

TOXICIDAD Y RESISTENCIA A PESTICIDAS EN *Drosophila melanogaster*

DRA. ROSARIO RODRIGUEZ ARNAIZ

Laboratorio de Genética y Evolución

Departamento de Biología Celular

Facultad de Ciencias

Fotografía de M en C. Berenit Mendoza Garfias

Laboratorio Nacional de Biodiversidad (LaNaBio). UNAM.

INTRODUCCION.....	3
Bioética y toxicología	7
TOXICIDAD	8
Características de la respuesta tóxica	8
Clasificación de la respuesta tóxica.....	9
Relaciones dosis-respuesta.....	10
Mecanismos celulares de la respuesta tóxica	11
Intoxicación y desintoxicación.....	12
Reacción del xenobiótico o del metabolito con la molécula blanco	14
Pasos para el desarrollo de la toxicidad.....	17
Biotransformación	20
Toxicogenómica	28
Toxicología y epigenética	31
Metilación del DNA.....	31
Modificaciones de las histonas.....	33
MicroRNAs.....	34
PESTICIDAS.....	35
Desarrollo histórico de los pesticidas	36
Clasificación de los pesticidas	38
Herbicidas.....	42
Insecticidas.....	45
Fungicidas.....	50
Fumigantes.....	50
Uso de pesticidas en México y el mundo.....	50
NANOPARTÍCULAS Y NANOPESTICIDAS	54
TOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DE PESTICIDAS EN <i>Drosophila melanogaster</i>. ..	57
LA RESISTENCIA A PESTICIDAS.....	63
Mecanismos de la resistencia.....	70
Origen de los genes que confieren resistencia	97
Conclusiones sobre la resistencia.....	98
REFERENCIAS.....	100

INTRODUCCION

El estudio de los efectos adversos de compuestos extraños al metabolismo celular, denominados xenobióticos, es el objeto de la toxicología. Esta disciplina es muy antigua ya que de forma empírica fue practicada durante muchos siglos a partir de los efectos producidos por diversos venenos tanto de origen natural denominados toxinas como de origen artificial denominados contaminantes.

La toxicología contemporánea va más allá del estudio de los efectos adversos de xenobióticos diversos para centrarse en el estudio y análisis de los mecanismos bioquímicos y moleculares que subyacen o que están involucrados en la respuesta de los seres vivos frente al gran número de agentes físicos, químicos y biológicos a los que están expuestos. La toxicología ha incorporado muchas de las herramientas metodológicas de la mayoría de las disciplinas biológicas, de la química, la física y las matemáticas. Por tanto la toxicología es actualmente por su naturaleza una multidisciplina e interdisciplina.

Las actividades de los toxicólogos cubren diferentes áreas del conocimiento. En la biomedicina los toxicólogos se ocupan de conocer los mecanismos de exposición y efecto de diversos compuestos químicos con relación a las causas que producen enfermedades agudas y crónicas en los seres humanos. En la medicina del trabajo los estudios toxicológicos se relacionan con el reconocimiento, la identificación y cuantificación de los riesgos a los que están expuestos ocupacionalmente los trabajadores. Los toxicólogos participan activamente en el desarrollo de regulaciones enfocadas a la protección de la salud

humana y del ambiente frente a los efectos adversos de diversos compuestos químicos. Los toxicólogos medioambientales estudian los efectos de los compuestos químicos en la flora y en la fauna. Los toxicólogos genetistas estudian los mecanismos mediante los cuales los compuestos tóxicos modulan el crecimiento celular, la diferenciación y la respuesta de los genes y de las moléculas que mantienen la vida.

Los toxicólogos genetistas están entrenados para examinar y comunicar la naturaleza de los efectos adversos producidos por los agentes físicos, químicos y biológicos. La investigación en el campo de la toxicología genética está entonces enfocada al análisis de los mecanismos celulares, bioquímicos, genéticos y de acción así como de los efectos funcionales que pueden provocarse por la exposición a diversos xenobióticos tanto a nivel neurológicos como inmunológico. Estos profesionistas además de establecer la relación entre la dosis y la respuesta tratan también de instaurar la evaluación de los riesgos cuantitativos derivados de la exposición sobre el efecto potencial que puedan provocar a la salud humana y al ambiente.

Debido a la variedad de efectos adversos potenciales que puede provocar la exposición a una diversidad enorme de agentes potencialmente tóxicos la toxicología ha generado una especialización en áreas diversas, que de acuerdo con Casarett y Doull (2013) son tres: mecanicista, descriptiva y regulatoria.

La *toxicología mecanicista* está involucrada en la identificación de los mecanismos celulares, bioquímicos, genéticos y moleculares mediante los cuales

los compuestos xenobióticos producen sus efectos en los seres vivos. Los resultados de estos estudios son muy importantes para el establecimiento del riesgo asociado a una exposición. En particular los ensayos que se realizan en los laboratorios y que han demostrado la inducción de daño en los organismos empleados para el bioensayo han sido y continúan siendo muy relevantes. Así el potencial tóxico de diversos pesticidas, como los insecticidas organofosforados, en insectos, roedores y seres humanos puede predecirse sobre la base del conocimiento de los mecanismos comunes que los producen, tales como la inhibición de la acetilcolinesterasa o bien en las diferencias que existen con relación a la biotransformación y a su efecto en diversas especies.

Los datos acerca de los mecanismos de acción y la identificación de las diferentes respuestas en los animales experimentales pueden o no ser relevantes para los seres humanos. Por ejemplo la sacarina puede producir cáncer de vejiga en roedores expuestos de forma crónica a concentraciones muy altas, ya que generan precipitaciones cristalinas que bloquean la vejiga, y no ser nociva en los seres humanos expuestos a muy bajas concentraciones.

La identificación y comprensión de los mecanismos que producen los efectos tóxicos conducen al conocimiento de la fisiología, farmacología, biología celular, bioquímica y genética disciplinas involucradas en la respuesta tóxica. Actualmente se han desarrollado diferentes tecnologías en la biología molecular y en la genómica que permiten explorar las similitudes y diferencias en las respuestas de los diferentes bioensayos y de los seres humanos. En particular se han desarrollado diferentes herramientas y ensayos genéticos que identifican los

polimorfismos moleculares en los seres humanos relacionados con el metabolismo de agentes terapéuticos lo cual dio origen a las nuevas áreas de farmacogenómica y toxicogenómica, las que permiten identificar genéticamente a los individuos susceptibles personalizándose la medicina terapéutica e incrementándose la eficacia de las dosis y minimizando, a su vez, la toxicidad de los medicamentos.

La *toxicología descriptiva* está relacionada con los ensayos biológicos que brindan información sobre los efectos tóxicos que conducen al empleo seguro de medicamentos y aditivos de alimentos y al establecimiento de su regulación en cuanto a la exposición de los seres humanos. También debe establecerse el riesgo que representan los pesticidas, los solventes y otros contaminantes sobre poblaciones de peces, plantas, pájaros y en general de los seres vivos, así como para modificar el balance de los diversos ecosistemas. La aplicación de las nuevas tecnologías “ómicas”: genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica son por su naturaleza descriptivas aportando un enfoque novedoso a la toxicología descriptiva.

La *toxicología regulatoria* se basa en los resultados de la toxicología mecanicista y de la toxicología descriptiva para decidir si un compuesto químico representa un riesgo para su exposición abierta. La agencia de drogas y alimentos norteamericana (FDA - *Food and Drug Administration*) es la encargada de permitir que medicamentos, cosméticos y aditivos de alimentos se vendan en el mercado, mientras que, la agencia de protección ambiental (EPA – *Environmental Protection Agency*) regula todos los otros compuestos químicos tales como pesticidas, regula la calidad del agua y los sitios de disposición de desechos.

Bioética y toxicología

El conocimiento acerca de los efectos toxicológicos que pueden producir diversos compuestos químicos, agentes físicos y biológicos a los que estamos expuestos actualmente se acompaña con la responsabilidad de las implicaciones, sociales, éticas y legales derivadas de la investigación y de los bioensayos. Los nuevos descubrimientos de las ciencias biológicas han puesto en evidencia nuestra interconexión con la naturaleza, el respeto al entorno natural y a las condiciones ambientales que aseguran el que los seres vivos alcancen su potencial genético. La toxicología por tanto está involucrada con la comprensión de los efectos tóxicos y genotóxicos de los agentes xenobióticos sobre la comunidad biótica. Aldo Leopold (1887-1948) es considerado el primer autor bioeticista ya que influyó en el desarrollo de la ética ambiental y en el movimiento de preservación de la naturaleza al poner en práctica en su granja sus ideas sobre la restauración ecológica. Leopold estableció que “una cosa está bien hecha cuando tiende a preservar su integridad, la estabilidad y la belleza de la comunidad biótica” (1947).

Hechos como el envenenamiento por mercurio en la bahía de Minamata (Japón) debido a la ingestión de pescado y mariscos contaminados por los vertidos de la empresa petroquímica Chisso; el nacimiento de niños sin extremidades debido al empleo en madres embarazadas de hasta tres meses del analgésico talidomida y los efectos provocados por pesticidas señalados por Raquel Carson (1907-1964) en el libro *“La primavera silenciosa”* (1962) condujeron unos años después (en 1970) al establecimiento de la agencia reguladora del ambiente, la EPA. La agencia de administración de medicamentos

y alimentos, la FDA, fue fundada en los Estados Unidos de Norteamérica en 1906.

La ética biomédica se estableció con base en cuatro principios: autonomía, beneficio, no-maleficio y justicia que regulan la investigación humana, reglas y regulaciones que se han extendido a la investigación con animales.

De otra parte la evaluación cuantitativa del riesgo que representa la exposición tiene un componente ético, social y político. Además la industria y en particular las compañías farmacéuticas deben invertir en investigación con animales y seres humanos que demuestren la seguridad del producto que deseen introducir al mercado.

TOXICIDAD

Características de la respuesta tóxica

Un veneno es un agente capaz de producir una respuesta deletérea en un sistema biológico, afectar seriamente una función e incluso producir la muerte, Sin embargo, tal como lo estableció Theophrastus Phillipus Aureolus Bombastum conocido como Paracelso (1493-1541), cuya casa-memorial se encuentra en Salzburgo, Austria, cualquier cosa puede ser considerada un veneno solamente la dosis puede determinar que algo no sea veneno. Por tanto el parámetro que mide la muerte del 50% de individuos tratados o dosis letal media (LD_{50}) es el adecuado para establecer la cantidad necesaria para matar al 50% de individuos tratados con un agente tóxico. Ésta varía desde 10,000 mg/Kg para el alcohol etílico hasta 0.00001 mg/Kg para la toxina botulínica.

Algunos compuestos químicos producen la muerte en dosis de microgramos, mientras que otros la producen en gramos o kilogramos. El espectro de toxicidad es por tanto muy variable. La toxicidad aguda (LD_{50}) no necesariamente refleja el espectro total del riesgo ya que hay agentes que muestran una toxicidad aguda baja y sin embargo pueden producir efectos carcinogénicos, teratogénicos y neurogénicos. Además la susceptibilidad individual tiene un componente genético que genera un amplio rango de respuestas frente al mismo agente.

Clasificación de la respuesta tóxica

Los agentes tóxicos pueden clasificarse de diferentes maneras: (i) por el órgano blanco al que afectan (hígado, riñón, pulmón) (ii) por el uso (pesticidas, solventes, aditivos) (iii) por la fuente (animal, vegetal, microbiana) (iv) por el efecto (mutagénesis, carcinogénesis, teratogénesis). El término toxina se emplea para las sustancias tóxicas que producen los seres vivos (bacterias, hongos, plantas y animales) mientras que el término agente tóxico se emplea para todos aquellos compuestos de origen antropogénico o que resultan de actividades antropogénicas (dioxinas, hidrocarburos aromáticos policíclicos) o de origen natural debidos a procesos naturales (incendios forestales, metales variados) (v) por su estado físico (gas, líquido, polvo) (vi) por su estabilidad y reactividad (explosivos, oxidantes, inflamables) (vii) por su estructura química (aromáticos, aminas, hidrocarburos) (viii) por el mecanismo de acción (agente alquilante, intercalante, inhibidor de enzimas) (ix) por su potencial tóxico (extremadamente tóxico, muy tóxico, poco tóxico) (Casarett y Doull, 2013).

Relaciones dosis-respuesta

Se refiere a las características de una exposición a un agente tóxico y su relación con los efectos tóxicos provocados. Se puede elegir una medida de toxicidad, pero siempre habrá una correlación entre el grado de respuesta del sistema biológico y la cantidad de agente tóxico administrado.

Existen al menos dos tipos de relación dosis-respuesta: (1) individual (2) poblacional.

(1) Al aumentar la dosis se incrementa la respuesta en el individuo. Sin embargo la respuesta en un individuo se complica porque la mayoría de los compuestos tóxicos afectan varios sitios o producen variados mecanismos de toxicidad cada uno de ellos con su propia relación dosis-respuesta.

(2) El grado de respuesta de un conjunto de individuos frente a un rango de dosis administradas. Este tipo de relación se estima con base en la dosis efectiva medida con el parámetro de la muerte de un número determinado de individuos conocida como dosis letal. Se elige el 50% como el valor que produce tanto el que la mitad de la población sobreviva como que la otra mitad muera. La LD_{50} es por tanto el primer indicador que debe establecerse en la investigación de los efectos producidos por un agente químico o físico que se desee estudiar.

Un aspecto importante en la relación dosis-respuesta es el que se refiere al concepto de umbral. En tratamientos agudos la respuesta de asocia a la dosis por debajo de la cual la respuesta es cero o en su defecto muy baja. La base biológica

del umbral se establece en poblaciones tratadas con base en la susceptibilidad diferencial. En tratamientos crónicos el umbral es más difícil de establecer debido a que la carcinogénesis suele estar relacionada con exposiciones a largo plazo a concentraciones bajas o muy bajas.

Mecanismos celulares de la respuesta tóxica

Existen diversos procesos celulares involucrados en la respuesta tóxica. En general el mecanismo es el siguiente: el agente químico, denominado xenobiótico (extraño al metabolismo normal de la célula), ingresa al organismo interactúa con su molécula blanco, altera el ambiente biológico, daña la función celular la cual no es reparada produciéndose así una respuesta tóxica. A veces el xenobiótico no interactúa con su molécula blanco pero sí afecta el ambiente biológico generando daños a nivel molecular, celular y tisular.

La intensidad de una respuesta tóxica depende de la concentración del agente tóxico y del tipo de exposición ya sea aguda ya sea crónica. En muchas ocasiones el agente tóxico no es reactivo por sí mismo sino más bien es el metabolito que se genera como resultado de la biotransformación del agente inocuo. La acumulación del metabolito en el sitio blanco se ve facilitada por su absorción y distribución y por el contrario la eliminación del metabolito se favorece por la desintoxicación y posterior excreción.

La tasa de absorción se asocia con la concentración del agente y depende tanto de la tasa de exposición como de la disolución del compuesto químico. Los compuestos solubles en lípidos se absorben con más facilidad que los compuestos solubles en agua.

La distribución del compuesto químico en el cuerpo va a depender también de sus características, así los solubles en lípidos entran a las células por difusión mientras que los hidrofílicos requieren, por regla general, de transportadores o receptores de membrana.

La excreción es un mecanismo físico de eliminación de los xenobióticos o de sus metabolitos, mientras que la desintoxicación corresponde a la fase final de la biotransformación. Los compuestos hidrofílicos se eliminan más fácilmente que los lipofílicos los cuales tienden a acumularse en los tejidos grasos, tal es el caso de los bifenilos halogenados y de los insecticidas clorados.

Intoxicación y desintoxicación

La biotransformación de compuestos inertes se conoce como activación metabólica. A menudo este proceso genera metabolitos muy reactivos que interactúan eficientemente con receptores específicos y con enzimas particulares. El paratión un insecticida organofosforado es biotransformado a paraoxón un metabolito que inhibe a la enzima colinesterasa. Durante la biotransformación de xenobióticos pueden generarse metabolitos electrofílicos, radicales libres, nucleofílicos y agentes que reaccionan en el proceso redox.

Los electrofílicos son compuestos que contienen un átomo deficiente en electrones que puede reaccionar con compuestos ricos en electrones llamados nucleofílicos. Tal es el caso de aldehídos, cetonas, epóxidos y otros compuestos que se forman durante la biotransformación del alcohol etílico, la aflatoxina B1, o la acroleína. La mayoría de estas reacciones están mediadas por la familia de enzimas de los citocromos P450.

Los radicales libres son moléculas o fragmentos de moléculas que contienen uno o más electrones no apareados en el orbital externo. La doxorubicina (adriamicina) es un agente intercalante que se emplea para combatir diversos tipos de cáncer, es capaz de aceptar electrones de las reductasas para formar radicales que se transfieren al oxígeno molecular formando un anión superóxido ($O_2\bullet$) regenerándose el xenobiótico parental, el cual puede ganar electrones. El radical anión superóxido está involucrado tanto en la formación de peróxidos de hidrógeno (H_2O_2) y del radical hidroxilo ($HO\bullet$) como en la del peroxinitrito ($ONOO^-$) y del dióxido de nitrógeno ($\bullet NO_2$).

La formación de nucleofílicos es poco común como mecanismo de activación de xenobióticos mientras que las flavoenzimas dependientes de la nicotinamida adenina dinucleótido reducida (NADPH) proporcionan parte del poder reductor necesario para las reacciones de reducción, es por tanto un cofactor esencial en las reacciones metabólicas (anabolismo y catabolismo).

La desintoxicación es la fase final de la biotransformación. El proceso puede llevarse a cabo con compuestos químicos que no contengan grupos funcionales, como el benceno, al cual se le introduce un grupo funcional por bioactivación de P450 (hidroxilo) y posteriormente la glutatión transferasa introduce un ácido endógeno (glucurónico) generándose un producto hidrofílico que es excretado. Los compuestos nucleofílicos son excretados por conjugación, por metilación o acetilación, mientras que la conjugación de los compuestos electrofílicos se lleva a cabo con el glutatión. La unión covalente de los electrofílicos con proteínas es otro mecanismo de desintoxicación. Las

carboxilesterasas inactivan a los insecticidas organofosforos tanto por hidrólisis como por unión covalente. Los radicales libres suelen ser eliminados enzimáticamente por la superóxido dismutasa enzima que se encuentra tanto en el citosol como en las mitocondrias.

Reacción del xenobiótico o del metabolito con la molécula blanco

El agente químico o el metabolito producto de la biotransformación para provocar la respuesta genotóxica debe unirse a su molécula blanco. Este proceso requiere de la interacción entre ellos. La molécula blanco tiene diversos atributos, tales como reactividad, accesibilidad y una función crítica para la célula o para el organismo. En tanto que con el compuesto químico se generan diversos tipos de reacciones, como la unión covalente, la transferencia de electrones y la reacción enzimática.

Las moléculas blanco más relevantes son los ácidos nucleicos y las proteínas, mientras que la reacción química más relevante es la unión covalente la que suele ser permanente.

Las diversas reacciones que provocan los agentes tóxicos en sus moléculas blanco son muy variadas desde el bloqueo en su función hasta su inhibición. Así el xenobiótico curare interfiere con los canales iónicos de las neuronas, mientras que el DDT y otros insecticidas como los piretroides los mantienen abiertos. Algunas proteínas son sensibles a la unión covalente quedando así inactivada su función.

Además de la formación de aductos, los agentes tóxicos pueden provocar ligamientos cruzados en el DNA y proteínas y su fragmentación. Algunas

moléculas blanco pueden ser susceptibles a una degradación espontánea después de haberse puesto en contacto con un agente químico particular. La formación de radicales libres tales como el triclorometilperóxilo puede iniciar la degradación de los lípidos por lipoperoxidación lesionando diversos órganos y tejidos.

Las moléculas blanco están involucradas en la regulación de la actividad de la célula, y en el mantenimiento de la vida celular. La desregulación de la expresión génica conduce a divisiones celulares no programadas, a apoptosis y a proliferación de proteínas no requeridas. También provoca cambios en las funciones celulares, tales como, las que se producen a nivel neuromuscular generando tanto convulsiones y arritmia cardíaca como necrosis y parálisis.

Las lesiones tóxicas pueden ser reparadas por diversos mecanismos tanto a nivel molecular como a nivel celular y tisular. Las proteínas pueden ser reparadas por diversos procesos fundamentalmente de reducción aunque también pueden ser degradadas por proteólisis mediada por los proteosomas. Los lípidos peroxidados son reparados mediante reductasas y la glutatión peroxidasa. Mientras que el DNA es reparado por diversos mecanismos tales como por la acción de la fotoliasa, como por la excisión de bases (glicosidasas) y la excisión de nucleótidos (que emplea cerca de 30 proteínas).

Por otra parte los organismos muestran una enorme capacidad para adaptarse y tolerar a diversos agentes tóxicos. La respuesta trata de revertir los efectos producidos y/o preservar la homeostasis biológica. Se han señalado

diversos mecanismos involucrados en la adaptación como una disminución del agente tóxico en el blanco, un decremento en la susceptibilidad del blanco, un aumento en la capacidad del organismo a repararse (Cassarett y Doull, 2013).

La función incorrecta de los mecanismos de reparación puede producir varios efectos, entre ellos la carcinogénesis, la que involucra las funciones inapropiadas de varios mecanismos de adaptación y reparación siendo la más importante la reparación del DNA lo que genera mutaciones en genes importantes; la falla en producir apoptosis y las fallas en el control de la proliferación celular. La carcinogénesis inicia tanto por mecanismos genéticos como epigenéticos. Los genéticos producen cambios cualitativos en la expresión génica, con ganancia o pérdida de la actividad de una proteína, mientras que los epigenéticos producen cambios cuantitativos en la expresión génica generándose una mayor o menor cantidad de producto protéico. Los mecanismos genéticos afectan la secuencia codificante de genes, mientras que los epigenéticos afectan las regiones reguladoras de los genes por lo que aumenta o disminuye la actividad transcripcional del gen.

Los carcinógenos genotóxicos inducen la activación de oncogenes y la inactivación de proteínas supresoras de tumores lo cual genera una transformación celular neoplásica, la expansión clonal y finalmente un tumor.

Los carcinógenos epigenéticos afectan a la región promotora de los genes en dos formas distintas: (1) alterando la actividad de los factores de transcripción; (2) alterando la capacidad de respuesta de las regiones promotoras de los genes

hacia los factores de transcripción. De modo que la metilación de las regiones promotoras del DNA por acción de las DNA metil transferasas de citosinas puede silenciar a genes debido a que la unión débil de los factores de transcripción al promotor generan una reducción en la accesibilidad. Por el contrario la hipometilación y la inhibición de la metilación del DNA se asocia con la sobreexpresión de proteínas involucradas en los procesos de invasión y metástasis y por tanto se asume que es un mecanismo que produce la tumorigénesis.

Pasos para el desarrollo de la toxicidad

La disposición de un xenobiótico en el organismo está mediada por diferentes mecanismos de acción. éstos son: absorción, distribución, biotransformación y eliminación.

La *absorción* se lleva a cabo por diferentes mecanismos, tanto activos como pasivos. El agente tóxico debe atravesar primero la membrana de las células. Ésta está formada por una bicapa de fosfolípidos que consiste en una cabeza polar hidrofílica, orientada hacia el exterior, y una cabeza hidrofóbica, orientada hacia el interior. Además numerosas proteínas están embebidas formando poros y canales iónicos. Algunas membranas tienen en la parte externa glicolípidos y ácidos grasos no saturados, de modo que cuanto mayor sea la cantidad de éstos la membrana será más fluida y facilitará un más rápido transporte activo o pasivo. El transporte pasivo es aquel que no requiere de gasto energético, se realiza básicamente por difusión. Si una molécula hidrofílica es pequeña, como el etanol, atravesará la membrana muy rápidamente a través de los poros acuosos. Muchas

moléculas orgánicas tienen una solubilidad diferencial en lípidos lo cual correlaciona con su transporte a través de las membranas, así el glutatión y los aminoácidos cisteína y glicina así como la glucosa son solubles en agua, mientras que la atropina, el benceno, el 2,4-D, el paratión y el DDT son solubles en lípidos. El otro medio de transporte pasivo es la filtración de moléculas pequeñas de pocos daltones.

El transporte activo requiere de un gasto energético ya que el movimiento de compuestos químicos en contra de un gradiente, la competencia entre compuestos por el mismo acarreador, entre otros, son factores que caracterizan a este tipo de transporte. El transportador, acarreador o receptor forma un complejo a nivel de membrana el cual la atraviesa; el complejo es liberado dentro de la célula y el transportador regresa a la superficie de la membrana para repetir todo el proceso. En el genoma humano se ha identificado un gen que confiere resistencia múltiple a drogas (MDR) que produce una glicoproteína que protege a las células al eliminar sustancias nocivas, funciona como una bomba ya que en las células cancerosas impide el ingreso de drogas citotóxicas contribuyendo así a su resistencia y/o a la excreción de los compuestos químicos ya conjugados con glutatión. El gen MDR mutado genera una proteína no funcional por lo cual los portadores serán muy sensibles a los compuestos xenobióticos.

Se conocen otras proteínas transportadoras como el casete ABC (*ATP-binding-cassette*) cuya función como transportadores se realiza mediante un dominio estructural hidrofóbico unido a la membrana y un dominio estructural hidrofílico que contiene un nucleótido intracelular en el cual el ATP se une y es

hidrolizado. Los miembros transportadores ABC juegan un papel muy importante en la absorción desde el tracto digestivo y la eliminación a través de la bilis o de la orina. En general mantienen las barreras que limitan el ingreso y disposición de xenobióticos.

La *distribución* ocurre una vez que el compuesto es absorbido por el cuerpo. Es un proceso que suele ser muy rápido. La tasa de distribución está íntimamente ligada al aparato circulatorio y a la tasa de difusión del compuesto y depende fundamentalmente de la afinidad del xenobiótico por varios tejidos. Las moléculas solubles en agua, como ya se mencionó, se difunden a través de los poros acuosos de las membranas, mientras que las solubles en lípidos permean la membrana. Las moléculas muy polares e inclusive los iones de poco peso molecular no entran fácilmente a la célula porque suelen tener una cubierta hidratada lo cual hace que su tamaño sea mayor.

Los compuestos orgánicos que son lipofílicos suelen ser capaces de atravesar rápidamente las membranas de diversos tejidos, pero además son capaces de acumularse en los tejidos adiposos, tal es el caso de algunos pesticidas como el DDT, el aldrin, endrin, heptacloro, toxafeno, bifenilos y dioxinas los cuales han sido sujetos a amplias regulaciones y tratados internacionales que controlan su uso ya que además son compuestos orgánicos muy persistentes. De modo que los compuestos con un coeficiente alto de partición lípido/agua tienden a acumularse en los tejidos grasos.

La *biotransformación* es el proceso mediante el cual un xenobiótico lipofílico o bien inerte es convertido a un compuesto hidrofílico el cual podrá ser excretado. Por su importancia en el proceso tóxico lo trataré de forma independiente en el próximo subtema.

La *excreción* es la eliminación de un compuesto previamente biotransformado a un producto soluble en agua. En los seres humanos la excreción se realiza principalmente en la orina, pero también a través de las heces y de los pulmones. Además todas las secreciones del cuerpo: saliva, lágrimas y leche excretan compuestos químicos tóxicos. En *Drosophila melanogaster* la excreción se realiza a través de los tubos de Malpigio que tienen funciones similares a las de los riñones de los seres humanos (Huylmans y Parsh, 2014).

Biotransformación

La biotransformación de xenobióticos es el proceso mediante el cual un compuesto lipofílico es convertido a uno hidrofílico el cual podrá ya ser excretado. El proceso consta de dos fases, la primera es la de funcionalización y la segunda es la de conjugación. La activación inicial de un xenobiótico se realiza en la fase uno y es mediada por diversas enzimas las cuales catalizan distintas reacciones enzimáticas tales como, hidrólisis (carboxilesterasas), reducción (carbonil reductasas) y oxidación (citocromos P450), mientras que la fase dos se lleva a cabo básicamente por conjugación (glutatión S-transferasas). Las diversas enzimas se localizan a nivel subcelular en los lisosomas, en el citosol, y en las mitocondrias. Algunas enzimas son capaces de biotransformar muchos sustratos,

es el caso de CYP2D6 y de CYP3D4 que metabolizan cerca del 50% de las drogas a las que están expuestos los seres humanos.

No todas las reacciones de biotransformación son catalizadas por estas enzimas, algunas reacciones se llevan a cabo por bacterias anaerobias que viven como simbiosis en la microflora de muchos eucariontes. La biotransformación puede alterar las propiedades de un compuesto químico ya que puede producirse su desintoxicación (por solubilización) o puede activarse hacia un compuesto más tóxico. Así el etanol puede ser oxidado para generar acetaldehído el cual es un compuesto activado y mucho más tóxico; éste a su vez puede ser oxidado produciéndose ácido acético, que es el metabolito desintoxicado.

Los citocromos P450 son enzimas capaces de transferir un compuesto nucleofílico a un electrofílico, que suele ser muy reactivo, y capaz de unirse a los sitios nucleofílicos del DNA generándose mutaciones y procesos de iniciación de cáncer. La biotransformación que se presenta en la fase 1 puede generar especies reactivas de oxígeno las que a su vez provocan estrés oxidante y peroxidación de lípidos. Sin embargo, muchos de los compuestos electrofílicos generados por las enzimas de la fase 1 son conjugados por enzimas de la fase 2 como el glutatión, reacción que corresponde a la desintoxicación.

La activación-desintoxicación de xenobióticos es muy variable entre los miembros de especies diferentes y también lo es entre los miembros de la misma especie. Este proceso dual está dado por la sensibilidad individual que es conferida por diversos subtipos celulares producto de la diversidad genética

individual. El estudio de las causas y de la prevalencia de las diferencias heredadas en la capacidad de biotransformación de xenobióticos se conoce como farmacogenómica, concepto que actualmente se emplea en la medicina personalizada en la cual la dosis de una droga terapéutica se ajusta de acuerdo con el genotipo individual del paciente. De modo que la variabilidad genética permite clasificar a los individuos en cuatro categorías: pobres metabolizadores (PM), intermedios (IM), rápidos (FM) y ultrarápidos (UM) que resultan de la expresión de diversas condiciones genéticas: sin alelos funcionales (-/-), con un alelo funcional (+/-), con dos alelos funcionales (+/+) y los ultrarápidos que portan duplicaciones génicas (Tabla 1).

Tabla 1. Relación entre el genotipo y el fenotipo en la expresión de las enzimas metabolizadoras.

GENOTIPO	ALELOS	FENOTIPO	ACTIVIDAD
2 alelos inactivos	(-/-)	Pobres (PM)	$0+0 = 0$
1 alelo activo +1 alelo inactivo	(+/-)	Intermedios (IM)	$1+0.5 = 1.5$
2 alelos activos	(+/+)	Rápidos (FM)	$1+1 = 2$
Duplicación	(+/+)n	Ultrarápidos (UM)	$2 \times n$

La expresión de la enzima polimórfica CYP2D6 sigue el orden PM>IM>FM>UM mientras que la exposición a drogas terapéuticas sigue el orden

inverso. Esta es la razón por la cual los PM requieren más cantidad de droga y por tanto están más expuestos a los efectos secundarios que producen.

Los aspectos estereoquímicos de los compuestos químicos juegan un papel crucial en los procesos de biotransformación. Un xenobiótico que posea un centro quiral, que tiene una imagen especular no superponible con ella denominada enantiómetro o estereoisómero, puede ya se inhibir ya sea activar a las enzimas P450. Por ejemplo la quinidina es un potente inhibidor de CYP2D6 mientras que la quinina no produce tal efecto.

La hidrólisis se realiza principalmente con el concurso de las carboxilesterasas, colinesterasa y paraoxonasas. Las dos primeras enzimas hidrolíticas se conocen como serin-esterasas debido a que su sitio catalítico contiene un residuo nucleofílico de serina que participa en la hidrólisis de varios sustratos endógenos y exógenos. Este residuo puede ser fosforilado por compuestos organofosfóricos, tales como, insecticidas, herbicidas, fungicidas, nematocidas y reguladores del crecimiento en plantas. En el genoma humano se han identificado alrededor de 1227 genes (5%) como serin-hidrolasas de las cuales se predice que unas 150 son serin-proteasas, enzimas que inactivan a los compuestos organofosforados (OP). En *Drosophila melanogaster* y en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* la acetilcolinesterasa, colinesterasa que hidroliza a la acetilcolina en colina, que es recuperada en las células para la síntesis de nuevas moléculas del neurotransmisor, y en ácido acético que es liberado del cuerpo a través de la linfa. La inhibición de la acetilcolinesterasa provoca la acumulación de acetilcolina en la unión sináptica y por tanto la

interrupción de la transmisión de los impulsos nerviosos efecto que se produce por su unión a organofosforados y carbamatos en su sitio activo. La inhibición de la acetilcolinesterasa se produce por la interacción del pesticida con el grupo OH de la serina del centro activo de la enzima. Se forma un intermediario de la enzima fosforilada, y es la salida de los grupos fosforo o carbamato del centro activo lo que inhibe de forma irreversible a la enzima. La fosforilación de la acetilcolinesterasa es el principal mecanismo de envenenamiento generado por los compuestos organofosforados (ORGF) y por los carbamatos (CARB).

Aldridge (1953) propuso una clasificación de las enzimas hidrolíticas (esterasas) y de su interacción con los insecticidas organofosforados que sigue vigente y es: las que hidrolizan a los compuestos organofosforados como esterasas A (paraoxonasa humana 1); las que las inhiben como esterasas B y las que no interactúan como esterasas C. El mecanismo catalítico de las carboxilesterasas es análogo al de las serin-proteasas e involucra una triada de residuos de aminoácidos: ácidos (glutamato), básicos (histidina) y nucleofílicos (serina). Los compuestos ORGF se unen al grupo OH del nucleofílico para formar un puente fósforo-oxígeno que no es escindido por el agua. Por tanto los compuestos ORGF inhiben la actividad enzimática de las carboxilesterasas y se clasifican como esterasas B.

Las paraoxonasas catalizan la hidrólisis de compuestos tales como el paratió, el malatió, carbonatos cíclicos y lactonas. Estas enzimas requieren de calcio tanto para su estabilidad como para su actividad catalítica por lo cual la hidrólisis de ORGF mediada por estas enzimas requiere de la hidrólisis catalizada

por calcio. Las paraoxonasas son enzimas que contienen un grupo sulfidrilo en el sitio activo del residuo de la cisteína. Los compuestos ORGF se unen al sitio nucleofílico SH formando un puente fósforo-azufre que es cortado por el agua.

La reducción de muchos compuestos xenobióticos que contienen aldehídos, cetonas, alquenos o grupos nitro se realiza in vivo, sin embargo, muchas veces se realiza por reacciones de interacciones no enzimáticas con glutatión. Los aldehídos pueden ser reducidos a alcoholes pero también pueden ser oxidados a un ácido carboxílico, lo cual muestra que estas reacciones dependen de los sustratos o de las condiciones intrínsecas. En algunos casos la reducción de aldehídos a alcoholes puede estar catalizada por la alcohol deshidrogenasa, enzima que pertenece al grupo de las deshidrogenasas/reductasas. La reducción de cetonas a alcoholes secundarios es mediada por las carbonil reductasas. La deshalogenación (F, Cl, Br, I) de xenobióticos alifáticos se lleva a cabo tanto por oxidación como por reducción ambas reacciones son mediadas, como ya se mencionó, por los citocromos P450 los cuales generan metabolitos secundarios muy reactivos capaces de unirse a proteínas y otras macromoléculas celulares. El metabolismo del alcohol es una ruta de dos vías: del etanol a acetaldehído y ácido acético por reducción, pero también la alcohol deshidrogenasa puede oxidar al acetaldehído y generar etanol (Umulis et al. 2005). El ácido acético a su vez es oxidado para generar bióxido de carbono y agua.

Las peroxidasas catalizan reacciones de tipo redox utilizando un peróxido como oxidante y un segundo sustrato, de características reductoras, que es oxidado por el peróxido. La biotransformación oxidativa de los xenobióticos

requiere de un cofactor de piridina reducido tal como nicotinamida adenina dinucleótido fosfato o la nicotiamida dinucleótido (NAPDH o NADH). En general no juegan un papel muy relevante en comparación con las enzimas oxidantes del complejo P450. Las peroxidasas son enzimas que contienen un grupo prostético hemo, en los seres humanos incluyen a las mieloperoxidasas, eosinól peroxidasas, tiroid peroxidasas y a dos formas de las postaglandin H sintasas. Estas últimas enzimas han sido muy estudiadas con relación a su participación en la biotransformación de xenobióticos.

La postaglandina H sintasa es una enzima con doble función compuesta por una ciclooxigenasa que convierte al ácido araquidónico en un hidroperóxido y una peroxidasa que convierte al 15-hidroperóxido en un 15-alcohol PGH₂ (peróxido de postaglandina) el cual puede estar involucrado en la oxidación del xenobiótico. Así el benzo(a)pireno es biotransformado por la acción de P450 en el epóxido 7-8 dihidrodiol el cual es oxidado al epóxido 9-10, metabolito tumorigénico, proceso mediado por una postaglandina. La postaglandina está también involucrada en la formación del epóxido 8-9 de la aflatoxina B₁, uno de los más potentes tumorigénicos del hígado, metabolito que puede ser inactivado al conjugarse con glutatión.

Las flavin monoxigenas (FMN) son enzimas que oxidan al nitrógeno, al azufre y a los átomos fosfóricos de muchos compuestos xenobióticos nucleofílicos como la nicotina, la demetilamina, el acetilaminofluoreno y las hidracinas. Las FMN son enzimas que requieren de NAPDH y de O₂ y muchas de sus reacciones son catalizadas por CYP450. Estas enzimas son termolábiles por tanto pueden

ser inactivadas a 50°C, su pH óptimo es de 8 a 10, mucho más alto que el de P450, que es de 7 a 8. Los citocromos P450 son enzimas muy versátiles involucradas tanto en la activación como en la desintoxicación de xenobióticos, Se encuentran tanto en las mitocondrias como en el retículo endoplásmico (microsomias). Biotransforman también sustratos endógenos como las hormonas esteroideas, los ácidos grasos, las vitaminas liposolubles A y D y los eicosanoides (prostaglandinas). Todas las enzimas del sistema de los citocromos P450 son hemoproteínas, el hierro del grupo hemo se encuentra en estado férrico (Fe^{3+}) y cuando se reduce pasa al estado ferroso (Fe^{2+}). El citocromo P450 se une a ligandos tanto de O_2 como de CO, el complejo citocromo-CO absorbe la luz a los 450nm de ahí su nombre (Omura y Sato, 1964). La mayoría de los complejos citocromo-CO absorben la luz entre los 447 y los 452nm lo cual se debe a un ligando cisteína-tiolato que contiene una secuencia de aminoácidos muy conservada, conocida como la señal de identidad, que está presente en todas las enzimas del citocromo. Cuando el puente cisteína-tiolato se rompe el P450 se transforma en un P420 que es inactivo (Feyereisen, 1999).

La reacción básica de los citocromos es la monooxigenación en la cual un átomo de oxígeno es incorporado a un sustrato (RH) en presencia de NADPH+ el producto es un sustrato oxidado (ROH) agua y NADP+. Durante la reacción el citocromo P450 se une directamente al sustrato y al oxígeno molecular pero no interactúa directamente con el NADPH, esto ocurre en el retículo endoplásmico donde la mayoría de los citocromos P450 están involucrados en el metabolismo de xenobióticos. P450 recibe los electrones de NADPH vía una flavoproteína

denominada NADH-citocromo P450 reductasa. En las mitocondrias donde los citocromos P450 están involucrados en la biosíntesis de hormonas esteroideas (esteroidogénesis) y de la vitamina D, los electrones son transferidos de NADPH a P450 vía dos proteínas: una ferredoxina y una ferredoxina reductasa. Varias son las reacciones catalizadas por los citocromos P450: hidroxilación de ácidos alifáticos (ácido laúrico) o aromáticos (testosterona); epoxidaciones (clorobenceno, cumarina); oxigenación de heteroátomos (omeoprazol, clorobenzilisoquinolina); desalquilaciones de oxígeno (7-etoxirespurfina) de nitrógeno (diazepam); de azufre (metilmercaptapurina) (Guengerich et al., 2016; Casarett and Doull, 2013).

Toxicogenómica

Las aproximaciones científicas tanto las que se refieren a las rutas bioquímicas como a las rutas moleculares están enfocadas a conocer la respuesta frente a un agente tóxico de un ser vivo mediante la observación y el análisis de la patología, histología, ruta bioquímica y conducta parámetros que son cruciales para la toxicología en general y para la toxicología genética en particular. Actualmente se han desarrollado nuevas herramientas toxicológicas que incluyen a la genómica o caracterización del genoma de una especie; la caracterización de los RNAs mensajeros o transcriptómica; el estudio de las proteínas que se expresan en una célula o tejido proteómica (en diversas células y tejidos); y la metabolómica o caracterización de los sustratos, productos y enzimas que median en las reacciones enzimáticas. Estas cuatro nuevas disciplinas integradas a nivel molecular han permitido ir entendiendo la respuesta de los organismos a nivel de lo que se conoce como biología de sistemas. Cada una de estas disciplinas genera una gran cantidad de datos cuya evaluación y análisis estadístico se

realiza a través de herramientas computacionales muy poderosas que se agrupan en una disciplina conocida como bioinformática. La bioinformática es pues un área emergente interdisciplinaria que se ocupa de la aplicación de la informática a la recopilación, almacenamiento, organización, análisis, manipulación, presentación y distribución de la información relativa a los datos biológicos o médicos, obtenidos por el estudio de diferentes macromoléculas (DNA, mensajeros, proteínas y metabolismo) (Casarett y Doull, 2013).

Las tecnologías “ómicas” han ido incorporando a la evaluación toxicológica la identificación de los mecanismos y modos de acción de los compuestos tóxicos.

La genómica se refiere al análisis del genoma de un organismo el cual está formado por el complemento de genes que ha heredado de su padre y de su madre. Cada célula del organismo contiene por tanto la misma información genética, es decir, las mismas secuencias de nucleótidos heredadas de sus progenitores.

La expresión del genoma se realiza en las células de forma diferencial lo que origina la transcriptómica que se caracteriza por la expresión de las secuencias de DNA en una molécula intermedia que es el RNA mensajero. La transcripción diferencial de genes es la responsable de la diferenciación celular y por tanto de los diversos tipos de células, tejidos y órganos que conforman a un individuo. El DNA genómico también codifica para pequeñas moléculas de RNA que participan en la regulación de la expresión génica conocidas como microRNAs.

Entre los primeros cambios que una célula puede exhibir después de exponerse a un agente tóxico es el de la expresión génica. Metodologías como la electrotransferencia tipo Northern y la de los microarreglos permiten conocer la expresión de genes y establecer el perfil de expresión.

Los cambios en la expresión génica se reflejan en cambios en el fenotipo como respuesta a la exposición a agentes tóxicos. Los cambios en el fenotipo a su vez requieren de la traducción de los mensajeros hacia las proteínas. La proteómica es entonces el estudio y análisis de las proteínas que una célula o tejido contienen, estudio que es muy complejo debido a la diversidad y al número de copias proteicas que una célula posee. La identificación de las proteínas se realiza mediante una serie de metodologías tales como la electroforesis en gel de dos dimensiones, la cromatografía líquida de alta resolución, y la espectrofotometría. Se espera que los cambios en la expresión de proteínas sirvan como marcadores de respuesta a los agentes tóxicos. Estas aproximaciones han sido de utilidad para la detección temprana de hiperplasia prostática mediante la identificación del antígeno prostático en suero.

La metabolómica se refiere al análisis de las moléculas involucradas en las reacciones enzimáticas tales como sustratos, productos y metabolitos que definen y caracterizan a las células y a los seres vivos. Los cambios temporales en el metabolismo se asocian con el estilo de vida y el ambiente. Los cambios en el perfil metabólico reflejan los cambios en la transcripción general, en la traducción, en la función proteica y en las respuestas adaptativas de los seres vivos.

Toxicología y epigenética

La epigenética se refiere al estudio de los cambios hereditarios que se producen en la expresión génica sin que se produzcan cambios en la secuencia de nucleótidos. Los cambios epigenéticos pueden ser desencadenados por factores ambientales como la exposición a diversos contaminantes tales como pesticidas y por la persistencia en el ambiente de contaminantes orgánicos que pueden afectar al sistema endócrino (Collota et al. 2013).

Las modificaciones epigenéticas incluyen a la metilación del DNA, modificaciones en las histonas y microRNAs.

Metilación del DNA.

Es un proceso que se asocia con la represión de la transcripción debido a que se añaden grupos metilo al DNA. Por tanto se trata de una modificación covalente del DNA involucrada en la regulación de la expresión génica, y en diversos procesos celulares que incluyen a las remodelaciones de la cromatina, la inactivación de un cromosoma X, la impronta genómica, la estabilidad cromosómica y la transcripción génica. La metilación del DNA se hereda en las células somáticas después de la división celular. La citosina metilada (5 Met-C) representa entre el 2 y el 5% de todas las citosinas del genoma de mamíferos y se encuentra principalmente en los dinucleótidos CpG. En general la hipermetilación se asocia con un decremento en la expresión de un gen, mientras que la hipometilación de regiones no codificantes se asocia con inestabilidad cromosómica. La impronta genómica es un fenómeno genético en el cual ciertos genes se expresan de forma específica y asociada a un progenitor e involucra la metilación del gen que no se expresa.

Recientemente se ha asociado la exposición a pesticidas con la metilación del DNA y la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo la exposición a DDT en ratas altera la metilación en el hipotálamo generándose metilaciones incompletas (hipometilación) en regiones génicas específicas. Alteraciones en la metilación del DNA se producen experimentalmente por la acción del metilmercurio y del cloruro de bifenilo.

Algunos pesticidas pertenecen al grupo de los disruptores endócrinos ya que son productos sintéticos que se parecen a las hormonas naturales produciéndose perturbaciones epigenéticas. Entre ellos se encuentra el metoxicloro, un insecticida organoclorado, que afecta tanto al sistema reproductivo de ratas macho como de ratas hembra al producir una reprogramación de la expresión hormonal del eje hipotálamo-ovario el cual incluye la expresión del receptor beta de estrógenos. Se han demostrado también efectos a largo plazo en la expresión de genes en ratonas preñadas en las cuales se alteran los genes involucrados en la impronta.

Los compuestos de arsénico, en particular el trióxido, han sido ampliamente usados en la producción de herbicidas e insecticidas empleados en la conservación de la madera. El arsénico es un carcinógeno no mutagénico que induce la formación de tumores por vía epigenética mediante hipometilación de oncogenes y de genes supresores de tumor que a largo plazo modifican la actividad de genes que controlan la transformación celular.

Modificaciones de las histonas.

Las modificaciones post-traduccionales de la colas de las histonas, son importantes ya que alteran la estructura de la cromatina y por tanto su accesibilidad al DNA. El efecto funcional de estas modificaciones depende del aminoácido específico que es alterado y del grupo específico al que se une de forma covalente. La acetilación resulta en un aflojamiento de la cromatina lo cual facilita la replicación y la transcripción, mientras que la metilación de las histonas tiene el efecto contrario ya que el DNA se mantiene muy apretado y cerrado por lo cual se restringe el acceso a varias enzimas. Las modificaciones en las histonas de hecho regulan la expresión génica, la remodelación de la cromatina, la sobrevivencia y la muerte celular.

Diversos factores ambientales pueden alterar la expresión génica y generar procesos neurodegenerativos. Un factor clave en las patologías de desórdenes neurológicos crónicos, como el Parkinson y el Alzheimer, es como ya se mencionó la exposición a metales y pesticidas. Tanto el herbicida paraquat como el insecticida dieldrin se han relacionado con la enfermedad de Parkinson ya que inducen la acetilación de la histona H3 y decrecen la actividad de la desacetilasa de las histonas. Los pesticidas pueden también incrementar la producción de la proteína beta-amiloide y generar Alzheimer. El propoxur, insecticida del grupo de los N-metilcarbamatos es uno de los agentes más empleados para el control de insectos tanto domésticos como en los campos agrícolas en los países subtropicales, se ha demostrado que es un inhibidor de la colinesterasa y por tanto un potente neurotóxico pero no induce mutaciones.

MicroRNAs.

Son secuencias de una sola hebra de RNA que contienen entre 21 y 23 nucleótidos que se transcriben a partir de DNA pero no se traducen en proteínas. Forman parte del grupo de los RNAs no codificantes. Su función es la de regular la expresión génica mediante el control de la estabilidad de los RNAs mensajeros y de la traducción. Los microRNAs pueden ser totalmente complementarios a los RNAs mensajeros, cuando ambos RNAs se aparean se produce entonces la degradación del mensajero. Cuando son parcialmente complementarios al RNA mensajero, entonces su papel en la regulación de la expresión génica se realiza bloqueando la traducción del mensajero. Puede suceder que un solo microRNA regule la expresión de cientos de genes blanco o bien puede suceder lo contrario que un gen sea regulado por cientos de microRNAs.

Los microRNAs juegan un papel importante en el desarrollo, la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. Los pesticidas producen cambios en el epigenoma los cuales pueden deberse a cambios en el perfil de expresión de los microRNAs y por tanto conducen a cambios en la regulación de la expresión génica lo cual explica, al menos en parte, los efectos nocivos de los pesticidas. El insecticida organofosforado diclorvos ha mostrado alterar el perfil de expresión de los microRNAs demostrándose entonces que este pesticida actúa por vía epigenética. Otras investigaciones realizadas en el pez cebra, en el cual se evaluaron los efectos del fipronil, del trifluorometil y del triazofos mostraron modificaciones en la expresión de los microRNAs sugiriendo su papel en la toxicidad de los pesticidas por lo cual el empleo de los microRNAs podría convertirse en un biomarcador novedoso de la toxicología.

De acuerdo con la Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (EPA) la mayoría de los pesticidas que actualmente se emplean en ese mercado han mostrado no ser genotóxicos, por lo que se postula que su mecanismo de acción podrían involucrar procesos epigenéticos (Collota et al. 2013).

PESTICIDAS

Son un grupo de compuestos químicos muy heterogéneos diseñados para el control de plagas. Se emplean para la protección de los productos agrícolas desde su siembra hasta su cosecha así como en la salud pública para controlar vectores de enfermedades y en la industria para proteger de la degradación biológica maquinarias, insumos y productos. Por tanto se usan para controlar organismos no deseados ya sea porque producen su muerte o bien porque impiden su crecimiento (de Souza et al. 2016). Los pesticidas son moléculas bioactivas que tienden a formar metabolitos electrofílicos capaces de reaccionar y combinarse mediante la interacción con diversas moléculas biológicas. Prefieren como sitios de acción los átomos nucleofílicos de oxígeno y de nitrógeno los cuales son abundantes en el DNA y predisponen a cambios en el material genéticos mediante la formación de puentes covalentes (Rodrigues, 2002). El empleo de productos químicos sintéticos se incrementó de forma considerable a partir de la segunda guerra mundial del siglo XX, tanto los pesticidas como los fertilizantes fueron responsables de la revolución verde al permitir los primeros la erradicación de plagas en los cultivos con valor alimenticio y los segundos el incremento en el crecimiento vegetal debido al enriquecimiento del suelo. Su empleo ha permitido el control de epidemias severas como la malaria y algunas encefalitis, sin embargo,

su uso intensivo e indiscriminado ha provocado grandes desórdenes ecológicos en el planeta además del aumento en el fenómeno de resistencia.

Desarrollo histórico de los pesticidas

El uso de pesticidas en la agricultura es muy antiguo, Homero (siglo VIII a.C.) menciona que el azufre era empleado como fumigante, mientras que Plinio el Viejo (23-79 d. C.) recomienda el uso de arsénico como insecticida y el empleo del aceite de oliva en los cultivos de leguminosas. La leyenda del mercader de Venecia Marco Polo (1254-1324) señala que uno de los primeros pesticidas utilizados en Europa fue el piretreno que Marco Polo llevó a China a finales del siglo XIII. Las piretrinas, el polvo y el extracto de las piretrinas, son un grupo económicamente importante de insecticidas vegetales naturales. Estos compuestos se derivan de las flores secas del piretro *Chrysanthemum cinerariaefolium* (fam. Compositae). La nicotina se usaba en Europa desde el siglo XVIII para el control de insectos no deseados, mientras que algunas sales de diversos metales y elementos químicos diversos (mercurio, zinc, fósforo, cobre y plomo) se emplean desde el siglo XIX para controlar plagas en los cultivos (Rodríguez-Arnaiz, 1994). Aunque los pesticidas suelen ser selectivos para el organismo que combaten también son nocivos, aunque en menor grado, para otras especies. En el hombre son tóxicos tanto por envenenamiento accidental agudo, que se da en los trabajadores del campo, como por exposición crónica a través de los residuos que existen en los alimentos que diariamente consumimos.

El insecticida DDT (diclorodifeniltricloroetiletano) fue desarrollado en 1945 para controlar a los mosquitos portadores de la malaria. Se estima que el DDT

salvó tantas vidas humanas como las otras tantas que murieron durante la Segunda guerra mundial (unos 30 millones de personas). El DDT es un veneno de contacto que afecta al sistema nervioso central de los insectos, pero en ratas de laboratorio produce cambios en el hígado. El DDT es insoluble en agua, sólo lo es en las grasas corporales; además se acumula en las cadenas tróficas. En mamíferos el insecticida produce estimulación del sistema nervioso central e interfiere con dos transmisores nerviosos: la acetilcolina y la norepinefrina. Además altera el transporte de los iones sodio y potasio en los canales iónicos de las membranas de las células nerviosas.

Por su parte los insecticidas organofosforados (ORGF) como el paratión son mucho más tóxicos ya que inhiben a las colinesterasas, enzimas que hidrolizan a la acetilcolina hasta acetato y colina. La acumulación de acetilcolina en las células puede llegar a ser letal ya que provoca una estimulación excesiva de las células nerviosas. Este mecanismo de acción se debe a que la acetilcolina y los insecticidas organofosforados tienen el mismo sustrato, la enzima acetilcolinesterasa. En el caso del neurotransmisor la degradación se realiza por hidrólisis mientras que en el caso del insecticida éste se mantiene unido a la enzima formando un complejo, que a pesar de ser hidrolizado lentamente, tiende a provocar la acumulación de acetilcolina en la célula.

En cuanto a los herbicidas, éstos fueron desarrollados entre los años 1930 y 1940, la mayoría de ellos tienen actividades similares a las de las hormonas que se presentan en las plantas, razón por la cual no son persistentes y por tanto no representan un problema para el ambiente, excepto aquellos elaborados a base

de arsénico que si son muy persistentes. En los seres humanos las intoxicaciones por herbicidas suelen ser muy raras y accidentales. Por ejemplo, el paraquat, un herbicida que se emplea para erradicar los plantíos de mariguana, puede provocar, cuando los trabajadores ocupacionalmente expuestos lo hacen sin protección, fibrosis pulmonar.

Clasificación de los pesticidas

Los pesticidas pueden clasificarse de acuerdo a diversos parámetros, tales como: (i) Por el organismo al que combaten en insecticidas, herbicidas, fungicidas, rodenticidas, acaricidas, molusquicidas y larvicidas, entre otros. (ii) Para propósitos de regulación se clasifican en repelentes, reguladores del crecimiento de plantas. (iii) Con base en sus estructuras químicas los insecticidas se clasifican en organoclorados, organofosforados, ciclodienos, carbamatos y piretroides. (iv) Por su acción se clasifican en inhibidores de la acetilcolinesterasa, inhibidores de los canales iónicos. (v) Por su toxicidad y con base en LD₅₀ la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (por sus siglas en inglés IARC) los clasifica en cinco grupos de acuerdo con su carcinogenicidad: Carcinogénicos para los seres humanos, probablemente carcinogénicos para los seres humanos; posiblemente carcinogénicos para los seres humanos; clasificados como no carcinogénicos. para los seres humaos y probablemente no carcinogénicos para los seres humanos.

Algunos pesticidas son muy persistentes y resistentes a la degradación ambiental mediada por procesos químicos, biológicos o fotolíticos, y además tienden a acumularse en el tejido adiposo cuando son liposolubles.

La exposición a los pesticidas en los seres humanos puede causar efectos agudos como simples irritaciones en la piel y en los ojos hasta efectos crónicos generándose alteraciones severas en el sistema nervioso debidas a la neurodegeneración (Parkinson y Alzheimer). Pueden también verse alterados diversos parámetros reproductivos como abortos, infertilidad y defectos durante la embriogénesis.

En la actualidad están registrados 6,400 ingredientes activos que conforman al grupo de los pesticidas y sus productos de transformación tales como adyuvantes y solventes que se emplean en la formulación de alrededor de 100,000 productos comerciales (Kegley et al. 2016). El mercado de los pesticidas ha cambiado alrededor del mundo mientras que en los países desarrollados la regulación y legislación sobre su uso es muy estricta, en los países en vías de desarrollo los productos químicos y las mezclas de pesticidas prohibidos en los países del primer mundo se emplean cotidianamente. Una consecuencia de las restricciones sobre el empleo de los pesticidas en los últimos años ha hecho que los organofosforados y los carbamatos se han ido reemplazando por insecticidas menos tóxicos como los piretroides. Sin embargo en los países del tercer mundo se siguen empleando todos los pesticidas en grandes cantidades.

La aplicación de los pesticidas suele no ser uniforme a pesar del empleo de la maquinaria más sofisticada, por tanto algunas especies se ven más afectadas que otras. Además la plaga puede no ser uniforme en cuanto a la edad y momento del ciclo de vida de sus miembros, por lo cual una dosis puede ser letal para un estadio vital pero no para otro. Adicionalmente las poblaciones estresadas por el

uso de pesticidas pueden sobrevivir a bajas dosis y generar un aumento significativo de mutaciones y además el pesticida actúa como un agente que selecciona a los individuos resistentes que en las siguientes generaciones irán siendo más numerosos. La resistencia en individuos y poblaciones produce un aumento en la cantidad de pesticida aspersada lo que permitiría un aumento en la productividad de un cultivar específico. Este hecho suele afectar a un número importante de organismos no blanco y producir daños severos en el ambiente, tales como, flora y fauna, fuentes de agua, suelos y atmósfera (Mckenzi, 1999).

La red de acción de pesticidas (*PAN-Pesticide Action Network*) publicó en 2013 la lista de los plaguicidas más peligrosos la cual incluye a 400 productos. Los más utilizados en la agricultura, de acuerdo con la FAO (2010) son los herbicidas (48%) seguidos de los insecticidas (32%) y de los fungicidas (20%). La combinación de diferentes ingredientes en la formulación de los pesticidas puede llevar al establecimiento de resultados no predecibles debido a las interacciones aditivas, sinérgicas y de potenciación que pueden ocurrir (Pan International 2013 <http://www.pan-germany.org>).

Un bioindicador es un organismo, parte de un organismo o una comunidad de organismos que refleja los diferentes niveles de contaminación ambiental tanto en los ecosistemas como en los laboratorios. El organismo expuesto puede exhibir diversos cambios tanto histológicos, como celulares, moleculares, bioquímicos, fisiológicos y conductuales (Depledge et al. 1993). El monitoreo biológico es por tanto una herramienta muy útil que aporta información muy valiosa acerca del riesgo genético que deriva de la exposición a diversos compuestos químicos. Un

biomarcador es una característica que se puede medir y que permite evaluar un proceso biológico, es decir, la respuesta del organismo después de la exposición a un xenobiótico. Existen diversos tipos de biomarcadores:

(1) De Efecto – Biomarcador que evidencia una alteración bioquímica, fisiológica o de comportamiento asociado a una enfermedad. Se puede medir a través de:

- Recuento de eritrocitos, leucocitos y trombocitos
- Inhibición de enzimas del grupo HEMO
- Niveles de proteínas en orina
- Marcadores de citotoxicidad
- Niveles de células necróticas
- Niveles de anticuerpos

(2) De Susceptibilidad – Biomarcador observable dependiendo de la sensibilidad individual a algún agente xenobiótico. Se analiza el:

- Polimorfismo de enzimas
- Polimorfismo de la glutatión-transferasa
- Polimorfismo genético

(3) De Exposición – Biomarcador asociado al efecto asociado por una exposición a un agente xenobiótico. Se evalúa mediante el análisis de:

- Excreción de metabolitos en orina
- Aductos de ADN

- Aductos de albúmina
- Aductos de hemoglobina

Para conocer la seguridad biológica que representa el empleo de pesticidas se requiere hacer investigaciones tanto *in vivo* como *in vitro* las cuales permitirán valorar los efectos citotóxicos y genotóxicos que pudieran producirse tales como mutaciones somáticas, aberraciones cromosómicas, y daño al DNA, entre otras. Por tanto la estimación del riesgo que representa la exposición a diversos pesticidas en los seres vivos, se vincula con el daño que puedan producir en el material genético.

Analizaremos de forma somera los efectos que producen diversos pesticidas, de acuerdo con el uso, clasificación, mecanismos de acción y resistencia.

Herbicidas

Son productos químicos que impiden diversos procesos metabólicos en las plantas, pueden alterar el desarrollo normal de la planta o provocar la muerte. Los efectos fisiológicos que alteran los herbicidas son la regulación del crecimiento, la inhibición de la división celular, la inhibición de la fotosíntesis y/o de la respiración e interrupción de procesos metabólicos complejos. Entre éstos se ha demostrado que los herbicidas pueden inhibir a la acetil coenzima A carboxilasa lo que se traduce en la inhibición de la biosíntesis de los ácidos grasos; la inhibición de acetolactato sintasa enzima que cataliza la biosíntesis de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina cuya deficiencia provoca una reducción en la tasa de división

celular; la inhibición de la enzima protoporfirinógeno oxidasa involucrada en la formación de porfirinas moléculas precursoras de la clorofila.

Los herbicidas pueden clasificarse de acuerdo con diferentes parámetros, tales como, el tiempo de aplicación (presembrado, preemergencia y postemergencia) su selectividad, su movilidad en la planta (sistémicos y de contacto), por su familia química (clorofenólicos, nitrofenólicos, triazinas, bipirilos, entre otras), por su mecanismo de acción (inhibidores de diversas enzimas, inhibidores de la fotosíntesis, inhibidores de la síntesis de pigmentos, entre otras) y por su resistencia (específica, cruzada y múltiple). Sin embargo en 2010 tanto la Sociedad Americana de Malezas (*WSSA-Weed Science Society of America*) como el Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas (*HRAC- Herbicide Resistance Action Committee*) han clasificado a los herbicidas por su mecanismo de acción (Tabla 2).

Tabla 2. Mecanismo de acción de diversos herbicidas, tipo de herbicida y principio activo, de acuerdo con la clasificación de WSSA y HRAC 2010.

MECANISMO DE ACCION	TIPO DE HERBICIDA	PRINCIPIO ACTIVO
Inhibidores de la acetil coenzima A carboxilasa	Arilxifenoxipropionatos	Fenoxaprop Propaquizaprop
	Ciclohexanodionas	Aloxidim Cletodim Propoxidim
Inhibidores de la enzima acetolactato sintasa	Sulfonilureas	Iodosulfuron Triasulfuron
	Imidazolidinas	Imazamox Imazpic Imazapir Imazaquin
	Triazolopirimidinas	Diclosulam Penoxsulam
Inhibidores de la S-enol-piruvilshikamato-3-fosfato sintasa	Glicinas	Glifosato
Inhibidores de la glutamino sintasa	Ácidos fosfínicos	Glufosinato
Inhibidores de la 7,8-dihidropteroato sintasa	Carbamatos	Asulam

Inhibidores de la protoporfirógeno oxidasa	Difelieteres	Acifluorfen Lactofen Oxifluorfen
	Triazolinonas	Sulfentrazone
	Pirimidionas	Butafenacil Safofenacil
Inhibidores del fotosistema I	Bipiridilos	Diquat Paraquat
Inhibidores de la fotosíntesis del fotosistema II	Triazinas	Amatrina Atrazina Simazina Terbutrina
	Triazinonas	Metribucin
	Uracilos	Bromacil Tebracil
	Fenilcarbamatos	Fenmedifam
	Ureas	Diuron Linuron Tebutiuron
	Amidas	Propanil
	Benzotiadiazinonas	Bentazon
Inhibidores de la síntesis de carotenoides	Piridin carboxamidas	Diflufenican
	Isoxazolidinonas	Clomazone
	Difenil eteres	Aclonifen
	Ácido benzoico	Dicamba
	Ácidos piridin carboxílicos	Clopiraldid Picloram
Inhibición de la división celular	Dinitroanilinas	Dinitramina Trifuralina
	Carbamatos	Clorprofam
	Cloroacetamidas	Aceticlor Alaclor Metolacoloro
Acción similar al ácido indolacético	Ácidos fenoxicarboxílicos	2,4-D 2,4-DB 2,4,5-T
Inhibidores de la síntesis de celulosa	Ácidos quinolín carboxílicos	Quinclorac
Inhibidores de la síntesis de lípidos	Tiocarbamatos	Butilate Molinate
	Ácidos cloro carbónicos	Dalapon

La toxicidad de los herbicidas en mamíferos e insectos suele ser muy baja aunque la genotoxicidad puede ser considerable. Los herbicidas clorofenólicos como el 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) y el 2,4,5-triclorofenoxiacético

(2,3,5-T) suelen unirse a proteínas y en concentraciones elevadas generan daño en los músculos estriados de los mamíferos, son capaces también de desacoplar la fosforilación oxidante. El pentaclorofenol (PCP) se emplea en aserraderos para la conservación de la madera. Los herbicidas del grupo de los nitrofenoles y nitrocreosoles son ampliamente usados ya que además de su acción en plantas y malezas tienen propiedades que combaten a ácaros, nematodos y hongos. Son biotransformados por reducción del grupo nitro a amino y posteriormente son conjugados. Los herbicidas bipiridílicos como el paraquat y el diguat se emplean para el control de maleza, hierbas y mariguana. El paraquat genera radicales libres y por tanto peroxidación de lípidos. El paraquat afecta a los pulmones mientras que el diquat afecta a los riñones.

Insecticidas

Un insecticida es un compuesto químico utilizado para matar insectos. Los insecticidas orgánicos sintéticos se desarrollaron durante el siglo XX, por orden de aparición en el mercado son:

- Organoclorados (ORGC). Como: DDT, clordano, dieldrin
- Organofosforados (ORGF). Como: paratión malatión, temephos, chlorpyrifos.
- Carbamatos (CARB). Como: carbaryl, carbofuran, pirimicarb
- Ciclodienos (CICL). Como el dieldrin y el heptacloro
- Piretroides (PIR). Como: permetrina, cipermetrina, bifenthrin, cyalothrin, cyfluthrin.

De origen biológico como las toxinas de *Bacillus thuringensis*, la nicotina, la giberelina.

Se han establecido diversas características, ideales, que un insecticida debe tener antes de salir al mercado, entre ellas, se mencionan la especificidad, la baja toxicidad para los seres humanos, baja toxicidad para los animales, poca persistencia en el ambiente. Características que por cierto que rara vez se presentan en los insecticidas.

Los insecticidas se utilizan en los diferentes ámbitos, tales como: la agricultura, la ganadería, el control de plagas domésticas, en la veterinaria y en la construcción. Los mecanismos de acción de los insecticidas pueden afectar tanto a los huevecillos, como a las larvas y a los adultos. Se ha demostrado que el contacto extendido del ser humano con insecticidas puede producir indigestión, dolores de cabeza, vómitos, manchas en la piel y dolor en los ojos. También puede ocasionar reacciones alérgicas.

Los insecticidas organoclorados (DDT, aldrín, lindano) se absorben a través de la piel, el intestino y los pulmones. La mayoría de los insecticidas organoclorados requieren ser biotransformados generándose metabolitos que pueden medirse en la orina. Algunos de ellos pueden almacenarse en el tejido adiposo debido a que su degradación en el cuerpo es muy lenta. Algunos organoclorados aumentan la irritabilidad del miocardio lo que genera arritmias. Los ciclodienos (dieldrín, heptacloro) son liposolubles y muy persistentes. Tanto el DDT como los ciclodienos inducen a los citocromos P450 lo cual acelera su excreción pero también promueve la biotransformación de sustratos endógenos

como las hormonas esteroideas. La persistencia del DDT en el ambiente es de 20 años.

Los insecticidas organofosforados se han convertido en los pesticidas más empleados, a partir de la prohibición en el empleo de los organoclorados, hecho que ocurrió hace más de 20 años. Actualmente los organofosforados se emplean tanto en la agricultura como en las casas y jardines así como en la práctica veterinaria. Se absorben por inhalación, penetración dérmica e ingestión. Todos son tóxicos y actúan inhibiendo a la colinesterasa. La fosforilación de la enzima acetilcolinesterasa en mamíferos e insectos es el principal mecanismo de acción de estos pesticidas. La acetilcolinesterasa es la enzima involucrada en el control de la transmisión nerviosa que corre desde las fibras nerviosas hasta las células musculares, las células glandulares y otras células nerviosas del Sistema Nervioso Central. Una alta concentración de acetilcolina en las neuronas colinérgicas puede producir contracciones musculares y secreción en tanto que en las uniones músculo-esqueleto puede provocar espasmos musculares y/o despolarización de la placa terminal provocando parálisis.

Los carbamatos se emplean también en diferentes ámbitos: agricultura, jardines y el hogar. Inhiben también a la acetilcolinesterasa pero su mecanismo de acción es a través de la carbomilación reversible formando carbamilo-acetilcolinesterasa que se disocia rápidamente por lo cual los efectos sobre las uniones neuroefectoras parasimpáticas y del músculo-esqueleto tienden a limitar la duración del envenenamiento.

Los insecticidas de origen biológico, también llamados bioinsecticidas, son productos de origen natural o incluso organismos vivos que sirven también para el control biológico de insectos. Se diferencian de los insecticidas sintéticos en su origen natural, son menos agresivos contra el medio ambiente, no suelen ser tóxicos para organismos superiores y plantas (CICOPLAFEST, 2004). También suelen ser más efectivos ya que evitan que los insectos desarrollen resistencia a los mismos, lo que suele ocurrir con los insecticidas sintéticos. El azadiractin que se extrae del árbol de Neem (*Azadirachta indica*) regula el desarrollo de los insectos ya que interactúa con la ecdisoma impidiendo la metamorfosis. Las toxinas de la bacteria *Bacillus thuringensis* son patógenas para moscas y mosquitos. Las distintas cepas se cultivan en el laboratorio, se cosechan las esporas las que sirven para formular los polvos que se aplican a los cultivos. El eugenol que se extrae del clavo (*Syzygium aromaticum*) se emplea para atraer insectos. La giberelina es una hormona de crecimiento que se extrae de los hongos del género *Giberellum*. La nicotina, alcaloide que se extrae de *Nicotiana tabaccum*, se emplea como fumigante y repelente de perros y conejos. El piretreno que se extrae de las hojas secas del crisantemo es un insecticida muy potente es lipofílico por tanto penetra fácilmente en las células. El producto natural es poco estable en presencia de luz mientras que los productos sintéticos, las piretrinas, si lo son. La cebadilla (*Elephantopus mollis*) se emplea en polvo para matar ectoparásitos. La estreptomicina (*Streptomyces griseus*) se emplea para el control de bacterias en diversos cultivos.

En la tabla 3 se muestran algunos ejemplos de insecticidas, su blanco celular y mecanismo de acción.

TABLA 3. Mecanismos de acción, blanco y características químicas de algunos insecticidas (Modificado de www.scielo.org.pe/img/revistas/rins/v25n1/a11tab01a.pdf).

TIPO DE INSECTICIDA	BLANCO	MECANISMO DE ACCIÓN	EJEMPLOS
Organofosforados Carbamatos	Inhibidores de la acetilcolinesterasa	Interrumpen la transmisión de los impulsos nerviosos	Clorpirifos Diazinon Malatión Paratión Aldicarb Carbaril Metomil
Organoclorados Piretroides	Moduladores del canal de sodio	Interfieren con los canales de sodio interrumpiendo la transferencia de iones	DDT Alletrin Cipermetrina Deltametrina
Ciclodienos Fenilpirazoles	Antagonistas del canal de cloro regulado por GABA	Interrumpen la transferencia de iones y la transmisión del impulso nervioso	Clordano Endosulfan Fipronil
Agonistas	del receptor de acetilcolina tipo nicotínico	Imitan la acción del neurotransmisor interrumpiendo la transmisión nerviosa	Imidacloprid Neonicotinoideos Nicotina Spinocid
Agonista	De la ecdisoma	Interfiere con el proceso de muda del insecto	Azadiractin Halofenoid
Análogos	De la hormona juvenil	Interfieren con la hormona juvenil	Fenoxicarb Metropeno Piriprofixen
Activadores	Del canal de cloro	Se adhieren a los canales de cloro e interrumpen la transmisión nerviosa	Abamectina
Especies de <i>Bacillus</i> y cultivos transgénicos que expresan las toxinas de <i>B. thuringensis</i>	Membrana de los intestinos de los insectos	Interrumpen la continuidad de las membranas intestinales de los insectos	<i>Bacillus thuringensis</i> , y Subespecies: <i>aizawai</i> , <i>kurstaki</i> , <i>tenebrionis</i>

Fungicidas

Se emplean para la protección de las semillas en graneros, durante su almacenamiento pero también durante su transporte y germinación. Asimismo se utilizan para la protección de cultivos maduros. También suelen emplearse en la industria del papel, y para el control de mohos en alfombra y telas. Los fungicidas más empleados se elaboran a partir de compuestos de cobre, cadmio y mercurio así como de tiocarbamatos.

Fumigantes

Son plaguicidas volátiles con propiedades importantes en cuanto a su difusión y penetración inclusive a través de la ropa de hule y neopreno. Algunos son gases a temperatura ambiente como el óxido de etileno, el bromuro de metilo, el cianuro de hidrógeno y el fluoruro sulfídrico; otros son líquidos como el tetracloruro de carbono y otros son sólidos como el naftaleno y el paradiclorobenceno.

Uso de pesticidas en México y el mundo

Según las proyecciones mundiales para el año 2020 el crecimiento de la toda la población superará los 7.500 millones de habitantes. La disminución de la fertilidad del suelo y el cambio climático han planteado, asimismo, la preocupación de la sostenibilidad en la productividad agrícola mundial actual. Las estrategias futuras para el aumento de la productividad agrícola tendrán que centrarse en una utilización más eficiente y sostenible de los recursos nutricionales disponibles para la población global (Gruhn et al. 2000). El crecimiento demográfico aunado al aumento en el consumo de alimentos, por el incremento simultáneo tanto del ingreso per cápita como de la elevada tasa de urbanización, son factores que generan la necesidad de incrementar la producción de alimentos. La inversión en

agricultura constituye una de las estrategias más eficaces para reducir la pobreza y el hambre y promover la sostenibilidad. La innovación tecnológica parece ser una posible solución a las demandas que se plantean en cuanto a “la necesidad de producir más alimentos en cada vez menos superficie agrícola” (FAO, 2012). Bajo este contexto, una de las principales innovaciones se centra en el sector de los agroquímicos, dónde se incluyen a los plaguicidas y a los fertilizantes. Por otra parte, es necesario destacar que una de las consecuencias más graves del proceso de intensificación de la agricultura es su impacto negativo sobre el ambiente tanto en México como en otros países, lo que ha desencadenado el uso masivo e indiscriminado de diversos agroquímicos con las consecuencias adversas que éstos producen en la biota y en el ambiente. Hechos que han propiciado una alerta entre los investigadores debido al impacto negativo que produce el empleo indiscriminado de pesticidas tanto para otras especies expuestas cuando se realiza la aspersion, como para los seres humanos y para el ambiente. De modo que el uso de agroquímicos ha aumentado de manera continua a escala mundial, sin embargo, se observa una clara tendencia en la reducción de su empleo en los países desarrollados y un aumento intensivo de aplicación en los países en desarrollo (Torres y Capote, 2004). Los países en vías de desarrollo son los consumidores más importantes de agroquímicos, ya que utilizan un 75% de la producción mundial de los mismos. Esto se debe a que su productividad está limitada debido a la aparición frecuente de plagas, de enfermedades que afectan a los cultivos y del fenómeno de resistencia. En el caso de los países iberoamericanos, el modelo de agricultura intensiva basado en organismos transgénicos o genéticamente modificados (OGM) es el que

actualmente se ha venido aplicando, especialmente en Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay y Uruguay (Pengue y col. 2004; Satorre, 2005). Sin embargo, este modelo no cuenta con una evaluación crítica, ni con estrictas regulaciones, ni con la adecuada información disponible por parte de los países que lo utilizan (Gómez-Arroyo y col. 2013). Por otra parte, debido a las condiciones socio-económicas de los países en vías de desarrollo, a la falta de cuidado en la aspersion de los productos por parte de los trabajadores del campo, a las condiciones de salud, y a la desnutrición la exposición a los agroquímicos resulta ser preocupante. La República Mexicana no parece ser ajena a esta tendencia en el aumento en el uso indiscriminado de agroquímicos. Durante los últimos 20 años en México, el área sembrada se extendió cerca del 35% y la producción de trigo, maíz, girasol y soya aumentó de 40 a 67 millones de toneladas, representando por consiguiente alrededor del 66% de la superficie territorial total, mientras que el empleo de agroquímicos ascendió a un 600%. La extensión de cultivo de soya transgénica en 2012 alcanzaba los 20 millones de toneladas, empleándose 200 millones de litros de glifosato para producir 50 millones de toneladas de soya por año. La soya RR (*Roundup Ready*) o soya 40-3-2 es una variedad resistente al herbicida glifosato. Su comercialización fue admitida por primera vez en 1996 en los Estados Unidos (Padgett. et al. 1995) Utilizando un gen de resistencia a este herbicida proveniente de una bacteria del suelo (*Agrobacterium*) y por medio de ingeniería genética (transgénesis), se obtuvieron las primeras plantas de soya resistentes a glifosato, denominadas *evento 40-3-2*. A partir de tal evento, se obtuvieron decenas de variedades de soya que manifiestan idéntica resistencia. El glifosato actúa en todas las especies vegetales inhibiendo la actividad de las

enzimas que sintetizan los aminoácidos aromáticos. Estos aminoácidos son necesarios en la fotosíntesis y por ello las plantas al no poder sintetizarlos mueren o frenan considerablemente su crecimiento. La soya transgénica puede resistir al glifosato porque posee la enzima β .glucuronidasa proveniente de *Agrobacterium tumefaciens*, que cataliza el rompimiento de carbohidratos complejos, que resisten la aplicación del glifosato. Por ello, al aplicarse glifosato sobre un cultivo de soya en crecimiento se secan las malezas y continúa creciendo el cultivo de soya sin verse afectado. Durante los últimos años, se acrecentó el cultivo de la soya en México mediante los permisos otorgados por el gobierno federal en 2012 a la transnacional Monsanto para la siembra de soya transgénica RR en 253 mil hectáreas en el sureste. El cultivo de soya transgénico afectó a las abejas y por tanto a la producción de miel en la Península de Yucatán (Campeche, Yucatán y Quintana Roo) de la cual el 90% se exporta a Europa; además organizaciones sociales y las comunidades mayas afectadas en varios municipios lograron la revocación del permiso a Monsanto en el sureste en 2017 debido a la falta de una consulta libre, informada y culturalmente adecuada a dichas comunidades cuyos territorios fueron afectados.

Dentro del mercado de los plaguicidas en México, según lo comunicado por el INEGI, los herbicidas lideran el volumen de ventas (INEGI, 2014). Cabe señalar, asimismo, que mientras los fungicidas e insecticidas representan un 15% y 17% del total de plaguicidas, respectivamente, el volumen total de herbicidas comercializado asciende al 59% (INTA, 2012). Dentro de los herbicidas más

utilizados en todo el mundo, el glifosato se encuentra a la cabeza de las ventas, situación que también se observa en México.

NANOPARTÍCULAS Y NANOPESTICIDAS

Las nanopartículas diseñadas tienen una dimensión de 1 a 100 nm y poseen propiedades físico-químicas únicas tales como un área superficial grande en proporción a su volumen, muchos sitios reactivos en su superficie y una fracción grande de átomos localizados en su cara exterior. Estas características facilitan su difusión ya que el coeficiente de difusión es inversamente proporcional al diámetro de la partícula. Su empleo hoy día es considerable tanto en la industria (del plástico, vestido, cosméticos, pinturas y alimentos) como en el campo biomédico y en el cuidado de la salud (obtención de imágenes médicas para el diagnóstico, apósitos para heridas, vehículos para medicamentos y terapias) (Kumar y Dhawn, 2013).

Se sabe que el tamaño de la partícula influye en la movilidad biológica en términos de la absorción, distribución, metabolismo y excreción. De modo que el destino subcelular de las partículas es dependiente de su tamaño: las partículas mayores a 500nm son engullidas por los fagocitos, mientras que las de menor tamaño son tomadas por pinocitosis. La nanoencapsulación para la entrega de compuestos terapéuticos se relaciona con la hipótesis que establece que la respuesta tóxica de un compuesto químico puede estar influenciada por el tamaño del portador-acarreador (Kah, 2015).

La habilidad para inducir toxicidad - medida a través de parámetros tales como muerte celular, daño a las mitocondrias y lesiones oxidantes - de las partículas en la escala nanométrica (~ 200nm) y micrométrica (~ 2200nm) - de diversos óxidos de metales (CuO, FeO₃, FeO₄ y TiO₂) mostró que en ambas escalas las partículas de cobre fueron las más tóxicas, seguidas de las de titanio y fierro (Karlsson et al. 2009).

Debido a su pequeño tamaño la probabilidad de interacción con los organelos y las macromoléculas de la célula es muy alta. Estas interacciones pueden dañar al material genético y a los organelos celulares tanto por daño físico como a través de la modulación de las rutas bioquímicas (Kumar y Dhawn, 2013).

La genotoxicidad inducida por las nanopartículas puede atribuirse a su interacción directa con el material genético e indirecta debida a la liberación de iones de la parte soluble de las nanopartículas. Otros efectos que pueden inducir la genotoxicidad son la interacción de las nanopartículas con las proteínas citoplasmáticas o nucleares; la unión con el aparato mitótico; el aumento en el estrés oxidante; la alteración del ciclo celular; la inhibición de las defensas antioxidantes; la inactivación de las proteínas involucradas en la reparación del daño inducido debido muy probablemente a la generación de radicales libres de oxígeno (ROS) (Bailén-Moscoso y Romero Benavides, 2016).

Los nanopesticidas se consideran productos que protegen a las plantas y al medio ambiente. Se ha reportado el uso de nanopesticidas de forma prioritaria en las formulaciones de insecticidas (55%) seguidas de las formulaciones de fungicidas (30%) y de herbicidas (15%). Las nanoformulaciones con propósito

insecticida se explican por el hecho de que la mayoría de las formulaciones comerciales de insecticidas tiene poca solubilidad en agua aunado al hecho de que el uso de insecticidas alternativos (nanoinsecticidas) son probablemente menos dañinos para organismos no blanco y porque son potencialmente capaces de reducir el desarrollo de resistencia. Las formulaciones nanotecnológicas son menos dañinas para el ambiente porque emplean nanocarreadores como polímeros de origen natural que son biodegradables (Kah y Hofmann, 2014).

Las nanoemulsiones son formulaciones en las cuales se persigue aumentar la solubilidad de los ingredientes activos manteniendo la concentración de surfactantes baja (alrededor de 5 a 10%) aumentando su biodisponibilidad. La tecnología de encapsulación involucra atrapar un ingrediente activo dentro de una cubierta polimérica de tamaño promedio de entre 20 y 50 μ m, aunque se han identificado suspensiones capsuladas de entre 2 μ m hasta 200nm (Kah, 2015). Los polímeros, como el polietilenglicol, han mostrado ser muy eficaces ya que liberan lentamente el ingrediente activo y reducen la toxicidad en organismos no blanco. Otros polímeros empleados en las formulaciones son polisacáridos como el almidón, y compuestos de origen natural como el aceite de maíz y la lecitina. Las nanoformulaciones a base de polímeros son variadas: nanoesporas, nanogeles y nanofibras. Se han propuesto como alternativas a las nanopartículas poliméricas a los sólidos de lípidos y a los liposomas. También se han empleado diversas nanopartículas inorgánicas como el sílice (15 a 30nm), de plata y de aluminio (Kah y Hofmann, 2014).

TOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DE PESTICIDAS EN *Drosophila melanogaster*.

Los efectos genotóxicos de los herbicidas en *Drosophila* se empezaron a estudiar a finales de la década de los años 1980 época en la cual se tenían disponibles diversos ensayos para evaluar los cambios heredables inducidos en la línea germinal. Las primeras investigaciones reportadas en la literatura se refieren a la producción de mutaciones letales recesivas ensayo que requiere el análisis de al menos dos generaciones de moscas en las cuales se observa la letalidad inducida en alguno de los 1000 genes que porta el cromosoma X, efecto que se demostró para el herbicida uréico diuron (Rodríguez-Arnaiz et al. 1989). El diuron es un herbicida que se emplea para controlar una amplia variedad de hierbas que afectan a los cultivos de maíz, caña de azúcar, algodón, y además se utiliza en la industria. Debido a su fórmula química se ha clasificado como un compuesto del tipo de las fenilureas. El herbicida es tomado por las hierbas a través de la raíz, y translocado a las hojas, movimiento que se realiza a través del xilema. Su mecanismo de acción implica la inhibición de la fotosíntesis al bloquear la transferencia de electrones en el fotosistema II. El metabolismo básico de las fenilureas incluye a las N-desmetilaciones seguidas de la oxidación de los grupos aromáticos. El diuron aumenta la actividad de los citocromos P450 así como de otras enzimas como la glutatión S-transferasa, la epóxido hidrolasa y la glucoronil transferasa. Recientemente se demostró que el diuron es capaz de inducir la pérdida de la heterocigosis en las células somáticas de la mosca, así

como daño al DNA evaluado mediante el ensayo cometa (Peraza-Vega et al. 2016; 2017).

Muchas han sido las investigaciones realizadas para establecer los cambios heredables inducidos en células somáticas de la mosca de la fruta. El análisis de los efectos inducidos por el paraquat, herbicida extraordinariamente tóxico y sin embargo ampliamente utilizado para el control de malas hierbas, de la mariguana y de la amapola, produce daño neurodegenerativo en el cerebro de la mosca y daño neuronal amplio en todo el Sistema Nervioso Central. Produce también en las moscas disminución en la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) y aumento en el daño oxidante al DNA. El herbicida destruye a las neuronas dopaminérgicas tanto en insectos como en mamíferos, reduce la neurotransmisión en el cerebro, distorsiona las actividades motoras (caminata, actividad rotacional) y en los seres humanos se menciona que puede estar relacionado con el desarrollo de la enfermedad de Parkinson. El paraquat es un potente agente redox genera un radical libre PQ muy estable que reacciona con el oxígeno para generar un anión superóxido, especie muy reactiva que se produce por reducción de NADPH. La acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) crea un ambiente de estrés oxidante en el cual los ROS pueden producir daño a los lípidos, las proteínas y el DNA. La enzima SOD es esencial en los procesos autooxidantes produciéndose en la reacción peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. La acumulación de radicales libres se ha asociado con la neurodegeneración de regiones específicas del cerebro. Esta acumulación se vincula con el aumento de la citotoxicidad lo cual podría deberse a un decremento

en la actividad de SOD. Asimismo se encontró una correlación entre la citotoxicidad y el daño cerebral inducido (Mehdi y Qamar, 2013).

El triasulfuran es una sulfonilurea que inhibe a la lactato sintasa tanto en las semillas como en las hojas del trigo. El metabolismo en plantas es tal como ocurre en todos los eucariontes, dependiente de los citocromos P450, la edad de las semillas y la interacción con otros compuestos. El herbicida resultó ser genotóxico tanto en cepas que expresan niveles basales de los citocromos P450 denominadas estándar (ST) como en las que estas enzimas están sobreexpresadas, denominadas de alta bioactivación (HB). El metabolismo del herbicida se lleva a cabo también en el trigo el cual puede modular el efecto genotóxico ya que cuando el herbicida fue biotransformado en la planta y posteriormente fue administrado a las moscas el daño fue menor en la cepa HB pero no en la cepa ST. Por su parte el herbicida basagrán fue genotóxico en HB pero no en ST lo que demuestra que requiere ser biotransformado para producir daño en las células somáticas (Heres-Pulido et al. 2008).

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es un herbicida sistémico hormonal muy común, usado para el control de malezas de hoja ancha en cultivos como el trigo, el maíz, el arroz y otros cereales. Es el tercer herbicida más ampliamente utilizado en los Estados Unidos de Norteamérica, y el más empleado en el mundo debido a su capacidad para controlar a las especies de dicotiledóneas pero no a las monocotiledóneas. El 2,4-D fue desarrollado durante la II Guerra Mundial, por británicos de la Estación Experimental de Rothamsted, con el propósito de incrementar los rendimientos de cultivos en una

nación inmersa en la guerra. El 2,4-D se vende en varias formulaciones bajo una amplia variedad de nombres registrados. Sigue usándose por su bajo costo, a pesar de disponerse de productos más selectivos, más efectivos, y menos tóxicos. El 2,4-D se clasifica como una auxina de síntesis, es decir, se la considera una clase de fitohormona. En *Drosophila* indujo daño en las células somáticas, mientras que el ácido 4-clorofenoxiacético (4-CPA) no indujo ningún daño (Kaya et al. 1999).

Los herbicidas bentazon (una tiadicina) y las dinitroanilinas molinato, tiobencarb y trifuralin mostraron inducir respuestas muy diferentes en el ensayo somático de las alas de *Drosophila melanogaster*. El bentazon, registrado en 1975, se emplea como un herbicida post-emergente. En *Drosophila* los metabolitos del herbicida fueron mucho más tóxicos que el propio herbicida, el cual resultó además ser recombinogénico. El molinato introducido en el mercado en 1954 es biotransformado por P450 para formar un sulfóxido de molinato que luego es conjugado con el glutatión. El herbicida es capaz de inhibir a la aldehído deshidrogenasa y a la acetil colinesterasa. En el ensayo somático indujo daño genotóxico tanto en la cepa ST como en la HB. El tiobencarb desarrollado en 1970 pertenece al grupo de los tiocarbamatos y se emplea como preemergente ya que inhibe la germinación de las semillas. Es metabolizado por los citocromos P450 y resultó ser genotóxico solamente en la concentración más alta ensayada. El trifuralin derivado del dinitrotolueno inhibe el crecimiento de las raíces ya que interrumpe la mitosis, el herbicida fue positivo tanto en la cepa ST como en la HB (Kaya et al. 2004).

Con respecto a los insecticidas organofosforados en *Drosophila* se ha demostrado que la unión del insecticida clorpirifos al DNA genera aductos. Induce rompimientos de una sola hebra en el sistema cometa y rompimientos de cadena doble en células HeLa. Además induce fragmentación de DNA y apoptosis (Li et al. 2015). El insecticida organofosforado clorpirifos induce en el sistema murino daños morfológicos, formación de micronúcleos, desórdenes durante el desarrollo y toxicidad materna.

En la Tabla 4 se muestra una síntesis de los efectos genotóxicos inducidos por diversos pesticidas en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*.

TABLA 4. Efectos genotóxicos inducidos por diversos pesticidas en *Drosophila melanogaster*.

TIPO DE PESTICIDA	NOMBRE	EFEECTO GENOTÓXICO	REFERENCIA
Herbicida	Diuron	Positivo en SLRLT* Positivo en SMART* ala Positivo en cometa discos imaginales de las alas	Rodríguez-Arnaiz et al.1989 Peraza-Vega et al. 2016; 2017
Herbicida	Dalapon	Negativo en SLRLT y SCLT*	Rodríguez-Arnaiz et al. 1989
Herbicidas	Diallate Triallate	+ SLRLT - SLRTL	Sandhu et al. 1984
Herbicida	Paraquat	En el ensayo cometa: degeneración neuronal, decremento en superóxido dismutasa y daño oxidante	Mehdi et al. 2013
	Triasulfuron Basagrán	Positivo en SMART* cepa ST* Positivo en HB*	Heres-Pulido et al. 2008
Herbicidas tipo Fenoxiacetatos	2,4-D 4-CPA	Positivo en ST Negativo en ST	Kaya et al. 1999
Herbicidas	Bentazon Molinate Tiobencarb Trifuralin	Positivo en HB Positivo en HB y ST Positivo en ST Positivo en HB y ST	Kaya et al 2004
Herbicidas	Hidracida maléica Glifosato	Positivo en ST Positivo en ST	Kaya et al. 2000a

	Acido 2,4,5-tricloroenoix-acético Propanil	Positivo en ST Positivo en HB	
Herbicidas triazénicos	Amitrol Metribucin Prometrin Terbutin Bipiridol dibromido Paraquat	Positivo Todos negativos en SMART/ala	Kaya et al 2000b
Herbicidas	Alacloro Atracina Hidracina Paraquat	Todos positivos en SMART cepa ST	Torres et al. 1992
Herbicida	Alaclor Hexazinona Pirimicarb Dimetilan Metabenztiazu ron	Positivos en SMART/ojo (w/w+)	Aguirrezabalaga et al. 1994
Herbicidas imidazólicos	Imazapyr Imazapic Imazethapyr Imazamox Imazaquin	Negativo Negativo Negativo Positivo en ST Positivo en HB	Fragiorge et al. 2008
Insecticida organofosforado	Fenitotrión	Negativo en SLRLT y en SCLT	Velázquez et al. 1987
Insecticida organofosforados	Dimetoato Fenitritión Malatión Metilparatión	Negativos en White-zeste	Xamena et al. 1988
Insecticida organofosforado	Roogor (dimetoato)	Positivo en células somáticas y germinales	Tripathy et al. 1998a
Organofosforados	Metilparatión Triazofos	Negativo Positivo en SLRLT y SCLT	Velázquez et al. 1990
Organofosforado	Monocrotofos	Positivo en células somáticas y germinales	Tripathy et al. 1992
Organofosforado	Clorpirifos	+ ST +SLRLT Fragmentación de DNA y apoptosis	Patnaik y Tripathy 1993 Li et al. 2015
Organofosforados	Azametifos Diazinon Diclorvos Metilparatión	Inducen mutaciones somáticas en el ensayo SMART/ala	Cakir y Sarikaya 2005
Organofosforado	Diclorvos	Alquilación (ensayo cometa) y estrés oxidante	Mishra et al, 2014
Organofosforados	Hexametilfosforamida Dimetox	Positivos en SMART ojo (w/w+)	Aguirrezabalaga et al. 1994

	Hexametil- amina		
Fenilpirazol	Fipronil	Interacción con GABA, apoptosis, decremento de la membrana mitocondrial, estrés oxidante	Zhang et al 2015
Fenilpropazide	Espinosad	Recombinación mitótica en SMART cepa ST	Aciole et al. 2014
Carbamato	Metomil	Aberraciones y rompimientos de una hebra	Guanggang et al. 2013
Carbamato	Monocrofos (prohibido en todas sus formulaciones)	Positivo en SMART cepa ST	Tripathy et al. 1993
Arsénico	Dimetilarsé- nico	Positivo en SMART	Rizki et al. 2006
Piretroides	Transflutrin Metoflutrin	+ ST + ST	Sarikaya y Memmi 2013
Piretroide Bioinsecticida	Deltametrin Espinosad	- ST - ST	Akmoutsou et al. 2011
Piretroide	Cipermetrin	Positivo en el ensayo cometa	Mukhopadnyay et al. 2004
Piretroide	Aletrin	Negativo en SMART ST y HB	Osaba et al. 1999
Compuesto fenólico Organoclorados Organofosforados:	Piperonil butóxido Diedrin, Endrin Dimetoato, Malatión	Negativos en SMART/ala cepa ST y positivos en la cepa HB	
Fungicidas	Zineb Ziram	Positivos en células germinales y en células somáticas	Tripathy et al. 1988b Tripathy et al. 1989
Fungicidas	Captan y Captafol Mneb Zineb	Recombinogénicos Negativo en ST y HB Positivo en ST y HB Negativo en ST y HB	Rhaden-Straton 2002

*HB – cepa de alta bioactivación; SCLT – Sex chromosome loss test; SLRLT – Sex-linked recessive lethal test; SMART – Somatic mutation and recombination test; ST – cepa estándar.

LA RESISTENCIA A PESTICIDAS

La resistencia desarrollada por los seres vivos frente a diversos agentes tóxicos es un fenómeno ampliamente distribuido en la naturaleza. De acuerdo con la

Organización Mundial de la Salud, la resistencia es la capacidad que desarrollan los individuos de una especie a tolerar elevadas dosis de productos tóxicos (drogas o pesticidas) que son letales para la mayoría de los individuos de una población normal de la misma especie. En términos prácticos esto implica que para combatir a una plaga es necesario aumentar cada vez más la concentración en cantidades cada vez superiores a las que antes de la aparición de la resistencia eran eficaces (Rodríguez-Arnaiz, 1994; 2004).

La resistencia a pesticidas además del aspecto aplicado, es un magnífico modelo para estudiar las bases moleculares del cambio evolutivo, en particular la adquisición cualitativa de fenotipos diferentes. Tiene también la ventaja en la biología evolutiva de que el cambio ha sido muy rápido, se ha extendido lo suficiente y por ello puede analizarse con detalle (Rusell, 1990). La lucha en contra de los organismos nocivos ha sido una preocupación tanto en la agricultura como en la medicina. Se ha calculado que cerca del 40% de los productos potenciales de cultivo se destruyen anualmente debido a las malas hierbas y a las infecciones de bacterias, hongos e insectos, por lo que los pesticidas se emplean para controlar a esos organismos nocivos. Esta práctica ha generado no sólo problemas de contaminación ambiental sino también a nivel biológico, la selección de individuos naturalmente resistentes capaces de sobrevivir a los pesticidas. Este hecho ha llevado al incremento tanto en la dosis como en la frecuencia de aplicación de los pesticidas, lo que ha provocado en la misma población una disminución en el número de organismos susceptibles y un aumento en el número de organismos resistentes.

El fenómeno de resistencia es un problema que adquiere proporciones importantes si se considera que los insectos son la clase de organismos más numerosa del reino animal, ya que alrededor de dos terceras partes de los animales son insectos. Además los insectos tienen un gran potencial de reproducción lo que representa un obstáculo adicional en la lucha contra las especies o individuos resistentes, ya que los genes que confieren resistencia serán transmitidos a numerosos descendientes. De las cerca de 850,000 especies descritas de insectos solo algunas miles son nocivas tanto para el hombre como para otros animales. Su resistencia puede representar un problema particularmente grave en los países tropicales, donde ciertas especies pueden ser vehículos de protozoarios o microorganismos patógenos y transmitirlos a la especie humana (Rodríguez-Arnaiz, 2004).

La lucha química a base de productos naturales o sintéticos en contra de los organismos nocivos, es la más empleada en la agricultura, si bien es cierto que tiende a ser reemplazada por la lucha biológica a base de biopesticidas naturales obtenidos de diversos organismos. Entre ellos las endotoxinas que se obtienen de la bacteria *Bacillus thuringensis* que muestran propiedades de insecticida, son ampliamente utilizadas en Europa Central y Canadá, y de hecho son las únicas autorizadas para su empleo por las instancias gubernamentales competentes en esos países. Sin embargo, la capacidad de adaptación de los insectos al medio que les es particularmente hostil es sorprendente, ya que luchan en contra de todas las moléculas que tienen efecto de insecticida (Baptiste-Berge, 1998).

La resistencia a insecticidas es conocida desde hace mucho tiempo, de hecho, la primera resistencia de un insecto fue descrita en la literatura a principios del siglo XX, este reporte señala la resistencia del piojo (*Pediculus humanus*) al polisulfuro de calcio (compuesto elaborado a base de hidróxido de calcio y azufre). Años después se desarrollaron los insecticidas orgánicos y se establecieron las propiedades insecticidas del derivado clorado diclorodifeniltricloroetano (DDT) este insecticida ha sido desde entonces aplicado por vía aérea para controlar numerosas plagas agrícolas, y en particular, se sigue empleando en la India para tratar de disminuir la presencia de vectores del paludismo y de la peste. Durante la segunda guerra mundial se empleó, como ya se mencionó, para proteger a los soldados contra los insectos vectores de enfermedades. Los primeros reportes de resistencia al DDT se realizaron entre 1946 en la mosca doméstica (*Musca domestica*), y 1952 en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*). La disminución en la eficacia del DDT para controlar las poblaciones de insectos nocivos llevó al desarrollo de otros insecticidas más complejos, sin embargo, en la actualidad se conocen diversos casos de resistencias múltiples y cruzadas en diversos insectos y ácaros un tercio de los casos de resistencia concierne a las especies de importancia médica y veterinaria y dos tercios a las especies de interés en la agricultura. Por regla general la resistencia cruzada se presenta en los organismos frente al mismo grupo de insecticidas, sin embargo, en ocasiones el fenómeno se presenta también frente a insecticidas de diferente clase química (Rodríguez-Arnaiz, 2004).

El desarrollo de resistencia frente a los insecticidas puede analizarse desde diferentes puntos de vista. El hombre de campo reconoce la presencia de la resistencia porque la efectividad de un pesticida para controlar la peste en cuestión decrece. El toxicólogo observará el cambio de susceptibilidad a resistencia mediante las curvas de mortalidad con relación a la dosis empleada. El ecologista se preocupa por los residuos que dejan los pesticidas en el ambiente y su incorporación a las cadenas alimenticias. El genetista tratará de establecer las bases hereditarias de la resistencia, es decir, si ésta se debe a un gen, a variantes alélicas presentes en la población, o a varios genes. El carácter de resistencia puede heredarse de forma dominante, parcialmente dominante – intermedia - o recesiva. Estos fenotipos pueden conocerse al tratar a las poblaciones con concentraciones uniformes de los pesticidas: los individuos resistentes (R/R) sobrevivirán, mientras que los susceptibles (R/r y r/r) morirán.

La localización cromosómica de los genes que confieren resistencia puede hacerse utilizando genes marcadores. Si la resistencia es recesiva, entonces la cepa resistente se cruza por una cepa en la que cada cromosoma está marcado con un gen dominante y con inversiones en los cromosomas balanceadores que impiden la recombinación, si la supervivencia es similar en los individuos que portan dos cromosomas marcados pero mucho mayor en los que portan un cromosoma marcado, entonces el gen que confiere resistencia está en este último cromosoma. Si la resistencia es dominante se emplean cepas con marcadores recesivos; si es parcialmente dominante se observan diferentes supervivientes entre los individuos silvestres.

A pesar de que *Drosophila melanogaster* no se considera una plaga, el organismo ha desarrollado resistencia frente a diversos pesticidas. El conocimiento de su biología y de los diversos mecanismos moleculares que subyacen a la resistencia la ha hecho un modelo ideal para el estudio de estos procesos. Las tecnologías disponibles en este insecto permiten el análisis sistemático de los blancos de los pesticidas y de su metabolismo así como la identificación de diversos blancos. *Drosophila* ha mostrado muchas similitudes con otros insectos considerados plagas, en cuanto a los sitios blanco y al tipo de mutaciones que confieren resistencia. Debido a la distancia evolutiva entre *Drosophila* y otras plagas de insectos, es claro que los blancos para muchos insecticidas se han conservado. Esta conservación ha sido considerada un arma de doble filo ya que los insecticidas matarán a especies distantes y beneficiarán a los insectos que producen un daño colateral en el ambiente (Perry et al. 2011).

La resistencia a pesticidas es por tanto un ejemplo de selección natural, ya que el pesticida selecciona en una población a los individuos naturalmente resistentes los cuales se reproducen más y dejan, generación tras generación, un número mayor de prole resistente. Además la dispersión de la resistencia se ha asociado a diversas mutaciones. Actualmente la mayoría de los genes que codifican para los blancos de las moléculas insecticidas se han identificado y clonado en *Drosophila melanogaster*. La mayoría de estos blancos son receptores de enzimas muy importantes que se encuentran en el sistema nervioso del insecto cuyo envenenamiento produce su parálisis y la muerte. La clonación de estos

genes ha permitido desvelar preguntas muy importantes sobre la selección de estos caracteres adaptativos. El ácido γ -aminobutírico (GABA) es un inhibidor de la transmisión nerviosa. En los insectos GABA tiene funciones tanto de inhibición como de excitación, mediando la activación muscular en las sinapsis entre los nervios y las células musculares, y también en la estimulación de ciertas glándulas. Diversos antagonistas del ácido γ -aminobutírico (GABA) como los beta carbonilos y los ansiolíticos provocan una estimulación de las funciones pre y postsinápticas. Los insecticidas organofosforados, por su parte, afectan el metabolismo del neurotransmisor acetilcolina al inhibir a las acetilcolinesterasas generando una hiperestimulación de las vías colinérgicas. Los carbamatos y ciclodienos inhiben al receptor de GABA por lo que afectan el proceso de sinapsis. Alrededor de 450 especies de insectos y ácaros, han desarrollado resistencia a pesticidas en los últimos cuarenta años. La resistencia al DDT y a los piretroides a través de los canales iónicos de sodio tiende a ser recesiva. La resistencia a los ciclodienos debida a la insensibilidad del receptor GABA suele ser codominante mientras que la resistencia a los insecticidas organofosforados y a los carbamatos se produce por la insensibilidad a la acetilcolinesterasa y suele ser codominante o dominante dependiendo del insecticida (Bourguet et al. 1996).

Los datos acumulados de resistencia entre 1914 y 2014 muestran que el número de especies resistentes a uno o más insecticidas pasó de 1 a 586 y el número de insecticidas a los cuales una o más especies mostraron resistencia pasó de 1 a 325. El aumento en el número de casos individuales de resistencia a

insecticidas, herbicidas y fungicidas en 1920 y 2010 fue de 10,000 y 5,000 (Sparks y Nauen, 2015).

Mecanismos de la resistencia.

Los insectos, como otros seres vivos, han desarrollado una serie de estrategias para defenderse en contra de los agentes tóxicos, éstos suelen ser moléculas hidrofóbicas que necesariamente deben convertirse en hidrofílicas para poder ser eliminadas a través de la excreción. Las estrategias que han desarrollado los insectos para combatir los efectos adversos de los insecticidas han generado resistencia. Se han identificado muchos mecanismos de resistencia a insecticidas, éstos varían de acuerdo con el insecticida en cuestión, la especie de insecto y a veces entre las poblaciones de la misma especie. Muchos mecanismos confieren resistencia a todas las clases químicas de insecticidas, y muchos otros confieren resistencia cruzada a miembros de otras clases.

La manipulación de la resistencia es actualmente esencial tanto para el manejo de las plagas como para el empleo de fuentes no renovables bajo el manto que cubre la resistencia. El Comité de Acción sobre la Resistencia a Insecticidas (IRAC) ha clasificado los modos de acción de los insecticidas, una herramienta muy útil en la prevención de la resistencia cruzada basada en el sitio blanco. La guía provee información sobre los sitios riesgo que podrían generar la resistencia cruzada y promueve la rotación de insecticidas lo que se asume podría disminuir la presión de selección, que como dijimos, está relacionada con el desarrollo de la resistencia (Sparks y Nauen, 2015).

Por regla general el compuesto xenobiótico debe atravesar diversas barreras antes de llegar al sitio blanco. El insecticida tendrá primero que ponerse en contacto con el insecto ya sea atravesando la cutícula, mediante la respiración o atravesando la pared intestinal después de la digestión de los alimentos. Una vez en contacto con las células el insecticida puede ser biotransformado tanto por las enzimas de la fase I como por las de la fase II, posteriormente puede llegar al órgano blanco e interferir con una función particular o bien ser excretado. La resistencia a pesticidas involucra un número finito de reacciones bioquímicas y de opciones genéticas, cada una de ellas puede servir de modelo para el estudio del cambio evolutivo. La aclaración de cualquier modelo a nivel molecular, requiere primero del conocimiento detallado de la resistencia a nivel genético y bioquímico así como de la población particular de insectos a la que afecta.

La dominancia del fenotipo resistente y la extensión de la resistencia cruzada a otros compuestos son las primeras claves que denotan que la resistencia tiene una base genética. La resistencia puede ser *recesiva*, cuando los individuos heterocigotos (R/r) muestran una respuesta similar a los individuos susceptibles (r/r) frente a concentraciones bajas del insecticida; *dominante* cuando los individuos heterocigotos (R/r) se comportan como los resistentes (R/R) y con *dominancia incompleta* cuando la respuesta de los animales R/r es intermedia entre los susceptibles (r/r) y los resistentes (R/R). Cuando en el campo la mortalidad de los heterocigotos ocurre a dosis intermedias entre los individuos resistentes y susceptibles (R/R y r/r) entonces la dominancia se convierte en un concepto operativo, debido a que la aplicación a dosis bajas del insecticida en

cuestión produce la sobrevivencia del genotipo heterocigoto, mientras que a dosis mayores se produce su muerte. El uso repetido o el incremento en el uso del mismo insecticida seleccionará a los genotipos r/r y R/r y tenderá a fijar al genotipo R/R . Ello ocurre también en ausencia de la presión de selección que ejerce el insecticida por lo que los genotipos resistentes tenderán a fijarse en la población. Otro hecho importante que complica la caracterización de los mutantes resistentes es que en las cepas resistentes a menudo coexisten diferentes mecanismos que generan resistencia (Rodríguez-Arnaiz, 1994; 2004).

La resistencia se desarrolla a nivel de la población y puede ser heredada. La evolución de la resistencia en una población depende de la variabilidad genética existente la cual permitirá que algunos individuos sobrevivan al ser expuestos al pesticida. Estos individuos transfieren a la siguiente generación estos rasgos genéticos. Hay que considerar que cada vez que una población de insectos se expone a un pesticida se produce la selección hacia la resistencia lo que conlleva a un aumento en la población de individuos resistentes. Las etapas de desarrollo del insecto, tales como huevo, estadios larvarios y adulto pueden variar en susceptibilidad y por ende en los mecanismos de resistencia. La velocidad con la cual se establece la resistencia en una población de insectos depende de dos factores biológicos esenciales: el tiempo generacional y el número de huevos que oviposita una hembra. Hechos que se asocian con la resistencia de forma particular en aquellos insectos en los cuales el sistema de reproducción es el haploide-diploide, como en los himenópteros o insectos sociales, en el cual los machos al ser haploides expresan todos los genes que portan en su genoma. En

las especies diploides la resistencia puede estar parcialmente oculta cuando el rasgo es recesivo (Cloyd y Cowlea, 2010).

La resistencia es entonces un fenómeno evolutivo, en el cual los elementos dinámicos que la producen son muy similares en los insectos. La clasificación tradicional de la resistencia establece que se producen cambios toxicodinámicos y toxicocinéticos en la fisiología y bioquímica de las cepas resistentes e inclusive se presentan cambios en la conducta de los organismos resistentes. Un cambio toxicodinámico es aquel que se produce por alteración del sitio blanco mientras que los cambios toxicocinéticos incluyen tanto un aumento en el metabolismo, un decremento en la penetración (como el secuestro) y la excreción incrementada. De acuerdo con Brun-Barale (1998) y Cloyd y Cowles (2010), se han establecido cinco tipos de adaptaciones bioquímicas que confieren resistencia a pesticidas (Fig. 1).

Estas son:

(1) modificación de la conducta frente al agente tóxico el artrópodo evita el contacto, estrategia conocida como resistencia conductual

(2) decremento en la absorción cambio en la cutícula de la piel que reduce o retrasa la absorción, adaptación conocida como resistencia morfológica

(3) modificación del sitio blanco o resistencia fisiológica

(4) aumento en los mecanismos de desintoxicación o resistencia metabólica,

(5) falta de sensibilidad a la toxina, estrategia conocida como natural

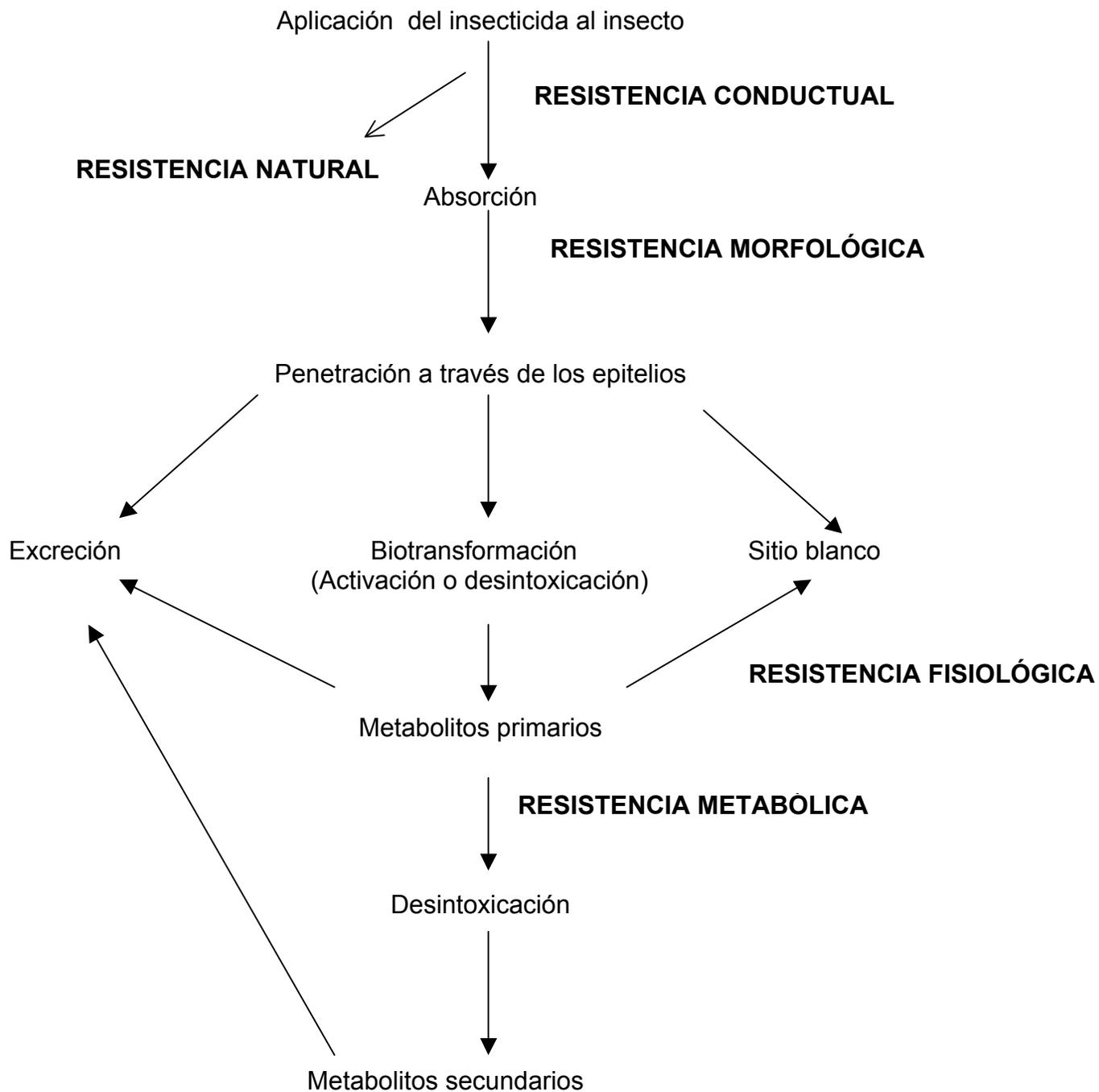


Fig. 1 Mecanismos de la resistencia a pesticidas en los insectos.

- (1) **Resistencia conductual.** Los organismos modifican su conducta frente al agente tóxico, eludiendo el contacto con los insecticidas. Es una estrategia que actualmente todavía es difícil de cuantificar y de analizar a nivel genético.
- (2) **Resistencia morfológica.** La penetración reducida a través de la cutícula puede ser el resultado de una modificación morfológica del espesor de la cutícula, mecanismo que por sí mismo no confiere resistencia, pero que, combinado con otros procesos como la desintoxicación y la excreción incrementada permite al insecto exponerse a elevadas dosis del insecticida sin mostrar sus efectos tóxicos. Es decir, la disminución en la penetración de un xenobiótico permite a los sistemas enzimáticos encargados de su biotransformación degradar a término al compuesto a medida que éste va penetrando en el organismo. La velocidad de excreción puede estar aunada a la aparición de resistencia, tal como se ha demostrado en algunas cepas susceptibles de insectos, en las que la excreción de metabolitos intermedios es 81 veces menor que en las resistentes.

El decremento en la absorción y en la penetración del insecticida es generalmente de importancia secundaria con respecto a otros mecanismos que confieren resistencia. En algunos casos la proporción de penetración está influida por cambios en la estructura de los fosfolípidos de la cutícula, cambios que influyen en la penetración de un insecticida en particular pero que pueden influir en la penetración de otros compuestos químicos no relacionados dando por resultado el fenómeno de resistencia cruzada. En la mosca doméstica la resistencia al insecticida organofosforado diclorvos resulta en la resistencia cruzada al

insecticida tipo ciclodieno dieldrin. Los genes que controlan la penetración reducida, como el *pen* que se encuentra en el cromosoma 3 de la mosca doméstica, confieren un nivel bajo de resistencia ya que retardan la penetración del insecticida. Sin embargo cuando el gen *pen* actúa en conjunto con los mecanismos que desintoxican al DDT se obtienen altos niveles de resistencia, del orden de diez veces.

(3) **La resistencia fisiológica** se manifiesta por una modificación en el sitio blanco del insecticida. La modificación se debe a la presencia de mutaciones en las secuencias codificantes de las proteínas blanco que fijan peor a los insecticidas. Los niveles de resistencia pueden estar modulados por la combinación de diversas mutaciones.

Los mecanismos moleculares de resistencia fisiológica pueden clasificarse de acuerdo al tipo de cambio genético que fue seleccionado debido a la presión del insecticida en: (a) *mutaciones genéticas que afectan la secuencia codificante del gen*, (b) *mutaciones que producen un aumento en la expresión* y (c) *mutaciones que producen un decremento en la expresión*. Las dos últimas clases de expresión génica pueden distinguirse en mutaciones que afectan al gen en su totalidad, tales como duplicaciones y amplificaciones, o bien la regulación en *trans* y/o los elementos de regulación en *cis* del gen. (Feyereisen et al. 2015).

(a) **Mutaciones genéticas que afectan la secuencia codificante del gen.** Estas mutaciones alteran estructuralmente al producto génico. Las mutaciones

incluyen cambios no sinónimos en la secuencia de la proteína. Estas mutaciones puntuales producen un decremento en la sensibilidad de los sitios blanco. Tanto las mutaciones puntuales como las pequeñas inserciones o deleciones (denominadas indels) e inclusive la inserción de transposones, pueden producir un prematuro codón de término (Feyereisen et al. 2015). La mayoría de los insecticidas tienen tres sitios blanco primarios en el sistema nervioso central de los insectos, estos son: (i) la enzima acetilcolinesterasa que es codificada por el gen *Ace*, es el sitio de acción de los insecticidas carbámicos y organofosforados, (ii) los canales de sodio dependientes del voltaje que son codificados por el gen *para*, (paralítico, sensible a la temperatura) que es el sitio primario de acción del DDT y los piretroides, (iii) los canales de cloro dependientes del ácido γ -aminobutírico (GABA) que contienen subunidades codificadas por el gen que confiere resistencia al dieldrin (*Rdl*), que es el sitio de acción de los insecticidas tipo ciclodieno. De modo que el mecanismo de resistencia fisiológico involucra fundamentalmente a tres proteínas que son las blanco del 90% de los insecticidas que hoy día se emplean (Rodríguez-Arnaiz, 2004).

- (i) **Acetilcolinesterasa (ACE)** Las alteraciones en la sensibilidad de las moléculas blanco pueden conferir altos niveles de resistencia. El primer gen que codifica para la acetilcolinesterasa en insectos fue clonado en *Drosophila* (Fournier et al. 1989). Así el blanco primario de los insecticidas organofosforados y de los carbamatos es la acetilcolinesterasa (ACE), de modo que las mutaciones en el gen *Ace*, producen insensibilidad a la

acción de los insecticidas, y por ello confieren resistencia. La resistencia usualmente se asocia con un decremento en la hidrólisis de la acetilcolina. Esta proteína es indispensable para el buen funcionamiento de las sinapsis colinérgicas, en cuyo nivel el influjo nervioso presináptico permite la liberación de acetilcolina, neurotransmisor del SNC en los insectos que se fija a aceptores específicos de la membrana postsináptica permitiendo así la apertura de los canales de sodio y potasio asociados al receptor. La membrana postsináptica se despolariza lo que permite un potencial de acción. La acetilcolinesterasa da por terminada la acción de la acetilcolina ya que es una enzima que cataliza su hidrólisis en colina y ácido acético.

La comparación de secuencias codificantes del gen *Ace* en cepas resistentes y susceptibles de la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, revelaron que existen cuatro mutaciones puntuales en cuatro sitios diferentes de las cepas resistentes, es más, diferentes cepas resistentes pueden tener uno, dos o los cuatro reemplazos, lo cual les confiere resistencia cruzada a los distintos insecticidas organofosforados. Las cuatro mutaciones más frecuentes del alelo AchE2 de *Drosophila* son: Ile129Val, Gly227Ala, Phe209Tyr y Gly328Ala pueden encontrarse de forma independiente o en diversas combinaciones, generándose alrededor de 15 variantes alélicas, las cuales han sido probadas mediante la expresión heteróloga, mostrando una sensibilidad decreciente frente a 17 insecticidas organofosforados y carbamatos (Menozzi et al. 2004). Las combinaciones de las mutaciones generalmente producen un aumento en la insensibilidad de la enzima, aunque también contribuyen a este efecto la

naturaleza del pesticida y alguna compensación debida a las mutaciones múltiples. En general las mutaciones múltiples generan una alta resistencia y un costo hacia la adecuación (Shi et al. 2004).

La acetilcolinesterasa es una enzima de 70 kDa que es procesada en dos proteínas asociadas de 55 y 16 kDa de tamaño. La enzima funcional se glicosila, es un dímero formado por dos subunidades unidas de forma covalente, cada una contiene ambos péptidos de 55 y 16 kDa.

(ii) *Canales de sodio dependientes del voltaje.* Estos canales tienen la función de dejar pasar al sodio a través de la membrana nerviosa en el momento de la transmisión del potencial de acción. Su modo de acción comprende tres fases: (1) una activación rápida del canal provocando un cambio en la conformación cuando se acerca el impulso nervioso. Este cambio conformacional da a la proteína una forma de poro lo que permite el ingreso de los iones de sodio a la célula; (2) una inactivación más lenta durante la cual el poro se cierra, y (3) un regreso del canal a una fase de reposo y una fase refractaria durante la cual el canal no puede ser activado.

El blanco primario de los piretroides y del DDT son los canales de sodio de las membranas nerviosas. Estudios electrofisiológicos han mostrado que los piretroides modifican una fracción reducida del número total de canales de sodio de manera tal que prolongan el tiempo de apertura sin alterar la conductancia de

los canales. Las moscas domésticas que portan la mutación *kdr* (resistencia al derribo) son resistentes tanto al DDT como a los piretroides, un estudio bioquímico ha sugerido que estos mutantes tienen un número reducido de canales de sodio. Dos de las mutaciones *kdr* en el núcleo del canal de sodio, Leu 1014 y Met 918, se han reportado en alrededor de 80 casos de resistencia (Feyereisen et al. 2015). La clonación de la subunidad mayor del canal en *Drosophila* llevó a la identificación de un gen sensible a la temperatura denominado paralítico (*para*) (Loughney et al. 1989). Después de la clonación del gen *para* diversos estudios genéticos mostraron la relación entre este gen y el gen *kdr* de la mosca doméstica (Williamson et al. 1993).

El canal de sodio dependiente del voltaje es una glicoproteína transmembranal formada por cuatro dominios homólogos compuestos de seis hélices transmembranales. Muchas neurotoxinas específicas modulan la actividad del canal. Se han identificado seis sitios de fijación. Los insecticidas piretroides y los organofosforados modifican los parámetros de inactivación prolongando el tiempo de apertura, efecto que genera resistencia. Otras modificaciones en la estructura de la proteína disminuyen la afinidad de los pesticidas hacia sus receptores en el canal.

El acceso molecular a los genes del canal de sodio se hizo posible gracias al conocimiento que se tenía diversos genes que confieren resistencia asociada al uso de diversos insecticidas (piretroides, organofosforados y organoclorados), tales como el gen *nap* (sin potencial de acción), el *kdr* (resistencia al derribo) y el

gen *para* (paralítico). Este último es, como ya se mencionó, el responsable del fenotipo paralítico que además es sensible a la temperatura. Este es un gen grande que contiene más de 60 kb, comprende alrededor de 26 exones y un marco abierto de lectura de 6 kb. El análisis de los transcritos reveló la presencia de empalmes alternativos en diversas posiciones del gen.

(iii) Receptores del ácido γ -aminobutírico (GABA). Los canales iónicos de voltaje reciben señales químicas de neurotransmisores tales como la acetilcolina o el ácido γ -aminobutírico los cuales convierten vía señales eléctricas la apertura de los canales iónicos. El receptor GABA es el sitio de acción de los ciclodienos y de los fenilpirazoles como el fipronil (ffrench-Constant et al. 2000). La resistencia al fipronil se ha asociado con mutaciones en Ala301Ser y en Thr350Met provenientes de *Drosophila simulans* las cuales se probaron en moscas transgénicas de *D. melanogaster* mostrándose que la segunda mutación contribuye a una reducción en los costos de la adecuación (Le Goff et al. 2005; Remnant et al. 2014).

Los mutantes de *Drosophila melanogaster* que mostraban una resistencia de 4,000 veces al insecticida organoclorado dieldrin (*Rdl*) fueron aislados de poblaciones naturales. El alelo de GABA resistente al dieldrin (*Rdl*) fue el primer sitio blanco caracterizado a nivel molecular (ffrench-Constant et al. 1991a; 1991b), posteriormente se demostró que el mecanismo de resistencia se debe a la sustitución de un aminoácido

que se encuentra en el dominio del poro provocando un cambio en la afinidad de unión del dieldrin al poro pero conservando la función del receptor. Los mutantes muestran, como muchos otros insectos resistentes al ciclodieno, el fenotipo semidominante característico y la resistencia cruzada a la picrotoxina - un alcaloide antagonista del ácido γ -aminobutírico - que modifica a los canales de cloro de entrada y a los receptores de GABA en la resistencia. Por esa época numerosos experimentos bioquímicos habían implicado a GABA y a los canales de cloro como el blanco de los ciclodienos, sin embargo no se habían aislado los receptores, por lo cual los mutantes resistentes al dieldrin (*Rdl*) facilitaron tanto la clonación del blanco de los ciclodienos como el aislamiento del primer receptor de GABA en un invertebrado.

GABA es una glicoproteína que forma un canal de cloro activo para la fijación del ácido γ -aminobutírico, neurotransmisor de numerosas sinapsis en el SNC de insectos y mamíferos. La apertura de este canal hiperpolariza la membrana nerviosa. El receptor de GABA está formado por al menos doce subunidades y presenta una variedad de sitios receptores capaces de unir diversas sustancias activas que modulan de forma positiva o negativa su respuesta al GABA. En los insectos el receptor de GABA es el blanco de los insecticidas organoclorados y de los ciclodienos que bloquean el canal produciendo una membrana nerviosa hiperexcitable. En *Drosophila melanogaster* una mutación puntual en el receptor GABA, cambio de una alanina por una serina, confiere resistencia a los

ciclodienos aunque se mantienen las funciones de los canales iónicos de cloro (French-Constant et al. 1993).

De modo que los tres sitios blanco de los insecticidas portan reemplazos de aminoácidos que en última instancia son los que confieren resistencia.

(b) mutaciones que confieren un aumento en la expresión génica

La sobrerregulación de los genes involucrados en la desintoxicación de pesticidas es bastante común aunque su mecanismo molecular no ha sido desvelado. Hay algunas investigaciones que señalan a la resistencia asociada con un aumento en el metabolismo y en algunos casos a los niveles de algunas enzimas, como la glutatión-s-transferasa (ver más adelante), pueden atenuar el estrés oxidante que inducen los pesticidas (Vontas et al. 2001).

Cambios en el número de copias que se producen tanto por duplicaciones como por deleciones son adaptativos. En *Drosophila* se ha demostrado que la frecuencia de duplicaciones génicas es mucho más alta que la frecuencia de mutación de un solo nucleótido (Schridder et al. 2013). Las duplicaciones génicas se han involucrado tanto en la resistencia toxicocinética como en la toxicodinámica (Feyereisen et al. 2015).

La amplificación génica es un evento que crea copias adicionales de proteínas. El fenómeno fue descrito por primera vez en células tumorales y en cultivos celulares inmortales. La amplificación del DNA, en un principio fue vista como un fenómeno anormal que solo ocurría en cultivo de tejidos pero ahora está ya ampliamente documentada en diferentes organismos, es un mecanismo que

genera una gran cantidad de productos génicos a partir de la transcripción incrementada de un solo gen. En mosquitos del género *Culex* la amplificación génica en el *locus* que codifica para las esterasas A y B se da por factores que varían de 70 (*Culex pipiens*) a 500 veces (*Culex quinquefasciatus*). La amplificación génica se da también en los genes que codifican para las glutatión transferasas (Zhou y Syvanen, 1997) y en los genes que codifican para los citocromos P450 (Puinean et al. 2010).

Las mutaciones que afectan a la expresión génica sin que se produzca un cambio en el número de copias génicas pueden ser del tipo *cis* o del tipo *trans*. Las de tipo *cis* implican una mutación en las secuencias reguladoras del gen. La inserción de un transposón en la región 5'-UTR del gen *Cyp6g1* de *Drosophila melanogaster* cuya enzima metaboliza tanto piretroides como neonicotinoides produce un efecto de resistencia cruzada a ambos tipos de insecticidas (Schmidt, 2010; Chung et al. 2014). Sin embargo en la mosca doméstica el gen *Cyp6g1* se sobreexpresa en cepas resistentes a piretroides, sobreexpresión que está controlada por genes que se encuentran en los cromosomas 1 y 2 y por tanto la regulación se realiza en *trans* (Scott, 1999).

(c) *mutaciones que confieren un decremento en la expresión génica.*

El trabajo pionero de T Wilson (1993) sobre la resistencia a los análogos de la hormona juvenil en *Drosophila* permitió descubrir al factor de transcripción tolerante al metopreno (Met), insecticida que inhibe la metamorfosis, cuyos alelos portan mutaciones sin sentido o inserciones de transposones que generan una reducción en los niveles de transcripción del gen.

Las mutaciones disruptivas que inducen cambios bruscos, incluyen a la inserción de transposones, indels de varios tamaños que generan proteínas truncadas, sustituciones de aminoácidos y el salto u omisión de exones, son muy efectivas para remover un blanco con funciones no vitales. La reducción en la transcripción de los genes que codifican para las aminopeptidasas parece estar ligada a la resistencia a la toxina generada por *Bacillus thuringensis* en la oruga de la col (Tiewisiri y Wang, 2011).

(4) **Resistencia metabólica.** Las mutaciones en los locus que codifican para las enzimas involucradas en la desintoxicación suelen ser deletéreas, producen por tanto una reducción en la actividad enzimática. Si en las moscas silvestres la actividad enzimática es alta entonces la proporción de las reacciones estará limitada por el sustrato (Bourguet et al. 1996).

La biotransformación de un compuesto xenobiótico produce, por regla general, su degradación hacia metabolitos no tóxicos los que son eliminados a través de la excreción. La transformación metabólica se lleva cabo, como ya se mencionó, en dos fases:

La fase I también conocida como de funcionalización, en la que se inserta un grupo funcional (hidroxi, epoxi) a la molécula lipofílica proceso que la hace hidrofílica y más fácilmente excretable. Este metabolito puede ser eliminado o bien tomado por las enzimas de la fase II. Las enzimas de la fase I son las

monoxigenasas dependientes del citocromo P450, las esterasas y en ocasiones también catalizan esta fase del metabolismo las flavín monoxigenasas y las alcohol y aldehído deshidrogenasas.

La fase II del metabolismo o fase de conjugación corresponde a la inserción de un grupo polar (glutatión, ácido glucurónico, fosfato, sulfato o cualquier otro ácido aminado) a la molécula funcionalizada o a la molécula misma. Las enzimas de esta fase son transferasas tales como la glutatión-S-transferasa, las sulfonotransferasas, y las fosfatotransferasas. La mayoría de éstas, excepto la glutatión-S-transferasa, requieren de cofactores energéticos tales como el ATP para la conjugación de un grupo fosfato o de un grupo sulfato; el ATP y la coenzima-A para la conjugación de la glicina, que es por cierto el aminoácido más utilizado en la conjugación por los insectos, después de la activación de un compuesto xenobiótico; el trifosfato 5 de uridina (UTP) para la conjugación de la glucosa mediada por las glicosil transferasas (Fig. 2).

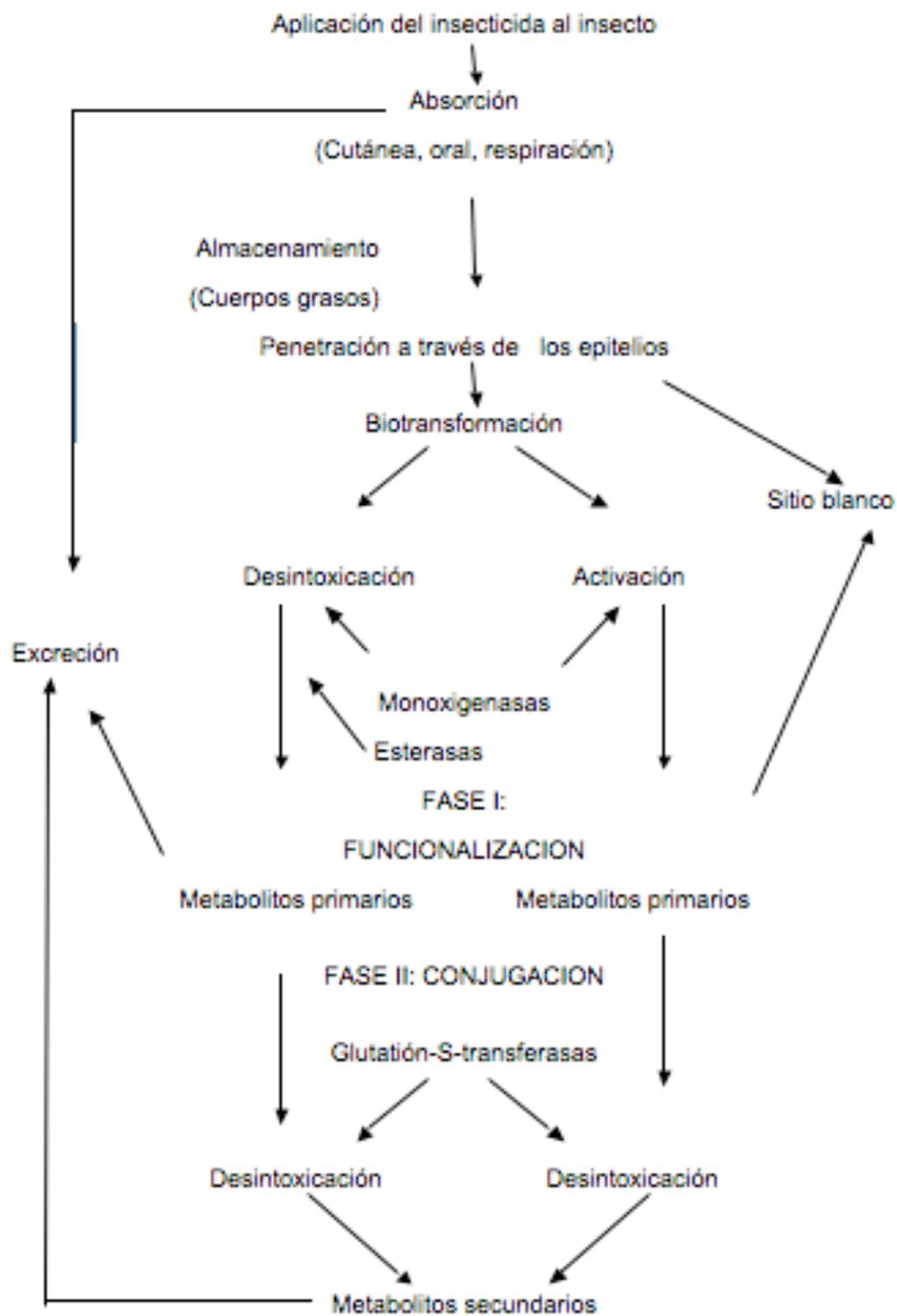


Fig. 2 Ruta metabólica de un insecticida en los insectos (Brun-Barale, 1998)

La resistencia metabólica a insecticidas es una consecuencia esperada del uso indiscriminado de los insecticidas de modo que conocer los mecanismos involucrados es de importancia primordial para desarrollar las formas de prevención y de reversión. Además hay que considerar que la resistencia metabólica afecta a todos los modos de acción de los pesticidas por lo cual es difícil predecir la resistencia cruzada con base en el metabolismo (Feyerherien, 2014).

Tres de los cinco grupos de insecticidas (organofosforados, carbamatos y piretroides), son ésteres. Las carboxilesterasas están siempre involucradas en la resistencia metabólica a los organofosforados, algunas veces en la de los piretroides y prácticamente no juegan ningún papel en la resistencia a los carbamatos. Los insecticidas organofosforados, al ser ésteres son sustratos para las esterasas, a las que se unen en sus sitios catalíticos muy rápidamente, mostrando una tasa de hidrólisis muy lenta. Así los insecticidas organofosforados se unen específicamente a la acetilcolinesterasa para ejercer su efecto insecticida, al quedar bloqueada la enzima ésta no puede ejercer su función normal en el organismo que como ya dijimos es la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina. Diversos insecticidas organofosforados son primero bioactivados los metabolitos intermedios así formados son los que interactúan con la acetilcolinesterasa inhibiendo su acción.

A través de las investigaciones sobre la resistencia a insecticidas se han identificado un grupo grande de enzimas capaces de metabolizar a los

insecticidas. Estas enzimas se conocen colectivamente como desintoxicantes, están codificadas por los citocromos P450 (P450), las glutatión transferasas (GST), las carboxilesterasas (COE) y las glucosiltransferasas (UGT). En *Drosophila melanogaster* se han identificado un total de 196 genes: 89 P450, 39 GST, 35 COE y 33 UGT. Se ha podido establecer además que en la mayoría de los genomas secuenciados de insectos existe una conservación de estas enzimas, lo cual sugiere un origen antiguo (Perry et al. 2011).

Cerca de un tercio de la resistencia a organofosforados ocurre en mutantes para la acetilcolinesterasa, otro tercio involucra a carboxilesterasas, y el resto involucra otros mecanismos como las oxidasas de función mixta (citocromos P450), la glutatión S-transferasa y alteraciones en la permeabilidad de la cutícula. Las mutaciones en las enzimas pueden llevar a un incremento en la desintoxicación, así la síntesis incrementada de carboxilesterasas puede generar resistencia mediante la reducción de los niveles del insecticida por debajo de la dosis tóxica. La resistencia metabólica a insecticidas en la mosca doméstica está asociada a un decremento en la actividad de la ali-esterasa y a aumentos en las actividades de los citocromos P450 y de la glutatión S-transferasa, enzimas todas ellas que intervienen en la biotransformación de los insecticidas.

(a) Citocromos P450

El control de las plagas generadas por insectos se ha producido en los últimos 60 años gracias al descubrimiento y desarrollo de un gran número de insecticidas sintéticos los cuales han beneficiado a la agricultura pero también han afectado al medio ambiente y generaron, por selección natural, un aumento en la resistencia

de los insectos (Sparks, 2013). Las investigaciones realizadas con relación a los citocromos P450 de los insectos han sido muy importantes ya que han permitido conocer el metabolismo de los insecticidas y su relación con la resistencia. Las enzimas P450 son las mejores herramientas empleadas por los insectos para metabolizar insecticidas básicamente como un mecanismo de desintoxicación pero también es un mecanismo de bioactivación. La desintoxicación se lleva a cabo en los insectos en los túbulos de Malpigio, los cuerpos grasos y el intestino medio proceso que en los mamíferos se realiza en el hígado (Feyereisen, 2014).

El sistema de monooxigenasas de los citocromo P450 juega un papel importante en el metabolismo de cuatro de las cinco clases de insecticidas (excepto de los ciclodienos). La actividad de estas enzimas depende de uno o más citocromos P450, de la citocromo c reductasa y de la concentración de NADPH. El aumento en la actividad de las oxidasas de función mixta es el mecanismo más común de resistencia frente a una gran variedad de insecticidas (Agosin, 1985). En *Drosophila melanogaster* el gen que confiere resistencia se encuentra en el cromosoma 2R en posición 64.5 cuya regulación se encuentra en dos genes, cada uno de ellos en un brazo del cromosoma 3. El mecanismo molecular que propicia la actividad incrementada de los citocromos P450 parece ser la sobreexpresión constitutiva muy probablemente debida a mutaciones en los genes reguladores. Se ha propuesto que este gen podría actuar como represor de las oxidasas además parece ser semejante al gen regulador de la glutatión S-transferasa que se encuentra en el mosquito *Aedes aegypti*.

La resistencia a pesticidas en muchos casos está asociada a un aumento en la expresión de formas específicas de los citocromos P450. Las diferencias en la expresión de estas enzimas, en organismos susceptibles y resistentes a pesticidas parece ser de tipo cuantitativo, ya que en los individuos susceptibles se encuentran niveles basales de RNA mensajero así como de las proteínas P450. La supresión *in vivo* o el decremento en la resistencia mediante sinergistas se emplea con frecuencia como un diagnóstico de la intervención de los P450s en el proceso. La intervención de estas enzimas en la resistencia puede mostrarse por diversas metodologías, entre ellas, la más común es la inhibición de las monoxigenasas mediante el empleo de inhibidores específicos. Así al tratar a moscas resistentes a pesticidas con butóxido de piperonilo, la resistencia se pierde, mostrándose que ésta se debe a las monoxigenasas (Feyereisen, 2014). El empleo de otros sinergistas como el fenobarbital, que confiere tolerancia a un amplio rango de insecticidas, han confirmado la participación de los citocromos P450 en la resistencia metabólica a pesticidas (Willoughby et al. 2007).

El aumento en las actividades de P450 en poblaciones resistentes puede ilustrarse mediante histogramas de frecuencia a partir de insectos individuales que revelan actividades bajas y homogéneas en poblaciones susceptibles y altas y heterogéneas en poblaciones resistentes. Las sondas moleculares obtenidas en los estudios de resistencia, en las que se cuantifican los niveles de mRNA, muestran todos la sobreexpresión constitutiva de los genes P450 en cepas resistentes (Dunkov et al. 1996). Las técnicas inmunológicas también han revelado la sobreexpresión constitutiva de las proteínas P450, pero debido a la multiplicidad

de los P450 y a la relación antigénica entre diversas proteínas P450, el uso de anticuerpos no es definitivo. Así un anticuerpo monoclonal de la mosca doméstica (P450B) reconoce tanto a CYP6A2 de *D. melanogaster* como a CYP9A1 de *H. viriscens*. El gen *CYP6A1* se expresa constitutivamente en siete cepas resistentes de la mosca doméstica (*Musca domestica*). En larvas y adultos de la cepa Rutgers los niveles de mRNA de CYP6A1 son al menos 10 veces superiores que en las cepas susceptibles. La sobreexpresión no es debida a amplificación génica sino a una proporción mayor de transcripción del gen o a la estabilización del mRNA. En esta cepa la resistencia está asociada al cromosoma 2, pero el gen estructural que codifica para la proteína CYP6A1 se encuentra en el cromosoma 5. Resultados similares se obtuvieron con el gen *CYP6D1* que se localiza en el cromosoma 1, pero su expresión está regulada en *trans* por un factor que se encuentra en el cromosoma 2. Las mutaciones en *trans* en estos genes reguladores de la expresión genética podrían ser el origen de las diferencias encontradas en cuanto a una expresión basal constitutiva en las cepas susceptibles y a la sobreexpresión constitutiva en las cepas resistentes (Feyereisen, 1999).

Los avances recientes debidos a la genómica han permitido contar con un microarreglo en el cual se colocan los 90 genes de *Drosophila melanogaster* que codifican para los citocromos P450. Este microarreglo se empleó para estudiar la transcripción de los citocromos P450 en cepas resistentes al DDT obtenidas en campos agrícolas alrededor del mundo encontrándose que solamente el gen *Cyp6g1* se sobretranscribe. Además se demostró que el alelo resistente de

Cyp6g1 porta una inserción parcial del transposón *Accord* en la terminal 5' (Daborn et al. 2002; Le Goff et al. 2003). Recientemente se ha demostrado que algunos herbicidas son capaces de inducir la expresión de CYP1A1, CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, y CYP3A4 en mamíferos (Abass et al. 2012). Las primeras cuatro enzimas tienen su homólogo en *Drosophila melanogaster* organismo en el que se denominan Cyp18A1, enzima que es una hidroxilasa/oxidasa que contribuye a la inactivación de la ecdisona. La enzima de mamíferos CYP3A4 ha mostrado una relación homóloga con los genes *Cyp9f2*, *Cyp6a2* y *Cyp6g1* de *Drosophila melanogaster* (Cunningham et al. 2014; Homologene 2015; Peraza-Vega et al. 2017).

Las hormonas juvenil y la 20-hidroxiectdisona o su precursor la ecdisona, juegan un papel relevante en la expresión basal de muchos P450. Se ha mostrado que los niveles endógenos de la 20-hidroxiectdisona son muy importantes para mantener el fenotipo que confiere resistencia, por lo que esta hormona, podría estar implicada en la resistencia a pesticidas mediada por los citocromos P450 (Feyereisen, 2014).

(c)Esterasas

Son enzimas que intervienen en el metabolismo de los insecticidas ya que catalizan el rompimiento de una unión éster al sustrato. Estas enzimas generan una forma particular de resistencia ya que en su presencia los insecticidas no se degradan, efecto que fue demostrado en *Culex pipiens* en el cual se presenta, frente al insecticida organofosforado naftil-acetato, un aumento en la actividad de las esterasas debido al fenómeno de amplificación génica. La amplificación génica

se ha demostrado que es un mecanismo de evolución adaptativa en el fenómeno de resistencia a insecticidas, herbicidas y fungicidas (Devonshire y Field, 1991; Bass y Field, 2011). Las moscas resistentes presentan de 200 a 250 veces más copias del gen que codifican para estas proteínas. Las copias del gen que codifica para la esterasa B₁ confieren resistencia por secuestro y se localizan en tandem en un solo cromosoma por lo cual la amplificación se realiza en una unidad de 30 kb denominada “amplicón”. Este mecanismo de amplificación se ha encontrado en poblaciones geográficas muy distantes sugiriendo que el flujo genético se debe a la migración pasiva de los mosquitos resistentes (Blackman et al.1995).

En el áfido que parasita a los duraznos, o pulgón verde del melocotón *Myzus persicae*, la amplificación génica del gen que codifica para las esterasa E₄ se ha correlacionado con el fenotipo resistente y un aumento hasta de cuatro veces en el número de copias génicas (alrededor de 80 copias) lo que genera áfidos cada vez más resistentes. La amplificación del gen de la esterasa E₄ está ligada a una translocación cromosómica (entre los autosomas 1 y 3) que puede ser inestable con clones que exhiben una pérdida repentina, en una sola generación, de la expresión génica de las esterasas y de la resistencia a pesticidas (Blackman et al.1995; Bass et al. 2014).

Se ha mostrado además que los niveles de resistencia y de expresión de E₄ son proporcionales a la presión de selección ejercida por la exposición al insecticida por lo que la regulación de la expresión del gen juega un papel esencial en la resistencia. Es decir, el fenómeno de amplificación del gen se da cuando los áfidos están expuestos al pesticida.

(d) Glutación S transferasas (GSTs)

Entre las transferasas solo las glutación S transferasas (GSTs) han sido identificadas en la resistencia a pesticidas. Estas enzimas no requieren de ningún aporte energético por lo que constituyen un sistema ideal para degradar a los agentes xenobióticos. Como ya se mencionó, estas enzimas catalizan la conjugación del glutación endógeno (GSH) con los compuestos electrofílicos generados por las oxidasas de función múltiple. Los conjugados así formados sufren un ataque nucleofílico en el átomo de azufre de la cisteína del glutación, el producto así formado es un compuesto hidrosoluble que se transformará en ácido mercaptoúrico para ser finalmente excretado (Strange et al. 2000).

Se conocen dos tipos de GST que se encuentran tanto en el citosol como en los microsomas. En el genoma de *Drosophila melanogaster* solamente se ha identificado un solo gen que codifica para una GST microsomal pero la enzima no está implicada en el metabolismo de los insecticidas. Las enzimas citosólicas características de los insectos y solamente presentes en esta clase de organismos se han clasificado en los grupos delta y epsilon (Ranson et al. 2001) el resto de las enzimas citosólicas pertenecen a los grupos zeta, teta y omega, enzimas muy conservadas presentes también en diversos grupos de organismos (plantas, nematodos, moluscos, helmintos y mamíferos). Las enzimas GSTs clasificadas como sigma se encuentran en *Musca domestica* y en *Drosophila melanogaster* en los músculos que propician el vuelo asociadas con la troponina H, enzima involucrada en la contracción muscular, y que parece jugar un papel importante en la protección en contra del estrés oxidante (Singh et al. 2001).

La duplicación génica particularmente de los genes específicos de los insectos (delta y épsilon) ha dado por resultado una expansión de la familia de estas GSTs. La sustitución de un pequeño número de aminoácidos en la proteína genera resultados dramáticos en la especificidad por el sustrato (Ortelli et al. 2003). El proceso de duplicación génica, la diversificación y la selección operan a favor de un gran número de reacciones catalizadas por GST que responden al particular nicho ecológicos que ocupan las especies (Ranson et al. 2002). La diversidad adicional de las GST se genera tanto por empalmes alternativos como por rearrreglos génicos. Por ejemplo en los mosquitos del género *Anopheles* dos empalmes alternativos en los genes que codifican para las delta GST producen cuatro proteínas (Enayati et al. 2005). En el genoma de la mosca doméstica se encuentran varios *loci* carentes de intrones que codifican para las glutatión-s-transferasas tipo delta los cuales aparentemente resultaron de la fusión entre los extremos 5' y 3' de diferentes genes que codifican para las delta GSTs (Zhou y Syvanen, 1997).

La actividad elevada de GSTs se ha asociado con la resistencia a todas las clases de pesticidas (Vontas et al. 2001). En muchos casos la resistencia se ha atribuido a un aumento en la cantidad de una o varias enzimas GSTs tanto como resultado de la amplificación génica como por el aumento en la tasa de transcripción (Ranson et al. 2001). La deshidroclorinación del DDT es una reacción muy importante en la desintoxicación de este insecticida y está catalizada por GSTs, sin embargo, el conjugado del DDT con GSH no se ha identificado. Los aumentos en la deshidroclorinación confieren resistencia a muchos insecticidas y

mosquitos del género *Anopheles* (Prapanthadara y Ketterman 1993). Las GSTs son también responsables de la resistencia a los organofosforados, como el paratión y el metilparatión, sin embargo, no se han implicado en el metabolismo de los piretroides, aunque las GSTs juegan un papel importante al desintoxicar a los productos de la peroxidación de lípidos producidos por la exposición a piretroides (Vontas et al. 2001).

Natural. Falta de sensibilidad a la toxina, estrategia conocida como natural

Origen de los genes que confieren resistencia

Una pregunta importante acerca del origen de los genes que confieren resistencia se refiere a las tasa de mutación, selección y de migración asociadas a la difusión de los alelos que confieren la resistencia. En este sentido las tasas de migración se ven afectadas por la intervención de los seres humanos (ffrench-Constant et al. 2004). La hipótesis que establece el origen de un solo alelo que confiere resistencia derivó del estudio de los genes que codifican para las esterases en el mosquito *Culex pipiens*. En este estudio las secuencias que flanquean al gen amplificado B2 de la esterasa se demostró que eran idénticas independientemente del origen geográfico (Asia, África y Norteamérica) de los mosquitos, hecho que sugiere que después del evento de amplificación inicial, el alelo que confiere resistencia se dispersó globalmente por migración (Raymond et al. 1991). En el caso del gen *Cyp6g1* de *Drosophila melanogaster* que contiene al transposón *Accord* se ha mostrado que en diversas poblaciones de *Drosophila* las secuencias de nucleótidos son similares por lo cual se asume que debe haber un solo origen de la resistencia, al menos en estos insectos (Daborn et al. 2002).

Conclusiones sobre la resistencia

En conclusión la resistencia a insecticidas ha podido evolucionar por diversos mecanismos. Así cuando los insectos se ponen en contacto con un insecticida en particular la resistencia inicial se presenta al evitar o reducir su contacto. Si el insecticida ingresa al organismo, pueden presentarse modificaciones en el sitio blanco o su biotransformación lo que usualmente involucra su desintoxicación y excreción. En la práctica la evolución de la resistencia compromete a varios mecanismos por lo cual el fenómeno de resistencia cruzada es muy común entre los insectos, tal como se muestra en la Fig. 3 (Rodriguez-Arnaiz, 2004).

Clase de insecticida en la que se presenta el fenómeno de resistencia

Mecanismo

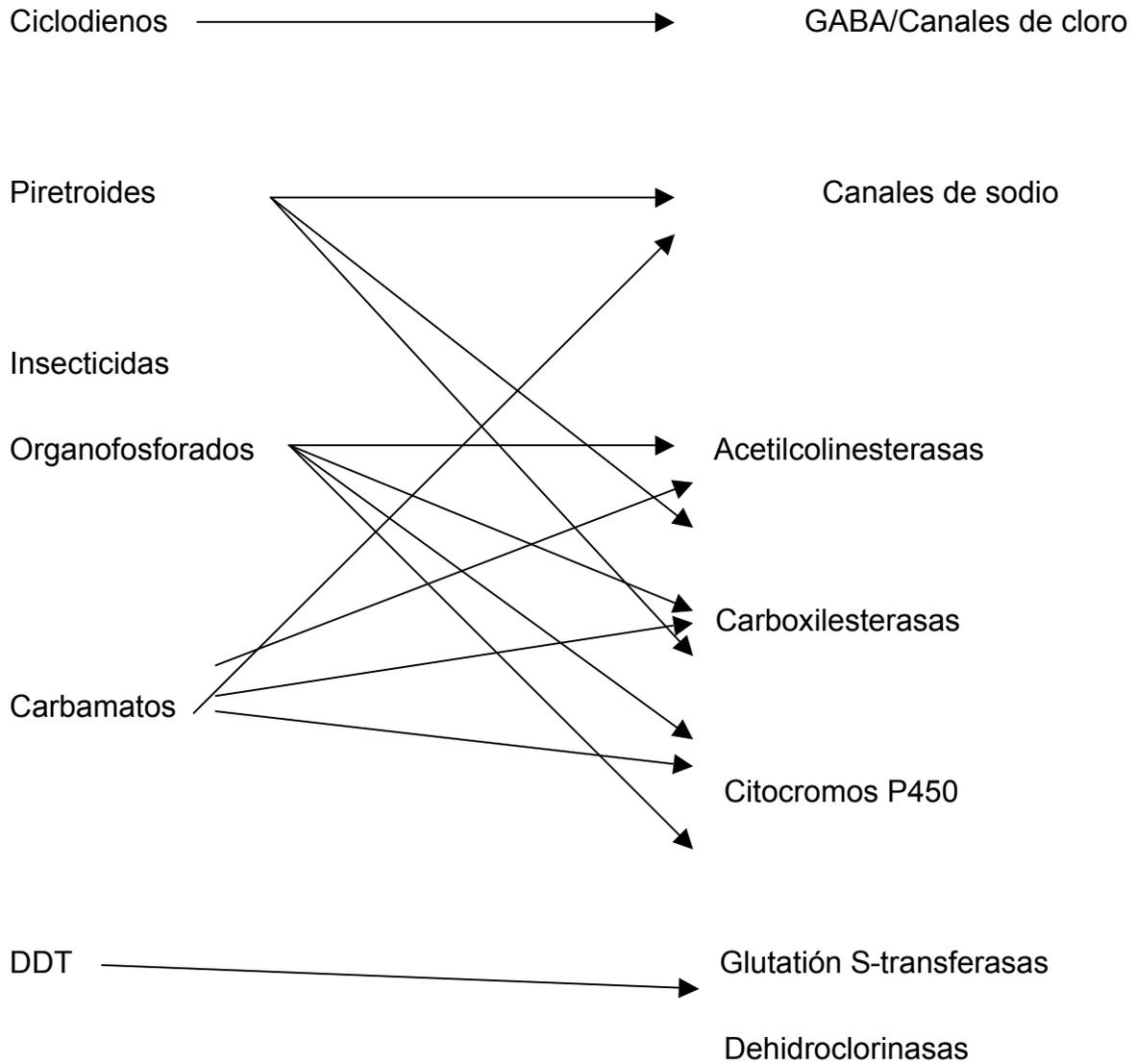


Fig. 3 Mecanismos de resistencia y resistencia cruzada frente a las diferentes clases de insecticidas en los insectos.

La estabilidad de la resistencia en una población-plaga de artrópodos depende de varios factores tales como (i) la inmigración de individuos susceptibles, los cuales pueden reducir la frecuencia de genes que confieren resistencia en una población (ii) el uso de control biológico es decir de enemigos naturales que pueden contrarrestar la resistencia eliminando a los individuos que sobreviven a la aplicación del pesticida (iii) poseer cualidades de resistencia. Si el rasgo de resistencia solo incrementa la sobrevivencia entonces cuando la selección termine los individuos que expresen rasgos no resistentes serán los que sobrevivan mejor, dejando más descendencia (Cloyd y Cowles, 2010). El manejo de la resistencia a pesticidas es una estrategia diseñada para preservar o mantener la efectividad del agroquímico. La rotación de pesticidas con mecanismos de acción diversos minimiza las posibilidades en cuanto a la capacidad de un artrópodo para desarrollar resistencia.

REFERENCIAS

- Abass K, . Lämsä V., Reponen P., Küblbeck, P. Honkakoski J., Mattila S., et al., 2012. Characterization of human cytochrome P450 induction by pesticides, *Toxicology*. 294: 17-26. doi:10.1016/j.tox.2012.01.010.
- Aciole EH, Guimarães NN, Silva AS, Amorim EM, Nunomura SM, Garcia AC, Cunha KS, Rohde C. 2014. Genetic toxicity of dillapiol and spinosad larvicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Pest Manag. Sci.* 70(4): 559-565. doi: 10.1002/ps.3573. Epub 2013
- Agosin M 1985. Role of microsomal oxidations in insecticide degradation, En: *Comprehensive insect physiology, and biochemistry* Kerkutt G.A. L.I.Gilber (Eds) Oxford UK, Pergamon Press Volumen 12: 647-712.
- Aguirrezabalaga I, Santamaría I, Comendador MA. 1994. The w/w+ SMART is a useful tool for the evaluation of pesticides. *Mutagenesis*. 9(4): 341-346.
- Akmoutsou P, Mademtoglu D, Nakou I, et al. 2011. Evaluation of the toxicity and genotoxic effects of spinosad and deltamethrin in *Drosophila melanogaster* and *Bacterocera oleae*. *Pest. Manag. Sci.* 67: 1534-1540.

Aldridge WN 1953 The inhibition of erythrocyte cholinesterase by tri-esters of phosphoric acid. The nature of inhibition process. *Biochem J.* 54: 442-448.

Bailen-Moscoso N, Romero Benavides JC 2016. Genotoxicidad de los nanomateriales, grandes discrepancias y desafíos. *Rev. Toxicol.* 33: 8-15.

Baptiste Bergé JR, Feyerresien R, Amichot M. 1998. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 353: 1701-1705.

Bass C, Field LM 2011. Gene amplification and insecticide resistance. *Pest Manag. Sci.* 67(8): 886-890. doi: 10.1002/ps.2189. Epub 2011 May 2.

Bass C, Puinean AM, Zimmer CT, Denholm I, Field LM, Foster SP, Gutbrod O, Nauen R, Slater R, Williamson MS 2014. The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 51: 41-51. doi: 10.1016/j.ibmb.2014.05.003. Epub 2014 May 20.

Blackman RL, Spence JM, Fiel LM, Devonshire AL 1995. Chromosomal location of the amplified esterase genes conferring resistance to insecticides in *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Heredity* 75: 297-302.

Bourguet D, Prout M, Raymond M (1996) Dominance of Insecticide Resistance Presents a Plastic Response. *Genetics* 143: 407-416.

Brun-Barale A 1998. La resistencia aux pesticides. Thèse doctorat Institut National de la Recherche Agronomique, Unité Santé Végétale et Environnement IFR38, Francia

Çakir Ş. Sarikaya R. 2005. Genotoxicity testing of some organophosphate insecticides in the *Drosophila* wing spot test. *Food and Chemical Toxicology*, 43(3): 443-450.

Casarett MJ, Doull J. 2013. *Toxicology the basic science of poisons* 8th Edition Curtis D. Klaassen, McGraw-Hill, 1310 pp.

Chung H, Bogwitz MR, McCart C, Andrianopoulos A, French-Constant RH, Batterham P, Daborn PJ. 2007. Cis-regulatory elements in the Accord retrotransposon result in tissue-specific expression of the *Drosophila melanogaster* insecticide resistance gene *Cyp6g1*. *Genetics*. 175(3): 1071-1077. Epub 2006 Dec 18.

CICOPLAFEST 2004. Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas.

<http://www.sagarpa.gob.mx/Glosario/Paginas/CICOPLAFEST.aspx>

Cloyd R.A. Cowles R.S. 2010. Manejo de la resistencia. The Connecticut Agricultural Experiment Station (www.ct.gov/caes).

Collotta M, Bertazzi PA, Bollati V 2013. Epigenetics and pesticides. *Toxicology* 307: 35-41.

- Cunningham R., Amode Md., Barrell D., Beal K. , Billis K, Brent S., et al., Ensembl 2015., Nucleic Acids Res. (2014) doi:10.1093/nar/gku1010.
- Daborn PJ, Yen JL, Bogwitz MR, Le Goff G, Feil E, Jeffers S, Tijet N, Perry T, Heckel D, Batterham P, Feyereisen R, Wilson TG, ffrench-Constant RH. 2002. A single P450 allele associated with insecticide resistance in global populations of *Drosophila melanogaster*. Science 297: 2253-2256.
- de Souza CP, Andrade G T, Fontanetti CS 2016. Evaluation of herbicide action on plant bioindicators by genetic biomarkers: a review. Environ. Mol. Assess 188: 694-706.
- Depledge MH, Amaral-Mendes J.J, Daniel B, Halbrook R et al 2013. The conceptual basis of the biomarker approach. En: Biomarker: research and supplication in the assessment of environmental health. DB Peakall and LR Shugart (Eds) pp 15-20.
- Devonshire AL, Field LM. 1991. Gene amplification and insecticide resistance. Annu Rev Entomol. 36: 1-23.
- Dunkov BC, Rodriguez-Arnaiz R, Pittendrigh B, Feyereisen R. 1996. Cytochrome P450 gene clusters in *Drosophila melanogaster*. Molecular General Genetics. 251: 290-297.
- Enayati AA, Ranson H, Hemingway J. 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. Insect Mol. Biol. 14(1): 3-8.
- FAO 2012 <http://www.fao.org/agriculture/crops/mapa-tematica-del-sitio/theme/pests/gestion-de-plagas-y-de-plaguicidas/es/>
- Feyereisen R. 1999. Insect P450 enzymes. Annu. Rev. Entomol. 44: 507-533. Review.
- Feyereisen R 2014. Insect P450 inhibitors and insecticides: challenges and opportunities. Pest. Manag. Sc. 71: 793-800.
- Feyereisen R, Dermauw W, Van Leeuwen T. 2015. Genotype to phenotype, the molecular physiological dimensios of resistance in arthropods. Pest. Biochem. Physiol. 121: 61-77
- Fournier D et al 1989. *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase gene. Structure, evolution and mutation. J. Mol. Biol. 210: 15-22.
- Fragiorge EJ, Alves de Rezende AA, Graf U, Spano MA. 2008. Comparative genotoxicity valuation of imidazolinone herbicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Food Chem. Toxicol. 46: 393-401.
- ffrench-Constant RH, Roush RT 1991a. Gene mapping and cross-resistance in cyclodiene insecticide-resistant *Drosophila melanogaster* (Mg.) Genet. Res. 57(1): 17-21.

French-Constant RH, Mortlock DP, Shaffer CD, MacIntyre RJ, Roush RT, 1991b. Molecular cloning and transformation of cyclodiene resistance in *Drosophila*: an invertebrate gamma-aminobutyric acid subtype A receptor locus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88: 7209-7213.

French-Constant RH, Rocheleau TA, Steichen JC, Chalmers AE. 1993 A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. Nature. 363(6428): 449-451.

French-Constant RH, Anthony N, Aronstein K, Rocheleau T, Stilwell G. 2000. Cyclodiene insecticide resistance: from molecular to population genetics. Annu. Rev. Entomol. 45: 449-466. Review.

French-Constant RH, Daborn PJ, Le Goff G. 2004. The genetics and genomics of insecticide resistance. Trends Genet. 20(3): 163-170.

Gómez-Arroyo S, Martínez Valenzuela C, Carbajal-López Y et al. 2013. Riesgo genotóxico por la exposición ocupacional a plaguicidas en América Latina. Rev. Int. Cont. Ambien. 29: 159-180.

Gruhn P, Golleti F, Yudelman M 2000. Integrated Nutrient Management, Soil Fertility and Sustainable Agriculture: Current Issues and Future Challenges. Washington D.C. International Food Policy Research Institute. Food, Agriculture and Environment Discussion Paper 32.

Guanggang X, Digiu L, Jianzhong Y et al 2013. Carbamate insecticide methomyl confers cytotoxicity through DNA. Food Chem. Toxicol 53: 352-358 doi:10.1016/j.fct.2012.12.020.

Guengerich FP, Waterman MR, Egli M. 2016. Recent structural insights into cytochrome P450 function. Trends Pharmacol. Sci. 37(8): 625-640. doi: 10.1016/j.tips.2016.05.006.

Heres-Pulido ME, Lombera-Hernández S, Dueñas-García I, Perales-Canales I, Castañeda-Partida L, Rocha-Ortiz C, Flores-Maya S, Durán-Díaz A, Graf U. 2008. Genotoxicity of triasulfuron in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is modulated by winter wheat seedlings. Mutat. Res. 653(1-2): 70-75. doi: 10.1016/j.mrgentox.2008.03.005. Epub 2008 Mar 27.

Homologene. 2015. National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/111391> HomoloGene CYP3A4

Huylmans AK, Parsh J. 2014. Population- and sex-biased gene expression in the excretion organs of *Drosophila melanogaster*. G3 (Bethesda) 4(12): 2307-2315. doi: 10.1534/g3.114.013417.

INEGI 2014 <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/default>

INTA 2012 <http://inta.org/2012AAM>

Kah M, Hofmann T. 2014. Nanopesticide research: current trends and future priorities. *Environ Int.* 63: 224-235. doi: 10.1016/j.envint.2013.11.015. Epub 2013 Dec 10.

Kah M. 2015. Nanopesticides and nanofertilizers: Emerging contaminants or opportunities for risk mitigation? *Front. Chem.* 3: 64. doi: 10.3389/fchem.2015.00064. eCollection 2015.

Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P, Möller L. 2009. Size-dependent toxicity of metal oxide particles: a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol.Lett.* 188(2): 112-118. doi: 10.1016/j.toxlet.2009.03.014. Epub 2009 Mar 26.

Kaya B, Yanikoglu A, Marcos R. 1999. Genotoxicity studies on the phenoxyacetates 2,4-D and 4-CPA in the *Drosophila* wing spot test. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 19(4): 305-312.

Kaya B, Creus A, Yanikoğlu A, Cabré O, Marcos R. 2000a. Use of the *Drosophila* wing spot test in the genotoxicity testing of different herbicides. *Environ. Mol. Mutagen.* 36(1): 40-46.

Kaya B, Yanikoglu A, Creus A, Marcos R. 2000b. Genotoxicity testing of five herbicides in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* 465(1-2): 77-84.

Kaya B, Marcos R, Yanikoğlu A, Creus A. 2004. Evaluation of the genotoxicity of four herbicides in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* using two different strains. *Mutat. Res.* 2004 Jan 10;557(1): 53-62.

Kegley SE, Hill BR, Orme S, Choi AH. 2016. Pesticide Action Network (PAN) Pesticide database <http://www.pesticideinfo.org/DOCS/data.html#update>

Kumar A, Dhawan A. 2013. Genotoxic and carcinogenic potential of engineered nanoparticles: an update. *Arch. Toxicol.* 87: 1883-1900.

Le Goff G, Boundy S, Daborn PJ, Yen JL, Sofer L, Lind R, Sabourault C, Madi-Ravazzi L, ffrench-Constant RH. 2003. Microarray analysis of cytochrome P450 mediated insecticide resistance in *Drosophila*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33(7): 701-708.

Le Goff G, Hamon A, Bergé JB, Amichot M 2005. Resistance to fibronil in *Drosophila simulans*: influence of two point mutations in the RDL GABA receptor subunit. *J. Neurochem.* 92: 1295-1305.

Li D, Huang Q, Lu M, Zhang L, Yang Z, Zong M, Tao L. 2015. The organophosphate insecticide chlorpyrifos confers its genotoxic effects by inducing DNA damage and cell apoptosis. *Chemosphere* 35: 387-393. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.05.024. Epub 2015 May 22.

- Loughney V, Kreber R, Ganetzky B 1989. Molecular analysis of the para locus a sodium channel gene in *Drosophila*. *Genetics* 58 (6): 1143-1154.
- McKenzie JA 1999. Ecological and evolutionary aspects of insecticide resistance, Academic Press, New York 180p
- Mehdi SH, Qamar A. 2013. Paraquat-induced ultrastructural changes and DNA damage in the nervous system is mediated via oxidative-stress induced cytotoxicity in *Drosophila melanogaster*. *Toxicol. Sci.* 134: 355-365. doi: 10.1093/toxic/kft116.
- Menzio P, Shi M, Lougarre A, Tang Z, Fournier D. 2004. Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations. *BMC Evol. Biol.* 4: 4
- Mishra M, Sharma A, Shukla AK, Kumar R, Dwivedi UN, Kar Chowdhuri D. 2014. Genotoxicity of dichlorvos in strains of *Drosophila melanogaster* defective in DNA repair. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 766: 35-41. doi: 10.1016/j.mrgentox.2014.02.004. Epub 2014 Mar 11.
- Mukhopadnyay I, Chowdhuri DK, Bajpayee M, Dhawan A. 2004. Evaluation of in vivo genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using alkaline comet assay. *Mutagenesis* 19: 85-90.
- Omura T, Sato R. 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239: 2370-2378.
- Ortelli F, Rossiter LC, Vontas J, Ranson H, Hemingway J. 2003. Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide-resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem J.* 373(Pt 3): 957-963.
- Osaba L, Aguirre A, Alonso A, Graf U. 1999. Genotoxicity testing of six insecticides in two crosses of the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* 419: 49-61.
- Osaba L, Rey MJ, Aguirre A, Alaron I, Alonso A, Graf U. 2002. Evaluation of genotoxicity of captan, maneb and zineb in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*: role of nitrosation. *Mutat. Res.* 518(1): 95-106.
- PAN International 2013. List of highly hazardous pesticides. <http://www.pan-germany.org>
- Padgett SR, Kolacz KH, Delannay, X et al. 1995. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci* (35): 1451-1461.

Patnaik KK, Tripathy NK. 1992. Farm-grade chlorpyrifos (Durmet) is genotoxic in somatic and germ-line cells of *Drosophila*. *Mutat. Res.* 279(1): 15-20.

Pengue W A. 2004. Producción agroexportadora e (in) seguridad alimentaria: El caso de la soya en Argentina. *Revibec: revista de la Red Iberoamericana de Economía Ecológica* 10: 46-55.

Peraza-Vega R, Castañeda-Sortibrán AN, Rodríguez-Arnaiz R. 2016. Metabolic activity of diuron by *Zea mays* detected through the wing spot assay in *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Information Service* 99: 19-24

Peraza-Vega RI, Castañeda-Sortibrán AN, Valverde M, Rojas E, Rodríguez-Arnaiz R. 2017. Assessing genotoxicity of diuron on *Drosophila melanogaster* by the wing-spot test and the wing imaginal disk comet assay. *Toxicol. Indust. Health* 33(5): 443-453.

Perry T, Batterham P, Daborna PJ. 2011. The biology of insecticide resistance and activity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41: 411-422.

Prapanthadara LA, Ketterman AJ. 1993. Qualitative and quantitative changes in glutathione S-transferases in the mosquito *Anopheles gambiae* confer DDT-resistance. *Biochem. Soc. Trans.* 3: 304S.

Puinean AM, Foster SP, Oliphant L, Denholm I, Field LM, Millar NS, Williamson MS, Bass C. 2010. Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *PLoS Genet.* 6(6):e1000999. doi: 10.1371/journal.pgen.1000999.

Rahdem-Staron I. 2002. The inhibitory effects of the fungicides captan and captafol on eukaryotic topoisomerases in vitro and lack of recombinogenic activity in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 518: 205-213.

Ranson H, Rossiter L, Orтели F, Jensen B, Wang X, Roth CW, Collins FH, Hemingway J. 2001. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem. J.* 359(Pt 2): 295-304.

Ranson H, Claudianos C, Orтели F, Abgrall C, Hemingway J, Sharakhova MV, Unger MF, Collins FH, Feyereisen R. 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* 298(5591): 179-181.

Raymond M, Callaghan A, Fort P, Pasteur N. 1991. Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature.* 350(6314): 151-153.
Remnant EJ, Morton CJ, Daborn PJ. et al 2014. The role of Rdl in resistance to phenylpyrazoles in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 54C: 11-21.

Rizki M, Kossatz E, Velázquez A, Creus A, Farina M, Fortaner S, Sabbioni E, Marcos R. 2006. Metabolism of arsenic in *Drosophila melanogaster* and the genotoxicity of dimethylarsinic acid in the *Drosophila* wing spot test. *Environ Mol Mutagen.* 47(3): 162-168.

Rodrigues GS 2002. Pesticide mutagenesis. En: Encyclopedia of pest management, D. Pimentel /Ed). pp 595-597.

Rodríguez Arnaiz R, Ramos Morales P, Gaytán Oyarzún JC, Rodríguez Zúñiga D L, Zimmering S. 1989. The herbicides dalapon and diuron tested for genotoxicity in *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambien.* 5(1):59-64.

Rodríguez-Arnaiz R. 1994. Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos. La ciencia para todos N° 124. FCE-SEP-CONACYT 95 p

Rodríguez-Arnaiz, R. 2004. Metabolismo de las toxinas ambientales . La ciencia para todos N° 199 FCE-SEP-CONACYT 112 p

Russell RJ, Dumanicic MM, Foster GG, Weller GL, Healy MJ, Oakeshott JG. 1990. Insecticide resistance as a model for studying molecular evolution. En: *Ecological and evolutionary genetics of Drosophila*, J.S.F.Baker (Ed.) Plenum Press, New York pp 293-314.

Sandhu SS, Waters MD, Mortelmans KE, Evans EL, Jotz MM, Mitchell AD, Kasica V. 1984. Evaluation of diallate and triallate herbicides for genotoxic effects in a battery of in vitro and short-term in vivo tests. *Mutat. Res.* 136(3): 173-183.

Sarikaya R, Memme B.K. 2013. Detection of transfrutin and metofluthrin genotoxicity in the ST cross of the *Drosophila* wing spot test. *Chemosphere* 93: 238-242.

Satorre EH. 2005. Cambios tecnológicos en la agricultura argentina actual. *Ciencia hoy*, 15(87): 24-31.

Schmidt JM, Good RT, Appleton B, Sherrard J, Raymant GC, Bogwitz MR, Martin J, Daborn PJ, Goddard ME, Batterham P, Robin C. 2010. Copy number variation and transposable elements feature in recent, ongoing adaptation at the Cyp6g1 locus. *PLoS Genet.* 6(6):e1000998. doi: 10.1371/journal.pgen.1000998.

vSchrider DR, Houle D, Lynch M, Hahn MW. 2013. Rates and genomic consequences of spontaneous mutational events in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 194(4): 937-954. doi:10.1534/genetics.113.151670. Epub 2013 Jun 3.

Scott JG. 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29(9): 757-777.

Shi M, Lougarre A, Alies C et al. 2004. Acetylcholinesterase alterations reveal the fitness cost of mutations conferring insecticide resistance. *BMC. Evol. Biol.* 4: 5.

Singh SP, Coronella JA, Benes H, Cochrane BJ, Zimniak P. 2001. Catalytic function of *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase DmGSTS1-1 (GST-2) in conjugation of lipid peroxidation end products. Eur. J. Biochem. 268(10): 2912-2923.

Sparks TC. 2013. Insecticide discovery: an evaluation and analysis. Pestic. Biochem. Physiol. 107(1): 8-17. doi: 10.1016/j.pestbp.2013.05.012.

Sparks TC, Nauen R. 2015. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. Pestic. Biochem. Physiol. 121:122-128. doi: 10.1016/j.pestbp.2014.11.014. Epub 2014 Dec 4.

Strange RC, Jones PW, Fryer AA. 2000. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. Toxicol. Lett. 112-113: 357-363.

Tiewisiri K, Wang P. 2011. Differential alteration of two aminopeptidases N associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in cabbage looper. Proc Natl Acad Sci U S A. 108(34): 14037-14042. doi: 10.1073/pnas.1102555108. Epub 2011 Aug 15.

Torres D, Capote T. 2004. Agroquímicos un problema global: uso de análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental. Ecosistemas 3: 2-6.

Torres C, Ribas G, Xamena N, Creus A, Marcos R. 1992. Genotoxicity of four herbicides in the *Drosophila* wing spot test. Mutat. Res. 280(4): 291-295.

Tripathy NK, Majhi B, Dey L, Das CC. 1988a. Genotoxicity of Rogor studied in the sex-linked recessive lethal test and wing, eye and female germ-line mosaic assays in *Drosophila melanogaster*. Mutat. Res. 206(3): 351-360.

Tripathy NK, Dey L, Majhi B, Das CC. 1988b. Genotoxicity of zineb detected through the somatic and germ-line mosaic assays and the sex-linked recessive-lethal test in *Drosophila melanogaster*. Mutat. Res. 206(1): 25-31.

Tripathy NK, Majhi B, Dey L, Das CC. 1989. Genotoxicity of ziram established through wing, eye and female germ-line mosaic assays and the sex-linked recessive lethal test in *Drosophila melanogaster*. Mutat. Res. 224(2):161-169.

Tripathy NK, Patnaik KK. 1992. Studies on the genotoxicity of monocrotophos in somatic and germ-like cells of *Drosophila*. Mutat. Res. 278(1): 23-29.

Tripathy NK, Routray PK, Sahu GP, Kumar AA. 1993. Genotoxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid tested in somatic and germ-line cells of *Drosophila*. Mutat. Res. 319(3): 237-242.

Umulis DM, Gurmen NM, Sing P, Fogler HS 2005. A physiologically based model for ethanol and acetaldehyde metabolism in human beings. Alcohol 35: 3-12.

- Velázquez A, Xamena N, Creus A, Marcos R. 1987. Mutagenicity studies on fenitrothion in *Drosophila*. *Mutagenesis* 2(5): 33-336.
- Velázquez A, Xamena N, Creus A, Marcos R. 1990. Mutagenic evaluation of the organophosphorus insecticides methyl parathion and triazophos in *Drosophila melanogaster*. *J. Toxicol. Environ. Health* 31(4): 313-325.
- Vontas JG, Small GJ, Hemingway J. 2001. Glutathione S-transferase as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem. J.* 357: 65-72.
- Willoughby L, Batterham P, Daborn PJ. 2007. Piperonyl butoxide induces the expression of cytochrome P450 and glutathione S-transferase genes in *Drosophila melanogaster*. *Pest. Manag. Sci.* 63(8):803-808.
- Wilson TG. 1993. Transposable elements as initiators of insecticide resistance. *J. Econ. Entomol.* 86(3) :645-651.
- Xamena N, Velázquez A, Batiste-Alentorn M, Creus A, Marcos R. 1988. Genotoxicity studies with four organophosphorus insecticides using the unstable white-zeste system of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 204(2): 251-256.
- Zhang B, Xu Z, Zhang Y, Shao X, Xu X, Chang J, Li z. 2015. Fipronil induces apoptosis through caspase dependent mitochondrial pathways in *Drosophila* S2 cells. *Pestic. Biochem. Physiol.* 119: 81-89. doi: 10.1016/j.pestbp,
- Zhou ZH, Syvanen M. 1997. A complex glutathione transferase gene family in the housefly *Musca domestica*. *Mol. Gen. Genet.* 256(2):187-194.