

La genética y genómica de la resistencia a los insecticidas

Resumen

En los últimos diez años se han dilucidado las bases moleculares de la resistencia de insectos a muchos insecticidas químicos. Los genes diana se identificaron y clonaron, principalmente en el sistema nervioso de *Drosophila melanogaster* y las mutaciones asociadas a la resistencia fueron examinadas en una variedad de insectos plaga. Más recientemente se describió la resistencia producida por complejos multigénicos de enzimas, tales como las esterasas, los citocromos P450 y las glutatión-S-transferasas. En este artículo revisamos el impacto de la genética de *Drosophila* en el campo de la resistencia en los insectos y nos centramos en el impacto actual y futuro de la genómica. Estos estudios nos permiten dar respuesta a tres preguntas fundamentales en la evolución de la resistencia. ¿Cuántos genes están involucrados? ¿Cuántas mutaciones hay en estos genes? ¿Con qué frecuencia se presentan estas mutaciones en las poblaciones naturales?

La resistencia a los insecticidas es un ejemplo importante de selección natural hecho por el hombre y los factores que determinan el origen y propagación de las mutaciones asociadas son de importancia académica y aplicada. En los últimos años, se han identificado y clonado, en *Drosophila melanogaster*, la mayor parte de los genes que codifican los sitios objetivo para los insecticidas. La mayoría de estos sitios objetivo son receptores o enzimas importantes en el sistema nervioso de los insectos, cuyo envenenamiento conduce a la parálisis y muerte rápida. La clonación de estos genes de resistencia nos ha permitido hacer frente a cuestiones fundamentales pertinentes a la selección de estos rasgos de adaptación. ¿Los fenotipos de resistencia están controlados por uno o varios genes? ¿Cuántas mutaciones hay dentro de los genes de resistencia? ¿Tuvieron origen independiente en las poblaciones de campo¹? Aunque la mayoría de los intentos de responder a estas preguntas fundamentales se basaron en los sitios de resistencia²⁻⁴, los recientes avances en genómica de insectos⁵ facilitan el análisis de sistemas metabólicos más complejos^{1, 6-8}.

por Richard H. Ffrench-Constant y otros

Traducción y adaptación
Pablo Adrián Otero

Este artículo es una traducción y adaptación del artículo: The genetics and genomics of insecticide resistance. Author: Richard H. Ffrench-Constant y otros. Publicado en *TRENDS in Genetics*. 2004. N° 40, pp: 163-170.

¿Cuántos genes como objetivo?

La teoría predice que el número de genes de resistencia seleccionados depende de si la selección actúa dentro o fuera de la distribución fenotípica de la población susceptible (Figura 1). La selección desde dentro de esta distribución selecciona preferentemente para la resistencia poligénica, mediante la combinación de factores de resistencia preexistentes comunes que tienen un efecto menor, tales como el tamaño del cuerpo y la tasa de desarrollo; mientras que la selección por fuera de esta distribución selecciona para mutaciones raras en los genes individuales que tienen un importante efecto, una respuesta monogénica⁹⁻¹¹. El examen de mutantes para los genes objetivo, aislados en estudios de campo, apoya la importancia de los genes individuales con un efecto importante. El análisis de los tres genes objetivos centrales para los insecticidas convencionales: canales iónicos activados por ligando, canales iónicos dependientes de voltaje y la acetilcolinesterasa, se ha visto facilitado por su identificación y clonación en *Drosophila*.

Canales iónicos activados por ligando

Los canales iónicos activados por ligando reciben señales químicas, neurotransmisores, como la acetilcolina o ácido g-aminobutírico (GABA), que luego se convierten en señales eléctricas a través de la apertura de canales iónicos integrales. El receptor de GABA en los insectos es el sitio de

acción de los insecticidas de tipo ciclodieno^a y los más recientemente introducidos, fenilpirazoles tales como fipronil¹². El gen de la subunidad farmacológicamente relevante del receptor GABA fue clonado a partir de un mutante de *Drosophila* que era resistente al insecticida ciclodieno dieldrin y se lo denominó *resistencia al dieldrin* o *Rdl*². Aunque *Drosophila* es rara vez una plaga, la exposición a los insecticidas probablemente ha conducido a la presencia generalizada de genes de resistencia a los insecticidas en poblaciones de campo de *Drosophila*. El mapeo genético clásico de la *resistencia al dieldrin* mostró que esta fue conferida por un único gen en el cromosoma III en la posición del mapa 66F¹³. La generación y el análisis de varios rearrreglos cromosómicos, tales como deleciones e inversiones que abarcan esta posición, mostraron el marco de lectura abierto responsable de la *Rdl*³. La resistencia es producida por una sustitución de alanina en la posición 302, ya sea por una serina o una glicina². La investigación farmacológica en las neuronas cultivadas de *Drosophila* sugiere que es crucial la presencia de alanina en la posición 302 para la unión del insecticida, y que la sola sustitución de este aminoácido puede producir resistencia¹⁴. Este mismo aminoácido también está sustituido en cepas resistentes de una amplia gama de plagas de insectos¹⁵, proporcionando un ejemplo notable de evolución paralela (Figura 2). Estas investigaciones no sólo han aclarado qué subunidades del receptor son los sitios de acción de ciclodieno y fipronil, sino también el sitio de unión de estos insecticidas.

(a) Distribución original



(b) Distribución después de la selección

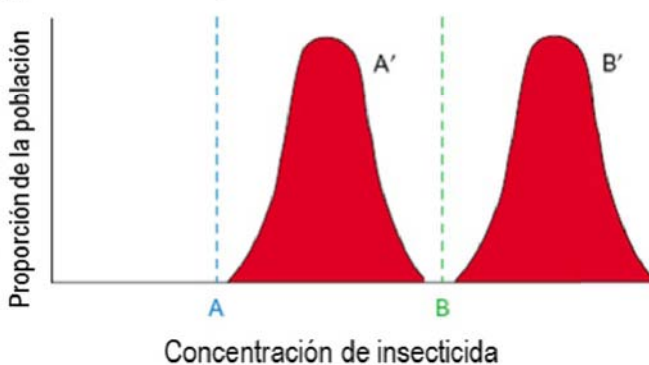


Figura 1. Selección dentro y fuera de la respuesta normal de una población de insectos. La selección dentro de la distribución normal de la tolerancia de insecticidas para una concentración indicada por la línea discontinua (A) muestra la supervivencia de un gran número de individuos (zona roja). Estos individuos muestran una mayor tolerancia a los insecticidas después de la selección (distribución A'). Cuando se aplica repetidamente a la misma población estas dosis seleccionan varios rasgos de resistencia de menor efecto pero que actúan acumulativamente (resistencia poligénica). La selección por fuera de la distribución normal de la tolerancia (concentración indicada por la línea B) da como resultado la selección de mutaciones raras que tienen un efecto importante dentro de los genes individuales (resistencia monogénica). Tales mutantes muestran una distribución de la tolerancia (distribución B') que se encuentra fuera de la distribución original. La frecuencia de tales mutantes raros en cepas de laboratorio se puede aumentar mediante mutagénesis. Por lo tanto, la mayoría de las cepas seleccionadas de forma continua en el laboratorio, a partir de pequeñas poblaciones genéticamente uniformes y sin mutagénesis, muestran resistencia poligénica, mientras que las cepas de campo más resistentes muestran resistencia monogénica⁷³. Hay que tener en cuenta que las dosis aplicadas en el campo están diseñadas para matar a todos los insectos presentes y por lo tanto se encuentran más cerca de la dosis B, mientras que la selección que se realiza en el laboratorio debe mantener los sobrevivientes y por ello se acerca más a la dosis más cerca de A.

a) Son compuestos cíclicos, llamándoseles así porque provienen de los dienios. Estos compuestos también poseen cloro, razón por la cual también se les considera como organoclorados. Entre los más importantes están: clordano, heptacloro, aldrin y dieldrin.

Sec. aminoácidos	L	N	R	N	A	T	P/L	A	R	V	S/G	L	G	V	T	T	
<i>D. melanogaster</i>	S	CTC	AAT	CGC	AAT	GCA	ACG	CCG	GCG	CGT	GTG	GCG	CTC	GGT	GTG	ACA	ACC
<i>D. simulans</i> allele 1	R	CTC	AAT	CGC	AAT	GCA	ACG	CCG	GCG	CGT	GTG	TCG	CTC	GGT	GTG	ACA	ACC
												↑s					
<i>D. simulans</i> allele 2	S	CTC	AAT	CGC	AAT	GCA	ACG	CCG	GCG	CGT	GTG	GCG	CTC	GGT	GTG	ACA	ACC
	R	CTC	AAT	CGC	AAT	GCA	ACG	CCG	GCG	CGT	GTG	GGG	CTC	GGT	GTG	ACA	ACC
												↑g					
<i>Mosca doméstica</i>	S	CTT	AAT	CGT	AAT	GCT	ACA	CCA	GCC	CGT	GTA	GCT	TTA	GGT	GTC	ACC	ACT
	R	CTT	AAT	CGT	AAT	GCT	ACA	CCA	GCC	CGT	GTA	TCT	TTA	GGT	GTC	ACC	ACT
												↑s					
Escarabajo rojo de la harina (<i>Tribolium castaneum</i>)	S	CTG	AAT	CGT	AAC	GCT	ACT	CTC	GCC	AGA	GTG	GCT	CTG	GGG	GTC	ACC	ACC
	R	CTT	AAT	CGT	AAT	GCT	ACA	CCA	GCC	CGT	GTR	TCT	TTA	GGT	GTC	ACC	ACT
												↑s					
Cucaracha alemana (<i>Blattella germanica</i>)	S	CTG	AAC	CGC	AAY	GCG	ACG	CCC	GCC	CGA	GTC	GCC	CTC	GGG	GTT	ACC	ACT
	R	CTS	AAC	CGC	AAT	GCG	ACG	CCC	GCC	CGA	GTC	TCC	CTC	GGG	GTT	ACC	ACT
												↑s					
Mosquito de la fiebre amarilla (<i>Aedes aegypti</i>)	S	CTA	AAT	AGA	GAT	GCT	ACA	CCA	GCA	CGT	GTT	GCA	TTA	GGT	GTA	ACC	ACT
	R	CTA	AAT	AGA	GAT	GCT	ACA	CCA	GCA	CGT	GTT	TCA	TTA	GGT	GTA	ACC	ACT
												↑s					

Figura 2. La evolución paralela de mutaciones asociadas a la resistencia entre las especies. Las mutaciones puntuales en el gen de resistencia al dieldrin (RDL) reemplazan el mismo aminoácido en gama de diferentes especies de insectos. El gen Rdl codifica un receptor de ácido g-aminobutírico (GABA). GABA es un neurotransmisor inhibitorio importante y el bloqueo del receptor de GABA por insecticidas del tipo ciclodieno o fipronil resulta en la muerte del insecto. La resistencia se asocia con la sustitución de alanina en la posición 302, ya sea con una serina o un residuo de glicina. Ambos reemplazos son codificados por mutaciones de un solo punto, como se muestra por las secuencias de nucleótidos en los alelos resistentes y susceptibles. Se cree que la alanina en la posición 302 al estar en la parte más estrecha del canal iónico de cloruro desempeña un doble papel único en la resistencia.

Los canales iónicos activados por ligando son también un sitio de acción de nuevos insecticidas, tales como los neonicotinoides y las ivermectinas^{16,17}. Aunque para este sitio objetivo aún deben ser identificados insectos resistentes a campo, si se han realizado importantes progresos en el análisis molecular de estos objetivos en *Drosophila*. Los neonicotinoides (imitadores de la nicotina) actúan sobre el receptor nicotínico de acetilcolina (de múltiples subunidades)^{18,19}. Varias subunidades ya han sido clonadas tanto en *Drosophila* como en otros insectos plaga. Sin embargo, la expresión funcional exitosa de las subunidades del receptor de insectos se basa en la co-expresión con subunidades de mamíferos como receptores quiméricos. Por tanto, parece que no se han identificado todos los componentes necesarios del receptor del insecto²⁰. Hasta la fecha, no se han descrito mutantes resistentes a neonicotinoides que estén asociados con mutaciones puntuales en cualquiera de las subunidades, aunque la mutagénesis de laboratorio en *Drosophila* es un enfoque prometedor para su aislamiento. El sitio objetivo de la ivermectina y el ácido nodulispórico ha sido identificado mediante la selección de mutantes de *Drosophila* que son resistentes al ácido nodulispórico²¹. La resistencia se asocia con una única sustitución de aminoácido en las subunidades GluClα de los

canales de cloruro; los canales de los mutantes mostraron ser menos sensibles a la activación por ácido nodulispórico o ivermectina²¹. La composición del receptor es incierta, pero los estudios de inmunoprecipitación han demostrado que parece contener una sola subunidad GluClα o en combinación con Rdl²².

Canales iónicos activados por voltaje

A diferencia de los canales activados por ligando, los canales dependientes de voltaje son activados por los cambios de voltaje de la membrana, más que por la concentración de un neurotransmisor. El canal de sodio dependiente de voltaje en insectos es el sitio de acción del DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) y los insecticidas piretroides²³. La resistencia in situ a los piretroides se caracterizó por primera vez como "resistencia a la caída (knockdown resistance - *kdr*)"^b en las moscas hogareñas²⁴. Sin embargo, la clonación de la subunidad principal del canal a partir de una cepa mutante de *Drosophila* condujo a la identificación de un gen sensible a la temperatura (*para^{ts}*)²⁵. Después de la clonación de *para^{ts}* en *Drosophila*, se realizaron estudios genéticos que mostraron vinculación entre el fenotipo *kdr* y el *para* homólogo en la mosca doméstica²⁶. Posteriormente, se encontró una única sustitución de aminoácidos que se asocia

b) El término "knockdown resistance" o "resistencia a la caída" se utiliza para describir los casos de resistencia a la difeniletano (por ejemplo, DDT) y los insecticidas piretroides en los insectos y otros artrópodos que resultan de la reducción de la sensibilidad del sistema nervioso.

con el fenotipo *kdr*, y la adición de un segundo reemplazo se asoció con un alelo mejorado *súper-kdr*^{4,27}. Similar a la situación *Rdl*, el análisis posterior de una amplia gama de insectos plaga revelaron mutaciones equivalentes en posiciones similares en el canal²³.

La acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa, un sitio objetivo de acción de los insecticidas organofosforados (OP) y carbamatos, es un enzima que degrada el neurotransmisor acetilcolina. El primer gen para la acetilcolinesterasa en insectos (*Ace*) fue clonado a partir de *Drosophila*²⁸. El examen de mutantes resistentes mostró que una variedad de sustituciones de aminoácidos individuales, solos o en combinación, produce un aumento de los niveles de insensibilidad de la enzima²⁸. Sin embargo, *Drosophila* posee un solo gen de *Ace*, mientras que los mosquitos tienen dos acetilcolinesterasas diferentes²⁹. Estas dos proteínas diferentes son codificadas por dos genes, *Ace-1* y *Ace-2*, cuya presencia fue confirmada dentro de la secuencia genómica completa del mosquito *Anopheles gambiae*³⁰ y sólo uno de los cuales (*Ace-1*) está relacionado con la resistencia del mosquito *Culex pipiens*³⁰. El examen de las cepas resistentes de *Culex pipiens* mostró que todos ellos llevan el mismo reemplazo asociado a la resistencia: glicina por serina en la posición 119 del sitio activo de la enzima³¹. Además, el examen de cepas resistentes de *A. gambiae* mostraron la misma sustitución³¹. En conclusión, para los tres principales objetivos de acción de los insecticidas existen sustituciones de aminoácidos de origen natural que confieren resistencia.

¿Cuántos genes metabólicos?

Los estudios sobre el sitio objetivo de los insecticidas han conducido a un paradigma simple de que los reemplazos individuales en genes pueden producir resistencia en una amplia

gama de insectos. La identidad de las mutaciones de los sitios objetivo pueden ser explicadas por la necesidad de mantener las funciones de tipo salvaje y por lo tanto un número limitado de sustituciones de aminoácidos puede ser tolerado en los receptores y enzimas importantes³². Sin embargo, los estudios de sistemas de enzimáticos multi-génicos, tales como los citocromos P450, que desintoxican una amplia gama de xenobióticos, sugirieron que, en algunos casos, la base molecular de la resistencia metabólica era probablemente más compleja³³. Así, la superposición en la especificidad de sustratos de los diferentes miembros de la familia de enzimas, podría confundir el análisis de la función de genes individuales y enzimas. Por lo tanto, se podría esperar un nivel de "redundancia funcional", por lo que si un citocromo P450 fue alterado para lidiar con el metabolismo de un insecticida, otras enzimas relacionadas podrían ser capaces de hacerse cargo de su función metabólica normal.

Análisis de microarreglos de ADN de los citocromos P450

Estudios de insectos plaga y de cepas resistentes de *Drosophila*, han implicado una plétora de diferentes genes del citocromo P450 en la resistencia a los insecticidas³³. Los recientes avances en la genómica han dado lugar a la disponibilidad de microarreglos^c de ADN (*microarrays* o *chips*) que contienen los 90 genes del citocromo P450 de *Drosophila*, lo que facilita el análisis de este sistema complejo de enzimas. Estos microarreglos se utilizaron para estudiar la transcripción del citocromo P450 en varias cepas de *Drosophila* resistentes al DDT aisladas a campo (Figura 3), y el exceso de transcripción fue confirmada por RT-PCR cuantitativo¹. En cepas resistentes de todo el mundo, sólo uno de los 90 genes, *Cyp6g1*, fue el más transcrito. Además se confirmó que el exceso en la transcripción del gen *Cyp6g1* en moscas transgénicas (utilizando

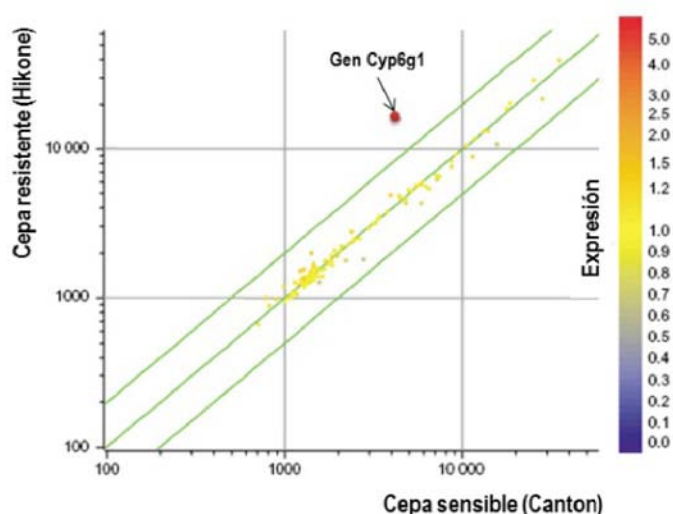


Figura 3. Identificación de un gen de resistencia a los insecticidas a través de análisis transcripcional utilizando un microarreglo (microarray) de ADN. *Drosophila melanogaster* contiene 90 genes diferentes del citocromo P450 los cuales están involucrados en una amplia variedad de funciones metabólicas incluyendo el metabolismo de compuestos extraños, tales como insecticidas. Para determinar qué genes P450 se están transcribiendo además en cepas resistentes a los insecticidas, un microarreglo de los 90 genes de P450 es tratado con ARN competitivos aislados de cepas resistentes y susceptibles. El gráfico muestra la intensidad relativa de hibridación para cada uno de los 90 P450s de una cepa resistente (Hikone R) y una cepa susceptible (Canton S). Los puntos que se encuentran en la línea se transcriben por igual en ambas cepas (manchas amarillas correspondientes a la mayoría P450 genes). La mancha roja corresponde a *Cyp6g1*, que es el único gen de citocromo P450 que es sobretranscrito en cepas resistentes.

c) Un microarray de ADN o microarreglo de ADN (también llamado chip de ADN) es una colección de fragmentos de ADN sobre una superficie sólida (vidrió, plástico, silicio). En los microarreglos se determina, generalmente mediante fluorescencia, la hibridación entre una sonda específica y las de ADN del microarreglo, lo que muestra el grado de expresión de un gen.

cepas UAS/GAL4^d), era suficiente para conferir resistencia al DDT. La comparación de los resistentes y susceptibles de *Cyp6g1* demostraron que los alelos resistentes llevan inserto un elemento transponible *Accord* en el extremo 5'. Mediante una PCR diagnóstica para ese elemento, se confirmó una perfecta correlación entre la presencia del elemento y resistencia en todas las cepas examinadas¹. Estos resultados sugieren que, a pesar de la complejidad del sistema enzimático del citocromo P450, la mayor transcripción de los genes del citocromo P450 individuales puede ser seleccionada en las poblaciones naturales. Sin embargo, no explica por qué muchos otros diferentes citocromos P450 se han identificado en cepas seleccionadas en laboratorio.

Para examinar la diferencia entre cepas seleccionadas en laboratorio y las recientemente aisladas del campo, la misma matriz se probó con cepas seleccionadas en el laboratorio con DDT. La selección continua con DDT en una cepa con mayor transcripción de *Cyp6g1*, permitió co-seleccionar un segundo gen *Cyp12d1*³⁴. Cuando el alelo resistente de *Cyp6g1* fue retirado de la cepa original de campo a través de la recombinación y se continuó con la selección con DDT, un gen diferente, *Cyp6a8*, fue seleccionado³⁵. Esto confirma la flexibilidad de la respuesta a la selección hecha en el laboratorio y sugiere que debería haber una cualidad única asociadas con *Cyp6g1*, tal como una amplia resistencia cruzada a diferentes insecticidas, favoreciendo su selección en el campo. Por lo tanto, las moscas que sobreexpresan *Cyp6g1* son resistentes a una amplia gama de insecticidas como el DDT, neonicotinoides, insecticidas OP y reguladores del crecimiento tales como lufenurón^{1,35,36}. Otros genes de citocromos P450, como *Cyp6a8*, con mayor transcripción en cepas seleccionadas en el laboratorio, muestran un espectro de resistencia cruzada estrecho³⁵. Estudios similares que transgénicamente sobreexpresan una resistencia asociada al citocromo P450 de mosca doméstica (*CYP6D1*), en *Drosophila* producen proteína de mosca doméstica pero fallaron en lograr resistencia³⁷. Sin embargo, la reciente disponibilidad de sistemas de transformación en otros insectos permitirá a los investigadores poner a prueba los genes candidatos de resistencia en los insectos plaga.

Esterasas

Los cambios en la función de esta enzima han llevado a la resistencia mediada por esterases. Estos cambios fueron documentados por primera

vez como una disminución de la actividad carboxilesterasa en cepas de moscas domésticas resistentes a los organofosforados (OP)³⁸⁻⁴⁰. Estas observaciones llevaron a la idea de que los mutantes resistentes tenían reducida la capacidad de hidrolizar los sustratos originales, pero habían adquirido la capacidad de hidrolizar sustratos órgano fosforados; la hipótesis de "ali-esterasa"⁴¹. Esta hipótesis ha sido confirmada en la especie *Lucilia cuprina*. En esta especie, la comparación en cepas resistentes y susceptibles del gen *LcaE7* (que codifica la enzima E3) predice un reemplazo de un solo aminoácido en el centro catalítico de la esterasa (glicina por ácido aspártico en la posición)⁶. La expresión recombinante de las enzimas mutantes confirmó que esta sustitución de aminoácidos conduce a un aumento en la hidrólisis de OP⁴². Mutagénesis dirigida al sitio de la butirilcolinesterasa humana (BCHE) también ha mostrado que la sustitución del residuo equivalente de glicina en la posición 137 con histidina también confiere actividad de OP hidrolasa⁴³. Además, la glicina en la posición 137 se encuentra en un sitio equivalente a la glicina en la posición 119 de la acetilcolinesterasa de mosquitos que está asociada a la resistencia³¹. Curiosamente, a pesar que *Drosophila* tiene un gen ortólogo a *LcaE7*^{44,45}, esta especie no muestra asociación entre la resistencia a los OP y los cambios en la isoenzima correspondiente, EST23. En *Drosophila*, el gen es parte de un gran grupo de genes llamado el clúster de α -esterasa⁴⁶, también encontrado en *L. cuprina*⁴⁷.

El exceso de la transcripción de genes de esterasa, ya sea a través de los cambios en la regulación de genes y/o amplificación del gen, también ha llevado a la evolución de la resistencia. En el pulgón del melocotón, *Myzus persicae*, y en varios mosquitos, la resistencia puede ser conferida por la amplificación de los genes de esterasa, a menudo en combinación con la regulación alterada de genes, lo que resulta en la producción de más esterasa, que puede hidrolizar o secuestrar insecticidas. En *M. persicae*, la resistencia está asociada, ya sea con la amplificación de la esterasa-4 (*E4*) o una forma truncada alternativa, 'fast'-*E4* (*FE4*)^{48,49}. En esta especie, el metabolismo del insecticida es lento, pero, debido a que la enzima *E4* puede componer hasta un 3% del peso corporal del pulgón, esta actúa como una esponja para secuestrar insecticidas^{50,51}. Del mismo modo, en el mosquito *C. pipiens*, diferentes *loci* de esterasa se pueden amplificar ya sea solos o en combinación para conferir resistencia a los insecticidas OP⁵².

d) El sistema GAL4-UAS es un método bioquímico utilizado para estudiar la expresión génica. El sistema consta de dos partes: el gen GAL4, que codifica la proteína Gal4 activadora de la transcripción en levaduras y UAS (secuencia de activación aguas arriba), un potenciador de Gal4 que se une específicamente a activar la transcripción de genes. Los genetistas han creado variedades genéticas de organismos modelo (típicamente moscas de la fruta), llamados líneas GAL4 cada una de las cuales expresa GAL4 en algún tejido del animal. Por ejemplo, algunas líneas pueden expresar GAL4 solo en las células musculares, o solo en los nervios, etc. La presencia de GAL4, por sí misma, tiene poco o ningún efecto ya que la mayoría de las células no tienen regiones UAS. En las líneas de moscas la región UAS especial está al lado de un gen deseado. Estas instrucciones genéticas están en todas las células del animal, pero en la mayoría de las células no sucede nada ya que no producen GAL4. Sin embargo, en las células que están produciendo GAL4, la región UAS se activa y el gen próximo a ella se enciende y se comienza a producir su proteína resultante.

¿Cuántos orígenes independientes?

El número de orígenes independientes de las mutaciones asociadas a la resistencia es importante en la evaluación de la importancia relativa de la tasa de mutación y la migración en la propagación de alelos de resistencia. Dentro de cada población, pocos estudios han aportado datos suficientes para establecer conclusiones significativas. Sin embargo, los pocos que hay indican que el número de orígenes independientes de la resistencia depende en gran medida de la importancia relativa de la mutación, la selección y la migración de diferentes poblaciones de insectos. Por otra parte, las tasas de migración, y con ello la propagación de alelos de resistencia, pueden ser fuertemente influenciadas por los humanos. La hipótesis de que un alelo de resistencia podría tener un único origen global se deriva de un estudio de los genes de esterasa amplificados en el mosquito *C. pipiens*⁵³. En este estudio, las secuencias que flanquean el gen amplificado de la esterasa B2 mostraron ser idénticas, independientemente de su origen geográfico. Esto sugiere que, después del evento inicial de la amplificación, el alelo de resistencia se había extendido a nivel mundial por la migración⁵³. Posteriormente, los estudios de otras esterases amplificados en este mosquito sugirieron que la resistencia puede surgir por la amplificación de varios *loci* diferentes esterasa⁵².

En el caso de la resistencia mediada por *Cyp6g1* en *Drosophila*, la asociación completa entre la presencia del elemento transponible *Accord* y la resistencia al DDT, y el hecho de que todos los alelos de resistencia parecen similares, es consistente con un único origen reciente de la resistencia (Figura 4a). Por lo tanto, los alelos

resistentes (que portan el *Accord*) son idénticos en la secuencia de nucleótidos y son similares a solo uno de los numerosos haplotipos susceptibles¹. Esto sugiere que el transposón se insertó una sola vez en un haplotipo susceptible. Por otra parte, ningún otro locus del citocromo P450 parece estar asociada con la resistencia en poblaciones de campo¹. Sin embargo, los estudios sobre la única mutación asociada a resistencia al ciclodieno en el gen *Rdl* del escarabajo rojo de la harina (*Tribolium castaneum*) muestran que varios orígenes independientes de la misma mutación pueden haber ocurrido en todo el mundo, con diferentes alelos que se extienden por la exportación de granos⁵⁴. En este estudio, fue posible no sólo documentar varios haplotipos diferentes resistentes sino también encontrar haplotipos susceptibles que eran progenitores potenciales (es decir, aquellos que difieren sólo por la presencia o ausencia de la misma mutación asociada a resistencia) (Figura 4b).

Múltiples orígenes independientes de resistencia también se observan en unidades taxonómicas genéticamente aisladas, como subespecies, biotipos o clones. Por ejemplo, la variación de haplotipos dentro de *Ace-1* de las dos subespecies diferentes de *C. pipiens* mosquitos sugiere que la mutación que causa insensibilidad en la enzima ha surgido de forma independiente dentro de cada subespecie³¹. Un análisis de los polimorfismos que flanquean a *Rdl* en diferentes biotipos de la mosca blanca, *Bemisia*, sugiere de nuevo que cada biotipo contiene su propia mutación única⁵⁵. Por último, los clones de *M. persicae* no sólo contienen niveles de amplificación únicas de E4 o FE4, sino que también puede portar otros mecanismos de

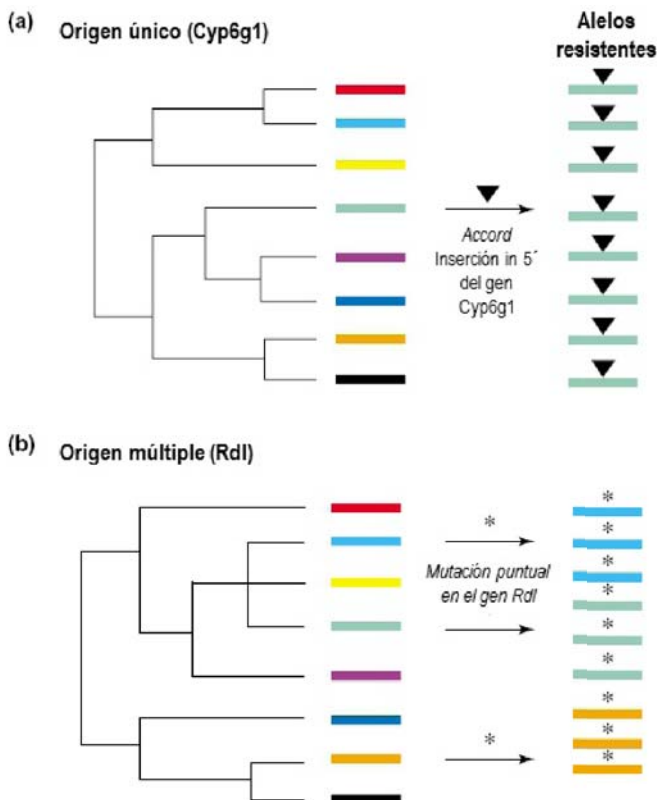


Figura 4. Orígenes únicos versus múltiples de resistencia a insecticidas asociadas a mutaciones. (a) La filogenia teórica de alelos susceptibles en diferentes haplotipos se muestran en diferentes colores. Después de la inserción del elemento de transposición *Accord* (indicado por el triángulo) en el extremo 5' del gen *Cyp6g1* en un haplotipo particular (verde), este haplotipo se convierte en un alelo resistente. La selección hecha por el insecticida y la migración habilitan la propagación de este alelo de resistencia nivel mundial y los alelos de resistencia de todo el mundo son idénticos. (b) En el caso de los orígenes múltiples, las mutaciones asociadas a la resistencia son independientes. En este caso las mutaciones en el gen *Rdl* (indicada por un asterisco), surgen en diferentes haplotipos (azul, verde y naranja). En la ausencia de migración generalizada y por la selección del insecticida cada población posee un tipo de alelo de resistencia diferente a partir de un haplotipo ancestral distinto.

resistencia como *kdr* y acetilcolinesterasa modificada (MACE) dentro de un linaje clonal⁵⁶. Estos estudios no solo son de interés académico ya que dado la escala a la cual evoluciona la resistencia es fundamental la elaboración de una estrategia adecuada del manejo de la resistencia.

Resistencia a las plantas transgénicas

Tradicionalmente, las moléculas pequeñas de insecticidas se pulverizan sobre las plantas infestadas. Sin embargo, los últimos enfoques novedosos para el control de insectos incluyen la ingeniería de toxinas insecticidas, principalmente de *Bacillus thuringiensis* (Recuadro 1), que se expresan en plantas transgénicas. Aunque ha sido tentador emplear nuevos métodos para el análisis de los mecanismos de resistencia, las presiones de la selección de los cultivos transgénicos y las estrategias de manejo para combatir la evolución de la resistencia son similares a los que se han desarrollado a partir de los insecticidas convencionales. Actualmente, nuestro conocimiento de la resistencia a las δ -endotoxinas (a menudo denominadas simplemente endotoxinas Bt) de *B. thuringiensis* se ve obstaculizada por la falta de mutantes derivados de campo ya que todavía no se han producido brotes de resistencia en respuesta a los cultivos transgénicos Bt⁵⁷. Sin embargo, las poblaciones de campo de la polilla dorso de diamante, *Plutella xylostella*, han desarrollado resistencia a los aerosoles Bt y la resistencia a Bt exógeno ha sido seleccionado en el laboratorio⁵⁸. Diferentes proteínas e hidratos de carbono, asociadas al intestino delgado, están implicadas como receptores de Bt⁵⁸ lo que hace más complejo el análisis de sitios diana.

En Lepidoptera (mariposas y polillas), el tipo más común de resistencia Bt seleccionado se ha denominado "modo 1"⁵⁹. En estas cepas, la resistencia es recesiva e implica altos niveles de resistencia y una reducción a la unión de a la toxina (*Cry1A*) (Recuadro 1), sin resistencia cruzada a la toxina 1C (*Cry1C*)⁵⁹. Esto sugiere que en insectos homocigotos, la unión a *Cry1A* está reducida o suprimida, pero que en insectos heterocigotos la presencia de un alelo susceptible los hace vulnerables. La susceptibilidad a *Cry1C* no se ve afectada porque esta toxina se une a un sitio diana diferente⁵⁸. Los dos principales candidatos para ser receptores de *Cry1A* son aminopeptidasas y cadherinas ya que a ambos se une la *Cry1A*⁶⁰⁻⁶⁴; estudios recientes han tratado de correlacionar alteraciones en estos receptores en cepas resistentes a Bt a campo y en laboratorio. En la cepa de laboratorio seleccionada de la oruga del tabaco *Heliothis virescens* YHD2, se ha demostrado una estrecha vinculación entre la resistencia a *Cry1Ac* y un gen que codifica la cadherina (*BTR-4*), y se encontró un retrotransposón que interrumpe el gen *BTR-4*, lo que sugiere que la pérdida de la cadherina *BTR-4* es responsable de la resistencia⁶⁵. Aunque las pruebas de complementación entre machos recogidos en el campo y hembras resistentes

(YHD2) sugieren que los alelos de resistencia *BTR-4* se encuentran en las poblaciones naturales, el alelo de resistencia en la cepa YHD2 no fue producido por fallas de control, sino por la rápida y generalizada adopción de las plantas transgénicas Bt.

Más recientemente, enfoques similares se usaron para mostrar el ligamiento de tres alelos mutantes de cadherina con resistencia a los *Cry1Ac* en el gusano rosado, *Pectinophora gossypiella*. Cada uno de los tres mutantes tiene una delección de al menos ocho aminoácidos aguas arriba de la región putativa de unión a la toxina de la proteína cadherina⁶⁶. Las larvas con dos alelos de resistencia en cualquier combinación son resistentes, mientras que aquellos con uno o ninguno son susceptibles.

Toxinas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis cristalina (*Cry*) y toxinas citolíticas (*Cyt*) y su especificidad

Las cepas de *B. thuringiensis* tienen más de 200 genes asociados a toxinas clasificados dentro de cinco grupos *CryI-IV* y *Cyt* (http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/B/). Estas toxinas tienen diferentes, pero a veces superpuestas, especificidades contra distintos insectos plaga. Los δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* se denominan normalmente 'Bt'. Sin embargo, *B. thuringiensis* también produce proteínas insecticidas vegetativas (*Vips*), proteínas insecticidas no relacionados con las *Cry* o *Cyt*.

Sprays Bt y cultivos transgénicos

Los genes que codifican las proteínas *Cry* y *Cyt* se codifican en grandes plásmidos extracromosómicos en diferentes cepas de *B. thuringiensis*. Por lo tanto aerosoles de 'Bt' pueden ser una mezcla de diferentes toxinas dependiendo de la cepa o combinación de cepas utilizadas. Actualmente, la mayoría de los cultivos transgénicos resistentes contienen una sola proteína *Cry* eficaz contra un estrecho rango de especies de insectos. Sin embargo, productos más recientes contienen dos o más proteínas insecticidas, bien diferentes proteínas *Cry* o *Cry* y *Vips* juntos, en un estrategia conocida como "pirámide". Esta estrategia le dará a los cultivos transgénicos la capacidad de resistir a una gama más amplia de insectos.

La resistencia a Bt

La resistencia a Bt en el campo ha evolucionado a partir del uso de aerosoles que han permitido la supervivencia de los heterocigotos resistentes y la aparición consiguiente de la resistencia. La estrategia actual utilizada para retrasar la evolución de la resistencia implica la aplicación de una "alta dosis" (asegurándose de que las toxinas maten a los heterocigotos resistentes) y "refugio" (cultivos no transgénicos que permiten preservar genes susceptibles dentro de las poblaciones de insectos tratados). A la fecha no ha aparecido a resistencia a los cultivos transgénicos.

Fundamentalmente, las larvas homocigotas resistentes, fueron capaces de sobrevivir cuando se colocaron sobre el algodón Bt transgénico. No está clara la importancia de estos alelos de resistencia en poblaciones de campo, debido a que todavía no se han documentado aumentos en la frecuencia de estos en los cultivos transgénicos Bt⁶⁷. Esto sugiere que las estrategias de manejo de resistencia (Recuadro 1) son eficaces o que estos alelos no tienen niveles suficientemente altos de resistencia para permitir la supervivencia en los cultivos transgénicos en el campo. Por otra parte, podrían estar asociados con otras desventajas adaptativas⁶⁷, manteniendo su frecuencia actualmente por debajo de los umbrales de control. Por último, la documentación de los mecanismos de resistencia a posibles plantas transgénicas Bt allana el camino para la aplicación de técnicas moleculares de vigilancia de la resistencia. Aunque estas técnicas han estado disponibles durante mucho tiempo para los insecticidas convencionales, su uso es limitado hasta la fecha. Sin embargo, la creciente necesidad de datos para satisfacer los requisitos reglamentarios para los cultivos transgénicos, incluyen la posibilidad de evolución de la resistencia, la vigilancia molecular de resistencia a la toxina Bt pronto podría convertirse en una necesidad.

Nuevas herramientas y conceptos

Aunque muchas de las preguntas en torno a la evolución molecular de resistencia a los insecticidas ya han sido abordadas, al menos parcialmente, ahora nos encontramos con nuevos problemas y posibles nuevas soluciones. En esta última sección, discutiremos el cambio de énfasis en los tipos de mutaciones asociadas con la resistencia, los desafíos implícitos en la búsqueda de nuevos objetivos de insecticidas y en la capacidad para predecir posibles mecanismos de resistencia.

Tipos de mutación

Uno de los nuevos conceptos centrales que surgen del estudio de la resistencia a los insecticidas es la identificación de los elementos transponibles como causantes de mutaciones. La mayoría de los primeros estudios sobre la resistencia sugiere que las mutaciones puntuales asociadas a ella y que la tasa de sustitución neutral por sitio (4×10^{-9}) indicaría la tasa de aparición de mutaciones de novo en las poblaciones naturales⁵⁴. Sin embargo, con el descubrimiento de que los elementos de transposición al parecer causan resistencia metabólica en *Drosophila*¹ y potencialmente la resistencia al Bt en Lepidoptera⁶⁵, el tema de la tasa de mutación debe ser revisada. Los genomas de insectos están llenas de transposones, como indicada por una revisión reciente que señala la existencia de 1.572

elementos completos o parciales en un único genoma de *Drosophila*⁶⁸. Estos elementos constituyen el 4% del ADN genómico en *Drosophila*, pero las mutaciones asociadas con su movimiento pueden ocurrir a una frecuencia más alta. Estas estimaciones revisadas de las frecuencias iniciales de resistencia deben ser incorporadas en los modelos de evolución y gestión de la misma.

Nuevas metas y herramientas

La genética de *Drosophila* también ha sido útil para determinar el modo de acción de nuevos insecticidas. Estos estudios incluyen el análisis de mutantes resistentes a nuevos reguladores del crecimiento de insectos tales como la hormona juvenil (JH) que imita al metopreno. La presencia de JH durante la muda de insectos promueve una muda larval-larval en lugar de una muda larval-pupal, lo que tiene un efecto letal. Mutantes de *Drosophila* resistentes al metopreno fueron recuperados después de mutagénesis del elemento P⁶⁹, mostrando de nuevo que los transposones pueden causar resistencia a nuevos compuestos⁷⁰. El producto del gen Metopreno-tolerante (Met) es regulador transcripcional, miembro de la familia bHLH-PAS⁷¹, lo que conduce a preguntas interesantes sobre el modo de acción de JH. Por lo tanto, análisis similares de nuevos reguladores de crecimiento no sólo prometen conocimientos sobre el modo de acción de estos nuevos compuestos, sino también proporcionar nuevos e interesantes sitios diana. Por último, la genómica comparativa promete mucho para el análisis comparativo de la resistencia a los insecticidas⁸. Aunque son pocos los genomas de insectos se han secuenciado hasta la fecha, hay grandes esfuerzos en la elaboración de mapas de ligamiento y colecciones de EST^e para los insectos de importancia económica⁷². A largo plazo, esto nos permitirá diseccionar la resistencia en un genoma de gran escala. Por ejemplo los microarreglos del citocromo P450 se han ampliado para incluir a todos los genes de esterasa y GST, y lo mismo se está desarrollando para los mosquitos. El correspondiente desarrollo de herramientas genéticas más allá de *Drosophila* también permitirá herramientas potentes, tales como la transformación y la interrupción de genes, que se utilizarán en los insectos plagas.

e) EST (acrónimo del inglés expressed sequence tag) o *marcador de secuencia expresada* es una pequeña sub-secuencia de una secuencia nucleotídica transcrita (codificante de una proteína o no).

Referencias Bibliográficas

Nota: la bibliografía de la sección «Traducciones» es citada y reproducida tal cual figura en el artículo original.

- 1 Daborn, P.J. et al. (2002) A single P450 allele associated with insecticide resistance in global populations of *Drosophila*. *Science* 297, 2253–2256
- 2 ffrench-Constant, R.H. et al. (1993) A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature* 363, 449–451
- 3 Mutero, A. et al. (1994) Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 5922–5926
- 4 Williamson, M.S. et al. (1996) Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Mol. Gen. Genet.* 252, 51–60
- 5 Oakeshott, J.G. et al. (2003) The genomics of insecticide resistance. *Genome Biol.* 4, 202
- 6 Newcomb, R.D. et al. (1997) A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 7464–7468
- 7 Tijet, N. et al. (2001) The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene* 262, 189–198
- 8 Ranson, H. et al. (2002) Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* 298, 179–181
- 9 McKenzie, J.A. et al. (1994) The genetic, molecular and phenotypic consequences of selection for insecticide resistance. *Trends Ecol. Evol.* 9, 166–169
- 10 McKenzie, J.A. et al. (1998) Predicting insecticide resistance: mutagenesis, selection and response. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 353, 1729–1734
- 11 McKenzie, J.A. (1996) Ecological and Evolutionary Aspects of Insecticide Resistance. R.G. Landes
- 12 ffrench-Constant, R.H. et al. (2000) Cyclodiene insecticide resistance: from molecular to population genetics. *Annu. Rev. Entomol.* 45, 449–466
- 13 ffrench-Constant, R.H. et al. (1991) Gene mapping and cross-resistance in cyclodiene insecticide-resistant *Drosophila melanogaster* (Mg.). *Genet. Res.* 57, 17–21
- 14 Zhang, H-G. et al. (1994) A unique amino acid of the *Drosophila* GABA receptor with influence on drug sensitivity by two mechanisms. *J. Physiol.* 479, 65–75
- 15 ffrench-Constant, R.H. (1994) The molecular and population genetics of cyclodiene insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24, 335–345
- 16 Tomizawa, M. et al. (2003) Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu. Rev. Entomol.* 48, 339–364
- 17 Clark, J.M. et al. (1995) Resistance to avermectins: extent, mechanisms, and management implications. *Annu. Rev. Entomol.* 40, 1–30
- 18 Matsuda, K. et al. (2001) Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 573–580
- 19 Tomizawa, M. et al. (2000) Neonicotinoid insecticides: molecular features conferring selectivity for insect versus mammalian nicotinic receptors. *J. Agric. Food Chem.* 48, 6016–6024
- 20 Tomizawa, M. et al. (2001) Structure and diversity of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Pest Manag. Sci.* 57, 914–922
- 21 Kane, N.S. et al. (2000) Drug-resistant *Drosophila* indicate glutamate-gated chloride channels are targets for the antiparasitic nodulisporic acid and ivermectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13949–13954
- 22 Ludmerer, S.W. et al. (2002) Ivermectin and nodulisporic acid receptors in *Drosophila melanogaster* contain both gamma-aminobutyric acid-gated Rdl and glutamate-gated GluCl alpha chloride channel subunits. *Biochemistry* 41, 6548–6560
- 23 Soderlund, D.M. et al. (2003) The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 563–577
- 24 Farnham, A.W. (1977) Genetics of resistance of houseflies (*Musca domestica* L.) to pyrethroids. I. Knock-down resistance. *Pestic. Sci.* 8, 631–636
- 25 Loughney, K. et al. (1989) Molecular analysis of the para locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. *Cell* 58, 1143–1154
- 26 Williamson, M.S. et al. (1993) Knockdown resistance (kdr) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene locus in the housefly (*Musca domestica*). *Mol. Gen. Genet.* 240, 17–22
- 27 Miyazaki, M. et al. (1996) Cloning and sequencing of the para-type sodium channel gene from susceptible and kdr-resistance German cockroaches (*Blattella germanica*) and the house fly (*Musca domestica*). *Mol. Gen. Genet.* 252, 61–68
- 28 Fournier, D. et al. (1989) *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase gene. Structure, evolution and mutations. *J. Mol. Biol.* 210, 15–22
- 29 Bourguet, D. et al. (1996) Existence of two acetylcholinesterases in the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J. Neurochem.* 67, 2115–2123
- 30 Weill, M. et al. (2002) A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila*. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 269, 2007–2016
- 31 Weill, M. et al. (2003) Comparative genomics: insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* 423, 136–137
- 32 ffrench-Constant, R.H. (1999) Target site mediated insecticide resistance: what questions remain? *Insect Biochem. Molec. Biol.* 29, 397–403
- 33 Feyereisen, R. (1999) Insect P450 Enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* 44, 507–533
- 34 Brandt, A. et al. (2002) Differential expression and induction of two *Drosophila* cytochrome P450 genes near the Rst(2)DDT locus. *Insect Mol. Biol.* 11, 337–341
- 35 Le Goff, G. et al. (2003) Microarray analysis of cytochrome P450 mediated insecticide resistance in *Drosophila*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 701–708
- 36 Daborn, P. et al. (2001) DDT resistance in *Drosophila* correlates with Cyp6g1 over-expression and confers cross-resistance to the neonicotinoid imidacloprid. *Mol. Genet. Genomics* 266, 556–563
- 37 Korytko, P.J. et al. (2000) Expression and activity of a housefly cytochrome P450, CYP6D1, in *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol. Biol.* 9, 441–449
- 38 Van Asperen, K. et al. (1959) Organophosphate resistance and esterase activity in houseflies. *Entomol Experimentalis et Applicata* 2, 48–57
- 39 Hughes, P.B. et al. (1985) Genetics of an esterase associated with resistance to organophosphorus insecticides in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). *Bull. Entomol. Res.* 75, 535–544
- 40 Townsend, M.G. et al. (1969) The mechanism of malathion resistance in the blowfly *Chrysomya putoria*. *Entomol Experimentalis et Applicata* 12, 243–267
- 41 Oppenoorth, F.J. et al. (1960) Allelic genes in the housefly producing modified enzymes that cause organophosphate resistance. *Science* 132, 298–299
- 42 Newcomb, R.D. et al. (1997) cDNA cloning, baculovirus-expression and kinetic properties of the esterase, E3, involved in organophosphorus resistance in *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27, 15–25
- 43 Lockridge, O. et al. (1997) A single amino acid substitution, Gly117His, confers phosphotriesterase (organophosphorus acid anhydride hydrolase) activity on human butyrylcholinesterase. *Biochemistry* 36, 786–795
- 44 Spackman, M.E. et al. (1994) A cluster of esterase genes on chromosome 3R of *Drosophila melanogaster* includes homologues of esterase genes conferring insecticide resistance in *Lucilia cuprina*. *Biochem. Genet.* 32, 39–62
- 45 Robin, G.C. et al. (2000) The evolution of an alpha-esterase pseudogene inactivated in the *Drosophila melanogaster* lineage. *Mol. Biol. Evol.* 17, 563–575
- 46 Russell, R.J. et al. (1996) Molecular cloning of an alpha-esterase gene cluster on chromosome 3R of *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 235–247
- 47 Newcomb, R.D. et al. (1996) Isolation of alpha cluster esterase genes associated with organophosphate resistance in *Lucilia cuprina*. *Insect Mol. Biol.* 5, 211–216
- 48 Field, L.M. et al. (1998) Evidence that the E4 and FE4 esterase genes responsible for insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer) are part of a gene family. *Biochem. J.* 330, 169–173

- 49 Field, L.M. et al. (1999) Relationship between amount of esterase and gene copy number in insecticide-resistant *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochem. J.* 339, 737-742
- 50 Devonshire, A.L. et al. (1998) The evolution of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 353, 1677-1684
- 51 Field, L.M. et al. (1988) Molecular evidence that insecticide resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae* Sulz.) results from amplification of an esterase gene. *Biochem. J.* 251, 309-312
- 52 Raymond, M. et al. (1998) An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 353, 1707-1711
- 53 Raymond, M. et al. (1991) Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature* 350, 151-153
- 54 Andreev, D. et al. (1999) Multiple origins of cyclodiene insecticide resistance in *Tribolium castaneum* (Coleoptera: tenebrionidae). *J. Mol. Evol.* 48, 615-624
- 55 Anthony, N.M. et al. (1995) Molecular analysis of cyclodiene resistance-associated mutations among populations of the sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 51, 220-228
- 56 Field, L.M. et al. (2002) Amplified esterase genes and their relationship with other insecticide resistance mechanisms in English field populations of the aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Pest Manag. Sci.* 58, 889-894
- 57 Shelton, A.M. et al. (2002) Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annu. Rev. Entomol.* 47, 845-881
- 58 Ferre, J. et al. (2002) Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 47, 501-533
- 59 Tabashnik, B.E. et al. (1998) Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: uniform or diverse? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 353, 1751-1756
- 60 Knight, P.J. et al. (1994) The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* 11, 429-436
- 61 Knight, P.J. et al. (1995) Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) toxin. *J. Biol. Chem.* 270, 17765-17770
- 62 Sangadala, S. et al. (1994) A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and 86Rb(p)-Kp efflux in vitro. *J. Biol. Chem.* 269, 10088-10092
- 63 Vadlamudi, R.K. et al. (1995) Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 270, 5490-5494
- 64 Nagamatsu, Y. et al. (1999) The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIAa toxin. *FEBS Lett.* 460, 385-390
- 65 Gahan, L.J. et al. (2001) Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science* 293, 857-860
- 66 Morin, S. et al. (2003) Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5004-5009
- 67 Tabashnik, B.E. et al. (2003) Insect resistance to transgenic Bt crops: lessons from the laboratory and field. *J. Econ. Entomol.* 96, 1031-1038
- 68 Kaminker, J.S. et al. (2002) The transposable elements of the *Drosophila melanogaster* euchromatin: a genomics perspective. *Genome Biol.* 3, 0084.1-0084.20
- 69 Shemshedini, L. et al. (1990) Resistance to juvenile hormone and an insect growth regulator in *Drosophila* is associated with an altered cytosolic juvenile hormone-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 2072-2076
- 70 Wilson, T.G. (1993) Transposable elements as initiators of insecticide resistance. *J. Econ. Entomol.* 86, 645-651
- 71 Ashok, M. et al. (1998) Insect juvenile hormone resistance gene homology with the bHLH-PAS family of transcriptional regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 2761-2766
- 72 Heckel, D.G. (2003) Genomics in pure and applied entomology. *Annu. Rev. Entomol.* 48, 235-260
- 73 Roush, R.T. et al. (1987) Ecological genetics of insecticide resistance. *Annu. Rev. Entomol.* 32, 361-380



TRADUCCIONES

Traductor
Pablo Adrián Otero

pabloadrianotero@gmail.com