesterasa (frente a los sustratos $\alpha\text{-NA}$ y $\alpha\text{-NB}$), con el fin de analizar la posible implicación de estas enzimas en la hidrólisis del BTCl.

Los resultados de este estudio se muestran en la figura 4.6. Por un lado, se observó que las curvas mostradas por ambos sustratos eran prácticamente coincidentes, para cada uno de los compuestos analizados. Por otro lado, la respuesta de las carboxilesterasas resultó ser muy similar a la obtenida en el ensayo anterior al utilizar BTCl, frente a los tres inhibidores. Es decir, se observó sensibilidad frente a eserina e iso-OMPA, siendo ésta mayor en el primer caso, y también insensibilidad frente a BW 284c51, en todo el rango de concentraciones analizado.

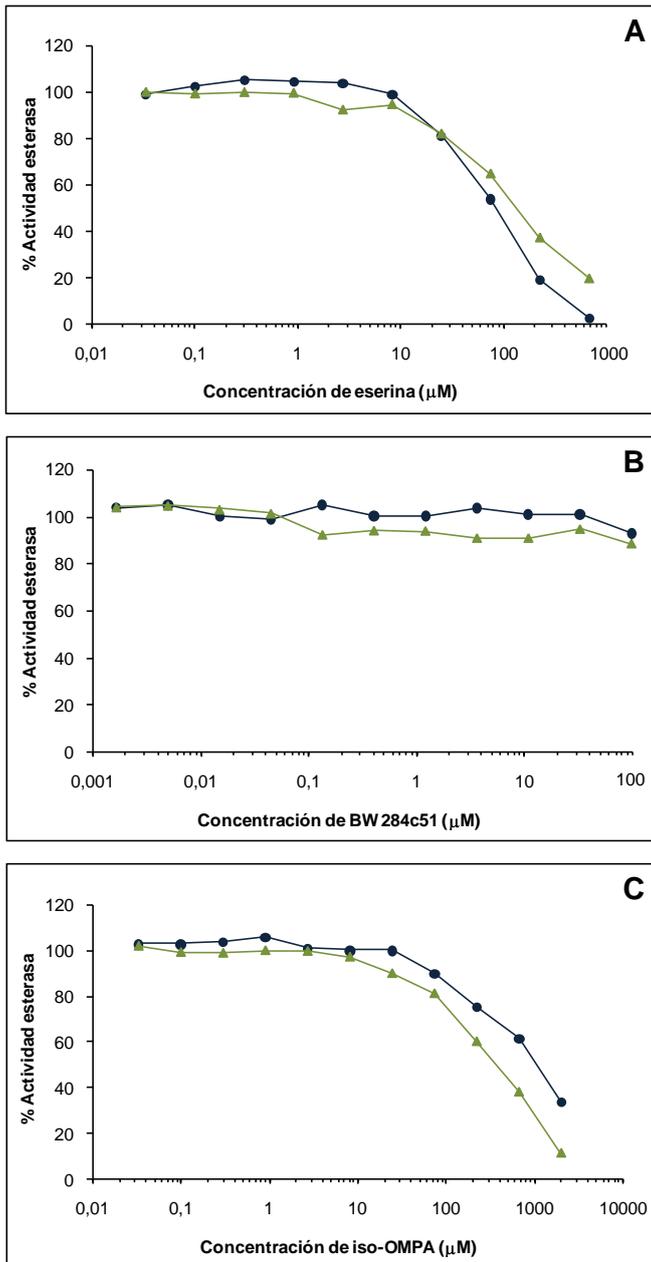


Figura 4.6. Inhibición de la actividad esterasa $\alpha\text{-NA}$ (●) y $\alpha\text{-NB}$ (▲) (expresada como porcentaje respecto al control) a concentraciones crecientes de eserina (A), BW 284c51 (B) e iso-OMPA (C) en homogeneizados de *F. occidentalis*.

4.3.1.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida nativos y tinción para actividad colinesterasa

Para finalizar el estudio de caracterización de ChE, se realizó un análisis de las isoenzimas existentes en *F. occidentalis* utilizando ATCI y BTCl como sustratos, así como el sustrato α -NA para poder llevar a cabo una comparación entre ellos. Los resultados se muestran en la figura 4.7. Se observa que al utilizar ATCI como sustrato, las isoenzimas se revelaron en la parte superior del gel y, aunque éstas aparecían de forma tenue, era posible establecer dos manchas separadas. Por el contrario, utilizando BTCl como sustrato, las bandas aparecían en la parte inferior del gel, y era posible distinguir 5 bandas o grupos de bandas. Por último, en el caso del sustrato α -NA las bandas se revelaron también en la parte inferior del gel como 5 grupos de bandas, exactamente coincidentes a las observadas con el sustrato BTCl.

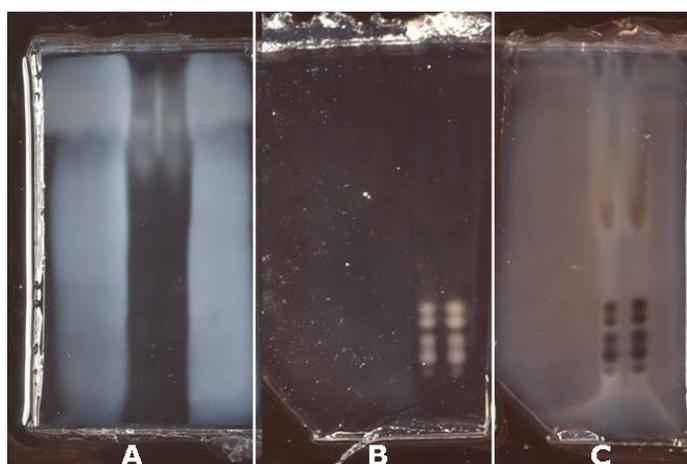


Figura 4.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida nativos teñidos para la actividad colinesterasa con el sustrato ATCI (A, las 2 carreras centrales), BTCl (B) y α -NA (C). Todas las carreras contienen una alícuota de un mismo homogeneizado de *F. occidentalis*.

4.3.2. Análisis de insensibilidad de acetilcolinesterasas frente a insecticidas organofosforados y carbamatos

En este estudio se pretendía analizar la actividad e insensibilidad de AChE frente a insecticidas en insectos individuales pertenecientes a diferentes poblaciones de *F. occidentalis*, con distintos factores de resistencia frente a OP y carbamatos.

4.3.2.1. Determinación de concentraciones discriminantes

Las concentraciones discriminantes de insecticidas a utilizar para el análisis de insensibilidad, corresponden a aquellas que producen alrededor del 80% de la inhibición en la población sensible, ya que se trata de la concentración que permite distinguir entre insectos sensibles y resistentes.

Por ello, se analizaron, en primer lugar, las curvas de inhibición para los insecticidas carbamatos formatanato y metiocarb, y para el OP metamidofos en la población sensible MLFOM. En la figura 4.8 se muestra el resultado de dicho estudio. Se puede observar que el efecto producido por los diferentes insecticidas resultó variable. Los carbamatos utilizados resultaron ser más efectivos que el OP, siendo la diferencia de unos tres órdenes de magnitud. Además, en el caso del metamidofos, a la mayor concentración ensayada (6500 μM), todavía existía aproximadamente un 15% de actividad AChE que no resultaba afectada por el insecticida. Entre los carbamatos también existía una cierta diferencia (de unas 5 veces), siendo el metiocarb el insecticida más efectivo.

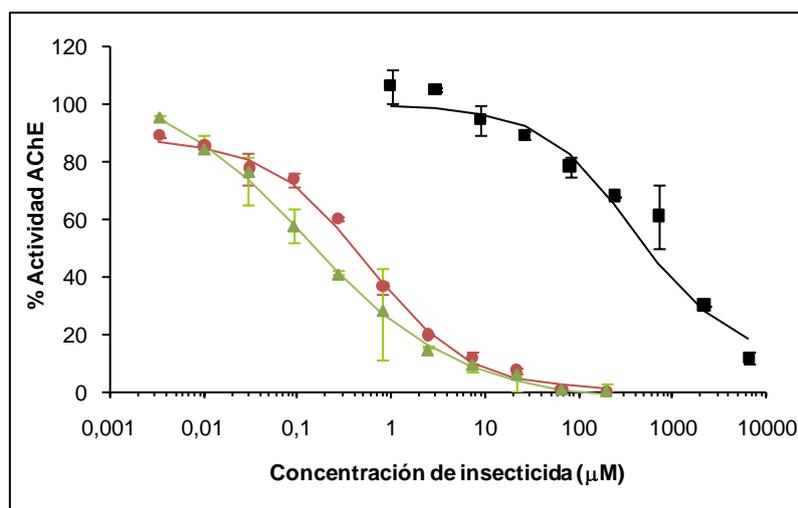


Figura 4.8. Inhibición de la actividad AChE (expresada como porcentaje respecto al control) a concentraciones crecientes de los insecticidas formetanato (●), metiocarb (▲) y metamidofos (■) en la población de referencia MLFOM. Cada punto es la media de 3 réplicas y las barras representan la DE de las mismas. Las líneas representan el ajuste de los datos a una ecuación logística sigmoide.

En la tabla 4.3 se muestran los valores obtenidos de CI_{50} para cada uno de los insecticidas, así como los IC 95% asociados a tales valores. Se puede observar que los valores más altos de CI_{50} correspondían al insecticida metamidofos, siendo mucho menores los obtenidos para el formetanato y algo inferiores para el metiocarb. Las diferencias observadas resultaron ser significativas en todos los casos. Cabe indicar que el formetanato y el metiocarb son insecticidas específicos contra trips, mientras que el metamidofos es un insecticida de uso general.

Tabla 4.3. Concentración de inhibición del 50% (CI_{50}) de la actividad AChE en la población sensible MLFOM, después de la incubación con formetanato, metiocarb y metamidofos. Se indican los valores del intervalo de confianza al 95% asociado a cada uno de ellos (IC 95%).

Insecticida	CI_{50} (μM)	IC 95% (μM)
Formetanato	0,584454	[0,43035-0,79376]
Metiocarb	0,129551	[0,07854-0,21368]
Metamidofos	423,4284	[420,543-426,324]

Teniendo en cuenta las curvas de inhibición obtenidas (figura 4.8), se determinaron las siguientes concentraciones discriminantes como las aptas para utilizar en el ensayo de insensibilidad en insectos individuales: 7 μM para el formetanato, 3 μM para el metiocarb y 4500 μM para el metamidofos.

4.3.2.2. Estudio de insensibilidad de acetilcolinesterasas en insectos individuales de distintas poblaciones

Los resultados obtenidos del análisis de actividad AChE e insensibilidad frente a los insecticidas, se muestran en la tabla 4.4. Se han indicado los valores medios obtenidos de las medidas individuales para cada población e insecticida.

El análisis de la actividad AChE, indicó que las poblaciones resultaron ser significativamente diferentes (ANOVA, $P < 0,001$). Analizando el test *a posteriori* (indicado en la tabla 4.4), se observó que tan solo la población MELAU (procedente de un invernadero comercial) resultó ser significativamente diferente de la población de referencia MLFOM. Esta población presentaba valores de actividad mucho mayores que el resto de poblaciones (sobre unas 3 veces). Observando la distribución de frecuencias de los valores individuales (figura 4.9) se determinó que este incremento se debía a la mayor actividad mostrada por una parte de la población (con un valor medio de actividad alrededor de $25 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$), mientras que otra parte seguía mostrando un patrón muy similar al observado tanto en la población de referencia como en el resto de poblaciones. Éstas mostraban una distribución entre 0 y $10 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$, con un pico alrededor de 5, y aunque en algún caso se observan ligeras diferencias de las curvas, no resultaron ser significativas.

Tabla 4.4. Actividad específica AChE (nmol min⁻¹ mg proteína⁻¹) y porcentaje de inhibición de la actividad AChE frente a diversos insecticidas, en individuos de diferentes poblaciones de *Frankliniella occidentalis*^{a,b}.

Población	% Inhibición de actividad AChE									
	Actividad AChE	P-valor	Formetanato	P-valor	Metiocarb	P-valor	Metamidofos	P-valor	Formetanato	P-valor
MLFOM	4,76 ± 2,00	-	79,3 ± 15,6	-	84,0 ± 6,4	-	75,6 ± 17,3	-	-	-
MELAU	17,3 ± 11,5	< 0,001	91,7 ± 7,5	0,002	75,1 ± 18,7	0,998	-	-	-	-
CIRSTB	5,73 ± 3,51	0,945	74,2 ± 17,2	0,996	78,5 ± 11,1	1,000	84,6 ± 10,9	0,122	-	-
PIPAM 1	6,04 ± 2,96	0,093	90,5 ± 6,9	0,013	80,3 ± 8,0	1,000	73,3 ± 12,6	1,000	-	-
PIPAM 2	5,74 ± 2,53	0,129	82,2 ± 9,3	1,000	80,5 ± 9,3	0,979	73,5 ± 15,0	1,000	-	-
FOR	5,62 ± 2,80	0,376	89,4 ± 6,1	0,187	89,3 ± 7,4	0,561	68,8 ± 13,3	0,272	-	-
MET	4,08 ± 2,16	0,272	78,5 ± 12,9	1,000	55,8 ± 12,1	< 0,001	55,6 ± 16,3	< 0,001	-	-

^a Valores medios ± DE.

^b Dentro de una misma columna, los valores resaltados en negrita indican diferencias significativas respecto de la población de referencia MLFOM (Actividad AChE: prueba T3 de Dunnet, P<0,05. Porcentaje de inhibición actividad AChE: comparaciones por pares con la corrección de Bonferroni, P<0,05).

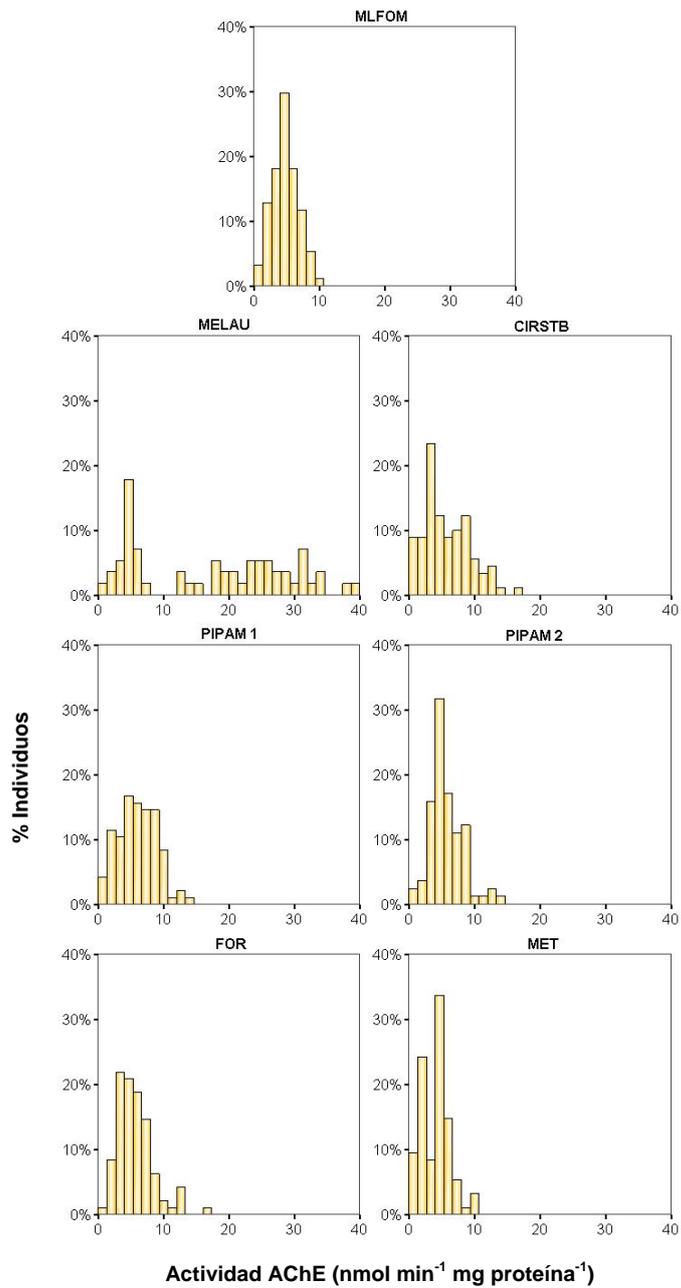


Figura 4.9. Histogramas de distribución de la actividad específica AChE (nmol min⁻¹ mg proteína⁻¹) en individuos de cada una de las poblaciones analizadas (n=96).

Los resultados obtenidos del ANOVA sobre los porcentajes medios de inhibición para las diferentes poblaciones, frente a los tres insecticidas analizados, se muestran en la tabla 4.5.

Tabla 4.5. Resultado del ANOVA de los dos factores incluidos en el estudio (*Población e Insecticida*) y sus interacciones, dentro de un modelo de análisis cruzado.

Fuentes de variación	gl ^a	Media cuadrática	F	P-valor
Población	6	0,610	21,030	<0,001
Insecticida	2	1,014	34,953	<0,001
Población*Insecticida	11	0,304	10,472	<0,001
Error	588	0,029		

^a gl (grados de libertad)

^b Estadístico F

En este caso también se observaron diferencias significativas. La significación obtenida en la interacción indicaba que el efecto de los factores no podía ser evaluado por separado. Los resultados de las comparaciones por pares para determinar los casos en los que se producían diferencias significativas, se han indicado en la tabla 4.4.

Frente al insecticida formetanato, de nuevo la población MELAU resultó ser significativamente diferente, mostrándose algo más sensible que la población de referencia, ya que la inhibición de las AChE resultó ser mayor. Asimismo, al observar la distribución de frecuencias (figura 4.10) se apreció un cierto desplazamiento de la misma hacia la derecha, es decir, hacia valores mayores de inhibición. Un resultado muy similar se observó también en la población PIPAM1, aunque en este caso la significación fue algo menor.

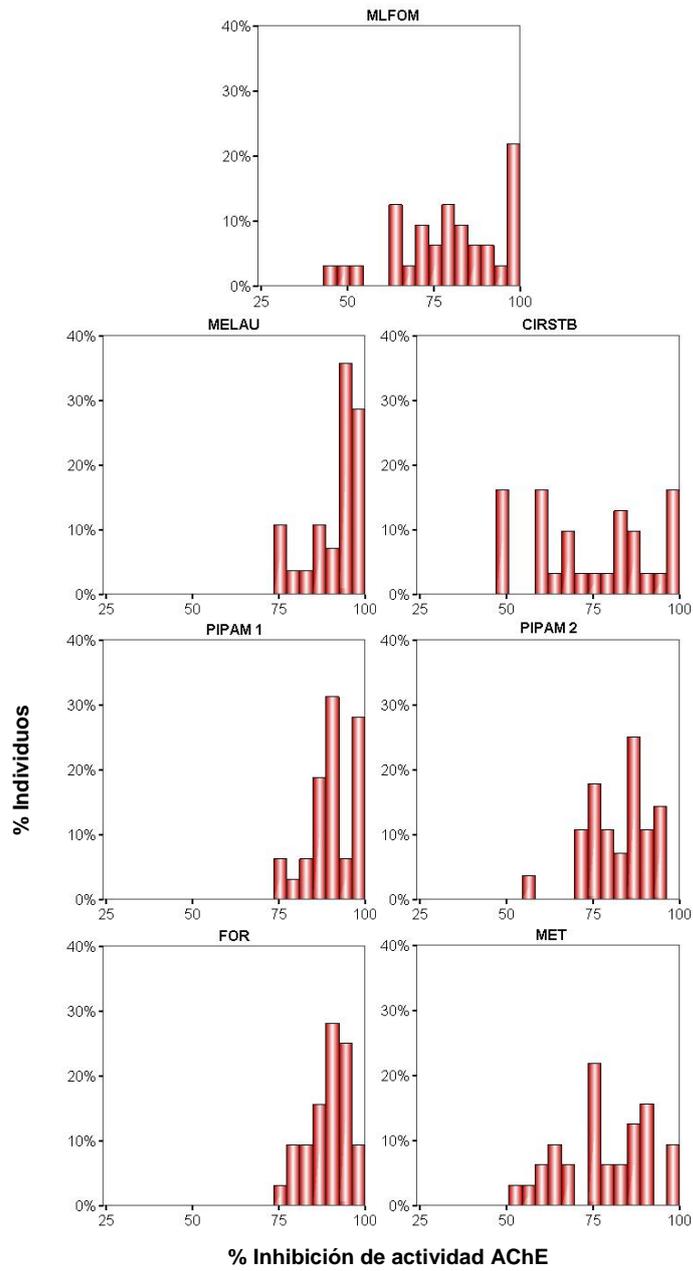


Figura 4.10. Histogramas de distribución de inhibición de la actividad AChE (expresada como porcentaje respecto al control) frente al insecticida formetanato (concentración discriminante: 7 μ M) en individuos de cada una de las poblaciones analizadas (n=32).

En el caso del insecticida metiocarb fue la población MET la que se mostró significativamente diferente respecto a la sensible. En este caso, la población mostró una mayor insensibilidad, es decir, se obtuvieron valores menores de inhibición de la actividad AChE, con un porcentaje aproximado del 55%. Observando las distribuciones correspondientes a las medidas (figura 4.11) se encontró que la población aparecía globalmente desplazada hacia la izquierda. De hecho, en la mayoría de poblaciones, los valores se distribuían alrededor del 80% de inhibición, mientras que en la población MET, los valores mayores obtenidos rondaban el 75%.

Por último, frente al insecticida metamidofos, de nuevo la población MET presentó un comportamiento casi idéntico al observado en el caso del insecticida metiocarb, con valores de inhibición muy similares y la curva de distribución desplazada a la izquierda respecto a la población de referencia (figura 4.12).

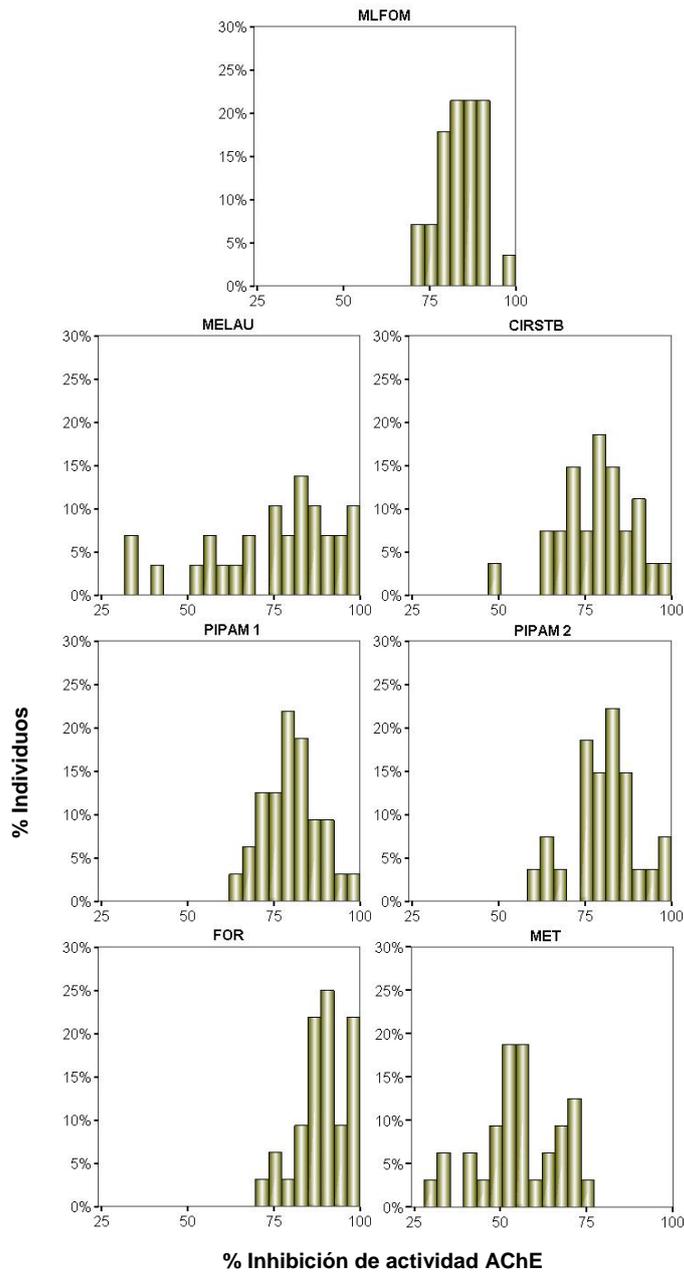


Figura 4.11. Histogramas de distribución de inhibición de la actividad AChE (expresada como porcentaje respecto al control) frente al insecticida metiocarb (concentración discriminante: 3 μ M) en individuos de cada una de las poblaciones analizadas (n=32).

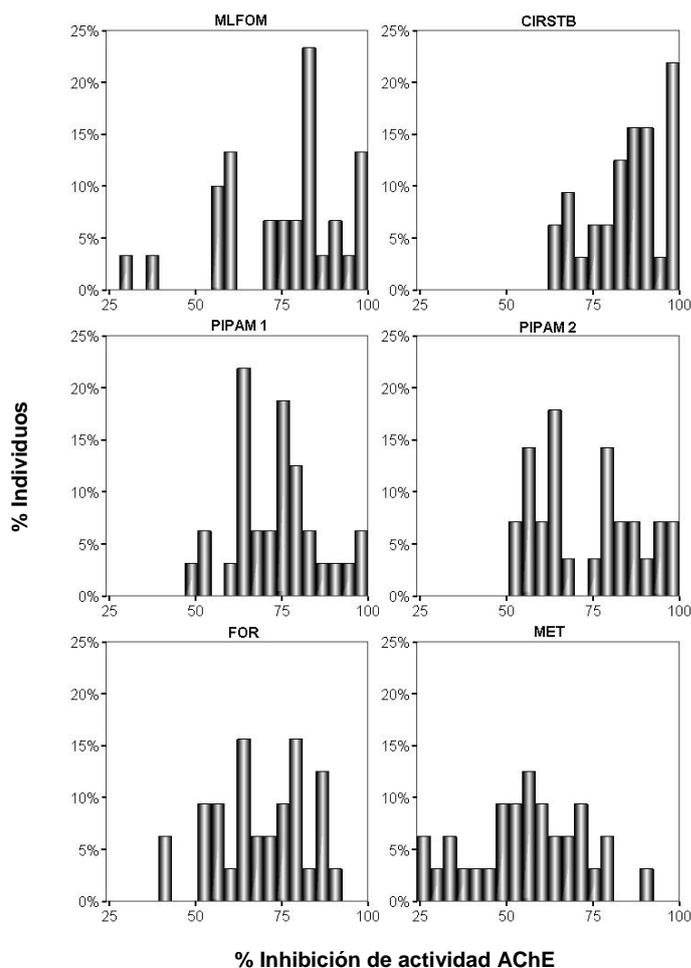


Figura 4.12. Histogramas de distribución de inhibición de la actividad AChE (expresada como porcentaje respecto al control) frente al insecticida metamidofos (concentración discriminante: 4500 μM) en individuos de cada una de las poblaciones analizadas (n=32).

El estudio de correlación entre el FR frente a los diferentes insecticidas y la actividad AChE y/o la inhibición de esta actividad, puso de manifiesto una relación entre el FR_{50} y la insensibilidad de la actividad AChE frente al insecticida metiocarb (porcentaje de inhibición a la concentración discriminante 3 μM) (figura 4.13). El coeficiente de correlación de Pearson fue de -0,84 (P-valor=0,036). A medida que aumentaba el FR_{50} de las

poblaciones, disminuía el porcentaje de inhibición de la actividad AChE causado por el insecticida metiocarb.

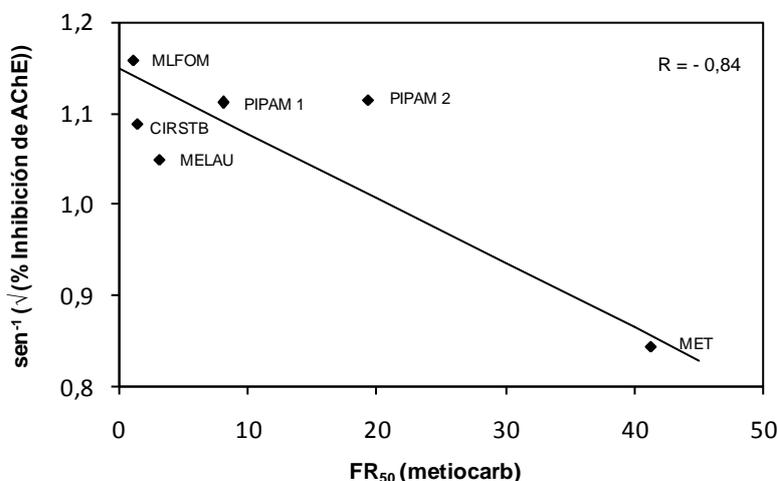


Figura 4.13. Correlación entre el porcentaje de inhibición de la actividad AChE para cada población (transformación del arco seno) y el FR₅₀ frente al insecticida metiocarb (concentración discriminante: 3 μ M). Cada punto corresponde a una población diferente y la línea indica el ajuste de los datos mediante reducción de los ejes mayores (RMA). La R indica el coeficiente de correlación de Pearson.

4.4. Discusión

En extractos de insectos, las colinesterasas se distinguen normalmente de otras esterasas por su sensibilidad frente a eserina a una concentración de 10^{-5} M (10 μ M) (Toutant, 1989). En nuestro estudio, al utilizar ATCI como sustrato sí se observó esta peculiaridad; sin embargo, pese a ser una característica general de colinesterasas, ésta no se produjo al utilizar BTCl como sustrato. No obstante, sí se observó sensibilidad, pero a concentraciones mayores a las indicadas. Sin embargo, otros autores (Liu et al., 1994) sí obtuvieron inhibición a la concentración de 10^{-5} M en estudios realizados sobre esta misma especie. Además, en la mayoría de los casos, la actividad colinesterasa se debe fundamentalmente a una AChE definida

por los siguientes criterios: inhibición por eserina y BW 284c51 a una concentración de 10^{-5} M, y a elevadas concentraciones de sustrato; insensibilidad hacia iso-OMPA; y una mayor actividad hacia el sustrato ATCI que hacia BTCl (Zhu y Clark, 1994). En nuestro estudio, utilizando ATCI como sustrato, sí se observó la primera peculiaridad, tal y como ya se ha mencionado, así como la sensibilidad a BW 284c51 e insensibilidad frente a iso-OMPA. Ahora bien, la inhibición a elevadas concentraciones de sustrato no parecía muy evidente, ya que ésta se produjo tan solo a la mayor concentración ensayada (70 mM). En el estudio de Liu y colaboradores (1994) el ensayo se realizó hasta una concentración de 8 mM y tampoco se observó inhibición. El hecho se justificó atendiendo a tres posibles motivos: que no fuera una característica de AChE de trips (en algunos áfidos tampoco se produce), que existiera más de una isoenzima de AChE, o que una esterasa no específica hidrolizara ATCI a altas concentraciones (como ocurría en *Tetranychus urticae*) (Brestkin et al., 1985).

No obstante, como ya se ha comentado al inicio de este capítulo, los áfidos, trips y alguna otra especie podrían presentar alguna otra peculiaridad (Gao y Zhu, 2001), como que la AChE no hidrolice BTCl o, en su caso, presente también inhibición a altas concentraciones de sustrato, y sea inhibida por reactivos sulfhidrilos. Además, en estos insectos parece existir una segunda colinesterasa, atribuida por algunos autores a una BChE, que hidroliza el sustrato BTCl a altas concentraciones (su K_m es muy elevada, sobre $1,5 \cdot 10^{-2}$ M), es resistente a la inhibición por BW 284c51, no hidroliza ATCI, no presenta inhibición por exceso de sustrato y no se observa inhibición por iso-OMPA a 10^{-5} M (Manulis et al., 1981; Brestkin et al., 1985). En nuestro estudio, al utilizar el sustrato BTCl, se observaron algunas de estas peculiaridades, como la hidrólisis del sustrato a concentraciones muy elevadas (la saturación se observó a una concentración alrededor de 20 mM) y la insensibilidad al BW 284c51 y a 10^{-5} M de iso-OMPA. En cuanto a la inhibición por exceso de sustrato, ocurría

algo similar al caso del ATCI, produciéndose tan solo a la mayor concentración ensayada, sin resultar muy patente.

Por otro lado, las curvas de inhibición de la actividad esterasa (utilizando α -NA y α -NB como sustratos) obtenidas al aplicar estos mismos inhibidores, eran prácticamente coincidentes con las obtenidas con el sustrato BTCl. Relacionando todos estos resultados, se podría establecer que la actividad BTCl observada en los homogeneizados de *F. occidentalis* aquí estudiados, se debería en realidad a la hidrólisis de este sustrato por parte de otra/s enzima/s inespecíficas. Este hecho explicaría la saturación a elevadas concentraciones de sustrato, una respuesta propia de una enzima con baja sensibilidad por el sustrato o de la intervención de varias enzimas sobre éste, de manera que al inicio actuaría aquella enzima con una mayor afinidad por el mismo (posiblemente una AChE), pero conforme se aumenta la concentración de sustrato no se observaría la saturación porque entonces empezarían a actuar aquellas enzimas con una menor afinidad hacia éste, posiblemente otras esterasas, es decir, el comportamiento de una enzima se vería alterado por la presencia de otras enzimas en la preparación (Gnagey et al., 1987; Gao y Zhu, 2001). En estudios sobre AChE de insectos, también se ha visto que éstas hidrolizan BTCl aunque en diferente grado, por lo que la hidrólisis de BTCl en insectos no sería un indicativo de la existencia de una enzima BChE (Toutant, 1989).

Finalmente, los resultados obtenidos del estudio electroforético defienden la idea de que se trata de otra/s enzima/s las que catalizan el sustrato BTCl y no una BChE, puesto que las bandas resueltas para el sustrato BTCl y α -NA fueron coincidentes. En el caso de la actividad ATCl, las enzimas aparecieron en la parte superior del gel, indicando que en este caso sí se trataba de enzimas diferentes. El problema fue que al revelarse como manchas, resultó imposible determinar cuántas bandas existían. En el estudio de Liu mencionado anteriormente (Liu et al., 1994) utilizaron el sustrato ATCl y BTCl en un análisis electroforético, y las bandas también

aparecieron como una mancha con el primero de ellos, mientras que en el caso del BTCl encontraron dos bandas de actividad intensa y, a veces, otras dos de menor intensidad.

Se han descrito posibles modificaciones en la enzima AChE como mecanismo de resistencia frente a varios insecticidas en poblaciones de *F. occidentalis* (Zhao et al., 1994; Jensen, 1998, 2000). En nuestro estudio se ha visto, por un lado, que la población MELAU, procedente de un invernadero comercial, presentó unas tres veces más actividad AChE que la población de referencia. Dicha población presentaba un FR₅₀ frente a los carbamatos formetanato y metiocarb, de 4,6 y 3, respectivamente, mientras que frente al OP metamidofos, era de 2,1. Por otro lado, la población MET, seleccionada con el insecticida metiocarb, resultó ser la más insensible frente a la inhibición de los insecticidas metiocarb y metamidofos, con un FR₅₀ de 41,3 en el primer caso y desconocido en el segundo. Tal y como se ha indicado al inicio de este capítulo, existen evidencias de que una mayor cantidad de enzima puede aumentar la tolerancia a los OP y carbamatos, pero mayores niveles de resistencia tan solo se han asociado con sustitución de aminoácidos en la parte catalítica de la enzima, las cuales le confieren insensibilidad hacia la inhibición por estos insecticidas (Mutero et al., 1994; Byrne y Devonshire, 1997).

Por otro lado, en el caso del insecticida metiocarb, se estableció una correlación entre el porcentaje de inhibición de la actividad AChE y el FR₅₀ frente a este insecticida de las poblaciones estudiadas (figura 4.13). Esta correlación era también un indicativo de la presencia de varias AChE con diferentes propiedades catalíticas en las poblaciones de *F. occidentalis* analizadas. En estudios realizados sobre esta misma especie (Zhao et al., 1994), también se relacionó la resistencia (a diazinón) con insensibilidad de AChE, explicándose por una posible predominancia de alguna forma insensible de la enzima. Del mismo modo, en otros estudios realizados en poblaciones resistentes a metiocarb (Jensen, 1998, 2000), la resistencia se

relacionó tanto con una mayor actividad AChE como con insensibilidad de la misma, y se estableció una correlación entre ambas, indicando que las poblaciones con mayor insensibilidad hacia los insecticidas presentaban también menor actividad AChE y viceversa. Es decir, la modificación en las AChE confería resistencia frente al insecticida metiocarb, y afectaba, a su vez, la cinética de la enzima. No obstante, en nuestro estudio probablemente los resultados de la población MET resultaron determinantes en la significación de la correlación, indicando que posiblemente tan solo esta población presentaría alguna AChE modificada.

Estudios genéticos han relacionado las modificaciones en los aminoácidos de las AChE con la resistencia en mosquitos (Nabeshima et al., 2004), áfidos (Andrews et al., 2004), moscas (Mutero et al., 1994; Walsh et al., 2001), escarabajos (Zhu et al., 1996) y ácaros (Anazawa et al., 2003). Excepto en dos casos inusuales, todas las sustituciones encontradas en las secuencias asociadas con la resistencia, implicaban cambios hacia volúmenes mayores de las cadenas laterales. Este hecho era generalmente interpretado como la generación de formas de la enzima con algún tipo de impedimento estérico, que limitara el acceso de las moléculas de insecticida al residuo catalítico de serina, al cual se unen en las formas sensibles de la enzima. Estas sustituciones seguirían permitiendo el acceso de la molécula de acetilcolina, más pequeña, a dicho residuo, de manera que la función colinérgica normal y necesaria de la AChE, se seguiría produciendo (Oakeshott et al., 2005b).

Así pues, este estudio evidencia que tanto una mayor actividad, así como la presencia de formas insensibles de la enzima AChE, son posibles mecanismos de resistencia en poblaciones de *F. occidentalis*. Ahora bien, ni en este ni en ningún otro estudio, se han realizado todavía análisis genéticos en esta especie que demuestren la modificación de aminoácidos como responsables de la resistencia.

5. Discusión general

5. Discusión general

La resistencia a insecticidas en poblaciones de campo de *F. occidentalis* es un hecho muy común, y una de las primeras causas de muchos de los fallos en el control de esta plaga mediante la utilización de insecticidas. Como ya se ha indicado, esta especie presenta un enorme potencial para desarrollar rápidamente la resistencia frente a un amplio rango de compuestos. Sin embargo, tan solo se han llevado a cabo unos pocos estudios para esclarecer los mecanismos subyacentes a la resistencia (Brodsgaard, 1994; Zhao et al., 1995b; Jensen, 1998, 2000; Herron y Gullick, 2001; Maymó et al., 2002, 2006).

El conocimiento de los mecanismos de resistencia puede ser la base para el desarrollo de ensayos bioquímicos rápidos y sensibles, que permitan detectar la resistencia en las poblaciones de insectos. Los ensayos que permiten la discriminación entre fenotipos sensibles y resistentes en insectos individuales, ofrecen la capacidad de una detección temprana de la resistencia y la evaluación de la dinámica poblacional de los insectos resistentes.

Los ensayos bioquímicos empleados en este estudio han sido utilizados en la detección de la resistencia en muchas otras especies de insectos (Feyereisen, 1995; Oakeshott et al., 2005b; Wheelock et al., 2005; Li et al., 2007). Se ha realizado el análisis de la actividad esterasa y sus isoenzimas frente a diferentes sustratos modelo (que constituye el capítulo 2 de esta tesis); el análisis de la inhibición *in vitro* e *in vivo* de la actividad esterasa por compuestos sinergistas (que compone el capítulo 3 de este trabajo); y el análisis de la actividad acetilcolinesterasa (AChE) y su insensibilidad frente a los insecticidas (que forma el capítulo 4). En la realización de los mismos, se han utilizado poblaciones procedentes tanto de invernaderos comerciales del sureste de España como de invernaderos

experimentales, y poblaciones seleccionadas en el laboratorio frente a diversos insecticidas.

Los factores de resistencia (FR) mostrados por las poblaciones analizadas en los diferentes capítulos de esta tesis, son mayores frente a los insecticidas metiocarb, formetanato y acrinatrina, que frente a metamidofos, deltametrina y endosulfán, siendo precisamente los tres primeros específicos contra trips. Además, tanto en las estrategias de reiteración como en los ensayos de selección con insecticidas, los FR son mayores conforme se incrementa la presión ejercida con los insecticidas, y alcanzan niveles especialmente elevados en el caso del insecticida acrinatrina (Espinosa et al., 2002).

En las poblaciones de campo analizadas, la presencia del triplete A de esterases en los individuos, que les confiere, a su vez, una mayor actividad enzimática total, es responsable de la resistencia cruzada a los insecticidas acrinatrina y metiocarb. Esta característica también la presentan tres poblaciones procedentes de invernaderos experimentales, correspondientes a las primeras etapas de los ensayos realizados en ellos, por lo que la presión ejercida con el insecticida no había sido demasiado elevada. La presencia o la intensidad de determinadas isoenzimas de esterases se ha relacionado con la resistencia a insecticidas en muchas especies de insectos (Devonshire, 1989; Rossiter et al., 2001). Las isoenzimas de esterases ya han sido previamente analizadas en la especie *F. occidentalis* (Zhao et al., 1994); sin embargo, ésta es la primera vez que se establece una relación entre la resistencia y la presencia de determinadas isoenzimas en esta especie.

Por otro lado, se ha descrito que un incremento en la actividad AChE confiere resistencia, aunque limitada, frente a organofosforados (OP) y carbamatos (Mutero et al., 1994; Byrne y Devonshire, 1997). La población de campo MELAU aquí estudiada muestra un incremento en la actividad AChE, presentando baja resistencia al organofosforado metamidofos y a los carbamatos metiocarb y formetanato. También muestra resistencia leve al

piretroide acrinatrina, la cual no puede ser explicada por este mecanismo, sino probablemente por la presencia del triplete A, como se ha visto en otras poblaciones de campo. Éste también podría explicar la resistencia a metiocarb. La resistencia a metamidofos podría ser explicada por el incremento de la actividad AChE, pero al ser la única población de las analizadas con un cierto grado de resistencia conocido para este insecticida, resulta difícil establecer este supuesto con una mayor exactitud. En el caso del carbamato formetanato, la resistencia podría deberse al incremento de la actividad AChE o a algún otro mecanismo no analizado en este trabajo. En el resto de poblaciones analizadas resistentes a formetanato, no se ha podido responsabilizar a ninguno de los mecanismos aquí estudiados, como causantes de la resistencia.

En poblaciones de campo y seleccionadas, se establece, además, una correlación entre insensibilidad de AChE y la resistencia al insecticida metiocarb (figura 4.13). Ahora bien, de las poblaciones incluidas en el análisis, dos son procedentes de invernaderos comerciales (CIRSTB y MELAU), dos de invernaderos experimentales (PIPAM1 y PIPAM2), y una seleccionada en el laboratorio (MET), con FR crecientes en este mismo orden. No obstante, las poblaciones de invernaderos experimentales muestran más sensibilidad de las AChE frente a los insecticidas que las poblaciones de invernaderos comerciales, y en una de ellas (PIPAM1) la resistencia a metiocarb se ha atribuido a la presencia del triplete A. En la otra no se han analizado las isoenzimas de esterasas, pero podría postularse el mismo mecanismo, por su resistencia cruzada con el insecticida acrinatrina. Finalmente, la población seleccionada MET sí presenta una clara insensibilidad, siendo, de hecho, el único caso en el que se ha encontrado una inhibición significativamente diferente respecto a la población de referencia. Por lo tanto, posiblemente sea ésta la única población analizada en la que se encuentre una forma modificada de AChE. Este mecanismo confiere niveles elevados de resistencia, como se puede observar en esta población, y más si se encuentra junto con algún

mecanismo de destoxificación (Oppenoorth et al., 1977), tal y como indica la restitución parcial de la resistencia en esta población por parte del butóxido de piperonilo (PBO) (Espinosa et al., 2005).

Así pues, las esterasas son un mecanismo muy importante en la resistencia observada en las poblaciones de campo frente a dos de los insecticidas específicos para esta especie, acrinatrina y metiocarb. Y en el conjunto de las poblaciones, la resistencia frente a estos insecticidas se relaciona, en el caso del metiocarb, con incremento de la actividad esterasa en poblaciones de campo y seleccionadas (Maymó et al., 2002 y capítulo 2), incremento de la actividad AChE y de su insensibilidad en poblaciones de campo y seleccionadas, respectivamente (capítulo 4), y una posible implicación de las oxidasas de función múltiple (MFO) en poblaciones seleccionadas, como sugiere la restitución parcial de la resistencia por el sinergista PBO (Espinosa et al., 2005). El efecto del PBO no puede ser atribuido a su acción sobre la actividad esterasa como se ha descrito en otras especies, a tenor de lo que indican las determinaciones realizadas en este estudio (capítulo 3). Al mismo tiempo, la resistencia frente al insecticida acrinatrina también se relaciona con un incremento de la actividad esterasa en poblaciones de campo y seleccionadas (Maymó et al., 2002 y capítulo 2), y también se restituye parcialmente por el sinergista PBO (Espinosa et al., 2005) en poblaciones seleccionadas, indicando de nuevo la posible implicación de las MFO.

Por tanto, la resistencia frente a ambos insecticidas (acrinatrina y metiocarb) se muestra como polifactorial: diferentes mecanismos parecen coexistir en una misma población, y distintos mecanismos confieren resistencia a un mismo insecticida en diferentes poblaciones (Jensen, 2000). Otros estudios realizados en esta misma especie determinaron la misma característica en la resistencia observada en las poblaciones frente al metiocarb, encontrándose implicados tanto mecanismos de destoxificación como alteración de los puntos diana (Jensen, 2000).

En el caso del insecticida acrinatrina, tal y como ya se ha indicado anteriormente, se produce un incremento de la resistencia conforme se aumenta la presión de selección con el mismo. En la población ACR, seleccionada con dicho insecticida, se ha visto que el PBO revierte en gran medida la resistencia al insecticida (Espinosa et al., 2005), sugiriendo una posible implicación de las MFO. La puesta en marcha de un ensayo para determinar la actividad MFO en esta especie podría tener un valor práctico en el control de la resistencia. Sin embargo, un ensayo con sustratos modelo para estas enzimas no parece fácil de llevar a cabo, en parte por las dificultades que este sistema presenta (asociado a membranas, existen inhibidores endógenos y proteasas, etc.) y en parte por el pequeño tamaño del insecto.

En esta misma población seleccionada también se ha determinado que la resistencia se encuentra ligada a un único gen (resistencia monogénica) y se presenta como semi-dominante (Bielza et al., 2008), aunque si la dosis utilizada no resulta letal para los individuos heterocigotos, se muestra entonces con carácter dominante. La dominancia en la resistencia es un factor clave, ya que acelera el desarrollo de la misma, aunque permite, a su vez, que los genes sensibles se mantengan en la población durante más tiempo. Así, en el caso de genes recesivos la resistencia evoluciona más lentamente, pero una vez desarrollada, resulta más probable que llegue a fijarse en la población (Denholm et al., 1998).

Sin embargo, no hay que olvidar que los resultados obtenidos de los estudios llevados a cabo en poblaciones seleccionadas en el laboratorio no pueden extrapolarse a poblaciones de campo, ya que éstos no reflejan las condiciones presentes en el ambiente natural. Sin embargo, pueden aportar evidencias de la capacidad de desarrollo de resistencia en la especie (Sayyed et al., 2005). Asimismo, la susceptibilidad de una plaga a los insecticidas puede variar dependiendo de la presión de selección ejercida por estos compuestos. Si la dosis de insecticida utilizada se encuentra dentro de la distribución fenotípica de resistencia de la población, deriva en

la supervivencia de un gran número de individuos, que muestran un aumento de la resistencia a los insecticidas y las aplicaciones repetidas seleccionan rasgos diferentes de resistencia pre-existentes en la población, que confieren baja resistencia pero que tienen un efecto acumulativo (resistencia poligénica). Si la dosis se encuentra fuera de dicha distribución, resulta en la selección de mutaciones raras en genes individuales, que tienen un efecto mayor (resistencia monogénica) (French-Constant et al., 2004).

Muchas de las características biológicas de *F. occidentalis* que contribuyen a su estatus de plaga y facilitan el desarrollo de la resistencia (generaciones cortas, sistema reproductivo haplodiploide, polifagia, etc.) no pueden ser manipuladas o controladas. Sin embargo, sí pueden ser adoptadas estrategias encaminadas a minimizar los efectos de tales características. Los programas de control integrado, con el control químico como uno de sus componentes, minimizan el uso de los insecticidas, pero incluso en este caso es necesario considerar el factor de la resistencia. Además, es importante tener en cuenta que resulta prácticamente imposible detener este problema mediante la utilización de nuevos compuestos insecticidas (problemas de desarrollo, registro, etc.), por lo que se deben utilizar los compuestos ya existentes, así como en combinación con compuestos sinérgicos. El control integrado en trips ha sido analizado por Jacobson (1997), Parker y Skinner (1997), y Parrella y Lewis (1997), e incluyen métodos de control tanto cultural, como físico, biológico y químico.

En el caso de métodos químicos, es necesario un uso óptimo de los insecticidas para evitar el desarrollo de la resistencia. Para *F. occidentalis*, es adecuada la rotación de insecticidas cada 4-6 semanas, siempre y cuando éstos produzcan la selección de diferentes mecanismos, para que así tan solo unas pocas generaciones sean expuestas al mismo insecticida (Robb y Parrella, 1995). Sin embargo, dependiendo del país, el número de insecticidas registrados para esta especie se encuentra más o menos

limitado, con lo que en función de este hecho, habría que depender en mayor o menor medida de otros métodos de control.

Con todo ello, la investigación en el ámbito de la resistencia debería abarcar tres aspectos fundamentales: el desarrollo de ensayos rápidos y sencillos que permitan el estudio de los mecanismos de resistencia, la identificación de los mismos como responsables de la resistencia observada en las poblaciones, y el diseño de estrategias que permitan el control de las plagas en los cultivos al tiempo que eviten el desarrollo de la resistencia.



6. Conclusiones

6. Conclusiones

- 1) Las isoenzimas de esterasas que muestran R_f de 0,64, 0,66 y 0,69, y que se han denominado triplete A, son responsables de la resistencia desarrollada frente a los insecticidas acrinatrina (piretroide) y metiocarb (carbamato) por las poblaciones de campo de *Frankliniella occidentalis* aquí estudiadas.
- 2) En poblaciones de *F. occidentalis* sometidas a una elevada presión de selección (experimentos de reiteración o selección en laboratorio) y con un factor de resistencia (FR_{50}) superior a 8,7 para metiocarb y 14,6 para acrinatrina, las isoenzimas correspondientes al triplete A no se asocian con la resistencia observada, sugiriendo que dicho grupo de bandas solo constituye un mecanismo importante en el desarrollo inicial de la resistencia.
- 3) Los insectos de *F. occidentalis* que presentan el triplete A muestran, a su vez, una mayor actividad esterasa total frente al sustrato α -naftil acetato, lo que permite proponer la medida de dicha actividad como método de identificación de resistencia a acrinatrina y metiocarb en insectos individuales de *F. occidentalis*.
- 4) El grado de inhibición producido por el sinergista DEF (S,S,S-tributylfosforotritioato) sobre las esterasas, así como su mayor especificidad hacia el triplete A, indica la idoneidad de este compuesto como inhibidor de esterasas en *F. occidentalis*.

- 5) El tiempo transcurrido desde la aplicación del sinergista DEF a los insectos de *F. occidentalis*, es un factor limitante para la inhibición de la actividad esterasa frente al sustrato α -naftil acetato.
- 6) La caracterización de la actividad colinesterasa en extractos de las poblaciones de *F. occidentalis* aquí estudiadas, apoya la inexistencia de butirilcolinesterasas en esta especie.
- 7) El incremento de la actividad acetilcolinesterasa es un mecanismo de desarrollo de resistencia al organofosforado metamidofos, y posiblemente a los carbamatos formetanato y metiocarb, en la población de campo MELAU de *F. occidentalis*.
- 8) En la población MET de *F. occidentalis* seleccionada en el laboratorio con el insecticida metiocarb, la insensibilidad de la acetilcolinesterasa frente a los insecticidas metiocarb y metamidofos sugiere la presencia de una AChE modificada en esta población, lo cual explicaría la resistencia mostrada.



Bibliografía

Bibliografía

- Aldridge, W.N. (1953a). Serum esterases. 1. Types of esterase (A and B) hydrolysing para-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem J* **53**: 110-117.
- Aldridge, W.N. (1953b). Serum esterases. 2. An enzyme hydrolysing diethyl para-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochem J* **53**: 117-124.
- Anazawa, Y., Tomita, T., Aiki, Y., Kozaki, T. y Kono, Y. (2003). Sequence of a cDNA encoding acetylcholinesterase from susceptible and resistant two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Insect Biochem Mol Biol* **33**: 509-514.
- Andrews, M.C., Callaghan, A., Field, L.M., Williamson, M.S. y Moores, G.D. (2004). Identification of mutations conferring insecticide-insensitive AChE in the cotton-melon aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Insect Mol Biol* **13**: 555-561.
- Ashour, M.B., Gee, S.J. y Hammock, B.D. (1987). Use of a 96-well microplate reader for measuring routine enzyme activities. *Anal Biochem* **166**: 353-360.
- Asidi, A.N. y Curtis, C.F. (2001). Partial cross resistance to carbosulfan of pyrethroid resistant strains of *Anopheles*. *Insecticide Resistance in Malaria Vectors, Multilateral Initiative on Malaria Harare, Zimbabwe*.
- Barberá, C. (1989). *Pesticidas agrícolas*. Ed. Omega, Barcelona.
- B-Bernard, C. y Philogène, B.J.R. (1993). Insecticide synergists: role, importance and perspectives. *J Toxicol Environ Health* **38**: 199-223.
- Belda, J.E. y Rodríguez-Rodríguez, M.D. (1989). Control de trips (*Frankliniella occidentalis*) en cultivos hortícolas protegidos. *Phytoma España* **10**: 21-31.

- Bielza, P. y Contreras, J. (2005). La resistencia a insecticidas en *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Phytoma* **173**: 58-62.
- Bielza, P., Espinosa, P.J., Quinto, V., Abellán, J. y Contreras, J. (2007). Synergism studies with binary mixtures of pyrethroid, carbamate and organophosphate insecticides on *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Pest Manag Sci* **63**: 84-89.
- Bielza, P., Quinto, V., Fernández, E., Grávalos, C., Abellán, J. y Cifuentes, D. (2008). Inheritance of resistance to acrinathrin in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Pest Manag Sci* **64**: 584-588.
- Bingham, G., Gunning, R.V., Gorman, K., Field, L.M. y Moores, G.D. (2007). Temporal synergism by microencapsulation of piperonyl butoxide and α -cypermethrin overcomes insecticide resistance in crop pests. *Pest Manag Sci* **63**: 276-281.
- Bloomquist, J.R. (1993). Toxicology, mode of action and target site-mediated resistance to insecticides acting on chloride channels. *Comp Biochem Physiol C* **106**: 301-314.
- Bloomquist, J.R. (1996). Ion channels as targets for insecticides. *Ann Rev Entomol* **41**: 163-190.
- Bourguet, D., Raymond, M., Berrada, S. y Fournier, D. (1997). Interaction between acetylcholinesterase and choline acetyltransferase: an hypothesis to explain unusual toxicological responses. *Pestic Sci* **51**: 276-282.
- Bournier, J.P. (1983). A polyphagous insect: *Thrips palmi* Karny. Important cotton pest in Philippines. *Coton Et Fibres Tropicales* **38**: 286-288.
- Bournier, A. y Bournier, J.P. (1987). L'introduction en France d'un nouveau ravageur: *Frankliniella occidentalis*. *Phytoma, defense del cultures* **338**: 14-17.
- Brattsten, L.B. (1988). Potential role of plant allelochemicals in the development of insecticide resistance. En: *Novel aspects of insect-*

- plant interactions*. P. Barbosa y D.K. Le Tourneau (eds.). John Wiley and Sons, New York: 331–348.
- Brattsten, L.B., Holyoke, C.W.J., Leeper, J.R. y Raffa, K.F. (1986). Insecticide resistance: challenge to pest management and basic research. *Science* **231**: 1255-1260.
- Brestkin, A.P., Maizel, E.B., Moralev, S.N., Novozhilov, K.V. y Sazonova, I.N. (1985). Cholinesterases of aphids .1. Isolation, partial-purification and some properties of cholinesterases from spring grain aphid *Schizaphis graminum* (Rond). *Insect Biochem* **15**: 309-314.
- Brindley, W.A. y Selim, A.A. (1984). Synergism and antagonism in the analysis of insecticide resistance. *Environ Entomol* **13**: 348-353.
- Brodsgaard, H.F. (1994). Insecticide resistance in European and African strains of western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) tested in a new residue-on-glass test. *J Econ Entomol* **87**: 1141-1146.
- Brooke, B.D., Kloke, G., Hunt, R.H., Koekemoer, L.L., Temu, E.A., Taylor, M.E., Small, G., Hemingway, J. y Coetzee, M. (2001). Bioassay and biochemical analyses of insecticide resistance in southern African *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae). *Bull Entomol Res* **91**: 265-272.
- Bunyan, P.J. y Taylor, A. (1966). Esterase inhibition in pheasants poisoned by o,o-diethyl s-(ethylthiomethyl)-phosphorodithioate (Thimet). *J Agr Food Chem* **14**: 132-137.
- Busvine, J.R. (1951). Mechanism of resistance to insecticide in houseflies. *Nature* **168**: 193-195.
- Byrne, F.J. y Devonshire, A.L. (1991). *In vivo* inhibition of esterase and acetylcholinesterase activities by profenofos treatments in the tobacco whitefly *Bemisia tabaci* (Genn.): implications for routine biochemical monitoring of these enzymes. *Pestic Biochem Physiol* **40**: 198-204.

- Byrne, F.J. y Devonshire, A.L. (1993). Insensitive acetylcholinesterase and esterase polymorphism in susceptible and resistant populations of the tobacco whitefly *Bemisia tabaci* (Genn). *Pestic Biochem Physiol* **45**: 34-42.
- Byrne, F.J. y Devonshire, A.L. (1997). Kinetics of insensitive acetylcholinesterases in organophosphate-resistant tobacco whitefly, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae). *Pestic Biochem Physiol* **58**: 119-124.
- Campbell, P.M., Newcomb, R.D., Russell, R.J. y Oakeshott, J.G. (1998). Two different amino acid substitutions in the ali-esterase, E3, confer alternative types of organophosphorus insecticide resistance in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem Mol Biol* **28**: 139-150.
- Chang, C.K. y Jordan, T.W. (1983). Inhibition of permethrin-hydrolysing esterases from *Wiseana cervinata* larvae. *Pestic Biochem Physiol* **19**: 190-196.
- Charpentier, A., Menozzi, P., Marcel, V., Villatte, F. y Fournier, D. (2000). A method to estimate acetylcholinesterase-active sites and turnover in insects. *Anal Biochem* **285**: 76-81.
- Cochran, D.G. (1987). Selection for pyrethroid resistance in the german cockroach (Dictyoptera: Blatellidae). *J Econ Entomol* **80**: 1117-1121.
- Collar, J.L. (2005). Principales dificultades en el control de plagas: resultados de las encuestas por IRAC España (Insecticide Resistance Action Committee), 2002-04. *Phytoma* **173**: 39-42.
- Corbel, V., Raymond, M., Chandre, F., Darriet, F. y Hougard, J.M. (2004). Efficacy of insecticide mixtures against larvae of *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae) resistant to pyrethroids and carbamates. *Pest Manag Sci* **60**: 375-380.
- Corbett, J.R. (1974). *The biochemical mode of action of pesticides*. Academic Press, New York.

- Dauterman, W.C., Talens, A. y Vanasperen, K. (1962). Partial purification and properties of flyhead cholinesterase. *J Insect Physiol* **8**: 1-14.
- Davis, B.J. (1964). Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann NY Acad Sci* **121**: 404-427.
- Denholm, I., Cahill, M., Dennehy, T.J. y Horowitz, A.R. (1998). Challenges with managing insecticide resistance in agricultural pests, exemplified by the whitefly *Bemisia tabaci*. *Phil Trans R Soc Lon B* **353**: 1757-1767.
- Devonshire, A.L. (1989). The role of electrophoresis in the biochemical detection of insecticide resistance. En: *Electrophoretic studies on agricultural pests*. H.D. Loxdale y J.D. Hollander (eds.). Clarendon Press, Oxford **29**: 363-374.
- Devonshire, A.L. (1991). Role of esterases in resistance of insects to insecticides. *Biochem Soc Trans* **19**: 755-759.
- Devonshire, A.L. y Moores, G.D. (1982). A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). *Pestic Biochem Physiol* **18**: 235-246.
- Devonshire, A.L., Moores, G.D. y French-Constant, R.H. (1986). Detection of insecticide resistance by immunological estimation of carboxylesterases activity in *Myzus persicae* (Sulzer) and cross reaction of the antiserum with *Phorodon humuli* (Schrank) (Hemiptera: Aphididae). *Bull Entomol Res* **76**: 97-107.
- Devonshire, A.L., Field, L.M., Foster, S.P., Moores, G.D., Williamson, M.S. y Blackman, R.L. (1998). The evolution of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. *Phil Trans R Soc Lon B* **353**: 1677-1684.
- Devonshire, A.L., Heidari, R., Bell, K.L., Campbell, P.M., Campbell, B.E., Odgers, W.A., Oakeshott, J.G. y Russell, R.J. (2003). Kinetic efficiency of mutant carboxylesterases implicated in

- organophosphate insecticide resistance. *Pestic Biochem Physiol* **76**: 1-13.
- Doctor, B.P., Toker, L., Roth, E. y Silman, I. (1987). Microtiter assay for acetylcholinesterase. *Anal Biochem* **166**: 399-403.
- Dowd, P.F. y Sparkes, T.C. (1987). Inhibition of trans-permethrin hydrolysis in *Pseudopulusia includens* (Walker) and use of inhibitors as pyrethroid synergists. *Pestic Biochem Physiol* **27**: 237-242.
- Eldefrawi, A.T. (1985). Acetylcholinesterases and anticholinesterases. En: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. G.A. Kerkut y L.I. Gilbert (eds.). Pergamon Press, Oxford **12**: 115-130.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.J. y Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* **7**: 88-95.
- EPPO (2006) http://www.eppo.org/QUARANTINE/insects/Frankliniella_occidentalis/FRANOC_map.htm. Fecha de acceso: 23-10-2007.
- Espinosa, P.J., Bielza, P., Contreras, J. y Lacasa, A. (2002). Field and laboratory selection of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) for resistance to insecticides. *Pest Manag Sci* **58**: 920-927.
- Espinosa, P.J., Contreras, J., Quinto, V., Grávalos, C., Fernández, E. y Bielza, P. (2005). Metabolic mechanisms of insecticide resistance in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Pest Manag. Sci* **61**: 1009-1015.
- FAO (1970). Pest resistance to pesticide in agriculture. Importance, recognition and countermeasures. *Informe Reunión FAO*, Roma.
- FAO (1989). Guidelines for Legislation on the Control of Pesticides. Roma.
- Feyereisen, R. (1995). Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicol Lett* **82/83**: 83-90.
- Feyereisen, R. (1999). Insect P450 enzymes. *Ann Rev Entomol* **44**: 507-533.

- French-Constant, R.H. y Bonning, B.C. (1989). Rapid microtitre plate test distinguishes insecticide resistant acetylcholinesterase genotypes in the mosquitoes *Anopheles albimanus*, *An. nigerrimus* and *Culex pipiens*. *Med Vet Entomol* **3**: 9-16.
- French-Constant, R.H., Daborn, P.J. y Le Goff, G. (2004). The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends Genet* **20**: 163-170.
- Fournier, D. y Mutero, A. (1994). Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comp Biochem Physiol C* **108**: 19-31.
- Gao, J.R. y Zhu, K.Y. (2001). An acetylcholinesterase purified from the greenbug (*Schizaphis graminum*) with some unique enzymological and pharmacological characteristics. *Insect Biochem Mol Biol* **31**: 1095-1104.
- Gao, J.R., Rao, J.V., Wilde, G.E. y Zhu, K.Y. (1998). Purification and kinetic analysis of acetylcholinesterase from western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Arch Insect Biochem Physiol* **39**: 118-125.
- Georghiou, G.P. (1983). Management of resistance in arthropods. En: *Pest resistance to pesticides*. G.P. Georghiou y T. Saito (eds.). Plenum, New York: 769-792.
- Georghiou, G.P. (1990). Overview of insecticide resistance. En: *Managing resistance to agrochemicals from fundamental research to practical strategies*. M.B. Green, H.M., LeBaron y W.K. Moberg (eds.). American Chemical Society, Washington **421**: 18-41.
- Gnagey, A.L., Forte, M. y Rosenberry, T.L. (1987). Isolation and characterization of acetylcholinesterase from *Drosophila*. *J Biol Chem* **262**: 13290-13298.
- Grasselly, D., Caudal, Y.T. y Trapateau, M. (1991). Lutte chimique contre le thrips *Frankiniella occidentalis*. *Phytoma- La Défense des végétaux* **433**: 54-56.

- Guedes, R.N.C., Zhu, K.Y., Kambhampati, S. y Dover, B.A. (1997). An altered acetylcholinesterase conferring negative cross-insensitivity to different insecticidal inhibitors in organophosphate-resistant lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*. *Pestic Biochem Physiol* **58**: 55-62.
- Guedes, R.N.C., Zhu, K.Y., Kambhampati, S. y Douer, B.A. (1998). Characterization of acetylcholinesterase purified from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Comp Biochem Physiol C* **119**: 205-210.
- Guengerich, F.P. (1991). Reactions and significance of cytochrome-P-450 enzymes. *J Biol Chem* **266**: 10019-10022.
- Guilbault, G.G., Kuan, S.S. y Sadar, M.H. (1970). Purification and properties of cholinesterases from honey bees-*Apis mellifera* and boll weevils-*Anthonomus grandis*. *J Agr Food Chem* **18**: 692-697.
- Gunning, R.V., Moores, G.D. y Devonshire, A.L. (1996). Esterases and fenvalerate resistance in Australian *Helicoverpa armigera* (Hubner) Lepidoptera: Noctuidae. *Pestic Biochem Physiol* **54**: 12-23.
- Gunning, R.V., Moores, G.D. y Devonshire, A.L. (1997). Esterases and fenvalerate resistance in a field population of *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. *Pestic Biochem Physiol* **58**: 155-162.
- Gunning, R.V., Moores, G.D. y Devonshire, A.L. (1998). Inhibition of resistance-related esterases by piperonyl butoxide in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae). En: *Piperonyl butoxide - The insecticide synergist*. D.G. Jones (ed.). Academic Press, London: 215-226.
- Gunning, R.V., Moores, G.D. y Devonshire, A.L. (1999). Esterase inhibitors synergise the toxicity of pyrethroids in Australian *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pestic Biochem Physiol* **63**: 50-62.

- Hall, L.M. y Malcolm, C.A. (1991). The acetylcholinesterase gene of *Anopheles stephensi*. *Cell Mol Neurobiol* **11**: 131-141.
- Han, Z., Moores, G.D., Denholm, I. y Devonshire, A.L. (1998). Association between biochemical markers and insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* glover. *Pestic Biochem Physiol* **62**: 164-171.
- Harold, J.A. y Ottea, J.A. (1997). Toxicological significance of enzyme activities in profenofos-resistant tobacco budworms, *Heliothis virescens* (F.). *Pestic Biochem Physiol* **58**: 23-33.
- Harold, J.A. y Ottea, J.A. (2000). Characterization of esterases associated with profenofos resistance in the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (F.). *Arch Insect Biochem Physiol* **45**: 47-59.
- He, Y., Ma, E. y Zhu, K.Y. (2004). Characterizations of general esterases in relation to malathion susceptibility in two field populations of the oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Pestic Biochem Physiol* **78**: 103-113.
- Helyer, N.L. y Brobyn, P.J. (1992). Chemical control of western flower thrips (*Frankliniella occidentalis* Pergande). *Ann App Biol* **121**: 219-231.
- Hemingway, J., Callaghan, A. y Amin, A.M. (1990). Mechanisms of organophosphate and carbamate resistance in *Culex quinquefasciatus* from Saudi Arabia. *Med Vet Entomol* **4**: 275-282.
- Herron, G.A. y Gullick, G.C. (2001). Insecticide resistance in australian populations of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) causes the abandonment of pyrethroid chemicals for its control. *Gen App Entomol* **30**: 21-26.
- <http://europa.eu/scadplus/leg/es/lvb/l13002a.htm> (2007). Fecha de acceso: 24-10-2007.
- Hunter, C.D. (1997). Suppliers of beneficial organisms in North America. Department of Pesticide Regulation. Sacramento, CA, California Environmental Protection Agency. Monografía.

- IRAC (2006). Prevention and management of insecticide resistance in vectors and pests of public health importance. Monografía.
- IRAC (2007a). Resistance management for sustainable agriculture and improved public health. Monografía.
- IRAC (2007b). Clasificación del modo de acción de insecticidas y acaricidas. Monografía.
- Jacobson, R.J., 1997. Integrated pest management (IPM) in glasshouses. En: *Thrips as crop pests*. T. Lewis (ed.). CAB International, Wallingford: 639–666.
- Jakoby, W.B. y Habig, W.H. (1980). Glutathione transferases. En: *Enzymatic basis of detoxification*. W.B. Jacoby (ed.). Academic Press, New York **2**: 63-94.
- Jensen, S.E. (1998). Acetylcholinesterase activity associated with methiocarb resistance in a strain of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Pestic Biochem Physiol* **61**: 191-200.
- Jensen, S.E. (2000). Mechanisms associated with methiocarb resistance in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *J Econ Entomol* **93**: 464-471.
- Karnovsky, M.J. y Roots, L. (1964). A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. *J Histochem Cytochem* **12**: 219-221.
- Kennaugh, L., Pearce, D., Daly, J.C. y Hobbs, A.A. (1993). A piperonyl butoxide synergizable resistance to permethrin in *Helicoverpa armigera* which is not due to increased detoxification by cytochrome-P450. *Pestic Biochem Physiol* **45**: 234-241.
- Lacasa, A. (1990). Un trienio de *Frankliniella occidentalis* en España: evolución temporal y espacial de una plaga importada. *Phytoma España* **6**: 3-8.
- Lacasa, A. y Contreras, J. (1993). Comportamiento de *Frankliniella occidentalis* en la transmisión del virus del bronceado del tomate:

- planteamientos para su control en cultivos hortícolas. *Phytoma España* **50**: 33-39.
- Lacasa, A., Torres, J. y Martínez, M.C. (1991). La implicación de *Frankliniella occidentalis* en la diseminación del virus del bronceado del tomate (TSWV) en los cultivos murcianos. *Agrícola Vergel* **112**: 203-209.
- Lacasa, A., Torres, J. y Martínez, M.C. (1992). Ensayo de control químico de *Frankliniella occidentalis* en nectarinas tempranas. *Phytoma España* **37**: 35-41.
- Lacasa, A., Torres, J. y Martínez, M.C. (1993). *Frankliniella occidentalis* en los cultivos de nectarina de Murcia. Evolución de las poblaciones y comportamiento de variedades. *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas* **19**.
- Li, X., Schuler, M.A. y Berenbaum, M.R. (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Ann Rev Entomol* **52**: 231-253.
- Liu, N. y Yue, X. (2000). Insecticide resistance and cross-resistance in the house fly (Diptera: Muscidae). *J Econ Entomol* **93**: 1269-1275.
- Liu, W., Zhao, G. y Knowles, C.O. (1994). Substrate specificity and inhibitor sensitivity of cholinesterases in homogenates of western flower thrips. *Pestic Biochem Physiol* **49**: 121-131.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.
- Ma, E., He, Y. y Zhu, K.Y. (2004). Comparative studies of acetylcholinesterases purified from two field populations of the oriental migratory locust (*Locusta migratoria manilensis*): implications of insecticide resistance. *Pestic Biochem Physiol* **78**: 67-77.

- Manulis, S., Ishaaya, I. y Perry, A.S. (1981). Acetylcholinesterase of *Aphis citricola*. Properties and significance in determining toxicity of systemic organophosphorus and carbamate compounds. *Pestic Biochem Physiol* **15**: 267-274.
- Massoulie, J., Anselmet, A., Bon, S., Krejci, E., Legay, C., Morel, N. y Simon, S. (1999). The polymorphism of acetylcholinesterase: post-translational processing, quaternary associations and localization. *Chem Biol Interact* **119-120**: 29-42.
- Matsumura, F. (1985). *Toxicology of insecticides*. New York, Plenum.
- Maymó, A.C., Cervera, A., Sarabia, R., Martínez-Pardo, R. y Garcerá, M.D. (2002). Evaluation of metabolic detoxifying enzyme activities and insecticide resistance in *Frankliniella occidentalis*. *Pest Manag Sci* **58**: 928-934.
- Maymó, A.C., Cervera, A., Garcerá, M.D., Bielza, P. y Martínez-Pardo, R. (2006). Relationship between esterase activity and acrinathrin and methiocarb resistance in field populations of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Pest Manag Sci* **62**:1129-1137.
- Melander, A.L. (1914). Can insects become resistant to sprays? *J Econ Entomol* **7**: 167-173.
- Milani, R. y Travaglino, A. (1957). Ricerche genetiche sulla resistenza al DDT in *Musca domestica* concatenazione del gene kdr (knockdown-resistance) con due mutanti morfologici. *Rivista di Parassitologia* **18**: 199-202.
- Moritz, G. (1997). Structure, growth and development. En: *Thrips as crop pests*. T. Lewis (ed.). CAB International, Wallingford: 15-63.
- Mound, L.A. y Teulon, D.A.J. (1995). Thysanoptera as phytophagous opportunists. En: *Thrips biology and management*. B.L. Parker, M. Skinner y T. Lewis (eds.). Plenum Press, New York **276**: 3-20.

- Mullin, C.A. y Scott, J.G. (1992). Biomolecular basis for insecticide resistance. Classification and comparisons. *Acs Symposium Series* **505**: 1-13.
- Mutero, A., Pralavorio, M., Bride, J. y Fournier, D. (1994). Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 5922-5926.
- N'Guessan, R., Darriet, F., Guillet, P., Carnevale, P., Traore-Lamizana, M., Corbel, V., Koffi, A.A. y Chandre, F. (2003). Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae* from Ivory Coast, based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *Med Vet Entomol* **17**: 19-25.
- Nabeshima, T., Mori, A., Kozaki, T., Iwata, Y., Hidoh, O., Harada, S., Kasai, S., Severson, D.W., Kono, Y. y Tomita, T. (2004). An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. *Biochem Biophys Res Commun* **313**: 794-801.
- Newcomb, R.D., Campbell, P.M., Ollis, D.L., Cheah, E., Russell, R.J. y Oakeshott, J.G. (1997). A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to a organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 7464-7468.
- Novozhilov, K.V., Brestkin, A.P., Khovanskikh, A.E., Maizel, E.B., Moralev, S.N., Nikanorova, E.V. y Sazonova, I.N. (1989). Cholinesterases of aphids. 3. Sensitivity of acetylcholinesterases to several inhibitors as a possible phylogenetic character. *Insect Biochem* **19**: 15-18.
- Oakeshott, J.G., Claudianos, C., Campbell, P.M., Newcomb, R.D. y Russell, R.J. (2005a). Biochemical genetics and genomics of insect esterases. En: *Comprehensive Molecular Insect Science*. L.G.

- Gilbert, K. Iatrou y S.S. Gill (eds.). Elsevier Pergamon, Oxford **5**: 309-381.
- Oakeshott, J.G., Devonshire, A.L., Claudianos, C., Sutherland, T.D., Horne, I., Campbell, P.M., Ollis, D.L. y Russell, R.J. (2005b). Comparing the organophosphorus and carbamate insecticide resistance mutations in cholin- and carboxyl -esterases. *Chem Biol Interact* **157-158**: 269-275.
- OMS (1957). World Health Organization expert committee on insecticides. *Technical Report Series (7th Report)*. **125**.
- OMS (1990). Public health impact of pesticides used in agriculture. *Informe Reunión OMS*. Ginebra.
- Oppenoorth, F.J. (1985). Biochemistry and genetics of insecticide resistance. En: *Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology*. G.A. Kerkut y L.I. Gilbert (eds.). Pergamon Press, Oxford **12**: 731-773.
- Oppenoorth, F.J. y van Asperen, K. (1960). Allelic genes in the housefly producing modified enzymes that cause organophosphate resistance. *Science* **132**: 298-299.
- Oppenoorth, F.J., Smislaert, H.R., Welling, W., van der Pas, L.T.J. y Hitman, K.T. (1977). Insensitive acetylcholinesterase, high glutathione S-transferase, and hydrolytic activity as resistance factors in a tetrachlorvinphos-resistant strain of house fly. *Pestic Biochem Physiol* **7**: 34-37.
- Pai, H.H., Wu, S.C. y Hsu, E.L. (2005). Insecticide resistance in German cockroaches (*Blattella germanica*) from hospitals and households in Taiwan. *Int J Environ Health Res* **15**: 33-40.
- Parella, P.M. y T. Lewis, 1997. Integrated pest management (IPM) in field crops. En: *Thrips as Crop Pests* T. Lewis (ed.). CAB International, Wallingford: 599-614.

- Park, N.J. y Kamble, S.T. (1999). Distribution and inhibition of esterases in various body tissues of susceptible and resistant German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). *Ann Entomol Soc Amer* **92**: 556-562.
- Parker, B.L. y Skinner, M., (1997). Integrated pest management (IPM) in tree crops. En: *Thrips as crop pests*. T. Lewis (ed.). CAB International, Wallingford: 615–638.
- Parker, P.J.A.N. y Callaghan, A. (1997). Esterase activity and allele frequency in field populations of *Simulium equinum* (L.) (Diptera: Simuliidae) exposed to organophosphate pollution. *Environ Toxicol Chem* **16**: 2550-2555.
- Pasini, C., D'Aquila, F., Costanzi, M. y Pini, S. (1993). *Frankliniella sulla rosa*: l'efficacia di alcuni insetticidi. *Colture Protette* **4**: 83-85.
- Pickett, C.H., Wilson, L.T. y González, D. (1988). Population dynamics and within-plant distribution of the western flower thrips (Thysanoptera, Thripidae), an early-season predator of spider mites infesting cotton. *Environ Entomol* **17**: 551-559.
- Plapp, F.W. y Hoyer, R.F. (1968). Insecticide resistance in house fly. Decreased rate of absorption as mechanism of action of a gene that acts as an intensifier of resistance. *J Econ Entomol* **61**: 1298-1303.
- Price, N.R. (1991). Insect resistance to insecticides: mechanisms and diagnosis. *Comp Biochem Physiol C* **100**: 319-326.
- Race, S.R. (1961). Early-season thrips control on cotton in New Mexico. *J Econ Entomol* **54**: 974-976.
- Raffa, K.F. y Priester, T.M. (1985). Synergists as research tools and control agents in agriculture. *J Agr Entomol* **2**: 27-45.
- Riudavets, J. y Castañé, C. (1998). Identification and evaluation of native predators of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera : Thripidae) in the Mediterranean. *Environ Entomol* **27**: 86-93.

- Robb, K.L. (1989). Analysis of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) as a pest of floricultural crops in California greenhouse. Riverside, Universidad de California. Tesis Doctoral.
- Robb, K.L., y Parrella, M.P. (1995). IPM of western flower thrips. En: *Thrips Biology and Management*. B.L. Parker, M. Skinner y T. Lewis (eds.). Plenum, New York: 365-370.
- Robb, K.L., Newman, J.P. y Parrella, M.P. (1988). The biology and control of western flower thrips. *Ohio Florist's Assoc Bull* **699**: 2-5.
- Rooker, S., Guillemaud, T., Berge, J., Pasteur, N. y Raymond, M. (1996). Coamplification of esterase A and B genes as a single unit in *Culex pipiens* mosquitoes. *Heredity* **77**: 555-561.
- Rose, R.L., Barbhuiya, L., Roe, R.M., Rock, G.C. y Hodgson, E. (1995). Cytochrome P450-associated insecticide resistance and the development of biochemical diagnostic assays in *Heliothis virescens*. *Pestic Biochem Physiol* **51**: 178-191.
- Rosenberry, T.L. (1975a). Catalysis by acetylcholinesterase: evidence that the rate-limiting step for acylation with certain substrates precedes general acid-base catalysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 3834-3838.
- Rosenberry, T.L. (1975b). Acetylcholinesterase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **43**: 103-218.
- Rossiter, L.C., Gunning, R.V. y Rose, H.A. (2001). The use of polyacrylamide gel electrophoresis for the investigation and detection of fenitrothion and chlorpyrifos-methyl resistance in *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae). *Pestic Biochem Physiol* **69**: 27-34.
- Roush, R.T. y McKenzie, J.A. (1987). Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Ann Rev Entomol* **32**: 361-380.
- Russell, R.J., Claudianos, C., Campbell, P.M., Horne, I., Sutherland, T.D. y Oakeshott, J.G. (2004). Two major classes of target site insensitivity

- mutations confer resistance to organophosphate and carbamate insecticides. *Pestic Biochem Physiol* **79**: 84-93.
- Sabelis, M.W. y van Rijn, P.C.J. (1997). Predation by insects and mites. En: *Thrips as Crop Pests*. T. Lewis (ed.). CAB-International, Wallingford: 259-354.
- Sabourault, C., Guzov, V.M., Koener, J.F., Claudianos, C., Plapp, F.W., Jr. y Feyereisen, R. (2001). Overproduction of a P450 that metabolizes diazinon is linked to a loss-of-function in the chromosome 2 ali-esterase (*MdaE7*) gene in resistant house flies. *Insect Mol Biol* **10**: 609-618.
- Sakimura, K. (1961a). Field observations on thrips vector species of *tomato spotted wilt virus* in San Pablo Area, California. *Plant Dis Rep* **45**: 772-776.
- Sakimura, K. (1961b). Techniques for handling thrips in transmission experiments with *tomato spotted wilt virus*. *Plant Dis Rep* **45**: 766-771.
- Sakimura, K. (1963). *Frankliniella Fusca*, an additional vector for *tomato spotted wilt virus*, with notes on *Thrips tabaci*, another vector. *Phytopathology* **53**: 412-415.
- Sánchez-Arroyo, H., Koehler, P.G. y Valles, S.M. (2001). Effects of the synergists piperonyl butoxide and S,S,S-tributyl phosphorotrithioate on propoxur pharmacokinetics in *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae). *J Econ Entomol* **94**: 1209-1216.
- Sayyed, A., Attique, M.N.R., Khaliq, A. y Wright, D.J. (2005). Inheritance of resistance and cross-resistance to deltamethrin in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from Pakistan. *Pest Mang Sci* **61**: 636-642.
- Scharf, M.E., Hemingway, J., Small, G.J. y Bennett, G.W. (1997). Examination of esterases from insecticide resistant and susceptible strains of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Insect Biochem Mol Biol* **27**: 489-497.

- Scharf, M.E., Meinke, L.J., Siegfried, B.D., Wright, R.J. y Chandler, L.D. (1999). Carbaryl susceptibility, diagnostic concentration determination and synergism for US populations of western corn rootworm (Coleoptera : Chrysomelidae). *J Econ Entomol* **92**: 33-39.
- Schuler, T.H., Martínez-Torres, D., Thompson, A.J., Denholm, I., Devonshire, A.L., Duce, I.R. y Williamson, M.S. (1998). Toxicological, electrophysiological and molecular characterisation of knockdown resistance to pyrethroid insecticides in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Pestic Biochem Physiol* **59**: 169-182.
- Scott, J.G., Cochran, D.G. y Siegfried, B.D. (1990). Insecticide toxicity, synergism and resistance in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J Econ Entomol* **83**: 1698-1703.
- Siegfried, B.D., Scott, J.G., Roush, R.T. y Zeichner, B.C. (1990). Biochemistry and genetics of chlorpyrifos resistance in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Pestic Biochem Physiol* **38**: 110-121.
- Small, G.J. y Hemingway, J. (2000). Molecular characterization of the amplified carboxylesterase gene associated with organophosphorus insecticide resistance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Mol Biol* **9**: 647-653.
- Soderlund, D.M. (1997). Molecular mechanisms of insecticide resistance. En: *Molecular Mechanism of Resistance to Agrochemicals (Chemistry of Plant Protection)*. V. Sjut (ed.). Springer-Verlag, Heidelberg **13**: 21-56.
- Soderlund, D. y Bloomquist, J.R. (1990). Molecular mechanisms of insecticide resistance. En: *Pesticide resistance in arthropods*. R.T. Roush y B.E. Tabashnik (eds.). Chapman & Hall, New York: 58-96.
- Sparks, T.C., Lockwood, J.A., Byford, R.L., Graves, J.B. y Leonard, B.R. (1989). The role of behavior in insecticide resistance. *Pestic Sci* **26**: 383-399.

- Srinivas, R., Udikeri, S.S., Jayalakshmi, S.K. y Sreeramulu, K. (2004). Identification of factors responsible for insecticide resistance in *Helicoverpa armigera*. *Comp Biochem Physiol C* **137**: 261-269.
- Szczepanski, C. (1990). Today's research for tomorrow's markets or: how to hit a moving target. En: *Recent Advances in the Chemistry of Insect Control II*. L. Crombie (ed.). Royal Society of Chemistry, Cambridge: 1-16.
- Tommasini, M.G. y Maini, S. (1995). *Frankliniella occidentalis* and other thrips harmful to vegetal and ornamental crops in Europe. En: *Biological Control of Thrips Pests*. A.J. Loomans, J.C. van Lenteren, M.G. Tommasini, S. Maini y J. Riudavets (eds.). Wageningen Agricultural University papers, Wageningen: 1-42.
- Toutant, J.P. (1989). Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. *Prog Neurobiol* **32**: 423-446.
- Valles, S.M., Koehler, P.G. y Brenner, R.J. (1997). Antagonism of fipronil toxicity by piperonyl butoxide and S,S,S-tributyl phosphorotrithioate in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J Econ Entomol* **90**: 1254-1258.
- Valles, S.M., Oi, F.M. y Strong, C.A. (2001). Purification and characterization of trans-permethrin metabolizing microsomal esterases from workers of the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Kollar). *Insect Biochem Mol Biol* **31**: 715-725.
- Vaughan, A. y Hemingway, J. (1995). Mosquito carboxylesterase Est α 2¹ (A₂). Cloning and sequence of the full-length cDNA for a major insecticide resistance gene worldwide in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *J Biol Chem* **270**: 17044-17049.
- Wachs, H. (1947). Synergistic insecticides. *Science* **105**: 530-531.
- Wagner, R.P. y Selander, R.K. (1974). Isoenzymes in insects and their significance. *Ann Rev of Entomol* **19**: 117-138.

- Walsh, S.B., Dolden, T.A., Moores, G.D., Kristensen, M., Lewis, T., Devonshire, A.L. y Williamson, M.S. (2001). Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *Biochem J* **359**: 175-181.
- Ware, G. y Whitacre, D. (2004). *The pesticide book*. MeisterPro, USA.
- Weill, M., Fort, P., Berthomieu, A., Dubois, M.P., Pasteur, N. y Raymond, M. (2002). A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila*. *Proc Biol Sci* **269**: 2007-2016.
- Wheelock, C.E., Shan, G. y Ottea, J. (2005). Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. *J Pestic Sci* **30**: 75-83.
- Wilkinson, C.F. (1983). Role of mixed-function oxidases in insecticide resistance. En: *Pest resistance to pesticides*. G.P. Georghiou y T. Saito (eds.). Plenum Press, New York: 175-206.
- Xu, G. y Bull, D.L. (1994). Acetylcholinesterase from the horn fly (Diptera, Muscidae). 2. Biochemical and molecular-properties. *Arch Insect Biochem Physiol* **27**: 109-121.
- Young, S.J., Gunning, R.V. y Moores, G.D. (2005). The effect of piperonyl butoxide on pyrethroid-resistance-associated esterases in *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag Sci* **61**: 397-401.
- Young, S.J., Gunning, R.V. y Moores, G.D. (2006). Effect of pretreatment with piperonyl butoxide on pyrethroid efficacy against insecticide-resistant *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera:Noctuidae) and *Bemisia tabaci* (Sternorrhyncha:Aleyrodidae). *Pest Manag Sci* **62**: 114-119.
- Zahavi, M., Tahori, A.S. y Klimer, F. (1972). An acetylcholinesterase sensitive to sulfhydryl inhibitors. *Biochim Biophys Acta* **276**: 577-583.

- Zhao, G., Liu, W. y Knowles, C.O. (1994). Mechanisms associated with diazinon resistance in western flower thrips. *Pestic Biochem Physiol* **49**: 13-23.
- Zhao, G., Liu, W. y Knowles, C.O. (1995a). Mechanisms conferring resistance of western flower thrips to bendiocarb. *Pestic Sci* **44**: 293-297.
- Zhao, G., Liu, W., Brown, J.M. y Knowles, O. (1995b). Insecticide resistance in field and laboratory strains of western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae). *J Econ Entomol* **88**: 1164-1170.
- Zhou, X., Scharf, M.E., Parimi, S., Meinke, L.J., Wright, R.J., Chandler, L.D. y Siegfried, B.D. (2002). Diagnostic assays based on esterase-mediated resistance mechanisms in western corn rootworms (Coleoptera: Chrysomelidae). *J Econ Entomol* **95**: 1261-1266.
- Zhou, X., Scharf, M.E., Sarath, G., Meinke, L.J., Chandler, L.D. y Siegfried, B.D. (2004). Partial purification and characterization of a methylparathion resistance-associated general esterase in *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Pestic Biochem Physiol* **78**: 114-125.
- Zhu, K.Y. y Brindley, W.A. (1992a). Enzymological and inhibitory properties of acetylcholinesterase purified from *Lygus hesperus* Knight (Hemiptera, Miridae). *Insect Biochem Mol Biol* **22**: 245-251.
- Zhu, K.Y. y Brindley, W.A. (1992b). Molecular-properties of acetylcholinesterase purified from *Lygus hesperus* Knight (Hemiptera, Miridae). *Insect Biochem Mol Biol* **22**: 253-260.
- Zhu, K.Y. y Clark, J.M. (1994). Purification and characterization of acetylcholinesterase from the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Biochem Mol Biol* **24**: 453-461.
- Zhu, K.Y. y Clark, J.M. (1995). Cloning and sequencing of a cDNA encoding acetylcholinesterase in Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Biochem Mol Biol* **25**: 1129-1138.

- Zhu, K.Y. y Gao, J.R. (1999). Increased activity associated with reduced sensitivity of acetylcholinesterase in organophosphate-resistant greenbug, *Schizaphis graminum* (Homoptera : Aphididae). *Pestic Sci* **55**: 11-17.
- Zhu, K.Y., Brindley, W.A. y Hsiao, T.H. (1991). Isolation and partial-purification of acetylcholinesterase from *Lygus hesperus* (Hemiptera, Miridae). *J Econ Entomol* **84**: 790-794.
- Zhu, K.Y., Lee, S.H. y Clark, J.M. (1996). A point mutation of acetylcholinesterase associated with azinphosmethyl resistance and reduced fitness in Colorado potato beetle. *Pestic Biochem Physiol* **55**: 100-108.
- Zhu, Y.C., Dowdy, A.K. y Baker, J.E. (1999). Detection of single-base substitution in an esterase gene and its linkage to malathion resistance in the parasitoid *Anisopteromalus calandrae* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Pestic Sci* **55**: 398-404.
- Zlotkin, E. (1999). The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. *Ann Rev Entomol* **44**: 429-455.
- Zubay, G. (1983). *Biochemistry*, Addison-Wesley publishing, Massachusetts.