

Universidad Nacional del Comahue  
Facultad de Ciencias del Ambiente y la Salud

**Efecto de concentraciones subletales de clorpirifós sobre mecanismos de defensa antioxidantes y detoxificantes en adultos de *Cydia pomonella*.**



Autor: Rodriguez Piuque Miguel

Año 2018

Alumno: Rodríguez Piuque Miguel

N° de legajo: 126.473

Directora de tesis: Dra. Montagna Cristina Mónica

Co-directora de tesis: Dra. Parra Morales Laura B.

Fecha de aprobación del plan de tesis: 3 de julio de 2017

## Agradecimientos

A mi directora Mónica, por haberme guiado en esta etapa de mi carrera, haciéndome el camino más fácil con su ayuda, paciencia y conocimiento.

A mi co-directora Laura, por su ayuda y acompañamiento en cada momento, por enseñarme las técnicas con paciencia infinita y por haber aceptado ser mi co-directora en un momento tan especial de su vida.

A Natalia, por brindarme la oportunidad de realizar mi tesis en un laboratorio lleno de excelentes profesionales y principalmente excelentes personas.

A Seba, Vicky, Betsy, Jose, Berta y Maru, por todo el afecto, risas, mates y consejos que compartimos.

A Eli, mi compañera de corazón y mente, por haberme acompañado en todo este trayecto haciendo que los miedos no sean tan grandes, y a su familia, por el apoyo y cariño que me brindaron estos años.

A mi familia, a mi papá y a mi mamá por siempre tener esperanzas en mí, por el amor con el que me formaron, por la paciencia, por los principios que me inculcaron y por nunca soltarme la mano. A mis hermanos Lilén, Antú y Felipe por aguantarme, acompañarme, alentarme, alimentarme, distraerme y brindarme su total apoyo durante toda mi carrera.

## Índice:

<b>Resumen</b>	<b>6</b>
<b>Abstract</b>	<b>7</b>
<b>Glosario</b>	<b>8</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>11</b>
<b>1.1. Plaguicidas</b>	<b>11</b>
1.1.1. Clasificación	11
1.1.2. Insecticidas organofosforados (OFs)	13
1.1.3. Mecanismo de acción	14
<b>1.2. Mecanismos de detoxificación</b>	<b>14</b>
1.2.1. Carboxilesterasas (CarE)	15
1.2.2. Actividad glutatión S-transferasa (GST)	15
1.2.3. Glutatión reducido (GSH)	16
<b>1.3. Exposición a concentraciones subletales</b>	<b>16</b>
<b>1.4. Situación regional</b>	<b>18</b>
<b>2. Hipótesis</b>	<b>21</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>21</b>
<b>3.1. Objetivo general</b>	<b>21</b>
<b>3.2. Objetivos específicos</b>	<b>21</b>
<b>4. Materiales y métodos</b>	<b>23</b>
<b>4.1. Material biológico</b>	<b>23</b>
<b>4.2. Reactivos y buffers</b>	<b>23</b>
4.2.1. Reactivos	23
4.2.2. Buffers	23
<b>4.3. Exposición a concentraciones subletales de clorpirifós</b>	<b>24</b>
<b>4.4. Estudios bioquímicos</b>	<b>24</b>
4.4.1. Preparación de homogenatos	24
4.4.2. Determinación de parámetros bioquímicos	24
4.4.2.1. Determinación de la actividad CarE	24
4.4.2.1.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) para la determinación de isoformas de las carboxilesterasas	25
4.4.2.2. Determinación de actividad GST	25
4.4.2.3. Determinación del contenido de GSH	26
4.4.3. Determinación de la cantidad de proteínas	26
4.4.4. Análisis estadístico	26
<b>5. Resultados</b>	<b>28</b>
<b>5.1. Actividad CarE</b>	<b>28</b>

5.1.1.	Caracterización cualitativa de CarE. Electroforesis en geles nativos de poliacrilamida	28
<b>5.2.</b>	<b>Actividad GST</b>	<b>29</b>
<b>5.3.</b>	<b>Contenido de GSH</b>	<b>30</b>
<b>6.</b>	<b>Discusión</b>	<b>33</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusiones finales</b>	<b>38</b>
<b>8.</b>	<b>Bibliografía utilizada</b>	<b>40</b>

## Figuras

Figura 1:	Representación esquemática de la estructura general de los plaguicidas organofosforados.	13
Figura 2:	Actividad CarE en adultos de <i>C. pomonella</i> expuestos a concentraciones subletales de clorpirifós.	28
Figura 3:	Geles nativos de poliacrilamida de la actividad CarE de homogenatos de <i>C. pomonella</i> .	29
Figura 4:	Actividades GST en adultos de <i>C. pomonella</i> expuestos a concentraciones subletales de clorpirifós.	30
Figura 5:	Contenido de GSH endógeno en adultos de <i>C. pomonella</i> expuestos a concentraciones subletales de clorpirifós.	31

## Tablas

Tabla 1:	Clasificación de los plaguicidas, según la familia química.	12
Tabla 2:	Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad.	12
Tabla 3:	Clasificación de los plaguicidas según su tiempo de vida media.	13

## Resumen

La carpocapsa o gusano de la manzana, *Cydia pomonella* (Linneaus) (Lepidoptera; Tortricidae) es la principal plaga de frutos de pepita, cuyo control involucra diversas familias de insecticidas, entre ellos los organofosforados (OFs).

El estadio blanco de control químico de *C. pomonella* son las larvas neonatas, las cuales coexisten con los adultos al momento de la aplicación de insecticidas. Dado que las concentraciones necesarias para el control de neonatas son muy inferiores al requerido para adultos, estos últimos quedan expuestos a concentraciones subletales. De esta manera, una proporción de individuos resulta estresada por el insecticida pero es capaz de sobrevivir. El estrés producido puede causar un aumento tanto en la tasa de mutaciones como en la actividad del sistema detoxificante, lo cual conduce al desarrollo de resistencia.

Se trabajó con adultos de la especie *C. pomonella* susceptibles a insecticidas, con el objetivo de evaluar la respuesta de algunos mecanismos bioquímicos de defensa en individuos expuestos a 0,01562; 0,0625 y 0,25 mg/L de clorpirifós durante 6 h.

Los resultados indicaron que la actividad promedio de carboxilesterasa (CarE) resultó significativamente mayor en los grupos expuestos durante 6 h a 0,01562 ( $p < 0,05$ ) y 0,0625 ( $p < 0,01$ ) mg/L de clorpirifós con respecto a los controles. La caracterización cualitativa de las CarE obtenida de la corrida electroforética en geles de poliacrilamida mostró la presencia de tres isoformas, con una mayor intensidad en la tinción de EST1. Las isoformas 1 y 2 presentaron una mayor tinción en los individuos expuestos a 0,01562 mg/L; mientras que las 3 isoformas de los individuos expuestos a 0,0625 mg/L mostraron mayor actividad que los controles. A partir de la concentración 0,25 mg/L de clorpirifós, la actividad CarE fue imperceptible en los geles. Las actividades promedio de GST determinadas en los grupos expuestos, no fueron estadísticamente diferentes a las del grupo control ( $p > 0,05$ ). Tampoco el contenido promedio de GSH fue significativamente afectado por la exposición *in vivo*, a ninguna de las concentraciones subletales de clorpirifós respecto de los controles ( $p > 0,05$ ).

En conclusión, los resultados del presente trabajo muestran una rápida respuesta de adultos de *C. pomonella* a la exposición a dosis subletales de clorpirifós través del aumento de actividad de CarE. Por otro lado, no se observaron modificaciones en los componentes sistema antioxidante evaluados a este tiempo de exposición.

Palabras Claves: Clorpirifós; efectos subletales; carboxilesterasa; sistema antioxidante; *Cydia pomonella*.

## Abstract

The codling moth, *Cydia pomonella* (Linneaus) (Lepidoptera, Tortricidae) is a key pest of pome fruit which is controlled by several families of insecticides, including organophosphates insecticides (OPs).

The control program of codling moth is intended to neonate larvae. However, adults may be subjected to sublethal pesticide concentrations because they coexist all together at the application time. Thereby, a proportion of individuals is stressed by the insecticide, but is able to survive. Moreover, the stress caused by the pesticide might enhance both the mutation rates and the activity of the detoxification system, which might lead to pesticide resistance.

The study was carried out with susceptible adults from *C. pomonella*, with the objective of evaluate the response of some biochemical mechanisms of defense of exposed individuals to 0,01562; 0,0625 y 0,25 mg/L of chlorpyrifos during 6 h.

The results showed that mean carboxylesterase activity (CarE) was significantly higher in the groups exposed during 6 h to 0.01562 ( $p < 0.05$ ) and 0.0625 ( $p < 0.01$ ) mg/L of chlorpyrifos concentrations respect to the controls. The use of polyacrylamide gels for qualitative CarE characterization showed the presence of three isoforms, with a greater stain intensity of EST1. Isoforms 1 and 2 showed a greater staining after exposure at 0.01562 mg/L of chlorpyrifos. On the other hand, all 3 isoforms showed greater activity after exposure at 0.0625 mg/L respect to the controls. Moreover, none of CarE isoforms were observed at 0.25 mg/L of chlorpyrifos. The mean GST activities in the exposed groups were not statistically different than the control ( $p > 0.05$ ). Also, the mean GSH content was not significantly affected by the *in vivo* exposure to any sublethal concentrations of chlorpyrifos respect to the control ( $p > 0.05$ ).

In conclusion, the results from the current study showed a quick response of *C. pomonella* adults to sublethal chlorpyrifos exposure through the increase of CarE activity. On the other hand, no modifications were observed in the antioxidant system under the conditions of the chlorpyrifos exposure.

Key words: Chlorpyrifos; sublethal effects; carboxylesterase; antioxidant system; *Cydia pomonella*.

## Glosario

**AChE:** acetilcolinesterasa.

**Amplificación génica:** aumento en el número de copias de un gen.

**ANOVA:** análisis de la varianza.

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero.

**Bioactivación:** conversión metabólica de un xenobiótico a un derivado más tóxico que el compuesto parental.

**Biotransformación:** Transformación metabólica que modifica una sustancia química con el fin de disminuir su toxicidad o eliminarla del organismo.

**CarE:** carboxilesterasas.

**CBs:** carbamatos.

**Concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>):** es la concentración del agente que mata al 50% de la población bajo determinadas condiciones de exposición.

**Concentración subletal:** concentración que no induce una mortalidad estadísticamente significativa en una población experimental.

**Detoxificación:** proceso mediante el cual se neutralizan, atenúan o eliminan sustancias tóxicas para el organismo.

**Efecto subletal:** efectos fisiológicos o de comportamiento de los individuos que sobreviven a la exposición de un tóxico (por ej. plaguicidas).

**Electrófilo:** reactivo químico atraído hacia zonas ricas en electrones que participa en una reacción química aceptando un par de electrones formando un enlace covalente.

**EROs:** especies reactivas de oxígeno.

**Estrés oxidativo:** desequilibrio entre la producción de EROs y la capacidad del sistema biológico para detoxificar rápidamente estas especies.

**FAO:** Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

**GR:** glutatión reductasa.

**GSH:** glutatión reducido.

**GSSG:** glutatión oxidado.

**GST:** glutatión S-transferasa.

**Inhibición enzimática:** proceso en el cual moléculas diferentes del sustrato pueden unirse a la enzima reduciendo total o parcialmente su actividad.

**INTA:** Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

**Isoenzimas:** son isoformas de una enzima. Las isoformas pueden diferir en su actividad biológica, propiedades regulatorias, expresión temporal y espacial y localización intracelular.

**Mutación:** cambios o modificaciones en la secuencia de nucleótidos del ADN, debido a deleciones o inserciones de pequeños fragmentos, o por sustitución de pares de bases.

**Neurotransmisor:** sustancia liberada durante la sinapsis por la llegada de un impulso nervioso, que al traspasar el espacio sináptico permite la transmisión química del impulso nervioso entre neuronas contiguas o entre una neurona y un músculo u otro órgano.

**Nucleófilo:** especie que reacciona cediendo un par de electrones libres a otra especie, enlazándose covalentemente con ella.

**OCl:** organoclorados.

**OF:** organofosforados.

**Plaga:** cualquier especie, raza o biotipo vegetal o animal o agente patógeno dañino para las plantas o productos vegetales.

**Sinapsis nerviosa:** mecanismo de comunicación químico-eléctrico entre dos o más neuronas, con el fin de transmitir un impulso nervioso destinado a coordinar una función en el organismo, este intercambio de información se caracteriza por no establecer contacto físico.

**Sistemas bioquímicos de defensa:** mecanismos tendientes a disminuir la toxicidad de los xenobióticos mediante reacciones de óxido-reducción, conjugación e hidrólisis.

**Toxicidad:** capacidad intrínseca de una sustancia de producir daño.

**Transcripción genética:** Es el primer paso de la expresión genética, en el cual un segmento de ADN es copiado a ARN (ARNm).

**Xenobiótico:** sustancia que no ha sido producida por la biota.

# **Introducción**

## 1. Introducción

La producción de frutas pomáceas en Argentina fue durante el año 2015 de 1,8 millones de toneladas, distribuidas casi en partes iguales entre manzana y pera (Ministerio de Hacienda y Finanzas Públicas 2016). El 85% de la producción de manzana y el 75% de pera del país, se concentra en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén, y en el Valle Medio de Río Negro (Ministerio de Hacienda y Finanzas Públicas 2016).

Considerando que la fruticultura de esta región se desarrolló en un marco fuertemente orientado a la exportación, las estrategias en el control de plagas están condicionadas por las exigencias de los mercados compradores (Sanchez & Villareal 2010). La carpocapsa o gusano de la manzana, *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Lepidoptera; Tortricidae) es la principal plaga de los cultivos de manzanos y perales y constituye el mayor problema debido a los niveles de daño que provoca en las frutas. Por lo que la aplicación de insecticidas, entre ellos los organofosforados (OFs), es una práctica común en el control de plagas de dichos frutales (Cichón, Rossini & Garrido 2013).

### 1.1. Plaguicidas

La FAO (2003) define a los plaguicidas como “sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de animales, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren de alguna otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos”. Son utilizados para controlar plagas antes de que estas causen daños, y deben ser efectivos sin perjudicar a los humanos o a los cultivos (Casida 2009).

#### 1.1.1. Clasificación

Los plaguicidas pueden clasificarse en función de algunas de sus características principales, como la toxicidad, tiempo de vida media, estructura química, uso o mecanismo y sitio de acción. También se clasifican según el organismo a combatir como insecticidas, herbicidas, funguicidas, rodenticidas, etc. La clasificación según la familia química cobra importancia desde el punto de vista toxicológico, ya que los plaguicidas pertenecientes a un mismo grupo químico producen efectos similares. Se han definido algunas familias químicas que engloban gran parte de los insecticidas utilizados en la actualidad (Tabla 1) (IRAC 2016).

**Tabla 1:** Clasificación de los plaguicidas, según la familia química.

Familia química	Ejemplos
Organoclorados	DDT, aldrín, endrín.
Organofosforados	Clorpirifós, metil azinfós, malatión.
Carbamatos	Carbaril, propoxur.
Piretroides	Cipermetrina, fenvalerato.
Neonicotinoides	Tiaclopid, acetamiprid.
Fenilpirazoles	Fipronil.
Espinosinas	Spinosad
Benzoilureas	Diflubenzurón, flufenoxurón, lufenurón, teflubenzurón, triflumurón
Fosfinas	Fosfuro de aluminio, fosfuro de magnesio
Derivados de los ácidos tetrónico y tetrámico	Spirodiclofén, spiromesifén
Diamidas	Clorantraniliprol, flubendiamida
Diacilhidracinas	Metoxifenocide, tebufenocide

En 1978, la Organización Mundial de la Salud estableció una clasificación basada en su peligrosidad o grado de toxicidad aguda (Tabla 2), definida ésta como la capacidad del plaguicida de producir un daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un período de tiempo relativamente corto.

**Tabla 2:** Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad.

Clase	Toxicidad	DL <sub>50</sub> * (mg/Kg) en rata	Ejemplos
IA	Extremadamente peligrosos	< 5 oral, < 50 dermal	Paratión, dieldrín
IB	Altamente peligrosos	5 - 50 oral, 50 - 200 dermal	Aldrín, diclorvós
II	Moderadamente peligrosos	50 - 2000 oral, 200 - 2000 dermal	DDT, clordano
III	Ligeramente peligrosos	> 2000 oral, > 2000 dermal	Malatión

\* DL<sub>50</sub> es la estimación estadística de la cantidad de una sustancia tóxica (mg/kg) por peso corporal, necesaria para observar un efecto mortal en el 50% de animales de experimentación en los que se ensaya el efecto letal de la sustancia, administrándola por vía oral o dérmica, durante un período de tiempo determinado y seguimiento en un período postexposición. Fuente: Ramírez & Lacasaña 2001; Ventura 2014.

Por otra parte, de acuerdo a su tiempo de vida media, los plaguicidas se clasifican en: permanentes, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes (Tabla 3) (Ramírez y Lacasaña 2001).

**Tabla 3:** Clasificación de los plaguicidas según su tiempo de vida media.

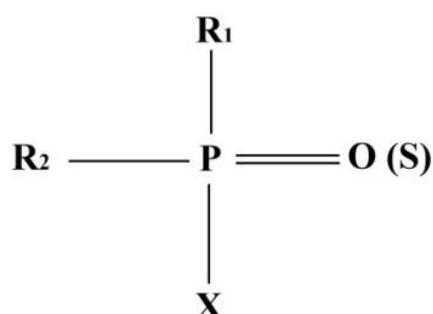
Persistencia <sup>a</sup>	Tiempo de Vida Media <sup>b</sup>	Ejemplos
No persistente	De días hasta 12 semanas	Malatión, diazinón, carbarilo, diametrín
Moderadamente persistentes	De 1 a 18 meses	Paratión, lannate
Persistente	De varios meses hasta 20 años	DDT, aldrín, dieldrín
Permanente	Indefinidamente	Productos hechos a partir de mercurio, plomo, arsénico

a) Capacidad de una sustancia o un compuesto de permanecer en un sustrato del ambiente en particular, después de que ha cumplido el objetivo para el cual se aplicó. b) Lapso de tiempo necesario para que la concentración del compuesto o mezcla aplicada disminuya a la mitad. Fuente: Ramírez & Lacasaña 2001

### 1.1.2. Insecticidas organofosforados (OFs)

A pesar de que algunos componentes OFs fueron sintetizados en el siglo XIX, no se desarrollaron como insecticidas sino hasta principios de la década de 1940 (Costa 2006). Los plaguicidas OFs son compuestos derivados del ácido fosfórico, usados extensivamente para el control de plagas en la agricultura y los hogares. Estos compuestos comprenden un grupo muy diverso de estructuras químicas con diferentes propiedades fisicoquímicas y toxicidad (Anguiano et al. 2011). Presentan características como la menor persistencia en el ambiente y la baja acumulación en los tejidos biológicos, que los hacen de preferencia frente a los insecticidas organoclorados (OCIs). Sin embargo, una desventaja de estos compuestos es su toxicidad, relativamente alta para los vertebrados y seres humanos (Ventura 2014).

La estructura general de los OFs puede ser representada como se muestra en la Figura 1:



**Figura 1:** Representación esquemática de la estructura general de los plaguicidas organofosforados.

La X representa el grupo saliente, el cual es desplazado cuando el OF fosforila a la enzima acetilcolinesterasa (AChE), R1 y R2 son generalmente grupos alcoxi, aunque pueden ser también otros grupos, y un átomo enlazado con un doble enlace al átomo de fósforo, el cual puede ser de oxígeno o de azufre. Para los compuestos que contienen un átomo de azufre enlazado al fósforo, es necesaria una bioactivación metabólica, para

que su principal actividad biológica se manifieste, ya que solo los compuestos OFs que contienen un doble enlace con un oxígeno son inhibidores eficaces de la AChE. Esta bioactivación consiste en una desulfuración oxidativa mediada por enzimas del citocromo P450 (CYP450), el cual conduce a la formación de un "oxón" en el insecticida parental (Costa 2006).

### 1.1.3. Mecanismo de acción

El principal mecanismo de acción de los OFs es la inhibición de la enzima AChE, una esterasa tipo B la cual es irreversiblemente inhibida por los OFs, cuya función principal es hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina (ACh) en las sinapsis nerviosas colinérgicas, interrumpiendo de esa manera la transmisión de impulsos nerviosos en la membrana postsináptica (Costa 2006). La unión en forma covalente del OF con el sitio activo de la enzima es mucho más estable que el enlace formado con la ACh. Dicha unión inhibe totalmente la enzima, provocando una acumulación excesiva de ACh en las uniones colinérgicas, causando la estimulación sostenida de los órganos efectores colinérgicos (Fukuto 1990; Costa 2006).

Otro blanco de acción de los OFs es la enzima carboxilesterasa (CarE), que cumple funciones fisiológicas como la degradación de neurotransmisores y el metabolismo de hormonas y feromonas específicas, desempeñando un papel fundamental en el desarrollo y el comportamiento de los insectos (Oakeshott et al. 1999). La inhibición de las CarE mediante unión covalente con los OFs no ha sido relacionada con algún efecto fisiológico particular, pero dado que los detoxifican estequiométricamente, reducen la cantidad de estos compuestos disponibles para inhibir a la AChE (Fukuto 1990). Por lo tanto, la inhibición de las CarE puede ser una importante vía de detoxificación para los OFs (Dettbarn et al. 1999).

## 1.2. Mecanismos de detoxificación

La biotransformación de los xenobióticos ocurre en dos etapas. Una fase inicial donde se inserta un grupo funcional a la molécula exógena, aumentando la hidrofiliidad, lo cual facilita su excreción. En la segunda fase, se conjuga un constituyente polar al grupo funcional producido durante la primera fase o a la molécula original. La primera fase involucra principalmente oxidaciones a través del CYP450 y las CarE, mientras que en la segunda fase la familia de las glutatión S-transferasas (GST) son el principal grupo de enzimas involucradas (Joseph et al. 2005). En general, la detoxificación de xenobióticos y la respuesta al estrés incluye tres principales vías interrelacionadas: óxido-reducción, conjugación e hidrólisis. Las reacciones de óxido-reducción son la principal vía de detoxificación de los insecticidas. Catalizadas en su mayoría por el CYP450, estas reacciones pueden producir EROs y otros metabolitos intermedios. Estos

metabolitos pueden ser detoxificados mediante conjugación, donde componentes endógenos como el glutatión (GSH) son transferidos para facilitar su excreción de la célula. También, la detoxificación puede ocurrir a través de la hidrólisis mediante enzimas como las CarE (Xu et al. 2013).

Además, Para minimizar los daños celulares producidos por las EROs, los organismos han desarrollado un complejo sistema antioxidante que, de acuerdo a su naturaleza, se divide en sistema de detoxificación enzimática y no enzimática. En este primer grupo se incluyen las enzimas GST, superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APOX) entre otras. Mientras que el sistema antioxidante no enzimático se encuentra compuesto por el GSH, los carotenoides, el tocoferol y el ácido ascórbico (Felton & Summers 1995).

### 1.2.1. Carboxilesterasas (CarE)

Como se mencionó anteriormente, las enzimas CarE cumplen múltiples funciones y desempeñan un papel fundamental en el desarrollo y en el comportamiento de los insectos. También participan del proceso de detoxificación de numerosos plaguicidas que poseen ésteres carboxílicos, entre ellos, carbamatos (CBs) y piretroides. Además, proporcionan protección contra la toxicidad de los OFs y los CBs al actuar como sitios de fosforilación/carbamilación estequiométricos alternativos, reduciendo la biodisponibilidad de estas moléculas (Dettbarn et al. 1999).

Como componente del sistema de detoxificación de xenobióticos en los insectos, las CarE están frecuentemente implicadas en la resistencia a los OFs, CBs y piretroides por cambios cualitativos o cuantitativos de las enzimas, o una combinación de estos mecanismos. La sobreexpresión de CarE, como una respuesta evolutiva a la presión de selección de los insecticidas OFs y CBs, se documentó en numerosas especies de artrópodos (Hemingway et al. 2004). La causa predominante del incremento en la síntesis de la enzima es la amplificación del gen o genes dentro del genoma (Vaughan y Hemingway 1995). La amplificación génica y la regulación positiva transcripcional de las CarE, solas o combinadas, suelen ser la principal causa de sobreproducción de esta enzima en insectos y ácaros resistentes a OFs y CBs (Vontas et al. 2007; Pan et al. 2009).

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

Las glutatión S-transferasas (GST) son una superfamilia de enzimas que se encuentran tanto en organismos procariontas como eucariotas. Son multifuncionales y catalizan las conjugaciones de GSH con un amplio espectro de compuestos electrófilos (Habig et al. 1974). Generalmente su principal función es la detoxificación, tanto de compuestos

endógenos como xenobióticos, ya sea directamente o catalizando los metabolitos secundarios de los compuestos oxidados por la familia de las CYPs (Hemingway et al. 2004). También participan en la reducción de hidroperóxidos (ROOH), pero no del peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), cumpliendo un importante rol contra el estrés oxidativo (Mannervik et al. 1985). Además, Catalizan el ataque nucleofílico del GSH en los centros electrofílicos de los xenobióticos, incluyendo insecticidas, metabolitos secundarios de plantas e hidroperóxidos orgánicos (Ranson & Hemingway 2005).

Según su distribución dentro de la célula, las GST se dividen en tres categorías: citosólicas, microsomales y mitocondriales. En los insectos, solo se conocen citosólicas y microsomales (Shi et al. 2012). Las GST citosólicas de los insectos se pueden clasificar en seis clases principales. Entre ellas,  $\sigma$ ,  $\Omega$ , Z, y  $\theta$  tienen representantes en todos los metazoarios; mientras que  $\delta$  y  $\epsilon$  son específicas de los insectos (Hemingway et al. 2004). De acuerdo a la comparación de secuencias de aminoácidos, se agrupan en las clases I y II. Mientras que algunos miembros de una misma clase muestran un alto grado de similitud ( $> 90\%$ ), otros pueden compartir menos de un 40%. La clase I de GST de insectos parece estar más cerca de las GST de la clase  $\theta$  de mamíferos, mientras que la clase II de GST está más cerca de las GST de clase  $\sigma$  (Feng et al. 1999). La primera GST de clase  $\theta$  fue reportada para la mosca *Lucilia cuprina* (Wilce et al. 1995).

### 1.2.3. Glutati3n reducido (GSH)

Constituido por los aminoácidos cisteína, glutamato y glicina, el GSH es uno de los tioles de bajo peso molecular más abundante entre los seres vivos. El GSH presenta un grupo tiol reactivo que cumple un rol importante en los procesos de detoxificación. Esta molécula interactúa con los radicales libres y compuestos oxidantes como  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $HO^\bullet$  y radicales de carbono, interviniendo en la protección contra el daño de los peróxidos lipídicos (Felton & Summers 1995; Krishnan et al. 2009). En presencia de radicales, la forma reducida de GSH se oxida a GSSG y puede ser reciclada en una reacción dependiente de NADPH catalizada por glutati3n reductasa (GR) o por el sistema tiorredoxina reductasa (Kanzok 2001). Además de mantener un entorno intracelular reductor (Meister 1992), el GSH está implicado en muchos procesos incluyendo la síntesis de ADN y de proteínas, el transporte, la actividad enzimática y la conjugaci3n de xenobióticos (Meister & Anderson 1983) y mantiene al ascorbato, tocoferoles y otros agentes reductores en su estado reducido (Felton & Summers 1995).

## 1.3. Exposici3n a concentraciones subletales

Cuando se aplica un insecticida sobre una poblaci3n de insectos plaga, el estadio fisiol3gico de los individuos que la componen puede ser heterogéneo y la dosis que es letal para algunos puede resultar subletal para otros (Gressel 2011). Por lo tanto, una

proporción de individuos resulta estresada por el insecticida, pero es capaz de sobrevivir. Además, la capacidad de detoxificación puede variar en los diferentes estadios de la especie, lo que implica una variación en la susceptibilidad a los insecticidas a lo largo del ciclo de vida (Terriere & Yu 1974; Bouvier et al. 2002). Por otra parte, diversos factores como la deriva, la volatilización y la degradación de plaguicidas, pueden contribuir a que los insectos estén expuestos a dosis subletales de insecticidas y por lo tanto sobrevivan (Cutler 2013).

La mayoría de los estudios sobre los efectos subletales de los insecticidas en los insectos se refieren a modificaciones que afectan negativamente la fisiología o el comportamiento: disminución de la fecundidad o la fertilidad, retardo en el desarrollo, reducción de la longevidad, etc. (Desneux et al. 2007). Aunque recibieron menor atención, también se reportaron efectos estimulatorios ocasionados por bajas dosis de insecticidas. Este fenómeno, llamado hormesis, ocurre como consecuencia del comportamiento bifásico de algunas sustancias: en bajas concentraciones producen efectos benéficos, mientras que en altas dosis causan efectos perjudiciales (Cutler 2013). La hormesis ha sido señalada como la causa subyacente del resurgimiento de plagas y la aparición de plagas secundarias (Guedes et al. 2009). Además, las exposiciones subletales a plaguicidas pueden ocasionar estrés oxidativo, produciendo un aumento tanto en la tasa de mutaciones como en la actividad del sistema detoxificante, lo cual podría conducir al desarrollo de resistencia (Gressel 2011).

La resistencia es una “disminución de origen genético en la susceptibilidad a un plaguicida” (Tabashnik et al. 2014). También puede ser definido como “un cambio heredable en la sensibilidad de la población plaga que se refleja en repetidas fallas de control de un producto, que fue usado de acuerdo con lo recomendado para esa especie” (IRAC 2016). Dos de los principales mecanismos de resistencia a insecticidas en los insectos son: (I) mutaciones que modifican los sitios de acción, disminuyendo la afinidad que por ellos presentan los insecticidas, (II) modificaciones metabólicas que aumentan la actividad de enzimas detoxificantes, lo cual incrementa la tasa de biotransformación de los insecticidas (Ranson et al. 2011).

Como componentes del sistema de detoxificación de xenobióticos en los insectos, las CarE están frecuentemente implicadas en la resistencia a los OFs, por cambios cualitativos o cuantitativos de las enzimas, o por una combinación de ambos. Una mayor actividad de la familia de enzimas glutatión S-transferasas (GST) se asoció con resistencia a OFs, DDT y piretroides (Tang y Tu 1994; Vontas et al. 2001; Wei et al. 2001). Dicha sobreexpresión se encuentra relacionada con mutaciones en elementos reguladores que aumentan los niveles de transcripción (Grant & Hammock 1992).

#### 1.4. Situación regional

El Alto Valle de Río Negro y Neuquén es una zona productora de peras y manzanas por excelencia donde la fruticultura es una de las actividades más importantes con capacidad de abastecimiento tanto del mercado interno como del internacional. La producción frutícola ha contribuido en buena medida al desarrollo y fortalecimiento social, económico y productivo regional. Una de las mayores preocupaciones de esta actividad económica, se centró históricamente en las dificultades para lograr un efectivo control de carpocapsa (*C. pomonella*), principal plaga del manzano, peral, nogal y membrillero. Este insecto produce daños irreversibles sobre la fruta, provocando pérdidas directas sobre la economía regional (cantidad y calidad de fruta, incremento de costos para su control, etc.) y limitaciones para el acceso a nuevos mercados (SENASA 2017). Para el control de esta y otras plagas de la región se utilizan distintas estrategias, dentro de las cuales el control químico forma una parte fundamental del control de las mismas. Para lograr estrategias de control que permitan lograr calidad de exportación, además de mantener la sustentabilidad productiva y ambiental, es necesario conocer y estudiar posibles cambios en las poblaciones de insectos que puedan afectar la sanidad de la fruta.

El estadio blanco de control químico de *C. pomonella* son las larvas neonatas, las cuales coexisten con los adultos al momento de la aplicación de insecticidas. Dado que las concentraciones necesarias para el control de neonatas son muy inferiores al requerido para adultos, estos últimos quedan expuestos a concentraciones subletales.

Estudios previos con larvas diapausantes de *C. pomonella* recolectadas entre 2003 y 2005 en chacras de la región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén con historial de control químico, mostraron menor susceptibilidad al tratamiento con una dosis discriminante de metil azinfós, en comparación con larvas de una cepa susceptible de laboratorio (CSL) (Soleño et al. 2008). En dicho estudio, las poblaciones con mayor tolerancia al OF mostraron una correlación positiva con la actividad de las esterasas y una pobre correlación con la actividad GST.

Por otro lado, numerosas poblaciones de carpocapsa procedentes de localidades situadas en un amplio rango geográfico de esta región mostraron grados de resistencia (GR) superiores a dos, con un GR máximo de 11 (Soleño et al. 2012). La mayoría de las poblaciones con los menores niveles de resistencia fueron colectadas en chacras localizadas en los extremos geográficos del valle productivo (El Chañar, Conesa y Río Colorado). Tanto las CarE como el CYP450 fueron significativa y positivamente correlacionados con las concentraciones letales 50 (CL<sub>50</sub>).

Recientemente, Parra Morales (2017) realizó la exposición *in vivo* de adultos durante 24 h a concentraciones subletales de clorpirifós y observó un aumento significativo en la actividad CarE de los adultos de la CSL tratados con 0,0625 y 0,25 mg/L de clorpirifós, aproximándose a las actividades de las poblaciones de campo expuestas a estas

concentraciones. Se ha citado que las CarE protegen a la enzima AChE, dado que actúan como sitios de fosforilación alternativos para los insecticidas OFs (Jokanović 2001).

# **Hipótesis y Objetivos**

## 2. Hipótesis

La exposición de adultos de *C. pomonella* a concentraciones subletales de plaguicidas durante un corto período de tiempo produce modificaciones en los sistemas bioquímicos de defensa.

## 3. Objetivos

### 3.1. Objetivo general

Evaluar la respuesta de mecanismos bioquímicos de defensa en adultos de *Cydia pomonella* expuestos a concentraciones subletales de clorpirifós.

### 3.2. Objetivos específicos

1. Evaluar a nivel cuantitativo la respuesta de CarE en adultos de *C. pomonella* luego de la exposición durante 6 horas a 3 concentraciones subletales de clorpirifós.
2. Determinar la respuesta de las diferentes isoformas de CarE en adultos de *C. pomonella* luego de la exposición durante 6 horas a 3 concentraciones subletales de clorpirifós.
3. Determinar la actividad de componentes del sistema antioxidante (actividad GST y contenido de GSH) en adultos de *C. pomonella* luego de la exposición durante 6 horas a 3 concentraciones subletales de clorpirifós.

# **Materiales y Métodos**

## 4. Materiales y métodos

### 4.1. Material biológico

Se trabajó con adultos de la especie *C. pomonella*. Los individuos de una cepa susceptible a insecticidas usada como referencia (CSL) fueron provistos por el insectario del INTA Alto Valle. Esta cepa fue establecida en junio de 1991, a partir de 7.000-8.000 larvas diapausantes recolectadas en una chacra de manzanos abandonada. Desde entonces, la cría se mantuvo en condiciones controladas de temperatura (25 °C), fotoperiodo (16:8 h L:O) y 70% de humedad relativa, siempre en ausencia de plaguicidas. Ocasionalmente se introducen en la cría individuos provenientes de montes frutales abandonados u orgánicos para disminuir la endogamia.

### 4.2. Reactivos y buffers

#### 4.2.1. Reactivos

El OF clorpirifós (99,08% de pureza) se compró en AccuStandard Inc., (New Haven, CT, USA). El  $\alpha$ -naftil acetato ( $\alpha$ -NA),  $\alpha$ -naftol ( $\alpha$ -N), Fast Garnet GBC, Tritón X-100, dibromuro de 1,5-bis(4-allildimetilamoniofenil)pentano-3-1 (BW284C5), el tetrametil etilén diamina (TEMED) y albúmina de suero bovina fueron comprados a Sigma-Aldrich, Argentina S.A. (Buenos Aires). La solución Folin Ciocalteu fue provista por Anedra, Argentina (Buenos Aires).

#### 4.2.2. Buffers

- A) Buffer de fosfato de potasio (143 mM), EDTA 6,3 mM; pH 7,5.
- B) Buffer de fosfato de sodio (0,1 M); pH 6,5 + Triton 0,5%.
- C) Buffer de muestra Tris HCl 0,5 M, glicerol y de azul de bromofenol al 1%; pH 6,8.
- D) Buffer de Tris HCl (0,025 M) y glicina (192 mM); pH 8,8.
- E) Buffer de fosfato de sodio (0,05 M), con Fast Garnet GBC (0,5 g) y  $\alpha$ - y  $\beta$ -naftil acetato 2% en acetona (2 mL).
- F) Buffer fosfato de Na 0,1M pH 6,5.

### 4.3. Exposición a concentraciones subletales de clorpirifós

Se diluyó en acetona una solución madre de 62,5 mg/L de clorpirifós, hasta obtener concentraciones de 0,01562; 0,0625 y 0,25 mg/L. Se aplicó de manera uniforme un mililitro de solución de plaguicida clorpirifós sobre la superficie interna de un vaso de vidrio (212 mL), incluida la tapa. La aplicación del insecticida en las paredes del vaso se realizó de forma manual. El mililitro de solución insecticida se depositó dentro del vaso. Luego se cerró el recipiente con la correspondiente tapa, se lo colocó de forma horizontal y se lo rotó unos minutos para lograr una cobertura uniforme. Posteriormente se lo dejó secar durante 1 hora a temperatura ambiente para permitir la evaporación completa del solvente (Knight 2010). Los grupos control se colocaron en vasos de vidrio tratados únicamente con 1 mL de acetona. En cada vaso se colocaron diez adultos, de ambos sexos, de 1-2 días de edad. La exposición se realizó durante 6 h a 25 °C y fotoperíodo de 16:8 h (L:O). Estas concentraciones fueron seleccionadas en base a resultados previos de exposición a clorpirifós durante 24 hs.

### 4.4. Estudios bioquímicos

En los estudios bioquímicos se utilizaron individuos no tratados (controles) y expuestos que sobrevivieron a los tratamientos con clorpirifós (incluidos los adultos que presentaban síntomas de intoxicación). Los individuos sobrevivientes de cada concentración fueron suficientes para realizar cinco repeticiones de 4 individuos por muestra. Los 4 individuos de cada muestra fueron almacenados en tubo Eppendorf en ultrafreezer (-80°C).

#### 4.4.1. Preparación de homogenatos

Los tórax y abdómenes de 4 adultos se homogeneizaron en 1.100 µL el buffer (A) con un homogeneizador PRO ultrasónico eléctrico 200. Los homogenatos fueron centrifugados a 1.000 x g durante 10 min a 4°C. Se extrajeron 120 µL del sobrenadante para la determinación del contenido de GSH y 10 µL para determinación de proteínas. El contenido de GSH se determinó de manera inmediata, mientras que el resto del homogenato se recentrifugó a 16.000 x g durante 20 min y el sobrenadante se congeló a -80 °C hasta el momento de determinar las actividades enzimáticas.

#### 4.4.2. Determinación de parámetros bioquímicos

##### 4.4.2.1. Determinación de la actividad CarE

La actividad CarE, se determinó según el procedimiento descrito por Dary et al.

(1990). Este método se basa en la hidrólisis de  $\alpha$ -naftil acetato por la enzima presente en el homogenato, en presencia de Tritón X-100 y un inhibidor específico de acetilcolinesterasa (AChE) (BW284C5). El  $\alpha$ -naftol, producto de la hidrólisis, fue determinado colorimétricamente mediante su reacción con Fast Garnet GBC.

Se tomaron alícuotas de 10  $\mu$ L de cada homogenato, al que se le adicionaron 490  $\mu$ L del buffer (B) para diluirlas. Posteriormente se agregaron 50  $\mu$ L de la muestra diluida y 100  $\mu$ L de una solución que contenía dicho buffer,  $\alpha$ -naftil acetato y BW284C5 en concentraciones finales de 2 mM y 0,002 mM, respectivamente. Luego de la incubación durante 15 minutos a 25 °C se adicionaron 100  $\mu$ L de Fast Garnet en agua destilada, en una concentración final de 1 mM. A los 10 minutos se registraron los valores de absorbancia a 550 nm en un lector de microtitulación. Las lecturas de absorbancia del blanco (50  $\mu$ L de buffer en lugar de la muestra) fueron restadas a los valores de las muestras. La actividad ( $\mu$ moles de  $\alpha$ -naftol hidrolizado/minuto x mg de proteína) se determinó mediante una curva estándar de  $\alpha$ -naftol (2-20 nmoles).

#### 4.4.2.1.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) para la determinación de isoformas de las carboxilesterasas

La separación electroforética de las proteínas se realizó en geles no desnaturizantes de poliacrilamida de acuerdo con la técnica de Davis (1964), utilizando un equipo Mini PROTEAN® para geles verticales de 1,5 mm de espesor. La composición del gel de separación al 7% fue: 2,33 mL de acrilamida/bisacrilamida al 3% p/v, 2,5 mL de Tris HCl 1,5 M (pH 8,8), 200  $\mu$ L de persulfato de amonio al 10% y 12,5  $\mu$ L de TEMED. La composición del gel de concentración al 4% fue: 0,65 mL de acril/bisacrilamida al 3% p/v, 1,25 mL de Tris HCl 1 M (pH 6,7), 50  $\mu$ L de persulfato de amonio al 10% y 5  $\mu$ L de TEMED.

Las muestras se prepararon en tubos eppendorf, que contenían un volumen suficiente de homogenato para una concentración final de 60  $\mu$ g de proteína, y la mitad de dicho volumen de buffer (C). En cada calle del gel se sembraron 20  $\mu$ L de muestra, previa colocación del buffer de electrodos (D), y se aplicó una corriente de 75 V durante 15 minutos para permitir el ingreso en el gel de separación; luego se aplicaron 150 V durante 60 minutos. A continuación, el gel fue incubado por unos minutos con 100 ml de buffer (E). Luego se descartó la solución de sustratos y colorante, se lavó dos veces el gel con agua corriente y se lo conservó en ácido acético.

#### 4.4.2.2. Determinación de actividad GST

La determinación de la actividad GST se basó en la conjugación de GSH y CDNB (Habig et al. 1974). La mezcla de reacción consistió en 930  $\mu$ L del buffer (F), 50  $\mu$ L de

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

#### 4.4.2.3. Determinación del contenido de GSH

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

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

La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Lowry et al. (1951). Se tomaron 15  $\mu$ L de la muestra y se llevó a 200  $\mu$ L con NaOH 0,1 N. Se agregó a cada tubo 1 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% en NaOH 0,1 N con CuSO<sub>4</sub> 0,5%, tartrato de sodio y potasio 1%. Se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se añadió 0,1 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu. Luego de 30 minutos se registró la absorbancia a 750 nm. Para obtener la curva estándar se utilizó albúmina bovina.

#### 4.4.4. Análisis estadístico

Los resultados de las determinaciones enzimáticas se sometieron a las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y de Levene (normalidad y homocedasticidad, respectivamente) para comprobar si reunían las condiciones para realizar el ANOVA. Los resultados que cumplieran estos requisitos se analizaron con ANOVA de una vía, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni.

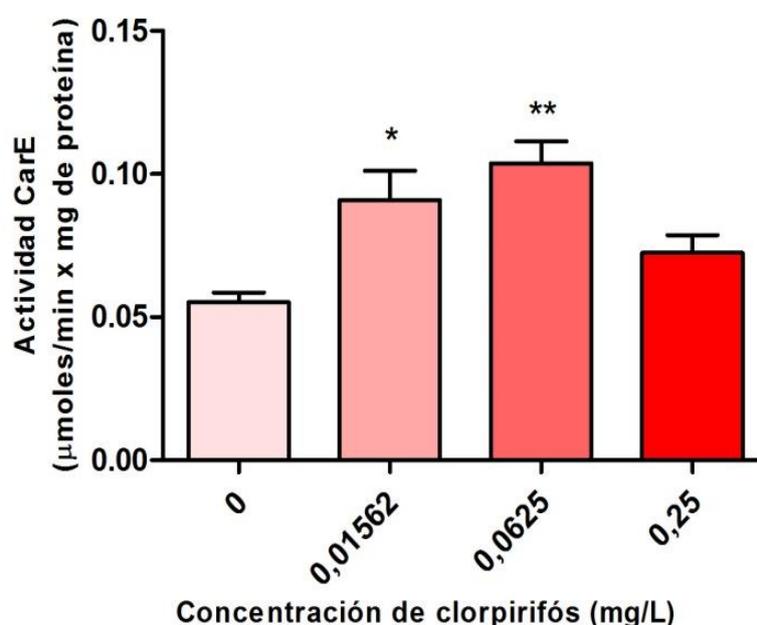
Los análisis se realizaron con los programas estadísticos STATISTICA versión 7 y GraphPad Prism version 4.0 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA.

# Resultados

## 5. Resultados

### 5.1. Actividad CarE

Las actividades CarE determinadas en adultos de *C. pomonella* pertenecientes al grupo control y los tratados con clorpirifós, se muestran en la Figura 2. Las actividades promedio CarE fueron  $0,055 \pm 0,0076$ ;  $0,091 \pm 0,0230$ ;  $0,104 \pm 0,0173$  y  $0,072 \pm 0,0140$   $\mu\text{moles}/\text{min} \times \text{mg}$  de proteína, tanto para los individuos control, como para aquellos expuestos a 0,01562; 0,0625 y 0,25 mg/L de clorpirifós, respectivamente. Las actividades CarE de los adultos expuestos a las concentraciones de 0,01562 y 0,0625 mg/L de clorpirifós fueron significativamente mayores que la del grupo control (ANOVA simple;  $F = 8,337$ ,  $gl = 3-19$ ,  $p = 0,0014$ ). Respecto al control, los aumentos observados correspondieron a un 39,30 y un 46,79% para los individuos expuestos a 0,01562 y 0,0625 mg/L, respectivamente.

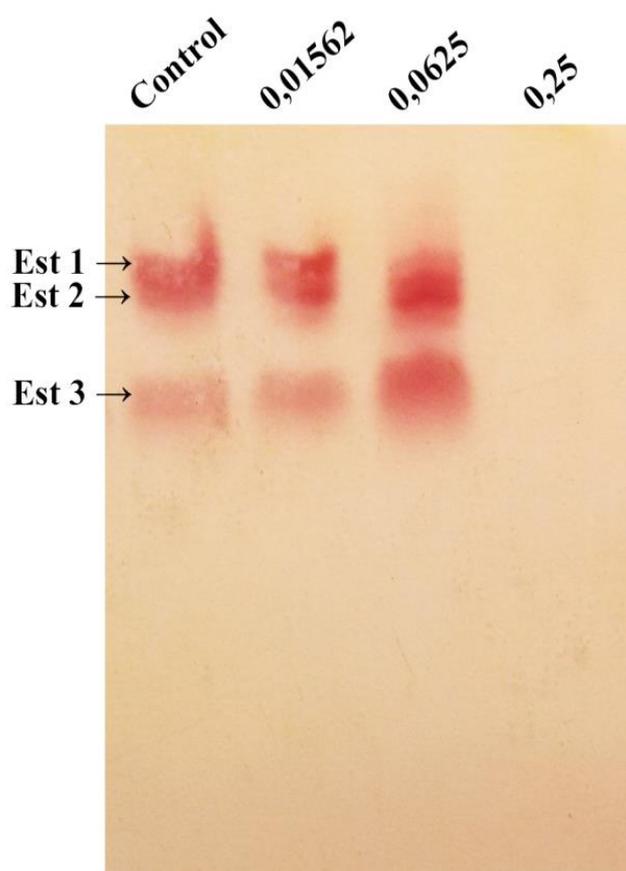


**Figura 2: Actividad CarE en adultos de *C. pomonella* expuestos a concentraciones subletales de clorpirifós.** Cada barra representa los valores de actividad enzimática promedio de cinco réplicas independientes  $\pm$  el error estándar. Las actividades CarE fueron analizadas por ANOVA simple seguido la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Un asterisco (\*) indica diferencias significativas a un 5% ( $p < 0,05$ ), dos asteriscos (\*\*) a un 1% ( $p < 0,01$ ) respecto al control.

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

La corrida electroforética de homogenatos en geles no desnaturalizantes permitió identificar las isoformas de CarE en adultos de *C. pomonella* (Figura 3). En el grupo

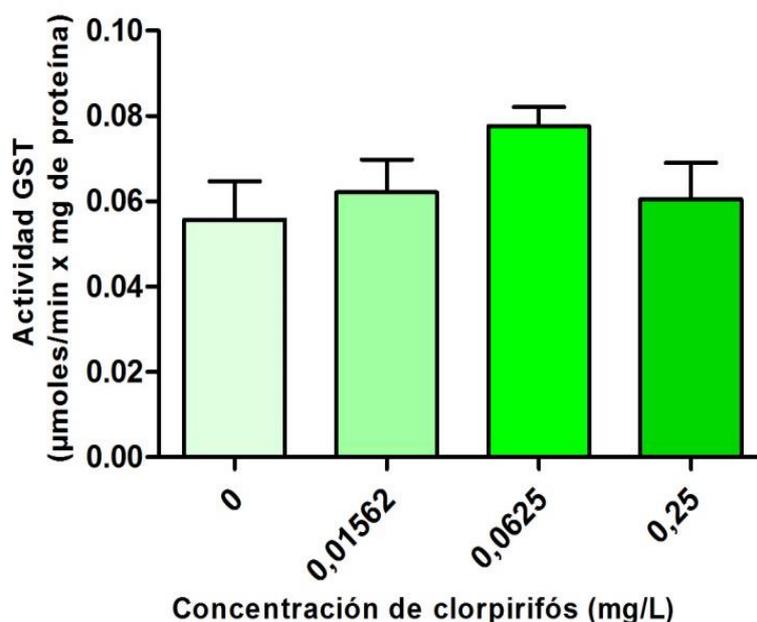
control se detectaron tres isoformas, con una mayor intensidad en la tinción de EST1. Los adultos expuestos a 0,01562 mg/L de clorpirifós mostraron una mayor tinción de las isoformas 1 y 2 con respecto al control. Por otro lado, las tres isoformas de los individuos expuestos a 0,0625 mg/L de clorpirifós mostraron mayor intensidad de tinción que los controles. A partir de la concentración 0,25 mg/L de clorpirifós, la tinción de las isoformas fue imperceptible.



**Figura 3:** Geles nativos de poliacrilamida de la actividad CarE de homogenatos de *C. pomonella*. En cada una de las calles se indica la concentración de exposición a clorpirifós, expresada en mg/L.

## 5.2. Actividad GST

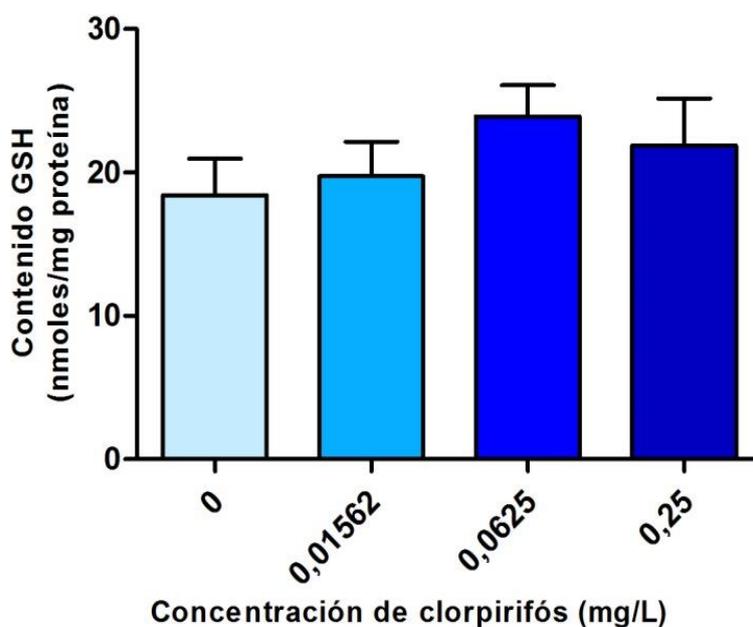
En la Figura 4 se muestra la actividad GST determinada en adultos de *C. pomonella*, del grupo control y expuestos a concentraciones subletales de clorpirifós. La actividad GST promedio para los individuos control y expuestos a 0,01562; 0,0625 y 0,25 mg/L de clorpirifós fueron  $0,056 \pm 0,0202$ ;  $0,062 \pm 0,0172$  y  $0,060 \pm 0,019$   $\mu$ moles de CDNB conjugados/min x mg de proteína, respectivamente. Las diferencias en las actividades GST respecto al control, no fueron estadísticamente significativas para ninguno de los grupos expuestos (ANOVA simple  $F = 1,55$ ,  $gl=3-19$ ,  $p = 0,2411$ ).



**Figura 4: Actividades GST en adultos de *C. pomonella* expuestos a concentraciones subletales de clorpirifós.** Las barras representan el promedio de las actividades GST de cinco réplicas independientes  $\pm$  el error estándar. La comparación de las actividades GST dentro de cada población fue analizada por ANOVA simple seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni.

### 5.3. Contenido de GSH

El contenido promedio de GSH determinado en adultos de *C. pomonella* control y expuestos a concentraciones subletales de clorpirifós se muestra en la Figura 5. Los promedios del contenido de GSH en el grupo control y en los grupos tratados con 0,01562; 0,0625 y 0,25 mg/L de clorpirifós fueron de  $18,40 \pm 5,70$ ;  $19,75 \pm 5,34$ ;  $23,91 \pm 4,86$  y  $21,89 \pm 7,34$  nmoles/mg proteína, respectivamente. Ninguna de las concentraciones de clorpirifós produjo efectos significativos en el contenido de GSH respecto al control (ANOVA simple;  $F = 0,8475$ ,  $gl = 3-19$ ,  $p = 0,4880$ ).



**Figura 5: Contenido de GSH endógeno en adultos de *C. pomonella* expuestos a concentraciones subletales de clorpirifós.** Las barras representan el contenido promedio de cinco réplicas independientes  $\pm$  el error estándar. Las diferencias dentro de cada población fueron analizadas por ANOVA simple seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni.

# Discusión

## 6. Discusión

El estudio de los efectos subletales de los plaguicidas en artrópodos, tanto plagas como benéficos, se basa principalmente en las alteraciones producidas en el comportamiento o en la fisiología, tales como disminución de la fertilidad, retardo en el desarrollo, reducción de la longevidad y perturbación en la movilidad, sin reconocer que dichas alteraciones no conduce necesariamente a un resultado adverso (Desneux et al. 2007; Guedes et al. 2017). También ocurren alteraciones a nivel bioquímico capaces de conducir al desarrollo de resistencia por un aumento en la frecuencia de mutaciones tanto de las moléculas blanco de insecticidas como de las enzimas detoxificantes (Terriere & Yu 1974; Gressel 2011).

Los principales mecanismos de resistencia a insecticidas en los insectos se agrupan en cuatro clases: (I) mutaciones en los sitios de acción, que disminuyen la afinidad de los mismos por los insecticidas, tales como las mutaciones en el receptor GABA, en el canal de sodio o en AChE que le confieren resistencia a ciclodienos, piretroides, OF y CBs, a una amplia variedad de insectos; (II) sobreexpresión de enzimas detoxificantes, que ocurre cuando aumenta la actividad de una o más enzimas, como las CYP450 o CarE, con lo cual se incrementa la tasa de biotransformación o secuestro de los insecticidas; (III) mutaciones que modifican la cutícula, causando un aumento en el grosor y/o una reducción en la permeabilidad de insecticidas lipofílicos, provocando una disminución de la velocidad de ingreso de los insecticidas al organismo y (IV) cambios de origen genético en el comportamiento, que implica cualquier modificación en el comportamiento del insecto, como en la alimentación, el traslado o el hábito de reposo, que evitan el contacto con el insecticida o produce una menor exposición a estos (Liu et al. 2005; Ranson et al. 2011).

Los principales mecanismos de resistencia descritos en *C. pomonella* incluyen resistencia metabólica basada en un aumento o disminución en la expresión o la actividad enzimática de esterasas no específicas, y frecuentemente aumento en la actividad GST y las CYP450 (Reyes et al. 2015; Dar Showket et al. 2017). Por lo que la determinación de la actividad de estas enzimas es un paso importante en el monitoreo de los mecanismos de resistencia a insecticidas a nivel mundial (Montella et al. 2012).

Las enzimas CarE, presentes en animales, plantas y bacterias, cumplen una amplia variedad de funciones fisiológicas, tales como degradación de neurotransmisores, metabolismo de hormonas y feromonas específicas, detoxificación, defensa y comportamiento. En insectos son uno de los principales componentes de la defensa contra xenobióticos incluidos los insecticidas (Cui et al. 2011). En el presente trabajo, la actividad CarE resultó significativamente mayor en los organismos expuestos durante 6 h a 0,01562 y 0,0625 mg/L de clorpirifós con respecto al grupo control. La caracterización cualitativa de las CarE en geles de poliacrilamida también mostró mayor actividad de las tres isoformas, en los individuos expuestos a 0,0625 mg/L. Estudios previos en los individuos de esta población expuestos durante 24 h a 0,0625 mg/L de

clorpirifós no mostraron diferencias significativas en la actividad CarE (Parra Morales 2017), lo que indicaría que la respuesta de estas enzimas al estrés causado por bajas dosis del insecticida ocurre durante las primeras horas de exposición.

El aumento en la actividad CarE en *C. pomonella*, ha sido descrito como uno de los principales mecanismos de resistencia metabólica a plaguicidas (Reyes et al. 2015). Estudios realizados en larvas de la polilla *Plutella xylostella*, mostraron una correlación positiva entre el aumento en la actividad CarE y la resistencia a clorpirifós (Gong et al. 2013). Además, varios autores relacionaron positivamente la actividad de esta enzima con la resistencia a metil azinfós, en poblaciones de carpocapsa de diferentes sectores del Alto Valle de Rio Negro y Neuquén (Anguiano et al. 2008; Soleño et al. 2012). Sin embargo, en un estudio realizado en individuos adultos pertenecientes a una cepa susceptible de laboratorio y poblaciones de campo colectadas en diferentes regiones de Chile; se observó una significativa correlación entre la disminución de la actividad CarE y la resistencia a clorpirifós (Reyes et al. 2015). También, la exposición de larvas susceptibles a 12,5 mg/L de clorpirifós, produjo una disminución de la actividad CarE luego de exposiciones de 12; 24; 36; 48 y 60 h en comparación con los controles (Yang 2016). En el mismo trabajo, se encontró un aumento significativo en la transcripción del gen de la CarE (*CpCE-1*) en individuos expuestos a una dosis subletal de clorpirifós durante 36; 48 y 60 h.

Las GST forman parte de una superfamilia de enzimas presentes tanto en organismos procariontas como eucariotas. Se encuentran involucradas en la detoxificación y en la protección contra el daño oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno, y catalizan las conjugaciones del GSH con un amplio espectro de compuestos electrófilos (Habig et al. 1974; Yan et al. 2013). Además, catalizan reacciones en las cuales el átomo de azufre del GSH, provee electrones para el ataque nucleofílico sobre un sustrato electrofílico. Este último puede corresponder a un sustrato natural endógeno, tal como epóxidos, hiperóxidos orgánicos o compuestos resultantes del metabolismo oxidativo; o puede corresponder a xenobióticos, como los insecticidas (Fournier et al. 1992). La investigación de GST en *C. pomonella* se ha enfocado principalmente en la relación entre la actividad GST y la resistencia a insecticidas (Liu et al. 2014). La exposición de individuos adultos de *C. pomonella* a concentraciones subletales de clorpirifós durante 6 h no mostró efectos significativos en la actividad GST. Si bien se registró aumento en la actividad GST del 28,29% en los individuos expuestos a 0,0625 mg/L, no fue significativamente mayor que la del grupo de control. Existe evidencia que correlaciona el aumento en la actividad GST con la resistencia a OFs en poblaciones de campo de *C. pomonella* en distintas regiones de España (Rodríguez et al. 2011). Estudios realizados en poblaciones de larvas diapausantes de carpocapsa del Valle de Rio Negro y Neuquén mostraron una pobre correlación entre la actividad GST y la resistencia a metil azinfós (Soleño et al. 2008). También se encontró evidencia de que el aumento en la actividad GST se encuentra asociado con la reducción en la mortalidad de larvas post diapausantes expuestas a metil azinfós, ya que podría representar una vía

metabólica de detoxificación alternativa y una posible causa de resistencia cruzada hacia principios activos con diferentes mecanismos de acción (Fuentes-Contreras et al. 2007). En larvas de *C. pomonella* expuestas a 12,5 mg/L de metil clorpirifós, la actividad aumentó significativamente comparada con el control luego de 24 h de exposición, pero disminuyó luego de 48 y 60 h de exposición (Liu et al. 2014). Estudios recientes realizados en individuos adultos de *C. pomonella* expuestos a concentraciones subletales de clorpirifós durante 24 h no mostraron efectos significativos sobre la actividad GST tanto en la cepa susceptible de laboratorio como en las poblaciones de campo (Parra Morales 2017). La actividad de GST tampoco fue modificada en *Oxya chinensis* luego de la exposición de 24 h a CL<sub>10</sub> y CL<sub>50</sub> de clorpirifós (Wu et al. 2011). Por otro lado, la exposición de la langosta *Locusta migratoria* a clorpirifós aumentó el ARNm de algunas clases de GST mientras que disminuyó para otras. Los autores concluyeron que el insecto regula diferencialmente la expresión de las enzimas involucradas en la detoxificación de insecticidas (Qin et al. 2014). Los insecticidas no solo son directamente tóxicos para la célula, sino también inducen estrés oxidativo durante el metabolismo. Algunas GST ( $\sigma$  GST) de insectos tienen actividad glutatión peroxidasa (GPx) y son capaces de remover activamente hidroperóxidos como 4-hidroxi-2-nonenal (Singh et al. 2001). La actividad GPx en insectos ha sido principalmente asociada a las  $\epsilon$  y  $\delta$  GST (Ding et al. 2005).

Uno de los tioles de bajo peso molecular más abundante entre los seres vivos, es el GSH. Constituido por los aminoácidos cisteína, glutamato y glicina, presenta un grupo tiol reactivo que cumple un rol importante en los procesos de detoxificación. Interactúa con los radicales libres y compuestos oxidantes como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, HO<sup>•</sup> y radicales de carbono, interviniendo en la protección contra el daño de los peróxidos lipídicos (Krishnan et al. 2009). En presencia de radicales, la forma reducida de GSH se oxida a GSSG y puede ser reciclada en una reacción dependiente de NADPH catalizada por GR o por los sistemas tioredoxina reductasa (Kanzok 2001). El GSH, además de mantener un entorno intracelular reductor, está implicado en muchos procesos incluyendo la síntesis de ADN y de proteínas, el transporte, la actividad enzimática, el mantenimiento de la membrana celular y la conjugación de xenobióticos para su detoxificación (Meister y Anderson 1983; Richie et al. 1987; Meister 1992). También cumple la función de mantener al ascorbato, tocoferoles y otros agentes reductores en su estado reducido (Felton y Summers 1995). En el presente estudio, el contenido de GSH de *C. pomonella* no fue significativamente afectado por la exposición *in vivo*, a ninguna de las concentraciones subletales de clorpirifós respecto a los controles. Los individuos expuestos a 0,0625 mg/L mostraron un aumento no significativo del 23,06 % en el contenido de GSH respecto de los organismos de control. Estudios similares evidencian un aumento significativo del contenido de GSH a concentraciones de 250 y 500 mg/L de clorpirifós en adultos de una cepa susceptible de laboratorio, pero no indican una clara dependencia entre la variación del contenido de GSH y la concentración del insecticida (Parra Morales 2017). El leve aumento en el contenido de GSH en los individuos expuestos a concentraciones subletales de clorpirifós, sugiere que el GSH es

regenerado a su forma oxidada (GSSG) por la GR, pero su utilización como antioxidante impide un aumento significativo.

# **Conclusiones Finales**

## 7. Conclusiones finales

Los resultados del presente trabajo muestran una rápida respuesta de adultos de *C. pomonella* a la exposición a dosis subletales de clorpirifós través del aumento de la actividad de CarE.

- ✓ La exposición a clorpirifós produjo un aumento en la actividad CarE, la cual fue significativa a 0,01562 y 0,0625 mg/L.
- ✓ Se detectaron tres isoformas de CarE tanto en los individuos control como a las dos concentraciones más bajas.
- ✓ No se registró un aumento significativo de la actividad GST, ni en el contenido de GSH. El sistema antioxidante no estaría jugando un rol importante a este tiempo de exposición.

# **Bibliografía**

## 8. Bibliografía utilizada

- Anguiano O.L., Ferrari A., Soleño J., Martínez M.C., Venturino A., Pechen De D'Angelo A.M., & Montagna M.C., 2008. Enhanced esterase activity and resistance to azinphosmethyl in target and nontarget organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(10): 2117-2123.
- Anguiano O.L., Montagna M.C., Ferrari A., Soleño J., Lascano C.I., Loewy M.R., Pechen De D'Angelo A.M. & Magnarelli G.G., 2011. Clasificación y toxicología de plaguicidas.
- Bouvier J.C., Boivin T., Beslay D. & Sauphanor B., 2002. Age-dependent response to insecticides and enzymatic variation in susceptible and resistant codling moth larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 51(2): 55–66.
- Casida J.E., 2009. Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action. *Chemical research in toxicology*, 22(4): 609–619.
- Cichón L., Rossini M. & Garrido S., 2013. Guía para el diseño de programas fitosanitarios en manzanos. Ediciones INTA. [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta\\_fitosanitario\\_manzana\\_web.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_fitosanitario_manzana_web.pdf).
- Costa L.G., 2006. Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica Chimica Acta*, 366(1-2): 1-13.
- Cui F., Lin Z., Wang H., Liu S., Chang H., Reeck G., Qiao C., Raymond M. and Kang L., 2011. Two single mutations commonly cause qualitative change of nonspecific carboxylesterases in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(1): 1–8.
- Cutler G.C., 2013. Insects, insecticides and hormesis: evidence and considerations for study. *Dose-response: a publication of International Hormesis Society*, 11(2): 154–77.
- Dar Showket .A., Padder A.B., Mahendran G., Raja H.W., Parey S.H. and Hassan G.I., 2017. Codling moth *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) management a potential threat to horticulture industry. *Journal of Economic Entomology*, 6(3): 312-319.
- Dary O., Georghiou G. P., Parsons E. & Pasteur N., 1990. Microplate adaptation of Gomori's assay for quantitative determination of general esterase activity in single insects. *Journal of Economic Entomology*, 83(6): 2187–2192.
- Davis B. J., 1964. Disc electrophoresis. Method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121:404-427.
- Desneux N., Decourtye A. & Delpuech J.M., 2007. The sublethal effects of pesticides

- on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology*, 52(1): 81–106.
- Dettbarn W.D., Yang Z.P. & Milatovic D., 1999. Different role of carboxylesterases in toxicity and tolerance to paraoxon and DFP. *Chemico-Biological Interactions*, 119-120: 445–454.
- Ding G.Y., Hawkes N., Meredith J., Eggleston P., Heminway J., Ransson H., 2005. Characterization of the promoters of Epsilon glutathione transferases in the mosquito *Anopheles gambiae* and their response to oxidative stress. *Biochemical Journal*, 387: 879-888.
- Ellman G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1): 70–7.
- Felton G.W. & Summers C.B., 1995. Antioxidant systems in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 29(2): 187–197.
- Feng Q.-L., Davey K.G., Pang A.S.D., Primavera M., Ladd T.R., Zheng S.-C., Sohi S.S., Retnakaran A. & Palli S.R., 1999. Glutathione S-Transferase from the *Spruce Budworm*, *Choristoneura fumiferana*: Identification, characterization, localization, cDNA cloning, and expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(9): 779–93.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2003. International code of conduct on the distribution and use of pesticides (revised version): adopted by the hundred and twenty-third session of the FAO Council in November 2002, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Fournier D., Bride J.M., Hoffmann F. & Karch F., 1992. Acetylcholinesterase. Two types of modifications confer resistance to insecticide. *Journal of Biological Chemistry*, 267(20): 14270–14274.
- Fuentes-Contreras E., Reyes M., Barros W. & Sauphanor B., 2007. Evaluation of azinphos-methyl resistance and activity of detoxifying enzymes in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) from central Chile. *Journal of Economic Entomology*, 100 (2): 551–556.
- Fukuto T.R., 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives*, 87: 245–254.
- Gong Y., Li T., Zhang L., Gao X. & Liu N., 2013. Permethrin induction of multiple cytochrome p450 genes in insecticide resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. *International Journal of Biological Sciences*, 9(9): 863-871.
- Grant D.F. & Hammock B.D., 1992. Genetic and molecular evidence for a trans-acting regulatory locus controlling glutathione S-transferase-2 expression in *Aedes*

- aegypti*. *Molecular and General Genetics*: MGG, 234(2): 169–176.
- Gressel J., 2011. Low pesticide rates may hasten the evolution of resistance by increasing mutation frequencies. *Pest Management Science*, 67(3): 253–257.
- Guedes R.N.C., Magalhães L.C. & Cosme L. V., 2009. Stimulatory sublethal response of a generalist predator to permethrin: hormesis, hormoligosis, or homeostatic regulation? *Journal of Economic Entomology*, 102(1): 170–176.
- Guedes R.N.C., Walse S.S. & Throne J.E., 2017. Sublethal exposure, insecticide resistance, and community stress. *Current Opinion in Insect Science*, 21: 47-53.
- Habig W.H., Pabst M.J. & Jakoby W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(22): 7130–7139.
- Hemingway J., Hawkes N.J., McCarroll L. & Ranson H., 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(7): 653–65.
- IRAC, Insecticide Resistance Action Committee, 2016. <http://www.iraac-online.org> (consultado 06.10.17)
- Jokanović M., 2001. Biotransformation of organophosphorus' compounds. *Toxicology*, 166: 139–160.
- Joseph P.D., Guengerich P.F. & Miners J.O., 2005. Phase I and Phase II drug metabolism: terminology that we should phase out? *Drug Metabolism Reviews*, 37(4):575-80.
- Kanzok S.M., 2001. Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 291(5504): 643–646.
- Knight A.L., 2010. Cross-resistance between azinphos-methyl and acetamiprid in populations of codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae), from Washington State. *Pest Management Science*, 66(8): 865–874.
- Krishnan N., Kodrik D., Kłudkiewicz B. & Sehnal F., 2009. Glutathione-ascorbic acid redox cycle and thioredoxin reductase activity in the digestive tract of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(3): 180–188.
- Liu J., Yang, X. & Zhang, Y., 2014. Characterization of a lambda-cyhalothrin metabolizing glutathione S-transferase CpGSTd1 from *Cydia pomonella* (L.). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(21): 8947–62.
- Liu Z., Williamson M.S., Lansdell S.J., Denholm I., Han Z. and Millar N.S., 2005. A

- nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper), *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(24): 8420-8425.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265–275.
- Mannervik B., Alin P., Guthenberg C., Jensson H. & Warholm M., 1985. Microsomes and drug oxidations. Boobis A. R., Caldwell, J., de Matteis, F. & Elcombe C. R., eds. En *Biological Oxidation Systems*. Taylor & Francis, London: 221-228.
- Meister A. & Anderson M.E., 1983. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52: (7)11–760.
- Meister A., 1992. Biosynthesis and function of glutathione, an essential biofactor. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 1–6.
- Ministerio de Hacienda y Finanzas Públicas, 2016. Informe de cadenas de valor, Frutícola – Manzana y pera. Año 1, N° 23. [https://www.economia.gob.ar/peconomica/docs/Complejo\\_fruta\\_pepita.pdf](https://www.economia.gob.ar/peconomica/docs/Complejo_fruta_pepita.pdf)
- Montella I.R., Schama R. and Valle D., 2012. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance - A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107 (4): 437–449.
- Oakeshott J.G., Claudianos C., Russell R.J. & Robin G.C., 1999. Carboxyl/cholinesterases: a case study of the evolution of a successful multigene family. *BioEssays*, 21(12): 1031–1042.
- Pan Y., Guo H. & Gao X., 2009. Carboxylesterase activity, cDNA sequence, and gene expression in malathion susceptible and resistant strains of the cotton aphid, *Aphis gossypii*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 152(3): 266-270.
- Parra Morales L.B., 2017. Efectos subletales de los insecticidas clorpirifós y acetamiprid en sistemas enzimáticos de *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) del Valle de Río Negro y Neuquén. Tesis de doctorado en Biología. Universidad Nacional del Comahue. Neuquén.
- Plapp F.Jr. & Wang T.C., 1983. Genetic origins of insecticide resistance. *Pest Resistance to Pesticides* Eds. Georgiou G.P. & Saito T., Plenum Press, New York. 47–70.
- Qin G.H., Liu T., Guo Y.P., Zhang X.Y., Ma E.B. & Zhang J.Z., 2014. Effects of chlorpyrifos on glutathione S transferase in migratory locust, *Locusta migratoria*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 109: 1–5.

- Ramírez, J. A. & Lacasaña M., 2001. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor*, 4(2): 67-75.
- Ranson H. & Hemingway J., 2005. Glutathione transferases. En: *Comprehensive molecular insect science – Pharmacology*. Ed. Gilbert L.I., Iatrou K., Gill S.S. Amsterdam: Elsevier. pp. 383–402.
- Ranson H., N'guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z & Corbel V., 2011. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends in Parasitology*, 27(2):91-98.
- Reyes M., Barros-Parada W., Ramírez C.C., Fuentes-Contreras E., 2015. Organophosphate resistance and its main mechanism in populations of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) from central Chile. *Journal of Economic Entomology*, 108(1): 277–285.
- Richie J.P. Mills B.J. and Lang C.A., 1987. Correction of a Glutathione Deficiency in the Aging Mosquito Increases Its Longevity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 184: 113-117.
- Rodríguez M.A., Bosch D. & Avilla J., 2011. Resistance of Spanish codling moth (*Cydia pomonella*) populations to insecticides and activity of detoxifying enzymatic systems. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 138: 184–192.
- Sanchez E.E. & Villareal P., 2010. Programa Nacional de Frutales. INTA. Cadena de Pepita. [http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmpinta\\_programa\\_nacional\\_frutales\\_cadena\\_frutales\\_de\\_pe.pdf](http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmpinta_programa_nacional_frutales_cadena_frutales_de_pe.pdf)
- SENASA (2017) <http://www.senasa.gov.ar/cadena-vegetal/frutales/produccion-primaria/programas-fitosanitarios/carpocapsa>.
- Shi H., Pei L., Gu S., Zhu S., Wang Y., Zhang Y. & Li B., 2012. Glutathione S-transferase (GST) genes in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and comparative analysis with five additional insects. *Genomics*, 100(5): 327-335.
- Singh S.P., Coronella J.A., Benes H., Cochrane B.J., Zimniak P., 2001. Catalytic function of *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase DmGSTS1-1 (GST2) in conjugation of lipid peroxidation end products. *European Journal of Biochemistry*, 268: 2912-2923.
- Soleño J., Anguiano L., Pechen de D'Angelo A.M., Cichón L., Fernandez D. and Montagna C., 2008. Toxicological and biochemical response to azinphos-methyl in *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) among orchards from the Argentinian Patagonia. *Pest Management Science*, 64: 964–970.
- Soleño J., Anguiano O.L., Cichón L.B., Garrido S.A. & Montagna C.M., 2012. Geographic variability in response to azinphos-methyl in field-collected

- populations of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) from Argentina. *Pest Management Science*, 68(11): 1451-1457.
- Tabashnik B.E., Mota-Sanchez D., Whalon M.E., Hollingworth R.M., Carrière Y., 2014. Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides. *Journal of Economic Entomology*, 107(2): 496–507.
- Tang A.H. & Tu C.P., 1994. Biochemical characterization of *Drosophila* glutathione S-transferases D1 and D21. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(45): 27876–84.
- Terriere L.C. & Yu S.J., 1974. Induction of detoxifying enzymes in insects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22(3): 366–373.
- Vaughan A. & Hemingway J., 1995. Mosquito carboxylesterase est alpha 2(1) (A2). Cloning and sequence of the full-length cDNA for a major insecticide resistance gene worldwide in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(28): 17044–17049.
- Ventura C., 2014. Acción del plaguicida organofosforado Clorpirifós sobre la carcinogénesis mamaria. Trabajo para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires.
- Vontas J., David J.P., Nikou D., Hemingway J., Christophides G.K., Louis C. & Ranson H., 2007. Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensi* using cross-species microarray hybridization. *Insect Molecular Biology*, 16(3): 315–324.
- Vontas J.G., Small G.J. & Hemingway J., 2001. Glutathione S-transferases as antioxidant defense agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *The Biochemical Journal*, 357: 65-72.
- Wei S.H., Clark A.G. & Syvanen M., 2001. Identification and cloning of a key insecticide metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide resistant strain of the house- fly *Musca domestica*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31 (12): 1145-1153.
- Wilce M.C., Board P.G., Feil S.C., & Parker M.W., 1995. Crystal structure of a theta-class glutathione transferase. *The EMBO Journal*, 14(10): 2133–2143.
- Wu H., Zhang R., Liu J., Guo Y. & Ma E., 2011. Effects of malathion and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and antioxidant defense system in *Oxya chinensis* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae). *Chemosphere*, 83(4):599-604.
- Xu, J., Strange J. P., Welker D.L. & James R.R., 2013. Detoxification and stress response genes expressed in a western North American bumblebee, *Bombus huntii*

(Hymenoptera: Apidae). *BMC Genomics*, 14(1): 874.

Yan H., Jia H., Gao H., Guo X., Xu B., 2013. Identification, genomic organization, and oxidative stress response of a sigma class glutathione S-transferase gene (AccGSTS1) in the honey bee, *Apis cerana cerana*. *Cell Stress Chaperones*, 18(4): 415-426.

Yang X.Q., 2016. Gene expression analysis and enzyme assay reveal a potential role of the carboxylesterase gene CpCE-1 from *Cydia pomonella* in detoxification of insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 129: 56–62.