

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL Y
ANTROPOLOGÍA FÍSICA

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE
RESISTENCIA FRENTE A INSECTICIDAS EN DOS
INSECTOS PLAGA: *BLATTELLA GERMANICA* (L.) Y
FRANKLINIELLA OCCIDENTALIS (PERGANDE)

ANA CRISTINA MAYMÓ HERNANDO

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 14 de
Desembre de 2007 davant un tribunal format per:

- D. Rafael Martínez Pardo
- D. Félix Ortego Alonso
- D^a. M^a Jesús Verdú Gallardo
- D. Jaime Primo Lillo
- D. Juan Ferré Manzanero

Va ser dirigida per:

D^a. M^a Dolores Garcerá Zamorano
D. Miguel Roca Arbós

©Copyright: Servei de Publicacions
Ana Cristina Maymó Hernando

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-7073-5

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



VNIVERSITATID VALÈNCIA

Facultat de Ciències Biològiques

Departament de Biologia Funcional i Antropologia Física

***E*STUDIO DE LOS MECANISMOS DE
RESISTENCIA FRENTE A INSECTICIDAS EN DOS
INSECTOS PLAGA: *Blattella germanica* (L.) Y
Frankliniella occidentalis (*Pergande*).**

Ana Cristina Maymó Hernando

Burjassot, Valencia

2007

Tesis presentada por **Ana Cristina Maymó Hernando** para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la Universitat de València

Fdo. Ana Cristina Maymó Hernando

Tesis dirigida por:

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

Miguel Roca Arbós, Doctor Ingeniero Agrónomo

Fdo. M^a Dolores Garcerá Zamorano

Miguel Roca Arbós

La investigación presentada en esta Tesis se realizó en la Unidad de Fisiología Animal del Departamento de Biología Animal (en la actualidad Biología Funcional y Antropología Física) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València, y en la empresa Argos Schering Agrevo, S.A. (en la actualidad Bayer CropScience, S.A.), gracias al disfrute de una Beca de Intercambio de personal entre Industrias y Centros Públicos de Investigación del Ministerio de Educación y Cultura.

*A mis padres
A mi hermana
A los cuentos y quienes los cuentan*

*“..La misma noche que hace blanquear los mismos árboles.
Nosotros, los de entonces, ya no somos los mismos...”*

Puedo escribir los versos....

Pablo Neruda

AGRADECIMIENTOS

A todos aquellos que han participado y contribuido en mayor o menor medida en la realización de este trabajo quería expresarles mi más sincero agradecimiento.

Diez años (porque así, sin proponérmelo han pasado ya ¡diez años!) dan para mucho. De hecho han pasado tantas cosas, tantos kilómetros, y tantas personas que no se ni por dónde empezar. Pero, ¡por fin! he llegado al final del camino. Y eso sí que hay que celebrarlo y agradecerlo. Así que voy a ello.

En primer lugar y por encima de todo, quiero agradecer a esta tesis, a ella (que para mí ya tiene entidad propia), el haberme dado la oportunidad de aprender. Y de APRENDERME. De saberme capaz, de creerme. Y eso no es poca cosa.

Claro que en este viaje me habéis acompañado unos cuantos. Mis directores de tesis, mis compañer@s de laboratorio y todos cuantos han formado y forman el Departamento de Biología Funcional i Antropología Física (antiguo Departamento de Biología Animal), becarios, estudiantes colaboradores, profesores y personal técnico y de administración. Mis padres y mi hermana, mi familia!!. Tod@s mis amig@s, a los que están, a los que estuvieron y siguen estando, y a los que siguieron otros caminos.

También quisiera agradecer a la empresa Bayer CropScience su apoyo, sin el cual no habría sido posible la realización de esta tesis.

A los Profesores Castañeda y López-Barea bajo cuya dirección realicé sendas estancias en sus laboratorios.

Así como al Dr. Lee de la Universidad Sains Malaysia de Malasia, Dr. Jensen del Danish Institute of Agricultural Sciences de Dinamarca, Dr. Michael Scharf de la Universidad de Florida de los Estados Unidos, la Dra. Ross del Virginia Polytechnic Institute and State University de los Estados Unidos y, todo el equipo del Departamento de Producción Vegetal de la

Universidad Politécnica de Cartagena, quienes me proporcionaron el asesoramiento técnico y los animales necesarios para llevar a cabo todo este proyecto.

Y por último, a mi Gigi, mi coche, mi otra casa.

A tod@s GRACIAS.

ÍNDICE

1. Prólogo	1
1-1. <i>Delimitación y planteamiento del problema</i>	3
1-2. <i>Objetivos</i>	7
1-3. <i>Plan de trabajo</i>	7
1-4. <i>Estructura de la Tesis</i>	8
2. Revisión Bibliográfica	9
2-1. <i>Antecedentes y estado actual del tema</i>	11
2-1.1. <i>Definición de resistencia</i>	12
2-1.2. <i>Tipos de resistencia</i>	13
2-1.2.1. <i>Resistencia por comportamiento</i>	13
2-1.2.2. <i>Resistencia a la penetración</i>	14
2-1.2.3. <i>Resistencia metabólica</i>	14
2-1.2.4. <i>Resistencia por modificación de la diana</i>	21
2-2. <i>Blattella germanica y la resistencia a los insecticidas</i>	23
2-2.1. <i>Blattella germanica como plaga</i>	23
2-2.2. <i>El control químico y la resistencia a los insecticidas</i>	25
2-2.3. <i>Mecanismos relacionados con la resistencia a insecticidas y Blattella germanica</i>	27
2-3. <i>Frankliniella occidentalis y la resistencia a los insecticidas</i>	30
2-3.1. <i>Frankliniella occidentalis</i>	30
2-3.2. <i>Frankliniella occidentalis en España</i>	31
2-3.3. <i>La resistencia en el trips de las flores</i>	32
2-4. <i>Bibliografía</i>	33
3. Procedimientos y Técnicas Experimentales	49
3-1. <i>Ensayos originales: condiciones de reacción</i>	52
3-1.1. <i>Actividad glutatión S-transferasa (GST)</i>	53
3-1.2. <i>Actividad esterasa (CaE)</i>	55
3-1.3. <i>Actividad 7-etoxirresorrufina-O-desetilasa (EROD)</i>	57
3-2. <i>Adaptación de los ensayos a las especies de interés</i>	58
3-2.1. <i>Preparación de las muestras</i>	58
3-2.2. <i>Optimización de los ensayos</i>	59
3-2.2.1. <i>Blattella germanica</i>	60

3-2.2.1.1. Ensayo de la actividad GST frente al CDNB.	61
3-2.2.1.2. Ensayo de la actividad GST frente al DCNB.	69
3-2.2.1.3. Ensayo de la actividad esterasa frente al p-NPA.....	73
3-2.2.1.4. Resumen de las condiciones finales.	78
3-2.2.2. Frankliniella occidentalis.....	79
3-2.2.2.1. Ensayo de la actividad esterasa frente al α -NA.....	80
3-2.2.2.2. Ensayo de la actividad esterasa frente al p-NPA.....	84
3-2.2.2.3. Resumen de las condiciones finales.	87
3-3. Bibliografía.....	87
4. Estudio de la resistencia en una población de campo de Blattella germanica.....	91
4-1. Material y Métodos.	96
4-1.1. Insectos. Recolección y cría.	96
4-1.2. Caracterización de la resistencia al insecticida deltametrina en la población R de B. germanica.	97
4-1.2.1. Detección de la resistencia.	97
4-1.2.2. Estudios con sinergistas	98
4-1.2.3. Ensayos enzimáticos.	99
4-1.2.3.1. Preparación de las muestras.	99
4-1.2.3.2. Cuantificación de las actividades enzimáticas.	99
4-1.3. Poblaciones híbridas de B. germanica sometidas a presión de selección con el piretroide deltametrina.	101
4-1.3.1. Establecimiento de las poblaciones híbridas.	101
4-1.3.2. Selección con deltametrina.	102
4-1.4. Análisis estadístico.	103
4-1.4.1. Ensayos toxicológicos.	103
4-1.4.2. Ensayos bioquímicos.	105
4-2. Resultados.....	105
4-2.1. Caracterización de la resistencia al insecticida deltametrina en la población R de B. germanica.....	105
4-2.1.1. Detección de la resistencia.....	105
4-2.1.2. Ensayos con los compuestos sinérgicos PBO y DEF.....	109

4-2.1.3. Ensayos bioquímicos.....	111
4-2.2. Respuesta a la presión de selección.....	114
4-3. Discusión..	122
4-4. Bibliografía.....	126
5. Frankliniella occidentalis y la resistencia a insecticidas	135
5-1. Material y Métodos.	138
5-1.1. Insectos.	138
5-1.2. Preparación de las muestras. Determinación de las actividades enzimáticas y de la cantidad de proteína.....	139
5-1.2.1. Preparación de las muestras.	139
5-1.2.2. Medida de la actividad CaE.....	139
5-1.3. Análisis estadístico.	141
5-2. Resultados.	142
5-2.1. Actividades enzimáticas.....	142
5-2.1.1. Análisis de los valores promedio.....	142
5-2.1.2. Análisis de la variabilidad de las observaciones alrededor del promedio: dispersión y forma de la distribución de frecuencias.....	147
5-2.2. Correlación entre las actividades enzimáticas y los datos toxicológicos.....	151
5-3. Discusión.	152
5-4. Bibliografía.	154
6. Discusión general.....	157
6-1. La resistencia y sus mecanismos: el caso de los piretroides.	161
6-2. Bibliografía.	164
7. Conclusiones	167

ABREVIATURAS

α -NA: α -naftil acetato.
 β -NA: β -naftil acetato.
AChE: acetilcolinesterasa.
ACR: acrinatrina.
BSA: albúmina de suero bovino.
Bt: Bacillus thuringiensis.
CaE: carboxilesterasa.
CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenceno.
CL₅₀: concentración letal 50.
CV: coeficiente de variación.
DCNB: 1,2-dicloro-4-nitrobenceno.
DDT: dicloro-difenil-tricloroetano.
DEF: isobutil tritioato.
DEL: deltametrina.
DL₅₀: dosis letal 50.
DMSO: dimetil sulfóxido.
DTT: ditioneitol.
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.
END: endosulfán.
EROD: 7-etosirresorrufina-O-desetilasa.
FBB: ortodiansidina bis diazotizada.
FR₁: factor de resistencia 1.
FR₂: factor de resistencia 2.
FS: factor de sinergismo.
GABA: ácido γ -amino butírico.
GBC: 2-metil-4-([2-metilfenil]azo)benzenodiazonio).
GSH: glutatión.
GST: glutatión-S-transferasa.
HJ: hormona juvenil.
HR: humedad relativa.
IGRs: reguladores del crecimiento de insectos.
IRAC: Insecticide Resistance Action Committee.
Kdr: resistencia a la parálisis.
K_m: constante de Michaelis-Menten.
L:O: luz:oscuridad.

LC: límites de confianza al 95%.
M100: fracción microsomal 100.000 g.
MET: metiocarb.
MTH: metamidofos.
NADPH: nicotiamida-adenina dinucleotido fosfato
OMS: Organización Mundial de la Salud.
OPs: organofosforados.
P450: monooxigenasas dependientes de P450.
PBO: butóxido de piperonilo.
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
p-NPA: p-nitrofenil acetato.
S100: fracción soluble 100.000 g.
SDS: dodecil sulfato sódico.
TK₅₀: tiempo knock down 50.
TK₉₀: tiempo knock down 90.
TSWV: virus del bronceado del tomate.
UI: unidad internacional.
V_{max}: máxima velocidad de la actividad enzimática.
Vp: volumen en el pocillo.
WFT: trips de las flores.

Prólogo

En el marco del proyecto de colaboración acordado entre la Unitat de Fisiologia Animal (Departament de Biologia Animal, en la actualidad Biologia Funcional i Antropologia Física de la Universitat de València) y la empresa Argos Schering AgrEvo S.A. (actualmente Bayer CropScience España, S.A.), se propone abordar el estudio de la resistencia a los insecticidas en plagas de insectos. Esta es una cuestión de gran interés tanto para la empresa, por el elevado impacto económico que suponen los fenómenos de resistencia en el campo y el compromiso en cuanto a la vida útil de los productos registrados, como para el grupo de investigación de la Universitat de València. Se abre así una nueva vía de trabajo dentro del grupo “Fisiología Comparada de la resistencia a xenobióticos”, cuya línea básica de investigación se centra en los mecanismos fisiológicos empleados por los animales para hacer frente a sustancias extrañas (xenobióticos). Con este fin se solicita y concede una beca de Intercambio de personal entre Industrias y Centros Públicos de Investigación para la realización de la presente Tesis Doctoral.

1-1. Delimitación y planteamiento del problema

Las tendencias actuales dentro del campo de la protección de cultivos se centran, en la mayoría de los países, en la implantación de la denominada *Protección Integrada*¹. Este término recoge el uso conjunto de todos los métodos de control disponibles, dentro del marco de la *Producción Integrada*². Dicho tipo de producción contempla no sólo la lucha contra plagas, sino todo el conjunto de las técnicas de producción (abonado, riego, poda, labores de cultivo, recolección, actuaciones postrecolección, etc.), y pretende optimizar el aspecto exterior del producto así como las características organolépticas, contenido vitamínico, residuos, etc. de la cosecha, a través de una

¹Término descrito por la FAO en 1965 y cuya definición más reciente aparece en la Directiva 91/414/CEE del Consejo, de 15 de julio de 1991, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios DO L 230 de 19.8.1991, p. 1/32.

²Término desarrollado por Investigadores de la Organización Internacional de Lucha Biológica e Integrada contra los Animales y las Plantas Nocivas (OILB), en 1977.

agricultura lo más respetuosa posible con el medio ambiente en todos sus aspectos.

El control de las plagas agrícolas mediante productos químicos ha sido hasta ahora la elección dominante, pero su abusiva utilización, aumentando dosis innecesariamente o mezclando productos sin ninguna racionalidad, ha tenido y tiene efectos perjudiciales. Estas consecuencias se observan en los presupuestos agrícolas, con el aumento de los costes de la protección fitosanitaria, en la aparición de fenómenos de resistencias y de nuevas plagas, o en la intensificación del ataque de plagas existentes, como consecuencia de la eliminación sistemática de sus enemigos naturales que las mantenían a niveles tolerables. También se advierten secuelas en la salud humana, el medio ambiente y el comercio internacional, por la presencia de residuos en los frutos, aspecto que preocupa ampliamente al consumidor y al mercado (apartado 14.74, Agenda 21³).

Sin embargo y a pesar de todo lo expuesto, los productos fitosanitarios continúan siendo herramientas imprescindibles para la producción agrícola, ya que, sin su uso, los daños potenciales de las diferentes clases de plagas determinarían la inviabilidad de muchos cultivos en las zonas de producción de mayor interés económico.

En la actualidad se cuenta con una gran cantidad de compuestos insecticidas y otros plaguicidas con características toxicológicas, físicas y químicas muy diversas. Miles de nuevos productos son investigados anualmente en búsqueda de propiedades plaguicidas, y algunos de ellos llegan a incorporarse al mercado después de muchos años de experimentación. En este sentido, el Registro único europeo de productos fitosanitarios (Directiva 91/414/CE, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios) exige unos requisitos cada vez más estrictos en cuanto a selectividad e impacto ambiental de estos compuestos. Ello restringe el uso de insecticidas tradicionales y obliga a investigaciones precisas para la búsqueda de otros plaguicidas más específicos o cuya aplicación sea selectiva. Así, en el proceso de revisión de sustancias activas, aquellas que no han sido incluidas (a 25 de Junio de 2007) en el anexo 1 de la citada Directiva, se han retirado del mercado (216) o están en fase de retirada (23), bien por no haber sido defendidas por las casas

³Programa 21. Desarrollado dentro de la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y Desarrollo (UNCED) celebrada en Río de Janeiro en 1992. También denominada "Cumbre de la Tierra".

comerciales, o bien por no haber superado los criterios que marca la Directiva 91/414/CE.

El proceso de revisión ha supuesto la retirada de muchas sustancias activas, lo que ha afectado a un número importante de productos comerciales y, aunque muchos de los compuestos eliminados tienen sustitutos, la reducción del catálogo puede crear problemas para la lucha contra determinadas plagas, especialmente en los cultivos de las zonas mediterráneas⁴.

Esto es especialmente preocupante en el caso del trips de las flores, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), plaga de gran importancia agrícola en las regiones del sudeste español, y para la que sólo hay registradas 3 materias activas: Fenitrotión 40%[CS] P/V[®], *Beauveria bassiana* 2,3% (2,3x10E9 ESP VIAB/ML) [SC] P/V[®] y Spinosad 48% [SC] P/V[®], esta última con autorización provisional y pendientes de revisión las dos primeras (Registro de Productos Fitosanitarios, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación⁵). A esto hay que añadir que el número de materias activas y formulados que se muestran efectivos en la detención de esta plaga es bastante reducido, y que la cifra de casos de fracasos con productos inicialmente eficaces es cada vez mayor, debido a la gran progresión de los fenómenos de resistencia en esta especie. Por esto, en la actualidad existen grandes dificultades para contener esta plaga en muchos de los cultivos de las comarcas hortícolas del sudeste peninsular, hecho que compromete la viabilidad de las producciones y convierte en preocupante el aumento en el consumo de plaguicidas.

A pesar de todo lo expuesto, al inicio de los trabajos de la presente Tesis los estudios en nuestro país sobre la resistencia a insecticidas en el trips de las flores eran escasos, y centrados en documentar la existencia de resistencia; o, de forma más general, en confirmar si los fallos en su control se debían a la existencia de resistencia, no habiéndose descrito en ningún caso cuáles eran las bases bioquímicas de la misma. Dado que a partir de este conocimiento se pueden establecer las bases para un control adecuado de *Frankliniella occidentalis*, iniciamos a partir de aquí las investigaciones encaminadas a dilucidar la naturaleza de la resistencia en poblaciones de esta especie, a diversas clases de insecticidas. Ello constituye uno de los grandes bloques que conforman la presente Tesis.

⁴<http://www.gencat.net/darp/e/camp/fitprod/efipro05.htm>

⁵<http://www.mapa.es/es/agricultura/pags/fitos/fitos.asp> [accedido 3 enero 2007]

En este sentido, el otro gran bloque de investigación lo integran los estudios sobre la resistencia a insecticidas en la cucaracha Blattella germanica (L.). Esta plaga urbana tiene primordial importancia desde el punto de vista de la salud pública, pues opera como vector natural en las casas, acarreado gérmenes patógenos que logran perdurar viables en sus heces, tubo digestivo e integumento durante varios días o semanas. En la actualidad se conocen alrededor de 45 patógenos que pueden transmitir estas cucarachas de manera mecánica, principalmente bacterias, hongos protozoarios, helmintos y virus.

Sin embargo, las resistencias que ofrecen estos insectos al tratamiento con plaguicidas dificulta en extremo su control. A esto hay que añadir que el nuevo marco normativo que plantea la Directiva de Biocidas (BDP), por la que se regula el proceso de autorización de productos biocidas a nivel comunitario, supondrá una disminución en el número de materias activas homologadas. Por todo ello, y dadas las características de los ambientes urbanos en los que se produce una convivencia casi permanente entre el ser humano y estas especies animales, la adopción de un programa de lucha racional que permita reducir o eliminar la incidencia de esta plaga resulta imprescindible.

Una de las dificultades con las que se encuentran este tipo de programas es que, a menudo, resulta complicado precisar cuál es el nivel máximo tolerado de cada especie plaga en un lugar determinado, ya que, a diferencia de las plagas agrícolas, no sólo hay que tener en cuenta criterios económicos, sino también otros factores como la salud de personas y animales, o incluso criterios estéticos que varían por completo dependiendo de cada situación. Además, estos niveles de tolerancia son totalmente variables según los lugares o las situaciones concretas; por ejemplo, la presencia de cucarachas puede tolerarse en algunas zonas, mientras que en las áreas de preparación de alimentos o en las zonas de su consumo resulta totalmente inaceptable su presencia, pudiéndose entonces hablar de tolerancia cero. De ahí la necesidad de diseñar programas de control integrado para cada caso o situación concreta, programas que deben ofrecer soluciones a largo plazo, reduciendo los costes asociados y la cantidad de productos químicos incorporada al medio ambiente⁶.

⁶Moreno et al., Rev. Esp. Salud Pública, Feb 2007, vol.81, no.1, p.15-24

1-2. Objetivos

Comprender el fenómeno de la resistencia en sus diferentes niveles permite la formulación de técnicas para ralentizarla, prevenirla o revertirla, y proporciona el conocimiento necesario para incrementar la especificidad y eficacia de los insecticidas, reduciendo así su efecto perjudicial. Por ello, la presente Tesis Doctoral, se plantea como objetivo general:

El estudio de los mecanismos implicados en la resistencia de los insectos a los insecticidas, concretamente los sistemas enzimáticos relacionados con la resistencia metabólica, en los insectos plaga *Blattella germanica* y *Frankliniella occidentalis*.

Con ello se pretende asentar las bases que permitan en un futuro la definición de las tácticas/estrategias a emplear para un control racional de la resistencia en plagas de insectos, especialmente aquellas de interés agrícola.

1-3. Plan de trabajo

Se describen a continuación las líneas básicas de trabajo desarrolladas y que se corresponden a los objetivos marcados:

- *Adaptación de los ensayos propuestos en la literatura para la cuantificación de actividades enzimáticas, a las características bioquímicas de nuestras especies de interés. En este aspecto, en una primera fase el estudio se centra en *Blattella germanica*, y en una segunda etapa en el tisanóptero, *Frankliniella occidentalis*.*
- *Validación de dicha metodología mediante su aplicación a varios supuestos prácticos:*
 - a) *Caracterización de la resistencia en una población de campo de la cucaracha *Blattella germanica*:*
 - *Determinación, mediante el empleo de bioensayos, de los niveles de resistencia, y evaluación de los mismos tras el tratamiento con inhibidores conocidos de algunas de las actividades enzimáticas implicadas en los fenómenos de resistencia (PBO: butóxido de piperonilo; DEF: isobutil tritioato;...); cuantificación mediante*

ensayos in vitro, de los niveles de dichas actividades enzimáticas. De este modo se pretende tener una primera idea de los mecanismos implicados en la resistencia.

- *Profundizar en el estudio de dicha resistencia mediante experimentos de selección en laboratorio de una población híbrida de B. germanica, obtenida a partir de la población recogida en campo.*

b) Análisis de las actividades enzimáticas de muestras de Frankliniella occidentalis, procedentes de campo y seleccionadas en laboratorio. Determinación de la relación entre los niveles de resistencia y las actividades enzimáticas estudiadas.

1-4. Estructura de la Tesis

El presente manuscrito constituye, pues, el compendio de los trabajos relativos al desarrollo del proyecto "Estudio de los mecanismos de resistencia frente a insecticidas en dos insectos plaga: Blattella germanica (L.) y Frankliniella occidentales (Pergande)", y que se abordan en los capítulos que se detallan a continuación. En el capítulo 2 se resumen los principales aspectos teóricos que han fundamentado los experimentos, desde el concepto de resistencia, pasando por los factores responsables de su aparición, así como sus diferentes tipos, profundizando en el fenómeno en lo que concierne a Blattella germanica y Frankliniella occidentalis. En el capítulo 3, y entendiendo que la puesta a punto de la metodología ha sido parte primordial en lo que a procedimiento experimental se refiere, se describen la mayor parte de las técnicas empleadas, con una breve introducción teórica, seguida de los procedimientos y resultados de los ensayos de adaptación y optimización en las dos especies de interés. El capítulo 4 detalla los trabajos realizados con Blattella, esto es, el estudio de la resistencia en una población de campo, la evaluación de su nivel de resistencia y los posibles mecanismos implicados en la misma. El capítulo 5 recoge todos los resultados del estudio de la resistencia en diferentes muestras del trips de las flores Frankliniella occidentalis. Y por último, y a modo de recopilación, se presentan los capítulos 6, discusión general, y 7, conclusiones finales.

Revisión Bibliográfica

2-1. Antecedentes y estado actual del tema

Los insecticidas orgánicos de síntesis han logrado, en el último siglo, un notable incremento de la producción agrícola, así como una mejora en el ámbito doméstico y de la salud humana, y continúan siendo la principal arma empleada en el control de las plagas de insectos. Sin embargo, la presión de selección ejercida sobre los insectos a consecuencia de su empleo excesivo, ha conducido irremediablemente a la evolución de la resistencia a estos insecticidas. Las consecuencias de la resistencia van desde la destrucción de los sistemas de producción agrícola y ganadera, hasta un incremento en la incidencia de las enfermedades transmitidas por insectos, o de las plagas de ámbito urbano.

El fenómeno de la resistencia a los insecticidas en insectos se ha convertido en las últimas décadas en un problema a escala mundial. A finales de los años 80 se habían descrito casos de resistencia a una o más clases de insecticidas en más de 500 especies de insectos y ácaros, de las que el 56,1% eran plagas de interés agrícola, el 39,3% plagas de importancia médico-veterinaria y el 4,6% artrópodos beneficiosos (Georghiou, 1990). Aproximadamente el 80% pertenecía a los órdenes Coleoptera, Diptera, Heteroptera y Lepidoptera, y el 20% restante eran trips, cucarachas, piojos, ácaros y garrapatas. En la actualidad son más de 700 las especies resistentes a uno o más productos (Bielza, 2005).

Existen numerosas revisiones en la bibliografía que abordan el tema de la resistencia a insecticidas en insectos, abarcando desde aspectos más generales, como por ejemplo las de Georghiou y Saito (1983), Oppenoorth (1984, 1985), Georghiou (1990), Roush y Tabashnik (1990), Price (1991) o Denholm y colaboradores (1999), hasta más específicas, que se centran en temas como la detección de la resistencia (Brown y Brogdon, 1987; French-Constant y Roush, 1990; Hemingway et al., 1996), resistencia por modificación de la diana (Fournier y Mutero, 1994; Soderlund y Knipple, 1999, 2003; Buckingham y Sattelle, 2005; Soderlund, 2005) o resistencia

metabólica (Agosin, 1985; Hodgson, 1985; Yu, 1996; Feyereisen, 1999; Scott y Wen, 2001; Enayati et al., 2005; Oakeshott et al., 2005; Ranson y Hemingway, 2005), así como las que tratan aspectos moleculares (Feyereisen, 1995; Hemingway y Ranson, 2000) o genéticos (Roush y McKenzie, 1987; Roush y Daly, 1990; Mullin y Scott, 1992; Hemingway et al., 2002; French-Constant et al., 2004).

Por ello, aquí simplemente se pretende introducir el tema, dando un repaso general de los mecanismos implicados en la resistencia, y particularizando en nuestras dos especies de interés.

2-1.1. Definición de resistencia.

La resistencia se define como una reducción en la sensibilidad de una población a un compuesto, lo que se refleja en el continuo fallo para conseguir el nivel de control esperado por el producto, aun cuando se hayan seguido las recomendaciones del fabricante para su uso en esa especie y se hayan conseguido eliminar los problemas debidos al almacenaje, aplicación del producto y circunstancias climáticas o ambientales inusuales (IRAC, 2007). En un contexto práctico se puede definir la resistencia a insecticidas como el estadio por encima del cual el control con un plaguicida dado no resulta económicamente viable (Sawicki, 1987). De acuerdo con esta definición, las diferencias observadas en ensayos de laboratorio, en cuanto a la tolerancia a insecticidas, no tienen porqué relacionarse necesariamente con la presencia de resistencia, si dicha diferencia no resulta en un cambio de la efectividad del producto en el campo (IRAC, 2007).

En principio, el desarrollo de la resistencia en una población de insectos se basa en la variabilidad natural que presentan los individuos de esa población frente a los efectos de un producto (Cisneros, 1980). Normalmente unos pocos individuos son capaces de tolerar las dosis que producen la muerte de la gran mayoría de la población. Si se ejerce una presión de selección por medio de sucesivas aplicaciones, aquellos insectos con genes resistentes sobrevivirán y pasarán el factor de resistencia a su descendencia. La proporción de insectos resistentes en la población se multiplicará, mientras que los individuos sensibles serán eliminados por el insecticida, con lo que finalmente éste dejará de ser eficaz.

La velocidad en la aparición de la resistencia depende de varios factores, como son:

Factores genéticos:

*número y frecuencia de alelos resistentes
dominancia y/o recesividad de alelos resistentes
expresividad e interacción de alelos*

Factores biológicos:

*número de generaciones por año
movilidad/migración
monogamia/poligamia
capacidad de refugio*

Factores operacionales (insecticida):

*naturaleza química
relación entre insecticidas usados
residuos/formulación*

Aplicación:

*umbral de aplicación
modo de aplicación
alternancia de productos*

Así, por ejemplo, las moscas tsetse, aunque fueron controladas durante muchos años fumigando a gran escala con DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), nunca desarrollaron resistencia a este insecticida, debido al pequeño número de huevos que producen. En contraposición se sitúan los mosquitos, que presentan las características apropiadas para desarrollar resistencia rápidamente, debido a su ciclo de vida corto con abundante descendencia (Hemingway y Ranson, 2000).

2-1.2. Tipos de resistencia.

Las vías por las que los insectos se hacen resistentes a los insecticidas se pueden dividir en cuatro niveles, atendiendo al modelo de interacción insecto-insecticida. Los insectos, a menudo, presentan más de uno de estos mecanismos simultáneamente, lo que se conoce como resistencia múltiple.

2-1.2.1. Resistencia por comportamiento.

Los insectos resistentes pueden detectar o reconocer el peligro y eludir el contacto con el insecticida, bien evitando comer, bien escapando del área donde se ha fumigado. Este mecanismo se ha descrito en más de

30 especies de insectos para diferentes clases de insecticidas, incluidos organoclorados, organofosforados (OPs), carbamatos y piretroides (Sparks et al., 1989), de modo que es un mecanismo ampliamente generalizado, si bien ha sido poco estudiado por las dificultades que plantea su análisis en el laboratorio.

2-1.2.2. Resistencia a la penetración.

Una vez el insecto entra en contacto con el insecticida, los individuos resistentes pueden absorber la toxina más despacio que los sensibles. Esto ocurre debido a que su cutícula o el epitelio del tracto digestivo han desarrollado barreras contra los productos, lo cual les protege frente a un amplio espectro de insecticidas. Normalmente puede presentarse junto con otras formas de resistencia, intensificando los efectos de estas últimas. Este tipo de resistencia se ha descrito para OPs en la mosca *Musca domestica* (Forgash et al., 1962), en la psila del peral *Psylla pyricola* (van de Baan y Croft, 1991) y en el gusano del tabaco *Heliothis virescens* (Kanga y Plapp, 1995); para carbamatos en la polilla oriental del melocotonero *Grapholita molesta* (Kanga et al., 1998), y para piretroides en los gusanos del algodón *Helicoverpa armigera* (Gunning et al., 1991) y del maíz *Helicoverpa zea* (Abd-Elghafar y Knowles, 1996).

2-1.2.3. Resistencia metabólica.

En el interior del insecto, aquellos resistentes pueden biotransformar o destruir el tóxico más rápidamente que los insectos sensibles; éste es el mecanismo más común. Tres son los principales sistemas enzimáticos implicados, y que todos los insectos poseen para biotransformar aquellos compuestos xenobióticos presentes en el ambiente de forma natural: las monooxigenasas dependientes de P450 (P450), las esterasas y las glutatión-S-transferasas (GSTs). Los insectos emplean estos sistemas para transformar la molécula insecticida, de manera que las poblaciones resistentes pueden tener o más cantidad o formas más eficaces de estas enzimas. Puesto que estas familias de enzimas pueden contener múltiples isoformas, con una amplia especificidad de sustratos, la probabilidad de que al menos uno de los miembros de la familia pueda metabolizar a uno o más insecticidas es elevada (Hemingway y Ranson, 2000). Este tipo de resistencia puede, por tanto, ser específica para un compuesto determinado, o ser más general y afectar a un amplio rango de compuestos (IRAC, 2007).



La mayoría de los insecticidas que penetran en el organismo son lipofílicos, una propiedad que les permite atravesar las membranas lipídicas y ser transportados por lipoproteínas. Su metabolismo consta de dos fases. En la fase I, un grupo polar reactivo es introducido en la molécula, dando lugar a un sustrato apropiado para las enzimas de la fase II. En la fase II tiene lugar la conjugación de diversos sustratos, como azúcares, aminoácidos, etc., que forman productos hidrosolubles que ya pueden ser excretados (Dauterman y Hodgson, 1990).

FASE I. Las reacciones de la fase I incluyen monooxigenaciones, oxidaciones citosólicas y mitocondriales, cooxidaciones en la reacción de síntesis de las prostaglandinas, reducciones, hidrólisis y epoxidaciones por hidratación.

- Las monooxigenaciones, conocidas también como oxidaciones de función mixta, son aquellas reacciones en las que un sólo átomo de una molécula de oxígeno se incorpora al sustrato, mientras que el otro se reduce a agua. El ciclo catalítico sería como sigue (Fig. 2-1):

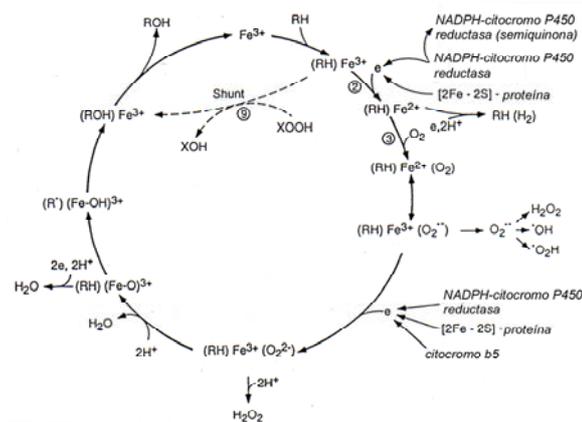


Figura 2-1. Ciclo de reacción de la citocromo P450 (Bernhardt, 1995).

Se requiere, por tanto, de un compuesto donante de electrones externo para la activación del oxígeno. En este sentido

distinguiamos las P450 microsomales de las mitocondriales. Las P450 microsomales son proteínas unidas a membrana que aceptan los electrones de una P450 NADPH-citocromo reductasa. En la **figura 2-2** se representa el modelo de organización del sistema P450 microsomal.

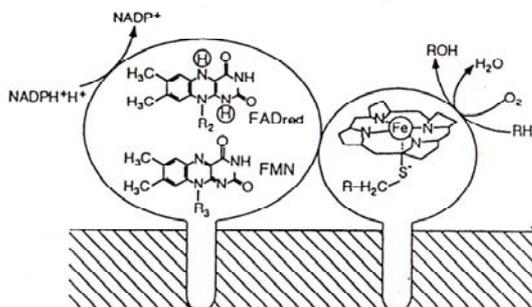


Figura 2-2. Modelo de organización del sistema citocromo-P450 microsomal (Bernhardt, 1995).

Todas las P450 aisladas hasta la fecha que metabolizan fármacos y xenobióticos pertenecen a esta clase de monooxigenasas.

Las P450 catalizan reacciones tan diversas como hidroxilaciones, N-, O-, y S- desalquilaciones, epoxidaciones, desaminaciones, sulfoxidaciones, deshalogenaciones y peroxidaciones, entre otras. Aparecen en las rutas biosintéticas de ecdisteroides y hormona juvenil (HJ) (hormonas responsables del crecimiento, desarrollo y reproducción de los insectos), también metabolizan insecticidas y otros muchos xenobióticos de origen natural o sintético (Feyereisen, 1999). Son enzimas ampliamente distribuidas, desde bacterias a mamíferos. Su gran diversidad se debe a la existencia de múltiples isoenzimas, diferentes patrones de expresión y una amplia especificidad de sustrato, lo cual es particularmente relevante en el caso de las P450 de los insectos (Hemingway et al., 2004).

A pesar de la complejidad de este sistema enzimático, se ha establecido que muchos de los casos de resistencia metabólica de los insectos a insecticidas son, en esencia, el resultado de un incremento en las actividades P450 (Agosin, 1985; Hodgson,

1985; Brogdon et al., 1999; Hemingway y Ranson, 2000; Brooke et al., 2001; Chareonviriyaphap et al., 2003).

Más allá, se han descrito numerosos casos de poblaciones resistentes en los que uno o varios genes que codifican a las oxidasas P450 presentaban mayor cantidad de transcritos, lo que sugiere que la sobreexpresión de uno o más genes P450 es un fenómeno común en la resistencia metabólica (Feyereisen, 2005). Así, en los estudios realizados en *Drosophila* con distintas poblaciones resistentes a DDT recogidas por todo el mundo, se ha encontrado que sólo uno de los 90 genes P450 de *Drosophila* estaba sobretranscrito, y que esa sobretranscripción era suficiente para conferir la resistencia al insecticida (Daborn, 2002).

- Las esterasas (subgrupo de las hidrolasas) que catalizan la hidrólisis de los ésteres, conforman una gran familia de enzimas de gran versatilidad y amplia especificidad de sustratos, hidrolizando tanto sustratos endógenos como xenobióticos.

Los diferentes subtipos de esterasas se definen en base a los tipos de enlaces éster que hidrolizan. Centrándonos en las que hidrolizan los ésteres de los ácidos carboxílicos, y dejando de lado las lipasas, distinguimos las acetilesterasas, las arilesterasas, las carboxilesterasas y las colinesterasas (Oakeshott et al., 2005).

El mecanismo de reacción de las carboxilesterasas (CaE) se resume en la **figura 2-3**.

La hidrólisis de los ésteres carboxílicos se produce vía acilación reversible de un residuo serina situado en el centro activo de la proteína. Esta acilación provoca la salida del alcohol. El posterior ataque nucleofílico del agua restituye la forma libre de la enzima y el correspondiente ácido carboxílico. Éste es el caso de los carbamatos y piretroides, cuyas estructuras químicas se corresponden con las de ácidos carboxílicos y por tanto pueden ser potencialmente hidrolizados por estas CaE. Para el caso de los OPs, las fosfotriesterasas son las principales encargadas de su metabolismo, ya que rompen el enlace entre el átomo de fósforo y el grupo saliente (Sogorb y Vilanova, 2002).

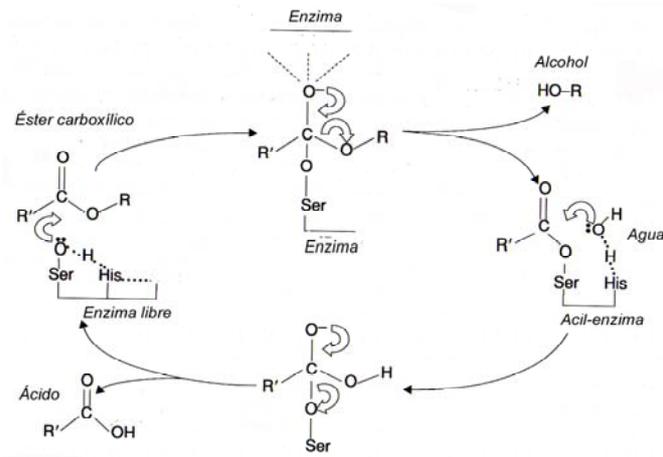


Figura 2-3. Mecanismo de reacción de las carboxilesterasas (Oakeshott et al., 2005).

Como en el caso de las P450, las CaE se reconocen como una de las principales familias de enzimas implicadas en la resistencia a OPs, carbamatos y piretroides (Hemingway y Ranson, 2000) y a los insecticidas más recientemente introducidos, como reguladores del crecimiento de insectos (IGRs), imidacloprid o toxinas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (Oakeshott et al., 2005). Así, se ha descrito su relación con la resistencia en muchas especies de insectos que constituyen plaga, como por ejemplo el mosquito *Anopheles gambiae* (Vulule et al., 1999), el gusano negro *Spodoptera littoralis* (Riskallah, 1983), la moscarda *Lucilia cuprina* (Campbell et al., 1998) o el barrenador del grano *Anisopteromalus calandrae* (Claudianos et al., 2002).

El caso mejor estudiado es el del áfido *Myzus persicae*. La sobreproducción de una isoenzima CaE específica, la E4, es responsable del notable incremento de esta actividad en clones resistentes a OPs (Devonshire, 1977). La resistencia se debe, principalmente, a la fosforilación o carbamilación de la isoenzima E4, impidiendo que el insecticida llegue a su diana (secuestro) (Devonshire y Moores, 1982). La amplificación del gen que codifica la isoenzima E4 sería la responsable de la sobreproducción de estas isoformas. En esta línea, en los

estudios llevados a cabo por Field y colaboradores en 1988 se demuestra una correlación positiva entre el grado de amplificación y los niveles de resistencia y de actividad E4. El mismo fenómeno se ha observado en poblaciones resistentes del mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus* (Devonshire y Field, 1991; Feyereisen, 1995) y del saltamontes marrón *Nilaparvata lugens* (Vontas et al., 2000). Por otro lado, en la resistencia por esterases también parecen estar implicados cambios cualitativos, esto es, en la función de la enzima. Es el caso de la resistencia al malatión de la moscarda *L. cuprina*, debida a la sustitución de un aminoácido (Trp²⁵¹-Leu) en la esterasa E3 (Campbell et al., 1998), lo que provoca un incremento en su hidrólisis. La sustitución Gly¹³⁷-Asp también confiere resistencia a otros OPs en esta especie (Newcomb et al., 1997).

FASE II. Las reacciones de la fase II implican la conjugación de compuestos endógenos, de xenobióticos o de metabolitos de la Fase I, con intermedios endógenos. De los tres tipos de reacciones de conjugación que se dan en la célula, nos centraremos en las de tipo III, catalizadas por la familia de enzimas glutatión S-transferasas:

Metabolito + glutatión reducido \longrightarrow glutatión conjugado
(grupo electrófilo)

- El sistema de las GSTs constituye, en insectos, una gran familia de enzimas multifuncionales, presentes en el transporte intracelular de compuestos hidrófobos, en la biosíntesis de hormonas, en la protección contra el estrés oxidativo y en la desintoxicación de compuestos tanto endógenos como xenobióticos, entre los que se incluyen los insecticidas, actuando bien directamente sobre el compuesto o bien sobre los metabolitos resultantes de las oxidaciones de las P450.

Se distinguen dos grupos de GSTs atendiendo a su localización en la célula: citosólicas y microsomales. La amplia mayoría de las GSTs son citosólicas. Las GSTs microsomales son proteínas unidas a membrana y, aunque en estructura y origen son muy diferentes a las citosólicas, catalizan reacciones similares. Sin

embargo, hasta la fecha no se han implicado en el metabolismo de los insecticidas (Enayati et al., 2005).

Las GSTs citosólicas, a las que nos referiremos a partir de ahora, catalizan la conjugación del grupo tiol del tripéptido glutatión (GSH) con una gran variedad de moléculas orgánicas hidrófobas que poseen grupos electrófilos. Los conjugados, generalmente menos tóxicos, son excretados de las células (Enayati et al., 2005).

Se ha asociado un incremento en la actividad GST con la resistencia a las principales clases de insecticidas (Ranson y Hemingway, 2005). Es el caso de *M. domestica* (Clark y Shamaan, 1984) y los mosquitos *Aedes aegypti* y *A. gambiae* (Grant y Matsumura, 1988, Prapanthadara et al., 1995) con el DDT, o *Plutella xylostella* (Chiang y Sun, 1993), *Anopheles* (Hemingway et al., 1991) y *M. domestica* (Oppenorth et al., 1979) con los OPs. Por otro lado, si bien no parece que estén directamente implicadas en el metabolismo de los piretroides, sí podrían jugar un papel importante en la resistencia a esta clase de insecticidas, al metabolizar los productos resultantes de la peroxidación inducida por ellos (Vontas et al., 2001). Además, las GSTs pueden proteger a los insectos de la acción tóxica de los piretroides mediante el secuestro del insecticida (Kostaropoulos et al., 2001).

En muchos casos no han sido identificadas las enzimas individuales implicadas en la resistencia, sino que ésta se ha relacionado con un incremento en la actividad enzimática, empleando sustratos modelo en poblaciones de insectos resistentes y comparando con una población sensible. En los casos que se han estudiado con mayor detalle, la resistencia se atribuye a un incremento en la cantidad de una o más GSTs más que a cambios cualitativos en enzimas individuales. El incremento en la cantidad podría ser el resultado de una amplificación del gen o, más comúnmente, de un aumento en la velocidad de transcripción (Enayati et al., 2005).

2-1.2.4. Resistencia por modificación de la diana.

Por último, el sitio al que la toxina se une puede estar modificado genéticamente, reduciendo así los efectos del insecticida. Este tipo de resistencia es el segundo más común, una forma de resistencia causada por un cambio en la estructura de la diana o en el número de sitios de unión del insecticida. Algunos fracasos en el control con DDT, OPs, carbamatos y piretroides son debidos a este tipo de resistencia. Es el mecanismo más problemático, pues puede provocar la extensión de la resistencia a una clase entera de insecticidas (resistencia cruzada). Así, hay gran cantidad de casos citados en la literatura donde parece existir resistencia a la parálisis (*kdr*) debida a la resistencia cruzada entre el DDT y los piretroides, que actúan en el mismo lugar del canal de sodio. El mismo fenómeno se ha observado entre OPs y carbamatos, cuando la resistencia se debe a una modificación de la acetilcolinesterasa (AChE) (Hemingway y Ranson, 2000). En este sentido, el IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) ha desarrollado una clasificación definitiva de los insecticidas basada en su modo de acción (MoA). Ésta se basa en el hecho de que, en la mayoría de los casos, la resistencia a un insecticida no se limita sólo a ese compuesto sino que a menudo aparece resistencia cruzada a otros compuestos químicamente relacionados. Ello es debido, generalmente, a que los compuestos de un determinado grupo químico comparten la diana en el insecto, y por tanto comparten un mismo modo de acción (IRAC, 2007).



La mayoría de insecticidas comparten el inicio y/o la transmisión del impulso nervioso como diana de su acción tóxica. Muchas de estas dianas son importantes receptores o enzimas cuya alteración produce una rápida parálisis y la muerte del insecto.

Tres son las principales dianas identificadas: los canales de sodio dependientes de voltaje, las AChEs y los canales dependientes de ligando.

- Los canales de sodio dependientes de voltaje de las membranas neuronales son la principal diana del DDT y de los piretroides (Miller, 1988). La resistencia a piretroides está basada en la presencia de una mutación en el gen "para" del canal de sodio, lo que produce insensibilidad del sitio de anclaje del insecticida en

dicho canal, y que se conoce como resistencia a la parálisis (resistencia knockdown o kdr). Fue caracterizada por primera vez en la mosca *M. domestica* (Farnham, 1977). Los estudios genéticos llevados a cabo por Williamson y colaboradores en 1993 demostraron una conexión entre el fenotipo kdr y el gen "para" de la mosca. En insectos tales como *H. virescens* (Nicholson y Millar, 1985; Taylor et al., 1993), *Anopheles stephensi* (Omer et al., 1980), *Culex tritaeniorhynchus* (Umeda et al., 1990) o *S. littoralis* (Gammon, 1980), también se ha relacionado una mutación en este punto con la resistencia a piretroides (kdr). Lo que sucede normalmente es que aparecen alteraciones en el dominio II de la región S4-S6 de la proteína canal, habiéndose localizado sólo 5 mutaciones diferentes entre las distintas especies de insectos. Al secuenciar los genes homólogos de los canales de sodio de *M. domestica* (Miyazaki et al., 1996, Williamson et al., 1996), *B. germanica* (Miyazaki et al., 1996) y *Haematobia irritans* (Guerrero et al., 1997) se comprobó que la resistencia kdr era debida a las mutaciones puntuales L1014F y M918T en el dominio II del canal de sodio. También se encontró la mutación L1029H en el sitio homólogo de la mutación kdr en poblaciones de *H. virescens* resistentes a piretroides (Park y Taylor, 1997). Las mutaciones D1561V y E1565G en el conector de los dominios III y IV del canal de sodio están también asociadas con este tipo de resistencia tanto en *H. virescens* como en *H. armigera* (Head et al., 1998).

- La acetilcolinesterasa es la diana de OPs y carbamatos. Hidroliza al neurotransmisor acetilcolina tras su unión a la membrana postsináptica, siendo la forma molecular predominante en insectos un dímero globular amfifílico unido a membrana mediante un anclaje glucolipídico.

Las modificaciones de las AChE en poblaciones de insectos resistentes a carbamatos y a OPs tienen como resultado una menor sensibilidad de la enzima a la inhibición producida por la acción tóxica de estos insecticidas (Ayad y Georghiou, 1975; Hemingway y Georghiou, 1983; Hemingway y Ranson, 2000). Se ha descrito resistencia a OPs y/o carbamatos por modificación de la diana en la mayoría de órdenes de insectos plaga, predominantemente en hemípteros y en dípteros, y en

menor medida en lepidópteros (Oakeshott et al., 2005). El estudio de diferentes poblaciones resistentes de *Drosophila* mostró que la existencia de diversas sustituciones en algunos aminoácidos tenía como resultado el incremento en los niveles de insensibilidad de la enzima (Fournier et al., 1989). El análisis de distintas poblaciones resistentes de *C. pipiens* mostró que todas ellas eran portadoras de la misma sustitución en el centro activo de la enzima (Gly¹¹⁹- Ser) (Weill et al., 2003). En la actualidad se conocen al menos 20 mutaciones distintas en la acetilcolinesterasa que han sido asociadas con la resistencia en diferentes especies de artrópodos (Menozzi et al., 2004).

- El receptor GABA (ácido γ -amino butírico) es el lugar de acción de los ciclodienos y los fenilpirazoles (como el fipronil), insecticidas de reciente introducción. Se trata de un canal de cloro heteromultimérico, un canal inhibidor de la neurotransmisión ampliamente distribuido en el sistema nervioso central de los insectos (Sattelle, 1990). El hecho de que se haya comprobado que insectos resistentes a ciclodienos lo sean también a la picrotoxina y a los fenilpirazoles, y que el efecto de la ivermectina sobre neuronas en cultivo pueda ser suprimido con un tratamiento previo con picrotoxina, sugiere que estos insecticidas ejercen su efecto al interactuar con el ionóforo de cloro asociado al receptor GABA del insecto (Kadous et al., 1983; Bloomquist, 1994; Hemingway y Ranson, 2000). La sustitución de una alanina, en la posición 302, por una serina o glicina en el dominio de revestimiento del canal del receptor GABA confiere resistencia a ciclodienos como el dieldrín (ffrench-Constant et al., 1993). Esta misma sustitución se ha descrito también en otras especies de insectos (ffrench-Constant, 1994).

2-2. *Blattella germanica* y la resistencia a los insecticidas

2-2.1. *Blattella germanica* como plaga.

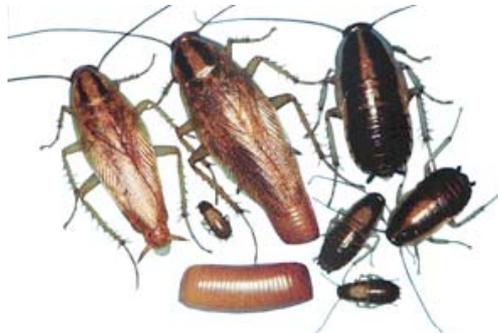
A pesar de que de las 4.000 especies de cucarachas existentes en el planeta apenas sólo 10 se citan en la lista de plagas de la OMS, en el mundo occidental las cucarachas conforman un grupo con el que, en

importancia económica y efectos sobre la salud, sólo compiten los mosquitos, no teniendo rival como plaga urbana.

Una de las especies de cucaracha más usual en las viviendas es *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae), comúnmente conocida como la cucaracha rubia, alemana o del café. Vive en zonas con humedad alta, comida abundante y temperaturas elevadas. Cuando la densidad de la población es importante no transcurre más de una semana sin invadir otros lugares a través de las cañerías e, incluso, trepando por las paredes. También es común que se trasladen en cajas, bolsas y envases de distintas mercancías. Son animales de hábitos nocturnos, aunque podemos verlas durante el día si el número de animales es muy elevado o si necesitan alimento.

Las cucarachas son insectos que pertenecen al grupo Dictyoptera. De acuerdo con la clasificación de Cornwell (1968) su ubicación es la siguiente:

- Clase Insecta
- Orden Dictyoptera
- Suborden Blattaria
- Superfamilia Blaberoidea
- Familia Blattellidae
- Género Blattella
- Especie Blattella germanica



El desarrollo de *B. germanica* es del tipo hemimetábolo o de metamorfosis incompleta, durante el cual se diferencian tres estados: huevo, ninfa y adulto. Este desarrollo se puede completar en 100 días, en condiciones ambientales favorables. *B. germanica* es una de las especies de cucarachas que producen más cantidad de huevos (20.000 descendientes/hembra/año, incluida la 2ª generación). Los huevos son depositados en grupos en una estructura protectora denominada ooteca (generalmente 30-40 huevos por ooteca) (Ross y Mullins, 1995), cuya longitud varía entre 7 y 9 mm, y que es acarreada por la hembra hasta el momento de la eclosión, cuando es depositada en lugares apropiados (Cochran, 1999).

Las ninfas pasan por 6 estadios, todos semejantes a los adultos, salvo por el hecho de que carecen de alas y de aparato reproductor desarrollado (Ross y Mullins, 1995). El adulto de *B. germanica* es uno de los más pequeños entre las cucarachas domésticas, midiendo de 10 a 15 mm de largo. El color de los adultos es marrón-amarillento en el caso de machos y ligeramente más oscuro en hembras. Los adultos y las ninfas tienen en el tórax dorsal dos bandas paralelas longitudinales negras separadas por una zona más clara. En estudios de campo se han descrito de 4 a 6 generaciones por año (Cochran, 1999).

2-2.2. El control químico y la resistencia a los insecticidas.

En los últimos 60 años los insecticidas han resultado ser el único método de control efectivo de esta especie, a pesar de que la resistencia se ha convertido en la principal causa de los fracasos en su contención (Siegfried y Scott, 1992). En la **tabla 2-1** (Cochran, 1999) se resumen los principales insecticidas empleados en el control de *Blattella*.

El problema de la resistencia surge en los inicios de la década de los 50 a partir del empleo de los insecticidas clorados como método de control en *Blattella*. Tras los primeros casos de fracaso en su contención, se detectan poblaciones de campo resistentes. En 1953 se localiza el primer caso de resistencia al ciclodieno clordano en *B. germanica*, en Corpus Christi, Texas, USA (Keller et al, 1956a), resistencia que se extiende rápidamente y obliga a la retirada de este producto. Se emplean a partir de entonces (mediados de los años 50) los insecticidas OPs. Sin embargo, no pasan muchos años hasta que aparecen casos de resistencia a estos insecticidas en poblaciones de campo (Bennett y Spinks, 1968), resistencia que también se observa con las piretrinas, ampliamente utilizadas durante muchos años en el control de la cucaracha (Keller et al, 1956b; Cochran, 1973), y con los piretroides introducidos en los 80 como alternativa a los OPs (Scott y Matsumura, 1981, 1983). Así, y después de tantos años de empleo de estos compuestos, esta especie ha desarrollado resistencia a casi todas las clases de insecticidas en todos los continentes: a OPs (Milio et al., 1987; Schal, 1988; Cochran, 1989; Scott et al., 1990; Siegfried et al., 1990; Rust y Reiersen, 1991; Prabhakaran y Kamble, 1993a; Hemingway et al., 1993a), a carbamatos (Cochran, 1989; Siegfried y Scott, 1991; Hemingway et al., 1993a; Prabhakaran y Kamble, 1993a) y a piretroides (Vagn-Jensen, 1987; Umeda et al., 1988; Cochran, 1989; Robinson y Zhai,

1990; Atkinson et al., 1991; Chapman et al., 1993; Hemingway et al., 1993b; Ladonni, 1997; Valles, 1998, 1999; Huang et al., 1999; Lin et al., 2000). Incluso para el fipronil, introducido a finales de los 90 en Norte América y en espera de su introducción en Europa, ya se han descrito casos de resistencia (Holbrook et al., 2003; Kristensen et al., 2005), probablemente debido a la resistencia cruzada con los ciclodienos.

Tabla 2-1. Insecticidas comúnmente empleados en el control de *B. germanica*.

Clase química	Insecticidas	Modo de acción
Organoclorados	Clordano, lindano, grupo dieldrín	Sistema nervioso (sinapsis colinérgica)
Organofosforados	Acefato, clorpirifos, diazinón, fenitrotión, malatión, pirimifos, metil propetamfos	Sistema nervioso (inhibe la AChE)
Carbamatos	Bendiocard, dioxacarb, propoxur	Sistema nervioso (inhibe la AChE)
Piretroides	Aletrina, ciflutrina, cipermetrina, deltametrina, fenvalerato, permetrina, fenotrina, piretrinas	Sistema nervioso (altera el canal de sodio dependiente de voltaje)
Amidinohidrazona	Hidrametilnona	Sistema respiratorio celular (inhibe el transporte de electrones)
Macrocíclico lactona glicosido	Avermectina	Sistema nervioso (altera el canal de cloro)
Fenilpirazoles	Fipronil	Sistema nervioso (altera los canales de cloro asociados a GABA)
Benzonil fenil urea (IGR)	Flufenoxurón	Sistema metabólico (inhibe la síntesis de quitina)
Varios (IGR)	Fenoxicarb, hidropreno, piriproxifén	Sistema metabólico (alterador de la función hormonal)
Inorgánicos	Ácido bórico	Tejido (alterador celular)

En la actualidad, los métodos de lucha se centran en el control integrado con cebos, polvos y el empleo de trampas con IGRs y feromonas (<http://www.roachcontrol.com/german.htm>, 2007). El tratamiento sólo con trampas se ha revelado útil únicamente en aquellos casos en los que los niveles de infestación son bajos. La mayoría de insecticidas que se

encuentran a disposición del gran público son aerosoles, geles y trampas que contienen ingredientes activos de la familia de los piretroides.

2-2.3. Mecanismos relacionados con la resistencia a insecticidas y *Blattella germanica*.

Los estudios encaminados a dilucidar los mecanismos implicados en la resistencia muestran que, en esta especie, parecen estar implicados mecanismos tales como:

- la **disminución en la penetración a través de la cutícula** (Anspaugh et al., 1994; Wu et al., 1998; Valles et al., 2000).
- la **disminución en la sensibilidad de la diana**, tanto kdr como Rdl (resistencia al dieldrín). En 1981, Scott y Matsumura demostraron por primera vez la implicación de la resistencia kdr en la resistencia al DDT y en la resistencia cruzada a piretroides en una población de *B. germanica* (VIPDLS) seleccionada con DDT en Estados Unidos. Más tarde se añadirían nuevos casos (Cochran, 1989; Hemingway et al., 1993b; Dong y Scott, 1994). La identificación de este tipo de resistencia en poblaciones de *B. germanica* de Estados Unidos (Scott y Matsumura, 1983; Scott et al., 1990; Atkinson et al., 1991) y Japón (Umeda et al., 1988) sugiere que se trata de un problema a nivel mundial. Profundizando en las bases moleculares de este tipo de resistencia, en el estudio llevado a cabo por Dong y Scott (1994) no se encontraron diferencias en la afinidad de la unión o en el número de sitios de unión del insecticida al canal de sodio dependiente de voltaje entre las poblaciones resistente y sensible, lo que sugiere que los canales de sodio de las cucarachas kdr resistentes son cualitativamente diferentes a los de la población sensible. Más aún, se ha demostrado que la modificación de estos canales está asociada con dicha resistencia. Los resultados obtenidos por Dong (1997) sugieren que el cambio en un único aminoácido (Leu⁹⁹³ por Fe⁹⁹³) es el responsable de la resistencia kdr en esta especie. Por otro lado, en un estudio llevado a cabo en Dinamarca, se estableció que las poblaciones estudiadas eran portadoras de la mutación A302S asociada a la Rdl (Hansen et al., 2005). También se ha descrito la insensibilidad de la diana debida a una acetilcolinesterasa modificada en una población de *B. germanica* de Dubai (Hemingway et al., 1993a).

-
- **el incremento en la actividad metabólica**, ya sea mediada por enzimas hidrolíticas (Scott et al., 1990; Siegfried et al., 1990; Siegfried y Scott, 1991; Atkinson et al., 1991, 1993; Prabhakaran y Kamble, 1993a, 1995; Hemingway et al., 1993a, b) o por enzimas oxidativas (Cochran, 1987a; Scott et al., 1990; Siegfried et al., 1990; Siegfried y Scott, 1991; Atkinson et al., 1991; Hemingway et al., 1993a,b; Scott, 1999, Ladonni, 2000). Hasta finales de los 80 todos los esfuerzos se habían centrado en el seguimiento de la resistencia en poblaciones de campo, pero la información disponible respecto de los mecanismos subyacentes a dicha resistencia era limitada. Es a partir de este momento cuando empiezan a realizarse estudios cuyo objetivo era dilucidar la naturaleza de los mecanismos implicados en la resistencia. En un primer momento se recurrió al uso de sinergistas tales como el PBO (butóxido de piperonilo, inhibidor de P450) o el DEF (isobutil tritioato, inhibidor de esterasas). Así, Cochran (1987b) redujo drásticamente los factores de resistencia en poblaciones de *B. germanica* resistentes a bendiocarb y piretrinas al utilizar PBO, lo que hizo suponer la implicación del sistema de las monooxigenasas en dicha resistencia. Empleando PBO y DEF, Scott y colaboradores (1990) consiguieron eliminar parcialmente la resistencia al bendiocarb en las poblaciones Kenly y Rutgers y sugirieron la implicación de las oxidasas y de las hidrolasas en dicha resistencia. Del mismo modo, Atkinson y colaboradores (1991) consiguieron eliminar también parcialmente la resistencia a la permetrina y cipermetrina en la población Green (altamente resistente a piretroides), sugiriéndose, de nuevo, la implicación de oxidasas e hidrolasas en dicho proceso. Con la ayuda de las técnicas bioquímicas, se profundizó en el conocimiento de los mecanismos implicados en la resistencia en esta especie. Así, la medida de las actividades oxidasa, esterasa y GST frente a diversos sustratos universales, corroboró los resultados obtenidos previamente con los ensayos en los que se utilizaron los sinergistas. En los estudios llevados a cabo con las poblaciones Baygon-R y Dursban-R (resistentes a varios insecticidas OPs y carbamatos, demostrándose la implicación tanto de oxidasas como de esterasas), un análisis comparativo mostró que las isoenzimas E5, E6, E7 y E8 eran las responsables del incremento en la actividad hidrolítica frente al α -naftil acetato (Prabhakaran y Kamble, 1993b), y más concretamente, un incremento en la producción de la isoenzima

E6 (Prabhakaran y Kamble, 1995). Esta isoenzima se ha asociado también con la resistencia a OPs y carbamatos en otras dos poblaciones de B. germanica (Prabhakaran y Kamble, 1996).

Aunque la resistencia puede ser debida a un único mecanismo o gen, numerosos estudios han confirmado la presencia de resistencia múltiple en poblaciones de campo de B. germanica (Dong et al., 1998; Scharf et al., 1998a,b,1999; Wu et al., 1998; Valles y Strong, 2001; Tan et al., 2002). Como ejemplos podemos citar la población Marietta, recogida en 1992 en una cafetería en Marietta (USA) y que presentaba una amplia resistencia cruzada, así como múltiples mecanismos implicados en la misma. La población resultó ser resistente a piretroides, OPs y carbamatos, y en dicha resistencia parecían estar implicados a la vez, un incremento en los metabolismos oxidativo e hidrolítico (Valles y Yu, 1996), así como insensibilidad de la diana (kdr) (Dong et al., 1998). La población Munsyana (MA), recogida en 1994 de un establecimiento público, también en Estados Unidos, presentaba factores de resistencia de 80x respecto del piretroide cipermetrina y de 5x en el caso del OP clorpirifos. Aquí se identificaron un incremento en la cantidad y actividades esterasa, P450 y GSTs (Scharf et al., 1997; Wu et al., 1998), así como elevados metabolismos oxidativo e hidrolítico del ¹⁴C-fenvalerato (Wu et al., 1998). Se observó, además, un menor impacto de la parálisis producida por los piretroides, así como la presencia de la mutación responsable de la resistencia kdr (Dong et al., 1998). Estudios posteriores demostraron la sobre-expresión de una citocromo P450, responsable de la resistencia en esta población (Scharf et al., 1998a). Éstos son sólo dos ejemplos de las numerosas poblaciones de esta cucaracha descritas en la literatura, que presentan múltiples mecanismos de resistencia.

2-3. *Frankliniella occidentalis* y la resistencia a los insecticidas

2-3.1. *Frankliniella occidentalis*.

El trips de las flores, *Frankliniella occidentalis*, pertenece al grupo Tisanoptera. De acuerdo con la clasificación de Kirk (1996) su ubicación es la siguiente.

- Clase Insecta
- Orden Tisanoptera
- Suborden Terebrantia
- Familia Thripidae
- Género *Frankliniella*
- Especie *Frankliniella occidentalis*



Se trata de un insecto de tamaño pequeño y cuerpo alargado y cilíndrico. Los machos se diferencian de las hembras por su menor tamaño y por ser de tonalidad más pálida. Su tipo de reproducción es por vía sexual o por partenogénesis de tipo arrenotoquia, en la que los huevos no fecundados dan lugar a machos, mientras que los fecundados dan lugar a hembras. La proporción de hembras en la descendencia puede variar en gran medida desde una proporción más o menos equilibrada a una proporción de 7 a 1. Las hembras de *F. occidentalis* depositan los huevos dentro del tejido parenquimático de las hojas, flores y frutos, con la ayuda de su ovipositor en forma de sierra. El número de huevos que puede poner una hembra puede variar según la planta huésped y la temperatura.

Comprenden dos estadios larvarios (I y II) y dos pupales quiescentes. Las larvas son de morfología similar a los adultos pero se diferencian en que no poseen alas, las antenas son más cortas y su tonalidad más clara. Las larvas I acabadas de emerger son de color blanco y se muestran activas inmediatamente después de la muda. Desde el momento en que empiezan a alimentarse adquieren una coloración amarillenta. Las larvas II son más grandes, más activas y de un color amarillo más intenso. Al final de este estadio las larvas salen de las flores y hojas de la planta y se dirigen al suelo donde mudan a prepupas. Éstas son de color blanquecino, con las

antenas cortas, presentan los rudimentos alares y son inmóviles. Las pupas, que también son inmóviles y no se alimentan, tienen los rudimentos alares más desarrollados y las antenas también más grandes y replegadas sobre el dorso. Después de la muda imaginal los adultos son de tonalidad clara y se oscurecen gradualmente. La duración del periodo preimaginal depende de las condiciones ambientales, especialmente la temperatura y la dieta (Riudavets, 1995).

2-3.2. Frankliniella occidentalis en España.

El trips de las flores (WFT), *Frankliniella occidentalis* (Pergande), es una de las principales plagas de los cultivos hortícolas en el sudeste español. Actualmente ésta es la región más importante de Europa en cultivos vegetales bajo invernadero (Hernández et al., 1999). Los cultivos hortícolas en la provincia de Almería, igual que en ciertas zonas de Murcia, Granada y Las Islas Canarias, forman una enorme y densa extensión de invernaderos, prácticamente ininterrumpido por otros tipos de vegetación (van der Blom, 2005).

F. occidentalis fue introducido en España en 1986, procedente de Holanda (donde aparece por primera vez en Europa en 1983), a través de distintos materiales vegetales y de invernadero (Lacasa, 1990). Cuando se introdujeron por primera vez no existían productos químicos en el mercado eficaces contra esta plaga, y en los primeros años la población se expandió rápidamente, hecho que causó problemas muy graves y dejó las plantas totalmente secas (Infoagro, 2007).

La importancia de los trips como plaga no se debe tanto al daño directo que producen al alimentarse de la planta, como a la pérdida del valor comercial derivada de la aparición de manchas oscuras producidas por el virus del bronceado del tomate (TSWV), del que actúan como vectores de transmisión. Como consecuencia de ello, esta plaga ocasiona daños considerables y grandes pérdidas en la producción de las cosechas, afectando también a la calidad de los productos y su comercialización (Espinosa et al., 2002c).

Los resultados de las encuestas llevadas a cabo por el Comité de Acción de Resistencia a Insecticidas (IRAC-España) en el periodo 2002-2004 (Collar, 2005), demuestran que, en este periodo, *F. occidentalis* es la especie de trips donde se ha publicado el mayor número de fracasos en su

control. Durante los últimos años, la importancia de los trips ha aumentado considerablemente en la agricultura española, obligando a modificar los programas de lucha contra las plagas en muchos de nuestros cultivos. En este sentido la Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación de la Generalitat Valenciana publicó en el DOGV la orden por la que se establecen medidas fitosanitarias obligatorias para controlar la presencia de insectos vectores de virus en cultivos hortícolas (DOGV nº 4942, 2005).

Todo lo anteriormente expuesto implica que el nivel de tolerancia de la plaga sea muy bajo (Forcioli et al., 2002), lo que unido a la capacidad de este insecto para multiplicarse rápidamente bajo condiciones favorables, junto con su habilidad de adaptación, su comportamiento alimenticio polífago, su haplodiploidía, su ciclo de vida corto y su elevada fecundidad (hasta 300 huevos por hembra), hace que se requieran reiteradas intervenciones químicas a lo largo de un ciclo de cultivo. Además, su forma de vida (protegidos de la exposición directa al insecticida durante prácticamente todo el ciclo) dificulta su control químico y favorece un rápido desarrollo de resistencias.

2-3.3. La resistencia en el trips de las flores.

En la lucha contra el trips de las flores se han empleado tanto insecticidas de amplio espectro como productos más específicos. En este último caso son 3 o 4 las materias activas utilizadas de forma extensiva y reiterada, lo que, con el paso del tiempo, ha dado lugar a la pérdida de eficacia de los productos asociada a la aparición de poblaciones resistentes.

El primer caso de fallo en el control de poblaciones de *F. occidentalis* se describe en 1961 (Race, 1961), en Estados Unidos, tras la utilización del ciclodieno toxafeno, aunque no es hasta 1989 cuando se demuestra la implicación de la resistencia en los fracasos en el control de *F. occidentalis* (Robb, 1989). Actualmente ésta ya ha sido descrita para las cuatro clases principales de insecticidas: organoclorados, OPs, carbamatos y piretroides (Immaraju et al., 1992; Brodsgaard, 1994; Robb et al., 1995; Zhao et al., 1995; Gunning et al., 1996; Broadbent y Pree, 1997; Harold y Ottea, 1997; Kontsedalov et al., 1998; Zhu y Gao, 1998; Jensen, 2000; Herron y Gullick, 2001; Espinosa et al., 2002a,b). El transporte internacional de plantas contribuye a la distribución de insectos portadores de genes resistentes, lo que podría explicar la rápida extensión de la resistencia en esta especie (Forcioli et al., 2002).

Aunque son escasos los estudios sobre los mecanismos implicados en la resistencia en esta especie, se ha comprobado que niveles crecientes de actividad esterasa están relacionados con la expresión de la resistencia (Jensen, 1998, 2000). También las P450 parecen estar implicadas en los fenómenos de resistencia en esta especie (Espinosa et al., 2005).

2-4. Bibliografía

Abd-Elghafar, S. F.; Knowles, C. O. Pharmacokinetics of fenvalerate in laboratory and field strains of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 89: 590-593 (1996).

Agosin, M. Role of microsomal oxidations in insecticide degradation. En: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Kerkut, G. A.; Gilbert, L. I. (eds.). Pergamon Press, Ltd. Oxford. Vol. 12: 647-712 (1985).

Anspaugh, D. D.; Rose, R. L.; Koehler, P. G.; Hodgson, E.; Roe, R. M. Multiple mechanisms of pyrethroid resistance in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). Pestic. Biochem. Physiol. 50: 138-148 (1994).

Atkinson, T. H.; Wadleigh, R. W.; Koehler, P. G.; Patterson, R. S. Pyrethroid resistance and synergism in a field strain of the german cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). J. Econ. Entomol. 84: 1247-1250 (1991).

Ayad, H.; Georghiou, G. P. Resistance to organophosphates and carbamates in *Anopheles albimanus* based on reduced sensitivity to acetylcholinesterase. J. Econ. Entomol. 68: 295-297 (1975).

Bennett, G. W.; Spinks, W. T. Insecticide resistance of German cockroaches from various areas of Louisiana. J. Econ. Entomol. 61: 426-431 (1968).

Bernhardt, R. Cytochrome P450: structure, function, and generation of reactive oxygen species. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 127: 138-221 (1995).

Bielza, P. La resistencia a insecticidas: de los mecanismos a las estrategias de manejo. Phytoma Esp. 173: 36-38 (2005).

Bloomquist, J. R. Cyclodiene resistance at the insect GABA receptor chloride channel complex confers broad cross-resistance to convulsants and experimental phenylpyrazole insecticides. Arch. Insect. Biochem. Physiol. 26: 69-79 (1994).

Broadbent, A. B.; Pree D. J. Resistance to insecticides in populations of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) from greenhouses in the Niagara Region of Ontario. *Can. Entomol.* 129: 907-913 (1997).

Brodsgaard, H. F. 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 (1994).

Brogdon, W. G.; McAllister, J. C.; Corwin, A. M.; Cordon-Rosales, C. Oxidase-based DDT-pyrethroid cross-resistance in Guatemalan *Anopheles albimanus*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 64: 101-111 (1999).

Brooke, B. D.; Kloke, G.; Hunt, R. H.; Koekemoer, L. L.; Temu, E. A.; Taylor, M. E.; Small, G.; Hemingway, J. M.; Coetzee, M. Bioassay and biochemical analyses of insecticide resistance in southern African *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae). *Bull. Entomol. Res.* 91: 265-272 (2001).

Brown, T. M.; Brogdon, W. G. Improved detection of insecticide resistance through conventional and molecular techniques. *Annu. Rev. Entomol.* 32: 145-162 (1987).

Buckingham, S. D.; Sattelle, D .B. GABA receptors of insects. *En: Comprehensive Molecular Insect Science. Gilbert, L. I.; Iatrou, K.; Gill, S. S. (eds.). Elsevier Ltd. Oxford. Vol. 5: 107-142 (2005).*

Campbell, P. M.; Newcomb, R. D.; Rusell, R. J.; Oakeshott, J. G. Two different amino acid substitutions in the *ali*-esterase, *E3*, confer alternative types of organophosphorous insecticide resistance in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28: 139-150 (1998).

Chareonviriyaphap, T.; Rongnoparut, P.; Chantarumporn, P.; Bangs, M. J. Biochemical detection of pyrethroid resistance mechanisms in *Anopheles minimus* in Thailand. *J. Vect. Ecol.* 28: 108-116 (2003).

Chapman, P. A.; Learmount, J.; Pinniger, D. B. Insecticide resistance in *Blattella germanica* in the United Kingdom. *En: Proceedings, First International Conference on Insects Pests in the Urban Environment. Wildley, K. B.; Robinson, W. H. (eds.) BCPP Wheatons, Cambridge. 125-133 (1993).*

Chiang, F. M.; Sun, C. N. Glutathione transferase isozymes of diamondback moth larvae and their role in the degradation of some organophosphorous insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 45: 7-14 (1993).

Cisneros, F. *Control de Plagas. Ed. CIP, La Molina, Lima (1980).*

- Clark, A. G.; Shamaan, N. A.** Evidence that DDT-dehydrochlorinase from the house fly is a glutathione S-transferase. *Pestic. Biochem. Physiol.* 22: 249-261 (1984).
- Claudianos, C.; Crone, E.; Coppin, C.; Russell, R.; Oakeshott, J.** A genomics perspective on mutant aliesterases and metabolic resistance to organophosphates. En: *Agrochemical Resistance: Extent, Mechanism and Detection*. Marshall Clark, J.; Yamaguchi, I. (eds.). American Chemical Society, Washington (2002).
- Cochran, D. G.** Inheritance and linkage of pyrethrins resistance in the german cockroach. *J. Econ. Entomol.* 66: 27-30 (1973).
- Cochran, D. G.** Selection for pyrethroid resistance in the german cockroach (*Dictyoptera: Blattellidae*). *J. Econ. Entomol.* 80: 1117-1121 (1987a).
- Cochran, D. G.** Effects of synergist on bendiocarb and pyrethrins resistance in the german cockroach (*Dictyoptera: Blattellidae*). *J. Econ. Entomol.* 80: 728-732 (1987b).
- Cochran, D. G.** Monitoring for insecticide resistance in field-collected strains of the German cockroach (*Dictyoptera: Blattellidae*). *J. Econ. Entomol.* 82: 336-341 (1989).
- Cochran, D. G.** *Cockroaches: their biology, distribution and control*. World Health Organization (WHO) (ed.) (1999).
- Collar, J. L.** Principales dificultades en el control de plagas: resultados de las encuestas por IRAC España (*Insecticide Resistance Action Committee*) 2002-2004. *Phytoma Esp.* 173: 39-42 (2005).
- Cornwell, P. B.** *The Cockroach*. Vol. 1: *A Laboratory Insect and an Industrial Pest*. Hutchinson & Co. London (1968).
- Daborn, P. J.** A single P450 allele associated with insecticide resistance in global populations of *Drosophila*. *Science* 297: 2253-2256 (2002).
- Dauterman, W. C.; Hodgson, E.** Metabolism of xenobiotics. En: *Safer insecticides: Development and use*. Hodgson, E.; Kuhr, R. J. (eds.). Marcel Dekker, New York. 19-56 (1990).
- Denholm, I.; Pickett, J. A.; Devonshire, A. L.** *Insecticide resistance: from mechanisms to management*. The Royal Society, London (1999).
- Devonshire, A. L.** The properties of a carboxylesterase from the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Sulz.), and its role in conferring insecticide resistance. *Biochem. J.* 167: 675-683 (1977).
- Devonshire, A. L.; Field, L. M.** Gene amplification and insecticide resistance. *Annu. Rev. Entomol.* 36: 1-23 (1991).

Devonshire, A. L.; Moores, G. D. A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorous, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). *Pestic. Biochem. Physiol.* 18: 235-246 (1982).

DOGV nº 4942 de fecha 9 de febrero de 2005. Orden de 2 de febrero de 2005, de la Conselleria de Agricultura, Pesca i Alimentació, por la que se declara la existencia de determinados insectos vectores de virus en cultivos hortícolas y se establecen las medidas fitosanitarias obligatorias para su control en la Comunidad Valenciana [2005/1228].

Dong, K. A single amino acid change in the para sodium channel protein is associated with Knockdown-resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides in German cockroach. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27: 93-100 (1997).

Dong, K.; Scott, J. G. Linkage of *kdr*-type resistance and the para-homologous sodium channel gene in German cockroaches (*Blattella germanica*). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24: 647-654 (1994).

Dong, K.; Valles, S. M.; Scharf, M. E.; Zeichner, B. C.; Bennett, G. W. The knockdown resistance mutation in pyrethroid-resistant German cockroaches. *Pestic. Biochem. Physiol.* 60: 195-204 (1998).

Enayati, A. A.; Ranson, H.; Hemingway, J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol. Biol.* 14: 3-8 (2005).

Espinosa, P. J.; Bielza, P.; Contreras, J.; Lacasa, A. Field and laboratory selection of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) for resistance to insecticides. *Pest. Manag. Sci.* 58: 920-927 (2002a).

Espinosa, P. J.; Bielza, P.; Contreras, J.; Lacasa, A. Insecticide resistance in field populations of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) in Murcia (South-east Spain). *Pest. Manag. Sci.* 58: 967-971 (2002b).

Espinosa, P. J.; Fuentes, J. F.; Contreras, J.; Bielza, P.; Lacasa, A. Método de cría en masa de *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Boletín de Sanidad Vegetal: Plagas* 28: 385-390 (2002c).

Espinosa, P. J.; Contreras, J.; Quinto, V.; Grávalos, C.; Fernández, E.; Bielza, P. Metabolic mechanisms of insecticide resistance in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Pest. Manag. Sci.* 61: 1009-1015 (2005).

Farnham, A. W. Genetics of resistance of houseflies (*Musca domestica* L.) to pyrethroids. I. Knock-down resistance. *Pestic. Sci.* 8: 631-636 (1977).

Feyereisen, R. Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicol. Lett.* 82-83: 83-90 (1995).

- Feyereisen, R.** *Insect P450 enzymes.* Annu. Rev. Entomol. 44: 507-533 (1999).
- Feyereisen, R.** *Insect cytochrome P450.* En: Comprehensive Molecular Insect Science. Gilbert, L. I.; Iatrou, K.; Gill, S. S. (eds.). Elsevier Ltd. Oxford. Vol.4: 1-77 (2005).
- ffrench-Constant, R. H.** *The molecular and population genetics of cyclodiene insecticide resistance.* Insect Biochem. Mol. Biol. 24: 335-345 (1994).
- ffrench-Constant, R. H.; Roush, R. T.** *Resistance detection and documentation: the relative roles of pesticidal and biochemical assays.* En: Pesticide resistance in arthropods. Roush, R. T.; Tabashnik, B. (eds.). Chapman and Hall, New York. 4-38 (1990).
- ffrench-Constant, R. H.; Rocheleau, T. A.; Steichen, J. C.; Chalmers, A. E.** *A point mutation in a Drosophila GABA receptor confers insecticide resistance.* Nature 363: 449-451 (1993).
- ffrench-Constant, R. H.; Daborn, P. J.; Le Goff, G.** *The genetics and genomics of insecticide resistance.* Trends Genet. 20: 163-170 (2004).
- Field, L. M.; Devonshire, A. I.; Forde, B. G.** *Molecular evidence that insecticide resistance in peach-potato aphids (Myzus persicae Sulz.) results from an amplification of an esterase gene.* Biochem. J. 251: 309-312 (1988).
- Forcioli, D.; Frey, B.; Frey J. E.** *High nucleotide diversity in the para-like voltage-sensitive sodium channel gene sequence in the western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae).* J. Econ. Entomol. 95: 838-848 (2002).
- Forgash, A. J.; Cook, B. J.; Riley, R. C.** *Mechanisms of resistance in diazinon-selected multi-resistant Musca domestica.* J. Econ. Entomol. 55: 544-551 (1962).
- Fournier, D.; Mutero, A.** *Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides.* Comp. Biochem. Physiol. 108C: 19-31 (1994).
- Fournier, D.; Karch, F.; Bride, J. M.; Hall, L. M. C.; Bergb, J. B.; Spierer, P.** *Drosophila melanogaster acetylcholinesterase gene. Structure, evolution and mutations.* J. Mol. Biol. 210:15-22 (1989).
- Gammon, D. W.** *Pyrethroid resistance in a strain of Spodoptera littoralis is correlated with decreased sensitivity of the CNS in vitro.* Pestic. Biochem. Physiol. 13: 53-62 (1980).

-
- Georghiou, G. P.** Overview of insecticide resistance. En: *Managing resistance to agrochemicals*. Green, M. B.; LeBaron, H. M.; Moberg, W.K. (eds.). American Chemical Society, Washington. 18-41 (1990).
- Georghiou, G. P.; Saito, T.** *Pest resistance to pesticides*. Plenum Press, New York (1983).
- Grant, D. F.; Matsumura, F.** *Glutathione S-transferase-1 in Aedes aegypti larvae. Purification and properties*. *Insect Biochem.* 18: 615-622 (1988).
- Guerrero, F. D.; Jamroz, R. C.; Kammlah, D.; Kunz, S. E.** *Toxicological and molecular characterization of pyrethroid-resistant horn flies, Haematobia irritans: Identification of kdr and super-kdr point mutations*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27: 745-755 (1997).
- Gunning, R. V.; Easton, C. S.; Balfe, M. E.; Ferris, I. G.** *Pyrethroid resistance mechanisms in Australian Helicoverpa armigera*. *Pestic. Sci.* 33: 473-490 (1991).
- Gunning, R. V.; Moores, G. D.; Devonshire, A. L.** *Esterases and esfenvalerate resistance in Australian Helicoverpa armigera (Hübner) Lepidoptera: Noctuidae*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 54: 12-23 (1996).
- Hansen, K. K.; Kristensen, M.; Vagn Jensen, K.-M.** *Correlation of a resistance-associated Rdl mutation in the German cockroach, Blattella germanica (L), with persistent dieldrin resistance in two danish field populations*. *Pest Manag. Sci.* 61: 749-753 (2005).
- Harold, J. A.; Ottea, J. A.** *Toxicological significance of enzyme activities in profenofos-resistant tobacco budworms, Heliothis virescens (F.)*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 58: 23-33 (1997).
- Head, D. J.; McCaffery, A. R.; Callaghan, A.** *Novel mutations in the para-homologous sodium channel gene associated with phenotypic expression of nerve insensitivity resistance to pyrethroids in Heliothine Lepidoptera*. *Insect Mol. Biol.* 7: 191-196 (1998).
- Hemingway, J.; Georghiou, G. P.** *Studies on the acetylcholinesterase of Anopheles albimanus resistant and susceptible to organophosphate and carbamate insecticides*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 19: 167-71 (1983).
- Hemingway, J.; Ranson, H.** *Insecticide resistance in insect vectors of human disease*. *Annu. Rev. Entomol.* 45: 371-391 (2000).
- Hemingway, J.; Miyamoto, J.; Herat, P. R. J.** *A possible novel link between organophosphorous and DDT insecticide resistance genes in Anopheles: supporting evidence from fenitrothion metabolism studies*. *Pest. Biochem. Physiol.* 39: 49-56 (1991).
- Hemingway, J.; Small, G. J.; Monro, A. G.** *Possible mechanisms of*

organophosphorous and carbamate insecticide resistance in German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) from different geographical areas. J. Econ. Entomol. 86: 1623-1630 (1993a).

Hemingway, J.; Dunbar, S. J.; Monro, A. G.; Small, G. J. *Pyrethroid resistance in German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae): resistance levels and underlying mechanisms. J. Econ. Entomol. 86: 1631-1638 (1993b).*

Hemingway, J.; Small, G. J.; Lindsay, S. W.; Collins, F. H. *Combined use of biochemical, immunological and molecular assays for infection, species identification and resistance detection in field populations of Anopheles (Diptera: Culicidae). En: The ecology of agricultural pests: biochemical approaches. Symondson, W. O. C.; Liddell, J. E. (eds.). Chapman and Hall, London. 31-49 (1996).*

Hemingway, J.; Field, L.; Vontas, J. *An overview of insecticide resistance. Science 298: 96-97 (2002).*

Hemingway, J.; Hawkes, N. J.; McCarroll, L.; Ranson, H. *The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. Insect Biochem. Mol. Biol. 34: 653-665 (2004).*

Hernández, D.; Mansanet, V.; Puiggros, J. M. *Use of Confidor 200 SL in vegetable cultivation in Spain. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 3: 364-375 (1999).*

Herron, G. A.; Gullick, G. C. *Insecticide resistance in Australian populations of Frankliniella occidentalis (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) causes the abandonment of pyrethroid chemicals for its control. Gen. Appl. Entomol. 30: 21-26 (2001).*

Hodgson, E. *Microsomal monooxygenases. En: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Kerkut, G. A.; Gilbert, L. I. (eds.). Pergamon Press Ltd. Oxford. Vol. 11: 225-321 (1985).*

Holbrook, G. L.; Roebuck, J.; Moore, C. B.; Waldvogel, M. G.; Schal, C. *Origin and extent of resistance to fipronil in the German cockroach, Blattella germanica (L.) (Dictyoptera: Blattellidae). J. Econ. Entomol. 96: 1548-1558 (2003).*

<http://www.roachcontrol.com/german.htm>. Fecha de acceso: 8 febrero 2007 (2007).

Huang, G.; Liu, J. M.; Liu, W. Y. *Resistance to five pesticides of Blattella germanica from cities of Hebei Province. Chin. J. Vec. Biol. Contr. 10: 285-287 (1999).*

-
- Immaraju, J. A.; Paine, T. D.; Bethke, J. A.; Robb, K. L.; Newman, J. P.** Western flower thrips (*Thysanoptera: Thripidae*) resistance to insecticides in coastal California greenhouses. *J. Econ. Entomol.* 85: 9-14 (1992).
- Infoagro.** <http://www.infoagro.com/hortalizas/trips.htm>. Fecha de acceso: 8 febrero 2007 (2007).
- IRAC (Insecticide Resistance Action Committee).** <http://www.iraconline.org/resources/guide.asp>. Fecha de acceso 8 febrero 2007 (2007).
- Jensen, S. E.** Acetylcholinesterase activity associated with methiocarb resistance in a strain of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Pestic. Biochem. Physiol.* 61: 191-200 (1998).
- Jensen, S. E.** Mechanisms associated with methiocarb resistance in *Frankliniella occidentalis* (*Thysanoptera: Thripidae*). *J. Econ. Entomol.* 93: 464-471 (2000).
- Kadous, A. A.; Ghiasuddin, S. M.; Matsumura F.; Scott J. G.; Tanaka, K.** Difference in the picrotoxinin receptor between the cyclodiene-resistant and susceptible strains of the German cockroach. *Pest. Biochem. Physiol.* 19: 157-66 (1983).
- Kanga, L. H. B.; Plapp, F. W. J.** Target-site insensitivity as the mechanism of resistance to organophosphorous, carbamate, and cyclodiene insecticides in tobacco budworm adults. *J. Econ. Entomol.* 88: 1150-1157 (1995).
- Kanga, L. H. B.; Pree, D. J.; Van Lier, J. L.; Whitty, K. J.** Mechanisms of resistance to organophosphorous and carbamate insecticides in oriental fruit moth populations (*Grapholita molesta* Busck). *Pestic. Biochem. Physiol.* 59: 11-23 (1998).
- Keller, J. C.; Clark, P. H.; Lofgren, C. S.; Wilson, H. G.** Recent progress in research on the control of cockroaches. *Pest Control* 24: 12-20 (1956a).
- Keller, J. C.; Clark, P. H.; Lofgren, C. S.** Susceptibility of insecticide-resistant cockroaches to pyrethrins. *Pest Control* 24: 14-30 (1956b).
- Kirk, W. D. J.** *Thrips.* The Richmond Publishing Co. Ltd. Slough (1996).
- Kontsedalov, S.; Weintraub, P. G.; Horowitz, A. R.; Ishaaya, I.** Effects of insecticides on immature and adult western flower thrips (*Thysanoptera: Thripidae*) in Israel. *J. Econ. Entomol.* 91: 1067-1071 (1998).
- Kostaropoulos, I.; Papadopoulos, A. I.; Metaxakis, A.; Boukouvala, E.; Papadopoulou-Mourkidou, E.** Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31: 313-319 (2001).
- Kristensen, M.; Klingenberg Hansen, K.; Vagn Jensen, K. M.** Cross-resistance between dieldrin and fipronil in German cockroach (*Dictyoptera:*

- Blattellidae*). J. Econ. Entomol. 98: 1305-1310 (2005).
- Lacasa, A.** *Un trienio de Frankliniella occidentalis en España: Evolución temporal y espacial de una plaga importada.* Phytoma Esp. 6: 3-8 (1990).
- Ladonni, H.** *Susceptibility of different field strains of Blattella germanica to four pyrethroids (Orthoptera: Blattellidae).* Iranian J. Publ. Health 26: 35-40 (1997).
- Ladonni, H.** *Permethrin resistance ratios compared by two methods of testing nymphs of the German cockroach, Blattella germanica.* Med. Vet. Entomol. 14: 213-216 (2000).
- Lin, L. F.; Lu, W. C.; Cai, S. W.** *Monitoring for insecticide resistance in field-collected strains of the German cockroach in Guangdong.* Chin. J. Vec. Biol. Contr. 11: 32-34 (2000).
- Menozi, P.; Shi, M. A.; Lougarre, A.; Tang, Z. H.; Fournier, D.** *Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in Drosophila melanogaster populations.* BMC Evolutionary Biol. 4: 4-11 (2004).
- Milio, J. F.; Koehler, P. G.; Patterson, R. S.** *Evaluation of three methods for detecting Chlorpyrifos resistance in German cockroach (Orthoptera: Blattellidae) populations.* J. Econ. Entomol. 80: 44-46 (1987).
- Miller, T. A.** *Mechanisms of resistance to pyrethroid insecticides.* Parasit. Today 4: S10-S11 (1988).
- Miyazaki, M.; Ohyama, K.; Dunlap, D. Y.; Matsumura, F.** *Cloning and sequencing of the para-type sodium channel gene from susceptible and kdr-resistant german cockroaches (Blattella germanica) and house fly (Musca domestica).* Mol. Gen. Genet. 252: 61-68 (1996).
- Mullin, C. A.; Scott, J. G.** *Molecular mechanisms of insecticide resistance: diversity among insects.* American Chemical Society, Washington (1992).
- Newcomb, R. D.; Campbell, P. M.; Rusell, R. J.; Oakeshott, J. G.** *cDNA cloning, baculovirus-expression and kinetic properties of the esterase, E3, involved in organophosphorous resistance in Lucilia cuprina.* Insect Biochem. Mol. Biol. 27: 15-25 (1997).
- Nicholson, R. A.; Miller, T. A.** *Multifactorial resistance to transpermethrin in field-collected strains of the tobacco budworm Heliothis virescens F.* Pestic. Sci. 16: 561-471 (1985).
- Oakeshott, J. G.; Claudianos, C.; Campbell, P. M.; Newcomb, R. D.; Rusell, R. J.** *Biochemical genetics and genomics of insect esterases.* En: Comprehensive Molecular Insect Science. Gilbert, L. I.; Iatrou, K.; Gill, S. S. (eds.). Elsevier Ltd. Oxford. Vol. 5: 309-381 (2005).

Omer, S. M.; Georgiou, G. P.; Irving, S. N. DDT/pyrethroid resistance inter-relationships in *Anopheles stephensi*. *Mosquito News* 40: 200-209 (1980).

Oppenoorth, F. J. Biochemistry of insecticide resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.* 22: 187-193 (1984).

Oppenoorth, F. J. Biochemistry and genetics of insecticide resistance. *En: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology.* Kerkut, G. A.; Gilbert, L. I. Pergamon Press, Ltd. Oxford. Vol. 12: 731-773 (1985).

Oppenoorth, F. J.; Van der Pas, L. J. T.; Houx, N. W. H. Glutathione S-transferase and hydrolytic activity in a tetrachlorvinphos-resistant strain of housefly and their influence on resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.* 11: 176-188 (1979).

Park, Y.; Taylor, M. F. J. A novel mutation L1029H in sodium channel gene *hscp* associated with pyrethroid resistance for *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 27: 9-13 (1997).

Prabhakaran, S. K.; Kamble, S. T. Activity and electrophoretic characterization of esterases in insecticide-resistant and susceptible strains of german cockroach (*Dictyoptera: Blattellidae*). *J. Econ. Entomol.* 86: 1009-1013 (1993a).

Prabhakaran, S. K.; Kamble, S. T. Subcellular distribution and characterization of esterase isozymes from insecticide-resistant and -susceptible strains of German cockroach (*Dictyoptera: Blattellidae*). *J. Econ. Entomol.* 87: 541-545 (1993b).

Prabhakaran, S.K.; Kamble, S. T. Purification and characterization of an esterase isozyme from insecticide resistant and susceptible strains of german cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25: 519-524 (1995).

Prabhakaran, S. K.; Kamble, S. T. Biochemical characterization and purification of esterases from three strains of German cockroach, *Blattella germanica* (*Dictyoptera: Blattellidae*). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 31: 73-86 (1996).

Prapanthadara, L.; Hemingway, J.; Ketterman, A. J. DDT-resistance in *Anopheles gambiae* Giles from Zanzibar Tanzania, based on increased DDT-dehydrochlorinase activity of glutathione S-transferases. *Bull. Entomol. Res.* 85: 267-274 (1995).

Price, N. R. Insect resistance to insecticides: mechanisms and diagnosis. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C: 319-326 (1991).

Race, S. R. Early-season thrips control on cotton in New Mexico. *J. Econ.*

Entomol. 54: 974-976 (1961).

Ranson, H.; Hemingway, J. Glutathione Transferases. En: Comprehensive Molecular Insect Science. Gilbert, L. I.; Iatrou, K.; Gill, S. S. (eds.). Elsevier Ltd. Oxford. Vol 5: 383-402 (2005).

Riskallah, M. R. Esterases and resistance to synthetic pyrethroids in Egyptian cotton leafworm. Pestic. Biochem. Physiol. 19: 184-189 (1983).

Riudavets, J. Depredadors autòctons per al control biològic de *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) en conreus hortícoles. Tesis Doctoral. Universitat de Lleida (1995).

Robb, K. L. Analysis of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) as a pest of floricultural crops in California greenhouses. Ph. D. Dissertation. University of California (1989).

Robb, K. L.; Newman, J.; Virzi, J. K.; Parrilla, M. P. Insecticide resistance in western flower thrips. En: Thrips biology and management. Parker, B. L.; Skinner, M.; Lewis, T. (eds.). Plenum Press. New York. 341-346 (1995).

Robinson, W.; Zhai, J. Pyrethroid resistance in German cockroaches. Pest. Control. Technol. 18: 26-30 (1990).

Ross, M. H., Mullins, D. E. Biology. En: Understanding and controlling the German cockroach. Rust, M. K.; Owens, J. M.; Reiersen, D. A. (eds.). Oxford University Press. Oxford. Cap. 2: 21-47 (1995).

Roush, R. T.; Daly, J. C. The role of population genetics in resistance research and management. En: Pesticide resistance in arthropods. Roush, R. T.; Tabashnik, B. E. (eds.). Chapman and Hall. New York. 97-152 (1990).

Roush, R. T.; McKenzie, J. A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. Annu. Rev. Entomol. 32: 361-380 (1987).

Roush, R. T.; Tabashnik, B. E. Pesticide resistance in arthropods. Chapman and Hall, New York (1990).

Rust, M. K.; Reiersen, D. A. Chlorpyrifos resistance in German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) from restaurants. J. Econ. Entomol. 84: 736-740 (1991).

Sattelle, D. B. GABA receptors of insects. Adv. Insect Physiol. 22: 1-113 (1990).

Sawicki, R. M. Definition, detection and documentation of insecticide resistance. En: Combating Resistance to Xenobiotics: Biochemical and Chemical Approaches. Ford, M. G.; Holloman, D. W.; Khambay, B. P. S.; Sawicki, R. M. (eds.). Chichester. 105-117 (1987).

Schal, C. Relation among efficacy of insecticides, resistance levels and

-
- sanitation in the control of the German cockroach (*Dictyoptera: Blattellidae*). *J. Econ. Entomol.* 81: 526-544 (1988).
- Scharf, M. E.; Kaakeh, W.; Bennett, G. W.** Changes in an insecticide-resistant field population of German cockroach after exposure to an insecticide mixture. *J. Econ. Entomol.* 90: 38-48 (1997).
- Scharf, M. E.; Neal, J. J.; Marcus, C. B.; Bennett, G. W.** Cytochrome P450 purification and immunological detection in an insecticide resistant strain of German cockroach. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28: 1-9 (1998a).
- Scharf, M. E.; Neal, J. J.; Bennett, G. W.** Changes of insecticide resistance levels and detoxification enzymes following insecticide selection in the German cockroach. *Pestic. Biochem. Physiol.* 59:67-79 (1998b).
- Scharf, M. E.; Lee, C. Y.; Neal, J. J.; Bennett, G. W.** Cytochrome P450 MA expression in insecticide-resistant German cockroaches (*Dictyoptera: Blattellidae*). *J. Econ. Entomol.* 92: 788-793 (1999).
- Scott, J.G.** Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29: 757-777 (1999).
- Scott, J. G.; Matsumura, F.** Characteristics of a DDT-induced case of cross-resistance to permethrin in *Blattella germanica*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 16: 21-27 (1981).
- Scott, J. G.; Matsumura, F.** Evidence for two types of toxic actions of pyrethroids on susceptible and DDT-resistant German cockroaches. *Pestic. Biochem. Physiol.* 19: 141-150 (1983).
- Scott, J. G.; Wen, Z.** Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. *Pest Manag. Sci.* 57: 958-967 (2001).
- Scott, J. G.; Cochran, D. G.; Siegfried, B. D.** Insecticide toxicity, synergism, and resistance in the German cockroach (*Dictyoptera: Blattellidae*). *J. Econ. Entomol.* 83: 1698-1703 (1990).
- Siegfried, B. D.; Scott, J. G.** Mechanisms responsible for propoxur resistance in the German cockroach. *Pestic. Sci.* 33: 133-146 (1991).
- Siegfried, B. D.; Scott, J. G.** Insecticide resistance mechanisms in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *En: Molecular Mechanisms of Insecticide Resistance. Christopher, A. M.; Scott, J. G. (eds.). American Chemical Society. Washington.* 218-230 (1992).
- Siegfried, B. D.; Scott, J. G.; Roush, R. T.; Zeichner, B. C.** Biochemistry and genetics of chlorpyrifos resistance in the German cockroach, *Blattella germanica* L. *Pestic. Biochem. Physiol.* 38: 110-121 (1990).
- Soderlund, D. M.** Sodium channels. *En: Comprehensive Molecular Insect Science. Gilbert, L. I.; Iatrou, K.; Gill, S. S. Elsevier Ltd. Oxford. Vol. 5: 1-24*

(2005).

Soderlund, D. M.; Knipple, D. C. Knockdown resistance to DDT and pyrethroids in the house fly (*Diptera: Muscidae*): from genetic trait to molecular mechanism. *Ann. Ent. Soc. Amer.* 92: 909-915 (1999).

Soderlund, D. M.; Knipple, D. C. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33: 563-577 (2003).

Sogorb, M. A.; Vilanova, E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorous, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol. Lett.* 128: 215-228 (2002).

Sparks, T. C.; Lockwood, J. A.; Byford, R. L.; Graves, J. B.; Leonard, B. R. The role of behavior in insecticide resistance. *Pestic. Sci.* 26: 383-399 (1989).

Tan, J.; Liu, Z.; Tsai, T. D.; Valles, S. M.; Goldin, A. L.; Dong, K. Novel sodium channel gene mutations in *Blattella germanica* reduce the sensitivity of expressed channels to deltamethrin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 445-454 (2002).

Taylor, M. F. J.; Heckel, D. G.; Brown, T. M.; Kreitman, M. E.; Black, B. Linkage of pyrethroid insecticide resistance to a sodium channel locus in the tobacco budworm. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23: 763-775 (1993).

Umeda, K.; Yano, T.; Hirano, M. Pyrethroid resistance mechanisms in the german cockroach, *Blattella germanica*. *Appl. Entomol. Zool.* 23: 373-380 (1988).

Umeda, K.; Shono, T.; Hirano, M.; Takahashi, M. Reduced nerve sensitivity as a resistant mechanism to a pyrethroid in *Culex tritaeniorhynchus* from Okinawa. *J. Pestic. Sci.* 15: 599-601 (1990).

Vagn-Jensen, K. M. Developing permethrin resistance among local populations of *Blattella germanica* in Denmark. *Dan. Pest. Infest. Lab. Annu. Rep.* 88: 59 (1987).

Valles, M. V. Toxicological and biochemical studies with field populations of the German cockroach, *Blattella germanica*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 62: 190-200 (1998).

Valles, M. V. λ -Cyalothrin resistance detection in the German cockroach (*Blattodea: Blattellidae*). *J. Econ. Entomol.* 92: 293-297 (1999).

Valles, S. M.; Strong, C. A. A microsomal esterase involved in cypermethrin resistance in the German cockroach, *Blattella germanica*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 71: 56-67 (2001).

Valles, S. M.; Yu, S. J. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 89: 21-26 (1996).

Valles, S. M.; Dong, K.; Brenner, R. J. Mechanisms responsible for cypermethrin resistance in a strain of German cockroach, *Blattella germanica*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 66: 195-205 (2000).

van de Baan, H. E.; Croft, B. A. Resistance to insecticides in winter- and summer-forms of pear psylla, *Psylla pyricola*. *Pestic. Sci.* 32:225-233 (1991).

van der Blom, J. <http://www.agroinformacion.com/leer-articulo.aspx?not=412>. Fecha de acceso: 8 febrero 2007 (2005).

Vontas, J. G.; Small, G. J.; Hemingway, J. Comparison of esterase gene amplification, gene expression and esterase activity in insecticide susceptible and resistant strains of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal). *Insect Mol. Biol.* 9: 655-660 (2000).

Vontas, J. G.; Small, G. J.; Hemingway, J. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem. J.* 357: 65-72 (2001).

Vulule, J. M.; Beach, R. F.; Atieli, F. K.; McAllister, J. C.; Brogdon, W. G.; Roberts, J. M.; Mwangi, R. W.; Hawley, W. A. Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin impregnated nets. *Med. Vet. Entomol.* 13: 239-244 (1999).

Weill, M.; Lutfalla, G.; Mogensen, K.; Chandre, F.; Berthomieu, A.; Berticat, C.; Pasteur, N.; Philips, A.; Fort, P.; Raymond, M. Comparative genomics: insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* 423: 136-137 (2003).

Williamson, M. S.; Denholm, I.; Bell, C. A.; Devonshire, A. L. Knockdown resistance (*kdr*) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene locus in the housefly (*Musca domestica*). *Mol. Gen. Genet.* 240: 17-22 (1993).

Williamson, M. S.; Martínez-Torres, D.; Hick, C. A.; Devonshire, A. L. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. *Mol. Gen. Genet.* 252: 51-60 (1996).

Wu, D.; Scharf, M. E.; Neal, J. J.; Suiter, D. R.; Bennett, G. W. Mechanisms of fenvalerate resistance in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Pestic. Biochem. Physiol.* 61: 53-62 (1998).

Yu, S. J. *Insect glutathione S-transferases*. Zoological Studies 35: 9-19 (1996).

Zhao, G.; Liu, W.; Brown, J. M.; Knowles, C. O. *Insecticide resistance in field and laboratory strains of western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae)*. J. Econ. Entomol. 88: 1164-1170 (1995).

Zhu, K. Y.; Gao, J. R. *Kinetic properties and variability of esterases in organophosphate-susceptible and -resistant greenbugs, Schizaphis graminum (Homoptera: Aphididae)*. Pestic. Biochem. Physiol. 55: 11-17 (1998).



Procedimientos y Técnicas Experimentales

Una detección fiable constituye un elemento clave en el control de la resistencia en insectos. Demostrar que existe resistencia, como fenómeno genético que es, supone poner de manifiesto los fenotipos resistente y sensible.

Existen numerosas estrategias que se pueden emplear para detectar insectos resistentes. Históricamente se han empleado los bioensayos convencionales como primera herramienta diagnóstica. El bioensayo permite evaluar la sensibilidad de una determinada población de insectos a un insecticida. Cuando éste entra en contacto con el insecto debe penetrar la cutícula y atravesar los tejidos hasta llegar a su diana, pudiendo ser metabolizado a lo largo del recorrido. En individuos sensibles esto sucede en un tiempo dado; todo aquello que suponga una interferencia o retraso en este proceso puede ser considerado resistencia (Brogdon y McAllister, 1998). Los métodos dosis diagnóstico y análisis probit-log son los más comúnmente empleados para la detección y seguimiento de la resistencia, incluso en sus estadios iniciales. Sin embargo, estos métodos no permiten dilucidar la naturaleza de los mecanismos subyacentes a dicha resistencia (French-Constant y Roush, 1990).

Una de las formas más rápidas y sencillas de obtener información preliminar sobre los posibles mecanismos implicados en la resistencia es el empleo de compuestos sinérgicos. Empleando un sinérgico, al comparar una población sensible con una resistente, es posible comprobar qué mecanismo (el inhibido por el sinérgico) está implicado en la resistencia (Scott, 1990).

Avanzando en este sentido, se sitúan las técnicas bioquímicas y moleculares ampliamente usadas en la actualidad. Mediante ellas, las poblaciones resistentes pueden ser caracterizadas por la presencia de un mecanismo de defensa, que en las poblaciones sensibles estará ausente o expresado a muy bajos niveles. Así, el uso de determinados sustratos modelo ha permitido relacionar incrementos en los niveles de algunas de las actividades enzimáticas implicadas en la biotransformación de los insecticidas con la resistencia (Sawicki et al., 1980; Pasteur y Georgiou,

1981; Devonshire y Moores, 1982; Brogdon y Dickinson, 1983; Byrne y Devonshire, 1991; Rose et al., 1995; Guerrero et al., 1999). Estos ensayos in vitro aportan evidencias indirectas, puesto que, a ciencia cierta, no sabemos cuáles son realmente las enzimas implicadas en el metabolismo de los sustratos modelo, y si coinciden con las implicadas en la resistencia. Sin embargo, estas pruebas son útiles desde el momento en el que se aprecien diferencias entre las distintas poblaciones (resistente y sensible), y, además, permiten el análisis individual de los insectos (Devonshire, 1989). Por ello nos centraremos en ellas a partir de ahora.

La diferencia en la actividad enzimática entre una población resistente y una sensible puede hacerse máxima si se optimizan las condiciones de ensayo de aquellas implicadas en la resistencia (Zhou et al., 2003). Con este fin, en la presente Tesis se llevaron a cabo toda una serie de experimentos para adaptar y optimizar los ensayos propuestos en la bibliografía para la medida de las actividades enzimáticas, a las características bioquímicas de las dos especies objeto de nuestro estudio, *Blattella germanica* y *Frankliniella occidentalis*. Estos experimentos constituyen pues la primera fase del trabajo, conducente a identificar los mecanismos implicados en la resistencia a insecticidas en poblaciones de estas dos especies de insectos, y la base para evaluar el potencial de estas actividades como posibles herramientas de diagnóstico. Junto con los bioensayos tradicionales, podrían proporcionar información sobre la dinámica y evolución de la resistencia en poblaciones de campo, conocimientos básicos a la hora de diseñar estrategias racionales para el control de plagas.

3-1. Ensayos originales: condiciones de reacción

Para medir la actividad de una enzima es necesario un procedimiento analítico sencillo que determine la desaparición del sustrato o la aparición de los productos de la reacción (Cox y Nelson, 2005). Para ello es preciso distinguir al final de la reacción los sustratos del/de los productos formados. Esto hace necesario que o bien el sustrato o bien el producto tengan alguna característica fácilmente cuantificable y proporcional a su concentración. Generalmente los sustratos naturales no tienen propiedades espectrales significativas y por ello se emplean sustratos artificiales (productos modificados químicamente para producir una sustancia con una propiedad

espectral particular). De este modo distinguimos dos tipos de técnicas: los métodos continuos en los que se hace un seguimiento directo de la reacción, y los métodos de punto final, donde la enzima es incubada con el sustrato durante un periodo de tiempo determinado, y a continuación la reacción se detiene, para luego medir el producto formado (cinética de punto final).

Uno de los mayores obstáculos en la identificación y caracterización bioquímica de las actividades enzimáticas implicadas en la resistencia es la elección del sustrato para medir dicha actividad en presencia de las múltiples isoenzimas que conforman estas familias. Existen gran cantidad de estudios donde se describe la medida de las actividades enzimáticas empleando sustratos colorimétricos como el p-nitrofenil acetato (p-NPA) o el α -naftil acetato (α -NA) en el caso de las esterasas, o el CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno) y el DCNB (1,2-dicloro-4-nitrobenzoceno) en el de las GSTs. Estos sustratos son adecuados en cuanto que tienen un bajo costo, requieren equipos relativamente accesibles para su cuantificación (ensayos colorimétricos), y sus propiedades físicas y químicas los hacen fácilmente solubles. El uso de sustratos o productos fluorescentes (7-etoxirresorrufina, o 7-metoxirresorrufina por ejemplo) permite hacer medidas cinéticas más sensibles de las reacciones enzimáticas. Es el caso de la medida de las actividades P450. Sin embargo, es probable que, de todas las isoenzimas presentes, no todas transformen estos sustratos eficazmente. Por ello, y dada la probabilidad de que en la muestra estén presentes numerosas isoformas distintas, sería altamente recomendable emplear más de un sustrato para realizar un examen lo más completo posible de la actividad enzimática en estudio.

Los ensayos empleados en la presente Tesis fueron elegidos en base a los descritos en la literatura para las especies aquí estudiadas y para otros insectos plaga. En concreto se analizaron las actividades GST frente a los sustratos CDNB y DCNB, esterasa frente a los sustratos p-NPA y α -NA, y P450 frente al sustrato 7-etoxirresorrufina. Estos ensayos son ampliamente utilizados en muchos laboratorios para la detección y estudio de los mecanismos implicados en la resistencia.

3-1.1. Actividad glutatión S-transferasa (GST).

Para la medida de la actividad GST frente al CDNB se adaptó el ensayo descrito por Habig y Jackoby en 1981, donde se sigue

espectrofotométricamente la aparición de un conjugado entre el glutatión reducido (GSH) y el sustrato (CDNB) (**Fig. 3-1**).

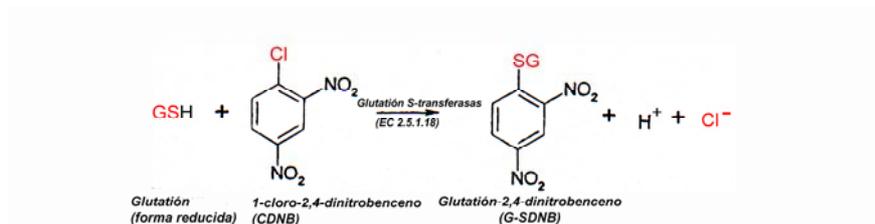


Figura 3-1. Esquema de la reacción en el ensayo de la actividad GST frente al CDNB.

En base al ensayo original se propuso el siguiente protocolo de partida:

Volumen en el pocillo (Vp) = 100 μ L

50 μ L homogeneizado (diluido)

50 μ L mezcla de reacción

- GSH 5 mM (concentración final)
- CDNB 1 mM (concentración final)
- Disolución reguladora del pH fosfato potásico 0,1 M, pH 6,5;
1 mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (**disolución de ensayo I**)

340 nm, $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

30°C, 2 min

También se empleó el ensayo original de Habig y Jackoby (1981) para la medida de la actividad GST frente al DCNB. Al igual que con el CDNB se sigue espectrofotométricamente la aparición de un conjugado, esta vez entre el GSH y el sustrato (DCNB) (**Fig. 3-2**).

Las condiciones que se emplearon en nuestros ensayos preliminares fueron:

$V_p = 100 \mu\text{L}$

50 μL homogeneizado

50 μL mezcla de reacción

- GSH 5 mM (concentración final)
- DCNB 1 mM (concentración final)
- Disolución reguladora del pH fosfato potásico 0,1 M, pH 7,5; 1 mM EDTA
(**disolución de ensayo I a pH 7,5**)

340 nm, $\epsilon = 8,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

30°C, 2 min

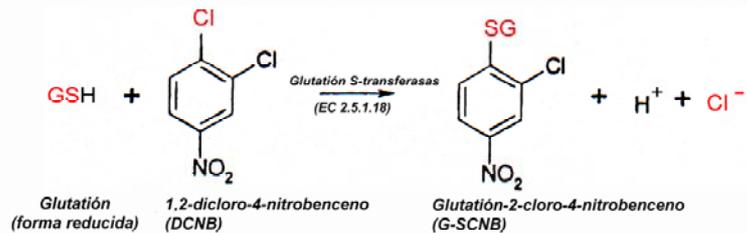


Figura 3-2. Esquema de la reacción en el ensayo de la actividad GST frente al DCNB.

3-1.2. Actividad esterasa (CaE).

Para la medida de la actividad CaE se adaptaron los ensayos de Townson (1972) y Van Asperen (1962), utilizando directamente sustratos cromogénicos para los ésteres del nitrofenol (ensayo p-NPA), o bien mediante reacción acoplada con un compuesto azo para los ésteres de naftol, empleando α -NA como sustrato.

En el ensayo con el p-NPA se sigue la rotura, a lo largo del tiempo y catalizada por las esterasas, de este sustrato en p-nitrofenol (longitud de onda de máxima absorción, 400 nm) y acetato (**Fig. 3-3**).

Las condiciones inicialmente propuestas fueron:

$V_p = 100 \mu\text{L}$

50 μL homogeneizado (diluido)

50 μL mezcla de reacción

➤ p-NPA 1 mM (concentración final)

➤ Disolución reguladora del pH fosfato sódico 0,1 M, pH 7,4

(disolución de ensayo II)

415 nm, $\epsilon = 6,53 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (de Scharf et al., 1998)

30°C, 2 min

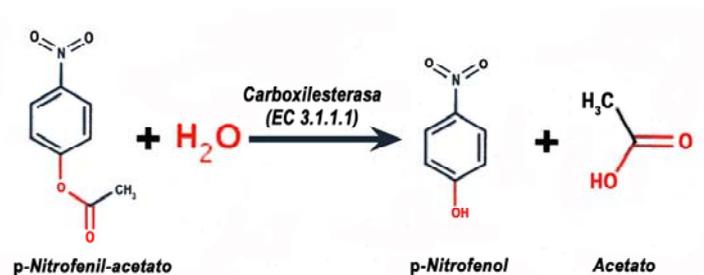


Figura 3-3. Esquema de la reacción, catalizada por las CaE, con el p-nitrofenil acetato como sustrato.

Para el análisis de la actividad CaE frente al α -NA se adaptó el ensayo descrito por Van Asperen (1962). El principio en el que se basa se resume en la siguiente reacción (**Fig. 3-4**):

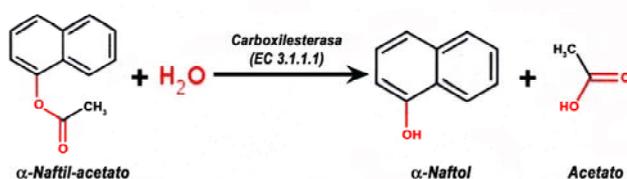


Figura 3-4. Esquema de la reacción, catalizada por las CaE, con el α -naftil acetato como sustrato.

Ciertas esterasas hidrolizan el α -NA. El naftol liberado se hace reaccionar con una sal de diazonio para formar un compuesto azo coloreado. La reacción se detiene (cinética de punto final) al provocar la desnaturalización de la enzima por efecto del detergente dodecil sulfato de

sodio (SDS). El compuesto azo formado presenta su máximo de absorción a 595 nm.

Condiciones iniciales:

Volumen de ensayo = 130 μL

Volumen de reacción = 100 μL

50 μL homogeneizado (diluido)
 50 μL mezcla de reacción
 > α -NA 0,375 mM (concentración final)
 > Disolución reguladora del pH fosfato sódico 0,1 M, pH 7,5
 (disolución de ensayo II a pH 7,5)
 ↓
 incubar, 30°C, 5 min
 30 μL mezcla para detener la reacción
 > sal de zinc y de la ortodiansidina bis diazotizada (FBB) 1 %
 > dodecil sulfato sódico (SDS) 5 %
 incubar, 30°C, 10 min

595 nm

3-1.3. Actividad 7-etoxirresorrufina-O-desetilasa (EROD).

En la cuantificación de la actividad EROD se empleó el método fluorimétrico de medida directa descrito por Burke y Mayer (1974). Este método se basa en la incubación del sustrato 7-etoxirresorrufina con la muestra y el cofactor (NADPH: nicotiamida-adenina dinucleotido fosfato) a un pH adecuado (Fig. 3-5). La fluorescencia aumenta debido a la formación del producto resorrufina.

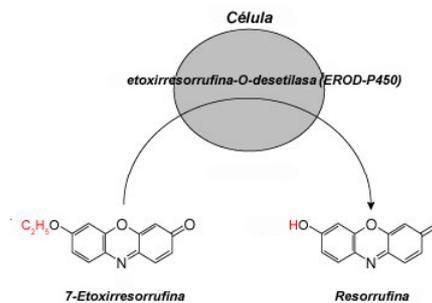


Figura 3-5. Esquema de la reacción de desalquilación de la 7-etoxirresorrufina catalizada por las P450.

Las condiciones empleadas se resumen en el siguiente esquema:

$V_p = 100 \mu\text{L}$

50 μL homogeneizado

50 μL mezcla de reacción

- NADPH 250 μM (concentración final)
- 7-etoxirresorrufina 60 μM (concentración final, en dimetilsulfóxido)
- Disolución reguladora del pH Tris-HCl 0,1 M, pH 7,8

(disolución de ensayo III)

545 nm excitación, 595 nm emisión

30°C, 3 min

3-2. Adaptación de los ensayos a las especies de interés

3-2.1. Preparación de las muestras.

La obtención del extracto proteico implica un proceso de homogeneización previa con una centrifugación posterior (entre 10.000 y 20.000 g, 20 min, 4°C) para eliminar los residuos insolubles. El extracto así obtenido (Fracción S-9) se filtra a través de lana de vidrio para eliminar las partículas de grasa, quedando la enzima dispersa en el sobrenadante (García-Segura et al., 1996). Una nueva centrifugación de la fracción S-9, esta vez a 100.000 g durante aproximadamente una hora a 4°C, permite obtener una fracción soluble, que contiene todas las moléculas solubles en el medio de homogeneización y el citosol celular, y un precipitado o fracción microsomal, con las vesículas derivadas del retículo endoplásmico.

La estabilidad de las enzimas a ensayar se consigue añadiendo a la disolución extractora agentes protectores como EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), GSH o DTT (ditiotreitól), así como inhibidores de proteasas como PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo). Para evitar la pérdida de actividad enzimática de las preparaciones muy diluidas se suele incluir algún agente que impida la rápida inestabilidad o desnaturalización de las enzimas, tales como el BSA (albúmina de suero bovino).

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, decidimos emplear como procedimiento básico de obtención de las muestras con actividad enzimática, el que a continuación se detalla (**Fig. 3-6**).

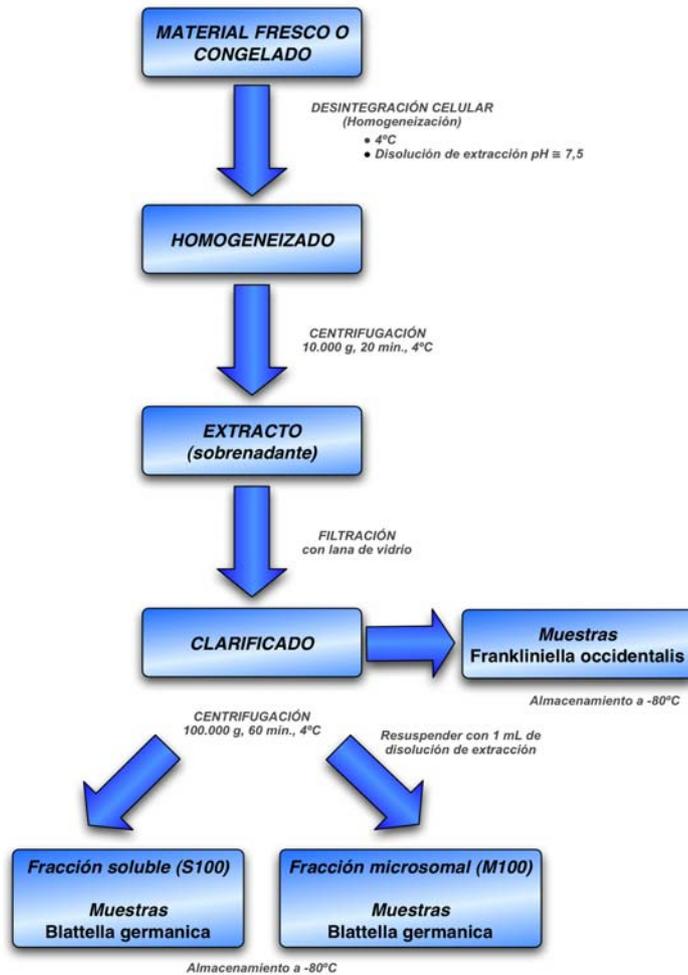


Figura 3-6. Esquema del protocolo básico de homogeneización de muestras de *Blattella germanica* y *Frankliniella occidentalis*.

3-2.2. Optimización de los ensayos.

La cantidad de una enzima en un extracto de tejido puede determinarse cuantitativamente en relación al efecto catalítico que produce. La dificultad para medir la cantidad de enzima en unidades convencionales ha llevado a utilizar la Unidad Internacional (UI) como medida de actividad enzimática, y que se define como la cantidad de enzima necesaria para

convertir 1 μmol de sustrato en producto en 1 minuto, en condiciones concretas (Holme, 1983).

Como la actividad catalítica puede verse afectada por diversos factores (concentración del o de los sustratos, efectos no específicos de compuestos como sales o las disoluciones reguladoras del pH, el pH, la fuerza iónica, la temperatura, otras proteínas, etc.) (Scopes, 1988), el primer objetivo en todo ensayo de actividad catalítica es la búsqueda de aquellas condiciones óptimas tales que la actividad enzimática dependa sólo de la concentración de la enzima, de modo que pequeñas variaciones en los otros factores no tengan efectos significativos (Cornish-Bowden, 1995).

En este sentido, se realizaron experimentos preliminares de adaptación de los análisis bioquímicos descritos en la bibliografía, y que aparecen resumidos en párrafos previos. Estos ensayos fueron optimizados, siempre y cuando se disponía de cantidad de muestra suficiente, para las dos especies analizadas, *Blattella germanica* y *Frankliniella occidentalis*.

Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro HP 8452A diode array (Hewlett-Packard Española, Madrid, España) y en un lector de placas Tecan SPECTRAFluor (TECAN, Salzburg, Austria).

3-2.2.1. Blattella germanica.

Se homogeneizaron por separado 30 machos, 30 hembras y 60 ninfas de los dos últimos estadios de dos de las poblaciones de las que disponíamos en nuestro laboratorio, la población L_1 (sensible) y la población R (resistente). Cada grupo de insectos fue decapitado y homogeneizado con una disolución Tris-HCl 0,1 M, pH 7,8 (0,2 mL/insecto) a 0°C, empleando un homogeneizador de potter a velocidad media en dos tandas de 30 segundos cada una. El homogeneizado fue entonces centrifugado a 10.000 g durante 20 minutos a 4°C con una centrífuga Sigma 2K20 (Sigma Laboratory Centrifuges GmbH, Osterode am Harz, Alemania). El sobrenadante se filtró con lana de vidrio y de nuevo se centrifugó a 100.000 g durante 60 minutos a 4°C en una ultracentrífuga Beckman Coulter Optima™ MAX-E (Beckman Coulter Inc., Palo Alto, California, USA). Los precipitados se resuspendieron en 1 mL de la disolución de homogeneización. Tanto el sobrenadante (fracción S100), como las fracciones microsomales (M100) se almacenaron a -80°C hasta su utilización en los ensayos de adaptación. Se obtuvieron y procesaron tres muestras diferentes en días distintos para cada una de las poblaciones.

Justo antes de ser empleadas en los ensayos enzimáticos las muestras proteicas se diluyeron con una disolución que contenía BSA en una proporción de al menos 0,1 mg/mL.

3-2.2.1.1. Ensayo de la actividad GST frente al CDNB.

Efecto del pH sobre la velocidad de la reacción. El pH "óptimo" de una enzima varía de un sustrato a otro, por lo que debe determinarse para cada sustrato en particular. Para ello se emplearon dos disoluciones reguladoras del pH distintas: disolución MES (0,1 M, 1 mM EDTA) y disolución fosfato sódico (0,1 M, 1 mM EDTA). La primera se ensayó a valores de pH de 5,5, 6,0 y 6,5, y con la segunda se probaron los valores de 7,0 y 7,5. El volumen final de ensayo contenía: 50 μ L de una dilución de la muestra (fracción S100, dilución 1/100 en las distintas disoluciones reguladoras del pH; 50 μ L de las diluciones sin muestra para el blanco) y 50 μ L de la mezcla de reacción (CDNB 1 mM, GSH 5 mM, concentraciones finales).

Como vemos, la **figura 3-7** muestra la curva de campana típica de este tipo de estudios (Cornish-Bowden, 1995). Estas curvas reflejan la ionización de ciertos restos de aminoácidos que han de encontrarse en un estado de ionización determinado a fin de que haya actividad enzimática. En todos los casos la meseta se situó alrededor de 7, por ello se adoptó este valor como pH de ensayo para la cuantificación de la actividad GST frente al sustrato CDNB.

Cálculo de la K_m aparente. Cuando la concentración de sustrato es saturante, la velocidad inicial de reacción es independiente de la concentración de sustrato y se aproxima a la velocidad máxima observable. Es conveniente usar, pues, concentraciones de sustrato tan elevadas como permita el coste, la solubilidad y su posible efecto inhibitor (Cornish-Bowden, 1995). Generalmente se recomienda emplear una concentración entre 5 y 10 veces el valor de la K_m (concentración de sustrato cuando la velocidad es la mitad de la velocidad máxima). Cuando hay más de un sustrato en la reacción, se varían las concentraciones de uno de ellos manteniendo constante la del otro, y se analiza su efecto sobre la velocidad de la reacción.

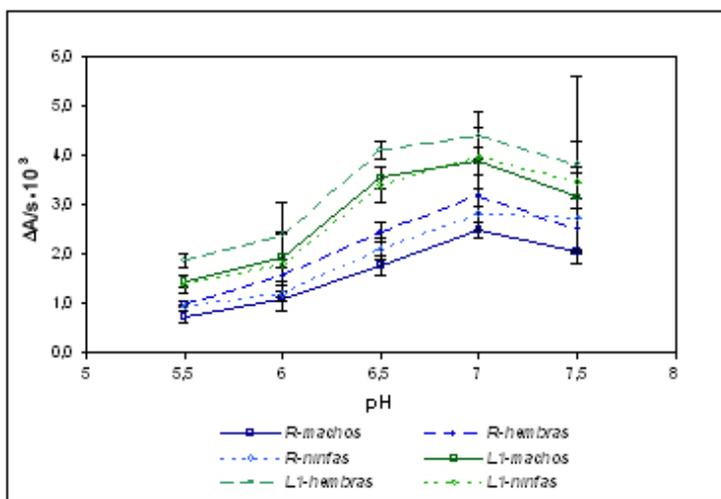


Figura 3-7. Resultados de los ensayos para la obtención del pH "óptimo" para la cuantificación de la actividad GST frente al sustrato CDNB en muestras de *Blattella germanica* (fracción S100, dilución 1/100). Cada punto representa el valor promedio (\pm desviación estándar) de las medidas de tres muestras diferentes, salvo para la población R-ninfas en la que se realizaron determinaciones de dos muestras distintas. Todas las medidas se hicieron por duplicado. CDNB = 1 mM, GSH = 5 mM. Tiempo de reacción = 2 min. R = población resistente; L1 = población sensible.

➤ **Para el GSH.** A 25 μ L del sustrato GSH (5, 4, 3, 2, 1,5, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o 0,1 mM, disolución de partida en agua MilliQ), se añadieron 50 μ L del homogeneizado (diluido 1/100 en la disolución de ensayo I a la que se añadió BSA 0,5 mg/mL) y 25 μ L de una disolución de CDNB (1 mM concentración final).

A la vista de los resultados obtenidos, y representados en la **figura 3-8**, se utilizó la ecuación de Michaelis-Menten para ajustar los datos. Para el cálculo de los parámetros cinéticos se utilizaron dos métodos diferentes: el cálculo a partir de la representación directa, y la transformación de la ecuación de Michaelis-Menten en una recta, mediante el método ampliamente usado de los dobles recíprocos.

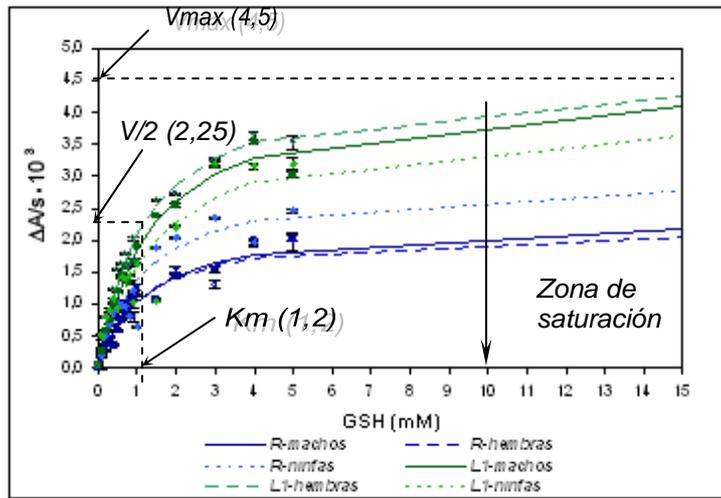


Figura 3-8. Resultados de los ensayos para el cálculo de la K_m aparente para el GSH, para la cuantificación de la actividad GST frente al sustrato CDNB en muestras de *Blattella germanica* (fracción S100, dilución 1/100). Cada punto representa el valor promedio (\pm desviación estándar) de las medidas de tres muestras diferentes, salvo para la población R-ninfas en la que se realizaron determinaciones de dos muestras distintas. Todas las medidas se hicieron por duplicado. Las líneas indican las curvas hiperbólicas obtenidas al ajustar la ecuación de Michaelis-Menten a los datos experimentales. Las flechas indican un ejemplo de cálculo de la K_m para muestras de hembras de la población L1. CDNB = 1 mM. Tiempo de reacción = 2 min. R = población resistente; L1 = población sensible.

Los valores obtenidos para la K_m aparente y V_{max} se recogen en la **tabla 3-1**. De estos resultados y a la vista de la **figura 3-8**, una concentración 10 mM para el GSH (entre 5,5 y 9 veces el valor de la K_m) aseguraría, en cualquier caso, estar a saturación.

➤ **Para el CDNB.** Los ensayos se realizaron añadiendo 25 μ L de las diferentes concentraciones del sustrato (5, 4, 3, 2, 1,5, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o 0,1 mM, en etanol < 3%) a 50 μ L del homogeneizado (diluido 1/100 con la disolución de ensayo I a la que se añadieron 0,5 mg/mL de BSA) y 25 μ L de la disolución de GSH (5 mM, concentración final).

Tabla 3-1. Determinación de los valores de la K_m aparente y V_{max} para el sustrato GSH en el ensayo de la actividad GST frente al sustrato CDNB en muestras de Blattella germanica.

Muestra ^a	K_m (mM)		V_{max} ($\Delta A/s \cdot 10^3$)		$R^{2(d)}$	
	Enzfitter ^b	D.R. ^c	Enzfitter ^b	D.R. ^c	Enzfitter ^b	D.R. ^c
R-machos	1,49±0,24	0,53	2,57±0,19	1,42	0,9596	0,8401
R-hembras	1,07±0,22	3,66	2,24±0,19	5,26	0,9245	0,9760
R-ninfas	1,39±0,37	1,40	3,09±0,36	3,13	0,8928	0,9229
L1-machos	1,30±0,16	2,28	4,28±0,22	6,26	0,9767	0,9866
L1-hembras	1,21±0,13	0,54	4,52±0,20	3,09	0,9804	0,9504
L1-ninfas	1,80±0,54	0,32	4,41±0,63	2,02	0,8700	0,8325

^aR = población resistente; L1 = población de referencia (sensible).

^bCálculo mediante el programa Enzfitter 2.0. (Biosoft, Cambridge, UK). Por cálculo iterativo, este programa proporciona el mejor ajuste de los datos a una hipérbola que sigue la ecuación de Michaelis-Menten: $v = v_{max} \cdot (S) / K_m + (S)$.

Valor promedio \pm error estándar.

^cD.R. = Dobles recíprocos. Mediante la transformación de la ecuación de Michaelis-Menten en la ecuación de una recta, $1/v = K_m/v_{max} \cdot 1/(S) + 1/v_{max}$. Al representar $1/v$ frente a $1/(S)$ obtenemos una recta de pendiente K_m/v_{max} y de ordenada en el origen $1/v_{max}$. Valor promedio.

^d R^2 indica la bondad del ajuste del modelo a nuestros datos.

Tabla 3-2. Determinación de los valores de la K_m aparente y V_{max} para el sustrato CDNB en el ensayo de la actividad GST frente a este sustrato, en muestras de Blattella germanica.

Muestra ^a	K_m (mM)		V_{max} ($\Delta A/s \cdot 10^3$)		$R^{2(d)}$	
	Enzfitter ^b	D.R. ^c	Enzfitter ^b	D.R. ^c	Enzfitter ^b	D.R. ^c
R-machos	0,61±0,05	0,63	3,04±0,080	3,13	0,9872	0,9715
R-hembras	0,24±0,02	0,2	3,46±0,048	3,30	0,9923	0,9849
R-ninfas	0,22±0,02	0,22	2,87±0,045	2,86	0,9897	0,9951
L1-machos	0,32±0,02	0,3	4,73±0,061	4,63	0,9949	0,9954
L1-hembras	0,24±0,02	0,27	5,44±0,088	5,60	0,9899	0,9874
L1-ninfas	0,27±0,03	0,25	4,70±0,13	4,61	0,9718	0,9827

^aR, población resistente; L1, población de referencia (sensible).

^bCálculo mediante el programa Enzfitter. Valor promedio \pm error estándar

^cD.R. = Dobles recíprocos. Valor promedio.

^d R^2 indica la bondad del ajuste del modelo a nuestros datos.

De nuevo se observa en la **figura 3-9** que la actividad enzimática obedece a una cinética de Michaelis-Menten. Empleando dicha ecuación resultaron para la K_m aparente y V_{max} los valores que se detallan en la **tabla 3-2**.

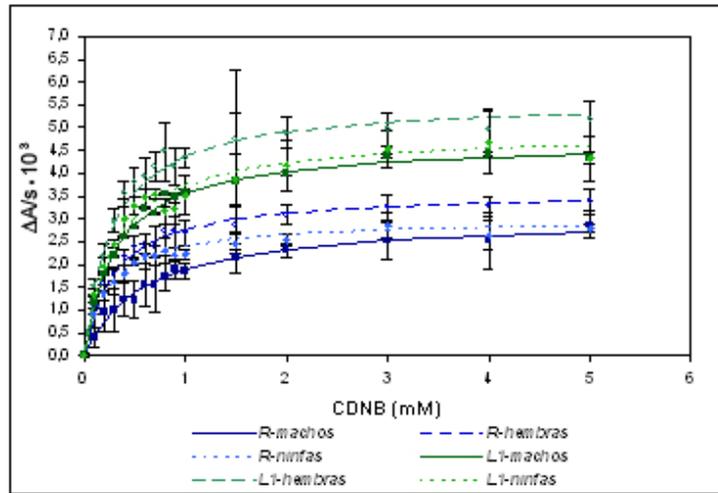


Figura 3-9. Resultados de los ensayos para el cálculo de la K_m aparente para el CDNB, para la cuantificación de la actividad GST frente al sustrato CDNB en muestras de *Blattella germanica* (fracción S100, dilución 1/100). Cada punto representa el valor promedio (\pm desviación estándar) de las medidas de tres muestras diferentes, salvo para la población R-ninfas en la que se realizaron determinaciones de dos muestras distintas. Todas las medidas se hicieron por duplicado. Las líneas indican las curvas hiperbólicas obtenidas al ajustar la ecuación de Michaelis-Menten a los datos experimentales. GSH = 5 mM. Tiempo de reacción = 2 min. R = población resistente; L1 = población sensible.

Para este sustrato, una concentración 2 mM asegura también (al igual que con el GSH) estar a saturación, y por ello ésta será la concentración del CDNB que se utilizará en los ensayos de cuantificación de la actividad GST frente a este sustrato en muestras de *Blattella germanica*.

Determinación del tramo lineal. Para la cuantificación de la actividad enzimática, los resultados finales se calculan, como ya se ha comentado previamente, a partir de las velocidades de reacción. Para estos cálculos es necesario suponer que existe una relación

directa entre la velocidad de reacción y la concentración de la enzima, por lo que cuando se plantea un análisis de este tipo es indispensable determinar el rango de actividad en el que dicha relación es lineal durante el tiempo de reacción ensayado. Con este fin, se emplearon diluciones de una muestra y se representaron la velocidad de reacción resultante frente a distintos volúmenes de la misma (**Fig. 3-10**). Se mezclaron 50 μL de la mezcla de reacción (CDNB 2 mM, GSH 10 mM, concentraciones finales) con 50 μL de homogeneizado a distintas concentraciones en la disolución de ensayo I a pH 7, a la que añadimos 0,5 mg/mL de BSA.

Utilizando el método detallado se obtuvo un rango analítico válido hasta una velocidad de reacción máxima de entre $1,1 \cdot 10^{-3}$ y $4,2 \cdot 10^{-3}$ unidades de absorbancia por segundo, en función de la muestra estudiada (**Fig. 3-10**). Por otro lado, se estableció el límite de detección (límite mínimo) como 3 veces la desviación estándar de la actividad espontánea (reacción en ausencia de muestra) de acuerdo con Bergmeyer y colaboradores (1983). De esta forma se fijaron ambos límites para el análisis cuantitativo para cada una de las muestras.

Cálculo del “coeficiente de extinción” (ϵd). Según lo predicho por la ecuación de Lambert-Beer, en toda fotometría vertical la absorbancia varía proporcionalmente con el volumen final del pocillo. Esto implica que se debe determinar un factor de corrección del paso óptico a medida que se producen cambios en el volumen final del ensayo. Se puede determinar dicho factor comparando la absorbancia de una disolución coloreada a un paso óptico conocido (p. ej. 1 cm) con la absorbancia del pocillo de una microplaca. Según esto, se midió la absorbancia de diferentes volúmenes (100, 200 y 300 μL) de la misma preparación, en tres pocillos de una placa, y se compararon con la absorbancia de 1 mL de la misma muestra medida con un espectrofotómetro.

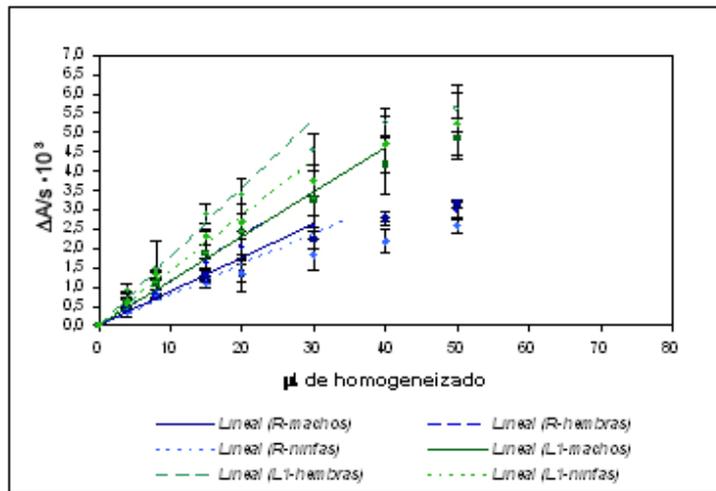


Figura 3-10. Resultados de los ensayos para la determinación del tramo lineal para la cuantificación de la actividad GST frente al sustrato CDNB en muestras de *Blattella germanica* (fracción S100, dilución 1/100). Cada punto representa el valor promedio (\pm desviación estándar) de las medidas de tres muestras diferentes, salvo para la población R-ninfas en la que se realizaron determinaciones de dos muestras distintas. Todas las medidas se hicieron por duplicado. CDNB = 2 mM; GSH = 10 mM; disolución de ensayo I a pH 7,0. Tiempo de reacción = 2 min. R = población resistente; L1 = población sensible.

Al representar la absorbancia de las distintas determinaciones en función de la concentración del producto formado al incubar el extracto con los sustratos (**Fig. 3-11**), obtenemos rectas cuyas pendientes representan el “coeficiente de extinción” ($\epsilon \cdot d$) para ese volumen final. Así, para 100 μ L el valor obtenido fue 3,5312 mM^{-1} .

Si representamos el “coeficiente de extinción” calculado para cada volumen ensayado en función del paso óptico, obtenemos una recta, tal y como se observa en la **figura 3-12**, cuya ecuación

$$\epsilon \cdot d^{340} = 0,0356 \times \text{paso óptico } (\mu\text{L})$$

nos permite calcular el “coeficiente de extinción” para cualquier volumen del pocillo.

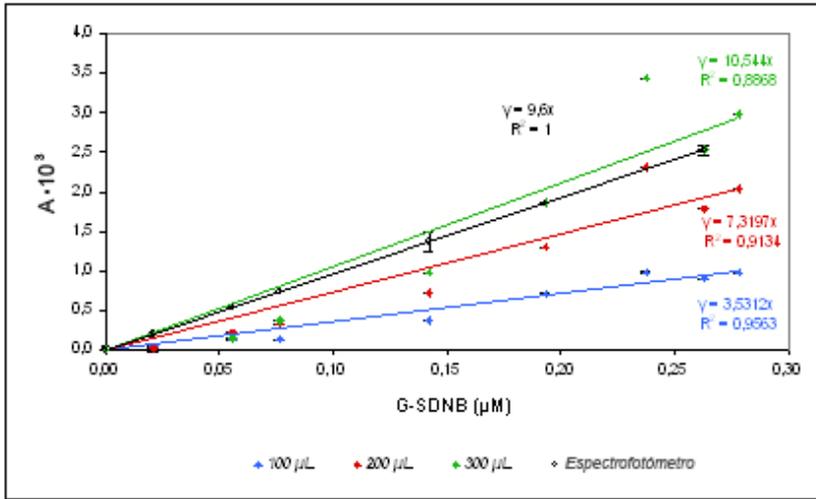


Figura 3-11. Resultados de los ensayos para la determinación del “coeficiente de extinción” para la cuantificación de la actividad GST frente al sustrato CDNB en muestras de *Blattella germanica* (fracción S100; dilución 3/1000). Cada punto representa el valor promedio (\pm desviación estándar) de las medidas de tres muestras diferentes. CDNB = 2 mM; GSH = 10 mM; $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

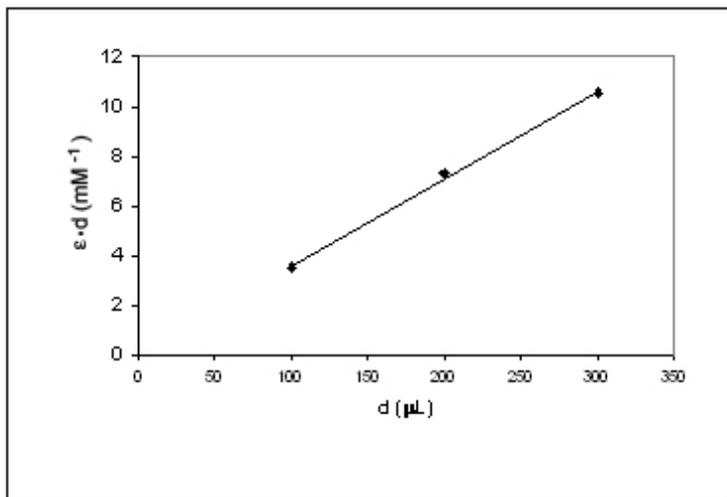


Figura 3-12. Representación del “coeficiente de extinción” en función del paso óptico ($\epsilon = f(l)$), para la cuantificación de la actividad GST frente al sustrato CDNB en muestras de *Blattella germanica* (fracción S100; dilución 3/1000). CDNB = 2 mM; GSH = 10 mM.

3-2.2.1.2. Ensayo de la actividad GST frente al DCNB.

Efecto del pH sobre la velocidad de la reacción. Siguiendo el mismo protocolo que el descrito para el ensayo de la actividad GST frente al CDNB, se realizaron los ensayos para la obtención del pH "óptimo" de la actividad GST frente al sustrato modelo DCNB. El rango de pHs analizados fue: 6,5 para la disolución reguladora MES (0,1 M, 1 mM EDTA); 7,0 y 7,5 para la disolución reguladora fosfato sódico (0,1 M, 1 mM EDTA), y 8,0 y 8,5 para la disolución Tris-HCl (0,1 M, 1 mM EDTA). Para ello mezclamos 50 μ L de la muestra (fracción S100) con 50 μ L de la mezcla de reacción (DCNB 1 mM, GSH 5 mM, en la disolución reguladora correspondiente).

En torno al pH 8,0 se aprecia la meseta típica de este tipo de ensayos (**Fig. 3-13**); por ello, éste fue el pH de la disolución de ensayo escogido para la actividad GST frente al DCNB en muestras de *Blattella germanica*.

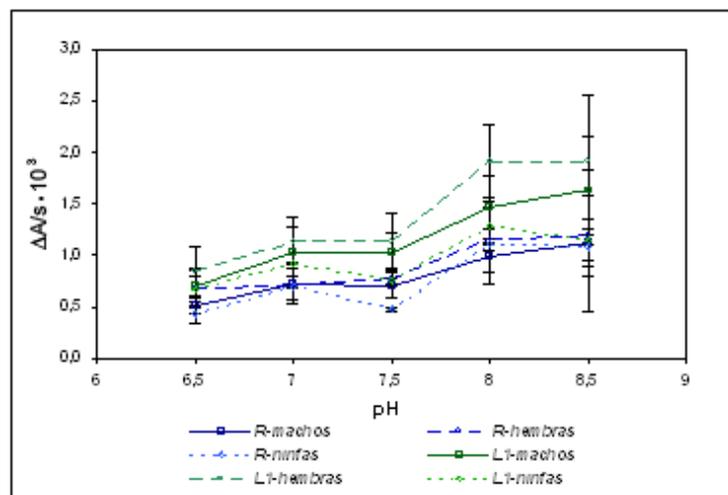


Figura 3-13. Resultados de los ensayos para la obtención del pH "óptimo" para la cuantificación de la actividad GST frente al sustrato DCNB en muestras de *Blattella germanica* (fracción S100). Cada punto representa el valor promedio (\pm desviación estándar) de las medidas de tres muestras diferentes, salvo para la población R-ninfas en la que se realizaron determinaciones de dos muestras distintas. Todas las medidas se hicieron por duplicado. R = población resistente; L1 = población sensible.

Cálculo de la K_m aparente.

➤ **Para el DCNB.** A 25 μL de una disolución de DCNB (5, 3, 2, 1,5, 1, 0,7 y 0,3 mM, disolución de partida en etanol <3%), se añadieron 50 μL de homogeneizado y 25 μL de una disolución de GSH (5 mM concentración final). Ambos sustratos se diluyeron en una disolución reguladora del pH Tris-HCl 0,1 M, EDTA 1 mM, pH 8.

Al igual que ocurriera con la actividad GST frente al sustrato CDNB, de nuevo observamos (**Fig. 3-14**) que todos los datos se ajustan a cinéticas de Michaelis-Menten. En la **tabla 3-3** se resumen los resultados de los ensayos para la determinación de la K_m aparente para este sustrato.

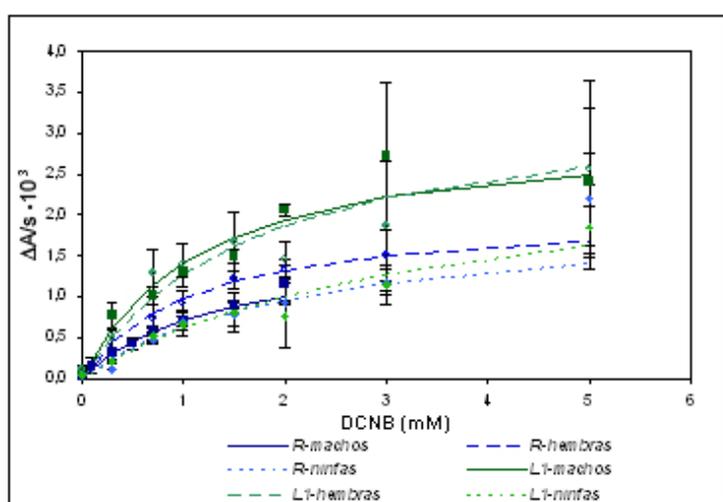


Figura 3-14. Resultados de los ensayos para el cálculo de la K_m aparente para el DCNB, para la cuantificación de la actividad GST frente al sustrato DCNB en muestras de *Blattella germanica* (fracción S100). Cada punto representa el valor promedio (\pm desviación estándar) de las medidas de tres muestras diferentes, salvo para la población R-ninfas en la que se realizaron determinaciones de dos muestras distintas. Todas las medidas se hicieron por duplicado. Las líneas indican las curvas hiperbólicas obtenidas al ajustar la ecuación de Michaelis-Menten a los datos experimentales. GSH = 5 mM. Tiempo de reacción = 2 min. R = población resistente; L1 = población sensible.

Si bien es conveniente emplear la concentración de sustrato tan alta como sea posible, en el caso del DCNB esta

concentración supone un compromiso entre la solubilidad del sustrato (a concentraciones mayores de 5 mM aparece un precipitado) y el requisito de saturación. De los resultados obtenidos (**Fig. 3-14, Tabla 3-3**) decidimos emplear como concentración final 3 mM de DCNB en el ensayo de la actividad GST frente a este sustrato.

Tabla 3-3. Determinación de los valores de K_m aparente y V_{max} para el sustrato DCNB en el ensayo de la actividad GST frente a dicho sustrato, en muestras de *Blattella germanica*.

Muestras ^a	K_m (mM)		V_{max} ($\Delta A/s \cdot 10^3$)		R^2 ^(d)	
	Enzfitter ^b	D.R. ^c	Enzfitter ^b	D.R. ^c	Enzfitter ^b	D.R. ^c
R-machos	2,15±0,47	1,36	2,31±0,32	1,72	0,9902	0,9883
R-hembras	1,62±0,31	1,50	2,39±0,22	2,32	0,9897	0,9943
R-ninfas	2,71±0,94	2,25	2,24±0,46	2,03	0,9765	0,9689
L1-machos	1,41±0,73	2,41	3,24±0,88	4,40	0,9493	0,9628
L1-hembras	1,21±0,44	1,75	2,89±0,40	3,48	0,9258	0,9484
L1-ninfas	1,90±0,70	3,61	1,77±0,34	2,77	0,9644	0,9829

^aR, población resistente; L1, población de referencia (sensible).

^bCálculo mediante el programa Enzfitter. Valor promedio \pm error estándar.

^cD.R. = Dobles recíprocos. Valor promedio.

^d R^2 indica la bondad del ajuste del modelo a nuestros datos.

➤ **Para el GSH.** Se diluyó el sustrato hasta obtener siete concentraciones diferentes (5, 3, 2, 1,5, 1, 0,7, y 0,3 mM, concentraciones finales de ensayo) y se mezcló (25 μ L) con 50 μ L de la muestra y 25 μ L de una disolución de DCNB (0,6 mM concentración final, disolución de partida en etanol <3%). Ambos sustratos se diluyeron en la disolución de ensayo III a pH 8. Los resultados obtenidos se representan en la **figura 3-15**.

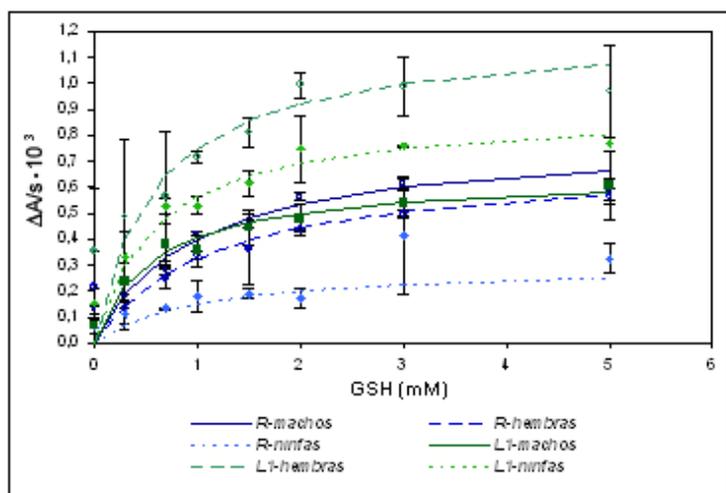


Figura 3-15. Resultados de los ensayos para el cálculo de la K_m aparente para el GSH, para la cuantificación de la actividad GST frente al sustrato DCNB en muestras de *Blattella germanica* (fracción S100). Cada punto representa el valor promedio (\pm desviación estándar) de las medidas de tres muestras diferentes, salvo para la población R-ninfas en la que se realizaron determinaciones de dos muestras distintas. Todas las medidas se hicieron por duplicado. Las líneas indican las curvas hiperbólicas obtenidas al ajustar la ecuación de Michaelis-Menten a los datos experimentales. Tiempo de reacción = 2 min. R = población resistente; L1 = población sensible.

La **tabla 3-4** nos muestra los resultados del cálculo de la K_m aparente para el sustrato GSH.

En base a estos resultados y a la vista de la **figura 3-15**, donde se aprecia saturación a partir de una concentración de sustrato 5 mM, decidimos emplear 10 mM como concentración final de GSH en el ensayo de la actividad GST frente a DCNB.

Determinación del tramo lineal. Del mismo modo que se realizó en el ensayo de la actividad GST frente al CDNB, aquí también se emplearon distintas diluciones del homogeneizado para determinar el rango en el que la actividad se mantenía proporcionalmente lineal al volumen de muestra ensayado, durante los dos minutos de reacción.

Tabla 3-4. Determinación de los valores de K_m aparente y V_{max} para el sustrato GSH en el ensayo de la actividad GST frente al sustrato DCNB en muestras de *Blattella germanica*.

Muestras ^a	K_m (mM)		V_{max} ($\Delta A/s \cdot 10^3$)		$R^{2(d)}$	
	Enzfitter ^b	D.R. ^c	Enzfitter ^b	D.R. ^c	Enzfitter ^b	D.R. ^c
R-machos	0,89±0,33	0,98	0,75±0,09	0,77	0,8960	0,9747
R-hembras	1,22±0,73	1,21	0,70±0,16	0,70	0,6620	0,9958
R-ninfas	1,36±0,80	0,37	0,38±0,10	0,24	0,7487	0,7899
L1-machos	0,62±0,17	0,47	0,65±0,05	0,60	0,9480	0,9594
L1-hembras	0,51±0,29	0,37	1,12±0,17	1,03	0,6381	0,8773
L1-ninfas	0,51±0,17	0,46	0,87±0,08	0,84	0,9078	0,9757

^aR, población resistente; L1, población de referencia (sensible).

^bCálculo mediante el programa Enzfitter. Valor promedio \pm error estándar.

^cD.R. = Dobles recíprocos. Valor promedio.

^d R^2 indica la bondad del ajuste del modelo a nuestros datos.

Los resultados establecen un rango lineal cuyo máximo varía entre $1,6 \cdot 10^{-3}$ y $3,2 \cdot 10^{-3}$ unidades de absorbancia por segundo, en función de la muestra analizada (**Fig. 3-16**). Para el límite de detección se empleó el mismo procedimiento que el utilizado con el sustrato CDNB, quedando así establecidos los límites superior e inferior del rango en el que se sabe que la actividad responde de forma linealmente proporcional a las variaciones en el volumen de ensayo.

Cálculo del “coeficiente de extinción” (ϵd). Teniendo en cuenta el valor del paso óptico obtenido en el ensayo con el CDNB, y el valor del ϵ obtenido de la bibliografía ($\epsilon = 8,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, Habig y Jackoby, 1981), se calculó el valor para el coeficiente (ϵd), que fue de $3,1266 \text{ mM}^{-1}$ para un volumen de reacción final de $100 \mu\text{L}$.

3-2.2.1.3. Ensayo de la actividad esterasa frente al p-NPA.

Efecto del pH sobre la velocidad de la reacción. Se midieron las velocidades de reacción frente a diferentes pH: 5,5, 6,0 y 6,5 para la disolución reguladora MES (0,1 M, 1 mM EDTA); 7,0 y 7,5 para la disolución fosfato sódico (0,1 M, 1 mM EDTA), y 8,0 para la disolución reguladora Tris-HCl (0,1 M, 1 mM EDTA). A modo de resumen, se añadieron $50 \mu\text{L}$ de una disolución de la muestra (fracción S100,

dilución 3/1000 en las distintas disoluciones reguladoras del pH) a 50 μL de la mezcla de reacción (p-NPA 1 mM, concentración final). Para el blanco, en lugar de la muestra se añadió sólo la disolución reguladora del pH.

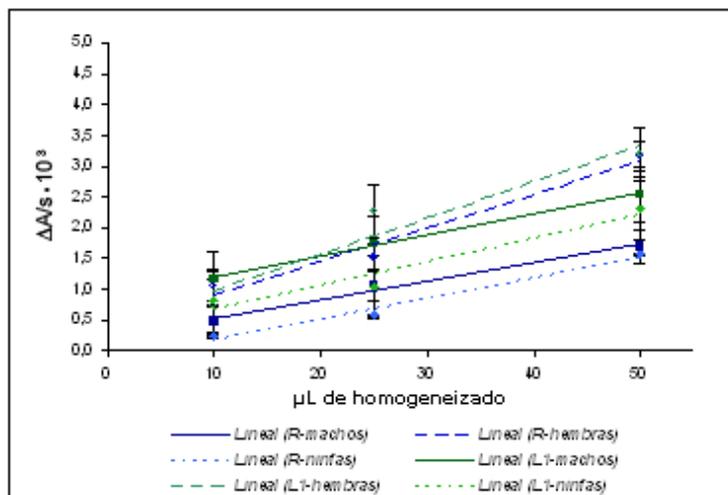


Figura 3-16. Resultados de los ensayos para la determinación del tramo lineal para la cuantificación de la actividad GST frente al sustrato DCNB en muestras de *Blattella germanica* (fracción S100, dilución 1/100). Cada punto representa el valor promedio (\pm desviación estándar) de las medidas de tres muestras diferentes, salvo para la población R-ninfas en la que se realizaron determinaciones de dos muestras distintas. Todas las medidas se hicieron por duplicado. CDNB = 3 mM; GSH = 10 mM; disolución de ensayo I a pH 8,0. Tiempo de reacción = 2 min. R = población resistente; L1 = población sensible.

En base a los resultados obtenidos (**Fig. 3-17**), se decidió emplear para este ensayo una disolución reguladora de pH 7,5.

Cálculo de la K_m . A 50 μL de una disolución de p-NPA (2, 1,5, 1, 0,8, 0,5, 0,4, 0,2 mM, disolución de partida en etanol < 3%), se añaden 50 μL de homogeneizado (diluido 3/1000). El efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de la reacción se pone de manifiesto en la **figura 3-18**.

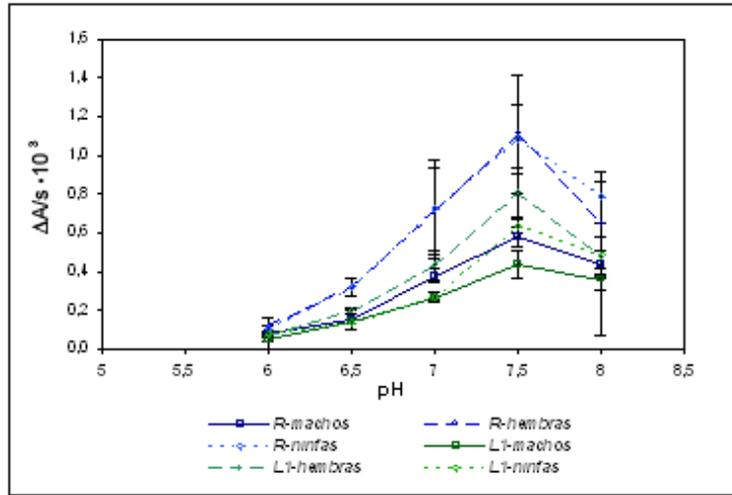


Figura 3-17. Resultados de los ensayos para la obtención del pH "óptimo" para la cuantificación de la actividad esterasa frente al sustrato p-NPA en muestras de *Blattella germanica* (fracción S100, dilución 3/1000). Cada punto representa el valor promedio (\pm desviación estándar) de las medidas de tres muestras diferentes, salvo para la población R-ninfas en la que se realizaron determinaciones de dos muestras distintas. Todas las medidas se hicieron por duplicado. R = población resistente; L1 = población sensible.

Como puede observarse, la K_m resultante para todas las muestras oscila entre 0,24 y 0,47 mM (Tabla 3-5), por lo que una concentración 2 mM nos asegura estar a saturación del sustrato para cualquiera de las muestras analizadas. De los valores estimados para la K_m esta concentración supondría entre 4,3 y 8,3 veces el valor de la K_m , dependiendo de la muestra.

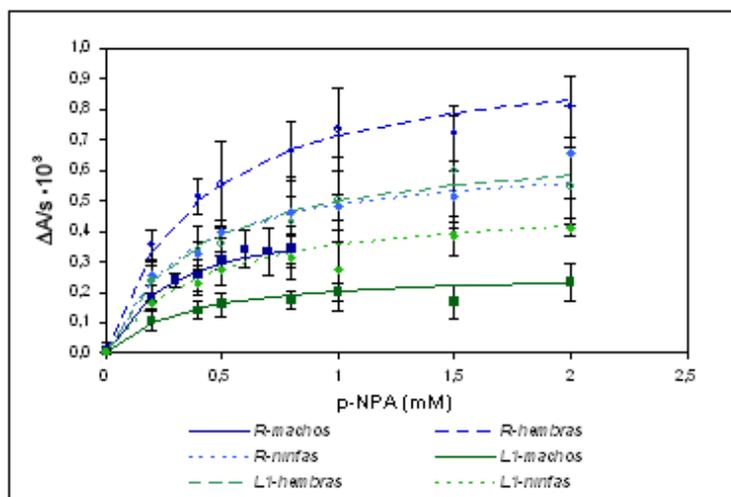


Figura 3-18. Resultados de los ensayos para el cálculo de la K_m para la cuantificación de la actividad esterasa frente al sustrato p-NPA en muestras de *Blattella germanica* (fracción S100, dilución 3/1000). Cada punto representa el valor promedio (\pm desviación estándar) de las medidas de tres muestras diferentes, salvo para la población R-ninfas en la que se realizaron determinaciones de dos muestras distintas. Todas las medidas se hicieron por duplicado. Las líneas indican las curvas hiperbólicas obtenidas al ajustar la ecuación de Michaelis-Menten a los datos experimentales. Tiempo de reacción = 2 min. R = población resistente; L1 = población sensible.

Tabla 3-5. Determinación de los valores de la K_m y V_{max} para el sustrato p-NPA en el ensayo de la actividad esterasa frente a dicho sustrato en muestras de *Blattella germanica*.

	K_m (mM)		V_{max} ($\Delta A/s \cdot 10^3$)		$R^{2(d)}$	
	Enzfitter ^b	D.R. ^c	Enzfitter ^b	D.R. ^c	Enzfitter ^b	D.R. ^c
Muestras^a						
R-machos	0,33 \pm 0,06	0,35	0,50 \pm 0,03	0,51	0,9899	0,9789
R-hembras	0,32 \pm 0,04	0,32	0,92 \pm 0,03	0,92	0,9937	0,9934
R-ninfas	0,37 \pm 0,11	0,33	0,74 \pm 0,06	0,65	0,9698	0,9558
L1-machos	0,34 \pm 0,08	0,32	0,23 \pm 0,18	0,23	0,9518	0,9153
L1-hembras	0,45 \pm 0,08	0,38	0,71 \pm 0,04	0,67	0,9820	0,9794
L1-ninfas	0,42 \pm 0,11	0,34	0,47 \pm 0,04	0,44	0,9633	0,9424

^aR, población resistente; L1, población de referencia (sensible).

^bCálculo mediante el programa Enzfitter. Valor promedio \pm error estándar.

^cD.R. = Dobles recíprocos. Valor promedio.

^d R^2 indica la bondad del ajuste del modelo a nuestros datos.

Determinación del tramo lineal. Cincuenta μL de la mezcla de reacción (p-NPA 2 mM, concentración final) se mezclaron con 50 μL de la disolución de ensayo II (pH 7,5, a la que añadimos 0,5 mg/mL de BSA) con distintas concentraciones de homogeneizado.

Como se ve en la **figura 3-19**, la respuesta fue lineal durante todo el tiempo de la reacción (2 min).

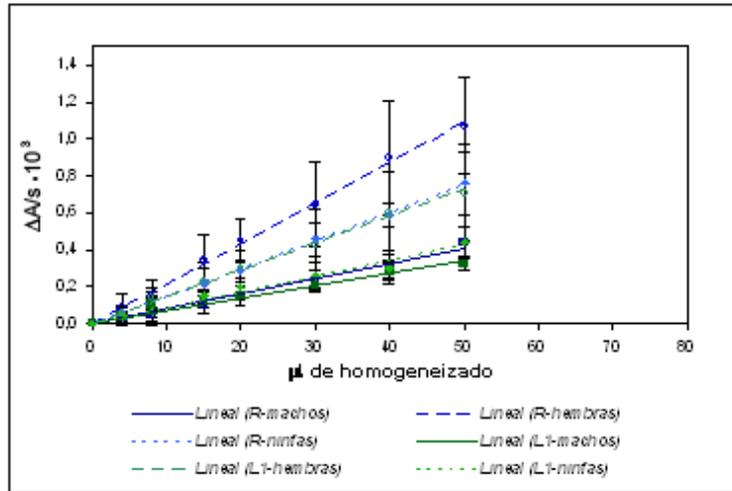


Figura 3-19. Resultados de los ensayos para la determinación del tramo lineal para la cuantificación de la actividad esterasa frente al sustrato p-NPA en muestras de *Blattella germanica* (fracción S100, dilución 3/1000). Cada punto representa el valor promedio (\pm desviación estándar) de las medidas de tres muestras diferentes, salvo para la población R-ninfas en la que se realizaron determinaciones de dos muestras distintas. Todas las medidas se hicieron por duplicado. p-NPA = 2 mM. Tiempo de reacción = 2 min. R = población resistente; L1 = población sensible.

Cálculo del “coeficiente de extinción” ($\epsilon \cdot d$). Al igual que se hizo para el CDNB, una misma preparación se midió por triplicado en los pocillos de una microplaca y en la cubeta (1 cm de paso óptico) de un espectrofotómetro. Cada pocillo contenía 100, 200 o 300 μL de volumen final. El “coeficiente de extinción” se determinó a partir de la pendiente de la recta resultante de representar la absorbancia frente a la concentración en función del producto formado al incubar el extracto con los sustratos (**Fig. 3-20**).

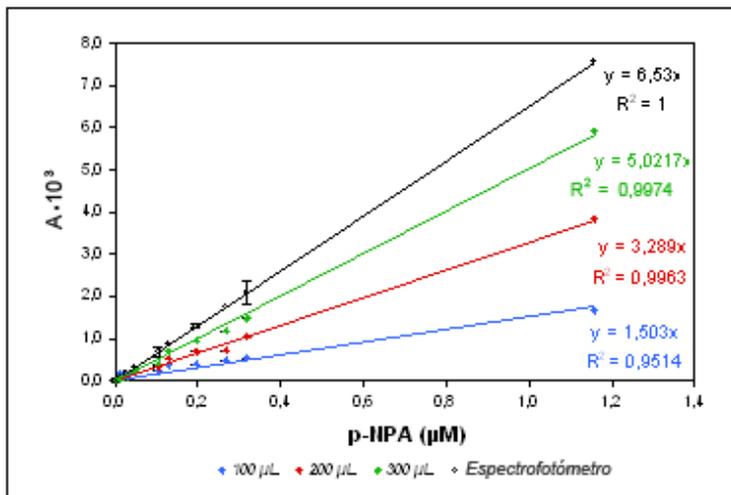


Figura 3-20. Resultados de los ensayos para la determinación del “coeficiente de extinción” para la cuantificación de la actividad esterasa frente al sustrato p-NPA en muestras de *Blattella germanica* (fracción S100; dilución 3/1000). Cada punto representa el valor promedio (\pm desviación estándar) de las medidas de tres muestras diferentes. pNPA = 2 mM; $\varepsilon = 6,53 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Para un volumen de reacción final de 100 μL , el valor calculado para el “coeficiente de extinción” en el ensayo de la actividad esterasa frente al sustrato p-NPA, fue de 1,503 mM^{-1} .

3-2.2.1.4. Resumen de las condiciones finales.

En todos los ensayos y para todas las poblaciones y estadios no se detectó actividad cuando se ensayaron los sustratos con muestras hervidas durante 2 horas a 100°C. Tampoco cuando eliminamos alguno o los dos sustratos. Así demostramos que la reacción dependía de la presencia de los sustratos y de la forma activa de la enzima.

Los resultados muestran que tanto la población resistente como la sensible (adultos y ninfas) presentaron el mismo patrón de comportamiento en las diferentes actividades frente a los diversos sustratos, y bajo condiciones de ensayo distintas (ver **Tablas 3-1 a 3-5** y **Figs. 3-7 a 3-20**). Otros autores, como Baker y colaboradores (1998) o Zhou y colaboradores (2003) encuentran respuestas similares al comparar las condiciones

óptimas de ensayo para la medida de estas actividades enzimáticas en poblaciones de otras especies de insectos resistentes y sensibles.

Por todo ello, y dada la similitud de resultados obtenidos en los diferentes grupos experimentales, establecimos las siguientes condiciones finales para los ensayos de medida de las actividades GST frente a CDNB y DCNB, y esterases frente a p-NPA, en muestras de *Blattella germanica* (Tabla 3-6):

Tabla 3-6. Cuadro resumen de las condiciones finales establecidas para la medida de actividades enzimáticas en muestras de *Blattella germanica*.

Parámetros	GST-CDNB		GST-DCNB		Esterasas-p-NPA	
	Condiciones iniciales ^a	Adaptación a lector de placas	Condiciones iniciales ^a	Adaptación a lector de placas	Condiciones iniciales ^a	Adaptación a lector de placas
pH de la disolución reguladora	Fosfato potásico 100 mM, 1 mM EDTA, pH 6,5	Fosfato potásico 100 mM, 1 mM EDTA, pH 7	Fosfato potásico 100 mM, 1 mM EDTA, pH 7,5	Tris-HCl 100 mM, 1 mM EDTA, pH 8	Fosfato sódico 100 mM, pH 7,4	Fosfato sódico 100 mM, 1 mM EDTA pH 7,5
Concentración de sustrato 1 ^b	1 mM	2 mM	1 mM	3 mM	1 mM	2 mM
Concentración de sustrato 2 ^c	5 mM	10 mM	5 mM	10 mM		
Temperatura	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C
Longitud de onda	340 nm	340 nm	345 nm	340 nm	400 nm	415 nm
Coefficiente extinción molar	9,6 mM ⁻¹ .cm ⁻¹	3,5 mM ^{-1(d)}	8,5 mM ⁻¹ .cm ⁻¹	3,1 mM ^{-1(d)}	6,5 mM ⁻¹ .cm ⁻¹	1,5 mM ^{-1(d)}

^aLas condiciones iniciales están basadas en los ensayos originales.

^bTodos los sustratos estaban disueltos en etanol.

^cGSH en todos los casos.

^d"Coeficiente de extinción" para un volumen de 100 µL.

Las condiciones óptimas identificadas fueron similares a las halladas por diversos autores en otros insectos (Baker et al., 1998).

3-2.2.2. *Frankliniella occidentalis*

Grupos de entre 50 y 200 trips, según el ensayo, se homogeneizaron manualmente usando volúmenes pequeños (de hasta 2 mL) de una disolución de fosfato sódico (100 mM, pH 7,4). Tras centrifugar a 10.000 g (20 minutos, 4°C) se filtró el sobrenadante a través de lana de vidrio. El sobrenadante clarificado, resultante de una segunda centrifugación (2.000 g, 5 minutos, 4°C) fue congelado hasta su utilización como fuente de enzima.

3-2.2.2.1. Ensayo de la actividad esterasa frente al α -NA.

Ensayos previos. Antes de obtener los valores de los parámetros cinéticos, y según proponen Dary y colaboradores (1990), se determinó cuál era la mejor combinación de la sal de diazonio y de detergente para detener la reacción. Para ello se compararon los espectros de absorción del compuesto azo que se forma entre el naftol y los iones de diazonio de la sal de zinc del FBB (concentración final $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) o de la sal Fast Garnet GBC (2-metil-4-([2-metilfenil]azo)benzenodiazonio) (concentración final $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) en presencia de SDS (concentración final $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) o de Tritón X-100 (concentración final $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y también sus variaciones con el tiempo. Los ensayos fueron realizados añadiendo $10 \mu\text{L}$ de la disolución del sustrato (α -NA 50 mM en etanol, concentración final 1 mM) a la cubeta que contenía $2 \mu\text{L}$ de la disolución de la enzima (diluida 1/10 con la disolución de homogeneización) en fosfato sódico pH 7,5 hasta completar $500 \mu\text{L}$. Después de incubar durante 5 minutos a 30°C , se añadieron $500 \mu\text{L}$ de la disolución de la sal de diazonio y el detergente, midiéndose entonces la absorbancia. La **figura 3-21** muestra que el compuesto azo producido por el ión tetrazotizado de la *o*-dianisidina en presencia de SDS es el que tiene la mayor absorbancia. Por otra parte, el espectro se mantuvo estable a lo largo del tiempo, mientras que cambió en el caso de utilizar la sal GBC. También se observa que la adición de la sal FBB al homogeneizado de trips en presencia de SDS inactivó inmediatamente la esterasa de los trips. Por lo tanto, la mejor combinación de sal y detergente para esta especie es la mezcla FBB + SDS.

También se investigó la posibilidad de que la sal del diazonio pudiera inhibir una o más de las actividades esterasa. Por ello se comparó un análisis modificado de punto final con uno tradicional, tal como describen Grant y colaboradores (1989). En el ensayo modificado, la sal de diazonio se añade al comienzo del período de incubación de la enzima, seguido por la adición del detergente 5 minutos más tarde. La ausencia de inhibición de la esterasa nos permitiría usar un procedimiento cinético. Los métodos cinéticos ofrecen la ventaja de controlar la formación del producto a lo largo del tiempo, reduciendo así la probabilidad de error causada por la

imprecisión en la medida del tiempo, que se produce cuando se usa un ensayo de punto final.

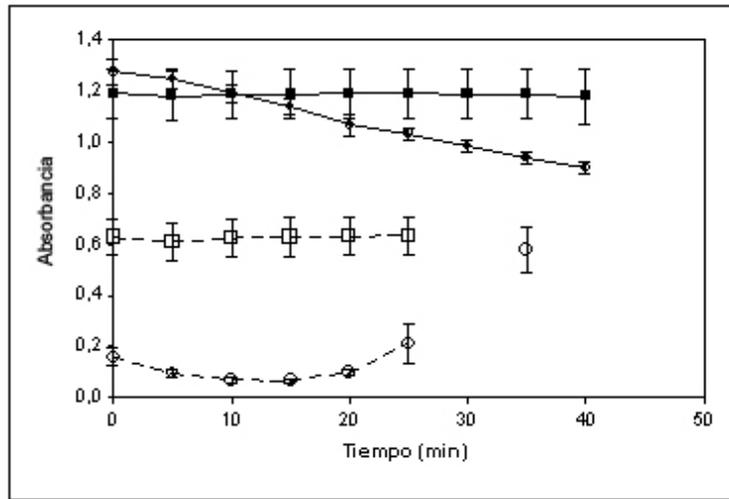


Figura 3-21. Absorbancia y estabilidad de los compuestos de azo formados al reaccionar el α -naftol con los iones diazonio de las sales FBB o GBC en presencia de SDS o de Tritón X-100 a lo largo del tiempo. ■ □ FBB = 1 g·L⁻¹; ● ○ GBC = 1 g·L⁻¹. Símbolos cerrados, SDS = 10g·L⁻¹; símbolos abiertos, Tritón X-100 = 5 g·L⁻¹. Cada punto representa el valor promedio (\pm desviación estándar) de las medidas de tres muestras diferentes.

En la **figura 3-22** se comprueba que la sal FBB inhibió significativamente la actividad esterasa cuando se encontraba presente durante la reacción de hidrólisis. Este resultado invalida el ensayo cinético para estas muestras de *F. occidentalis*, optándose definitivamente por la cinética de punto final.

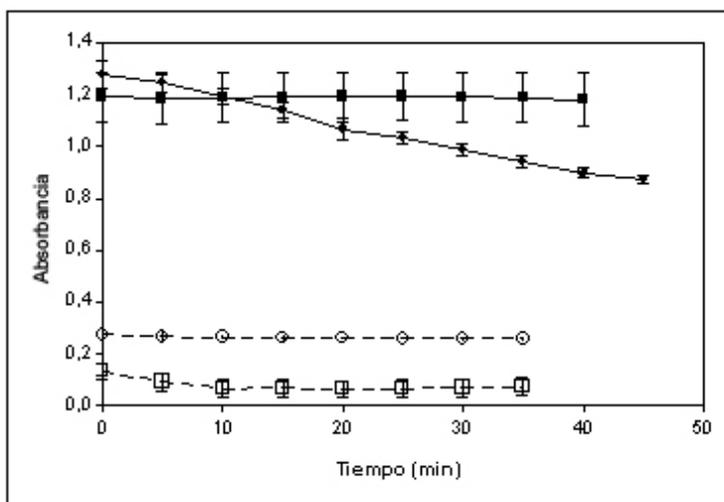


Figura 3-22. Absorbancia de los compuestos de azo formados al reaccionar el α -naftol con los iones diazonio de las sales FBB o GBC, usando un ensayo de punto final modificado. Se permitió que el ensayo típico de esterasa de punto final se desarrollara durante 5 minutos con (símbolos abiertos) o sin (símbolos cerrados) la sal en la reacción. Tras los 5 minutos, se añadió el SDS o el SDS + la sal, a la cubeta apropiada, y se obtuvieron los valores de la absorbancia. Cada punto representa el valor promedio (\pm desviación estándar) de las medidas de tres muestras diferentes. ■ □ FBB 1 g·L⁻¹; ● ○ GBC 1 g·L⁻¹.

Cálculo de la K_m . Se determinó la concentración saturante del sustrato añadiendo 10 μ L de las diferentes concentraciones de α -NA (2, 1,5, 1, 0,5, 0,4, 0,2, 0,1, 0,04 mM) a 2 μ L de homogeneizado de trips (diluido 1/10 con la disolución de homogeneización). A continuación se añadió disolución de ensayo II a pH 7,5 hasta alcanzar un volumen final de 500 μ L. Tras incubar durante 30 minutos a 30°C, se añadieron 500 μ L de la sal de diazonio (FBB, concentración final 0,2 g·L⁻¹) disuelta en el detergente (SDS, concentración final 10 g·L⁻¹) para detener la reacción. Una vez alcanzado el equilibrio del color (30 minutos), se leyó la absorbancia a 600 nm. Se comprobó que a medida que aumentaba la concentración del sustrato se inhibía la actividad (inhibición por el sustrato) (**Fig. 3-23**).

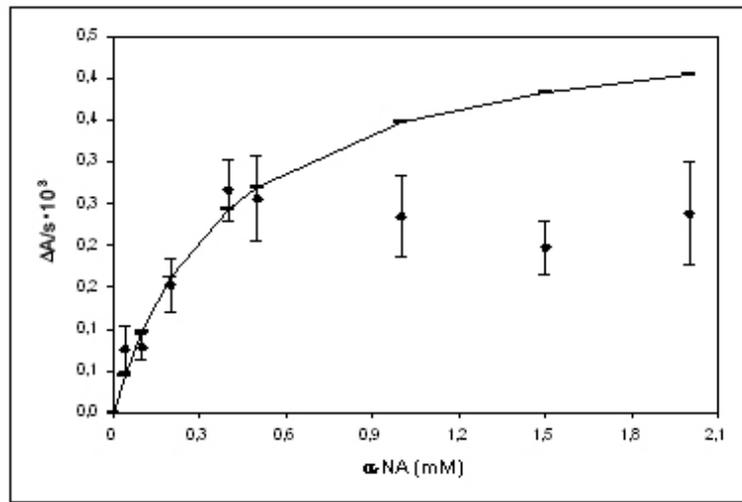


Figura 3-23. Resultados de los ensayos para el cálculo de la K_m para la cuantificación de la actividad esterasa frente al sustrato α -NA en muestras de *Frankliniella occidentalis*. Cada punto representa el valor promedio (\pm desviación estándar) de las medidas de cinco muestras diferentes. La línea continua indica la curva hiperbólica obtenida al ajustar la ecuación de Michaelis-Menten a los datos experimentales, después de eliminar las velocidades inhibidas a altas concentraciones del sustrato.

Por ello, una vez eliminadas las velocidades inhibidas, se utilizó la cinética de Michaelis-Menten para ajustar los datos. Se obtuvo un valor de la K_m de 0,11 mM. Usando este valor se estableció que la concentración óptima de α -NA era de 0,75 mM (aproximadamente 7 veces el valor de la K_m).

Determinación del tramo lineal. El límite superior se calculó usando una serie de diluciones del homogeneizado de trips. Las diluciones se ensayaron siguiendo el protocolo descrito para el estudio de la concentración saturante del sustrato, pero adaptadas a un volumen de ensayo de 100 μ L. La concentración final para el α -NA fue 0,75 mM. Se observó que el aumento en la actividad esterasa frente a α -NA era proporcional a la concentración total de proteína en *F. occidentalis* (**Fig. 3-24**). La actividad enzimática era lineal hasta un volumen de homogeneizado equivalente a 0,4 trips. El rango funcional de medida de este ensayo se estableció desde 0,03 (límite de detección) hasta $1,2 \times 10^3$ A·s⁻¹.

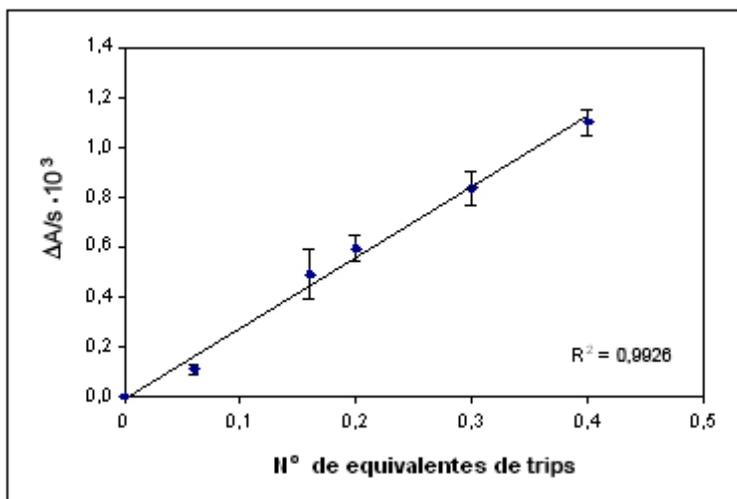


Figura 3-24. Resultados de los ensayos para la determinación del tramo lineal para la cuantificación de la actividad esterasa frente al sustrato α -NA en muestras de *Frankliniella occidentalis*. Cada punto representa el valor promedio (\pm desviación estándar) de las medidas de tres muestras diferentes.

3-2.2.2.2. Ensayo de la actividad esterasa frente al p-NPA.

Cálculo de la K_m . Para comprobar el efecto de la concentración del p-NPA, se añadieron 970 μ L de la disolución de ensayo II a 10 μ L del homogeneizado de trips (diluido 1/80 con la disolución de homogeneización) y 20 μ L de etanol que contenía suficiente cantidad de p-NPA como para obtener unas concentraciones finales de 1,5, 1,25, 1, 0,75, 0,5, 0,4, 0,3, 0,1 y 0,04 mM. El volumen total de ensayo fue de 1 mL. Se midió entonces la actividad a 30°C, durante 180 s y a una longitud de onda de 400 nm.

La **figura 3-25** muestra el efecto de la concentración del p-NPA sobre la velocidad de la reacción. El valor de la K_m (0,19 mM) se calculó igual que para la actividad α -NA. Sin embargo aquí no se detectó ninguna inhibición del sustrato en el rango estudiado. Se eligió una concentración final de p-NPA de 1 mM porque no limitaba la velocidad durante el período de tiempo ensayado.

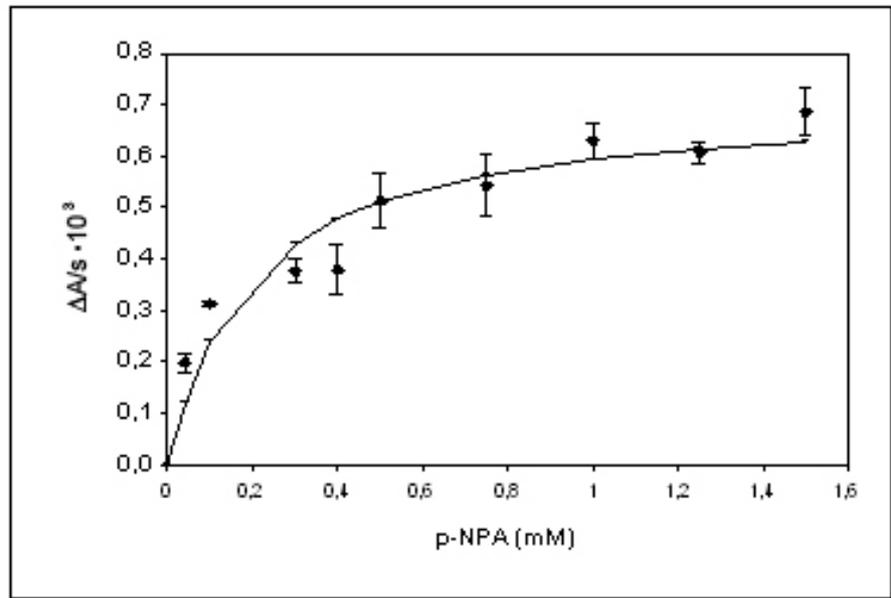


Figura 3-25. Resultados de los ensayos para el cálculo de la K_m para la cuantificación de la actividad esterasa frente al sustrato p-NPA en muestras de *Frankliniella occidentalis*. Cada punto representa el valor promedio (\pm desviación estándar) de las medidas de cinco muestras diferentes. La línea continua indica la curva hiperbólica obtenida al ajustar los datos a la ecuación de Michaelis-Menten.

Determinación del tramo lineal. En la **figura 3-26** se muestran las rectas generadas tanto con el espectrofotómetro HP como con el lector de microplacas Tekan, tras emplear el mismo procedimiento que en el caso de la determinación del “coeficiente de extinción” para *Blattella germanica* (ver secciones “Determinación del tramo lineal”). El paso óptico así obtenido, para un volumen final de ensayo de 100 μL , fue de 0,1494 cm.

El intervalo de proporcionalidad entre la actividad medida y el volumen de muestra para este ensayo se situó entre 0,3 (límite de detección) y $8,5 \times 10^3 \text{ A}\cdot\text{s}^{-1}$.

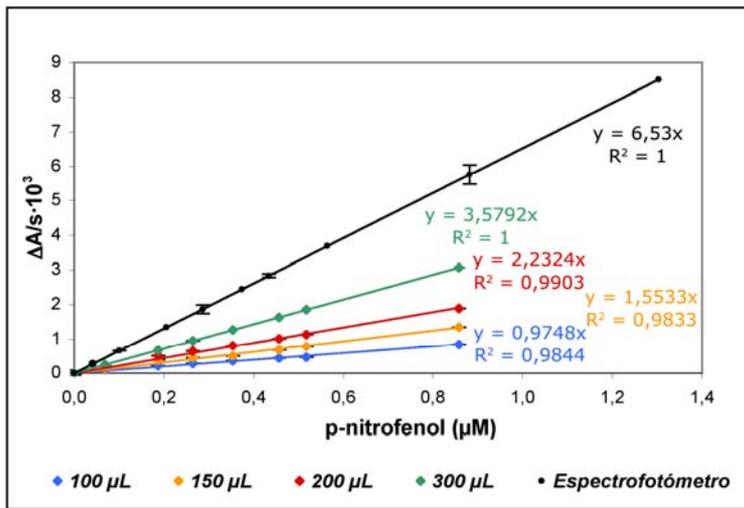


Figura 3-26. Resultados de los ensayos para la determinación del tramo lineal para la cuantificación de la actividad esterasa frente al sustrato p-NPA en muestras de *Frankliniella occidentalis*, medidos en un espectrofotómetro y en un lector de placas. Cada punto representa el valor promedio (\pm desviación estándar) de las medidas de tres muestras diferentes.

3.2.2.2.3. Resumen de las condiciones finales.

Las condiciones óptimas identificadas (**Tabla 3-7**), fueron similares a las halladas para *Blattella* y otros insectos (Zhou et al., 2003).

Tabla 3-7. Cuadro resumen de las condiciones finales establecidas para la medida de actividades enzimáticas en muestras de *Frankliniella occidentalis*.

Parámetros	Esterasas- α -NA		Esterasas-p-NPA	
	Condiciones iniciales ^a	Adaptación a lector de placas	Condiciones iniciales ^a	Adaptación a lector de placas
pH de la disolución reguladora	Fosfato sódico 100 mM, pH 7,5	Fosfato sódico 100 mM, pH 7,5	Fosfato sódico 100 mM, pH 7,4	Fosfato sódico 100 mM, pH 7,5
Concentración de sustrato 1 ^b	0,375 mM	0,75 mM	1 mM	1 mM
Combinación sal y detergente	FBB 1% + SDS 5%	FBB 1% + SDS 5%		
Temperatura	30°C	30°C	30°C	30°C
Longitud de onda	595 nm	595 nm	400 nm	415 nm
Coefficiente extinción molar	Patrón α -naftol	Patrón α -naftol	6,5 mM ⁻¹ .cm ⁻¹	0,9758 mM^{-1(c)}

^aLas condiciones iniciales están basadas en los ensayos originales.

^bTodos los sustratos estaban disueltos en etanol.

^c"Coeficiente de extinción" para un volumen de 100 μ L.

3-3. Bibliografía

Baker, J. E.; Fabrick, J. A.; Zhu, K. Y. Characterization of esterases in malathion-resistant and susceptible strains of the pteromalid parasitoid *Anisopteromalus calandrae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28: 1039-1050 (1998).

Bergmeyer, H. U.; Horder, M.; Markowetz, D. *Methods of enzymatic analysis*. 3rd ed. Verlag, Chemie. Weinheim and Academic Press, New York. Vol. 1 (1983).

Brogdon, W. A.; Dickinson, C. M. A microassay system for measuring esterase activity and protein concentration in small samples and high pressure liquid chromatography eluate fractions. *Anal. Biochem.* 131: 499-503 (1983).

Brogdon, W. G.; McAllister, J. C. Simplification of adult mosquito bioassays through the use of time-mortality determination in glass bottles. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 14: 159-165 (1998).

Byrne, F. J.; Devonshire, A. L. *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 (1991).

Cornish-Bowden, A. *Fundamentals of enzyme kinetics.* Portland Press Ltd, London (1995).

Cox, M. M.; Nelson, D. L. *Lehninger. Principios de Bioquímica.* 4ª ed. Editorial Omega, Barcelona (2005).

Dary, O.; Georghiou, G. P.; Parsons, E.; Pasteur, N. *Microplate adaptation of Gomori's assay for quantitative determination of general esterase activity in single insects.* J. Econ. Entomol. 83: 2187-2192 (1990).

Devonshire, A. L. *The role of electrophoresis in the biochemical detection of insecticide resistance.* En: *Electrophoretic studies on agricultural pests.* Hugh, D. L., Hollander, J. D. (eds.) *The Systematics Association special volume.* 39: 363-374 (1989).

Devonshire, A. L.; Moores, G. D. *A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorous, carbamate, and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (Myzus persicae).* Pestic. Biochem. Physiol. 18: 235-246 (1982).

Enzfitter 2.0. Biosoft, Cambridge, Reino Unido (2002).

French-Constant, R. H.; Roush, R. T. *Resistance detection and documentation: The relative roles of pesticidal and biochemical assays.* En: *Pesticide resistance in arthropods.* Roush, R. T., Tabashnik, B. E. (eds.) Chapman and Hall, New York (1990).

García-Segura, J. M.; Gavilanes, J. G.; Martínez del Pozo, A.; Montero, F.; Oñaderra, M.; Vivanco, F. *Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica.* 1ª ed. Editorial Síntesis, Madrid (1996).

Grant, D. F.; Bender, D. M.; Hammock, B. D. *Quantitative kinetic assays for Glutathione-S-Transferase and General Esterase in individual mosquitoes using an EIA reader.* Insect. Biochem. 19: 741-751 (1989).

Guerrero, F. D.; Pruett, J. H.; Kunz, S. E.; Kammlah, D. M. *Esterase profiles of diazinon-susceptible and resistant horn flies (Diptera:Muscidae).* J. Econ. Entomol. 92: 286-292 (1999).

Habig, W. H.; Jackoby, W. B. *Assays for differentiation of Glutathione S-Transferases.* Methods in Enzymology 77: 398-405 (1981).

Holme, D. J. *Bioquímica Analítica.* Editorial Acribia, Zaragoza (1983).

Pasteur, N.; Georghiou, G. P. Filter paper test for rapid determination of phenotypes with high esterase activity in organophosphate resistant mosquitoes. *Mosq. News* 41: 181-183 (1981).

Rose, R. L.; Barbhaya, L.; Roe, R. M.; Rock, G. C.; Hodgson, E. Cytochrome P450-associated insecticide resistance and the development of biochemical diagnostic assays in *Heliothis virescens*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 51: 178-191 (1995).

Sawicki, R. M.; Devonshire, A. L.; Payne, R. W.; Petzing, S. M. Stability of insecticide resistance in the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Pestic. Sci.* 11: 33-42 (1980).

Scharf, M. E.; Neal, J. J.; Bennett, G. W. Changes of insecticide resistance levels and detoxification enzymes following insecticide selection in the german cockroach, *Blattella germanica* (L). *Pestic. Biochem. Physiol.* 59: 67-79 (1998).

Scopes, R. K. Protein purification. Principles and practice. Springer advanced texts in chemistry. Springer-Verlag, New York (1988).

Scott, J. G. Investigating mechanisms of insecticide resistance: Methods, strategies and pitfalls. En: Pesticide resistance in arthropods. Roush, R. T., Tabashnik, B. E. (eds.) Chapman and Hall, New York (1990).

Townson, H. Esterase polymorphism in *Aedes aegypti*: the genetics and K_m values of electrophoretically heterogeneous forms. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 66: 255-266 (1972).

Van Asperen, K. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *J. Insect Physiol.* 8: 401-416 (1962).

Zhou, X.; Scharf, M. E.; Meinke, L. J.; Chandler, L. D.; Siegfried, B. D. Characterization of general esterases from methyl parathion-resistant and -susceptible populations of western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 96: 1855-1863 (2003).



Imágenes de *Blattella germanica* (L.) y el control de las plagas urbanas.

Estudio de la resistencia en una población de campo de Blattella germanica

Tras la amplia introducción del DDT como método de control de los mosquitos transmisores de la malaria, la evolución de la resistencia en los insectos se convirtió en un problema (Brown, 1967), que, hoy por hoy, se mide a escala global. El hecho de que la diana del DDT fuese de naturaleza ubicua, hizo que la evolución de la resistencia fuera inevitable en otras especies de insectos expuestas también a este insecticida.

Durante los años 90 se comprobó, a partir de investigaciones más específicas sobre los mecanismos implicados en la resistencia, que los insectos tienen la habilidad innata de desarrollar resistencia a la mayoría de clases de insecticidas, e incluso, en algunos casos, a diferentes clases a la vez. Este es el caso de la cucaracha *Blattella germanica*, que ha desarrollado resistencia a todos los insecticidas tradicionales, así como resistencia cruzada a los introducidos recientemente, como el fipronil (ver apartados 2-2.2 y 2-2.3 del capítulo 2). Este hecho la hace particularmente interesante como organismo modelo para el estudio de la resistencia a insecticidas. En este sentido, Hemingway y colaboradores (2002) proponen el empleo, como especies modelo, de aquellos insectos plaga sometidos a extensos programas de control y frente a los cuales han desarrollado múltiples mecanismos de resistencia.

En la actualidad, y dada su eficacia y baja toxicidad en mamíferos, los piretroides son los compuestos más ampliamente utilizados en el control de *Blattella*. Existen dos tipos de piretroides según su diferente estructura química y síntomas de exposición: los del tipo I, que no contienen el grupo α -ciano y entre los que se incluyen la aletrina, tetrametrina, resmetrina, sumitrina, bioresmetrina y permetrina; y los del tipo II, que sí lo contienen, como la cipermetrina, ciflutrina, cialotrina, deltametrina, esfenvalerato, fluvalinato y fenvalerato (Martínez-Torres et al., 1997). Ambos tipos de piretroides actúan sobre el sistema nervioso de los insectos, al nivel de los canales de sodio dependientes de voltaje de la membrana neuronal. Algunos piretroides del tipo II también afectan la acción del neurotransmisor GABA (Bloomquist et al., 1997).

Los piretroides cipermetrina, permetrina, fenvalerato y deltametrina se encuentran entre los más empleados en el control de insectos (El-Sayed y

Knowles, 1984), siendo la deltametrina el principio activo más utilizado y más eficaz en el control de *Blattella* (Cochran, 1995a). Este compuesto consta de un único isómero, y esta característica exclusiva de la deltametrina proporciona mayor estabilidad a la molécula, más pureza al producto, mayor eficiencia con dosis más bajas y mejores resultados en el control de la plaga.

No obstante, y como consecuencia de su uso continuado, la resistencia de *B. germanica* a los piretroides se ha convertido en un serio problema (Ebbett y Cochran 1997), provocando fallos en su control en poblaciones de campo (Cochran, 1989; Scott et al., 1990, Atkinson et al., 1991; Valles y Yu, 1996; Dong et al., 1998; Wei et al., 2001). Así, se han descrito poblaciones de *Blattella* resistentes a piretroides en países como Dinamarca (Vagn-Jensen, 1988; Hemingway et al., 1993a), Japón (Umeda et al., 1988), Estados Unidos (Cochran, 1989; Zhai y Robinson, 1990; Atkinson et al., 1991; Bull y Patterson, 1993; Hemingway et al., 1993a; Valles y Yu, 1996; Scharf et al., 1996, 1997), Panamá (Hemingway et al., 1993a), Reino Unido (Chapman et al., 1993), Malasia (Lee et al., 1996), China (Huang et al., 1999; Lin et al., 2000), Brasil (Salmeron y Omoto, 2003), Taiwan (Pai et al., 2005) e Irán (Ladonni, 1997; Limoe et al., 2007). Sin embargo, hasta la fecha no se ha publicado ningún estudio en este sentido en España, pese a los múltiples problemas descritos relacionados con esta plaga (Aguilar et al., 2000; ANECPLA, 2006).

Los principales mecanismos implicados en la resistencia a piretroides en esta cucaracha son: una elevada biotransformación o una mayor capacidad para secuestrar al insecticida (Hemingway et al., 1993b; Scharf et al., 1998a); cambios estructurales en los canales de sodio dependientes de voltaje debidos a mutaciones (Scott et al., 1990; Hemingway et al., 1993b; Lee et al., 1996; Dong et al., 1998); o bien una combinación de ambos mecanismos (Hemingway et al., 1993b; Dong et al., 1998; Wu et al., 1998; Valles et al., 2000; Wei et al., 2001; Pridgeon et al., 2002; Valles, 2004; Limoe et al., 2007).

Con el fin de comprender las bases bioquímicas de la resistencia en *Blattella germanica*, y siguiendo los objetivos marcados al inicio de la presente Tesis Doctoral, se llevaron a cabo toda una serie de experimentos para documentar y evaluar los mecanismos implicados en la resistencia de una población de *Blattella germanica* (población R) obtenida a partir de una muestra recogida en 1999 en la cocina de una cafetería en Valencia

(España). Las cucarachas habían sido sometidas a un tratamiento de choque con piretrinas y posteriormente tratadas con un piretroide como métodos de control.

Así pues, en primer lugar se determinó la resistencia frente al piretroide deltametrina, y a continuación se evaluaron los mecanismos bioquímicos que potencialmente podrían estar implicados en dicha resistencia, tanto mediante el empleo de los compuestos sinérgicos PBO y DEF, inhibidores de P450 y de hidrolasas, respectivamente, como mediante la medida de las actividades enzimáticas CaE, GST y P450.

Por otro lado, a menudo no se conocen exactamente los insecticidas empleados en el control de las poblaciones recogidas en el campo (como es el caso de nuestra población R), y que desembocan en la aparición de la resistencia. De modo que realmente no sabemos cuáles son los mecanismos directamente relacionados con el tratamiento con un insecticida determinado. Por ello, son interesantes los experimentos de selección en el laboratorio, diseñados para identificar mecanismos de resistencia específicos a un determinado insecticida, y poder formular así estrategias de control efectivas en base a los conocimientos adquiridos en dichos experimentos. En este sentido, con la excepción de algunos estudios en laboratorio y limitadas evaluaciones en campo, se posee muy poca información respecto a la deltametrina y su capacidad para seleccionar resistencia. Por ello, nuestra siguiente etapa fue seleccionar resistencia a la deltametrina en una población híbrida, resultante del cruce de la población de campo R e individuos de una población sensible de referencia (L_1), caracterizar dicha resistencia, sus niveles y patrón de desarrollo.

Los objetivos del presente trabajo fueron:

- 1) Evaluar los mecanismos que confieren resistencia a insecticidas en una población de *B. germanica*, y en especial, la desintoxicación metabólica en la resistencia a piretroides.
- 2) Evaluar la respuesta de una población de *B. germanica* sometida a presión de selección con un piretroide, y la contribución de cada mecanismo en el fenómeno global.

4-1. Material y Métodos

4-1.1. Insectos. Recolección y cría.

La población *R*, caracterizada en este estudio, fue establecida en nuestro laboratorio a partir de una muestra cedida por una empresa de control de plagas. La muestra estaba formada por una hembra con ooteca, un macho y una ninfa de tercer estadio de *B. germanica*. Las cucarachas se mantuvieron sin exposición a insecticidas, y fue necesario esperar varias generaciones desde su llegada al laboratorio para tener suficiente número de insectos para los ensayos toxicológicos y bioquímicos.

En los ensayos se comparó la población *R* con las poblaciones de referencia: *L*₂, población sensible cedida por la Dra Ross, del Virginia Polytechnic Institute (USA); *L*₁, población sensible mantenida en nuestro laboratorio durante más de 25 años sin contacto alguno con insecticidas, y la población *Melia* (ML), que nos sirvió como población resistente de referencia. Ésta fue establecida a partir de una muestra de la población *Melia* 12 enviada por el Dr. Lee del Institute of Science of Malaysia. Dicha población fue recogida en julio de 1997, habiendo sido tratada durante más de 20 años con propoxur (carbamato), y en los dos últimos años con λ -cialotrina (piretroide). En el laboratorio del Dr. Lee, la población fue seleccionada cada tres generaciones con fenitrotión (50 mg/m²) durante 7 días, en adultos y ninfas de 5^o y 6^o estadio. También allí se caracterizó su nivel de resistencia, siendo moderado frente a piretroides, OPs y carbamatos. Parece que en dicha resistencia estarían implicadas monooxigenasas y esterasas (Lee, comunicación personal).

Por último, se estableció la población BCP, a partir de individuos de las poblaciones BBR, CIGO y PG, enviados a nuestro laboratorio por el Dr. Lee. La población BBR, recogida en julio de 1999, había sido tratada mensualmente con deltametrina y α -cipermetrina (ambos piretroides). Posteriormente no fue seleccionada en el laboratorio del Dr. Lee, aunque sí caracterizados sus niveles de resistencia (moderada a piretroides y baja a OPs y carbamatos) así como los posibles mecanismos implicados en la misma: monooxigenasas y esterasas (Lee, comunicación personal). La población CIGO, recogida en diciembre de 1998, recibió tratamientos mensuales alternados de λ -cialotrina (piretroide) y metil-pirimifos (OP). Tampoco fue posteriormente seleccionada en el laboratorio. Presentaba

niveles de resistencia moderados a piretroides, OPs y carbamatos, apareciendo implicadas monooxigenasas y esterasas (Lee, comunicación personal). Por último, la población PG fue recogida en octubre de 1999 y tratada mensualmente con λ -cialotrina y metil-pirimifos. No fue seleccionada en laboratorio ni caracterizada su posible resistencia (Lee, comunicación personal).

Todas las poblaciones fueron criadas a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, 65-70% HR y fotoperiodo de 16h:8h (L:O). Las colonias se sincronizaban manteniendo las camadas de cada semana en botes separados. Para la manipulación de los insectos no se utilizaba anestesia. Las cucarachas fueron alimentadas ad libitum con pienso para ratas y el agua se administró en tubos de cristal tapados con algodón.

4-1.2. Caracterización de la resistencia al insecticida deltametrina en la población R de B. germanica.

4-1.2.1. Detección de la resistencia.

Dos son los tipos de bioensayos más comúnmente empleados en Blattella germanica: bioensayos de aplicación tópica (dosis-mortalidad) (Milio et al., 1987; Cochran, 1997) y métodos de contacto por exposición a residuo (tiempo-mortalidad), donde los insectos caminan sobre una superficie tratada con el insecticida (Cochran, 1989, 1994; Ladonni, 2001). En los primeros se prueban varias concentraciones del ingrediente activo y se anota el porcentaje de individuos muertos a un tiempo prefijado. Para el segundo tipo, se deposita una cantidad diagnóstica (determinada previamente) del ingrediente activo y se anota el instante en que aparece el primer muerto, así como los sucesivos tiempos hasta que no queden supervivientes. Con piretroides el criterio de respuesta se define como knockdown, esto es, la inmovilización del insecto. Este segundo tipo de bioensayos, que se recoge como método estándar por la Organización Mundial de la Salud (W.H.O. 1970) para el estudio de la resistencia a insecticidas en cucarachas, fue el empleado en nuestro trabajo. Mediante este método los insectos están expuestos al insecticida por contacto tarsal, como ocurre en su ambiente natural (Lee et al., 1996). Ahora bien, puesto que solamente se emplea una cantidad fija del insecticida, ésta debe ser cuidadosamente escogida para permitir que se exprese el mecanismo de la resistencia; si se utiliza una cantidad excesivamente alta sería capaz de

matar a la mayoría de los insectos y concluirse, erróneamente, que éstos no son resistentes (Cochran, 1997).

En el presente trabajo los bioensayos fueron realizados con el insecticida deltametrina (98,5% de pureza) cedido por la empresa Agrevo, S. A. (en la actualidad Bayer CropScience, S.L.).

Los recipientes de cristal (263,9 cm² de superficie interna) se trataron con 2 mL de acetona y 500 µL de una disolución de deltametrina (5 miligramos del producto técnico en 20 mL de acetona), resultando depositados 473,66 ng de deltametrina/cm². Los botes se hicieron rodar para que la acetona con el insecticida se distribuyera uniformemente por sus paredes interiores, y seguidamente se mantuvieron en campana extractora hasta la evaporación completa de la acetona. Para cada bioensayo se trataron de tres a cinco botes. Los controles recibieron sólo acetona. La cantidad empleada se basó en ensayos preliminares realizados con la población sensible L₁ y con las que se obtenía un TK₅₀ (tiempo de respuesta, definida como knockdown, del 50% de los individuos) de 60 minutos o menos (Cochran, 1989).

Para cada tratamiento, y después de ser pesadas, se emplearon 10 cucarachas, 5 machos más 5 hembras (adultas de 7 días de edad), o 10 ninfas de los dos últimos estadios. Tras colocar a las cucarachas dentro de los botes se comprobó, a intervalos de 2-3 minutos para las poblaciones sensibles o de 10 minutos para las resistentes, el número de insectos caídos (knocked), hasta obtener entre el 90% y 100% de individuos afectados. Se consideró como respuesta al tratamiento a la incapacidad de las cucarachas para moverse normalmente de forma coordinada tras ser estimuladas con unas pinzas. Cada bioensayo fue repetido en tres o cuatro días distintos, siempre a la misma hora.

4-1.2.2. Estudios con sinergistas.

Mediante aplicación tópica se evaluaron los efectos sinérgicos del PBO y del DEF en la resistencia a la deltametrina en la población R.

Previamente se habían realizado ensayos preliminares para determinar las dosis subletales de los sinergistas. En base a los resultados obtenidos, las cucarachas (ninfas de los dos últimos estadios) se trataron primeramente con el sinergista PBO (0,95 µg/insecto) o DEF (1,04 µg/insecto). Dos horas después de este tratamiento, eran expuestas al

bioensayo de contacto tarsal con el insecticida, siguiendo los procedimientos descritos en el apartado anterior (4-1.2.1).

4-1.2.3. Ensayos enzimáticos.

Las medidas de las actividades enzimáticas se realizaron en extractos, tanto de ninfas como de adultos decapitados, de las poblaciones R y L₁ (población sensible de referencia) de *B. germanica*.

4-1.2.3.1. Preparación de las muestras.

Las cucarachas de cada grupo analizado (30 machos, 30 hembras y 60 ninfas de los dos últimos estadios), sin exposición previa a ningún insecticida, se pesaron y a continuación fueron homogeneizadas con una disolución Tris-HCl 0,1 M, pH 7,8 (0,2 mL/insecto) a 4°C, empleando un homogeneizador de potter a velocidad media, en dos tandas de 30 segundos cada una. El homogeneizado fue entonces centrifugado a 10.000 g durante 20 minutos a 4°C con una centrífuga Sigma modelo 3K20 (Sigma Laboratory Centrifuges GmbH, Osterode am Harz, Alemania). El sobrenadante se filtró con lana de vidrio y de nuevo se centrifugó a 100.000 g durante 60 minutos a 4°C en una ultracentrífuga Beckman Coulter Optima™ MAX-E (Beckman Coulter Inc., Palo Alto, California, USA). Los precipitados se resuspendieron en 1 mL de la disolución de homogeneización. Tanto el sobrenadante (fracción S100), como las fracciones microsomales (M100) se almacenaron a -80°C hasta su utilización (**Fig. 3-6**). Se obtuvieron y procesaron tres muestras diferentes en días distintos para cada una de las poblaciones.

Justo antes de ser empleadas en los ensayos enzimáticos las muestras proteicas se diluyeron con una disolución que contenía BSA en una proporción de 0,5 mg/mL.

4-1.2.3.2. Cuantificación de las actividades enzimáticas.

Los mecanismos bioquímicos potencialmente implicados en la resistencia de la población R fueron evaluados mediante la cuantificación de las actividades esterasa, GST y EROD.

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y la cuantificación se efectuó dentro de los rangos de linealidad para el tiempo y la concentración de proteína (ver capítulo 3). Las medidas

se hicieron en un lector de placas (TECAN SPECTRA-Fluor, Salzburg, Austria), siguiendo los protocolos adaptados según se describe en el capítulo 3.

Actividad GST. Se determinó la actividad GST tanto en la fracción subcelular S100 (citósica) como en la M100 (microsomal). Siguiendo el protocolo establecido (**Tabla 3-6**), a 50 μL de la disolución de la enzima diluída (3/1000 en una disolución de fosfato potásico 0,1 M, 1 mM EDTA, pH 7), para el análisis con CDNB, o a 50 μL del homogeneizado sin diluir, para el caso del DCNB, se añadieron 50 μL de una mezcla de reacción que contenía para el ensayo con el CDNB: una disolución de fosfato potásico (0,1 M, 1 mM EDTA; disolución de ensayo I a pH 7), que contenía GSH (10 mM concentración final) y CDNB (2 mM concentración final); y para el ensayo con el DCNB: una disolución de Tris-HCl (0,1 M, 1 mM EDTA, pH 8), que contenía GSH (10 mM concentración final) y DCNB (3 mM concentración final), siendo el volumen final de reacción de 100 μL . La reacción espontánea (no catalizada), medida en ausencia de homogeneizado, sirvió como control. Se siguió la reacción durante 2 minutos, a 340 nm y 30°C, empleando el modo cinético para ambos ensayos. Los “coeficientes de extinción” determinados previamente (ver apartados 3-2.2.1.1 y 3-2.2.1.2) se emplearon para convertir los cambios en la absorbancia en μmoles de conjugado formado en los 2 minutos de la reacción.

Actividad CaE. Para un volumen final de reacción de 100 μL , 50 μL de la mezcla de reacción (p-NPA 2 mM, concentración final) se mezclaron con 50 μL del homogeneizado (fracciones S100 y M100) diluido en la disolución de ensayo II (pH 7,5, a la que añadimos 0,5 mg/mL de BSA). Después de la adición del sustrato, se siguió la aparición del producto durante dos minutos a 415 nm. La reacción espontánea (no catalizada) medida en ausencia de homogeneizado, sirvió como control. El “coeficiente de extinción” determinado previamente (ver apartado 3-2.2.1.3) se utilizó para convertir los cambios en la absorbancia en μmoles de conjugado formado en los 2 minutos de la reacción. Para la fracción S100 se determinaron también los valores de la K_m y de la V_{max} , para la actividad esterasa frente a p-NPA en las cepas L_1 y R, tanto en ninfas como en adultos (para detalles de los protocolos ver apartado 3-2.2.1.3). Estos valores

se calcularon aplicando el programa Enzfitter Software (Biosoft) y utilizando la ecuación de Michaelis-Menten para ajustar los datos.

Actividad P450 (EROD). A 50 μL de homogeneizado (fracción M100) se añadieron 50 μL de la mezcla de reacción: NADPH 250 μM (concentración final) y 7-etoxirresorrufina (60 μM en DMSO, concentración final) en una disolución Tris-HCl 0,1 M, pH 7,8 (disolución de ensayo III). Durante tres minutos se siguió el incremento en la fluorescencia debida a la aparición de la resorrufina. Para los cálculos de la actividad se preparó un patrón con distintas cantidades de resorrufina (0,02 μM -1 μM).

Experimentos preliminares demostraron que la actividad EROD se encontraba por debajo del nivel de detección cuando se empleaban insectos no decapitados.

Cantidad de proteína. El contenido proteico de los extractos se determinó mediante el método de Lowry y colaboradores (1951), siguiendo la modificación de Biorad para microensayo en microplaca. Como patrón se empleó la albúmina de suero bovino.

4-1.3. Poblaciones híbridas de *B. germanica* sometidas a presión de selección con el piretroide deltametrina.

4-1.3.1. Establecimiento de las poblaciones híbridas.

Las poblaciones híbridas RL_1 y $BCPL_1$, se obtuvieron como resultado de los cruzamientos aleatorios en masa de las poblaciones R y L_1 , y BCP y L_1 , respectivamente.

Para la población RL_1 , 60 individuos de cuarto estadio de la población L_1 se cruzaron con 30 individuos de cuarto estadio de la población R (4 meses después de su recolección).

Para la población $BCPL_1$ el cruce también mantuvo la proporción 2:1, aunque en este caso fueron 120 insectos de cuarto estadio de la población L_1 , con 60 insectos, entre machos adultos y ninfas, de la población BCP.

Antes de los experimentos de selección, y para poder tener suficiente número de cucarachas, se dejaron transcurrir dos generaciones de cruzamiento endogámico aleatorio en ambas poblaciones híbridas.

4-1.3.2. Selección con deltametrina.

La población RL_1 fue dividida en dos subpoblaciones en la generación F_3 , una fue seleccionada (desde la F_2 hasta la F_5) con deltametrina (sRL_1), y la otra permaneció sin seleccionar (RL_1). Se procedió de igual manera con la población $BCPL_1$. La subpoblación sBCPL_1 fue sometida a presión de selección con la deltametrina, desde la generación F_3 a la F_7 , mientras que la subpoblación $BCPL_1$ fue mantenida sin presión de selección.

En todos los casos los experimentos de selección se llevaron a cabo con los estadios más tolerantes (5º y 6º estadios ninfales; Koehler et al., 1993). En cada ciclo se exponían entre 50 y 80 individuos de cada una de las distintas camadas empleadas, con un total de aproximadamente 400 insectos por generación. Las cucarachas se distribuían en botes de cristal previamente tratados con la concentración apropiada de la disolución insecticida (siguiendo el mismo procedimiento que el descrito para los bioensayos de contacto tarsal, sección 4-1.2.1) y permanecían en ellos durante periodos específicos de tiempo, como se detalla en la **tabla 4-1**.

Tabla 4-1. Detalles de los experimentos de selección de dos poblaciones híbridas, sRL_1 y sBCPL_1 , de *Blattella germanica* en ninfas de 5º y 6º estadio.

Población	Generación	Concentración insecticida (ng/cm ²)	Tiempo de exposición (min)	Porcentaje de caídos (knocked) ^a	Porcentaje de muertos ^b
sRL_1	F_2	473,66	25	40,4	21,0
	F_3	473,66	75	71,2	28,3
	F_4	1894,64	60	59,2	54,2
	F_5	18946,57	5760	73,1	76,2
sBCPL_1	F_3	473,66	25	58,3	38,8
	F_4	473,66	40	83,6	67,1
	F_5	-	-	-	-
	F_6	1136,79	40	91,4	89,6
	F_7	-	-	-	-

^aPorcentaje de caídos (knocked) tras exposición al insecticida durante el tiempo establecido.

^bPorcentaje de mortalidad 72 horas después de la exposición.

Los insectos paralizados eran eliminados, lo que constituía una primera fase en el ensayo. Los restantes eran transferidos a botes limpios con agua y comida. A las 72 horas, se comprobaba la mortalidad y los supervivientes eran devueltos a la población de partida. Obviamente, la

selección última dependía de los supervivientes que maduraban y se reproducían con éxito.

Para evaluar la respuesta a la presión, después de cada ciclo de selección, tanto las subpoblaciones seleccionadas como las mantenidas sin presión fueron sometidas a bioensayos de contacto tarsal con la deltametrina. Además, en el último ciclo se incluyeron también ensayos con los sinergistas PBO y DEF, con el fin de evaluar la posible participación de los mecanismos oxidativo e hidrolítico en la resistencia seleccionada. Se siguió el mismo procedimiento que en los estudios realizados con la población R (ver apartado 4-1.2.2).

También en el último ciclo fueron evaluadas las respuestas frente a los insecticidas fenitrotión (OP) y acrinatrina (piretroide). En el caso del fenitrotión se utilizó un bioensayo de aplicación tópica empleando el producto técnico (97,8% de pureza, cedido por la empresa Bayer CropScience, S.L.). Las concentraciones evaluadas (5 concentraciones distintas) producían una mortalidad entre el 1-100% de los individuos tratados. Las cucarachas fueron inicialmente separadas y distribuidas en placas petri de vidrio. Para cada concentración se trataron unos 30 individuos (3 grupos de 10 cucarachas por recipiente). El protocolo básico consistió en depositar sobre el abdomen de cada cucaracha 1 mL de la disolución del insecticida, o de acetona en el caso de los controles. Para facilitar la manipulación y el tratamiento de los insectos, las cucarachas fueron anestesiadas con frío. Los posibles efectos adversos de una exposición prolongada al frío se minimizaron al procesar a los insectos en pequeños grupos de insectos y ser tratados rápidamente. Experimentos preliminares habían demostrado que, de este modo, el procedimiento de inmovilización no producía efectos dañinos. La evaluación de la mortalidad se realizó 24 horas después de la aplicación del insecticida, adoptándose como criterio de respuesta la incapacidad de movimiento, mostrando evidencia de parálisis. Para la acrinatrina el procedimiento fue idéntico al empleado con la deltametrina (ver apartado 4-1.2.1).

4-1.4. Análisis estadístico.

4-1.4.1. Ensayos toxicológicos.

Típicamente, en los ensayos dosis-mortalidad los resultados son analizados mediante análisis Probit para estimar la dosis que mata al 50% de la población (DL_{50}) (Litchfield y Wilcoxon, 1949). Este fue el método

empleado en los ensayos con el fenitrotión. Para este análisis se empleó el programa estadístico POLO-PC (LeOra Software, Berkely, CA).

Sin embargo, estas técnicas estándar de análisis Probit no son aplicables cuando se dispone de datos tiempo-mortalidad, puesto que, al realizar múltiples observaciones sobre el mismo grupo de individuos, las medidas están correlacionadas (violada la asunción de independencia) (Robertson y Preisler, 1992). De ello resultan errores estándar más pequeños, con lo que se obtendrían más resultados "estadísticamente significativos" de lo esperable. Esta correlación debe ser, pues, tenida en cuenta utilizando métodos de análisis apropiados. En este sentido, los modelos de regresión estándar probit se han adaptado al incluir una estructura de correlación y un estimador robusto de la varianza de los coeficientes de regresión. Así, Throne y colaboradores, en 1995(a), desarrollaron un programa (PROBIT) con el que implementar la regresión logística para datos correlacionados. Este fue el programa empleado en el análisis de los datos de los ensayos de contacto tarsal. El programa está escrito y es ejecutado en lenguaje Mathematica. Con él se estimaron los valores del TK_{50} y TK_{90} .

En todos los análisis se empleó el estadístico χ^2 para verificar la bondad del ajuste del modelo a los datos experimentales (Robertson y Preisler, 1992; Throne et al., 1995b).

A partir de aquí definimos factor de resistencia (FR) como el valor resultante de dividir el valor de la DL_{50} o TK_{50} (dependiendo del tipo de bioensayo empleado) de las poblaciones estudiadas, por el valor de la DL_{50} o TK_{50} de la población de referencia (sensible) de laboratorio; este factor nos permite comparar entre poblaciones, o entre distintos tóxicos para una misma población. El intervalo de confianza al 95% de esta nueva ratio se calculó en base a Robertson y Preisler (1992); si los intervalos incluyen el valor 1, entonces los dos parámetros no son significativamente diferentes.

El efecto de los sinergistas se expresó en los términos siguientes: factor de sinergismo (FS): TK_{50} sin sinergista / TK_{50} con sinergista; factor de resistencia 1 (FR1): TK_{50} de la población resistente con sinergista / TK_{50} de la población sensible sin sinergista (mide el efecto del sinergismo en la resistencia); factor de resistencia 2 (FR2): TK_{50} de la población resistente con sinergista / TK_{50} de la población sensible con sinergista (compara el valor del TK_{50} con sinergista entre las poblaciones resistente y sensible). Estos términos se adoptaron de Saito y colaboradores (1991). Además se

calcularon las proporciones $FR/FR1$ y $FR2/FR$ indicativas de la presencia de otros mecanismos adicionales al suprimido por el sinergista empleado.

4-1.4.2. Ensayos bioquímicos.

Los análisis estadísticos se realizaron usando los paquetes informáticos SPSS 12.0 básico y avanzado para Windows (SPSS Inc, Chicago, IL).

Los datos de las actividades enzimáticas, así como los valores de la K_m y de la V_{max} , (calculados empleando la ecuación de Michaelis-Menten), de las poblaciones resistente y sensible se compararon mediante la prueba t de Student.

Antes de realizar los análisis se estudió la normalidad de los datos, utilizando las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y de Shapiro-Wilk con la corrección de Lilliefors; la homogeneidad de la varianza se comprobó con la prueba de Levene. Las actividades enzimáticas no mostraron distribuciones normales respecto de la media y además presentaron heterogeneidad de las varianzas. Para estabilizar la normalidad y la varianza se utilizó una transformación logarítmica. El nivel de significación empleado fue del 5%.

4-2. Resultados

4-2.1. Caracterización de la resistencia al insecticida deltametrina en la población R de *B. germanica*.

4-2.1.1. Detección de la resistencia.

En la **tabla 4-2** y en las **figuras 4-1 y 4-2** se recogen los resultados de los análisis de regresión para medidas correlacionadas, y las curvas respuesta, tras evaluar la toxicidad del piretroide deltametrina en las poblaciones R (población de campo), L_1 y L_2 (sensibles de referencia) y ML (resistente de referencia).

Para 5 de las 11 regresiones calculadas, los valores de χ^2 no fueron significativos ($P > 0,05$). Los valores significativos de χ^2 ($P < 0,05$) para el resto de curvas (**Tabla 4-2**), podrían señalar que las respuestas fueron heterogéneas. Entre las causas cabría citar las diferentes respuestas en función de la edad incluso dentro de un mismo estadio (se emplearon ninfas

Tabla 4-2. Tiempos de respuesta knockdown (TK_{50} y TK_{90}), pendiente de la recta de regresión PROBIT y factores de resistencia (FR_{50} y FR_{90}) a la deltametrina (473,66 ng de deltametrina/cm²) de adultos y ninfas de distintas poblaciones de *B. germanica*.

Población ^a	Estadio ^b	Pendiente \pm error estándar	$P > \chi^2$ ^(c)	TK_{50} (95%LC) (min.)	Factor resistencia (FR_{50}) ^d	TK_{90} (95%LC) (min.)	Factor resistencia (FR_{90}) ^d
L ₂	machos	8,42 \pm 1,85	0,179	8 (7-10)	1	12 (10-16)	1
	hembras	7,25 \pm 1,64	0,130	9 (7-11)	1	13 (11-20)	1
	ninfas	5,96 \pm 0,75	0,004	22 (16-29)	1	36 (27-67)	1
L ₁	machos	6,57 \pm 0,59	0,238	11 (10-12)	1,35	18 (16-20)	0,95
	hembras	7,01 \pm 0,64	0,127	14 (10-16)	1,56	21 (18-26)	1,04
	ninfas	3,19 \pm 0,19	6,5 \cdot 10 ⁻³	26 (20-32)	1,18	65 (49-99)	0,72
ML	machos	3,45 \pm 0,37	0,038	20 (14-30)	2,41*	48 (32-100)	1,70*
	hembras	2,32 \pm 0,32	0,024	30 (18-74)	3,35*	106 (50-1585)	2,23*
	ninfas	1,83 \pm 0,15	1,2 \cdot 10 ⁻⁴	70 (44-147)	3,23*	354 (163-2301)	1,97*
R	machos	3,41 \pm 0,48	0,56	4643 (3685-5933)	551,85*	11027 (8237-17302)	388,90*
	hembras	2,07 \pm 0,45	0,26	12669 (7936-18942)	1424,40*	52826 (31828-152999)	948,58*
	ninfas	nc	nc	nc	nc	nc	nc

^aL₂ y L₁, poblaciones sensibles; ML(Melia), población resistente; R, población recogida en una cafetería de Valencia (España) (ver características de las poblaciones en el texto, apartado 4-1.1).

^bMachos y hembras, adultos de 7 días; ninfas de los dos últimos estadios.

^cUn valor de $P > \chi^2$ mayor de 0,05 indica un ajuste significativo entre las líneas de regresión observada y esperada.

^dEl factor de resistencia y los límites de confianza del 95% se calcularon para cada población respecto de la población L₂ según el método de Robertson y Preisler (1992).

nc, no fue posible su cálculo. La cantidad de insecticida empleada resultó ser subletal para las ninfas de esta población. Sí se observaron alteraciones morfológicas en los adultos; incluso algunas ninfas murieron en el paso al estadio adulto.

*, los valores de la misma columna seguidos de asterisco señalan una diferencia significativa entre este valor TK_{50} o TK_{90} y el de la población sensible.

de los dos últimos estadios), o diferencias ligadas al sexo (no se verificó el sexo de las ninfas tratadas).

Los resultados nos muestran que no hay diferencias significativas en los valores de los tiempos knockdown entre las poblaciones L_1 y L_2 , tanto en adultos (machos y hembras) como en ninfas a los niveles 50 y 90% (**Tabla 4-2, Fig. 4-1 y 4-2**). Se verificó así que la población L_1 podía ser tomada como sensible de referencia. La población L_2 es una población sensible de laboratorio, marcada genéticamente, y cuya sensibilidad a insecticidas ha sido acreditada (Cochran, 1995b).

Por otro lado, las hembras de cada población resultaron ser más tolerantes a la deltametrina que los machos. Así en la población L_2 las hembras eran 1,06 veces (95% LC, 0,84-1,33) más tolerantes, en la población L_1 , 1,22 veces (95% LC, 0,94-1,41), en la ML 1,47 veces (95% LC, 1,19-2,62) y en la R 2,73 veces más tolerantes (95% LC, 1,72-4,33).

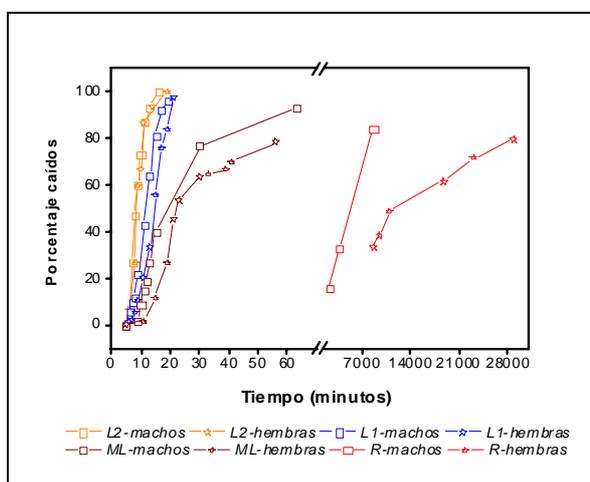


Figura 4-1. Porcentaje de adultos caídos en función del tiempo, de las poblaciones L_2 , L_1 , ML y R en los bioensayos de contacto tarsal con la deltametrina ($0,47 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Centrándonos en la población R, los adultos (machos y hembras) fueron significativamente más resistentes a la deltametrina que las cucarachas (machos y hembras) de las poblaciones L_1 y L_2 . Incluso resultaron ser 229,16 y 425,6 veces más resistentes que los machos y

hembras, respectivamente, de la población resistente *Melia* a nivel de TK_{50} (Tabla 4-2, Fig. 4-1).

En cuanto a las ninfas, 473,66 ng de deltametrina/cm² causaron la parálisis del 100% de los individuos a los 50 minutos del inicio del experimento (TK_{50} = 22 minutos) en la población L₂, y a los 60 minutos (TK_{50} = 26 minutos) en la población L₁. (Tabla 4-2, Figura 4-2).

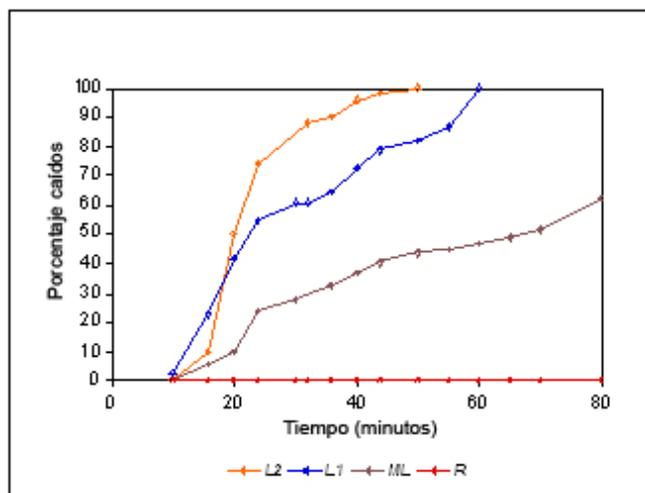


Figura 4-2. Porcentaje de ninfas caídas en función del tiempo, de las poblaciones L₂, L₁, ML y R en los bioensayos de contacto tarsal con la deltametrina (0,47 µg/cm²).

En la población ML el porcentaje de ninfas caídas a los 80 minutos fue de un 60%. La población ML en este estadio, presentó niveles de resistencia bajos con un factor de 2,75 en el nivel TK_{50} comparado con la población L₁. Niveles más bajos que los que dicha población presentaba en el laboratorio del Dr. Lee, posiblemente porque la población ML permaneció desde su llegada a nuestro laboratorio sin exposición alguna a insecticidas, lo que da cuenta de la estabilidad de la resistencia de esta población.

Para las ninfas de la población R tratadas la cantidad de insecticida empleada resultó ser subletal y éstas consiguieron mudar al estadio adulto. Hay que hacer notar el elevado número de insectos que sufrieron algún tipo de alteración, incluso la muerte en el paso a este estadio (datos no mostrados). En éste sentido, se ha descrito que muchos insecticidas

presentan actividad agonista o antagonista de hormonas de insectos, siendo clasificados como alteradores endocrinos (Committee on Hormonally Active Agents in the Environment, National Research Council, USA, 1999; McLachlan, 2001). Parece que la deltametrina tendría éste efecto y como tal ya ha sido descrita en *B. germanica* (Lee et al., 1998).

En todos los casos, las ninfas eran más tolerantes que los adultos de su misma población, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Koehler y colaboradores (1993) y Valles y colaboradores (1996).

4-2.1.2. Ensayos con los compuestos sinérgicos PBO y DEF.

Las pruebas realizadas con el PBO y con el DEF evidenciaron el efecto de estos compuestos sinérgicos sobre los niveles de resistencia de las poblaciones estudiadas (**Tablas 4-3 y 4-4, Fig. 4-3 y 4-4**).

Cuando las cucarachas fueron pretratadas con el PBO, se produjo un incremento en la toxicidad de la deltametrina en las poblaciones ML (3,50x) y R (**Tabla 4-4**), que se pone de manifiesto en el desplazamiento de las curvas tiempo-respuesta hacia los tiempos de las poblaciones sensibles (**Fig. 4-3**). El resultado fue una reducción de la resistencia en ambas poblaciones al compararlas con la población L₂ (**Tablas 4-3 y 4-4**).

Tabla 4-3. Tiempos de respuesta knockdown (TK₅₀ y TK₉₀), y límites de confianza del 95% (95% LC), de distintas poblaciones de *B. germanica* tras exposición a PBO (0,95 µg/insecto) o DEF (1,04 µg/insecto) y deltametrina (473,66 ng de deltametrina/cm²) en ninfas (5º y 6º estadio).

Sinergista	Población ^a	Pendiente ± error estándar	P > χ ^{2(b)}	TK ₅₀ (95%LC) (min.)	TK ₉₀ (95%LC) (min.)
PBO	L ₂	4,20 ± 0,55	0,2900	18 (15-21)	36 (29-48)
	L ₁	3,21 ± 0,44	0,0240	19 (13-28)	48 (32-107)
	ML	3,09 ± 0,29	0,0026	20 (15-28)	53 (37-96)
	R	2,62 ± 0,39	0,0032	567 (139-3631)	1745 (718-2476624)
DEF	L ₂	3,04 ± 0,28	0,0079	17 (12-25)	44 (29-99)
	L ₁	2,60 ± 0,30	0,0022	18 (2-53)	55 (53-89)
	ML	2,34 ± 0,33	0,0520	34 (25-46)	120 (82-218)
	R	2,96 ± 0,46	0,0720	1356 (1066-1810)	3671 (2566-6729)

^aL₂ y L₁, poblaciones sensibles; ML(Melia), población resistente; R, población recogida en una cafetería de Valencia (España) (ver características de las poblaciones en el texto, apartado 4-1.1).

^bUn valor de P > χ² mayor de 0,05 indica un ajuste significativo entre las líneas de regresión observada y esperada.

Tabla 4-4. Efectos del PBO y del DEF en la toxicidad de la deltametrina en ninfas de 5º y 6º estadio de distintas poblaciones de *Blattella germanica*.

Sinergista ^a	Población ^b	FS	FR	FR1	FR2	FR/FR1	FR2/FR
PBO	L ₁	1,37	1,18	0,86	1,06	1,37	0,90
	ML	3,50	3,23	0,91	1,11	3,55	0,34
	R	nc ^c	nc	25,77	81,5	nc	nc
DEF	L ₁	1,44	1,18	0,82	1,06	1,44	0,90
	ML	2,06	3,23	1,55	2,00	2,08	0,62
	R	nc	nc	61,64	79,76	nc	nc

^aNinfas de los dos últimos estadios se trataron previamente con el sinergista, PBO (0,95 µg/insecto), o DEF (1,04 µg/insecto). Dos horas después de este tratamiento, eran expuestas al bioensayo con el insecticida, siguiendo los procedimientos descritos en el apartado 4-1.2.2.

^bL₁, población sensible; ML, población resistente; R, población recogida en una cafetería de Valencia (España) (ver características de las poblaciones en el texto, apartado 4-1.1).

^cnc, no fue posible su cálculo. La cantidad de insecticida empleada resultó ser subletal para las ninfas de esta población.

FR, factor de resistencia calculado para cada población respecto de la población L₂ según el método de Robertson y Preisler (1992) (ver **tabla 4-2**). FS, factor de sinergismo (TK₅₀ sin sinergista/ TK₅₀ con sinergista). FR1, factor de resistencia 1 (TK₅₀ de la población resistente con sinergista/ TK₅₀ de la población sensible L₂ sin sinergista). FR2, factor de resistencia 2 (TK₅₀ de la población resistente con sinergista/ TK₅₀ de la población sensible L₂ con sinergista).

Del mismo modo, al emplear el inhibidor de hidrolasas DEF, también se incrementó la toxicidad de este piretroide en ambas poblaciones resistentes (2,06x en la población ML), produciéndose un descenso en el nivel de la resistencia (0,62x en la población ML) (**Tablas 4-3 y 4-4**) y un desplazamiento hacia tiempos más bajos de las curvas tiempos-respuesta en presencia del sinergista (**Fig. 4-4**), si bien no tan acusado como con el PBO.

En la población Melía, los valores de la ratio FR2/FR con el PBO indicarían la presencia, junto al mecanismo oxidativo, de otro mecanismo de resistencia adicional. Puesto que el valor del FS para este sinergista (3,50) es el mayor. Los resultados con el sinergista DEF confirmarían la presencia de más de un mecanismo de resistencia a la deltametrina en esta población, posiblemente de naturaleza hidrolítica.

En la población R, de nuevo el PBO produjo el mayor efecto sobre la resistencia, rebajando la resistencia a un nivel 25,77x (FR1, **Tabla 4-4**).

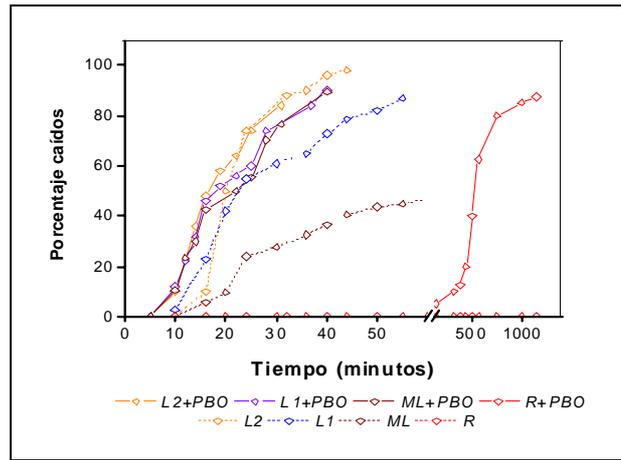


Figura 4-3. Porcentaje de ninfas caídas en función del tiempo, de las poblaciones L₂, L₁, ML y R en los bioensayos de contacto tarsal con la deltametrina (0,47 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), sola y con la deltametrina y el sinergista PBO (0,95 $\mu\text{g}/\text{insecto}$).

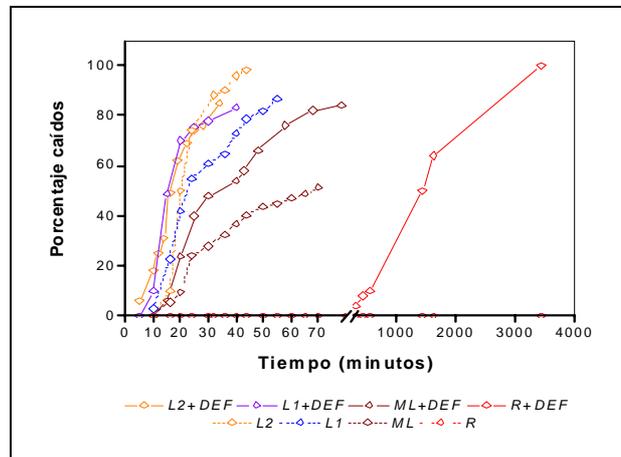


Figura 4-4. Porcentaje de ninfas caídas en función del tiempo, de las poblaciones L₂, L₁, ML y R en los bioensayos de contacto tarsal con la deltametrina (0,47 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), sola y con la deltametrina y el sinergista DEF (1,04 $\mu\text{g}/\text{insecto}$).

4-2.1.3. Ensayos bioquímicos.

En la **tabla 4-5** se presentan los valores de las actividades GST frente al CDNB y DCNB, CaE frente al pNPA y P450 (EROD), medidas en las poblaciones L₁ y R.

Tabla 4-5. Resultados de la medida de las actividades enzimáticas esterasa, GST y P450 frente a varios sustratos modelo en las poblaciones resistente (R) y sensible (L₁) de *Blattella germanica*.

Población ^c	Estadio ^b	GST ^a ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$)		CaE ^a ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$)		P450 ^a ($\text{pmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$)
		CDNB	DCNB	p-NPA		EROD
		S100	S100	S100	M100	M100
R	machos	0,4427±0,0554	0,0023±0,0005	0,3377±0,0817*	0,3660±0,0571*	0,2892±0,0300*
	hembras	0,4865±0,0413	0,0027±0,0006	0,4197±0,0667*	0,3818±0,0077*	0,3091±0,0092*
L ₁	machos	0,5197±0,0384	0,0023±0,0004	0,1492±0,0112	0,1201±0,0183	0,1264±0,0241
	hembras	0,5401±0,0095	0,0023±0,0002	0,1846±0,0165	0,1316±0,0184	0,1468±0,0181
R	ninfas	0,4901±0,0408	0,0015±0,0003	0,3928±0,1049*	0,4036±0,0229*	0,3312±0,0256*
L ₁	ninfas	0,5262±0,0408	0,0019±0,0001	0,1921±0,0619	0,1948±0,0216	0,1416±0,0341

^aMedia \pm error típico; se realizaron tres preparaciones distintas de cada extracto (mezcla de varios individuos) que se ensayaron por duplicado.

^bL₁, población sensible; R, población recogida en una cafetería de Valencia (España) (ver características de las poblaciones en el texto, apartado 4-1.1).

^cMachos y hembras, adultos de 7 días; ninfas de los dos últimos estadios.

S100, fracción citosólica; M100, fracción microsomal.

*, en una misma columna el asterisco indica la diferencia significativa respecto de la población L₁ ($P < 0,05$, prueba t de Student).

Para los ensayos GST-CDNB y GST-DCNB, la actividad GST fue más activa frente al CDNB que frente al DCNB, no evidenciándose diferencias significativas en las actividades entre ambas poblaciones en adultos, así como tampoco en ninfas (**Tabla 4-5**).

La actividad P450-EROD, por contra, sí presentó diferencias significativas entre las dos poblaciones estudiadas. Así, los machos de la población R presentaron una actividad EROD 2,3 veces mayor que los de la población L₁. Incrementos de 2,1x y 2,4x se dieron entre las hembras y ninfas, respectivamente, de las poblaciones L₁ y R (**Tabla 4-5**).

En el ensayo esterasa-pNPA, la población R presentó una actividad 2,3, 2,3 y 2,0 veces significativamente mayor que la población L₁ en machos, hembras y ninfas, respectivamente, para la fracción citosólica y 3,0, 2,9 y 2,1 veces, respectivamente, en la fracción microsomal (**Tabla 4-5**).

Por otro lado el estudio de la afinidad (K_m) de las CaEs por el sustrato p-NPA, mostró que no había diferencias significativas entre las dos poblaciones estudiadas L₁ y R (**Tabla 4-6**). Si la población resistente tuviera alguna isoenzima modificada, la K_m sería significativamente diferente que la de la población sensible. Nuestros datos sugieren que la población R de Blattella germanica no presenta una forma modificada de la enzima para resistir a los insecticidas. Por otro lado, la velocidad máxima de la enzima (V_{max}) fue significativamente más alta para la población resistente que la de la sensible (en machos, hembras y ninfas) (**Tabla 4-6**). Es decir, hay un incremento en la producción de la enzima en la población resistente respecto de la sensible. Estos resultados concuerdan con los de Prabhakaran y Kamble (1995).

Tabla 4-6. Estudio de la afinidad de las esterasas por el sustrato p-NPA. Parámetros cinéticos^a K_m y V_{max} , de la reacción de hidrólisis catalizada por esterasas de extractos de adultos y ninfas de dos poblaciones, resistente y sensible, de *B. germanica*.

Muestra ^b	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ proteína)
R-machos	0,31 \pm 0,06	0,18 \pm 0,01*
R-hembras	0,32 \pm 0,04	0,20 \pm 0,01*
R-ninfas	0,37 \pm 0,11	0,19 \pm 0,02*
L1-machos	0,34 \pm 0,08	0,07 \pm 0,01
L1-hembras	0,45 \pm 0,08	0,08 \pm 0,01
L1-ninfas	0,42 \pm 0,11	0,08 \pm 0,01

^aTodos los valores están representados como el valor promedio \pm error típico (se realizaron tres preparaciones distintas de cada extracto que se ensayaron por duplicado). Cálculo mediante el programa Enzfitter (ver capítulo 3, Tabla 3-1).

^bMachos y hembras, adultos de 7 días; ninfas de los dos últimos estadios. L₁, población sensible; R, población recogida en una cafetería de Valencia (España) (ver características de ambas poblaciones en el texto, apartado 4-1.1.1). Se empleó la fracción citosólica (S100) de los extractos.

*en una misma columna el asterisco indica la diferencia significativa respecto de la población L₁ ($P < 0,05$, prueba t de Student).

Por último, ninguna de las actividades analizadas mostró diferencias significativas entre machos, hembras y ninfas de una misma población (Tabla 4-5). Es decir, basándonos en los datos de las actividades enzimáticas frente a sustratos modelo, parecería que el metabolismo más activo de hidrolasas y oxidasas no explicaría las diferencias en la sensibilidad entre adultos y ninfas observadas en los bioensayos (apartado 4-2.1.1). Valles y colaboradores (1994) encontraron resultados similares.

En resumen, los bioensayos revelaron la elevada resistencia a la deltametrina de la población R. Los ensayos con los sinergistas, además, implicaron a esterasas y oxidasas en dicha resistencia, datos que parecerían corroborarse con los resultados de los ensayos bioquímicos.

4-2.2. Respuesta a la presión de selección.

A partir de las poblaciones R, con un nivel de resistencia a la deltametrina elevado (420 y 904,3 veces más resistente (al nivel TK_{50}) que la población L₁ para machos y hembras, respectivamente; **Tabla 4-2**) y la población sensible L₁, se obtuvo la población RL₁ (ver apartado 4-1.3.1).

Ésta fue sometida a presión de selección con el piretroide deltametrina, respondiendo significativamente a dicha presión (Tablas 4-1 y 4-7, Fig. 4-5).

Tabla 4-7. Tiempos de respuesta knockdown (TK_{50} y TK_{90}), pendiente de la recta de regresión PROBIT y factores de resistencia (FR_{50} y FR_{90}) a la deltametrina de las ninfas (5^o y 6^o estadios) de la subpoblaciones RL_1 y sRL_1 de *B. germanica*.

Población ^a	Pendiente ± error estándar	$P > \chi^2$ ^(b)	TK_{50} (95%LC)	FR_{50} ^c	TK_{90} (95%LC)	FR_{90} ^c
RL_1 (F ₂)	2,19 ± 0,39	0,021	37 (17-89)	1	144 (67-1316)	1
RL_1 (F ₃)	2,22 ± 0,17	0,024	30 (18-49)	0,80	114 (66-360)	0,21
RL_1 (F ₅)	3,02 ± 0,32	0,023	27 (16-42)	0,70	71 (44-220)	0,19
RL_1 (F ₆)	2,54 ± 0,41	9,4•10 ³	41 (nd)	1,09	131 (nd)	0,29
sRL_1 (F ₃)	1,66 ± 0,16	0,011	49 (31-84)	1,32	293 (149-1127)	0,34
sRL_1 (F ₅)	0,50 ± 0,09	0,009	3808 (509-40884)	101,68*	1428927 (8988-210087396924)	26,5*
sRL_1 (F ₆)	nc	nc	nc	nc	nc	nc

^a RL_1 , población híbrida resultante del cruce de las poblaciones R y L₁; sRL_1 subpoblación obtenida a partir de la F₃ de la subpoblación RL_1 tras aplicar presión de selección con el piretroide deltametrina (ver apartados 4-1.3.1 y 4-1.3.2).

^bUn valor de $P > \chi^2$ mayor de 0,05 indica un ajuste significativo entre las líneas de regresión observada y esperada.

^cEl factor de resistencia y los límites de confianza del 95% se calcularon para cada subpoblación respecto de la subpoblación RL_1 (F₂) según el método de Robertson y Preisler (1992).

nc, no fue posible su calculo. La concentración empleada resultó ser subletal para las ninfas de esta generación.

*, los valores de la misma columna seguidos de asterisco señalan una diferencia significativa entre este valor TK_{50} o TK_{90} y el de la población de referencia RL_1 (F₂).

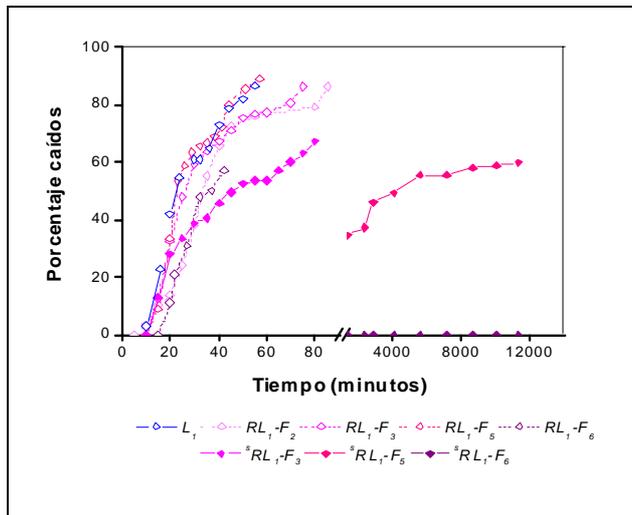
nd, no fue posible determinar los límites de confianza.

A diferencia del método seguido en los bioensayos, donde la cantidad de insecticida depositada era fija (no así el tiempo), en los experimentos de selección la cantidad y/o el tiempo de exposición variaron de unas generaciones a otras con el fin de mantener un porcentaje de mortalidad alrededor del 50% (incluidos los recuperados a las 72 horas)(Tabla 4-1). A medida que la resistencia iba progresando, cada vez el número de insectos paralizados era menor para el tiempo de exposición propuesto inicialmente. Así, en el caso de la subpoblación sRL_1 , en la primera generación seleccionada se depositaron 0,47366 µg de deltametrina/cm² manteniendo a los insectos en los botes durante 25 minutos, mientras que en la segunda generación el tiempo tuvo que subir a los 75 minutos, manteniendo la misma cantidad de insecticida, y en la tercera generación seleccionada se

hubo de multiplicar por cuatro la cantidad depositada y variar el tiempo de exposición a 60 minutos. Todo ello es indicativo de la selección de algún mecanismo de resistencia.

Conforme la selección fue progresando, la resistencia se fue incrementando significativamente en los niveles TK_{50} y TK_{90} . Así, y sólo tras 3 ciclos de aplicación de la presión de selección, el factor de resistencia fue de 102 (al nivel TK_{50}) comparado con la subpoblación RL_1 en la generación F_2 (Tabla 4-7). La selección también produjo una disminución en las pendientes de las curvas tiempo-respuesta (Tabla 4-7 y Fig. 4-5).

Al igual que sucediera en los ensayos con las ninfas de la población R (Tabla 4-2, Fig. 4-2), para algunas ninfas de la subpoblación seleccionada la cantidad de insecticida empleada en los bioensayos resultó ser subletal, aumentando la proporción de individuos que sobrevivían con el número de ciclos de selección. Aquí también se observaron alteraciones morfológicas en las ninfas que sobrevivían a los bioensayos y mudaban a adultas.



Por otro lado, los niveles de resistencia de la subpoblación sin seleccionar RL_1 , se mantuvieron después de 5 generaciones sin exposición alguna a insecticidas (tan sólo 1,58 veces más resistente que la población L_1 al nivel TK_{50}) (**Figura 4-5**).

Para las subpoblaciones $BCPL_1$ y sBCPL_1 se verificó un patrón de desarrollo de la resistencia diferente al de las poblaciones RL_1 y sRL_1 (**Tablas 4-1 y 4-8, Fig. 4-6**).

Tabla 4-8. Tiempos de respuesta knockdown (TK_{50} y TK_{90}), pendiente de la recta de regresión PROBIT y factores de resistencia (FR_{50} y FR_{90}) a la deltametrina de las ninfas (5^o y 6^o estadios) de la subpoblaciones $BCPL_1$ y sBCPL_1 de *B. germanica*.

Población ^a	Pendiente ± error estándar	$P > \chi^2$ ^(b)	TK_{50} (95%FL)	FR_{50} ^c	TK_{90} (95%FL)	FR_{90} ^c
$BCPL_1$ (F ₃)	3,06 ± 0,60	0,002	24 (12-47)	1	62 (35-557)	1
$BCPL_1$ (F ₄)	2,85 ± 0,27	0,004	30 (19-46)	0,99	83 (52-214)	0,38
$BCPL_1$ (F ₆)	4,28 ± 0,36	0,008	25 (16-38)	1,04	49 (33-163)	0,40
$BCPL_1$ (F ₇)	3,89 ± 0,34	0,007	25 (18-35)	1,06	54 (38-103)	0,41
$BCPL_1$ (F ₈)	3,58 ± 0,36	0,055	25 (22-29)	1,08	58 (48-76)	0,41
sBCPL_1 (F ₄)	2,81 ± 0,22	0,001	23 (15-36)	0,98	66 (41-177)	0,38
sBCPL_1 (F ₆)	3,33 ± 0,27	0,010	29 (20-40)	1,22	70 (48-149)	0,47
sBCPL_1 (F ₈)	2,98 ± 0,47	0,150	34 (27-43)	1,44	91 (68-151)	0,55

^a $BCPL_1$, población híbrida resultante del cruce de las poblaciones BCP y L_1 ; sBCPL_1 subpoblación obtenida a partir de la F₄ de la subpoblación $BCPL_1$ tras aplicar presión de selección con el piretroide deltametrina (ver apartados 4-1.3.1 y 4-1-3.2).

^bUn valor de $P > \chi^2$ mayor de 0,05 indica un ajuste significativo entre las líneas de regresión observada y esperada.

^cEl factor de resistencia y los límites de confianza del 95% se calcularon para cada subpoblación respecto de la subpoblación $BCPL_1$ (F₃) según el método de Robertson y Preisler (1992).

nc, no fue posible su calculo. La concentración empleada resultó ser subletal para las ninfas de esta generación.

Al contrario de lo que sucedía con la población sRL_1 , aquí, a pesar de que en cada ciclo de selección se incrementó el tiempo de exposición y/o la cantidad de insecticida depositada en los botes de tratamiento (**Tabla 4-1**), no se apreciaron diferencias significativas en las distintas generaciones seleccionadas (**Tabla 4-8**). No obstante, la tendencia de las curvas en desplazarse hacia tiempos mayores, así como el incremento de los valores TK_{90} (**Fig. 4-6**), apuntarían a un posible, aunque lento, desarrollo de la resistencia a la deltametrina en esta subpoblación híbrida sBCPL_1 .

La subpoblación sin seleccionar $BCPL_1$, no presentó niveles de tolerancia a la deltametrina diferentes, significativamente, de los de la población sensible L_1 (**Fig. 4-6, Tablas 4-2 y 4-8**).

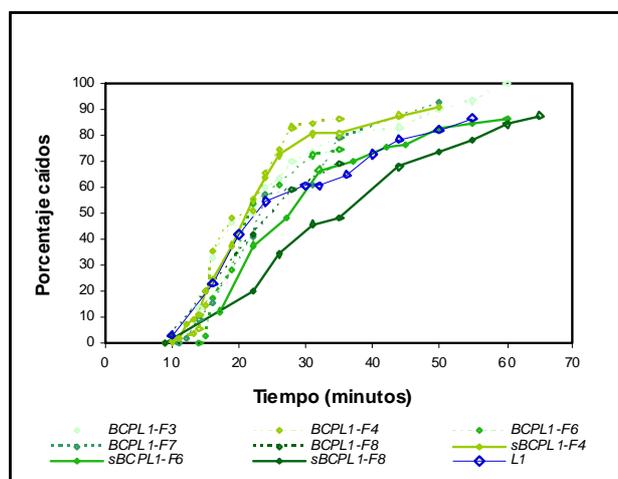


Figura 4-6. Porcentaje de individuos caídos en función del tiempo, de las subpoblaciones $BCPL_1$ y $sBCPL_1$ en los bioensayos de contacto tarsal con la deltametrina ($0,47 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Al indagar en la naturaleza de los mecanismos seleccionados, la existencia de resistencia cruzada a un compuesto químicamente diferente del empleado en la selección de la resistencia sugeriría la presencia de un mecanismo de naturaleza metabólica, mientras que si la resistencia cruzada se diera con un compuesto de la misma familia no descartaría el origen metabólico, pero haría que las modificaciones en la diana fuera una explicación alternativa razonable.

Al analizar los niveles de resistencia cruzada en la subpoblación sRL_1 a otro compuesto insecticida químicamente diferente de la deltametrina, el fenitrotión (OP), se comprobó, tras varios ciclos de selección, que el factor de resistencia en la generación F_6 era de 8,16 comparado con la subpoblación RL_1 (F_6) y 17,4 comparada con la población L_1 (DL_{50} 1,40 (LC 95% 0,97 – 1,85) μg insecticida/insecto). Al tratar la población $sBCPL_1$ con el fenitrotión, no se apreciaron diferencias significativas entre los valores de la DL_{50} al compararla en la F_8 con la subpoblación sin seleccionar (**Tabla 4-9**).

Tabla 4-9. Resultados de los bioensayos de aplicación tópica con el insecticida fenitrotión en ninfas (5º y 6º estadio) de las subpoblaciones ^sRL₁, ^sBCPL₁, RL₁ y BCPL₁ de *B. germanica* en el último ciclo de selección (F₆ para RL₁ y ^sRL₁, y F₈ para BCPL₁ y ^sBCPL₁).

Población ^a	DL ₅₀ (95% LC) (µg insecticida/insecto)
RL ₁	2,98 (2,80-17,68)
^s RL ₁	24,32 (19,94-37,65)
BCPL ₁	2,66 (1,90-3,51)
^s BCPL ₁	2,06 (1,09-2,89)

^aRL₁, población híbrida resultante del cruce de las poblaciones R y L₁; ^sRL₁ subpoblación obtenida a partir de la F₃ de la subpoblación RL₁ tras aplicar presión de selección con el piretroide deltametrina; BCPL₁, población híbrida resultante del cruce de las poblaciones BCP y L₁; ^sBCPL₁ subpoblación obtenida a partir de la F₄ de la subpoblación BCPL₁ tras aplicar presión de selección con el piretroide deltametrina (ver apartados 4-1.3.1 y 4-1.3.2).

Los ensayos con la acrinatrina, piretroide químicamente similar a la deltametrina, resultaron en un valor del TK₅₀ de 134 minutos para las de la subpoblación RL₁ (F₆), mientras que para las ninfas de la subpoblación ^sRL₁ la cantidad de insecticida resultó ser subletal (**Tabla 4-10**). De nuevo, no se apreciaron diferencias significativas entre los valores de la TK₅₀ en la población ^sBCPL₁, al compararla en la F₈ con la subpoblación sin seleccionar (**Tabla 4-10**) o con la población L₁ (TK₅₀ 46 (LC 95% 34 – 85) minutos).

Tabla 4-10. Resultados de los bioensayos de contacto por exposición a residuo con el insecticida acrinatrina en ninfas (5º y 6º estadio) de las subpoblaciones ^sRL₁, ^sBCPL₁, RL₁ y BCPL₁ de *B. germanica* en el último ciclo de selección (F₆ para RL₁ y ^sRL₁, y F₈ para BCPL₁ y ^sBCPL₁).

Población ^a	TK ₅₀ (95% LC) (min.)
RL ₁	134 (117-125)
^s RL ₁	nc
BCPL ₁	60 (32-138)
^s BCPL ₁	82 (73-167)

^aRL₁, población híbrida resultante del cruce de las poblaciones R y L₁; ^sRL₁ subpoblación obtenida a partir de la F₃ de la subpoblación RL₁ tras aplicar presión de selección con el piretroide deltametrina; BCPL₁, población híbrida resultante del cruce de las poblaciones BCP y L₁; ^sBCPL₁ subpoblación obtenida a partir de la F₄ de la subpoblación BCPL₁ tras aplicar presión de selección con el piretroide deltametrina (ver apartados 4-1.3.1 y 4-1.3.2).

nc, no fue posible su cálculo. La cantidad de insecticida empleada resultó ser subletal para las ninfas de esta población.

Los ensayos con los compuestos sinérgicos PBO y DEF aportaron nuevas pruebas sobre la naturaleza de los mecanismos implicados en la resistencia seleccionada con la deltametrina.

La **tabla 4-11**, y las **figuras 4-7** y **4-8** recogen los resultados de dichos ensayos.

Tabla 4-11. Tiempos de respuesta knockdown (TK_{50} y TK_{90}), e intervalos de confianza del 95% (95% LC), tras exposición a PBO o DEF en ninfas (5º y 6º estadio) de las subpoblaciones sRL_1 , sBCPL_1 , RL_1 y $BCPL_1$ de B. germanica en el último ciclo de selección (F_6 para RL_1 y sRL_1 , y F_8 para $BCPL_1$ y sBCPL_1).

Sinergista	Población ^a	Pendiente ± error estándar	$P > \chi^2$ ^(b)	TK_{50} (95%LC) (min.)	TK_{90} (95%LC) (min.)	FS
PBO	RL_1	1,87 ± 0,19	2,04•10 ⁻⁸	19 (10-36)	91 (45-411)	2,16
	sRL_1	1,06 ± 0,17	1,44•10 ⁻⁸	183 (nd)	2976 (nd)	nd
	$BCPL_1$	4,83 ± 0,46	0,015	25 (20-31)	45 (35-70)	1
	sBCPL_1	3,14 ± 0,44	0,084	27 (21-34)	68 (51-107)	1,26
DEF	RL_1	2,67 ± 0,54	0,003	44 (nd)	132 (nd)	0,93
	sRL_1	1,83 ± 0,37	0,001	1779 (nd)	8882 (nd)	nd
	$BCPL_1$	3,62 ± 0,50	0,020	22 (14-37)	50 (31-190)	1,14
	sBCPL_1	2,23 ± 0,39	0,001	33 (16-119)	125 (54-7509)	1,03

^a RL_1 , población híbrida resultante del cruce de las poblaciones R y L_1 ; sRL_1 subpoblación obtenida a partir de la F_3 de la subpoblación RL_1 tras aplicar presión de selección con el piretroide deltametrina; $BCPL_1$, población híbrida resultante del cruce de las poblaciones BCP y L_1 ; sBCPL_1 subpoblación obtenida a partir de la F_4 de la subpoblación $BCPL_1$ tras aplicar presión de selección con el piretroide deltametrina (ver apartado 4-1.3.1).

^bUn valor de $P > \chi^2$ mayor de 0,05 indica un ajuste significativo entre las líneas de regresión observada y esperada.

^cFS, factor de sinergismo (TK_{50} sin sinergista/ TK_{50} con sinergista)
nd, no fue posible su determinación.

Las ninfas de la población RL_1 (F_6) que presentaban un nivel de resistencia de 1,09, mostraron con el PBO un factor de sinergismo de 2,16, mientras que con el DEF fue de 0,93. En la población sRL_1 el efecto fue mucho mayor, consiguiendo disminuir la resistencia en las ninfas de la generación seleccionada F_6 a un nivel 4,95x respecto a la generación F_2 . Con el DEF la resistencia se rebajó hasta un nivel 48,08x.

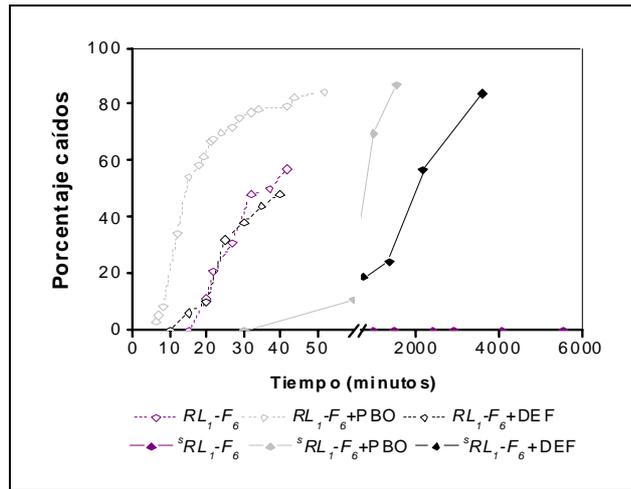


Figura 4-7. Porcentaje de caídos en función del tiempo, de las poblaciones RL_1 y sRL_1 en los bioensayos de contacto tarsal con la deltametrina ($0,47 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) sola y con la deltametrina y el sinergista PBO ($0,95 \mu\text{g}/\text{insecto}$) o DEF ($1,04 \mu\text{g}/\text{insecto}$).

Por otro lado, en la población sBCPL_1 , los efectos sinérgicos se observan sobre todo al nivel TK_{90} (**Tabla 4-11**) en el que también se pone de manifiesto el desarrollo incipiente de resistencia. De nuevo el mayor efecto sinérgico se debe al PBO.

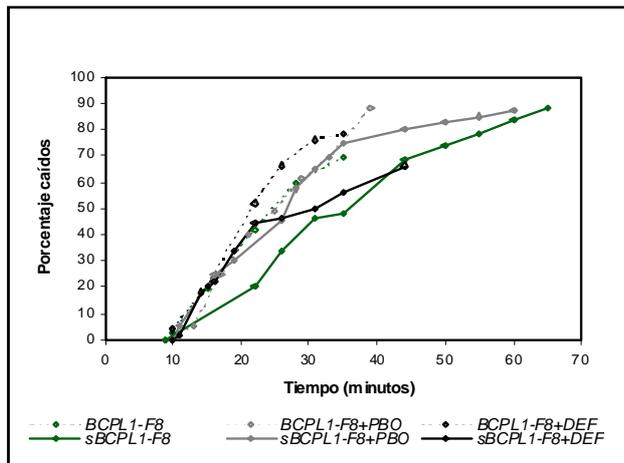


Figura 4-8. Porcentaje de caídos en función del tiempo, de las poblaciones $BCPL_1$ y sBCPL_1 en los bioensayos de contacto tarsal con la deltametrina ($0,47 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) sola y con la deltametrina y el sinergista PBO ($0,95 \mu\text{g}/\text{insecto}$) o DEF ($1,04 \mu\text{g}/\text{insecto}$).

En resumen, tras varios ciclos de selección se comprobó un rápido incremento en el nivel de resistencia al piretroide deltametrina en la subpoblación seleccionada ^sRL₁, que además mostró resistencia cruzada al organofosforado fenitrotión y al piretroide acrinatrina. Los ensayos con sinergistas implicaron a esterasas y monooxigenasas en dicha resistencia, si bien no puede descartarse la presencia de otro mecanismo de naturaleza no metabólica. Para la población ^sBCPL₁, sin embargo, los ciclos de selección aplicados resultaron en un lento desarrollo de resistencia a la deltametrina.

4-3. Discusión

Los mecanismos que confieren resistencia a la deltametrina se han estudiado en diferentes órdenes de insectos como Diptera, incluyendo a moscas (Liu y Yue, 2000) y mosquitos (Chareonviriyaphap et al., 2003; Rodpradit et al., 2005; Gayathri y Murthy, 2006; Hu et al., 2007), Coleoptera (Beckel et al., 2006), o Lepidoptera (Bues et al., 2005; Ahmad et al., 2006; Huang y Han, 2007). En todos los casos, en la resistencia parecen estar implicados, entre otros, procesos de naturaleza metabólica, preferentemente oxidasas y esterasas, lo cual concuerda con los resultados obtenidos al analizar las rutas de desintoxicación de la deltametrina en insectos. En concreto en estudios in vivo del metabolismo de la deltametrina en poblaciones resistentes de *Cydia pomonella*, se obtuvieron dos tipos de metabolitos, aquellos provenientes de la hidrólisis del enlace éster y los derivados hidroxilados de la deltametrina (dependientes, por tanto, de las P450) (Sauphanor et al., 1997).

En Dictyoptera, y en concreto en *Blattella germanica*, los trabajos de Wei y colaboradores (2001) y Pridgeon y colaboradores (2002), de nuevo constatan la implicación de oxidasas y esterasas en la resistencia de este insecto a la deltametrina. Nuestros resultados en la población española R, altamente resistente a la deltametrina, continúan en esta línea. Esto es, la implicación de las P450 así como la participación de las hidrolasas, aunque a un menor nivel que las oxidasas, entre los mecanismos responsables de la resistencia en la población resistente analizada. Incrementos similares a los obtenidos en nuestros experimentos en las actividades esterasas y oxidasas han sido descritos por diversos autores en poblaciones resistentes de *B. germanica* (Siegfried y Scott, 1992; Prabhakaran y Kamble, 1993;

Hemingway et al., 1993b; Prabhakaran y Kamble, 1994; Valles y Yu, 1996; Scharf et al., 1996; Prabhakaran y kamble, 1996; Lee et al., 1997; Wu et al., 1998; Valles, 1998; Scharf et al., 1999; Lee et al., 2000; Valles et al., 2000; Limoe et al., 2007).

Así, en relación al papel de las oxidasas en la resistencia a piretroides en Blattella germanica, nuestros resultados estarían en concordancia con los obtenidos por Hemingway y colaboradores (1993b), Wu y colaboradores (1998), Valles y colaboradores (2000) y Limoe et al. (2007).

Evidencias sobre la naturaleza metabólica de la resistencia de B. germanica a piretroides y la implicación de las hidrolasas en dicha resistencia fueron descritas, entre otros, por Hemingway y colaboradores (1993b), Wu y colaboradores (1998) y Valles (1998). En esta especie, la actividad esterasa se debe principalmente a las enzimas solubles presentes en la fracción citosólica. Sin embargo, algunas formas están unidas a la membrana, aunque en este aspecto, los estudios son escasos. Valles, en 1998, describe por primera vez el papel de las esterases microsomales en la resistencia a piretroides. En la población analizada (Aves) las esterases microsomales fueron más activas que las citosólicas en la resistencia a la permetrina. Otras poblaciones de B. germanica resistentes a la cipermetrina como la población Marietta (Valles y Yu, 1996) o la población Union 511, también mostraron que un incremento en la actividad esterasa microsomal era responsable de la resistencia observada (Valles, 1998). En nuestro trabajo, si bien no se apreciaron diferencias significativas entre las esterases citosólicas y las microsomales, ambas actividades sí fueron significativamente diferentes entre la población sensible y la resistente. Estudios in vitro con [¹⁴C]deltametrina permitirían corroborar el papel de las esterases citosólicas y microsomales en la resistencia de nuestra población R e indagar en la naturaleza de dicha participación, esto es, la desintoxicación vía hidrólisis o bien el secuestro de las moléculas de insecticida.

Nuestros resultados en el estudio de la afinidad de las CaE por el p-NPA concuerdan con los resultados de Karunaratne y Hemingway (1996), Scharf y colaboradores (1998b) y Lee y colaboradores (1994) y apoyan la hipótesis de que la resistencia en cucarachas mediada por esterases está relacionada con una amplificación génica (Prabhakaran y Kamble, 1995). La semejanza en las propiedades de las esterases citosólicas, así como el incremento en la actividad, apoyarían más un cambio cuantitativo que

cualitativo en la composición de las isoenzimas entre las poblaciones resistente y sensible, sin descartar otros factores, tales como un incremento en la velocidad de transcripción o una disminución en la velocidad de degradación del ARN.

Por otro lado, y aunque ha sido descrito como uno de los principales sistemas enzimáticos de desintoxicación implicados en la resistencia a insecticidas en insectos (ver capítulo 2, apartado 2-1.2.3), el sistema GST no parece estar implicado en la resistencia de nuestra población R. Scharf y colaboradores (1996), al estudiar la población multirresistente Muncie '86, tampoco observaron un incremento en la actividad GST al compararla con la población sensible JWax. En el estudio realizado por Limoe y colaboradores (2007), sólo se encontró un pequeño incremento en la actividad GST en dos de las poblaciones analizadas; las otras poblaciones tenían la misma o incluso menos actividad que la población sensible SUS. En la población híbrida JM tampoco hubo cambios estadísticamente significativos en la actividad de estas enzimas tras ser seleccionada con clorpirifos o con cipermetrina (Scharf et al., 1998b). Por el contrario la población Marietta, resistente al bendiocarb, cipermetrina, propoxur, permetrina y clorpirifos, sí presentó un incremento en la actividad GST (CDNB, DCNB) al compararla con la población sensible Orlando (Valles y Yu, 1996). En este mismo sentido se sitúan los trabajos de Hemingway y colaboradores (1993a), Wu y colaboradores (1998), Valles (1998) y Lee y colaboradores (2000). Muchas de estas poblaciones eran resistentes a OPs y carbamatos, así como a piretroides. Posiblemente los incrementos observados en la actividad GST estuvieran relacionados, en primer término, con la resistencia a los OPs o a los carbamatos, o a ambos, antes que con la resistencia a los piretroides (Hemingway et al., 1993b).

Lo que resulta notable de nuestra población R es el elevadísimo nivel de resistencia tras su recolección y multiplicación durante varias generaciones en ausencia de insecticidas. La estabilidad de esta resistencia puede deberse bien a que el costo biológico dependa de las condiciones ambientales, y por tanto no se de bajo las condiciones de laboratorio; bien porque la resistencia esté cercana a ser fijada, y conlleve por ello a un lento incremento de la heterocigosis. La selección en laboratorio de la población híbrida obtenida a partir de la población R, demostró aún más la magnitud de esta resistencia. La presión de selección a la que fueron sometidas las ninfas resultó inicialmente en un lento desarrollo de la resistencia que, sin embargo, se incrementó dramáticamente tras los siguientes ciclos de

selección. Esto suele ser indicativo de la selección de mecanismos fenotípicamente recesivos en los que la mayoría de los supervivientes son homocigóticos para el loci resistente (Matambo et al., 2007). De este modo, los alelos resistentes alcanzan una elevada frecuencia muy rápidamente. En este sentido, Siegfried y Scott (1992) demostraron que la actividad P450 era heredada, en *B. germanica*, como un carácter recesivo. También la mutación *kdr* es heredada como un rasgo simple, autosómico e incompletamente recesivo (Scott y Dong, 1994). En nuestra población seleccionada sRL_1 , por tanto, no podría descartarse que ambos mecanismos pudieran haber sido coseleccionados. La acción combinada de ambos mecanismos podría explicar el elevado nivel de resistencia en esta población. Los efectos conjuntos de los mecanismos P450 y *kdr* estarían en concordancia con varios estudios genéticos que muestran la implicación de ambos mecanismos en la resistencia a piretroides (Roush et al., 1986; McDonald y Schmidt, 1987; Payne et al., 1988).

La resistencia cruzada detectada entre la deltametrina y el fenitrotión en la población sRL_1 en la generación F_6 indicaría la implicación de un mecanismo de naturaleza metabólica en la resistencia, al que habría que añadir otro mecanismo no metabólico en base a los resultados con la acrinatrina. Algún tipo de insensibilidad a la diana, posiblemente del tipo *kdr*. Los estudios de Cochran (1991) y Valles (1998) ya señalan que la resistencia a un piretroide generalmente resulta en la resistencia cruzada a otros piretroides. La supresión incompleta de la resistencia por los compuestos sinérgicos en la población seleccionada indicaría, de nuevo, que uno o más mecanismos adicionales (no metabólicos) podrían estar implicados. A diferencia de la resistencia debida a un incremento de la desintoxicación metabólica, la resistencia knockdown (ver capítulo 2, sección 2-1.2.4) no se ve alterada por la acción de los sinergistas inhibidores de esterasas o monooxigenasas. La resistencia a la parálisis o resistencia *kdr* a piretroides, ha sido ampliamente estudiada en *Blattella* (Scott y Matsumura, 1981; Bull y Patterson, 1993; Anspaugh et al., 1994; Dong, 1997; Dong et al., 1998). En nuestro caso, aún cuando se observó un incremento en el tiempo knockdown promedio durante la selección, evaluar la frecuencia del alelo *kdr* permitiría determinar si dicho mecanismo estaría también implicado o no en la resistencia a la deltametrina.

Por otro lado, los valores de las pendientes de las curvas tiempo/dosis-respuesta son medidas de la heterogeneidad genética asociada a la resistencia en las poblaciones resistentes (French-Constant y Roush, 1991).

En este sentido, la disminución de las pendientes de las curvas de la población sRL_1 en las diferentes generaciones seleccionadas indicarían un incremento de la heterogeneidad, y apoyaría la hipótesis de la selección de más de un mecanismo en esta población. En la población sBCPL_1 este efecto se verifica al comprobar que, aún cuando los niveles originales de tolerancia se mantienen, el valor del TK_{90} aumenta en cada generación seleccionada. Scharf y colaboradores (1997) observaron efectos similares en la heterogeneidad y el desarrollo de la resistencia tras someter a la población de campo Munsyana a presión de selección con una mezcla de insecticidas.

4-4. Bibliografía

Aguilar, J.; Sevillano, J. S.; Amaro, M. A.; Cejudo, M. Control de plagas en restauración colectiva de tipo comercial. *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos* 315: 39-42 (2000).

Ahmad, M.; Denholm, I.; Bromilow, R. H. Delayed cuticular penetration and enhanced metabolism of deltamethrin in pyrethroid-resistant strains of *Helicoverpa armigera* from China and Pakistan. *Pest Manag. Sci.* 62: 805-810 (2006).

ANECPLA. Nota de prensa. Madrid, 31 de Mayo de 2006. <http://www.anecpla.es>

Anspaugh, D. D.; Rose, R. L.; Koehler, P. G.; Hodgson, E.; Roe, R. M. Multiple mechanisms of pyrethroid resistance in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Pestic. Biochem. Physiol.* 50: 138-148 (1994).

Atkinson, T. H.; Wadleigh, R. W.; Koehler, P. G.; Patterson, R. S. Pyrethroid resistance and synergism in a field strain of the German cockroach (*Dictyoptera: Blattellidae*). *J. Econ. Entomol.* 84(4): 1247-1250 (1991).

Beckel, H. D.; Lorini, I.; Lazzari, S. M. N. Synergistic effect of piperonyl butoxide on the resistance of *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (*Coleoptera, Silvanidae*) to deltamethrin and fenitrothion. *Revista Brasileira de Entomologia* 50: 110-114 (2006).

Berge, J.; Feyereisen, R.; Amichot, M. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 353: 1701-1705 (1998).

- Bloomquist, J. R.; Ferguson, H. J.; Cpx, E. D.; Reddy, M. S.; Cook, J. M.** Mode of action of β -carboline convulsants on the insect nervous system and their potential as insecticides. *Pest. Sci.* 51: 1-6 (1997).
- Brown, A. W. A.** Genetics of insecticide resistance in insect vectors. *En: Genetics of insect vectors of disease. Wright, J. E.; Pai, R. (eds.) Elsevier, Amsterdam. (1967).*
- Bues, R.; Bouvier, J. C.; Boudinhon, L.** Insecticide resistance and mechanisms of resistance to selected strains of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae) in the south of France. *Crop Protection* 24: 814-820 (2005).
- Bull, D. L.; Patterson, R. S.** Characteristics of pyrethroid resistance in a strain of the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 86: 20-25 (1993).
- Chapman, P. A.; Learmount, J.; Pinniger, D. B.** Insecticide resistance in *Blattella germanica* in the United Kingdom. *En: Proceedings, First International Conference on Insects Pests in the Urban Environment. Wildley, K. B.; Robinson, W. H. (eds.) BCPP Wheatons, Cambridge. 125-133 (1993).*
- Chareonviriyaphap, T.; Rongnoparut, P.; Chantarumporn, P. et al.** Biochemical detection of pyrethroid resistance mechanisms in *Anopheles minimus* in Thailand. *Journal of Vector Ecology* 28 (1): 108-116 (2003).
- Cochran, D. G.** Monitoring for insecticide resistance in field-collected "strains" of the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 82: 337-341 (1989).
- Cochran, D. G.** Extended selections for pyrethroid resistance in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 84: 1412-1416 (1991).
- Cochran, D. G.** Effects of three synergists on pyrethroid resistance in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 87: 879-884 (1994).
- Cochran, D. G.** Insecticide resistance. *En: Understanding and controlling the German cockroach. Rust, M. K.; Owens, J. M.; Reiersen, D. A. (eds.) Cambridge, Oxford University Press. 171-192 (1995a).*
- Cochran, D. G.** Standard insecticide-susceptible strain for the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 88: 1542-1544 (1995b).

Cochran, D. G. Misuse of the tarsal-contact method for detecting insecticide resistance in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 90: 1441-1444 (1997).

Committee on Hormonally Active Agents in the Environment, N.R.C.U.S.A. Hormonally Active Agents in the Environment. *National Academy press, Washington.* (1999).

Dong, K. A single amino acid change in the para sodium channel protein is associated with Knockdown-resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides in German cockroach. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27: 93-100 (1997).

Dong, K.; Valles, S. M.; Scharf, M. E.; Zeichner, B. C.; Bennett, G. W. The knockdown resistance mutation in pyrethroid-resistant German cockroaches. *Pestic. Biochem. Physiol.* 60: 195-204 (1998).

Ebbett, R.; Cochran, D. G. Inheritance of resistance to pyrethroids in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 90: 1458-1461 (1997).

El-Sayed, G. N.; Knowles, C. O. Formamidine synergism of pyrethroid toxicity to twospotted spider mites (Acari: Tetranychidae). *J. Econ. Entomol.* 77: 23-30 (1984).

Feyereisen, R. Insect P450 enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* 44: 507-533 (1999).

French-Constant, R. H.; Roush, R. T. Resistance detection and documentation: the relative roles of pesticidal and biochemical assays. *En: Pesticide resistance in arthropods.* Roush, R. T.; Tabashnik, B. E. (eds.) New York, Chapman and Hall (1991).

Gayathri, V.; Murthy, P. B. Reduced susceptibility to deltamethrin and *kdr* mutation in *Anopheles stephensi* Liston, a malaria vector in India. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 22: 678-688 (2006).

Hemingway, J.; Small, G. J.; Monro, A. G. Possible mechanisms of organophosphorous and carbamate insecticide resistance in *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae) from different geographical areas. *J. Econ. Entomol.* 86: 1623-1630 (1993a).

Hemingway, J.; Dunbar, S. J.; Monro, A. G.; Small, G. J. Pyrethroid resistance in German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae): resistance levels and underlying mechanisms. *J. Econ. Entomol.* 86(6): 1631-1638 (1993b).

Hemingway, J.; Field, L.; Vontas, J. An overview of insecticide resistance. *Science.* 298(5591): 96-97 (2002).

Hodgson, E. Microsomal monooxygenases. *En: Comprehensive Insect*

- Physiology, Biochemistry, and Pharmacology. Kerkut, G. A.; Gilbert, L. I. (eds.) Pergamon Press Ltd, Oxford. Vol. 11: 225-321 (1985).
- Hu, X. B.; Sun, Y.; Wang, W. J.; Yang, M. X.; Sun, L. X.; Tan, W. B.; Sun, J.; Qian, J.; Ma, L.; Zhang, D. H.; Yan, G. Y.; Zhu, C. L.** Cloning and characterization of NYD-OP7, a novel deltamethrin resistance associated gene from *Culex pipiens pallens*. *Pest. Biochem. Physiol.* 88: 82-91 (2007).
- Huang, G.; Liu, J. M.; Liu, W. Y.** Resistance to five pesticides of *Blattella germanica* from cities of Hebei Province. *Chinese Journal of Vector Biology and Control.* 10:285-287 (1999).
- Huang, S. J.; Han, Z. J.** Mechanisms for multiple resistances in field populations of common cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius) in China. *Pest. Biochem. Physiol.* 87: 14-22 (2007).
- Karunaratne, S. H. P. P.; Hemingway, J.** Different insecticides select multiple carboxylesterase isozymes and different resistance levels from a single population of *Culex quinquefasciatus*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 54: 4-11 (1996).
- Koehler, P. G.; Strong, C. A.; Patterson, R. S.; Valles, S. M.** Differential susceptibility of German cockroach (*Dictyoptera: Blattellidae*) sexes and nymphal age classes to insecticides. *J. Econ. Entomol.* 86: 785-792 (1993).
- Ladonni, H.** Susceptibility of different field strains of *Blattella germanica* to four pyrethroids (*Orthoptera: Blattellidae*). *Iranian Journal of Public Health.* 26:35-40 (1997).
- Ladonni, H.** Evaluation of three methods for detecting permethrin resistance in adult and nymphal *Blattella germanica* (*Dictyoptera: Blattellidae*). *J. Econ. Entomol.* 94: 694-697 (2001).
- Lee, H. R.; Kim, J. W.; Bang, J. R.; Choi, K. S.** Studies on the selections, the cross-resistance and the esterase activity in the strain of German cockroach selected with dichlorvos. *Korean J. Appl. Entomol.* 33: 74-80 (1994).
- Lee, C. Y.; Yap, H. H.; Chong, N. L.; Lee, R. S. T.** Insecticide resistance and synergism in field collected German cockroaches (*Dictyoptera: Blattellidae*) in peninsular Malaysia. *Bulletin of Entomological Research.* 86: 675-682 (1996).
- Lee, C. Y.; Yap, H. H.; Chong, N. L.** Elevated esterase detection in insecticide resistant german cockroaches (*Dictyoptera: Blattellidae*) using modified Pasteur-Georghiou's filter-paper method. *Tropical Biomedicine* 14: 81-86 (1997).

-
- Lee, C. Y.; Yap, H. H.; Chong, N. L.** Sublethal effects of deltamethrin and propoxur on longevity and reproduction of German cockroaches, *Blattella germanica*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 89: 137-145 (1998).
- Lee, C. Y.; Hemingway, J.; Yap, H. H.; Chong, N. L.** Biochemical characterization of insecticide resistance in the German cockroach, *Blattella germanica*, from Malaysia. *Medical and Veterinary Entomology*. 14: 11-18 (2000).
- Limoe, M.; Enayati, A. A.; Ladonni, H.; Vatandoost, H.; Baseri, H.; Oshaghi, M. A.** Various mechanisms responsible for permethrin metabolic resistance in seven field-collected strains of the German cockroach from Iran, *Blattella germanica* (L.) (Diptera: Blattellidae). *Pest Biochem. Physiol.* 87: 138-146 (2007).
- Lin, L. F.; Lu, W. C.; Cai, S. W.** Monitoring for insecticide resistance in field-collected strains of the German cockroach in Guangdong. *Chinese Journal of Vector Biology and Control*. 11(1):32-34 (2000).
- Litchfield, J. T.; Wilcoxon, F.** A simplified method of evaluation dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics* 96: 99-113 (1949).
- Liu, N. N.; Yue, X.** Insecticide resistance and cross-resistance in the house fly (Diptera : Muscidae). *J. Econ. Entomol.* 93: 1269-1275 (2000).
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 (1951).
- Martínez-Torres, D.; Devonshire, A. L.; Williamson, M. S.** Molecular studies of knockdown resistance to pyrethroids: cloning of domain II sodium channel gene sequences from insects. *Pest. Sci.* 51: 265-270 (1997).
- Matambo, T. S.; Abdalla, H.; Brooke, B. D.; Koekemoer I. I.; Mnzava A.; Hunt, R. H.; Coetzee, M.** Insecticide resistance in the malarial mosquito *Anopheles arabiensis* and association with the *kdr* mutation. *Medical and Veterinary Entomology* 21: 97-102 (2007).
- McDonald, P. T.; Schmidt, C. D.** Genetics of permethrin resistance in the horn fly (Diptera: Muscidae). *J. Econ. Entomol.* 80: 433-437 (1987).
- McLachlan, J. A.** Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocrine Reviews* 22: 319-341 (2001).
- Milio, J. F.; Koehler, P. G.; Patterson, R. S.** Evaluation of three methods for detecting Chlorpyrifos resistance in German cockroach (Orthoptera: Blattellidae) populations. *J. Econ. Entomol.* 80: 44-46 (1987).

- Pai, H. H.; Wu, S. C.; Hsu, E. L.** Insecticide resistance in German cockroaches (*Blattella germanica*) from hospitals and households in Taiwan. *International Journal of Environmental Health Research*. 15(1): 33-40 (2005).
- Payne, G. T.; Blenk, R. G.; Brown, T. M.** Inheritance of permethrin resistance in the tobacco budworm (*Lepidoptera: Noctuidae*). *J. Econ. Entomol.* 81: 65-73 (1988).
- Prabhakaran, S. K.; Kamble, S. T.** Activity and electrophoretic characterization of esterases in insecticide-resistant and susceptible strains of German cockroach (*Dictyoptera: Blattellidae*). *J. Econ. Entomol.* 86:1009-1013 (1993).
- Prabhakaran, S. K.; Kamble, S. T.** Subcellular distribution and characterization of esterase isozymes from insecticide resistant and susceptible strains of German cockroach (*Dyctioptera: Blattellidae*). *J. Econ. Entomol.* 87: 541-545 (1994).
- Prabhakaran, S. K.; Kamble, S. T.** Purification and characterization of an esterase isozyme from insecticide resistant and susceptible strains of german cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Insect Biochem. Molec. Biol.* 25: 519-524 (1995).
- Prabhakaran, S. K.; Kamble, S. T.** Biochemical characterization and purification of esterases from three strains of German cockroach, *Blattella germanica* (*Dictyoptera: Blattellidae*). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 31:73-86 (1996).
- Pridgeon, J. W.; Appel, A. G.; Moar, W. J.; Liu, N.** Variability of resistance mechanisms in pyrethroid resistant German cockroaches (*Dictyoptera: Blattellidae*). *Pestic. Biochem. Physiol.* 73: 149-156 (2002).
- Robertson, J. L.; Preisler, H. K.** Pesticide bioassays with arthropods. *CRC Press* (1992).
- Rodpradit, P.; Boonsuepsakul, S.; Chareonviriyaphap, T.** Cytochrome P450 genes: Molecular cloning and overexpression in a pyrethroid-resistant strain of *Anopheles minimus* mosquito. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 21: 71-79 (2005).
- Rose, R. L.; Barbhaiya, L.; Roe, R.; Rock, G.; Hodgson, E.** Cytochrome P450-associated insecticide resistance and the development of biochemical diagnostic assays in *Heliothis virescens*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 51:178-191 (1995).
- Roush, R. T.; Combs, R. L.; Randolph, T. C. McDonald, J.** Inheritance and effective dominance of pyrethroid resistance in the horn fly (*Diptera:*

-
- Muscidae). *J. Econ. Entomol.* 79: 1178-1182 (1986).
- Saito, K.; Motoyama, N.; Dauterman, W. C.** Studies on the resistance to various insecticides of a house fly strain (Diptera: Muscidae) selected with azamethiphos. *J. Econ. Entomol.* 84: 1635-1637 (1991).
- Salmeron, E.; Omoto, C.** Characterization of deltamethrin and chlorpyrifos resistance in *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae) and cross-resistance relationships to fipronil. *Neotrop. Entomol.* 32: 177-181 (2003).
- Sauphanor, B.; Cuany, A.; Bouvier, J. C.; Brosse, V.; Amichot, M; Bergé, J. B.** Mechanism of resistance to deltamethrin in *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). *Pest Biochem. Physiol.* 58: 109-117 (1997).
- Scharf, M. E.; Hemingway, J.; Reid, B. L.; Small, G. J.; Bennett, G. W.** Toxicological and biochemical characterization of insecticide resistance in a field-collected strain of *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 89: 322-331 (1996).
- Scharf, M. E.; Kaakeh, W.; Bennett, G. W.** Changes in an insecticide-resistant field population of german cockroach after exposure to an insecticide mixture. *J. Econ. Entomol.* 90: 38-48 (1997).
- Scharf, M. E.; Neal, J. J.; Marcus, C. B.; Bennett, G. W.** Cytochrome P450 purification and immunological detection in an insecticide resistant strain of German cockroach (*Blattella germanica*, L.). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28: 1-9 (1998a).
- Scharf, M. E.; Neal, J. J.; Bennett, G. W.** Changes of insecticide resistance levels and detoxication enzymes following insecticide selection in the german cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Pest. Biochem. Physiol.* 59: 67-79 (1998b).
- Scharf, M. E.; Lee, C. Y.; Neal, J. J.; Bennett, G. W.** Cytochrome P450 MA expression in insecticide-resistant German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 92: 788-793 (1999).
- Scott, J. G.** Cytochrome P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29: 757-777 (1999).
- Scott, J. G.; Dong, K.** *Kdr*-type resistance in insects with special reference to the German cockroach, *Blattella germanica*. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B: 191-198 (1994).
- Scott, J. G.; Matsumura, F.** Characteristics of a DDT-induced case of cross-resistance to permethrin in *Blattella germanica*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 16: 21-27 (1981).

- Scott, J. G.; Cochran, D. G.; Siegfried, B. D.** Insecticide toxicity, synergism, and resistance in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 83: 1698-1703 (1990).
- Siegfried, B. D.; Scott, J. G.** Biochemical characterization of hydrolytic and oxidative enzymes associated with chlorpyrifos and propoxur resistance in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *J. Econ. Entomol.* 85: 1092-1098 (1992).
- Throne, J. E.; Weaver, D. K.; Chef, V.; Baker, J. E.** Probit analysis of correlated data: multiple observations over time at one concentration. *J. Econ. Entomol.* 88: 1510-1512 (1995a).
- Throne, J. E.; Weaver, D. K.; Chef, V.; Baker, J. E.** Probit analysis: Assessing goodness-of-fit based on backtransformation and residuals. *J. Econ. Entomol.* 88: 1513-1516 (1995b).
- Umeda, K.; Yano, T.; Hirano, M.** Pyrethroid resistance mechanisms in the German cockroach, *Blattella germanica*. *Appl. Entomol. Zool.* 23: 373-380 (1988).
- Vagn-Jensen, K. M.** Developing permethrin resistance among local populations of *Blattella germanica* in Denmark. *Dan. Pest. Infest. Lab. Annu. Rep.* 88: 59 (1988).
- Valles, S. M.** Toxicological and biochemical studies with field populations of the German cockroach, *Blattella germanica*. *Pest. Biochem. Physiol.* 62: 190-200 (1998).
- Valles, S. M.** Effects of cypermethrin selection on expression of insecticide resistance mechanisms in the German cockroach (Blattaria: Blattellidae). *J. Entomol. Sci.* 39: 84-93 (2004).
- Valles, S. M.; Yu, S. J.** Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 89: 21-26 (1996).
- Valles, S. M.; Yu, S. J.; Koehler, P. G.** Detoxifying enzymes in adults and nymphs of the German cockroach: evidence for different microsomal monooxygenase systems. *Pest. Biochem. Physiol.* 49: 183-190 (1994).
- Valles, S. M.; Yu, S. J.; Koehler, P. G.** Biochemical mechanisms responsible for stage-dependent propoxur tolerance in the German cockroach. *Pest. Biochem. Physiol.* 54: 172-180 (1996).
- Valles, S. M.; Dong, K.; Brenner, R. J. M.** Mechanisms responsible for cypermethrin resistance in a strain of German cockroach, *Blattella germanica*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 66: 195-205 (2000).

W.H.O. *Insecticide resistance and vector control. Seventeenth report of the W.H.O. expert committee on insecticides.* WHO Technical Report series, No. 433 (1970).

Wei, Y.; Appel, A. G. Moar, W. J.; Liu, N. *Pyrethroid resistance and cross-resistance in the german cockroach, Blattella germanica (L).* Pest Manag. Sci. 57: 1055-1059 (2001).

Wu, D.; Scharf, M. E.; Neal, J. J.; Suiter, D. R.; Bennett, G. W. *Mechanisms of fenvalerate resistance in the German cockroach, Blattella germanica (L).* Pest. Biochem. Physiol. 61: 53-62 (1998).

Yu, S. J.; Huang, S. W. *Purification and characterization of glutathione S-transferases from the german cockroach, Blattella germanica (L).* Pest. Biochem. Physiol. 67: 36-45 (2000).

Zhai, J.; Robinson, W. H. *Pyrethroid resistance in German cockroaches.* Pest Contr. Tech. 18: 26-28 (1990).



Imágenes de
Frankliniella
occidentalis (Pergande)
y sus efectos sobre
cultivos

Frankliniella occidentalis y
la resistencia a insecticidas

Para el establecimiento y mantenimiento de una estrategia exitosa en el control de las plagas, es importante la evaluación de la resistencia en el campo. A finales de los años 80 no se poseían datos de ensayos de resistencia a insecticidas de las poblaciones españolas de *F. occidentalis*. Sin embargo, dado el elevado número de aplicaciones, a veces con una misma materia activa o grupo químico, en intervalos de tiempo muy cortos, no se descartaba ya entonces que muchos de los fallos en el control no se debieran tan sólo a los problemas en la aplicación de los insecticidas, como consecuencia del ciclo de vida del insecto. Era posible que en estos fracasos también estuvieran implicados los fenómenos de resistencia, sobre todo en aquellos productos (clorados, organofosforados y piretroides) que inicialmente sí habían resultado ser eficaces y que fueron empleados masivamente. Y, ya entonces, se recomendaba alternar las materias activas, cambiando los grupos químicos en tratamientos sucesivos, para evitar así la presión de selección con el mismo insecticida o familia de insecticidas (Belda y Rodríguez, 1989).

Diez años más tarde se pone de manifiesto que las poblaciones de trips presentan altos niveles de resistencia contra todas las materias activas disponibles (Contreras et al., 2001; Espinosa et al. 2002 a, b). En estos trabajos se abordó el estudio de la resistencia a insecticidas en *F. occidentalis* mediante ensayos de campo y de laboratorio, y también empleando bioensayos con sinergistas. En ellos se apuntó la posibilidad de que la resistencia fuera debida a un mecanismo de tipo metabólico (Espinosa et al., 2002b), probablemente mediado por las monooxigenasas dependientes de P450 (Espinosa et al., 2005), si bien no se podía descartar la participación de otros sistemas enzimáticos también relacionados con la resistencia, como las esterasas o las glutatión-S-transferasas. Se proponía, pues, la necesidad de ahondar en el estudio de los mecanismos implicados en la resistencia en esta especie-plaga.

En este sentido, en el presente trabajo se evaluó la implicación de las esterasas en la resistencia de las poblaciones de *F. occidentalis* del sudeste español, así como la posibilidad de emplear dicha actividad como posible

herramienta diagnóstico de la resistencia en este trips. Para ello se determinó la actividad carboxilesterasa frente a dos sustratos modelo: α -naftil acetato y p-nitrofenil acetato, tanto de poblaciones recogidas en el campo con diferentes niveles de sensibilidad a acrinatrina y metiocarb (insecticidas selectivos), y endosulfán, metamidofos y deltametrina (insecticidas de amplio espectro), como de poblaciones seleccionadas en laboratorio. Los insectos poseían distintos niveles de resistencia a piretroides y carbamatos (**Tabla 5-1**) (Espinosa et al., 2002a,b).

Para las medidas de actividad enzimática se aplicaron los métodos adaptados en nuestro laboratorio, que permiten medir a la vez, y en un mismo trips, hasta tres actividades distintas implicadas en la resistencia a insecticidas (ver Capítulo 3). Además, se comparó dicha actividad con el grado de resistencia in vivo (CL_{50}), en busca de una posible correlación entre ambos parámetros.

Los objetivos del presente capítulo fueron:

- 1) Caracterizar las diferencias en la actividad esterasa entre poblaciones resistentes y sensible de *F. occidentalis*.
- 2) Evaluar la posibilidad de emplear dicha actividad como herramienta diagnóstico de la resistencia en poblaciones de campo de *F. occidentalis*.

5-1. Material y Métodos

5-1.1. Insectos.

Todos los trips empleados en este estudio fueron cedidos por el Departamento de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena. Tras la recogida en campo, los insectos se mantuvieron y multiplicaron en su laboratorio durante una o dos generaciones antes de ser enviados al nuestro.

A su llegada, los trips vivos se colocaron individualmente en tubos de microcentrífuga y fueron almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización en las determinaciones enzimáticas.

Las poblaciones fueron recogidas de distintos cultivos donde habían sido sometidas a diferentes tratamientos con insecticidas. Las

características toxicológicas de las distintas poblaciones analizadas se resumen en la **tabla 5-1**. La población MLFOM se tomó como población de referencia al no haber estado expuesta a insecticidas.

5-1.2. Preparación de las muestras. Determinación de las actividades enzimáticas y de la cantidad de proteína.

5-1.2.1. Preparación de las muestras.

Los homogeneizados de los trips se prepararon colocando 8 insectos adultos en ocho pocillos de una microplaca de 96-pocillos mantenida sobre hielo. A continuación se añadió 1 μL de una disolución de fosfato sódico 0,1 M (pH 7,4) a cada uno de ellos y se homogeneizaron simultáneamente todos los insectos con la ayuda de un homogeneizador múltiple (Burkard Instruments, Rickmansworth, Reino Unido) (French-Constant y Devonshire, 1987). Posteriormente se enjuagó el homogeneizador con más disolución de fosfato sódico, hasta alcanzar un volumen final de 50 μL . En las diluciones finales necesarias para la realización de las medidas enzimáticas se empleó la disolución de homogeneización.

5-1.2.2. Medida de la actividad CaE.

En los ensayos con p-NPA la mezcla de reacción contenía de 15 a 20 μL de una dilución 1:5 del homogeneizado en disolución de homogeneización, p-NPA (1 mM; disolución de partida en etanol absoluto), y disolución de fosfato sódico (0,1 M, pH 7,4) hasta un volumen final de 100 μL por pocillo. Para equilibrar la mezcla, las adiciones se realizaron en una microplaca precalentada. Los controles se midieron al mismo tiempo, empleando una mezcla de reacción sin extractos proteicos. Las muestras se midieron durante 180 s a una longitud de onda de 415 nm y a una temperatura de 30°C. Para convertir los cambios en la absorbancia en μmoles de p-nitrofenol producidos durante 3 minutos se utilizaron el coeficiente de extinción molar descrito en la literatura para el p-nitrofenol ($\epsilon_{415} = 6,56 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Scharf et al., 1998), y el paso óptico (para un volumen final de 100 μL) obtenido en los ensayos de optimización (ver Capítulo 3).

Tabla 5-1. Características de las poblaciones de insectos analizadas: régimen de tratamientos empleados, datos de la recolección y resultados de los bioensayos de aplicación tópica con diversos insecticidas.

CL ₅₀ (mg producto activo L ⁻¹) ^{b,c}							
Población ^a	Huésped	MET	ACR	MTH	END	DEL	Tratamiento insecticida empleado
MLFOM	Melocotón	15 (1)	9 (1)	1056 (1)	3206 (1)	131 (1)	Ninguno (orgánico). Cultivo ecológico
SALB		85 (5,7)	119 (13,2)	2040 (1,9)	903 (0,3)	580 (4,4)	Mantenida durante 9 años en ausencia de insecticida (excepto un tratamiento accidental con acrinatrina 5 años antes)
PIMOL	Pimiento	190 (12,7)	70 (7,8)	888 (0,8)	25354 (7,9)	403 (3,1)	Formetanato (x1)/acrinatrina (x2)/diclorvos (probablemente también endosulfán y metomilo)
GERBPIL	Gerbera	100 (6,7)	127 (14,1)	1962 (1,9)	8988 (2,8)	426 (3,3)	Formetanato/acrinatrina
TOMCO	Tomate	150 (10)	112 (12,4)	2778 (2,6)	4862 (1,5)	73 (0,6)	Metiocarb/formetanato/acrinatrina (dulcoso)
PIMPE	Pimiento	150 (10)	128 (14,2)	2694 (2,6)	5908 (1,8)	265 (2,0)	Acrinatrina/diclorvos/metiocarb/formetanato/ buprofezin/pirimifos metilo (alta presión)
CLME	Clavel	155 (10,3)	-	1938 (1,8)	2307 (0,7)	144 (1,1)	Metomilo/triclorfón/fluenoxuron/tautlivanilato/diclorvos/metiocarb
PIMMIR 1	Pimiento	140 (9,3)	268 (29,8)	1548 (1,5)	2646 (0,8)	-	Buprofezin/imidacloprid/acrinatrina (x3)/metiocarb (x1)/formetanato (x2). El mismo invernadero que el de la población PIMMIR 2, los insectos se recogieron justo después del último tratamiento
PIMMIR 2	Pimiento	105 (7)	67 (7,4)	810 (0,8)	3605 (1,1)	165 (1,3)	Buprofezin/imidacloprid/acrinatrina (x3)/metiocarb (x1)/formetanato (x2). El mismo invernadero que el de la población PIMMIR 1, los insectos se recogieron 1 mes después del último tratamiento
MET 7	SEL	305 (20,3)	nd	nd	nd	nd	Siete ciclos de selección con metiocarb
ACR 7	SEL	nd	383 (42,6)	nd	nd	nd	Siete ciclos de selección con acrinatrina

^aPara los ensayos de actividad enzimática se emplearon trips adultos de la primera generación (F1) criada en el laboratorio tras la recogida en campo (verano 2000 y 2001) o seleccionadas en el laboratorio (SEL).

^bInsecticidas: MET, metiocarb (carbamato); ACR, acrinatrina (piretroide); MTH, metamidofos (organofosforado), END, endosulfán (organoclorado) y DEL, deltametrina (piretroide).

^cResultados de los bioensayos tópicos, de las referencias: Espinosa et al., 2002a,b. Factor de resistencia entre paréntesis.

-, no se ajusta al modelo probit.

nd, no se determinó.

Para las determinaciones con el α -NA, la mezcla de reacción contenía: 10 μ L del extracto enzimático diluido 1:10 y una cantidad suficiente de α -NA en una disolución de fosfato sódico (0,1 M, pH 7,5) como para tener una concentración final de sustrato de 0,75 mM. El volumen final de ensayo fue de 50 μ L. La microplaca se incubó a 30°C durante 15 minutos, deteniéndose entonces la reacción añadiendo 50 μ L de la disolución de o-dianisidina (FBB) (concentración final 0,2 $g L^{-1}$) y SDS (concentración final 10 $g L^{-1}$). Tras 5 minutos se leyó la absorbancia a 595 nm y se comparó con la de una curva patrón de α -naftol (5-500 μ M), el producto de la reacción.

Todas las reacciones enzimáticas se midieron en los rangos lineales de tiempo de reacción y concentración de proteína fijados previamente (ver Capítulo 3).

En cada placa las determinaciones se realizaron por duplicado. Se leyeron al menos tres placas de cada población por día, y las mismas lecturas se repitieron por lo menos en dos días diferentes.

El contenido proteico de los homogeneizados se determinó mediante el método de Lowry y colaboradores (1951), siguiendo la modificación del microensayo de Bio-Rad (Hercules, CA) para microplacas, y usando albúmina de suero bovino como patrón.

Las actividades específicas se expresan en Unidades Internacionales de enzima, definidas como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μ mol de sustrato a producto en un minuto, en las condiciones de ensayo, por mg de proteína.

5-1.3. Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos se realizaron usando los paquetes informáticos SPSS 12.0 básico y avanzado para Windows (SPSS Inc, Chicago, IL).

Antes de realizar los análisis de regresión o los ANOVA, se estudió la normalidad de los datos, utilizando las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y de Shapiro-Wilk con la corrección de Lilliefors; la homogeneidad de la varianza se comprobó con la prueba de Levene. Las actividades enzimáticas no mostraron distribuciones normales respecto de la media, y además presentaron heterogeneidad de las varianzas. Para estabilizar la normalidad y la varianza se utilizó una transformación logarítmica.

Los resultados de las determinaciones enzimáticas se analizaron usando un ANOVA para un modelo mixto anidado en base al diseño experimental propuesto, definiendo a la “población” como factor fijo, y a los factores “día” y “placa” como factores aleatorios. Para determinar las diferencias entre las medias se utilizó la prueba de comparación múltiple de dos colas de Dunnett, usando la población MLFOM como categoría control.

También se estudiaron las varianzas, analizándose sus diferencias mediante la prueba F de Snedecor, y el coeficiente de variación (CV), que indica la relación existente entre la desviación típica de una muestra y su media. Al dividir la desviación típica por la media se convierte en un valor exento de unidad de medida. Se utiliza para comparar las desviaciones estándar entre poblaciones que tienen medias diferentes. Si comparamos la dispersión en varios conjuntos de observaciones tendrá menor dispersión aquella que tenga menor coeficiente de variación.

Las distribuciones de frecuencia de las actividades esterasa frente a α -NA y p-NPA se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Posteriormente se compararon individualmente cada una de las poblaciones estudiadas con la de referencia, usando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney y empleando la corrección de Bonferroni para ajustar el nivel de significación (Milton, 1991).

El análisis de las correlaciones entre las respuestas toxicológicas y las medias de las medidas enzimáticas, así como entre ambas actividades enzimáticas, se realizó mediante regresión lineal.

El nivel de significación de estas pruebas fue de $\alpha = 0,05$.

5-2. Resultados

5-2.1. Actividades enzimáticas.

Las **figuras 5-1, 5-2 y 5-3** y las **tablas 5-2, 5-3 y 5-4**, resumen los resultados de las actividades enzimáticas frente a ambos sustratos modelo.

5-2.1.1. Análisis de los valores promedio.

De las poblaciones de campo analizadas (**Tabla 5-1**), las denominadas GERBPIL, CLME y PIM MIR 2, presentaron los mayores niveles de actividad CaE media frente a p-NPA. En las poblaciones seleccionadas en laboratorio, la actividad fue mayor para la ACR 7, siendo

en la población MET 7 algo menor que en la de referencia (MLFOM) (**Fig. 5-1**).

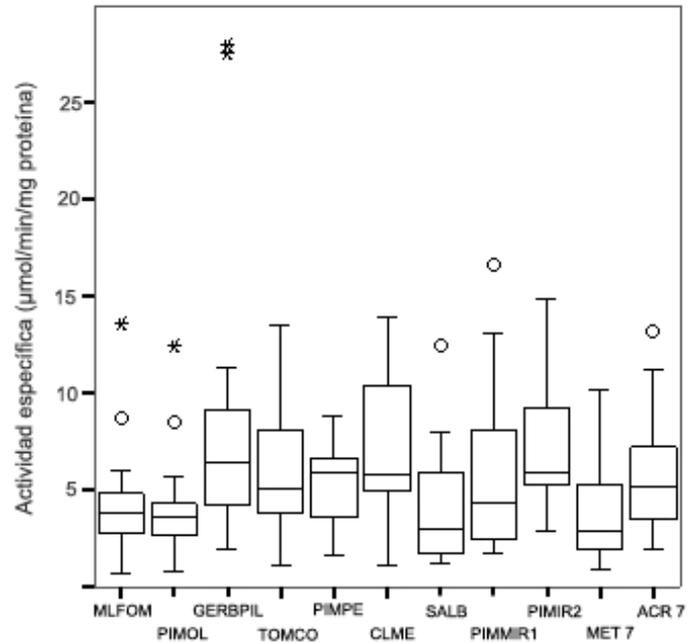


Figura 5-1. Diagrama de cajas para la actividad p-NPA medida en diferentes poblaciones de *Frankliniella occidentalis* (**Tabla 5-1**). La caja indica el rango en el que se concentra el 50% central de los datos. Sus extremos son, por lo tanto, el 1^{er} y 3^{er} cuartil de la distribución (rango intercuartil, RIC). La línea central en la caja es la mediana. Los extremos de los "bigotes" que salen de la caja son los valores que delimitan el 95% central de los datos. Las observaciones que caen fuera de este rango (outliers o valores extremos) están representados por un círculo (cuando el valor sobrepasa el 3er cuartil en 1,5 veces el RIC) o un asterisco (cuando el valor sobrepasa el 3er cuartil en 3 o más veces el RIC).

Para el α -NA, la población de campo PIM MIR 1 y las dos poblaciones seleccionadas en el laboratorio (MET 7 y ACR 7) mostraron las actividades más altas (**Fig. 5-2**).

Con el fin de comparar los niveles de actividad en las distintas poblaciones, empleamos como herramienta estadística el análisis de la varianza (ANOVA), que nos permite, además de comprobar si las medias entre los distintos grupos (poblaciones) son significativamente diferentes,

examinar la contribución relativa de las distintas fuentes de variación (población, día, placa, error) a la variabilidad total de la variable respuesta (en este caso el valor de la actividad, ρ -NPA o α -NA).

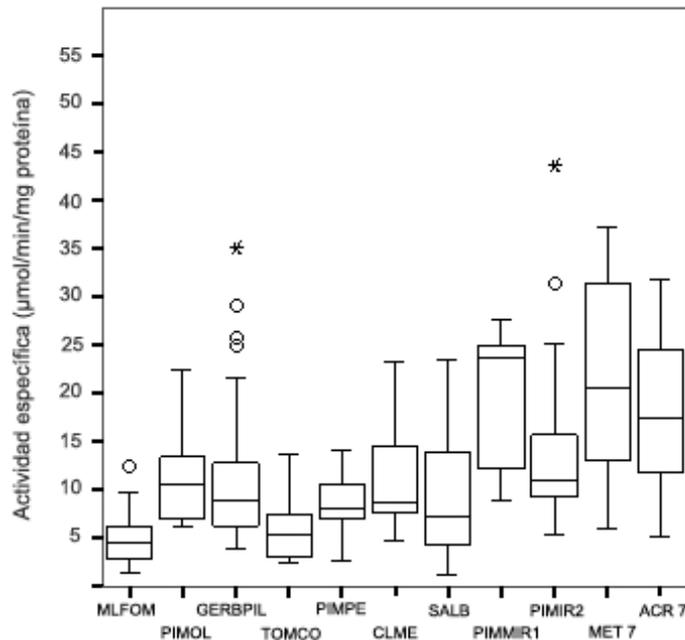


Figura 5-2. Diagrama de cajas para la actividad α -NA medida en diferentes poblaciones de *Frankliniella occidentalis* (Tabla 5-1). La caja indica el rango en el que se concentra el 50% central de los datos. Sus extremos son, por lo tanto, el 1^{er} y 3^{er} cuartil de la distribución (rango intercuartil, RIC). La línea central en la caja es la mediana. Los extremos de los "bigotes" que salen de la caja son los valores que delimitan el 95% central de los datos. Las observaciones que caen fuera de este rango (outliers o valores extremos) están representados por un círculo (cuando el valor sobrepasa el 3er cuartil en 1,5 veces el RIC) o un asterisco (cuando el valor sobrepasa el 3er cuartil en 3 o más veces el RIC).

Como resultado del diseño experimental planteado se propone inicialmente el siguiente modelo mixto anidado:

$$(constante + población + día(población) + placa(día(población)))$$

donde el factor "población" se define como un factor fijo y los factores "día" y "placa" se consideran factores aleatorios.

Los resultados del ANOVA se muestran en la **tabla 5-2**, de la que se deduce que el factor "placa" se puede excluir del modelo, puesto que su contribución (valor de Eta^2 , 14,6% para el α -NA y 16,8% para el p-NPA) no es significativa. Además, la estima de su varianza, 0,0298 y 0,010 para el p-NPA y el α -NA respectivamente, corrobora que puede ser excluido.

Tabla 5-2. Resultados del ANOVA para un diseño anidado, con el factor "población" considerado como factor fijo y los factores aleatorios "día" anidado a población y "placa" dentro del factor día. Modelo completo.

	gl	F	Prob>F	Eta ²	Potencia ^a
α-NA					
Constante	1	1837,447	0	0,992	1
Población	10	8,482	0,002	0,901	0,995
Día	11	1,460	0,181	0,264	0,667
Placa	33	1,143	0,282	0,146	0,928
p-NPA					
Constante	1	750,617	0	0,984	1
Población	10	2,982	0,073	0,798	0,631
Día	12	1,156	0,342	0,234	0,564
Placa	29	1,391	0,099	0,168	0,959

^a $\alpha = 0,05$

Por ello, se propone como modelo definitivo para el estudio de las actividades enzimáticas mediante un ANOVA el siguiente:

(constante+población+día(población))

que incluye sólo los factores "población" y "día".

Del análisis del ANOVA para este nuevo modelo (**Tabla 5-3**), se desprende que no existen diferencias significativas en la actividad p-NPA entre individuos de diferentes poblaciones. Sin embargo, el valor Eta^2 sugiere que el factor "población" es responsable en un 78,1% de la variación. Posiblemente una mayor potencia, más cercana a 1, permitiría detectar esta diferencia entre las poblaciones. El factor "día" supone sólo el 7% de la variación.

Por otro lado, el ANOVA mostró que las diferencias en la actividad α -NA explicadas por el factor "población" sí eran significativas (**Tabla 5-3**).

Tabla 5-3. Resultados del ANOVA para un diseño anidado, con el factor "población" y el factor "día" anidado a población. Modelo reducido.

	gl	F	Prob>F	Eta ²	Potencia ^a
α-NA					
Constante	1	1719,274	0	0,990	1
Población	10	7,394	0,002	0,876	0,993
Día	11	1,593	0,101	0,065	0,802
p-NPA					
Constante	1	752,782	0	0,982	1
Población	10	2,917	0,070	0,781	0,649
Día	12	1,429	0,154	0,070	0,771

^a $\alpha = 0,05$

Para investigar estas diferencias entre las poblaciones se aplicó la prueba de comparación múltiple de dos colas de Dunnett. Los resultados se resumen en la **tabla 5-4**. Dicha prueba mostró que, en insectos de las poblaciones GERBPIL y PIM MIR 2, las actividades p-NPA eran significativamente más altas (1,87 y 1,79 veces superiores, respectivamente) que las de la población de referencia (MLFOM). Para la población CLME no se encontró ninguna diferencia significativa, a pesar de presentar una actividad CaE frente a p-NPA 1,76 veces más alta que la correspondiente a la población de referencia. La actividad p-NPA de las poblaciones PIMOL, SALB y MET 7 era similar a, o incluso más baja que, la de la población de referencia. La prueba de Dunnett es una modificación de la prueba t. Fue diseñada específicamente para comparar cada grupo con un grupo control, por lo que el número de comparaciones es menor que en cualquier prueba en la que se comparen más de dos grupos. Resulta ser, por tanto, una prueba más potente que otras en las que se realicen comparaciones múltiples. Probablemente, esta sea la causa por la que se aprecian diferencias significativas entre determinadas poblaciones respecto de la población de referencia, aún cuando con el ANOVA no se apreciaban.

En las medidas con el α -NA, los trips de las poblaciones de campo hidrolizaron el sustrato a una velocidad mayor que los de la población de referencia MLFOM (**Tabla 5-4**). Las poblaciones PIM MIR 1 y PIM MIR 2 mostraron las actividades CaE mayores, 4,02 y 2,83 veces superiores a las de MLFOM. El resto de las poblaciones de campo (PIMOL, GERBPIL, PIMPE, CLME y SALB) mostraron diferencias significativas respecto a la población de referencia, con factores que oscilaron entre 2,3 y 1,8 veces el valor de MLFOM. La población TOMCO no fue significativamente diferente de la población de referencia. Las poblaciones seleccionadas también

fueron significativamente diferentes de la población MLFOM (4,3 y 3,7 veces superiores para MET 7 y ACR 7 respectivamente) (**Tabla 5-4**).

Tabla 5-4. Actividades esterasa medias frente a p-NPA y α -NA, y sus varianzas asociadas, medidas en individuos de diferentes poblaciones de *Frankliniella occidentalis*.

Población	α -NA ^a	Varianza	vR/vS	F-Snedecor	p-NPA ^a	Varianza	vR/vS	F-Snedecor
MLFOM	4,83±2,43 (n=56)	5,88	1		4,07±2,30 (n=34)	5,312	1	
PIMOL	11,09±4,78*** (n=12)	22,85b	3,88	2,24	3,89±2,37 (n=27)	5,626	1,06	2,06
GERBPIL	11,12±7,06*** (n=46)	49,76b	8,46	1,74	7,61±5,90** (n=32)	34,782b	6,55	2,02
TOMCO	5,72±3,04 (n=18)	9,21	1,57	2,03	6,12±3,11 (n=25)	9,696	1,83	2,09
PIMPE	8,45±3,07*** (n=15)	9,43	1,60	2,11	5,26±2,22 (n=12)	4,922	<1	2,41
CLME	11,06±5,21*** (n=28)	27,11b	4,61	1,87	7,16±4,27 (n=8)	18,198b	3,43	2,7
SALB	9,27±6,42** (n=20)	41,20b	7,00	1,99	4,02±2,98 (n=19)	8,894	1,68	2,19
PIM MIR 1	19,39±7,28*** (n=11)	52,93b	9,00	2,29	5,62±3,67 (n=35)	13,498b	2,54	2
PIM MIR 2	13,65±8,22*** (n=30)	67,50b	11,47	1,85	7,30±3,89** (n=15)	11,483	2,16	2,29
MET 7	20,68±10,54*** (n=13)	111,08b	18,88	2,19	3,73±2,45 (n=12)	6,024	1,13	2,15
ACR 7	17,83±7,65*** (n=26)	58,54b	9,95	1,89	5,72±2,89 (n=8)	8,349	1,57	2,1

^a Cada valor representa la actividad específica media ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) (\pm DE), n = tamaño de muestra. Las condiciones del ensayo se especifican en la Sección 5-1.

^b Varianza significativamente diferente de la varianza de referencia cuando la relación (varianza R/varianza S) > F-Snedecor [0,975, GL (numerador), GL (denominador)]; R, poblaciones resistentes; S, población de referencia.

Los valores de la misma columna seguidos de asterisco indican diferencias significativas respecto de la población de referencia (MLFOM) (* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, prueba de Dunnett).

5-2.1.2. Análisis de la variabilidad de las observaciones alrededor del promedio: dispersión y forma de la distribución de frecuencias.

En el ensayo con el p-NPA, las distribuciones de la actividad enzimática en las poblaciones GERBPIL y PIM MIR 2 fueron significativamente diferentes a la de la población MLFOM (prueba de Mann-Whitney, $P < 0,05$) (**Fig. 5-3a, b**).

Las varianzas de las poblaciones GERBPIL, CLME y PIM MIR 1 fueron significativamente diferentes a la varianza de la población MLFOM (**Tabla 5-4**). La mayor varianza se encontró en la población GERBPIL, que también presentó el mayor coeficiente de variación (CV=77,5%).

Las distribuciones de frecuencia de la actividad enzimática frente al α -NA en todas las poblaciones de campo, excepto TOMCO y SALB, fueron también significativamente diferentes de las mostradas por MLFOM (prueba de Mann-Whitney, $P < 0,05$).

Las varianzas de las poblaciones de campo analizadas fueron significativamente diferentes de la obtenida para la población MLFOM, excepto para las poblaciones TOMCO y PIMPE (**Tabla 5-4**). Las poblaciones seleccionadas también fueron significativamente diferentes de la población MLFOM respecto de la varianza y distribución de frecuencia (**Tabla 5-4**). Al igual que sucediera para la actividad p-NPA, las dos poblaciones con los valores de varianza más elevados (PIM MIR 2 y MET 7) también presentaron coeficientes de variación elevados (60,2% y 60,0%, respectivamente).

En la distribución de frecuencias de las actividades α -NA y p-NPA (**Fig. 5-3a, b y c**), aunque existe solapamiento entre las distintas distribuciones y no se puede ver una clara separación entre las poblaciones sensible y resistentes, sí se aprecia en estas últimas un claro desplazamiento en la actividad hacia niveles más altos. De hecho en la actividad α -NA resulta posible detectar individuos cuya actividad enzimática es mucho mayor que la media, tanto si se comparan con su propia población como si se hace con la de referencia.

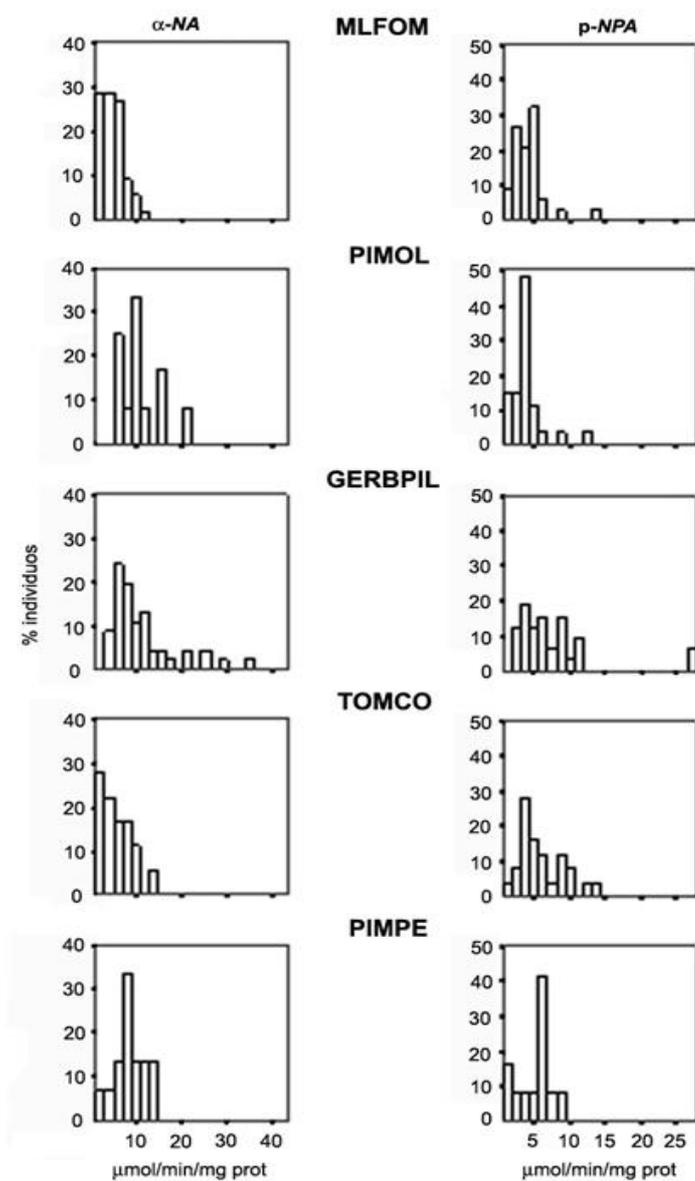


Figura 5-3a. Histogramas de las determinaciones de las actividades esterasa α -NA y p-NPA ($\mu\text{mol/min/mg prot}$) en individuos de distintas poblaciones de campo de *Frankliniella occidentalis*.

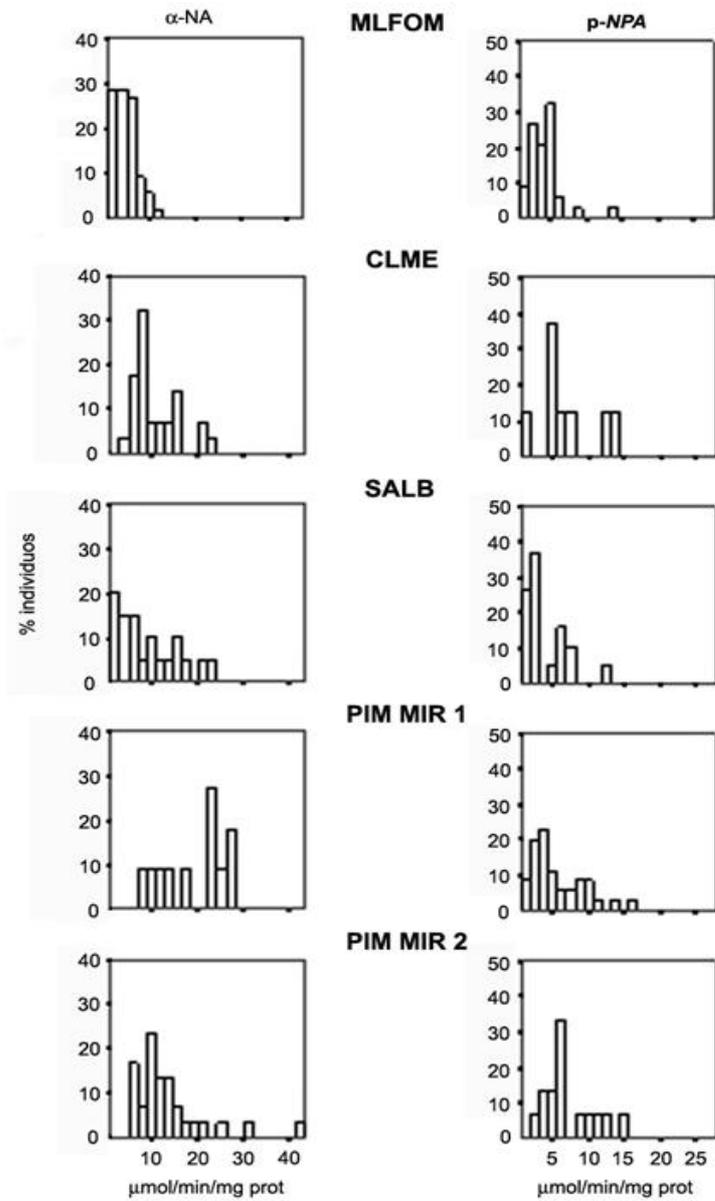


Figura 5-3b. Histogramas de las determinaciones de las actividades esterasa α -NA y p-NPA ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$) en individuos de distintas poblaciones de campo de *Frankliniella occidentalis*.

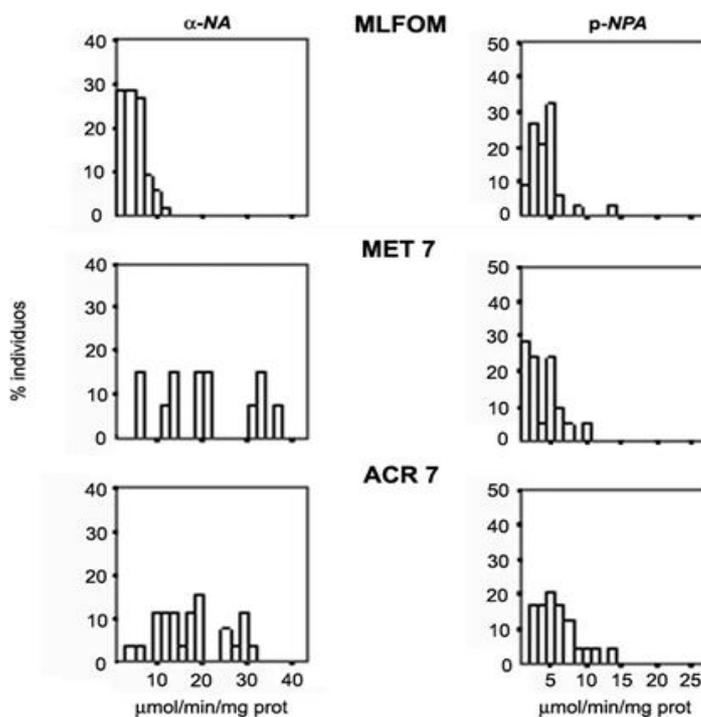


Figura 5-3c. Histogramas de las determinaciones de las actividades esterasa α -NA y p-NPA ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$) en individuos de distintas poblaciones seleccionadas en laboratorio de *Frankliniella occidentalis*.

5-2.2. Correlación entre las actividades enzimáticas y los datos toxicológicos.

Los valores CL_{50} para la acrinatrina de las diferentes poblaciones se correlacionaron significativamente con las actividades medias frente a α -NA ($R^2 = 0,5278$, $F_{(1, 6)} = 6,68$, $P < 0,05$) y frente a p-NPA ($R^2 = 0,5191$, $F_{(1, 7)} = 7,56$, $P < 0,05$). El metiocarb también se correlacionó significativamente con la actividad media frente a α -NA ($R^2 = 0,6175$, $F_{(1, 7)} = 11,30$, $P < 0,05$). Sin embargo, no se encontró ninguna correlación entre ambas actividades esterasa.

5-3. Discusión

Según indicó Jensen (2000a), “la resistencia a insecticidas en poblaciones de campo de *F. occidentalis* parece ser común y probablemente es la causa principal de muchos fallos en el control con insecticidas de infestaciones de *F. occidentalis*”. Los resultados de los estudios de Contreras y colaboradores (2001) y Espinosa y colaboradores (2002b) sobre los problemas en el control de los trips en el área del sudeste español parecerían corroborar esta tendencia, esto es, el desarrollo de resistencia a insecticidas en poblaciones de campo de *F. occidentalis*.

Las poblaciones de campo empleadas en este estudio y recogidas de cosechas de invernadero sometidas a alta presión de insecticida (**Tabla 5-1**), mostraron una resistencia moderada a la acrinatrina y al metiocarb al mismo tiempo (factores de resistencia entre 5,7 y 14,2). Estos son insecticidas selectivos contra los trips. Para el endosulfán (insecticida de amplio espectro) en la población PIMOL se detectó un factor de resistencia de alrededor de 8. Para el metamidofos y la deltametrina (también insecticidas de amplio espectro), las relaciones de resistencia presentaron un factor en torno a tres para todas las poblaciones, excepto la población SALB que presentó un factor de 4,4 con la deltametrina.

En poblaciones de insectos sometidas a una elevada presión de selección con piretroides se ha descrito el desarrollo de múltiples mecanismos de resistencia a una o varias clases de insecticidas (Khambay y Jewess, 2005). En el mismo trips de las flores, Zhao y colaboradores (1995) demostraron que una reducción en la penetración, el incremento del metabolismo y posiblemente la insensibilidad nerviosa contribuían a la resistencia frente al fenvalerato (piretroide). También se han descrito poblaciones de trips con resistencias múltiples en Dinamarca (Jensen, 1998) y Australia (Herron y Gullick, 2001). Los resultados de toxicidad de nuestras poblaciones parecen indicar la misma tendencia, esto es, la posible presencia de más de un mecanismo responsable de la resistencia, en base a las distintas dianas de los insecticidas ensayados.

En algunas especies de insectos se ha correlacionado un incremento en la actividad esterasa con la resistencia a los insecticidas (Soderlund y Bloomquist, 1990). En nuestro estudio los niveles medios de actividad esterasa frente a α -NA y p-NPA fueron más elevados en las poblaciones resistentes que en la de referencia, lo que concuerda con los estudios

llevados a cabo, también en Frankliniella, por Ferrari y colaboradores (1993) y por Jensen (1998, 2000b). Estos autores también encontraron un incremento en la actividad esterasa frente a α -NA o β -NA cuando se ensayaron poblaciones resistentes, en comparación con una población sensible, si bien ninguno de los ensayos empleados en dichos estudios mostraron una correlación positiva entre los niveles de actividad y los niveles de resistencia frente al insecticida metiocarb. En este sentido, en nuestro trabajo se ha encontrado una correlación significativa entre la resistencia a la acrinatrina y la actividad esterasa frente al p-NPA. También se ha correlacionado significativamente el metiocarb y la acrinatrina con la actividad esterasa frente a α -NA, lo que apoyaría la posible implicación de este mecanismo en la resistencia de estas poblaciones de campo de F. occidentalis a estos dos insecticidas. Además, dadas las dianas distintas que usan estos insecticidas, parecería confirmarse la selección de un sistema de desintoxicación similar, no específico, en estas poblaciones de campo, si bien no se puede excluir la interacción de las estererasas con otros mecanismos que contribuirían de forma multiplicativa a la resistencia. De hecho, ensayos realizados con las poblaciones de campo PIM MIR 1 y PIM MIR 2 resultaron en un incremento significativo de la actividad GST frente al sustrato CDNB al compararla con la población sensible de referencia (Maymó et al., 2002), lo que corroboraría esta hipótesis. Por otro lado, Espinosa y colaboradores (2005) observaron que en poblaciones de trips seleccionadas en el laboratorio con insecticida, el mecanismo de resistencia era metabólico y se suprimía con butóxido de piperonilo, indicando que las P450 podrían ser el agente principal responsable de la resistencia observada. Pero además indicaron que: "Otros factores, tales como GST, estererasas, alteración de AChE y reducción de la penetración, también pueden contribuir a la resistencia frente a diferentes insecticidas".

Por otro lado, las diversas poblaciones resistentes analizadas en el presente trabajo presentaron actividades esterasa que diferían ampliamente entre individuos de la misma población. Así, tanto la actividad media como el tipo de distribución se ven modificados con una dispersión de los valores hacia mayores niveles de actividad en las poblaciones resistentes. Los resultados obtenidos por Jensen (1998) muestran una pauta de comportamiento similar. Tal como indicaron Callaghan y Holloway (1999), el aumento de la varianza en las poblaciones resistentes se puede relacionar con un incremento en la expresión o en el número de genes expresados.

Sin embargo, y a pesar de que las actividades medias fueron significativamente diferentes entre las poblaciones resistentes y sensible, el ensayo no parece ser válido como herramienta diagnóstica en individuos, debido al solapamiento en las distribuciones de las poblaciones.

Al profundizar en las bases moleculares de la resistencia, la mediada por esterasas parece ser debida a cambios cuantitativos o cualitativos en las isoenzimas responsables de la hidrólisis o secuestro del insecticida (Soderlund y Bloomquist, 1990). Así, se ha publicado que en el áfido *M. persicae*, los mosquitos *Culex quinquefasciatus*, *C. pipiens*, *C. tarsalis* y *C. tritaeniorhynchus* y en el saltamontes marrón *Nilaparvata lugens* (Stål) el incremento en las esterasas se debe a un fenómeno de amplificación génica, mientras que en las moscas *Lucilia cuprina* y *Musca domestica* se ha demostrado que la resistencia debida a un incremento del metabolismo por las esterasas está causada por una única mutación puntual (Hemingway, 2000). De nuestros resultados parece desprenderse que debe haber un incremento del metabolismo de la acrinatrina y del metiocarb mediado por esterasas en el trips de las flores, pero no podemos concluir cuáles de las numerosas esterasas presentes en el insecto son las que están implicadas en la resistencia, ni de qué forma.

5-4. Bibliografía

Belda, J. E.; Rodríguez, M. D. Control de trips (*Frankliniella occidentalis*) en cultivos hortícolas protegidos. *Phytoma-España* 10: 21-31 (1989).

Callaghan, A.; Holloway, G. J. The relationship between environmental stress and variance. *Ecol. Applic.* 9: 456-462 (1999).

Contreras, J.; Moreno, D.; Hernández, M. D.; Bielza, P.; Lacasa, A. Preliminary study on insecticide resistance in *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (*Thysanoptera: Thripidae*) in sweet pepper crops in Campo de Cartagena (Murcia), S.E. of Spain. *Acta Hort. (ISHS)* 559: 745-752 (2001).

Espinosa, P. J.; Bielza, P.; Contreras, J.; Lacasa, A. Field and laboratory selection of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) for resistance to insecticides. *Pest. Manag. Sci.* 58: 920-927 (2002a).

Espinosa, P. J.; Bielza, P.; Contreras, J.; Lacasa, A. Insecticide resistance in field populations of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) in Murcia (South-east Spain). *Pest. Manag. Sci.* 58: 967-971 (2002b).

Espinosa, P. J.; Contreras, J.; Quinto, V.; Grávalos, C.; Fernández, E.;

- Bielza, P.** *Metabolic mechanisms of insecticide resistance in the western flower thrips, Frankliniella occidentalis (Pergande).* Pest. Manag. Sci. 61: 1009–1015 (2005).
- French-Constant, R. H.; Devonshire, A. L.** *A multiple homogeneizer for rapid sample preparation in immunoassay and electrophoresis.* Biochem. Genet. 25: 493–499 (1987).
- Hemingway, J.** *The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance.* Insect. Biochem. Mol. Biol. 30: 1009–1015 (2000).
- Herron, G. A.; Gullick, G. C.** *Insecticide resistance in Australian populations of Frankliniella occidentalis (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) causes the abandonment of pyrethroid chemicals for its control.* Gen. Appl. Entomol. 30: 21–26 (2001).
- Jensen, S. E.** *Acetylcholinesterase activity associated with methiocarb resistance in a strain of western flower thrips, Frankliniella occidentalis (Pergande).* Pestic. Biochem. Physiol. 61: 191–200 (1998).
- Jensen, S. E.** *Insecticide resistance in the western flower thrips, Frankliniella occidentalis.* Integr. Pest. Manag. Rev. 5: 131–146 (2000a).
- Jensen, S. E.** *Mechanisms associated with methiocarb resistance in Frankliniella occidentalis (Thysanoptera: Thripidae).* J. Econ. Entomol. 93: 464–471 (2000b).
- Khambay, B. P. S.; Jewess, P. J.** *Pyrethroids.* En: Comprehensive Molecular Insect Science. Gilbert, L. I., Iatrou, K., Gill, S. S. (eds). Vol. 6, pp 1-29. Elsevier Ltd. Oxford. Vol 6: 1-30 (2005).
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.** *Protein measurement with the folin phenol reagent.* J. Biol. Chem. 193: 265–275 (1951).
- Maymó, A. C.; Cervera, A.; Sarabia, R.; Martínez-Pardo, R.; Garcera, M. D.** *Evaluation of metabolic detoxifying enzyme activities and insecticide resistance in Frankliniella occidentalis.* Pest Manag. Sci. 58: 928-934. (2002).
- Milton, J. S.** *Statistical methods in the biological and health sciences.* 2ª ed, McGraw-Hill, Nueva York (1991).
- Scharf, M. E.; Neal, J. J.; Bennett, G. W.** *Changes of insecticide resistance levels and detoxification enzymes following insecticide selection in the german cockroach, Blattella germanica (L).* Pestic. Biochem. Physiol. 59: 67–79 (1998).

Soderlund, D. M.; Bloomquist, J. R. *Molecular mechanisms of insecticide resistance. En: Pesticide resistance in arthropods. Roush, R. T., Tabashnik, B. E. (eds.) pp 58-96. Chapman and Hall, New York (1990).*

Zhao, G.; Liu, W.; Knowles, C. O. *Fenvalerate resistance mechanisms in western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae). J. Econ. Entomol. 88: 531–535 (1995).*

Discusión General

La resistencia a insecticidas es la respuesta evolutiva natural a un estrés ambiental y, a menos que se produjera la extinción total de la especie en su hábitat inmediato y alrededores, es inevitable en un plazo de tiempo más o menos largo. Dado que la eliminación completa de una especie resulta inadecuada, la investigación en resistencia a insecticidas no debe pretender buscar una solución definitiva, sino prolongar, en la medida de lo posible, la vida útil de los productos, procurando mitigar los factores que conducen a la aparición de la resistencia.

Una de las formas de conseguir este objetivo es la de emplear aquellos recursos y herramientas biológicas que permitan diseccionar el entramado genético y molecular de las especies resistentes. Examinar a los mutantes resistentes aislados del campo es el método instintivo para comprender el fenómeno de la resistencia. Un amplio muestreo de poblaciones de diferentes ámbitos geográficos, con diferentes temperaturas, vegetación o tratamientos con insecticidas, puede proporcionar un abanico de mutantes con los que comenzar las investigaciones, y tratar así de responder a diversas cuestiones fundamentales para el entendimiento del fenómeno de la resistencia en general: ¿qué o cuáles mutaciones en qué o cuáles genes son las responsables de la resistencia?; ¿cómo se manifiestan fisiológicamente dichas mutaciones para conducir a la supervivencia del individuo ante tal reto mortal?; ¿pueden darse estas mutaciones tanto en el campo como en el laboratorio?; ¿están conservadas dichas mutaciones dentro de una misma población y entre poblaciones distintas?; ¿qué nos dice esto de la evolución de la resistencia en estas poblaciones?; ¿cómo afecta a la estabilidad de la resistencia la ausencia de presión de selección con un insecticida?; ¿cuáles son los efectos en otras especies?.

La presente Tesis Doctoral ha tratado de abordar alguna de estas cuestiones a través del estudio de dos insectos plaga, *Blattella germanica* y *Frankliniella occidentalis*.

Iniciamos los trabajos con la puesta a punto de la metodología, esto es su adaptación a las condiciones bioquímicas de las dos especies de interés (**Capítulo 3**). Y comprobamos que las diferencias entre poblaciones

resistentes y sensibles pueden hacerse máximas si se optimizan las condiciones de estos ensayos.

A continuación, en el **capítulo 4** abordamos el estudio de una población de campo de *B. germanica*. La población resultó ser altamente resistente al piretroide deltametrina, y los mecanismos implicados en la resistencia de naturaleza metabólica. La posterior selección en el laboratorio pretendía identificar los mecanismos específicamente relacionados con la resistencia a este insecticida y su contribución en el fenotipo final, especialmente los mecanismos de desintoxicación basados en las actividades P450 y esterasas. Tras ser sometida a varios ciclos de selección, la resistencia creció rápidamente de 1,58x a 102x en tan sólo tres ciclos, sugiriendo la posible selección de mecanismos de carácter recesivo. La supresión incompleta de la resistencia por los sinergistas PBO y DEF, y la resistencia cruzada con otro piretroide (acrinatrina) evidenciaron que, además de oxidasas (principalmente) y esterasas (en menor medida), otros mecanismos de naturaleza no metabólica podrían ser coseleccionados en los individuos resistentes a la deltametrina.

Los resultados con *F. occidentalis* se resumen en el **capítulo 5**. En el estudio se incluyeron poblaciones seleccionadas en el laboratorio y poblaciones recogidas de diferentes invernaderos del sureste español. Los mecanismos bioquímicos implicados en la resistencia de estas poblaciones se analizaron con los ensayos in vitro, previamente optimizados, de la actividad esterasa frente a dos sustratos modelo diferentes. Así se halló una correlación significativa entre los niveles elevados de la actividad esterasa y la resistencia a la acrinatrina y al metiocarb, al incluir tanto las poblaciones de campo como las seleccionadas en el laboratorio. Dadas las distintas dianas a las que atacan estos insecticidas, parecería que en la resistencia observada estaría implicado un sistema de desintoxicación, no específico, probablemente esterasas. Aunque las diferencias entre las poblaciones resistentes y sensible en la actividad esterasa eran significativas, las diferencias exhibidas en los ensayos en individuos no permitían discriminar entre las poblaciones en base al solapamiento de sus distribuciones, cuestionando la validez de estos ensayos como posible herramienta diagnóstico a este nivel individual.

Finalmente, con esta discusión pretendemos fusionar el conocimiento adquirido y trasladarlo al ámbito del control integrado. Se pone así de manifiesto que el fenómeno de la resistencia es un problema multidisciplinar

y requiere, por tanto, para su gestión, del esfuerzo conjunto de todos los sectores implicados: investigadores, productores, empresas y administraciones públicas.

6-1. La resistencia y sus mecanismos: el caso de los piretroides

La principal causa del desarrollo de la resistencia en el campo es, como ya se apuntó en el capítulo 2, la elevada y persistente presión de selección, consecuencia de las repetidas aplicaciones de una única clase de insecticida (o de otros con el mismo modo de acción). Por ello, a pesar del control eficaz en los primeros estadios, un pequeño número de supervivientes resistentes pueden reproducirse rápidamente hasta provocar un fallo en el control. En este sentido los piretroides no son diferentes de las otras clases de insecticidas. De hecho el desarrollo de la resistencia a los piretroides fue precisamente lo que impulsó a las empresas a considerar la importancia de la resistencia y tomar acciones en conjunto. Además, los piretroides presentaban una desventaja de partida, y es que la mutación kdr también confiere resistencia al DDT, y precisamente el uso previo del DDT seleccionó alelos kdr a niveles significativos. En la actualidad unas 80 especies han desarrollado resistencia a piretroides (Whalon et al., 2003), entre las que se incluyen las dos especies aquí estudiadas. Ambas son ejemplos de plagas, de importancia, tanto agrícola (Frankliniella occidentalis), como en salud pública (Blattella germanica).

Por otro lado y como el resto de especies de la clase Insecta, las aquí estudiadas presentan una sorprendente similitud en los mecanismos subyacentes a la resistencia. Así, nuestra población de B. germanica, la población R, presentaba múltiples mecanismos de resistencia a la deltametrina, incluyendo esterasas, P450 y modificaciones de la diana (kdr). En las poblaciones de F. occidentalis las esterasas explicaban, aunque no en su totalidad, los niveles de resistencia a la acrinatrina detectados. En la literatura son frecuentes los casos de poblaciones de insectos resistentes a piretroides en los que se manifiestan varios de estos mecanismos a la vez. Tales insectos suelen presentar niveles de resistencia extremadamente elevados y, en alguna medida, resistencia cruzada con otros piretroides, tal y como sucedía también con nuestra población R.

Todos los piretroides, con la excepción de algunos compuestos como el MTI800 (en su molécula no hay enlaces éster), son susceptibles de ser atacados por las esterasas, siendo importante la estereoquímica del ácido ciclopropanocarboxílico (presente en la estructura de la mayoría de los piretroides) en la velocidad de la reacción, puesto que los isómeros trans son mucho mejores sustratos para estas enzimas que los isómeros cis (Soderlund y Casida, 1977). De hecho, los cis-piretroides que poseen un grupo α -ciano (piretroides del tipo II), y por tanto un éster secundario, son degradados generalmente mediante oxidasas microsomales dependientes de P450 a través de la oxidación del carbono α . En este sentido, el trabajo de Soderlund y Casida (1977) en hígado de mamíferos mostró que los piretroides cipermetrina y deltametrina (piretroides del tipo II) eran menos sensibles a la hidrólisis y oxidación catalizadas por esterasas. Generalmente, la principal ruta del metabolismo de los piretroides del tipo II en mamíferos es vía desesterificación catalizada por las oxidasas microsomales (Crawford y Hutson, 1977).

Los estudios en insectos también concluyen que la rotura del enlace éster se debe principalmente a un mecanismo oxidativo (Casida y Ruza, 1980; Funaki et al., 1994). Así, este último estudio demostraba que la desesterificación del fenvalerato por moscas resistentes se debía principalmente a la sobreexpresión de las P450; sólo una pequeña proporción de la rotura del enlace éster era causado por hidrolasas. No obstante, que el ataque al éster sea hidrolítico u oxidativo parece que depende en gran medida de la especie. Por ejemplo, *T. ni*, *S. littoralis*, *S. eridana* (Lepidoptera), y *B. tabaci* (Hemiptera) degradan a los piretroides trans vía un mecanismo hidrolítico, mientras que la mosca doméstica común (Diptera) y el gorgojo castaño de la harina, *Tribolium castaneum* (Coleoptera) emplean la vía oxidativa. Un caso especial es el del insecto *Chrysoperla carnea* agg. (Neuroptera), altamente resistente a piretroides. Este insecto contiene elevados niveles de una esterasa que es capaz de catalizar la hidrólisis de los isómeros cis, incluyendo aquellos piretroides del tipo II como la cipermetrina (Khambay y Jewess, 2005).

Cómo la sobreproducción de las esterasas está implicada en la resistencia a piretroides cis, como la deltametrina, siendo pobres sustratos para estas enzimas, ha sido objeto de controversia. Devonshire y Moores (1989) evidenciaron en el áfido *M. persicae*, que los piretroides cis se unían fuertemente al centro activo y eran así secuestrados por la gran cantidad de esterasas (E4 y FE4) asociadas con la resistencia. Es decir, la deltametrina

actuaría como un inhibidor competitivo de la actividad esterasa siendo preferentemente eliminada al unirse a la proteína y no por hidrólisis.

En nuestro trabajo, tanto en *B. germanica* como en las muestras de *F. occidentalis*, los piretroides estudiados (*acrinatrina* y *deltametrina*) eran del tipo II. Y mientras que en *B. germanica* el papel preponderante de las P450 frente a las esterases (Capítulo 4) es claro, en *F. occidentalis* nuestros resultados con las esterases (niveles de correlación alrededor de 0,5) no descartarían un destacado papel de estas enzimas en la resistencia a piretroides en esta especie, sin embargo, es necesario confirmar este extremo. En este sentido, nuestro laboratorio está haciendo avances en la puesta a punto de los ensayos para la medida de la actividad P450 en *F. occidentalis*.

En cuanto al sistema GST, aunque es importante en la desintoxicación de insecticidas organofosforados y otros compuestos electrófilos, no ocurre lo mismo para los piretroides. Estos compuestos no son electrófilos y, por tanto, no parece que vayan a ser biotransformados por este mecanismo. Parece que nuestros resultados en *B. germanica* se situarían en este camino. Sin embargo, en experimentos realizados por nuestro laboratorio en *F. occidentalis*, sí se encontró un incremento de la actividad en poblaciones resistentes. En la literatura aparecen algunos trabajos en los que se correlaciona un incremento en los niveles de las GSTs con la resistencia a piretroides en diferentes especies. Parece que en estos casos las proteínas secuestrarían a los piretroides (Kostaropoulos et al., 2001) o protegerían a los tejidos de la peroxidación lipídica inducida por ellos (Vontas et al., 2001). Nuestro laboratorio continúa los trabajos para ahondar en la naturaleza de la participación de este sistema en la resistencia a piretroides en *F. occidentalis*.

Todos estos resultados confirman que existe un número limitado de mecanismos que confieren resistencia a los insectos. Y aún cuando no concluyen de manera precisa la naturaleza exacta de aquellos implicados en la resistencia de las poblaciones estudiadas, suponen un primer paso en el complejo proceso de identificar, de entre la miríada de enzimas implicadas en el metabolismo de los xenobióticos, a aquellas responsables de la resistencia. Además, proporcionan las claves en base a las que formular posibles estrategias de control. Cabe mencionar, sin embargo, que no hay una única solución válida para tratar con la resistencia; la mejor aproximación es la integración de varias estrategias de control, incluyendo

métodos culturales, físicos y biológicos, junto con un seguimiento regular de los niveles de la resistencia y los mecanismos implicados en la misma.

En este sentido, nuestros resultados, junto con los obtenidos por el Departamento de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena, en poblaciones de *F. occidentalis* de invernaderos del sureste español, evidencian que tras la resistencia detectada subyacen mecanismos de naturaleza metabólica, oxidasas (Espinosa et al., 2005) y esterasas (capítulo 5). Este tipo de mecanismos, como se ha visto, son específicos de una familia de compuestos químicos e, incluso en ocasiones, de un determinado compuesto. Por ello se sugiere la necesidad de emplear estrategias de rotación utilizando compuestos químicos de distintas clases, como por ejemplo el spinosad, para el que, en la resistencia ya detectada, no parece que estén implicados mecanismos de desintoxicación metabólica sino probablemente una modificación de la diana (Bielza et al., 2007a). En esta línea se sitúan las estrategias propuestas por Bielza y Contreras (2005) y Bielza y colaboradores (2007b).

6-2. Bibliografía

Bielza, P.; Contreras, J. La resistencia a insecticidas en *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Phytoma España* 173: 58-62 (2005).

Bielza, P.; Espinosa, P.; Quinto, V.; Abellán, J.; Contreras, J. Synergism studies with binary mixtures of pyrethroid, carbamate and organophosphate insecticides on *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Pest Manag. Sci.* 63: 84-89 (2007a).

Bielza, P.; Quinto, V.; Contreras, J.; Torné, M.; Martín, A. Espinosa, P. J. Resistance to spinosad in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), in greenhouses of south-eastern Spain. *Pest Manag. Sci.* 63: 682-687 (2007b).

Casida, J. E.; Ruzo, L. O. Metabolic chemistry of pyrethroid insecticides. *Pestic. Sci.* 11: 257-269 (1980).

Crawford, M. J.; Hutson, D. H. Metabolism of pyrethroid insecticide (+/-)-alpha-cyano-3-phenoxybenzyl 2,2,3,3-tetramethylcyclopropanecarboxilate, WL 41706, in rat. *Pestic. Sci.* 8: 579-599 (1977).

Devonshire, A. L.; Moores, G. D. Detoxication of insecticides by esterases from *Myzus persicae*- is hydrolysis important?. *En: Enzymes hydrolysing*

organophosphorous compounds. Reiner, E.; Aldridge, W. N. (eds). Ellis Horwood, Chichester, UK. 180-192 (1989).

Espinosa, P. J.; Contreras, J.; Quinto, V.; Grávalos, E. Fernández; E.; Bielza, P. Metabolic mechanisms of insecticide resistance in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Pest. Manag. Sci.* 61: 1009-1015 (2005).

Funaki, E.; Dauterman, W. C.; Motoyama, N. In-vitro and in-vivo metabolism of fenvalerate in pyrethroid-resistant houseflies. *J. Pest. Sci.* 19: 43-52 (1994).

Khambay, B. P. S.; Jewess, P. J. Pyrethroids. En: *Comprehensive Molecular Insect Science*. Gilbert, L. I.; Iatrou, K.; Gill, S. S. (eds.). Elsevier Ltd. Oxford. Vol. 6: 1-29 (2005).

Kostaropoulos, I.; Papadopoulos, A. I.; Metaxakis, A.; Boukouvala, E.; Papadopoulou-Mourkidou, E. Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31: 313-319 (2001).

Soderlund, D. M.; Casida, J. E. Effects of pyrethroid structure on rates of hydrolysis and oxidation by mouse-liver microsomal enzymes. *Pestic. Biochem. Physiol.* 7: 391-401 (1977).

Vontas, J. G.; Small, G. J.; Hemingway, J. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem. J.* 357: 65-72 (2001).

Whalon, M.; Mota-Sanchez, D.; Hollingworth, R. M.; Bills, P.; Duynslager, L. The Data Base of arthropods resistant to pesticides. Michigan State University <http://www.pesticideresistance.org/DB/index.php> accedido el 20 de Agosto de 2007.

Conclusiones

Resumiendo los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, podemos concluir que:

- *Las condiciones óptimas de los ensayos para la medida de las actividades enzimáticas implicadas en la resistencia a los insecticidas, determinadas en la presente Tesis, son características para cada una de las especies analizadas, Blattella germanica y Frankliniella occidentalis, y válidas en cualquier estadio y nivel de tolerancia a los insecticidas.*
- *Los ensayos optimizados presentados en este trabajo permiten la medida en fracciones de insectos individuales, incluso para un insecto tan pequeño como es Frankliniella occidentalis, permitiendo así que en un mismo individuo se realicen diversos análisis bioquímicos a la vez.*
- *Se describe por primera vez en España una población de Blattella germanica altamente resistente a piretroides, identificándose como mecanismos responsables de la resistencia a oxidasas, esterases y posibles modificaciones en la diana.*
- *En dicha población, una presión intensa con el insecticida deltametrina induce a la selección de diferentes mecanismos de resistencia que parecen ser fenotípicamente recesivos.*
- *Las esterases explican parte de la resistencia hallada en poblaciones de Frankliniella occidentalis procedentes del sureste español, y estudiadas en el presente trabajo.*
- *Los niveles de correlación establecidos entre las actividades esterasa y el grado de resistencia a los insecticidas acrinatrina (piretroide) y metiocarb (carbamato) permiten concluir que la resistencia de las poblaciones de Frankliniella occidentalis analizadas no se explica mediante un sólo mecanismo, sino que es polifactorial.*
- *Los ensayos de la actividad esterasa empleados en la presente Tesis en poblaciones de Frankliniella occidentalis,*

permiten poner de manifiesto las diferencias significativas existentes entre las poblaciones resistentes y sensible. Sin embargo, y puesto que no se ve una clara separación entre las distribuciones de frecuencia de ambas poblaciones, se cuestiona la validez de la utilización de esta actividad como posible herramienta de diagnóstico a nivel individual en esta especie.