

# **Efecto de estresores naturales y antropogénicos (insecticidas) sobre diferentes estructuras lipídicas y metabolismo oxidativo de arañas**

**DOCTORANDO:**

Licenciado Gabriel Molina

**DIRECTORES:**

Doctor Carlos Fernando Garcia

Doctora Aldana Laino



**Facultad de Ciencias Naturales y Museo**

**Universidad Nacional de la Plata**

**2024**

---

*El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Naturales fue realizado en el Instituto de investigaciones bioquímicas de La Plata “Profesor Doctor Rodolfo R. Brenner” (INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, bajo la dirección del Dr. Carlos Fernando Garcia y la Dra. Aldana Laino.*

---

---

## Agradecimientos

---

Al CONICET y a la FCNyM, UNLP por hacer posible realizar este trabajo de doctorado. Y al INIBIOLP, por brindar un sitio y buen ambiente laboral para su desarrollo.

A mis directores, Dr. Fernando Garcia y Dra. Aldana Laino, por acordarse de su ex alumno de química biológica y ofrecerle la oportunidad de realizar este trabajo. Al margen del aporte científico que realizamos, fue una experiencia formadora a otros niveles para mí. Gracias por ser siempre atentos y considerados, tanto desde lo profesional, como desde lo humano.

A mis compañeras de laboratorio, la Dra. Sofia Romero, que me ofreció su apoyo durante el tiempo que compartimos como becarios. Y la Dra. Cunningham, por su trato ameno durante estos años.

Al Ing. Luis Giambelluca, por abrirme las puertas de su propiedad para muestrear.

A Luciano Peralta, por su diligente servicio en el muestreo de arañas, sin el cual hubiera sido mucho más difícil terminar este trabajo.

Al Bioq. Sergio Mijailovsky y al Dr. Juan Girotti, por estar siempre disponibles cuando necesité su experiencia en cromatografía.

A la Dra. Julia Tau por su colaboración durante los análisis de citometría de flujo.

A la Dra. Florencia Arrighetti por realizar los análisis histológicos.

Al Lic. Ignacio Chiumiento, por su compañerismo ejemplar, desde las aulas de nuestra facultad, hasta los pasillos del INIBIOLP.

**Gracias a todos.**

***Dedicado a***

Mi familia, por su constante apoyo y calidez durante estos años.

Gracias a mis padres Mabel y Jorge por servirme de ejemplo y ayuda. Y gracias a mi hermano Joaquín y mi tío Ricardo por ser mi contrapeso emocional luego de los días de trabajo.

Sin ustedes no hubiera llegado hasta acá.

---

Los resultados presentados en el **Capítulo 4** de esta tesis doctoral fueron publicados en:

- **Molina, G., Laino, A., Arrighetti, F., Lacava, M., Romero, S., Mijailovsky, S., & Garcia, C. F. 2023.** Effect of the insecticide chlorpyrifos on behavioral and metabolic aspects of the spider *Polybetes pythagoricus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 42(6), 1293-1308. <https://doi.org/10.1002/etc.5607>

Los resultados presentados en los **Capítulos 5 y 6** de esta tesis doctoral fueron enviados a publicar a *Journal of Zoology*:

- **Molina, G., Laino, A., Garcia, C. F.** Adaptive homeoviscosity in spiders.
-

---

## Resumen

---

Las arañas (Arthropoda: Araneae) son el orden más diverso dentro de la Clase Arachnida. Se encuentran presentes en todos los ecosistemas terrestres y se destacan por su voraz hábito depredador generalista, principalmente sobre insectos. Esta formidable capacidad para controlar las poblaciones de especies potencialmente destructivas para la agricultura convierte a las arañas en candidatas para ser importantes controladores biológicos de plagas. Sin embargo, los medios químicos convencionales empleados para proteger los cultivos, suponen un riesgo para los organismos no blanco. Como modelo biológico de arañas para esta tesis, se eligió a *Polybetes pythagoricus* (Sparassidae), una araña autóctona de Sudamérica, distribuida en el centro-norte del país. Esta especie resulta un adecuado modelo para ensayos bioquímicos debido a su tamaño, abundancia, facilidad de captura, manipulación y mantenimiento en laboratorio.

El clorpirifos es un insecticida organofosforado de amplio espectro que, aunque ha generado preocupación por su potencial persistencia en el ambiente y evidencia de toxicidad para muchas especies incluida la humana, sigue siendo utilizado en muchos países del mundo para el control de plagas en agroecosistemas, incluido Argentina. Una vez liberado al ambiente, es factible que los organismos puedan detectar las áreas contaminadas con insecticidas y evitarlas a partir de cambios en su comportamiento. Para evaluar la capacidad de *P. pythagoricus* de alterar su comportamiento exploratorio a causa de este insecticida, se realizaron ensayos en los que se registraron, durante 4 h, los movimientos de adultos en presencia de superficies expuestas a clorpirifos. Se observó que *P. pythagoricus* es capaz de reconocer y evitar superficies contaminadas.

Sin embargo, debido a los usuales medios de aplicación, aún es probable que este plaguicida alcance a los individuos. La cutícula de los artrópodos es la primer defensa contra las condiciones adversas y sustancias xenobióticas. Su capa más externa, la epicutícula, se ha descrito como una potencial barrera ante los insecticidas, debido a su contenido de hidrocarburos. Los hidrocarburos de la epicutícula de *P. pythagoricus* se caracterizaron mediante cromatografía gaseosa y espectrometría de masas, mostrando una composición rica en hidrocarburos de cadena larga, la que implica un posible rol en la protección ante la internalización de insecticidas.

Pese a lo expuesto, la internalización de los insecticidas es una posibilidad. Una consecuencia general de la intoxicación con estos compuestos, incluso en dosis subletales, es la sobreproducción de especies reactivas del oxígeno, lo que puede provocar estrés oxidativo y por lo tanto daño en las biomoléculas, que particularmente en lípidos, se evidencia como peroxidación lipídica. Uno de los principales mecanismos que existen como defensa ante lo anterior, es el sistema antioxidante enzimático. Se plantearon ensayos de exposición tópica a una dosis de campo de clorpirifos, con tiempos de 6, 24 y 48 h, sobre *P.*

*pythagoricus* adultas. Posteriormente a los ensayos, se disecó el divertículo intestinal, órgano clave en el metabolismo de las arañas. Sobre el homogenato de este órgano se realizaron mediciones de actividad de varias enzimas: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, glutatión-S-transferasa; y se midió la concentración de malonaldehído (como evidencia de peroxidación lipídica), y la actividad del biomarcador de efecto de organofosforados, la enzima acetilcolinesterasa. Se observó un cambio significativo en la actividad de catalasa, que fue más alta a las 6 h, mientras que la actividad de superóxido dismutasa y glutatión S-transferasa aumentó significativamente a las 24 h. La peroxidación lipídica aumentó a las 6 h, pero disminuyó a las 48 h.

Una potencial consecuencia del estrés oxidativo es el daño a nivel de los tejidos. Para estudiar esta posibilidad sobre el divertículo intestinal, se expusieron adultos a dosis de campo de clorpirifos durante 24 h y se realizaron preparados histológicos teñidos con hematoxilina-eosina. Se observó necrosis desde las 24 h en el divertículo intestinal.

Existen otros tipos de insecticidas para los que, a diferencia de los organofosforados, se tiene evidencia de ser relativamente más benignos para los enemigos naturales. Por lo cual, se realizó exposición tópica de 48 h a la dosis de campo de abamectina, una avermectina de uso común como insecticida en agricultura, sobre *P. pythagoricus* y se cuantificaron las actividades de las enzimas catalasa, como parte del sistema antioxidante y acetilcolinesterasa, como biomarcador de efecto. Además, se cuantificó la peroxidación lipídica para verificar daño oxidativo. No se probaron efectos significativos de la abamectina para ninguna de estas variables.

Los plaguicidas son una fuente de estrés de origen antropogénico, pero todo organismo debe enfrentarse también a fluctuaciones de la temperatura ambiental, que son de especial relevancia para los organismos ectotermos como las arañas. Las membranas son estructuras fundamentales de toda célula, cuya función biológica depende de su viscosidad. Este parámetro es afectado por la temperatura y por la composición lipídica. La hipótesis de homeoviscosidad adaptativa propone que, ante aumentos de la temperatura ambiental, la composición lipídica, y principalmente de ácidos grasos de las membranas, se modifica. Además, cambios en los porcentajes de fosfolípidos y colesterol son ajustes frecuentemente observados. Para estudiar como estos mecanismos operan en *P. pythagoricus*, se aclimataron adultos y juveniles durante 20 días a 1, 4, 10, 25 y 35 °C. Los lípidos totales del divertículo intestinal y el tejido muscular se extrajeron y se caracterizaron por cromatografía en capa fina acoplada a detector de ionización por llama. A partir de los lípidos totales se obtuvieron por saponificación y esterificación los ésteres metílicos de ácidos grasos, cuyos porcentajes se analizaron por cromatografía gaseosa acoplada a detector de ionización por llama. Los resultados indicaron que existieron variaciones lipídicas entre las diferentes temperaturas. Se observaron cambios en colesterol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y triacilglicerol. Para el caso de los ácidos grasos, a menores temperaturas se observó un

aumento de ácidos grasos insaturados (16:1, 18:1) y una disminución concomitante de ácidos grasos saturados (17:0 y 20:0).

Múltiples estresores pueden presentarse simultáneamente en el ambiente natural, por lo que entender cómo sus efectos se combinan para impactar sobre los individuos, se vuelve necesario a la hora de evaluar el riesgo sobre los organismos de interés como las arañas. La temperatura como condición ambiental, es por sí misma capaz de provocar estrés oxidativo, lo que podría agravarse si los organismos se exponen además a un segundo factor de estrés, como un insecticida. Para este estudio se aclimataron adultos de *P. pythagoricus* a 1, 25 y 35 °C durante 20 días, luego se los expuso tópicamente por 24 h a la dosis de campo de clorpirifos y se cuantificaron en divertículo intestinal la actividad de las enzimas del sistema antioxidante y las especies reactivas del oxígeno totales. Como resultado, no se encontró interacción entre las dos fuentes de estrés. Pero si se observó que la temperatura afecta levemente a la catalasa, glutatión-S-transferasa y superóxido dismutasa. Esta última, a su vez se observó influenciada por la exposición al clorpirifos. También se cuantificaron las sustancias crioprotectoras glicerol y glucosa, en divertículo intestinal, cuyos niveles se mantuvieron constantes entre las diferentes temperaturas.

Finalmente, de los ensayos realizados para esta tesis, se puede concluir que *P. pythagoricus*, como modelo de araña, puede ser afectada por una fuente de estrés antropogénico como el insecticida clorpirifos, en dosis que son usadas para la agricultura. Se probó que esta sustancia es capaz de alterar su comportamiento exploratorio y de inducir efectos adversos subletales, evidenciados por los cambios en la actividad de enzimas antioxidantes y marcadores de estrés oxidativo como peroxidación lipídica y daño histológico. A su vez, se cuantificó la variación en la composición lipídica ocasionada por la aclimatación a distintas temperaturas. Por último, no se encontró evidencia de que ambas fuentes de estrés interactuaran para agravar el efecto sobre el sistema antioxidante en las condiciones que fueron ensayadas.



---

## Abstract

---

Spiders (Arthropoda: Araneae) are the most diverse order within the Arachnida class. They inhabit all terrestrial ecosystems and are notable for their voracious, generalist predatory habits, primarily targeting insects. This formidable ability to control populations of potentially destructive agricultural pests makes spiders important candidates for biological pest control strategies. However, conventional chemical means used to protect crops pose a risk to non-target organisms.

*Polybetes pythagoricus* (Sparassidae), a spider native to South America and distributed in the central-northern part of the continent, was chosen as the biological model for this thesis. This species is an ideal biological model for biochemical tests due to its size, abundance, and ease of capture, handling, and maintenance in the laboratory.

Chlorpyrifos is a broad-spectrum organophosphate insecticide that, despite concerns about its environmental persistence and toxicity to many species, including humans, continues to be used globally for pest control in agroecosystems. Once released into the environment, organisms may detect and avoid insecticide-contaminated areas through behavioral changes. To evaluate the ability of *P. pythagoricus* to alter its exploratory behavior due to chlorpyrifos exposure, tests were conducted in which the movements of females on surfaces exposed to the insecticide were recorded for 4 hours. It was observed that *P. pythagoricus* can recognize and avoid contaminated surfaces.

Despite this avoidance behavior, the usual methods of application make it likely that spiders will still encounter the pesticide. The cuticle of arthropods serves as the first defense against adverse conditions and xenobiotic substances. Its outermost layer, the epicuticle, has been described as a potential barrier to insecticides in other arthropods due to its hydrocarbon content. The epicuticle of *P. pythagoricus* was characterized using gas chromatography and mass spectrometry, revealing a composition rich in long-chain hydrocarbons, suggesting a possible protective role against insecticide internalization.

Nevertheless, effective internalization of insecticides remains a possibility. Even at sublethal doses, poisoning with these compounds often results in the overproduction of reactive oxygen species, leading to oxidative stress and damage to biomolecules, particularly lipids, evidenced by lipid peroxidation. The enzymatic antioxidant system is a key defense mechanism against oxidative stress. Field-dose topical exposure trials were conducted on adult *P. pythagoricus* at 6, 24, and 48 hours. After the trials, the midgut diverticulum, a key metabolic organ in spiders, was dissected. The homogenate of this organ was used to measure the activity of several enzymes: superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, and glutathione S-transferase. Additionally, malonaldehyde concentration (a marker of lipid peroxidation) and acetylcholinesterase

activity (a biomarker of organophosphate effect) were measured. Significant changes were observed in enzyme activity, with catalase activity peaking at 6 hours, and superoxide dismutase and glutathione S-transferase activities increasing significantly at 24 hours. Lipid peroxidation increased at 6 hours but decreased at 48 hours.

A potential consequence of oxidative stress is tissue damage. To investigate this, adults were exposed to field doses of chlorpyrifos for 24 hours, and histological preparations of the midgut diverticulum stained with hematoxylin-eosin were examined. Necrosis was observed after 24 hours in the midgut diverticulum.

There are other insecticides, unlike organophosphates, which are considered relatively milder on natural enemies. Topical exposure to the field dose of abamectin, an avermectin commonly used as an insecticide in agriculture, was conducted for 48 hours on *P. pythagoricus*. The activities of catalase (as part of the antioxidant system) and acetylcholinesterase (as a biomarker of effect) were quantified, along with lipid peroxidation to assess oxidative damage. No significant effects of abamectin were found for any of these variables.

Pesticides are a source of anthropogenic stress, but organisms must also cope with ambient temperature fluctuations, which are particularly relevant for ectothermic organisms like spiders. Membranes are fundamental cell structures, and their biological function depends on their viscosity, which is affected by temperature and lipid composition. The adaptive homeoviscosity hypothesis proposes that as ambient temperature increases, the lipid composition of membranes, especially fatty acids, is modified. Changes in phospholipids and cholesterol are frequently observed adjustments. To study these mechanisms in *P. pythagoricus*, adults and juveniles were acclimatized for 20 days at 1, 4, 10, 25, and 35 °C. Total lipids from the midgut diverticulum and muscle tissue were extracted and characterized by thin-layer chromatography coupled with a flame ionization detector. Fatty acid methyl esters were obtained by saponification and esterification and analyzed by gas chromatography coupled with a flame ionization detector. The results indicated lipid variations with different temperatures, showing changes in cholesterol, phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine, and triacylglycerols. An increase in unsaturated fatty acids (16:1, 18:1) and a decrease in saturated fatty acids (17:0 and 20:0) were observed at lower temperatures, along with an increase in 18:2 at low temperatures.

Multiple stressors can occur simultaneously in the natural environment, so understanding their combined effects on individuals is necessary when assessing the risk to organisms like spiders. Temperature alone can cause oxidative stress, which could be exacerbated by exposure to a second stressor, such as an insecticide. For this study, *P. pythagoricus* adults were acclimatized to 1, 25, and 35 °C for 20 days, then topically exposed to the field dose of chlorpyrifos for 24 hours. The activity of antioxidant system enzymes and total reactive oxygen species in the midgut diverticulum were quantified. No interaction was found between the two stress sources. However, temperature slightly affected catalase, glutathione S-

transferase, and superoxide dismutase, with the latter also being influenced by chlorpyrifos exposure. Glycerol and glucose, cryoprotective substances in the midgut diverticulum, did not vary with temperature.

In conclusion, the tests carried out for this thesis show that *P. pythagoricus*, as a spider model, can be affected by anthropogenic stressors like chlorpyrifos at doses used in agriculture. It was proven that this substance can alter the exploratory behavior of the model and induce sublethal adverse effects, evidenced by changes in antioxidant enzyme activity, oxidative stress markers such as lipid peroxidation, and histological damage. Additionally, the variation in lipid composition due to acclimatization to different temperatures was quantified. Finally, no evidence was found that both stress sources interacted to exacerbate the effect on the antioxidant system under the tested conditions

---

## Abreviaturas

---

- **ABM:** abamectina
- **AChE:** acetilcolinesterasa
- **AG:** ácido graso
- **AGL:** ácidos grasos libres
- **CAT:** catalasa
- **CPF:** clorpirifos
- **COL:** colesterol
- **DG:** diacilglicerol
- **DI:** divertículo intestinal
- **EE:** esteroides esterificados
- **GC:** cromatografía gaseosa
- **Gli:** glicerol
- **Glu:** D-glucosa
- **GPx:** glutatión peroxidasa
- **GR:** glutatión reductasa
- **GSC:** cromatografía gas-sólido
- **GST:** glutatión-S-transferasa
- **HC:** hidrocarburos
- **HVA:** homeoviscosidad adaptativa
- **MDA:** malonaldehído
- **NADPH:** nicotinamida adenina dinucleótido
- **PC:** fosfatidilcolina
- **PE:** fosfatidiletanolamina

- **ROS:** especies reactivas del oxígeno
- **SM:** esfingomielina
- **SOD:** super óxido dismutasa
- **TAG:** triacilglicerol
- **TBHP:** hidroperóxido de terbutilo
- **TLC:** cromatografía en capa fina
- **TM:** tejido muscular

---

# Índice

---

<b>Resumen</b> .....	v
<b>Abstract</b> .....	viii
<b>Abreviaturas</b> .....	xi
<b>Índice</b> .....	xiii
<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1. Breves comentarios sobre el phylum Arthropoda .....	1
1.2. Introducción básica a la anatomía de las arañas .....	4
1.2.1. Cutícula .....	5
1.2.2. Sistema digestivo .....	5
1.2.3. Sistema circulatorio .....	7
1.2.4. Sistema respiratorio .....	7
1.2.5. Sistema excretor .....	7
1.2.6. Sistema reproductor.....	7
1.3. Sobre el modelo biológico empleado en este trabajo .....	8
1.3.1. Elección .....	8
1.3.2. Generalidades de <i>Polybetes pythagoricus</i> .....	9
1.4. Potencial de las arañas como controladores biológicos .....	10
1.5. Concepto de “estrés” en contexto de la biología .....	11
1.5.1. Estrés oxidativo y sistemas de defensa contra el mismo.....	11
1.6. Breve introducción a la toxicología .....	14
1.7. Insecticidas y sus potenciales riesgos para el ambiente.....	17
1.7.1. Organofosforados: clorpirifos .....	17
1.7.2. Avermectinas: abamectina .....	19
1.7.3. Efectos subletales de los insecticidas.....	19
1.8. Estrés por temperatura y adaptaciones relacionadas .....	20

1.8.1. Composición de membranas y temperatura: homeoviscosidad adaptativa y otros procesos.....	21
1.8.2. Ectotermos y cambio climático.....	23
1.9. Efecto de más de una fuente de estrés.....	23
<b>2. Materiales y métodos.....</b>	<b>25</b>
2.1. Insecticidas, solventes y reactivos .....	25
2.2. Modelo .....	27
2.2.1. Muestreo.....	27
2.2.2. Mantenimiento .....	28
2.2.3. Eutanasia y disección .....	29
2.3. Preparación de insecticidas.....	30
2.3.1. Dosis de campo .....	30
2.3.2. Insecticidas sobre superficies.....	31
2.4. Extracción acuosa.....	31
2.5. Técnicas de espectrofotometría .....	32
2.5.1. Lowry.....	33
2.5.2. Enzimas.....	33
2.5.3. TBARS .....	34
2.5.4. Glicerol .....	34
2.5.5. Glucosa .....	34
2.6. Análisis de daño histológico.....	34
2.7. Citometría de flujo .....	35
2.8. Extracción de hidrocarburos cuticulares.....	37
2.9. Extracción orgánica .....	37
2.10. Cromatografía en capa fina.....	38
2.11. Cromatografía Gaseosa .....	40
2.11.1. Análisis de hidrocarburos cuticulares .....	41
2.11.2. Análisis de ácidos grasos .....	42
2.12. Diseños experimentales .....	43
2.12.1. Experimentos de exposición tópica a insecticidas .....	43
2.12.2. Experimentos comportamentales sobre superficies expuestas a insecticidas .....	44
2.12.3. Experimentos de aclimatación a diferentes temperaturas.....	45
2.12.4. Experimentos de estrés combinado: temperatura e insecticidas.....	46

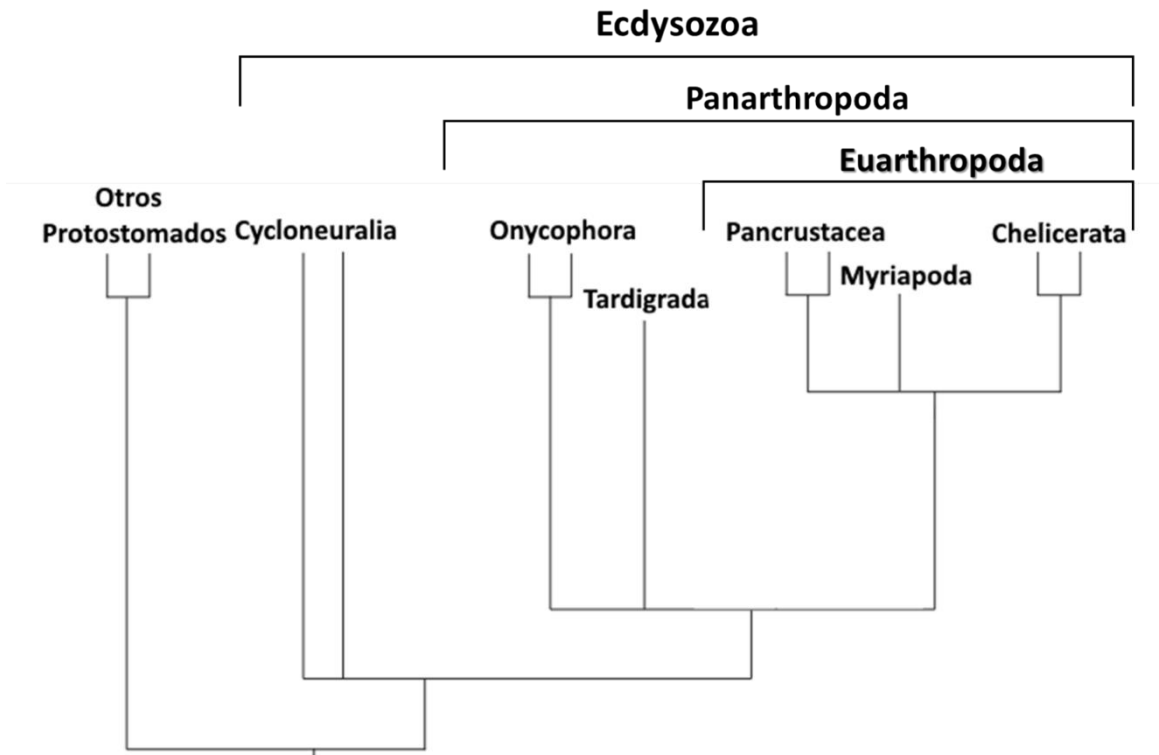
2.13. Análisis estadístico .....	48
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>49</b>
3.1. Objetivo general.....	49
3.2. Objetivos específicos.....	49
<b>4. Exposición al organofosforado clorpirifos .....</b>	<b>50</b>
4.1. Introducción .....	50
4.2. Resultados .....	52
4.2.1. Efecto del clorpirifos en superficie sobre comportamiento .....	52
4.2.2. Caracterización hidrocarburos cuticulares.....	53
4.2.3. Efectos de exposición a clorpirifos sobre sistema antioxidante .....	57
4.2.4. Efectos histopatológicos de clorpirifos sobre divertículo intestinal .....	59
4.2.5. Efectos de la abamectina sobre sistema antioxidante.....	60
4.3. Discusión .....	61
<b>5. Composición lipídica en relación con la temperatura .....</b>	<b>66</b>
5.1. Introducción .....	66
5.2. Resultados .....	68
5.2.1. Efecto de la aclimatación en la composición lipídica .....	68
5.2.2. Efecto de la aclimatación en composición de ácidos grasos.....	76
5.3. Discusión .....	81
<b>6. Aclimatación térmica y exposición a clorpirifos .....</b>	<b>84</b>
6.1. Introducción .....	84
6.2. Resultados .....	85
6.2.1. Estrés conjunto sobre sistema antioxidante enzimático .....	85
6.2.2. Estrés conjunto sobre especies reactivas del oxígeno .....	88
6.3. Discusión .....	90
<b>7. Conclusiones .....</b>	<b>92</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>94</b>



# 1. Introducción

## 1.1. Breves cometarios sobre el phylum Arthropoda

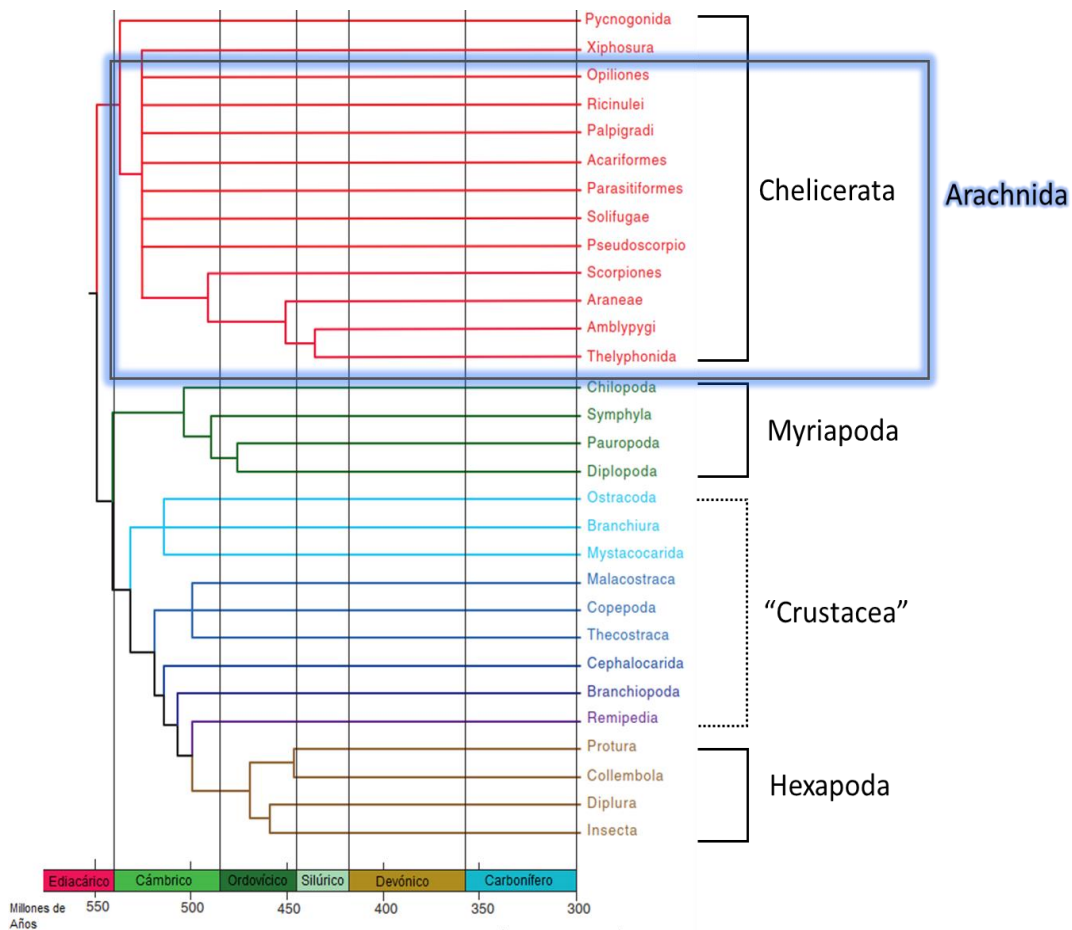
El phylum Arthropoda es el más diverso del reino Metazoa (Zabeati 2023). Su historia natural se puede rastrear hasta el período Cámbrico temprano, conociéndose fósiles de 521 millones de años (Giribet & Edgecombe 2019). El consenso actual (**Figura 1.1.**), clasifica a los artrópodos como bilaterios protostomados, pertenecientes al clado Ecdysozoa, caracterizado por la posesión de un exoesqueleto denominado cutícula, el cual deben mudar (“ecdisis”) para crecer (Budd & Telford 2009). Dentro de este clado se clasifican grupos importantes como Cycloneuralia (que contiene al phylum Nematoda y otros phyla menores), multitud de linajes extintos y Panarthropoda. El Phylum más derivado dentro de este último clado es Euarthropoda (=Arthropoda), los “verdaderos artrópodos”, caracterizados por apéndices con artejos esclerotizados y articulados entre sí por zonas de cutícula flexible (membranas articulares) (Giribet & Edgecombe 2019).



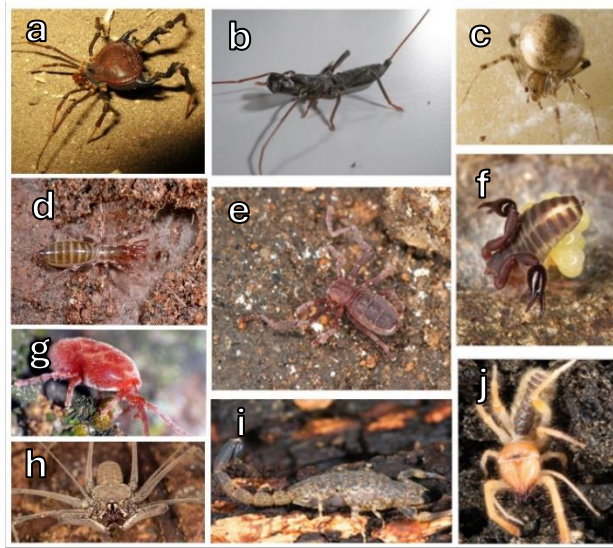
**Figura 1.1** Ubicación filogenética de Ecdysozoa. Tomada de Budd & Telford (2009) con modificaciones.

Las características morfológicas de los artrópodos son: un sistema circulatorio abierto, con un corazón dorsal y senos conformando un hemocel; un sistema nervioso central anterior supraesofágico, conectado a un cordón nervioso ventral ganglionado; músculos estriados y ausencia de células epiteliales ciliadas (Lane 1993). Los artrópodos, además de su superlativa riqueza específica, se destacan por ser numéricamente dominantes en toda clase de ecosistemas terrestres, y prominentes en los ecosistemas acuáticos, marinos y dulceacuícolas (Thorp 2009).

Los grupos taxonómicos con representantes vivos dentro del phylum de los artrópodos, se muestran con sus relaciones a lo largo del tiempo geológico en la **Figura 1.2**. La clase Arachnida, incluida en el subfilo Chelicerata, morfológicamente posee dos regiones del cuerpo o tagmas (asociaciones funcionales de segmentos) y seis pares de apéndices. El tagma anterior es denominado prosoma y lleva los quelíceros, pedipalpos y cuatro pares de patas caminadoras; el posterior se llama opistosoma y contiene la mayor parte del sistema reproductor y digestivo (Cowles 2018). Los arácnidos ocupan todos los hábitats terrestres (desiertos, bosques, tundra, praderas, montañas, suelos, detritos vegetales, cuevas, etc.) (Levin 2013). La mayoría de los órdenes de este grupo (varios representantes se ilustran en la **Figura 1.3**.) son depredadores que se alimentan de los fluidos pre-digeridos de sus presas. Sin considerar a los ácaros, los arácnidos tienden a estar en el tope de las cadenas tróficas de los invertebrados (Levin 2013), por lo que su relevancia ecológica es clara.

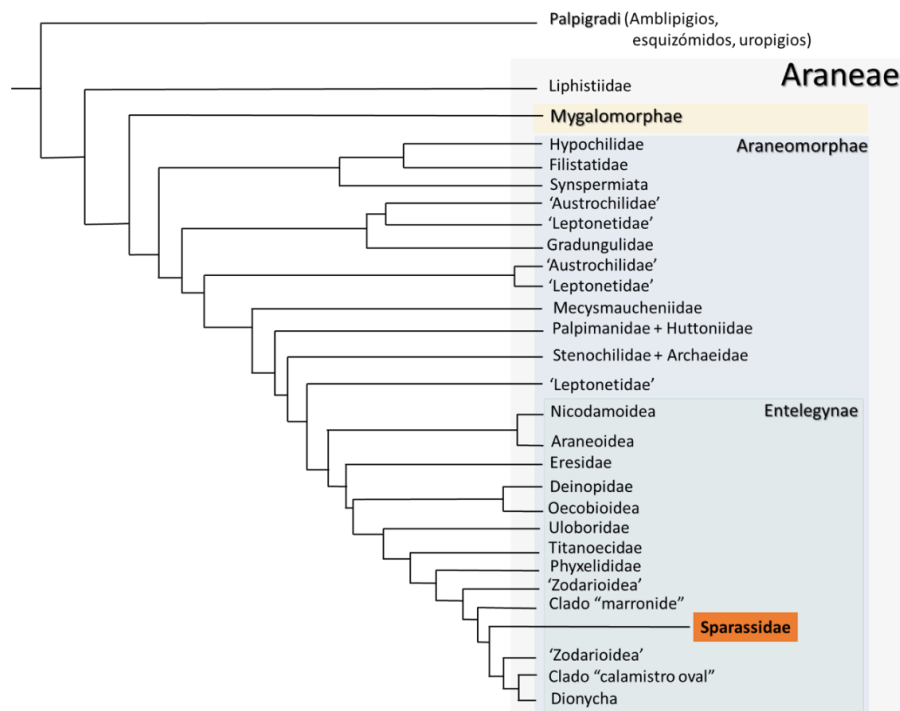


**Figura 1.2.** Cladograma de Arthropoda. Tomado con modificaciones de Giribet & Edgecombe (2019).



**Figura 1.3.** Representantes de arácnidos: **a.** Opiliones. **b.** Uropigi. **c.** Araneae. **d.** Schizomida. **e.** Ricinulei. **f.** Pseudoscorpiones. **g.** Acari. **h.** Amblipigii. **i.** Scorpiones. **j.** Solifuga. Tomado con modificaciones de Sharma (2018).

El orden Araneae, cuenta con más de 52.000 especies descritas (World Spider Catalog 2024). La gran mayoría de las familias, incluyendo la familia Sparassidae, a la que pertenece la especie modelo de esta tesis (**sección 1.3**), se ubican dentro de Araneomorphae. La **Figura 1.4.** ilustra una hipótesis filogenética del orden basada en caracteres moleculares (Wheeler *et al.* 2017).



**Figura 1.4.** Árbol filogenético molecular resumido de Araneae. Ubicación de Sparassidae resaltada. Cladograma tomado y simplificado de Wheeler y colaboradores (2017).

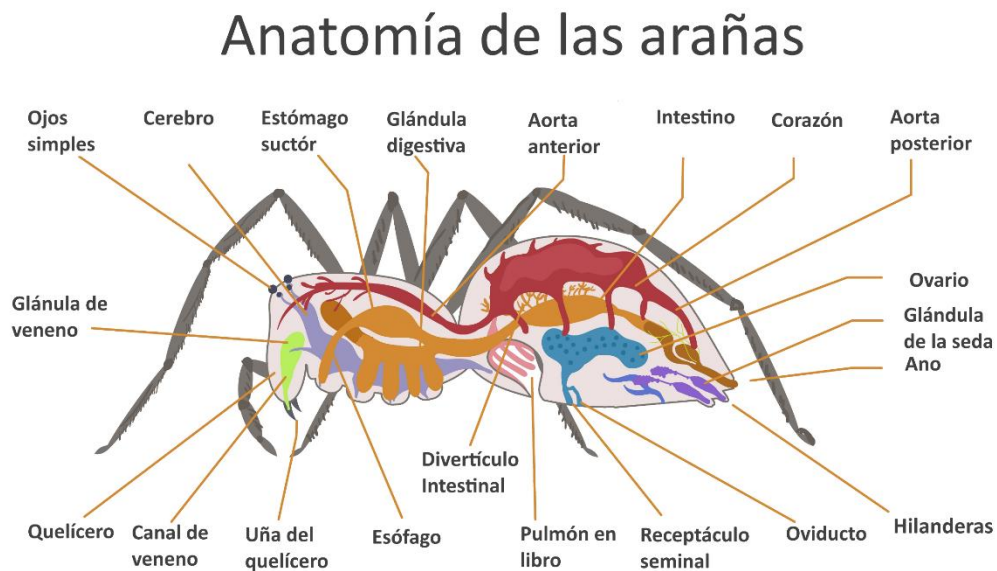
## 1.2. Introducción básica a la anatomía de las arañas

El plan corporal del grupo mantiene las características generales mencionadas para los arácnidos (**Figura 1.5.**). Los quelíceros de las arañas cuentan con sus característicos “colmillos” (uñas esclerotizadas y articuladas) para la captura de presas y manipulación del entorno. Cerca del extremo de estos desembocan las glándulas de veneno, conectadas por un ducto a su porción secretora, ubicada en el prosoma. El veneno en sí es una mezcla de numerosos polipéptidos de acción neurotóxica, aminos, aminoácidos y enzimas proteolíticas. Se considera que su función principal es la de paralizar a la presa (Foelix 2011). Solo los géneros *Atrax*, *Latrodectus*, *Loxosceles* y *Phoneutria*, poseen un veneno peligroso para el ser humano (Isbister & Gray 2003).

Los pedipalpos, apéndices de función sensorial, se caracterizan en los machos por estar modificados para la reproducción, contando con órganos secundarios de transferencia espermática. La movilidad la proveen los cuatro pares de patas locomotoras, formadas por seis artejos, siendo de distal a proximal: tarso, metatarso, tibia, patela, fémur trocánter y coxa.

El tejido muscular (**TM** en adelante) es de tipo estriado, con una estructura de los elementos contráctiles similar a la de otros artrópodos.

El opistosoma ha perdido todo rastro de segmentación interna. Las aperturas del sistema respiratorio, así como del reproductor se ubican ventralmente. Las glándulas de la seda secretan su producto desde derivados apendiculares ventrales, característicos del orden, llamados hilanderas.

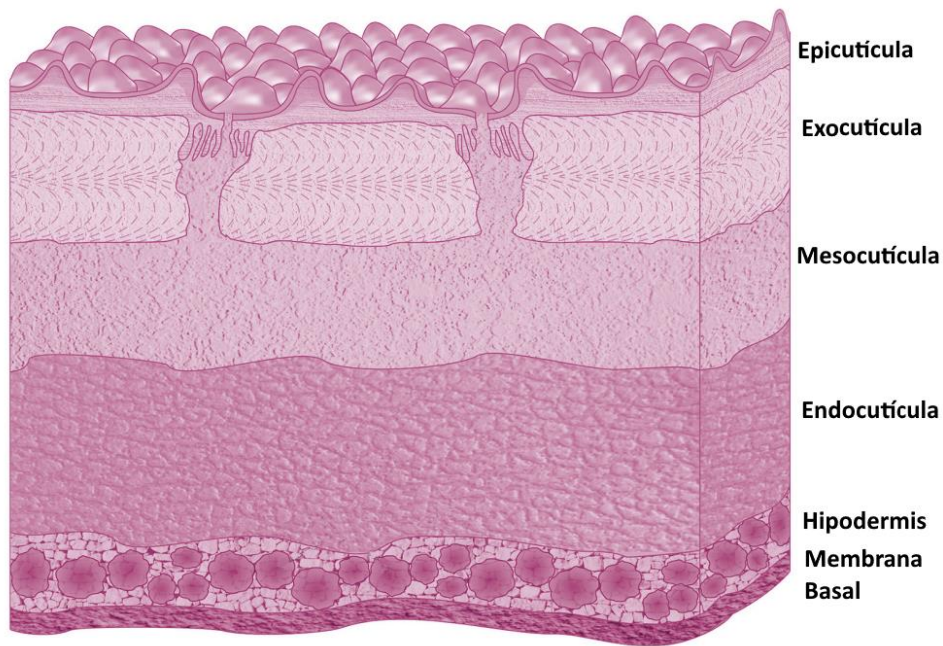


**Figura 1.5.** Anatomía externa e interna de las arañas.

A continuación, se describen brevemente aspectos relevantes de estructuras y sistemas de órganos de las arañas.

### 1.2.1. Cutícula

La cutícula de las arañas posee una función, estructura y composición, comparable a la del resto de artrópodos. Constituye el sostén del cuerpo, permite inserción muscular, protege del medio externo y aloja distintos tipos de sensilias (mecano y quimiorreceptores). Las capas que la conforman en general se resumen en: una epicutícula delgada superficial, de composición lipídica (ver adelante), y por debajo la procutícula compuesta por láminas del polisacárido quitina (polímero de unidades de N-acetilglucosamina) en una matriz proteica. Esta procutícula se divide en exocutícula esclerotizada, mesocutícula y endocutícula (**Figura 1.6.**). Por debajo de la cutícula se encuentra la hipodermis (o epidermis) que descansa sobre una membrana basal (Trabalon & Garcia 2021).



**Figura 1.6.** Esquema de la cutícula de arañas, con sus múltiples capas y estructuras. Tomada de Trabalon & Garcia (2021) con modificaciones.

La epicutícula, al ser la más externa de las capas cuticulares, es la responsable de prevenir la deshidratación del organismo (Foelix 2011). Se compone de una capa muy delgada hidrofóbica, lipídica, secretada desde la hipodermis a través de canales que atraviesan toda la procutícula. En la araña *Eratigena atrica* se ha determinado que la epicutícula se compone de un 86% de hidrocarburos (HC) con predominancia de los alcanos lineales, 9% de metil-ésteres y un 4% de ácidos grasos (AGs) (Trabalon & Garcia 2021).

### 1.2.2. Sistema digestivo

Luego de la captura y parálisis de la presa, las arañas regurgitan sobre esta un fluido enzimático que la pre-digiere externamente. El producto resultante es bombeado a través de la boca, faringe y esófago por acción muscular del estómago succionador. Posterior a este, comienza el intestino medio, el cual posee algunas digitaciones en el prosoma, pero la mayor parte se ubica en el opistosoma, donde

se forman proyecciones denominadas divertículos intestinales (en adelante **DI**). Posteriormente, se conecta un saco estercoral y los ductos excretores (túbulos de Malpighi). Por último, el tubo digestivo desemboca en el ano, ubicado en el extremo final del opistosoma (Foelix 2011).

## Divertículo intestinal

Anatómicamente, el DI se compone de múltiples lóbulos ramificados desde el intestino medio, los cuales suelen ocupar el espacio del hemocel entre los otros sistemas de órganos dentro del opistosoma. Como parte del sistema digestivo, se encarga de la producción y secreción de enzimas digestivas y absorción de nutrientes mediante células especializadas (Foelix 2011). Funcionalmente, esta estructura es clave para el metabolismo de las arañas ya que, además, almacena las reservas de glucógeno y lípidos (Foelix 2011).

En *P. pythagoricus* se ha probado la capacidad de asimilación en DI de los AGs de la dieta, y su uso en síntesis de acilglicéridos y fosfolípidos (Laino *et al.* 2009), así como el antes mencionado rol en el almacenamiento lipídico (Laino *et al.* 2009, Romero *et al.* 2018, Romero *et al.* 2019) y la liberación de los lípidos hacia las lipoproteínas hemolinfáticas (Laino *et al.* 2009, Laino *et al.* 2011a, Laino *et al.* 2015a). Además, en el DI ocurre la síntesis de proteínas precursoras del vitelo, las vitelogeninas, como se comprobó para *P. pythagoricus* (Romero *et al.* 2019). Debido a sus similitudes funcionales, se suele establecer una analogía entre el DI de las arañas con el cuerpo graso de insectos (Arrese & Soulages 2010) y hepatopáncreas de escorpiones (Warburg 2011, Laino *et al.* 2015b) y crustáceos (Al-Mohanna *et al.* 1985, Al-Mohanna & Nott 1986, Vogt 1994, Vogt 2019). Para decápodos existen muchos trabajos que exploran el rol del hepatopáncreas de los crustáceos en el almacenamiento, metabolismo y movilización lipídica (O'Connor & Gilbert 1968, Gonzalez-Baró & Pollero 1988, Gonzalez-Baro *et al.* 1990, Gonzalez-Baró & Pollero 1993, Kanazawa & Koshio 1994, González-Baró & Pollero 1998, Garcia *et al.* 2002b, Luo *et al.* 2021). Del mismo modo, en insectos abunda la bibliografía sobre estos aspectos del cuerpo graso (Gilbert & Chino 1974, Fernando-Warnakulasuriya *et al.* 1988, Tsuchida & Wells 1988, Ryan & van der Horst 2000, Ziegler & Ibrahim 2001, Canavoso *et al.* 2004, Arrese & Soulages 2010).

Otra de las destacables funciones del DI se relaciona con la defensa antioxidante y detoxificante. Se ha observado como la actividad de las enzimas pertenecientes a este sistema y marcadores de estrés oxidativo (ver **sección 1.5**) en DI, se ven afectados por la exposición a metales en las arañas *Agelena labyrinthica* (Agelenidae) y *Linyphia triangularis* (Linyphiidae) (Wilczek *et al.* 2008) y por metales, insecticidas y otras fuentes de estrés en la araña *Xerolycosa nemoralis* (Wilczek *et al.* 2008, Wilczek *et al.* 2013, Wilczek *et al.* 2014). Además, está bien documentado que los órganos análogos al DI de crustáceos e insectos son susceptibles a sufrir alteraciones en el sistema antioxidante y mostrar evidencia de estrés oxidativo al ser expuestos a contaminantes. En crustáceos, el hepatopáncreas de varias especies es reconocido como órgano clave en la detoxificación, donde se han registrado efectos significativos sobre la actividad de las enzimas antioxidantes y varios marcadores de estrés oxidativo, incluida peroxidación lipídica, en bioensayos de exposición a metales y diversos insecticidas (Wei & Yang 2015, Zhang *et al.* 2019, Duarte-Restrepo *et al.* 2020, Uçkun *et al.* 2021, Butcherine *et al.* 2022, Lavarias *et al.* 2022, Huang *et al.* 2023). En insectos existe un registro similar, habiéndose observado cambios en niveles de peroxidación lipídica, actividad y expresión de enzimas antioxidantes en el cuerpo graso en relación a distintos insecticidas (Mao *et al.* 2019b, Zhao *et al.* 2020a, Lu *et al.* 2023).

### 1.2.3. Sistema circulatorio

El sistema circulatorio de las arañas sigue en líneas generales el patrón descrito para los artrópodos. El fluido circulatorio se denomina hemolinfa y en este circulan diferentes elementos celulares y el pigmento respiratorio hemocianina, responsable del color azul característico de la hemolinfa (Foelix 2011). Como ya se mencionó, los lípidos son transportados por la hemolinfa unidos a lipoproteínas que clasifican según su densidad. En arañas y otros arácnidos se han registrado lipoproteínas de alta densidad (HDL) y de muy alta densidad (VHDL).

En cuanto a la morfología del sistema circulatorio, la división arterial se puede considerar “cerrada”, los vasos arteriales llevan la hemolinfa impulsada desde el corazón y se ramifican por el cuerpo. Las arterias desembocan en espacios lagunares que bañan los tejidos, y desde estos el fluido se recoge en senos ventrales, allí la hemolinfa pasa al sistema respiratorio y luego vuelve al corazón, vía las venas pulmonares (Foelix 2011).

### 1.2.4. Sistema respiratorio

Existen dos clases de estructuras respiratorias en arañas: los pulmones en libro y las tráqueas. Los pulmones en libro se conectan con el exterior por hendiduras pulmonares en la superficie ventral anterior del opistosoma. En su interior se disponen series alternadas de espacios aéreos y lamelas llenas de hemolinfa, donde ocurre el intercambio de gases. Las arañas primitivas poseen cuatro pares de pulmones en libro, mientras que, en la mayoría de las arañas más derivadas, el par posterior es reemplazado por sistemas de tráqueas tubulares. Estos sistemas traqueales derivan al menos en parte de pulmones en libro y varían en desarrollo en los distintos grupos de arañas. A diferencia de los de los insectos, donde las tráqueas llevan los gases directamente a los tejidos, en arañas el intercambio gaseoso es mediado por la hemolinfa gracias a la hemocianina (Foelix 2011).

### 1.2.5. Sistema excretor

La excreción de los desechos nitrogenados en arañas se lleva a cabo principalmente mediante los túbulos de Malpighi. A diferencia de los presentes en insectos cuyo origen embrionario es ecto y mesodérmico (Klowden 2013), en arañas poseen origen endodérmico y se prolongan hacia el hemocel desde el saco estercoral (Foelix 2011). Otros órganos excretores menores son las glándulas coxales, más conspicuos en especies basales (Foelix & Chu-Wang 1973).

### 1.2.6. Sistema reproductor

Las gónadas, en ambos sexos, son estructuras pares ubicadas dentro del opistosoma que liberan las gametas a través de una abertura ventral anterior, el surco epigástrico. La fecundación es interna, indirecta, a través de los ya mencionados palpos modificados de los machos. Estos órganos copuladores se cargan con esperma a través de una tela espermática especial, que a su vez lo recibe desde del surco epigástrico. En las hembras, la genitalia se conoce como placa epiginal, y posee una complejidad proporcional a los palpos de los machos, con los que debe coincidir mecánicamente durante la cópula. Este proceso es muy dependiente de la especie (descrito como “llave – cerradura”), mostrando una gran complejidad anatómica en las enteleginas (Foelix 2011).

Durante la etapa vitelogénica del ciclo reproductivo de las hembras, en los ovarios ocurre el proceso de vitelogénesis, en el que los oocitos acumulan las reservas metabólicas (vitelo) que sirven como recurso energético durante el desarrollo embrionario (Tsukimura 2001, Romero *et al.* 2018, Romero *et al.* 2022). En *P. pythagoricus* se halló evidencia de que las reservas de los oocitos poseen un origen tanto en síntesis proteica ovárica, como extraovárica en el DI (Romero *et al.* 2019).

## 1.3. Sobre el modelo biológico empleado en este trabajo

### 1.3.1. Elección

Para esta tesis doctoral, se decidió emplear la especie *Polybetes pythagoricus* (Holmberg, 1875), como modelo animal de laboratorio representativo del grupo de interés, las arañas.

Esta especie fue elegida, debido a la larga experiencia en su manejo por parte del grupo de trabajo. En *P. pythagoricus* se ha estudiado el transporte lipídico vía lipoproteínas, su interacción con fenitrotión (Cunningham *et al.* 1994, Cunningham & Pollero 1996, Cunningham *et al.* 2002, Cunningham *et al.* 2006, Laino *et al.* 2015a) y el metabolismo lipídico (Laino *et al.* 2009, Laino *et al.* 2011b). Además, se ha logrado caracterizar la enzima arginino quinasa (Laino *et al.* 2017), estudiado su hemocianina (Cunningham & Pollero 1996, Cunningham *et al.* 1999, Laino *et al.* 2015c) y la actividad fenoloxidasa que posee (Laino *et al.* 2015c). Por otro lado, se ha caracterizado bioquímicamente el desarrollo y ciclo reproductivo de esta especie (Laino *et al.* 2011b, Romero *et al.* 2018, Romero *et al.* 2019, Romero *et al.* 2022).

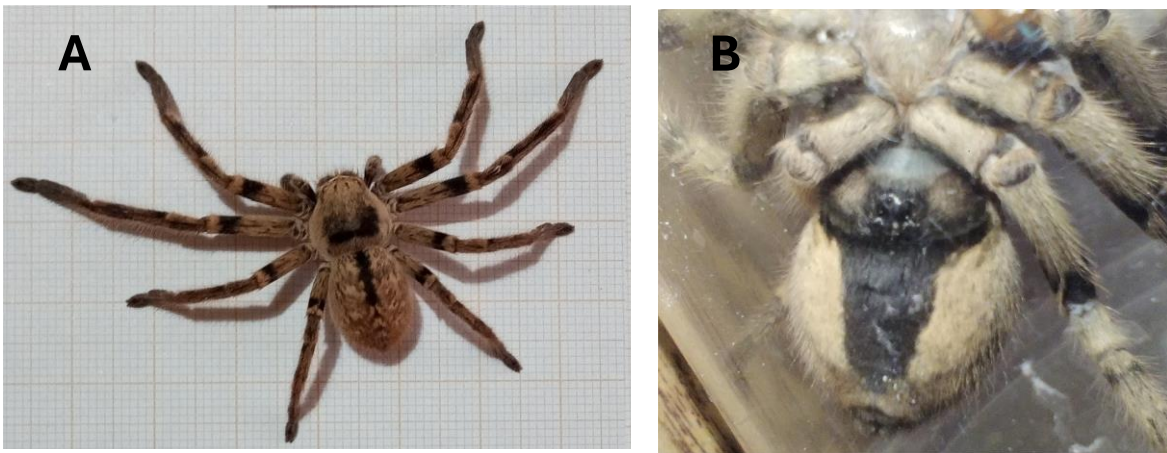
Los precedentes en *P. pythagoricus* sobre el estrés oxidativo ocasionado por insecticidas (Laino & Garcia 2020) sumados a la mencionada información generada sobre metabolismo lipídico plantean una buena base para esta tesis.

Por otro lado, esta especie demuestra facilidad operativa de muestreo otorgada por su distribución, hábitat frecuente y número. Así como la posibilidad de ser mantenida en cautiverio (ver **sección 2.2**). Su masa corporal relativamente abundante en comparación a la mayoría de las araneomorfas comunes en la región, resulta muy valiosa a la hora de realizar estudios bioquímicos.



### 1.3.2. Generalidades de *Polybetes pythagoricus*

*P. pythagoricus* (**Figura 1.7-A**) pertenece a la familia de arañas araneomorfas enteleginas Sparassidae (filogenia se muestra en **Figura 1.4.**), la cual cuenta actualmente con 1488 especies en 97 géneros (World Spider Catalog 2024). El género *Polybetes* posee 15 especies, 8 de ellas presentes en Argentina. *P. pythagoricus* es reconocida por el público en general como una araña imponente, debido tanto a su tamaño, como a su tendencia a realizar despliegues defensivos en los cuales levanta el primer par de patas y enseña sus quelíceros mientras realiza movimientos de balanceo característicos. Se diferencia de otras especies del género por los patrones negro oscuro en su opistosoma, concretamente una mancha longitudinal ventral, vagamente triangular, inmediatamente posterior a la región epigástrica (Gersschman & Schiapelli 1965) (**Figura 1.7-B.**). Es una especie de hábitos nocturnos y no construye nidos. Su picadura no supone un peligro para la vida humana, siendo el veneno de esta especie de baja toxicidad y de acción local leve (Laino 2011).



**Figura 1.7.** Fotografías de *P. pythagoricus*. **A.** Hembra adulta sobre papel milimetrado. **B.** Detalle ventral del opistosoma y sus patrones de pigmentación.

#### Distribución y hábitat

En cuanto al hábitat frecuente de *P. pythagoricus*, se la suele hallar en zonas forestadas, debajo de la corteza de algunos árboles, especialmente los del género introducido *Eucalyptus*. Es usual encontrar hembras sobre sus ootecas discoidales (sacos de seda donde las arañas oviponen) (Galiano 1971) a lo largo de todo el año.

En la **Figura 1.8.** se muestran los registros para la especie disponibles en la base de datos libre GBIF.org (2023). Se distribuye al sur del continente americano, principalmente en Argentina, Uruguay, sur de Brasil y Paraguay, con algunos registros para Chile, Bolivia y Guayana Francesa.



**Figura 1.8.** Registro de avistamientos para *P. pythagoricus* en GBIF.org (2023)

## 1.4. Potencial de las arañas como controladores biológicos

Se puede definir control biológico como el uso de agentes vivos para reducir el efecto perjudicial de especies plaga (herbívoros que atacan cultivos, vectores de enfermedades, parásitos de ganado, entre otras). De entre los múltiples mecanismos para lograr esto, se suele considerar como más importante el consumo directo de los organismos nocivos, a través de, por ejemplo, interacciones predatorias (Stenberg *et al.* 2021). Así, una especie depredadora que incluya en su dieta a una o varias especies fitófagas con tendencia a atacar un cultivo vegetal, se puede considerar un “enemigo natural” de posibles plagas, y su presencia en abundancia en el agroecosistema es deseable desde el punto de vista productivo.

La inmensa mayoría de las especies de arañas conservan el estilo de vida depredador generalista de la mayoría de los órdenes de arácnidos. Son, a su vez, de los grupos depredadores invertebrados más abundantes en ambientes terrestres, consumiendo principalmente insectos, muchos potencialmente perjudiciales para el ser humano (Nyffeler & Sunderland 2003). Por lo tanto, su presencia en ambientes antropizados es capaz de proveer valiosos servicios de control de plagas agrícolas y sanitarias (Ndava *et al.* 2018, Michalko *et al.* 2019, Upadhyay *et al.* 2020). Específicamente en agroecosistemas, se ha cuantificado que las arañas pueden consumir hasta un 50% de la biomasa de insectos que provocan daños en los cultivos de importancia económica (Riechert & Lockley 1984, Orazé & Grigarick 1989, Tarabaev & Sheykin 1990, Riechert 1999, Birkhofer *et al.* 2008). Por esta razón, se ha reconocido el potencial de las arañas como controladoras biológicas, pese a las dudas sobre su efectividad que puedan traer aspectos como su densidad poblacional en cultivos e ingestas infrecuentes (Nyffeler & Sunderland 2003, Furlong *et al.* 2004, Foelix 2011, Michalko *et al.* 2019, Rajashekhar *et al.* 2020).

## 1.5. Concepto de “estrés” en contexto de la biología

Una de las propiedades básicas de los sistemas vivos es la homeostasis: el mantenimiento de todas las variables fisiológicas dentro de un rango aceptable (Buchman 2002, Chovatiya & Medzhitov 2014). Es normal que numerosos factores externos e internos a los organismos tiendan a alterar este delicado equilibrio dinámico. Se considera un estado de estrés cuando el balance entre los estresores y sus sistemas de control se desplaza en favor de los primeros (Chrousos & Gold 1992), lo que puede llevar a un efecto adverso y/o daño apreciable (Kültz 2020).

### 1.5.1. Estrés oxidativo y sistemas de defensa contra el mismo

Desde que nuestro planeta posee cantidades significativas de oxígeno en su atmósfera, la vida ha requerido tolerar ambientes oxidantes. Especialmente los organismos aeróbicos, que se sirven del oxígeno durante la respiración celular, deben lidiar con subproductos altamente reactivos que ocasionalmente son generados durante este proceso. Estas sustancias son las llamadas especies reactivas del oxígeno (**ROS** por sus siglas en inglés).

#### Especies reactivas del oxígeno

Las ROS son especies químicas derivadas del oxígeno que poseen una reactividad mayor que este (Halliwell & Gutteridge 2015). Un radical libre es un átomo o molécula, que posee uno o más electrones desapareados, lo que los convierte en inestables y propensos a reaccionar con otras especies químicas (Halliwell & Gutteridge 2015). Entre las ROS encontramos radicales libres del oxígeno, como el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) o el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), el óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) y el oxígeno triplete ( $^3O_2$ ). A su vez, dentro de las ROS se incluyen otros derivados de la molécula de oxígeno, como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) o el anión hidroxilo ( $OH^-$ ), que no son radicales.

*In vivo*, la producción de ROS puede ocurrir por mecanismos no enzimáticos, si las células son expuestas a radiación, o cuando el oxígeno reacciona espontáneamente con moléculas orgánicas. También pueden generarse enzimáticamente, en este caso intervienen muchas enzimas vitales para

la función normal del organismo. Se destacan las pertenecientes a la cadena de transporte de electrones mitocondrial, además de otros procesos bioquímicos de oxidación-reducción (Kehrer & Klotz 2015, Pizzino *et al.* 2017, Snezhkina *et al.* 2019). A su vez, el ritmo endógeno de producción de ROS puede verse aumentado por infecciones, inflamación, respuesta inmune, entre otros, así como por la exposición a contaminantes químicos externos (Pizzino *et al.* 2017).

Para reducir el ataque oxidativo a las biomoléculas clave de sus células, los organismos poseen el denominado sistema antioxidante. Este presenta componentes tanto no enzimáticos, como enzimáticos. Los primeros lo constituyen moléculas capaces de oxidarse y así neutralizar ROS, como las vitaminas E y C, carotenoides y polifenoles que se obtienen de la dieta, así como glutatión (un tripéptido que es coenzima de varias enzimas del sistema antioxidante) (Costantini 2014). Los componentes enzimáticos lo constituyen una serie de enzimas cuya actividad consume ROS y otras sustancias reactivas y/o tóxicas. Algunos de sus componentes se listan a continuación. Las reacciones que catalizan y sus relaciones entre sí, se esquematizan en la **Figura 1.9**.

- Super óxido dismutasa (**SOD**)

Cataliza la dismutación de  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$ . Existen isoformas dependientes de magnesio (mitocondria) y dependientes de cobre.

- Catalasa (**CAT**)

Cataliza la disociación de  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y oxígeno. Abundante en los peroxisomas, su baja afinidad por  $H_2O_2$  hace que sea relevante principalmente durante los picos de producción de esta sustancia.

- Glutatión peroxidasa (**GPx**)

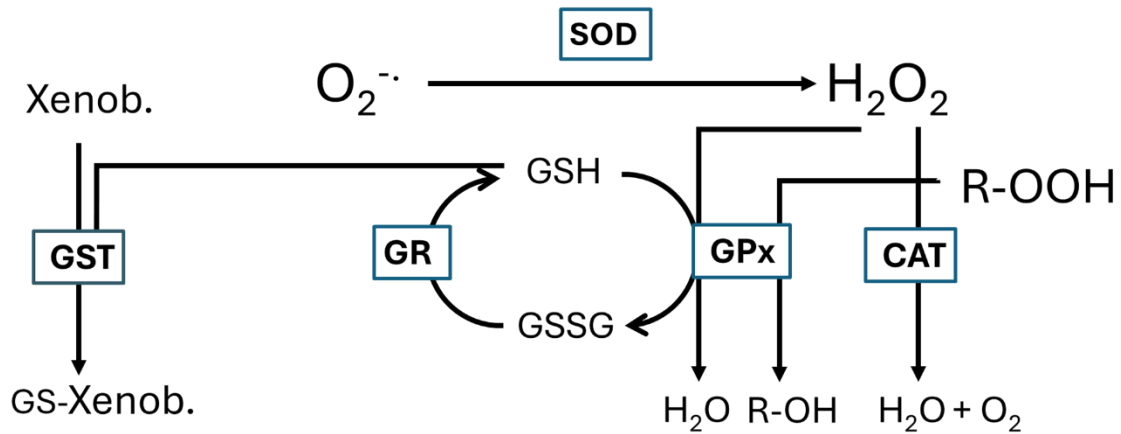
Cataliza la reducción de distintos peróxidos orgánicos (R-OOH) y  $H_2O_2$  a alcoholes y agua respectivamente. Esta reacción es dependiente de glutatión, el cual resulta oxidado. Existen isoformas dependientes y no dependientes de selenio. Es más afín que CAT a su sustrato, por lo que es probable que trabaje eliminando los peróxidos que se producen basalmente en las células (Costantini 2014).

- Glutatión Reductasa (**GR**)

Cataliza la reducción del glutatión oxidado, empleando como coenzima al transportador electrónico nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (**NADPH**), el cual dona el poder reductor necesario.

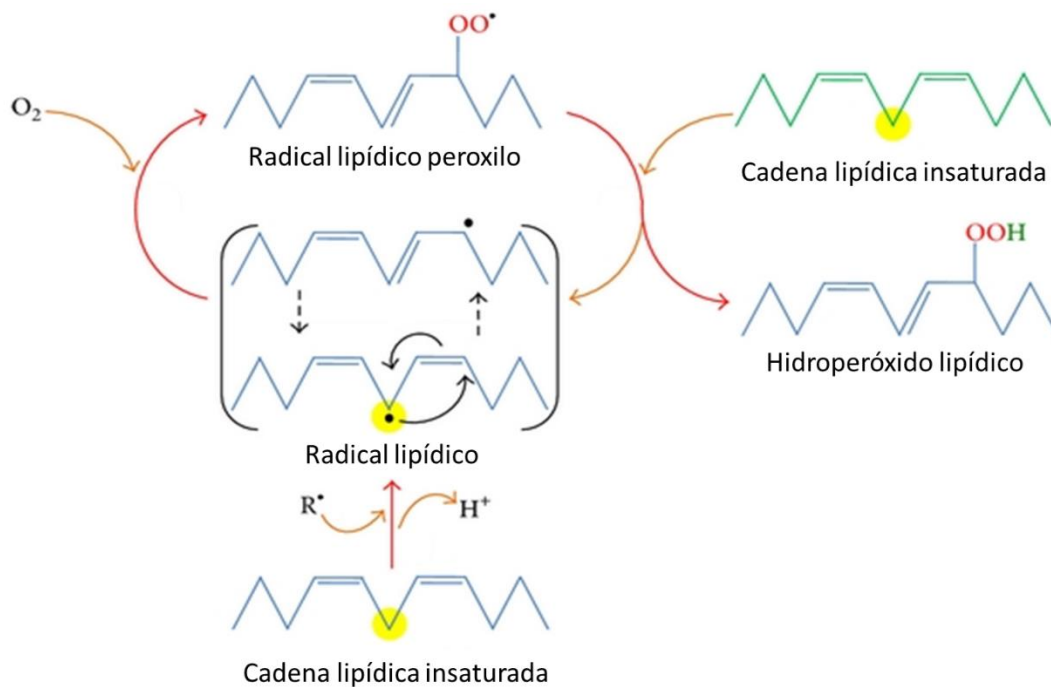
- Glutatión S transferasa (**GST**)

Cataliza la conjugación de distintas moléculas con el glutatión. Importante en biotransformación de xenobióticos.



**Figura 1.9.** Sistema antioxidante enzimático y las interconexiones entre las reacciones que catalizan. *GSH*: glutatión reducido; *GSSG*: glutatión oxidado; *Xenob.*: xenobiótico; *GS-Xenob.*: xenobiótico conjugado con GSH.

Las sustancias extrañas que ingresan a un organismo se denominan xenobióticos. Estos deben ser detoxificados y excretados para mantener la homeostasis y evitar daños. El metabolismo de xenobióticos, denominado biotransformación, suele implicar reacciones de oxidación en las que interviene el oxígeno y la cadena de transporte microsomal. Debido a la naturaleza de dichas reacciones, se genera ROS como subproducto (Kehrer & Klotz 2015, Klotz & Steinbrenner 2017). Las etapas de biotransformación se explican brevemente más adelante (ver **sección 1.6**). Esta sobreproducción de ROS implica un desequilibrio que debe ser compensado por un aumento de la actividad del sistema antioxidante, cuyo componente enzimático es susceptible de ser cuantificado (ver **sección 2.5.2**). Se habla de estrés oxidativo cuando la tasa de generación de ROS supera al sistema antioxidante, conduciendo a un exceso de especies reactivas que terminan por dañar los componentes celulares (Kehrer 1993). No todas las biomoléculas son igualmente susceptibles a la oxidación, siendo los AGs poliinsaturados los compuestos más afectados (Costantini 2014). En un escenario de estrés oxidativo, puede ocurrir el fenómeno denominado “peroxidación lipídica”. Este implica una reacción en cadena, que inicia con la formación de un radical en una reacción que involucra ROS o alguna otra especie reactiva, y los dobles enlaces de los AGs (Figura 1.10.). Este radical lipídico luego reacciona con oxígeno produciendo un radical peroxilo lipídico, capaz de atacar otros AGs y producir más radicales lipídicos, en un ciclo que termina al reaccionar entre sí dos radicales peroxilos. Durante la propagación, son varias las posibilidades de reacción, produciéndose hidroperóxidos lipídicos y aldehídos (como por ejemplo malonaldehído (MDA)) que se suman a las ROS provocando estrés oxidativo y reaccionan con el ADN y otras moléculas vitales deteriorando la maquinaria celular (Nam 2011, Yin *et al.* 2011). Por lo tanto, la concentración de derivados de la peroxidación lipídica, evidencia de la presencia efectiva de daño, se puede usar como indicador de estrés oxidativo.



**Figura 1.10.** Peroxidación lipídica simplificada. Tomada de Ayala y colaboradores (2014) con modificaciones.  $R^\bullet$  simboliza un radical de cualquier origen.

## 1.6. Breve introducción a la toxicología

La toxicología es el estudio de los efectos adversos de agentes químicos o físicos en los organismos vivos (Casarett & Doull 2008). Dichos agentes pueden tener un origen natural, pero es usual que sean producidos por las actividades antrópicas, repercutiendo en el ecosistema y en la propia salud del ser humano. En el mundo moderno post revolución industrial, son innumerables los posibles focos de interés para la toxicología, como sustancias producidas en procesos de fabricación, contaminación por vehículos, etc. Una actividad que merece especial atención al respecto es la producción de alimentos, debido a que muchas técnicas tales como las agrícolas, requieren el uso de agroquímicos, conllevando un evidente riesgo ambiental.

Desde un punto de vista toxicológico clásico, la toxicocinética se define como el estudio cuantitativo del movimiento de una sustancia química xenobiótica desde su entrada al cuerpo (absorción), pasando por su distribución a órganos y tejidos a través de la circulación, las transformaciones metabólicas (biotransformación) que sufre y su eliminación final por excreción (Casarett & Doull 2008, Carriquiriborde *et al.* 2021). A continuación, se describen estos pasos brevemente y de manera conceptual.

## Absorción

Un xenobiótico tiene esencialmente tres vías de entrada primarias a un organismo animal (“rutas de exposición”): a través del tegumento, a través del sistema digestivo, o a través del sistema respiratorio (Carrquiriborde *et al.* 2021)

Independientemente de la ruta, se considera determinante para la absorción de un xenobiótico la capacidad de atravesar membranas biológicas (Newman 2015), debido a las uniones entre las células en los epitelios tegumentarios, respiratorios y digestivos. Los compuestos relativamente apolares (compuestos orgánicos aromáticos, organometálicos, muchos insecticidas, entre otros) podrán atravesar directamente la bicapa lipídica por difusión simple, mientras que los compuestos más polares o con carga eléctrica deben ser capaces de emplear canales o transportadores proteicos, o transporte por fagocitosis o pinocitosis para acceder al organismo (Newman 2015, Carrquiriborde *et al.* 2021).

La cutícula de los artrópodos posee como capa más externa una epicutícula lipídica (ver **sección 1.2.1**), que constituye la primera línea defensiva que debe traspasar un xenobiótico, en caso de considerar una ruta tegumentaria. Existe evidencia para varias especies de insectos del rol de la epicutícula en la resistencia a insecticidas al exponerse tópicamente (Balabanidou *et al.* 2018). En *Triatoma infestans* tanto la remoción de la capa epicuticular, como la inhibición de la síntesis de los HC que la componen, condujo a una mayor mortalidad por exposición tópica al insecticida Sumithion (organofosforado) (Juárez 1994). Se ha encontrado que las cepas resistentes a insecticidas piretroides de *T. infestans* y *Anopheles gambiae*, poseen una cutícula más gruesa y rica en HC (masa por unidad de peso de los individuos), comparadas con las cepas susceptibles (Pedrini *et al.* 2009, Balabanidou *et al.* 2016).

## Distribución

Una vez dentro del organismo, los xenobióticos son traslocados a los distintos compartimientos y sistemas por los fluidos circulatorios. Estos se disuelven en la fase acuosa del fluido circulatorio, o se unen a moléculas que se encuentren en solución, dependiendo de las propiedades de cada xenobiótico (Casarett & Doull 2008). Es probable que en arañas y otros artrópodos las lipoproteínas circulantes jueguen un rol en la distribución de compuestos tóxicos (Cunningham *et al.* 2007). Se ha estudiado la capacidad del insecticida organofosforado fenitrotión para unirse a las HDL y alterar su estructura, y probablemente también sus funciones *in vivo*, tanto en el camarón *Macrobrachium borelli* (García *et al.* 2002a, García *et al.* 2004) como en *P. pythagoricus* (Cunningham *et al.* 2002).

La acumulación de los xenobióticos se produce diferencialmente en distintos tejidos dependiendo nuevamente del tipo de sustancia y sus propiedades (carga, tamaño molecular, solubilidad especialmente) (Carrquiriborde *et al.* 2021). Compuestos lipofílicos como muchos insecticidas, compuestos órgano-mercuriales, entre otros, tienden a acumularse en tejidos grasos (Casarett & Doull 2008). Se sabe que las arañas pueden acumular metales en forma de gránulos en el DI (Brown 1982, Ludwig & Alberti 1988) y en proteínas especializadas en unir metales conocidas como metalotioneínas (Babczyńska *et al.* 2011), como mecanismo para neutralizar sus efectos adversos.

## Biotransformación

Las especies químicas xenobióticas originales son susceptibles de ser transformadas por procesos biológicos, normalmente por catálisis enzimática. Dependiendo del caso, puede ocurrir que los derivados del xenobiótico sean menos tóxicos, en ese caso se habla de **detoxificación**; pero también es posible que la biotransformación resulte paradójicamente en un aumento de la toxicidad de los productos de la reacción, ocurriendo entonces **bioactivación** (Newman 2015). Esto se vuelve relevante en caso de la exposición subletal a insecticidas, tratada al final de la **sección 1.7**. Los insecticidas organofosforados, para ejercer su mecanismo de acción requieren ser bioactivados a su forma oxón (Crane *et al.* 2012).

Los compuestos orgánicos atraviesan por lo general, dos pasos de biotransformación: Fase I y II. El fin de estas reacciones es conseguir productos menos tóxicos, más hidrosolubles y fáciles de excretar.

### **Fase I:** Reacciones de adición de grupos hidrofílicos

A través de reacciones de oxidación, hidrólisis o reducción, se transforma a las moléculas xenobióticas adicionando o exponiendo grupos como hidroxilo (-OH), amino (-NH<sub>2</sub>), sulfhidrilo (-SH) o carboxilo (-COOH). Son muchas las enzimas que pueden participar en fase I, suelen ser poco sustrato-específicas y encontrarse en varios tejidos, pero predominando en órganos como el hígado de vertebrados o hepatopáncreas o DI en invertebrados (Lavarías *et al.* 2013, Bednarek *et al.* 2016, Laino & Garcia 2020, Carriquiriborde *et al.* 2021). Algunos ejemplos generales son: epóxido hidrolasa (hidroliza epóxidos a alcoholes), alcohol deshidrogenasa y las enzimas monoxigenasas, el sistema más importante de la fase I. Estas reciben poder reductor de la cadena de transporte microsomal (ubicada en la membrana del retículo endoplasmático) a través de hemoproteína citocromo P450. El sistema microsomal participa en reacciones de oxidación y reducción de xenobióticos, así como en rutas metabólicas centrales (por ejemplo, la síntesis de eicosanoides en vertebrados, entre otras) (Casarett & Doull 2008, Carriquiriborde *et al.* 2021). Como se mencionó antes, muchos organofosforados son bioactivados por este sistema al cambiar oxidativamente el enlace entre azufre y fósforo por uno fósforo-oxígeno, constituyendo el derivado "oxón". Son las formas oxón de los insecticidas organofosforados las verdaderas causantes de la toxicidad. Cabe mencionar también, por último, a las denominadas "paraoxonasas", esterases capaces de hidrolizar organofosforados, entre otros muchos compuestos con función éster (Carriquiriborde *et al.* 2021).

### **Fase II.** Reacciones de conjugación

En esta etapa los xenobióticos son unidos covalentemente a otros compuestos más polares y abundantes en organismo, favoreciendo más aún la solubilidad del producto, reduciendo o eliminando su toxicidad. Estas moléculas pueden ser derivados de carbohidratos, aminoácidos, glutatión o sulfato (Timbrell 1999). Un ejemplo importante de enzima de fase II es la GST ya introducida, como también varias glucuronil transferasas (transfieren ácido glucurónico), sulfotransferasas (transfieren grupos sulfato), entre otras (Newman 2015).



## Eliminación

Un xenobiótico o los metabolitos derivados de su biotransformación pueden ser eliminados por el sistema excretor del organismo cuando estos son lo suficientemente hidrofílicos, a través de otras vías dependiendo de la especie y propiedades del compuesto. En mamíferos, sustancias volátiles pueden ser exhaladas, y las de alto peso molecular y/o muy poco solubles excretadas con la bilis. En organismos acuáticos las branquias pueden ser un sitio importante de eliminación de xenobióticos hidrofílicos. Otra forma de eliminación de contaminantes menos solubles, es a través de la incorporación en la cutícula y posterior muda en artrópodos (Carriquiriborde *et al.* 2021).

La conjugación producida en la fase II de biotransformación no solo mejora la solubilidad de la molécula original, sino que puede ayudar a su transporte a través de membranas. Por ejemplo, la “bomba de exportación de s-conjugados” puede reconocer xenobióticos unidos a glutatión y translocarlos con consumo de ATP. Existen otros mecanismos como por ejemplo los transportadores de iones orgánicos (Casarett & Doull 2008).

## 1.7. Insecticidas y sus potenciales riesgos para el ambiente

Los plaguicidas son sustancias que controlan organismos (insectos, hongos, plantas, babosas, caracoles, malezas, microorganismos, nematodos, etc.), que causan daño a la vida vegetal, interfieren con la cadena alimentaria y/o actúan como vectores de organismos patógenos para el hombre y los animales (Ballantyne & Marrs 2004). El uso de plaguicidas supone indiscutibles beneficios para la humanidad, como el aumento de la productividad agrícola y ganadera y el control de enfermedades zoonóticas graves (Aktar *et al.* 2009, Tudi *et al.* 2021). Sin embargo, también es claro que el uso sostenido de toda clase de plaguicidas guarda un gran riesgo medioambiental, tanto para un gran espectro de especies inofensivas, como para la población humana (Ware 1980, Sheahan *et al.* 2016, Zaller & Brühl 2019, Kamal *et al.* 2020).

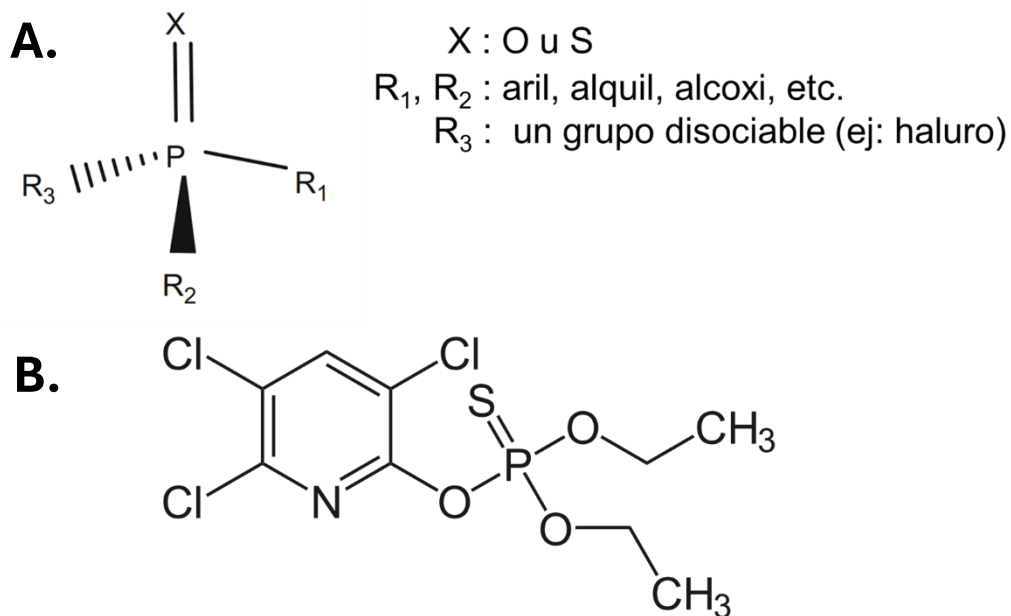
Los plaguicidas en general son comúnmente aplicados mediante pulverización sobre los cultivos. Esto conlleva una gran ineficiencia, debido a que es necesario aplicar alrededor de 3000 veces la cantidad necesaria para lograr el control deseado de la plaga, perdiéndose por deriva aérea la mayor parte de ese material hacia los ambientes aledaños a los campos cultivados (Matthews *et al.* 2000), que de este modo sufren los subsecuentes efectos adversos de dicha contaminación (Tudi *et al.* 2021). Por esta razón, el uso de estos compuestos no solo supone un peligro para especies de agrobiontes no-blanco que habiten los cultivos, sino también para todas las comunidades a las que arribe la deriva de los insecticidas (Simó *et al.* 2011, Tudi *et al.* 2021).

### 1.7.1. Organofosforados: clorpirifos

Los organofosforados, como su nombre indica, son compuestos orgánicos que contienen fósforo, con una amplia gama de aplicaciones industriales y como agroquímicos. Un importante grupo dentro de estos compuestos son los organofosfatos, que se pueden definir como ésteres de ácido fosfórico, con un amplio uso como plaguicidas y medicamentos. Su estructura generalizada se representa en **Figura 1.11-A**. El enlace fosforilo (P=O) puede reemplazarse por uno tiofosforilo (P=S), y los posibles sustituyentes le dan a cada molécula sus particularidades toxicológicas. La mayoría de los

insecticidas organofosfatos utilizados poseen enlace tiofosforilo (malatión, paratión, fenitrothión, clorpirifos). El mecanismo de acción tóxica de los plaguicidas organofosfatos en general, tiene como blanco a la enzima esterasa encargada de degradar el neurotransmisor acetilcolina, liberado durante ciertas sinapsis en el sistema nervioso (acetilcolinesterasa: AChE). Al inhibir la AChE, muchas veces irreversiblemente dependiendo del compuesto, causan la acumulación de acetilcolina en el espacio sináptico, interfiriendo gravemente con la transmisión normal del impulso nervioso. Los tiofosfonatos, como se mencionó, requieren ser bioactivados vía desulfuración oxidativa del enlace tiofosforilo a fosforilo, las moléculas originales no tienen actividad anti-AChE (Casarett & Doull 2008, Balali-Mood & Abdollahi 2014).

El insecticida no sistémico clorpirifos (en adelante **CPF**) (**Figura 1.11-B.**) es extensivamente empleado para el control de varias especies de insectos plaga en agricultura, horticultura, viticultura y silvicultura, así como en el control residencial y sobre ganado. Es preferido por su costo-efectividad y amplio espectro comparado con otros productos (Testai *et al.* 2010). Pese a ser uno de los agentes insecticidas más usados en todo el mundo (Kraj *et al.* 2007, Aktar *et al.* 2009, Yadav *et al.* 2015, Degrendele *et al.* 2016, Shaffo *et al.* 2018, Sumon *et al.* 2018, Ding *et al.* 2019), la comunidad Europea ha expresado su preocupación sobre los posibles efectos genotóxicos del CPF (FSN 2019) y varios países lo han prohibido (Ministry of Agriculture and Rural Affairs 2013, Foong *et al.* 2020, Huang *et al.* 2020). Existe evidencia de sus efectos adversos tanto para el ser humano, como para múltiples especies de vertebrados e invertebrados (ur Rahman *et al.* 2021). El riesgo que supone este compuesto puede verse incrementado por su acumulación en suelos donde las condiciones de degradación biótica y abiótica no son óptimas, con una vida media máxima de hasta 4 años (Watts 2012, John & Shaike 2015). Se han hallado residuos de CPF en cuerpos de agua, aguas subterráneas y en numerosos productos agrícolas (Dar *et al.* 2019).



**Figura 1.11. A.** Fórmula generalizada de los organofosfatos y sus posibles sustituyentes (tomada de Balali-Mood & Abdollahi (2014) con modificaciones. **B.** Fórmula del clorpirifos.

Es poca la bibliografía relacionada a los efectos del CPF sobre arañas. Se comprobó para linajes de *Cheiracanthium mildei* (Cheiracanthiidae) resistentes a otro organofosforado (malatión) que podrían ser susceptibles a CPF (Mansour 1984). Fountain y colaboradores (2007) observaron que parcelas de pastizales tratados con este insecticida experimentan una disminución en el número de individuos de araneidos. Residuos de un formulado con los principios activos de CPF y un piretroide (cipermetrina) se probaron altamente tóxicos y afectaron el comportamiento locomotor de varias especies de arañas habitantes de agroecosistemas (Pekár & Benes 2008). Mustafa y colaboradores (2011) concluyeron, tras realizar ensayos tópicos y de residuos secos con el principio activo de CPF sobre *Lycosa terrestris* (Lycosidae), que el compuesto a dosis de aplicación recomendadas posee alta toxicidad para la especie (registrando efectos letales y subletales, como parálisis). Laino y colaboradores (2021) expusieron hembras de *Pardosa saltans* (Lycosidae) que cargaban con sus ootecas a superficies con CPF, las que mostraron un efecto significativo tanto en varios aspectos del comportamiento de las hembras, como sobre algunas enzimas del sistema antioxidante, tanto en las madres como sobre sus crías. En distintos estadios de *Misumenops maculisparsus* (Thomisidae) se encontró también que este insecticida afecta el sistema antioxidante, además de inducir cambios en el comportamiento al reconocer los individuos superficies expuestas a CPF (Romero *et al.* 2024). De manera comparable, para otro arácnido, concretamente el escorpión *Urophonius brachycentrus*, se comprobó que el CPF es capaz de ejercer un efecto repelente, alterar significativamente el sistema antioxidante y además dañar el ADN (García *et al.* 2024). Estos precedentes permiten estimar el potencial perjuicio que este compuesto supone para las arañas en agroecosistemas.

### 1.7.2. Avermectinas: abamectina

Las avermectinas son un grupo de compuestos sintetizados por la actinobacteria *Streptomyces avermitilis*. Químicamente son lactonas macrocíclicas que se usan tanto como fármacos antiparasitarios veterinarios y humanos, así como plaguicidas (Casarett & Doull 2008). Su mecanismo de acción neurotóxico en insectos y nematodos (especies blanco), implica la activación de los canales de cloro dependientes de glutamato en el sistema nervioso (Arena *et al.* 1995). En vertebrados, en cambio, pueden ocasionar efectos tóxicos sobre el sistema nervioso central al activar receptores GABA<sub>A</sub> (Pong *et al.* 1982, Fisher & Mroziak 1992).

Se denomina abamectina (ABM) a una mezcla con 80% avermectina B<sub>1a</sub> y 20% avermectina B<sub>1b</sub>. Se emplea para control agrícola y doméstico de ácaros y varias especies de insectos, y como fármaco antihelmíntico (Environmental Protection Agency (EPA) 2010). Si bien se ha determinado que la AB es tóxica para artrópodos beneficiosos como abejas y ácaros depredadores de plagas agrícolas, las altas tasas de degradación en superficies reducen el riesgo de efecto adverso de este compuesto en los agroecosistemas (Wislocki *et al.* 1989, Lumaret *et al.* 2012, Bai & Ogbourne 2016).

### 1.7.3. Efectos subletales de los insecticidas

La sensibilidad de las especies no blanco a ciertos plaguicidas, considerando determinada ruta y tiempo de exposición, se suele evaluar en base a su capacidad para inducir la muerte, su “efecto letal”. Sin embargo, incluso cuando un xenobiótico no llega a ocasionar la muerte directamente a un organismo, sí puede afectar negativamente sus funciones de diversas maneras, al punto de disminuir sus probabilidades de sobrevivir y/o reproducirse (Serrão *et al.* 2022).

Los insecticidas, en dosis subletales (que no causan mortalidad significativa en una población expuesta), pueden provocar alteraciones fisiológicas del sistema nervioso, del desarrollo, la longevidad, sistema inmunológico y la reproducción (Desneux *et al.* 2007). A su vez, los efectos adversos pueden ser comportamentales, afectando la capacidad de alimentarse, de oviponer, la orientación espacial y la movilidad (Desneux *et al.* 2007). Si se consideran los organismos no blanco y las superficies contaminadas con insecticidas depositados por deriva luego de una aplicación, se puede plantear un escenario en el que sus movimientos se vean limitados a causa de efectos repelentes (Longley & Jepson 1996, Cordeiro *et al.* 2010, Fernandes *et al.* 2010). Si bien esto podría ser positivo en cuanto a que se evitaría la intoxicación, también puede ir en detrimento de la función de estos organismos como controladores de plagas, en caso de enemigos naturales como las arañas (Pekár & Haddad 2005, Pekár & Benes 2008).

Se ha asociado la exposición a varios grupos de insecticidas con patologías relacionadas a desbalances oxidativos (Banerjee *et al.* 1999, Abdollahi *et al.* 2004). Los organofosforados en general, por un lado, inducen aumento en la producción de ROS durante su bioactivación en el citocromo P450 (Lukaszewicz-Hussain 2010). Por otro lado, una consecuencia adicional de la inhibición de la AChE es un estado excitatorio exacerbado, con eventual agotamiento del potencial intermembrana mitocondrial. Esto provoca que se fugen electrones desde la cadena de transporte de electrones, que terminan produciendo  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  (Milatovic *et al.* 2006, Lukaszewicz-Hussain 2010). El estrés oxidativo resultante se ha propuesto como parte del mecanismo de toxicidad de organofosforados, junto con la inhibición de AChE propiamente dicha. Incluso si los cambios en la actividad de esta enzima no son detectables, las consecuencias del estrés oxidativo pueden estar presentes (Lukaszewicz-Hussain 2010).

## 1.8. Estrés por temperatura y adaptaciones relacionadas

En la superficie de nuestro planeta, la vida se desarrolla a temperaturas ambientales que pueden variar entre un mínimo de  $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$  en los polos, a un máximo de  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en los desiertos (incluso hasta  $350\text{ }^{\circ}\text{C}$  si consideramos los manantiales geotérmicos marinos habitados por extremófilos) (Cossins 2012). La temperatura es un parámetro termodinámico esencial para el funcionamiento normal de la maquinaria celular, por lo que es compresiblemente uno de los factores abióticos más importantes que afectan a la vida (Perez & Aron 2020). Los organismos ectotermos, como los artrópodos, dependen de fuentes de calor externas para mantener su temperatura corporal, por lo que su fisiología está fuertemente condicionada a estas variaciones ambientales (Paaijmans *et al.* 2013). Existe un intervalo de temperaturas dentro del cual las especies ectotermas pueden operar eficazmente, fuera del cual la aptitud biológica decrece, alcanzando más allá de cierto umbral altos grados de estrés térmico y eventual letalidad (Schwerdt *et al.* 2020, Ørsted *et al.* 2022).

En relación al estrés por baja temperatura, se suelen separar las estrategias de adaptación de los animales entre las que toleran la congelación y las que previenen la congelación. En las primeras, las células expresan proteínas especializadas denominadas “proteínas de nucleación de hielo” las cuales controlan la formación de los cristales de agua, confinándolos en el espacio extracelular, evitando necrosis y daños a estructuras macromoleculares en el citoplasma (Duman 2001). Otras defensas, que se expresan tanto en estrategias de tolerancia como de prevención de la congelación,

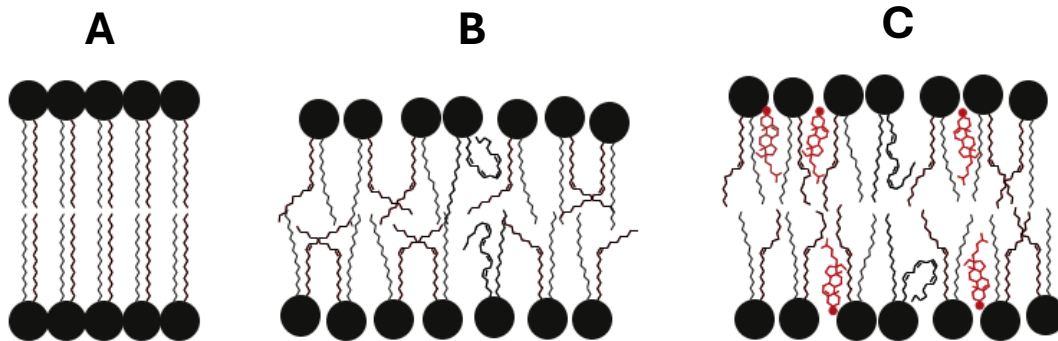
son las denominadas proteínas de histéresis térmica (PHT) y sustancias crioprotectoras de bajo peso molecular (polioles y/o azúcares) (Duman 1979, Somme 1982, Storey & Storey 1988). Las últimas ejercen su función valiéndose de la propiedad coligativa del descenso crioscópico (disminución de la temperatura de congelación) del citosol y fluidos extracelulares, al acumularse en solución. En numerosas especies de artrópodos se ha observado una relación entre supervivencia a bajas temperaturas y concentración de glicerol (Gli) y varios monosacáridos y disacáridos (Somme 1982, Kelleher *et al.* 1987, Rickards *et al.* 1987, Kukal *et al.* 1988, Rozsypal *et al.* 2013). En arañas se ha propuesto el Gli como crioprotector en los géneros *Philodromus* (Philodromidae), *Clubiona* (Clubionidae), *Pardosa astrigera* (Lycosidae) y *Euathlus condorito* (Theraphosidae) (Duman 1979, Tanaka & Ito 2015, Cubillos *et al.* 2018), así como PHT en *Philodromus* y *Clubiona* y Glu en *E. condorito* (Duman 1979, Cubillos *et al.* 2018). Ante estrés por altas temperaturas (así como otros factores adversos como altas concentraciones de osmolitos, sustancias tóxicas, etc.), se sabe que todas las células sintetizan las denominadas proteínas de shock térmico (PST), que impiden plegamientos anómalos y agregación de otras proteínas importantes para el normal funcionamiento celular (Feder & Hofmann 1999).

### 1.8.1. Composición de membranas y temperatura: homeoviscosidad adaptativa y otros procesos

La prevención del daño por cristales de hielo o por pérdida de estructura/función de las proteínas es crítica, sin embargo, los cambios de temperatura tienen efectos en otras estructuras absolutamente vitales de toda célula: los sistemas de membranas. Sus múltiples funciones, como permeabilidad a electrolitos (Carruthers & Melchior 1984), actividad de enzimas asociadas (Houslay & Gordon 1983, Ushio & Watabe 1993), velocidad de procesos acoplados a la difusión (Govers-Riemslog *et al.* 1992) entre otras, están condicionadas al grado de ordenamiento de su interior hidrofóbico. La temperatura ambiental es inversamente proporcional al orden y directamente proporcional a la fluidez. El aumento en la energía cinética molecular con la temperatura implica que las moléculas se disponen menos ordenadas (Hazel 1995).

Cuando las cadenas de los glicerolípidos y esfingolípidos se disponen muy ordenadas, se considera que la membrana se halla en “fase gel o gel-cristalina”, y todos sus movimientos están restringidos (estado para-cristalino). En cambio, se habla de “fase líquida desordenada o cristalina-líquida”, cuando los movimientos son libres y no hay empaquetamiento entre las cadenas hidrocarbonadas. Estas fases se producen a temperaturas extremas inferiores y superiores al intervalo fisiológico normal respectivamente (Eeman & Deleu 2010). Es dentro de este último, en el que las membranas adoptan una fase intermedia “líquida ordenada”, con cierto empaquetamiento de colas hidrofóbicas, pero con la posibilidad de los movimientos de rotación y desplazamiento (Nelson & Lehninger 2009).

La fase en la que se encuentra una membrana a determinada temperatura depende de su composición lipídica particular. La disposición espacial de los lípidos de membrana con respecto a un AG saturado, monoinsaturado y polinsaturado se ilustra en la **Figura 1.12.**, donde se puede observar como las insaturaciones dificultan el ordenamiento en paralelo de las colas hidrofóbicas. A su vez, las moléculas de esteroides (colesterol (COL) en animales), otro componente de las membranas biológicas, actúan como moderadoras de la fluidez de la bicapa, al ubicarse el núcleo plano de estos compuestos entre las colas hidrofóbicas, previniendo tanto la rigidización debido al elevado empaquetamiento a bajas temperaturas, como el desorden excesivo a altas temperaturas (Eeman & Deleu 2010).



**Figura 1.12.** Ejemplos teóricos de membranas con distintas proporciones de insaturaciones en los AG fosfolipídicos. **A.** membrana insaturada altamente ordenada. **B.** Membrana con alta proporción de insaturaciones en los AGs de sus fosfolípidos. **C.** Ubicación y rol del colesterol moderador de fluidez en la membrana fosfolipídica. Tomada con modificaciones de Ernst y colaboradores (2016).

En base a lo explicado, los organismos que no regulan su temperatura corporal y que deben tolerar por consiguiente un cierto rango térmico, requieren ajustar la composición de AGs de sus membranas biológicas para mantener una fluidez adecuada para sus funciones (Hazel 1995, Ernst *et al.* 2016), concepto conocido como “homeoviscosidad adaptativa” (HVA) (Sinensky 1974, Hazel & Williams 1990). Además, se han observado otros ajustes en la composición lipídica, como la alteración en la proporción de PE/PC y en la abundancia relativa de COL (Hazel 1995, 1997, Crockett 1998). Estas remodelaciones en las proporciones de lípidos, junto a las mencionadas alteraciones en el grado de insaturación de los AGs, se han propuesto como mecanismos para que, pese a las variaciones en la temperatura corporal propias de los ectotermos, la fase de fluidez en la que se encuentren las membranas sea siempre la adecuada (Hazel 1995, 1997).

En arácnidos, existe solo un precedente bibliográfico relacionado a la aclimatación a temperaturas y composición lipídica, para dos especies de escorpiones de la familia Bothriuridae activas durante el invierno en un ambiente de frío, *U. achalensis* y *U. brachycentrus*. Garcia y colaboradores (2021) demostraron que la aclimatación prolongada (4 semanas) a temperaturas compatibles con la estación de verano en su hábitat, induce aumento en la proporción de AG saturados (18:0 y 16:0) a la par de una disminución en insaturados (18:1 y 18:2), además de registrarse cambios en proporciones de clases de lípidos, principalmente TAG.

## 1.8.2. Ectotermos y cambio climático

La humanidad impacta de múltiples formas sobre los sistemas naturales: contaminación, transformación del territorio, introducción de especies exóticas, entre otras, siendo el cambio climático antropogénico uno de los tópicos más importantes y discutidos al respecto (Sage 2020). Los animales ectotermos constituyen la mayor parte de la biodiversidad terrestre y, como ya se ha mencionado, son especialmente sensibles a los cambios en la temperatura ambiental. En un escenario de aumento global de la misma, es de suponer que muchas poblaciones de artrópodos se vean afectadas negativamente debido a que sus funciones básicas como locomoción, crecimiento, reproducción están fuertemente influenciadas por esta variable (Deutsch *et al.* 2008, Colinet *et al.* 2015). Se ha previsto un acotado margen de tolerancia de aumento de las temperaturas para muchos grupos ectotermos, especialmente a latitudes intermedias (Hoffmann *et al.* 2013).

Es realmente poco lo que se ha estudiado sobre las posibles consecuencias del cambio climático sobre las poblaciones de arañas, pese a su importancia en las redes tróficas y como enemigos naturales de plagas (Harvey & Dong 2023). Si bien puede que algunos efectos no sean negativos sobre ciertas especies, como parecen indicar modelos predictivos de distribución (Ferretti *et al.* 2018), es de esperar que las condiciones progresivamente extremas pongan a prueba la plasticidad fisiológica y comportamental, y la capacidad adaptativa de las poblaciones de arañas (Malmos *et al.* 2021). En este contexto, generar un mejor entendimiento sobre las adaptaciones de las arañas al estrés térmico posee una importancia innegable.

## 1.9. Efecto de más de una fuente de estrés

Al contrario de como se suele plantear en la mayoría de los experimentos, en el medio natural los organismos afrontan más de una fuente de estrés (Breitburg *et al.* 1998).

En arañas, existen precedentes bibliográficos para la interacción entre estresores químicos, concretamente para insecticidas organofosforados y metales pesados. Babczyńska & Migula (2002) no encontraron interacción entre exposición oral al cadmio y la exposición tópica al insecticida fenitrotión en *Pardosa lugubris*. Babczyńska y colaboradores (2006) además, muestrearon individuos de las especies *P. lugubris* y *A. labyrinthica* en sitios contaminados, y los expusieron en laboratorio al insecticida malatión. Concluyeron que el estrés atribuible a los metales de los sitios de muestreo sería capaz de inducir el sistema enzimático antioxidante, mejorando la resistencia al insecticida, pero el coste adicional en recursos energéticos supondría menos capacidad para contrarrestar fuentes adicionales de estrés.

La temperatura ambiental es un factor importante que modula la capacidad para afrontar la exposición a xenobióticos (Holmstrup *et al.* 2010, Laskowski *et al.* 2010, Verheyen & Stoks 2019). Para arañas, existen algunos precedentes que han abordado este escenario. Everts y colaboradores (1991) descubrieron que *Oedothorax apicatus* (Linyphiidae) es más sensible al piretroide deltametrina bajo estrés por temperatura y baja humedad. Wilczek y colaboradores (2005) estudiaron el estrés térmico agudo y exposición tópica al organofosforado dimetoato sobre *A. labyrinthica* y *P. lugubris* comprobando un mayor nivel de apoptosis en los tratamientos que combinaron las dos fuentes de

estrés. Michalko y Kosulic (2016) determinaron que la letalidad del piretroide lambdacialotrina para una comunidad de especies de *Philodromus* aumenta directamente con la temperatura durante la exposición; aunque también vieron que el efecto negativo sobre la capacidad predatoria es mayor a temperaturas bajas. Duque y colaboradores (2023) criaron bajo distintas temperaturas juveniles de *Pardosa amentata*, obtenidos de distintas regiones climáticas (boreal y templada-fría), y los expusieron a lambdacialotrina, en ensayos a diferentes temperaturas. En este caso, sin embargo, hallaron que, para esa especie, solo la región de procedencia afecta la sensibilidad al insecticida.

Además de las posibles interacciones planteadas entre tóxicos y el factor de la temperatura, hay que considerar la capacidad que posee esta variable ambiental para generar estrés oxidativo por sí misma. Como se desarrolla en la **sección 1.5**, las ROS son un subproducto del metabolismo aeróbico, el cual se ve fuertemente vinculado a estresores como los xenobióticos. Sin embargo, el estrés provocado por la aclimatación tanto a temperaturas bajas (Joanisse & Storey 1996b, Rojas & Leopold 1996, Lalouette *et al.* 2011) como a temperaturas altas (Jena *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2015, Zhao *et al.* 2020b), puede conducir a su vez a estrés oxidativo en artrópodos. La actividad de las enzimas del sistema antioxidante, como sucede con la exposición a insecticidas, puede ser cuantificada a modo de biomarcadores del grado de estrés oxidativo provocado por la temperatura (Costantini 2014). A su vez, la concentración de ROS total en los tejidos de organismos aclimatados, puede evidenciar estos procesos relacionados al estrés (Zhang *et al.* 2014).



## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Insecticidas, solventes y reactivos

Los principios activos del organofosforado CPF (CAS#: 2921-88-2) y la avermectina ABM (CAS#: 71751-41-2) en estado sólido (pureza 98%), fueron donados por Laboratorios Gleba®.

Los reactivos y solventes orgánicos empleados en este trabajo de tesis se listan por metodología a continuación:

Ensayos de exposición tópica a insecticidas (**sección 2.12.1**)

- Acetona (Carlo Erba®)

Extracción lipídica (**sección 2.9**) y cromatografía en capa fina (**sección 2.10**):

- Ácido fórmico (Sintorgan®)
- Benceno (Merk®)
- Cloroformo (Baker® y Cicarelli®)
- Éter de petróleo (Sintogan®)
- Metanol (Baker®)

Extracción de HC cuticulares, preparación de ésteres metílicos de AGs, cromatografía gaseosa (GC) (**secciones 2.8 y 2.11.2**):

- Ácido clorhídrico (HCl) (Mallinckrodt®)
- Hexano (Baker® y Carlo Erba®)
- Hidróxido de potasio (KOH) (Carlo Erba®)
- Trifluoruro de boro (BF<sub>3</sub>) (Merk®)

Preparación de soluciones amortiguadoras (buffers) empleadas en homogeneización de tejidos (**sección 2.4**) y espectrofotometría (**sección 2.5**):

- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Biopack®)
- Bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) (Carlo Erba®)
- Carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (Mallinckrodt®)
- Fosfato de potasio di básico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Carlo Erba®)
- Fosfato de potasio mono básico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Carlo Erba®)
- Fosfato de sodio di básico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Biopack®)
- Fosfato de sodio mono básico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Biopack®)
- Trisaminometano (TRIS) (Biopack®)

Mediciones espectrofotométricas (**sección 2.5**)

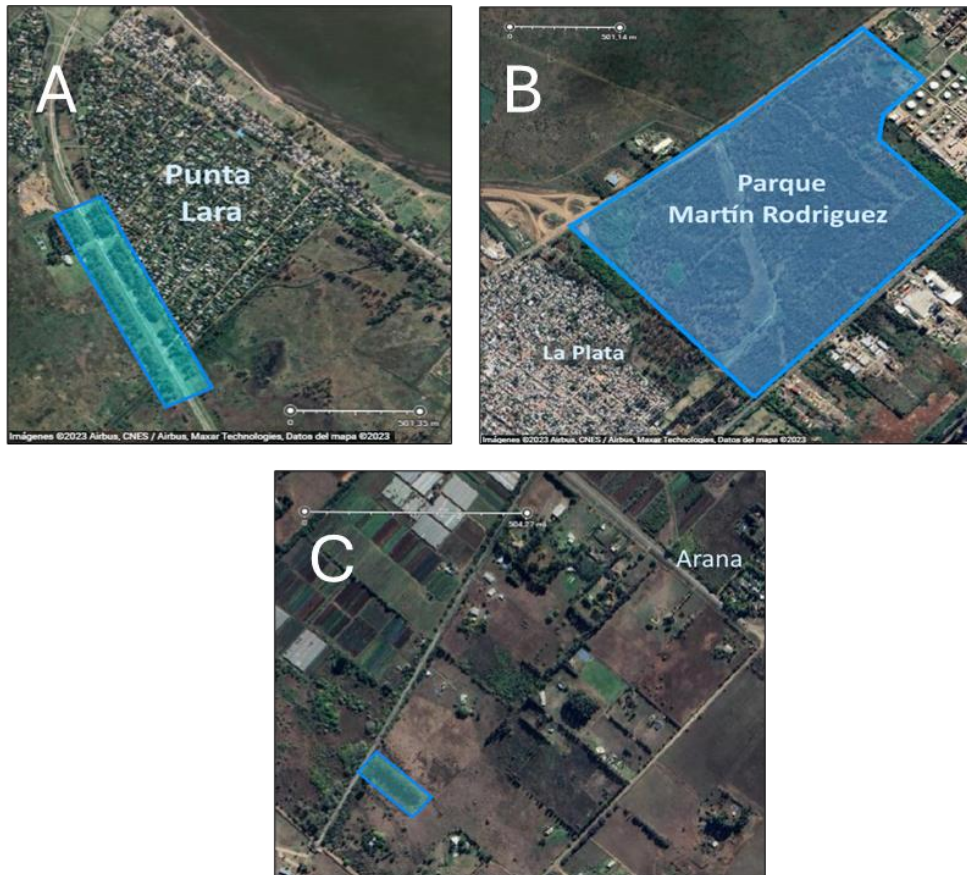
- Ácido acético (Biopack®)
- Ácido tiobarbitúrico (TBA) (Sigma-Aldrich - Merk®)
- Azida sódica (Biopack®)

- 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) (Sigma-Aldrich - Merk®)
- 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCHF-DA) (Thermo Fisher Scientific®)
- Dodecilsulfato sódico (SDS) (Carlo Erba®)
- Epinefrina (Sigma-Aldrich - Merk®)
- Etanol absoluto (Biopack®)
- Reactivo de Folin (Sigma-Aldrich - Merk®)
- Glutati3n oxidado (GSSG) (Sigma-Aldrich - Merk®)
- Glutati3n reducido (GSH) (Sigma-Aldrich - Merk®)
- Glutati3n reductasa de levadura (Sigma-Aldrich - Merk®)
- Hidr3xido de sodio (NaOH) (Biochem®)
- Kit medici3n glicerol (Gli) (Megazyme®)
- Kit medici3n AChE (Wiener-lab®)
- Malonaldehido (MDA) (Sigma-Aldrich - Merk®)
- Nicotinamida adenina dinucle3tido fosfato (NADPH) (Sigma-Aldrich - Merk®)
- Per3xido de hidr3geno
- Sulfato cúprico (Carlo Erba)
- Tartrato de sodio - Potasio (Timper)
- Terbutilhidroper3xido (TBHP) (Sigma-Aldrich - Merk®)
- Trit3n (detergente) (Baker®)

## 2.2. Modelo

### 2.2.1. Muestreo

Los sujetos experimentales, adultos y juveniles de *P. pythagoricus*, fueron colectados en los alrededores de la ciudad de La Plata en áreas arboladas con especies del género *Eucalyptus*, durante el periodo 2018-2022. Se obtuvieron ejemplares principalmente de la localidad de Punta Lara (34°49'58.0"S 57°57'58.6"O, **Figura 2.1-A.**) y complementariamente del Parque Martín Rodríguez (34°53'00.2"S 57°56'08.9"O **Figura 2.1- B.**) y la localidad de Arana (35°00'22.7"S 57°54'33.1"O **Figura 2.1-C.**).



**Figura 2.1.** Vista satelital de los sitios de muestreo (resaltados en azul). **A.** Punta Lara. **B.** Parque Martín Rodríguez. **C.** Arana.

Durante los muestreos se revisaron todos los árboles con cortezas apropiadas (parcialmente desprendida del tronco) como refugio para *P. pythagoricus* disponibles en la localidad de muestreo. Los individuos identificados visualmente fueron introducidos en frascos de plástico transparente (**Figura 2.2.**) (un individuo por frasco) y transportados al laboratorio.



**Figura 2.2.** Individuos de *P. pythagoricus* capturados en el campo.

A lo largo de este trabajo de tesis, se recolectaron un aproximado de 270 individuos (175 adultos y 87 juveniles) empleados tanto para los experimentos finales como para pruebas preliminares.

### 2.2.2. Mantenimiento

Para el mantenimiento en cautiverio de los individuos capturados se emplearon los mismos frascos de muestreo a modo de terrarios, con la adición de un algodón húmedo para proveer hidratación. Se mantuvo la temperatura a 25 °C y fotoperíodo de 14:10 h de luz:oscuridad, alimentación con larvas de *Tenebrio molitor* y limpieza de terrario una vez por semana.

#### Cría de *Tenebrio molitor* como alimento vivo para *P. pythagoricus*

Las larvas del escarabajo de la harina *T. molitor* se produjeron en criaderos a base de salvado de trigo como sustrato/alimento. Se utilizaron cajas de vidrio, cubiertas con malla de tela sintética en lugar de tapas originales, para evitar formación de moho (**Figura 2.3.**). La hidratación se les proporcionó con papel madera/algodón humedecido dos veces por semana. La alimentación de los escarabajos se complementó con una mezcla de harina blanca, leche en polvo, levadura seca y germen de trigo (1:0,06:0,06:0,06 p/p).



**Figura 2.3.** Criaderos de *T. molitor* con sustrato de salvado de trigo.

### 2.2.3. Eutanasia y disección

Una vez concluidos los periodos de aclimatación/exposición correspondientes a los diferentes experimentos, los individuos fueron anestesiados con CO<sub>2</sub>, hasta verificar ausencia de respuesta a estímulos. De inmediato, se procedió con el siguiente protocolo de disección:

#### I. Recolección de hemolinfa

Las patas se seccionan a la altura del artejo fémur, empleando tijeras de disección rectas, y se reservan en frío para extracción de TM (II)

Para el drenaje de la hemolinfa del hemocel, el individuo se coloca en un embudo de vidrio, cuyo vástago desemboca en un tubo Eppendorf de 1,5 mL, siendo este arreglo soportado por un tubo Falcon de 50 mL adaptado (**Figura 2.4.**). Para forzar la salida del fluido circulatorio, se aplica centrifugación a baja velocidad (271 x g, Centrífuga International® Modelo UV) durante 5 min. Esto permite evitar la contaminación del DI con el fluido circulatorio, y adicionalmente facilita la identificación visual de los órganos del opistosoma.



**Figura 2.4.** Arreglo para extracción de hemolinfa mediante centrifugación. Se compone de tubos tipo Falcon, usados para sostener un embudo de laboratorio destinado a coleccionar hemolinfa en un tubo Eppendorf amortiguado con algodón.

#### II. Recolección de tejido muscular

De las patas removidas en I. y las coxas (aún unidas al prosoma) se separa el TM, utilizando pinzas y tijera quirúrgicas de 7 mm. Se aplica presión sobre cada artejo, comenzando desde el extremo proximal del apéndice hasta el punto de corte, consiguiendo que el tejido interno sea expulsado del interior. Una vez removido todo el TM, se pesa su masa en tubo Eppendorf y balanza de precisión (Traveler®).

### III. Recolección de divertículo intestinal

El opistosoma se separa del prosoma por seccionado del pedicelo y se deposita sobre placa de Petri. Sobre la cutícula dorsal se practica una incisión, a modo de exponer la cavidad. El DI se identifica y se separa cuidadosamente del resto de órganos (ovarios, pulmones en libro, resto del tubo digestivo + excretor) empleando pinzas de disección. La masa de DI obtenida se pesa en balanza de precisión (Traveler®), como en el paso II.

Las muestras de II. y III. se destinan a extracción acuosa (**sección 2.4**) u orgánica (**sección 2.9**) según el caso.

## 2.3. Preparación de insecticidas

### 2.3.1. Dosis de campo

Para el cálculo de la dosis de campo por individuo adulto de *P. pythagoricus*, se tomó como referencia la máxima dosis de ingrediente activo por unidad de área recomendada en los productos comerciales, revisados por la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. (**Tabla 2.1**).

**Tabla 2.1.** Dosis de campo de cada insecticida y su extrapolación por individuo.

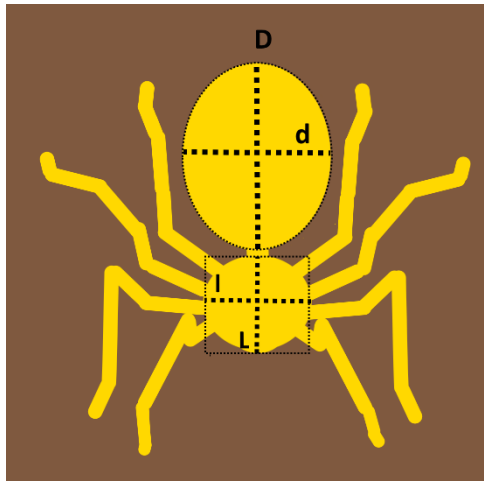
Insecticida	Dosis (g/ha)	Dosis (µg/ind)	Referencia
Abamectina	27	1,34	EPA (2010)
Clorpirifos	1120,85	52,63	EPA (2012)

El cálculo de la cantidad de insecticida por individuo se realizó mediante una aproximación del área tegumentaria de una hembra adulta. Se consideró la suma del área de un rectángulo (dorso del prosoma) y el área de un óvalo (dorso del opistosoma) (**Figura 2.5.**). Se promediaron las superficies así obtenidas para los individuos involucrados en los dos ensayos, obteniéndose 494,73 mm<sup>2</sup> para el grupo experimental destinado a ABM y 469,59 mm<sup>2</sup> para el destinado a CPF. A partir de estas se calcularon las dosis por individuo.

Ambos insecticidas se vehiculizaron en acetona pura. Se comprobó en estudios previos (Laino & Garcia 2020) que este solvente orgánico es capaz de vehiculizar los principios activos de manera efectiva, en las condiciones y concentraciones usadas; además de ser inocuo para *P. pythagoricus* en los volúmenes usados. Por último, al ser un solvente tan volátil (presión de vapor de 222 mm Hg) resulta práctico para una aplicación tópica, debido a que se evapora rápidamente evitando posibles derrames en caso de movimientos impredecibles del animal.

Para preparar la solución de cada insecticida, se emplearon tubos tipo Eppendorf, envueltos en papel aluminio. Se pesó la masa de cada principio activo en balanza de precisión (Mettler Toledo®) en su respectivo tubo, y por último se adicionó el volumen necesario de solvente. Para medir, transferir y mezclar estas soluciones se utilizaron jeringas Hamilton® de 100 a 500 µL de volumen. Las

soluciones se almacenaron en frío, aisladas de la luz y selladas con film de laboratorio (Parafilm®) para evitar la evaporación de acetona.



**Figura 2.5.** Cálculo de superficie. **D.** Diámetro mayor del opistosoma. **d.** Diámetro menor del opistosoma. **L.** Largo mayor del prosoma. **l.** Largo menor del opistosoma.

### 2.3.2. Insecticidas sobre superficies

Con el objetivo de estudiar el efecto del insecticida CPF en superficies sobre el comportamiento de *P. pythagoricus*, se expusieron papeles de filtro de 144 cm<sup>2</sup> de área.

La dosis por superficie fue la misma que para los ensayos tópicos (**Tabla 2.1**) preparada con acetona como solvente, como se describe en **sección 2.3.1**. Los papeles utilizados como “área control” se expusieron a acetona pura, y los utilizados como “área expuesta” a una solución de CPF de 2,02 µg/µl. En todos los casos en volumen final utilizado fue de 800 µl por papel. Se empleó una jeringa Hamilton® de 100 µL para dispensar el insecticida, procurando una consistente distribución de la solución en las múltiples réplicas del experimento. Cada papel se dejó secar en corriente de aire durante 10 min previos a su uso.

### 2.4. Extracción acuosa

Para poder desarrollar los ensayos que se describen en la **sección 2.5.**, se requirió que las muestras de tejido sean procesadas para obtener los componentes solubles en medio acuoso. Con este objetivo se aplicó tanto a TM como DI el siguiente protocolo:

- I. La masa de tejido disecado se suspende en buffer fosfato-potásico (50 mM, pH 7,4) en relación de 20 µL cada 5 mg (proporción empíricamente apropiada para los posteriores ensayos). Para

impedir que las proteasas intrínsecas de los tejidos hidrolicen las proteínas de interés, se usa 1  $\mu\text{L}$  de inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich) por cada 1000  $\mu\text{L}$  de buffer.

- II. Subsiguientemente las muestras se procesan en un homogeneizador de Potter-Elvehjem, consistente en un tubo de vidrio y un émbolo de teflón de rápida rotación (motor eléctrico de frecuencia regulable). Para evitar la desnaturalización proteica por sobrecalentamiento por fricción, el tubo se mantiene inmerso en hielo durante el proceso.
- III. El tejido homogeneizado se trasvasa a tubos Eppendorf de 1,5 mL y se centrifuga a 10000 x g por 20 min a 4 °C (centrífuga Eppendorf®). El pellet con restos insolubles se descarta y el sobrenadante conteniendo la fracción proteica soluble es recuperado (de ahora en adelante “homogenato”).
- IV. El homogenato se alicuota de a 200  $\mu\text{l}$  y se almacena a -20 °C hasta su uso en los distintos ensayos bioquímicos.

## 2.5. Técnicas de espectrofotometría

Las técnicas espectrofotométricas de absorción se fundamentan en la Ley de Bouguer-Lambert-Beer:

$$A = -\log T = \epsilon b c$$

que permite relacionar la transmitancia de la luz ( $T$ ), con el parámetro absorbancia ( $A$ ). Este último se encuentra relacionado directamente con una concentración de soluto determinada ( $c$ ), el coeficiente de extinción molar de la sustancia ( $\epsilon$ ) y la distancia que debe a travasar el haz de luz ( $b$ ) (Cooper, 1984).

A partir de esta ecuación se calcula, para un analito con un  $\epsilon$  conocido, su concentración en solución, mediante la medición de su absorbancia. Cuando se desea cuantificar la actividad de una enzima de interés, es posible relacionar la variación de la absorbancia con el cambio en la concentración de reactivos o productos a lo largo del tiempo (**sección 2.5.2**). El equipo empleado para este tipo de técnicas se denomina espectrofotómetro. El utilizado en esta tesis (Shimadzu© UV-



**Figura 2.6.** Espectrofotómetro marca Shimadzu© empleado para las técnicas descritas en la **Sección 2.5**.



VIS 06377) cuenta con fuentes de luz visible y UV y medios para controlar la temperatura de la muestra durante la medición (**Figura 2.6.**).

### 2.5.1. Lowry

Las proteínas totales de cada muestra de homogenato, se cuantificaron por el método de Lowry y colaboradores (1951). En este, las proteínas primero forman un complejo con cobre en medio alcalino que posteriormente reduce un reactivo fosfomolibdénico-fosfowolfrámico (reactivo de Folin), lo que produce un viraje del amarillo (reactivo oxidado) al azul (reactivo reducido). La reacción colorimétrica se mide a 750 nm y se utiliza albúmina sérica bovina (1 mg/mL) como estándar.

### 2.5.2. Enzimas

En este trabajo se evaluó el estrés oxidativo ocasionado por la exposición a insecticidas a través de la medición de las actividades de enzimas del sistema antioxidante. En todos los ensayos se utilizaron los homogenatos obtenidos como se explica en la **sección 2.4.**

La actividad de la AChE se cuantificó por el método de Ellman & Callaway (1961). Esta técnica se basa en la reacción del ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) con la tiocolina, producto de la hidrólisis de la acetilcolina por parte de la AChE, seguida a 405 nm. El medio de reacción consiste en buffer fosfato-potasio (50 mM, pH 7,7), S-butiriltiocolina y DTNB. Una unidad de AChE se define como la hidrólisis de 1  $\mu\text{mol}$  de S-butiriltiocolina por minuto.

La actividad CAT se determinó por el método de Aebi (1984). Este emplea la reducción en la absorbancia del  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante su disociación catalítica, cuantificada a 240 nm, en un medio con buffer fosfato-potasio (50 mM, pH 7) y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se define una unidad de CAT como la cantidad de enzima que consume 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por minuto.

La actividad SOD se midió siguiendo el método de Misra & Fridovich (1972). Este se basa en la inhibición de la autooxidación de la epinefrina a adrenocromo en medio alcalino, seguida a 480 nm. El medio de reacción contiene buffer glicina (50 mM, pH 10,2) y epinefrina. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para inhibir un 50% la tasa de formación de adrenocromo por minuto.

La actividad GR se obtuvo gracias al método de Calberg & Mannervik (1985). Este vincula la reducción de glutatión oxidado (GSSG) a la oxidación de NADPH, medida a 340 nm. El medio de reacción es en buffer fosfato-potasio (200 mM, pH 7) GSSG y NADPH. Una unidad de GR se define como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH por minuto.

La actividad GPx se evaluó a través del método de Flohé & Gunzler (1984). Este implica la cuantificación del consumo de NADPH por la enzima GR, medido a 340 nm, reacción que se acopla a la reducción de hidroperóxido terbutílico (TBHP) dependiente de GSH, por parte de GPx. El medio de reacción es en buffer fosfato-potasio (100 mM, pH 8,5 y EDTA 1 mM) con GR, TBHP y NADPH. Una unidad de GPx se define como la cantidad de enzima necesaria para provocar el consumo de 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH por minuto.

La actividad GST se ensayó siguiendo lo descrito por Habig y colaboradores (1974). En este método se sigue la conjugación de CDNB con GSH a 340 nm por parte de GST. La mezcla de reacción

contiene buffer fosfato-potasio (100 mM, pH 6,5-7) con CDNB y GSH. Una unidad de GST se define como la cantidad de enzima que cataliza la conjugación de 1  $\mu$ mol de GSH con 1  $\mu$ mol de CDNB por minuto.

### 2.5.3. TBARS

La peroxidación lipídica, es una frecuente consecuencia del estrés oxidativo. Esta se cuantificó por la técnica de Ohkawa y colaboradores (1979) que mide la concentración de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARs), derivadas de AGs peroxidados. La reacción colorimétrica se midió a 532 nm y se utilizó MDA como estándar.

### 2.5.4. Glicerol

La cuantificación del Gli total se llevó a cabo mediante una adaptación de la técnica de Wieland (1965) para homogenato de DI de *P. pythagoricus*, utilizando el kit comercial Megazyme®. En esta, se acoplan tres reacciones enzimáticas (Gli quinasa, glucoquinasa y glucosa-6P deshidrogenasa) para vincular la concentración de Gli de la muestra con el aumento en la absorción a 340 nm (debido a formación de NADH al final de la secuencia de catálisis). Al igual que otras mediciones realizadas, la concentración de Gli obtenida se determinó en relación a la concentración proteica del homogenato.

### 2.5.5. Glucosa

La cuantificación del contenido de D-glucosa (Glu) del DI se hizo a través de una adaptación de la técnica de Ziegenhorn y colaboradores (1977) para homogenato de tejidos de *P. pythagoricus*, utilizando el kit comercial de Glicemia enzimática® (Wiener lab). El fundamento de esta técnica implica dos reacciones acopladas. En la primera, la Glu de la muestra es oxidada a ácido glucurónico por la enzima Glu oxidasa, produciendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En la segunda, la enzima peroxidasa cataliza la reacción del peróxido producido en el paso anterior con 4-aminofenazona y fenol para producir una quinona coloreada. Esta molécula absorbe luz a 505 nm, estableciendo así una relación entre la densidad óptica leída y la concentración original de Glu. La concentración de Glu se refirió al contenido proteico de la muestra.

## 2.6. Análisis de daño histológico

Los análisis histológicos se realizaron sobre adultos expuestos tópicamente durante 24 h, con su respectivo grupo control expuesto a acetona (N = 8).

Transcurridos los tiempos de exposición, se aplicó eutanasia y disección (**sección 2.2.3**). El DI se embebió en solución fijadora (formol al 4%) y se almacenó en frío hasta su procesado.

Las metodologías que se describen a continuación fueron llevadas a cabo en el Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia” (MACN) por la Dra. Florencia Arrighetti.

## Elaboración de preparados histológicos

### I. Deshidratación

Las muestras de DI se deshidratan por inmersión en una serie de soluciones acuosas de etanol de concentración ascendente: 70°, 80° y por último 96°.

### II. Inclusión

i. Las muestras, ya deshidratadas, se sumergen en una solución 1/1 v/v de etanol 96° y solución de infiltración, compuesta esta última por resina de metacrilato de glicol (Leica Histo-resin®) durante 2 h.

ii. Posteriormente se incuban en solución de infiltración por 24 h a 4 °C.

### III. Preparación de los tacos y cortes histológicos

i. Las muestras infiltradas se depositan individualmente en moldes, con solución de infiltración y catalizador de endurecimiento. Se dejan endurecer a temperatura ambiente.

ii. El tejido incluido en los tacos se corta en secciones de 5 µm con un micrótomo electrónico (Leica RM 2155™). Las secciones obtenidas se adhieren a un portaobjetos mediante calentamiento en estufa a 40-50 °C durante 6-8 h.

### IV. Tinción con hematoxilina – eosina

i. Los cortes son rehidratados.

ii. Los preparados se mantienen durante 20 min en solución de hematoxilina (formada por alumbre de potasio, iodato de potasio, etanol 100°, glicerina y agua destilada).

iii. Los preparados se lavan con agua destilada.

iv. Posteriormente se sumergen durante 15 min en solución alcohólica de eosina (en alcohol 70°).

### V. Montado

Se deshidrata nuevamente cada preparado, ya teñido, en soluciones de etanol 70°, 90° y 96° y se adhieren a portaobjetos con bálsamo de Canadá sintético.

### VI. Observación con microscopía óptica

Las muestras se examinan bajo un microscopio óptico (AXIOPLAN 2 Zeiss™). Para el análisis fotográfico se emplea el sistema Axiovision Rel 4.4.

## 2.7. Citometría de flujo

La citometría de flujo permite cuantificar y clasificar células vivas en suspensión extraídas de cultivos o de muestras de tejido. Esta técnica se emplea en combinación con sondas fluorescentes susceptibles de ser incorporadas por las células para marcar determinadas biomoléculas o productos metabólicos (Soh 2006). En síntesis, el proceso consiste en bombear una suspensión celular a través de un conducto estrecho, un láser atraviesa este flujo, y un detector mide entonces la luz dispersada y la fluorescencia emitida (Cossarizza *et al.* 2019).

Una sonda usada comúnmente para estudiar las ROS causantes de estrés oxidativo es la 2',7'-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCFH<sub>2</sub>-DA) (Chen *et al.* 2010). Al ser incorporada por las células vivas, la DCFH<sub>2</sub>-DA es hidrolizada a 2',7'-dihidrodiclorofluoresceína (DCFH<sub>2</sub>) por esterasas intracelulares impidiendo su redifusión fuera del citoplasma. Luego, la DCFH<sub>2</sub> es oxidada a diclorofluoresceína (DCF) por las ROS. Es la DCF la que, al excitarse bajo radiación laser (entre 485 a

500 nm) emite fluorescencia entre 515 a 530 nm, la cual es recibida por el detector del citómetro, permitiendo cuantificar así las ROS (Chen *et al.* 2010).

Para la cuantificación de ROS en DI de adultos de *P. pythagoricus*, una vez terminada la aclimatación/exposición correspondiente, se aplicó eutanasia y se disecaron los individuos experimentales (**ver sección 2.2.3**). De inmediato, se aplicó el siguiente protocolo adaptado de Armstrong (2010).

- I. La porción de DI (10 mg) se deposita en tubo Eppendorf con 100 µL de buffer.
- II. El tejido se disgrega mecánicamente, empleando un émbolo de teflón adecuado. Posteriormente se hace pasar varias veces por una aguja 25G y se agita en vortex.
- III. El tejido disgregado se centrifuga durante 5 min a 800 x g y 4° C (centrífuga de mesada Eppendorf refrigerada).
- IV. El sobrenadante resultante se recupera y se completa el volumen a 1000 µL con buffer.
- V. Empleando el sobrenadante del paso anterior, para cada muestra se preparan las siguientes réplicas experimentales:
  - Control positivo: 90 µL de suspensión y 10 µL de TBHP (usado como agente oxidante).
  - Control negativo: 100 µL de suspensión (permite conocer la auto fluorescencia basal de la muestra).
  - Muestra: 100 µL de suspensión (destinada a la obtención de la medida de fluorescencia propiamente dicha).
- VI. Se incuba durante 45 min a 37 °C en ThermoMixer (Eppendorf®) con agitación.
- VII. Se somete a centrifugación durante 10 min a 400 x g, 4 °C (Centrífuga Eppendorf®).
- VIII. Los sobrenadantes se descartan.
- IX. Los pellets del control positivo y muestra se resuspenden en 50 µL de buffer con DCFH<sub>2</sub>-DA. (10 µM). El control negativo se re suspende solo con 50 µL de buffer.
- X. Se incuba nuevamente en ThermoMixer durante 45 min a 37 °C con agitación.
- XI. Se cuantifica la intensidad de fluorescencia media (IF) de la DFC en citómetro de flujo, utilizando el canal 488 530/30 nm. Primero se visualizaron las poblaciones celulares mediante *dot plot* FSC-A vs SSC-A (valor umbral = 80.000 en FSC-H). Se recolectaron 50.000 eventos en cada muestra.

#### NOTAS:

- Equipo empleado: BD AccuriTM C6 Plus Flow Cytometer (número de serie: R660517100012). Con dos láseres: uno de 488nm sólido de 20mW y otro de 640nm diodo de 12.5 mW; y cuatro canales de detección (515-800nm).
- Buffer empleado: fosfato-potásico (50mM, pH7,4).
- TBHP: peróxido orgánico (hidroperóxido de *t*-butilo) empleado para asegurar producción de ROS en control positivo y validar la respuesta de la sonda. Preparado con 10 µL TBHP (5,5 M) y 90 µL de agua Miliq.

## 2.8. Extracción de hidrocarburos cuticulares

La vía tegumentaria de exposición implica que las sustancias xenobióticas como los insecticidas, deben superar la barrera cuticular. La epicutícula es la más externa de las capas del exoesqueleto de los artrópodos, compuesta en gran proporción por HC (Trabalon *et al.* 1997). Con el objetivo de realizar la primera descripción del perfil de HC que la componen para la especie *P. pythagoricus*, se realizó la siguiente extracción y caracterización vía GC (dichas técnicas se tratan en más profundidad en **sección 2.11.1**):

- I. Adultos de *P. pythagoricus* (n = 8) se sacrifican como se describe en la **sección 2.2.3**.
- II. Cada individuo se lava con agua bidestilada durante 3 min para remover cualquier contaminante hidrosoluble.
- III. Se sumergen en 5 mL de hexano bidestilado por 5 min, para extraer todos los lípidos cuticulares (Sesga *et al.*, 2021).
- IV. Los HC se purifican en una mini-columna cromatográfica (Bio-Sil A activado, de 10 mm × 5 mm) y se eluyen con 4 mL de hexano bidestilado.
- V. Las muestras se secan con corriente de N<sub>2</sub> y resuspenden con 2 µL de hexano bidestilado.
- VI. Se analizan los HC por GC.

## 2.9. Extracción orgánica

El contenido lipídico total de las muestras de tejidos de los individuos aclimatados fue obtenido mediante la técnica descrita por Folch y colaboradores (1957). En esta, se utiliza una mezcla de solventes compuesta por cloroformo y metanol en proporción 2:1 v/v (en adelante “solución Folch”) para separar los componentes liposolubles de la muestra. A continuación, se describe el protocolo adaptado a muestras de tejido de *P. pythagoricus*:

### Extracción (Folch *et al.* 1957)

- I. La muestra de tejido se coloca en tubo de vidrio con tapa provista de cierre apto para solventes (teflón) y se agrega 3 mL de solución Folch (volumen estandarizado).
- II. Se agita el contenido con la ayuda de vortex (Decalab SRL®) de mesada, para favorecer el disgregado del tejido y aumentar la superficie de contacto con la mezcla de extracción.
- III. Se almacena en heladera durante una hora hasta completar extracción de lípidos.
- IV. Las muestras se filtran de todo resto sólido de tejido, con embudo y papel filtro previamente embebido en solución Folch.
- V. Al filtrado se le agrega 1 mL de solución de NaCl al 18‰ y se agita vigorosamente en vortex. El agregado de la solución salina aumenta la fuerza iónica del sistema, permitiendo la separación de fases y forzando a que los lípidos queden en la fase clorofórmica y que toda sustancia hidrosoluble sea lavada hacia la fase metanol/acuosa.
- VI. Se separan las mencionadas fases, acelerando el proceso por centrifugación durante 5 min a baja velocidad (centrífuga Internacional®).
- VII. La fase superior acuosa/metanólica se descarta usando pipetas Pasteur de vidrio.

- VIII. Se repiten pasos 5, 6 y 7 un mínimo de 3 veces, hasta asegurar una apariencia traslúcida de la fase inferior clorofórmica (ausencia de emulsiones).
- IX. Los tubos se gasean con N<sub>2</sub> y se sellan con Parafilm para evitar la oxidación de los lípidos y pérdidas de solventes y se almacena a 4 °C.

### Determinación gravimétrica de masa lipídica

La masa de lípidos totales correspondiente a cada muestra se obtuvo mediante gravimetría. En este método, se emplea el peso seco del analito para obtener su masa (Sarkisyan *et al.* 2017). Los extractos obtenidos de los pasos anteriores se llevaron a seco evaporando los solventes con corriente de N<sub>2</sub>. Posteriormente se re suspendieron en 200 µL de solución Folch y se transfirieron a cápsulas de vidrio (1 mL de capacidad y peso conocido) y allí se expusieron nuevamente a corriente de N<sub>2</sub> hasta obtener la muestra lipídica libre de todo resto de solvente. Los pesos se obtuvieron con balanza microanalítica (Mettler Toledo) procurando obtener medidas repetibles, alternando mediciones con exposición a corriente de N<sub>2</sub> (aceptándose una medida cuando un valor se obtiene un mínimo de tres veces).

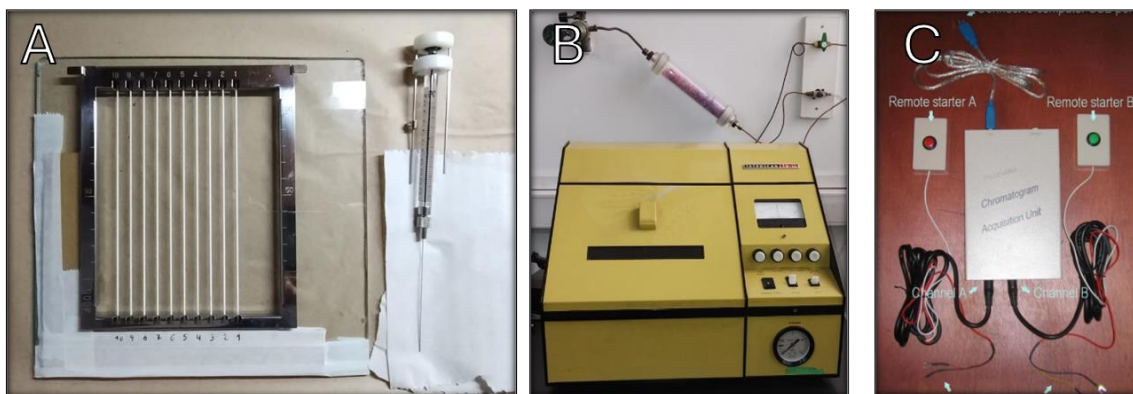
## 2.10. Cromatografía en capa fina

La cromatografía es un método para separar muestras complejas en sus partes constituyentes, muy usada para aislar y purificar sustancias químicas (Miller 2005). En estas técnicas, una fase móvil líquida o gaseosa, que contiene las sustancias a separar, fluye en contacto con una fase estacionaria (sólida o líquida). Los componentes de la muestra interactúan diferencialmente con la fase estacionaria/fase móvil, dependiendo de sus propiedades, lo que lleva a cada uno de ellos a demorar un tiempo específico en atravesar el medio cromatográfico, consiguiéndose así su separación.

En la técnica de cromatografía en capa fina (TLC por sus siglas en inglés) usada en este trabajo para analizar extractos lipídicos, se emplea como fase estacionaria sólida, sílica gel (formada por partículas de dióxido de silicio) dispuesta en una capa delgada sobre un soporte físico. La fase móvil la constituyen mezclas de solventes orgánicos (en adelante “sistema de solventes”). Esta fase móvil asciende a través de la fase estacionaria gracias al fenómeno de capilaridad, arrastrando a la muestra por el medio de alta porosidad del sílica gel. La combinación entre la partición (solubilidad en la fase líquida móvil) y la adsorción (interacción de superficie con la fase sólida estacionaria) de los componentes de la muestra resulta en que, al finalizar el desarrollo de la corrida cromatográfica, los menos polares se habrán desplazado una mayor distancia del punto de siembra.

Para realizar un análisis cuali-cuantitativo de las proporciones de lípidos presentes en las muestras, se utilizó la técnica de TLC-FID, en la que el desarrollo de la cromatografía se asocia a un detector de ionización por llama (FID por sus siglas en inglés). Este dispositivo aprovecha el hecho de que la combustión de compuestos de carbono produce iones, los que al pasar entre los electrodos del detector, producen una señal que se registra (Holm 1999). Se usaron varillas cromatográficas con una capa de sílica gel de 75 µm, sobre un soporte de cuarzo de 158 mm largo y 1 mm diámetro (Chromatorod-A®, Iatron Laboratories, Japón, **Figura 2.7-A.**). Estas se montaron sobre un marco de acero inoxidable. Las corridas cromatográficas se realizaron en cubas de vidrio de 17,5 x 15,5 x 3,5 cm con tapa esmerilada, con un volumen total de 50 mL de mezcla de solventes de desarrollo.

Los lípidos adsorbidos en las varillas cromatográficas se quemaron con una llama de H<sub>2</sub> (flujo con constante de 2000 mL/minuto de aire seco, con 1 kg/cm<sup>3</sup> de presión de H<sub>2</sub>). El auto-analizador que se utilizó para este trabajo fue el equipo Iatroscan-TH10<sup>®</sup> (Iatron Laboratories, Tokio, **Figura 2.7-B.**) conectado a una unidad de adquisición de datos (**Figura 2.7-C.**) y software de análisis cromatográfico Peak-ABC<sup>®</sup> (Qianpu Software Company, China). Procesada la señal, se obtuvo un cromatograma en el que se representan la intensidad de la señal por tiempo de corrida (mV /min). El área debajo de cada pico registrado, equivalente a un tipo de lípido, representa la masa registrada por el detector FID. La composición porcentual de lípidos de la muestra se obtuvo al sumar todas estas áreas y calcular su proporción. Esta cuantificación relativa de los grupos de lípidos se normalizó por la masa total obtenida por gravimetría.



**Figura 2.7.** Equipamiento empleado para TLC-FID. **A.** Varillas cromatográficas (izquierda), y jeringa Hamilton (2  $\mu$ L) para sembrado de muestra (derecha). **B.** Dispositivo IATROSCAN (contiene el FID). **C.** Placa adquisidora de datos.

## Sistemas de solventes

El equipo auto-analizador utilizado permite escanear parcialmente las varillas con el FID, de modo que es posible llevar a cabo corridas secuenciales sobre las mismas muestras, empleando distintos sistemas de solventes capaces de desarrollar grupos de lípidos con diferentes polaridades.

En este trabajo se emplearon, en orden de uso, los siguientes sistemas:

- I. Separación de lípidos **apolares**: hexano:benceno, 35:15 v/v
- II. Separación de lípidos **neutros**: benceno:cloroformo:ácido fórmico, 37:13,2:0,53 v/v
- III. Separación de lípidos **polares**: cloroformo:metanol : agua, 36:12,8:1,5 v/v

## Siembra

Como paso previo a la siembra, las varillas deben ser escaneadas por completo en el FID para activar la sílica gel. La llama del detector quema cualquier residuo que pueda interferir y elimina la humedad.

Se re suspende cada muestra en el volumen de solución Folch correspondiente para obtener una concentración de 30  $\mu$ g/ $\mu$ L. Se emplea jeringa Hamilton de 2  $\mu$ L para sembrar 1  $\mu$ L en cada varilla (masa suficiente para obtener buena resolución con esta técnica).

## Desarrollo cromatográfico

**Aclaración:** Estos pasos se repiten para los tres grupos de lípidos (apolares, neutros y polares) lo cuales son movilizados del punto de siembra por su respectivo sistema de solventes, empleados en el orden especificado anteriormente.

- I. Para estandarizar la humedad de las varillas, se mantienen durante 5 min en una cuba con solución saturada de NaCl.
- II. Las varillas se llevan a cuba cromatográfica con 50 mL del sistema de solventes correspondiente, que entra en contacto con el extremo inferior de las mismas. La corrida cromatográfica se desarrolla hasta que el frente de corrida llega hasta 1 cm antes del extremo superior de las varillas.
- III. Las varillas se retiran de la cuba cromatográfica y se secan en estufa para evaporar los restos de solventes (80 °C).
- IV. Los segmentos de la varilla donde los grupos lipídicos se desarrollaron se queman en el FID a una velocidad de escaneo de 0,49 cm/segundo.

## 2.11. Cromatografía Gaseosa

Otras técnicas de cromatografía ampliamente utilizadas en ciencia e industria para analizar toda clase de compuestos volátiles, por su rapidez y alta resolución, son las de GC (Baugh 1993). A diferencia de TLC descrita en la sección anterior, la fase móvil es gaseosa. En la GC capilar, la fase estacionaria se dispone en el interior de un tubo de vidrio o acero de muy delgado calibre (del orden del mm). En este caso (cromatografía gas-sólido, GSC) se emplea una fase sólida unida químicamente a un capilar de sílice fundida (vidrio de alta pureza). La muestra luego de ser volatilizada es arrastrada por la fase móvil a lo largo de la columna por el gas portador (gas inerte, helio en este caso), forzando a los componentes de la muestra a interactuar con la fase estacionaria. El tiempo que demora cada uno en realizar su recorrido por la columna (tiempo de retención) depende del coeficiente de partición entre el gas portador y la fase estacionaria sólida. En esta última fase, los componentes de la muestra son adsorbidos según su polaridad relativa, de manera análoga a como ocurre en la TLC (**sección 2.10**).

Como se mencionó, en estos métodos las sustancias a analizar deben ser volatilizadas para poder ser separadas. Esto se logra manteniendo la columna capilar dentro de un horno a altas temperaturas. En el paso inmediatamente previo a la corrida cromatográfica, la muestra debe pasar de estado líquido (en un solvente orgánico, hexano) a gaseoso. Esto ocurre en un artefacto denominado “inyector” el cual se haya conectado a la columna y es donde el operador introduce la muestra mediante una jeringa (de tipo Hamilton®).

Como detector se empleó un FID (GSC-FID). El proceso de detección es análogo al detallado para TLC, pero el FID recibe los componentes de la muestra a medida que eluyen de la columna. La señal generada es transformada en datos procesables por un software especializado de manera similar a como se describe para TLC.



El equipo empleado para realizar los análisis cromatográficos a continuación descritos fue un cromatógrafo gaseoso de marca Hewlett Packard® modelo 6890 (**Figura 2.8.**). El gas portador empleado fue helio, en flujo de 0,7 mL/min. El detector FID usó una mezcla de hidrógeno y nitrógeno para la combustión. Las condiciones particulares de las corridas varían entre ambos análisis, como se aclara en cada apartado.



**Figura 2.8.** Cromatógrafo gaseoso acoplado a detector de ionización por llama empleado en el análisis de ácidos grasos (derecha). Computadora para adquisición y análisis de datos (izquierda).

### 2.11.1. Análisis de hidrocarburos cuticulares

El siguiente análisis se realizó sobre los extractos obtenidos como se describe en la **sección 2.8.**

#### Condiciones de corrida para HC

Se usó el modo de inyección *splitless* (que permite inyectar la masa completa de la muestra) con el inyector a 320 °C. Se desarrolló la corrida en una columna capilar DB-5, de sílica fundida diseñada para compuestos no polares, de 30 m x 0.32 mm (fase estacionaria sólida de 5% difenil/95% dimetil siloxano). El incremento de temperatura se programó para que fuera en una primera etapa de 50 °C a 180 °C, con incremento de 20 °C/minuto; y luego desde 180 °C a 310 °C, aumentando 3 °C/minuto.

En este caso se usó un estándar interno de dodecosano (22 carbonos) 10 µg/mL (Sigma-Aldrich). Los tiempos de retención (TR) se calcularon de acuerdo con Kovats (1965) comparando con los obtenidos de estándares en similares condiciones.

## 2.11.2. Análisis de ácidos grasos

Para estudiar la composición de AGs de la muestra (expresada como porcentaje) se usó el método descrito por Morrison & Smith (1964) que implica la saponificación de los AGs que se encuentren formando parte de otro tipo de lípido y su posterior derivatización a sus ésteres metílicos.

### Saponificación de ésteres de ácidos grasos

- I. Los extractos lipídicos (**sección 2.9**) se secan con corriente de  $N_2$ , se resuspenden en solución de KCl al 10% p/v (preparada con etanol 96°) y se incuban durante a 1 hora a 80 °C en bloque de calentamiento para tubos (Lab-Line Instr.®).
- II. Se adiciona a cada tubo de 1 mL de agua Miliq y 2 mL de hexano. Se agitan en vortex y se aguarda a que las fases se separen. La fase superior (rica en lípidos no saponificables y contaminantes no polares) se descarta. Este lavado con hexano se repite otras dos veces.
- III. Se agrega HCl (37% v/v) con gotero, hasta conseguir acidificar el medio (verificación por medio de tiras de pH). De este modo se logra protonar los ácidos grasos libres (AGL), forzando a que pierdan su polaridad y afinidad con fase acuosa inferior.
- IV. Se añade 1 mL hexano, se agita y aguarda separación de fases. Se recupera la fase superior orgánica, rica en AGs.

### Derivatización a ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG)

- V. Se evapora el solvente con  $N_2$ , y se re suspenden las muestras en 1,5 mL benceno y 1,5 mL  $BF_3$  (al 10% p/v en metanol).
- VI. Se incuba a 100 °C durante 1 h en bloque de calentamiento.
- VII. Se agregan 2 mL de agua Miliq.
- VIII. Se agrega 1 mL de hexano, se agita y dejan separar fases.
- IX. Se repite el paso VIII tres veces, conservando la fase orgánica superior rica en EMAG en tubo de punta cónica.

**NOTA:** en cada paso de agitación deben gasear los tubos de muestra con corriente de  $N_2$ .

### Condiciones de corrida e identificación de ácidos grasos

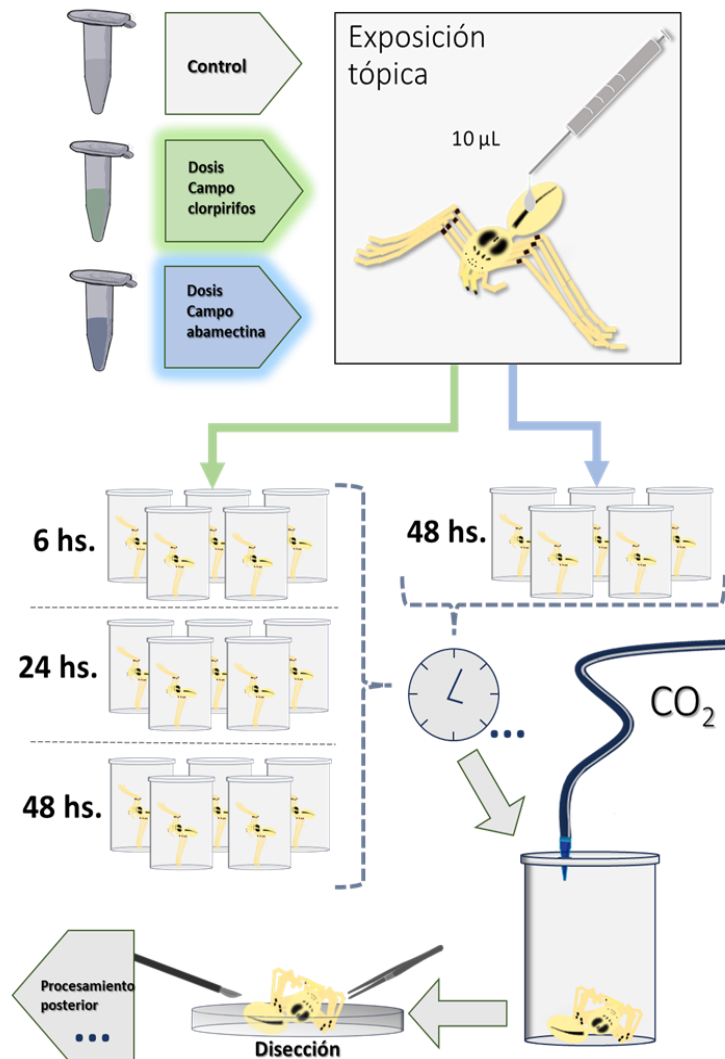
Se empleó una columna capilar diseñada para resolver EMAG, DB- 23 (J y W Scientific©) de 30 m de largo y fase fija compuesta por (50%-Cianopropil)-metilpolisiloxano (Megawax 250 Supelco). La temperatura de inyección fue de 260 °C, con el modo *split*. La temperatura inicial del horno fue de 175 °C y la temperatura final de 230 °C. El incremento de temperatura fue de 3 °C/min.

Se asignaron las identidades a los picos registrados en base a compararlos con los obtenidos de un estándar (Supelco 37 Component FAME Mix) y confirmación por espectrometría de masa. Se calculó la proporción de cada uno con respecto al área total para su cuantificación relativa.

## 2.12. Diseños experimentales

### 2.12.1. Experimentos de exposición tópica a insecticidas

Con el objetivo de estudiar el efecto de los insecticidas CPF y ABM a lo largo del tiempo, ejemplares adultos de *P. pythagoricus* (N = 12) se expusieron a la dosis de campo de los insecticidas (**sección 2.3.1**) solubilizados ambos en 10  $\mu\text{L}$  de acetona (**Figura 2.9.**). Se empleó una jeringa (Hamilton®, 10  $\mu\text{L}$ ) para aplicar tópicamente la gota sobre la superficie dorsal del opistosoma de cada individuo experimental. Como control se aplicó en ambos casos 10  $\mu\text{L}$  de acetona siguiendo el mismo procedimiento. Los tratamientos implicaron distintos tiempos luego de la exposición: 6, 24 y 48 h para CPF, y 48 h para ABM. Finalizados estos tiempos se realizó la eutanasia y se procesaron las muestras. No se registró mortalidad para ninguno de los insecticidas a los tiempos ensayados. Como medida

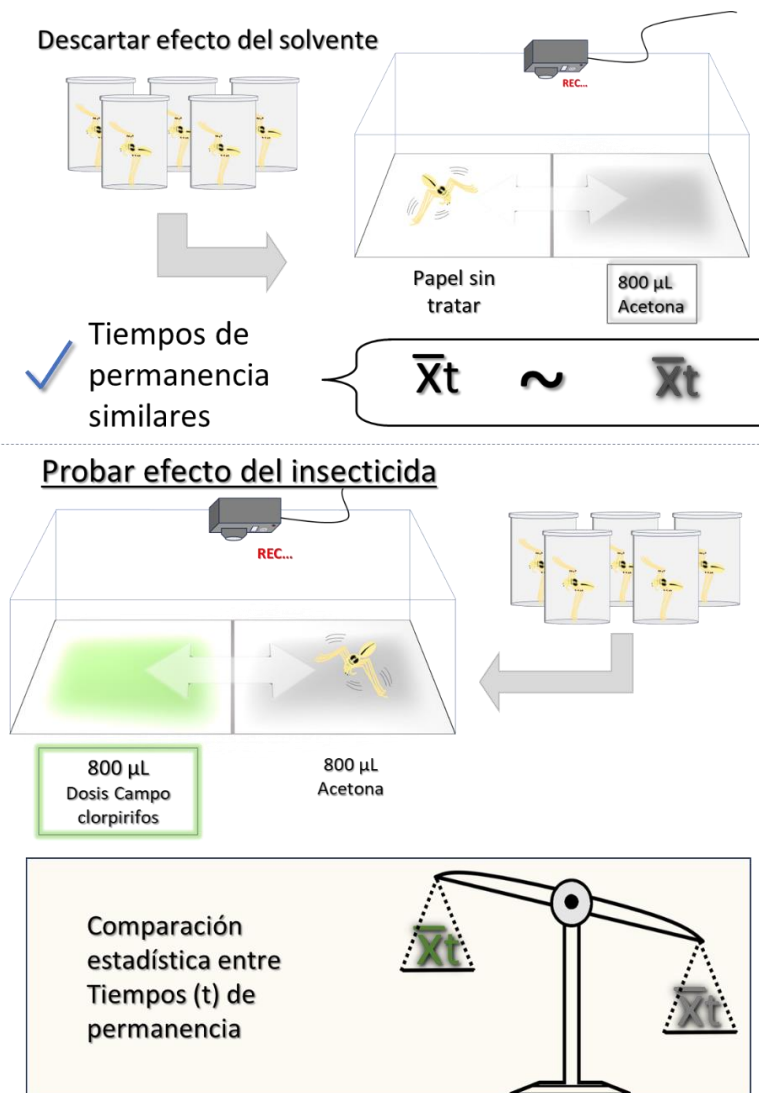


**Figura 2.9.** Infografía para la exposición a insecticidas

del estrés oxidativo sufrido a cada tiempo de exposición, se cuantificó la actividad del sistema antioxidante enzimático (**sección 2.5.2**) y la peroxidación lipídica (**sección 2.5.3**). El efecto del CPF a nivel tisular sobre el DI se evaluó para el tiempo de exposición de 24 h, como se describe en la **sección 2.6**.

## 2.12.2. Experimentos comportamentales sobre superficies expuestas a insecticidas

Se evaluó el efecto del insecticida CPF en superficie sobre el comportamiento exploratorio y movilidad de *P. pythagoricus* (N= 24) (**Figura 2.10.**). Para esto, se preparó un terrario de vidrio de 24,1 x 12 cm de base y 10,3 cm de altura. Con el objetivo de aislar a los animales de los estímulos externos en el espacio de testeo, el terrario se cubrió con una caja opaca de 58,3 x 36 cm de base y 36 cm de altura, provista de una luz roja y una apertura de observación superior, a través de la cual se ubicó el lente de una cámara de video (Noblex® 4k, modelo Acn4k1) conectada a software de grabación (NCH®, Debut Professional, versión 6.67).



**Figura 2.10.** Infografía para el ensayo correspondiente al efecto sobre el comportamiento de superficies expuestas a clorpirifos.

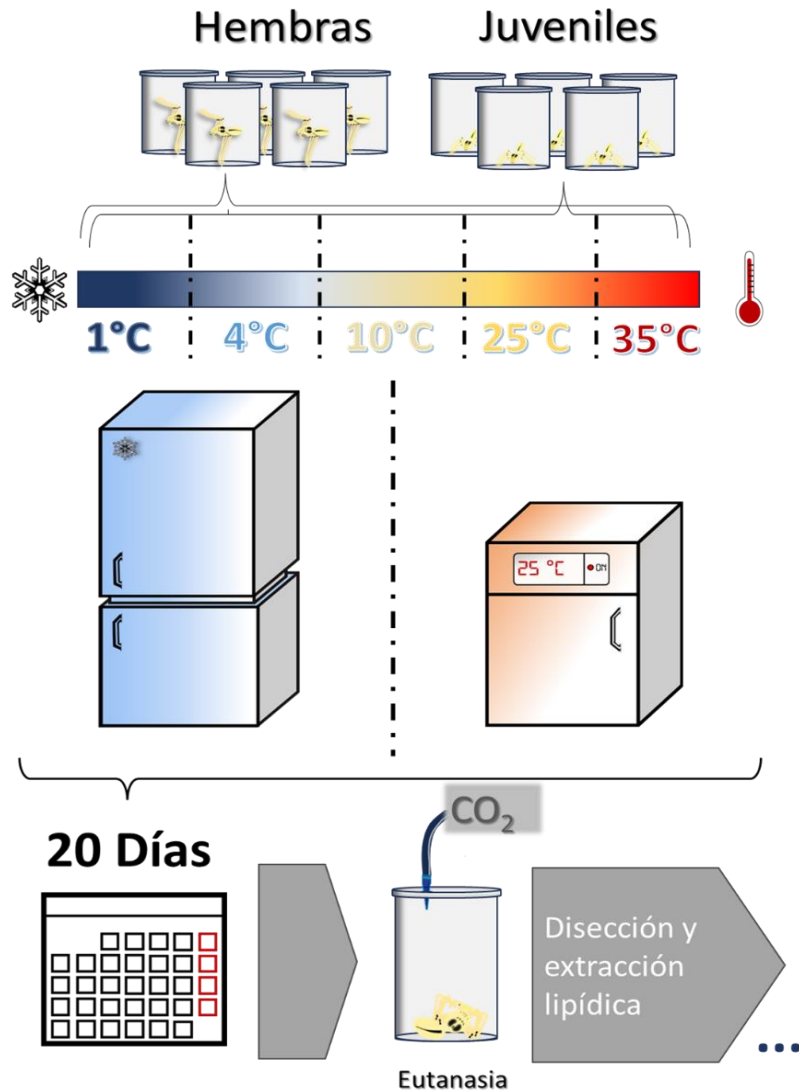
Previo a los ensayos propiamente dichos, fue necesario evaluar un posible efecto del solvente acetona empleado para vehicular el insecticida. Se registraron los movimientos de 12 individuos en el terrario con una de las áreas expuesta a 800 µl de acetona, y la otra sin exponer. Luego de descartar el efecto del solvente, se evaluó el efecto del CPF sobre el comportamiento exploratorio de *P. pythagoricus*. Se aplicó insecticida a la mitad del área (11,1 µg/cm<sup>2</sup>, equivalente a la dosis de campo máxima (**sección 2.3**); similar a Pekár & Haddad (2005); y la otra mitad se trató con acetona.

El área de la base del terrario se dividió en dos sub-sectores (de 288 cm<sup>2</sup>), uno de los cuales fue el área expuesta, y la otra el área control. En cada una de estas áreas se colocó un papel de filtro, el cual recibió la exposición correspondiente según el caso, detallado en **sección 2.3.1**. Se registraron los movimientos a lo largo de las áreas del terrario durante 4 h, un individuo por vez. Se volvieron a preparar los papeles para cada uno de los individuos, y se alternaron sus posiciones en el terrario (para evitar sesgos imprevistos) tomando el recaudo de higienizar las superficies en cada ocasión. Las grabaciones fueron procesadas con el software EthoVision versión 3.1 (Noldus Information Technology) obteniéndose la variación en la posición en función del tiempo cada 5 min, para cada individuo experimental (gracias a ensayos preliminares se llegó a concluir que este esquema de análisis resulta efectivo para evaluar el comportamiento de la especie utilizada).

A partir del análisis de las grabaciones se calculó el tiempo de permanencia de cada individuo en cada sector del terrario, medida usada en los análisis estadísticos (**sección 2.13**).

### 2.12.3. Experimentos de aclimatación a diferentes temperaturas

Para evaluar el efecto de la temperatura en la composición lipídica y de AGs, adultos (N=25) y juveniles (N=25) de *P. pythagoricus* se sometieron a aclimatación por 20 días a las temperaturas constantes de: 1, 4, 10, 25 y 35 °C (**Figura 2.11**). Durante la aclimatación los animales se mantuvieron en condiciones y recipientes individuales como se describe en la **sección 2.2.2**, con la salvedad de que no fueron alimentados durante todo el experimento. Se empleó, una estufa de cultivo (Faeta®) (25, 35 °C) o una heladera (1, 4, 10 °C) según correspondiese. Transcurridos los 20 días, se aplicó eutanasia y se procedió a diseccionar los tejidos de interés (TM y DI) (**sección 2.2.3**). Se extrajeron los lípidos totales (**sección 2.9**), y se caracterizó la composición lipídica por TLC-FID (**sección 2.10**) y la composición de AGs por GC-FID (**sección 2.11.2**). Los individuos que no se procesaron de inmediato fueron preservados a -80 °C en ultrafreezer (Haier®).



**Figura 2.11.** Infografía del ensayo de aclimatación a distintas temperaturas.

#### 2.12.4. Experimentos de estrés combinado: temperatura e insecticidas

Para estudiar la interacción entre la aclimatación a tres diferentes temperaturas y la exposición al CPF, insecticida para el que se hallaron pruebas de estrés oxidativo, se efectuó el siguiente experimento (**Figura 2.12.**):

Se seleccionaron adultos de *P. pythagoricus* (N=24), se dividieron en 3 grupos de aclimatación a 1, 25 y 35 °C. Se utilizaron individuos aclimatados a la temperatura intermedia como el control del estresor térmico. A su vez, cada grupo de temperatura se dividió en: grupo tratado con la dosis de campo de CPF y grupo control (repitiendo el procedimiento de exposición descrito en **sección 2.12.1**). Los individuos se aclimataron a sus respectivas temperaturas durante 20 días y concluido el

tiempo de aclimatación se realizaron las exposiciones de 24 h (manteniéndose condiciones de aclimatación).

### Estrés conjunto:



**Figura 2.12.** Infografía para el experimento de estrés combinado por aclimatación y exposición a clorpirifos.

Completada la etapa de exposición a este segundo estresor, se aplicó eutanasia y disección (ver **sección 2.2.3**). Una parte del DI (0,01 g) se destinó a citometría de flujo para determinación de ROS y el resto de la masa del tejido se procesó como se detalló en la **sección 2.4** y se destinó a la medición de actividad enzimática del sistema antioxidante (**sección 2.5.2**). Para este experimento, se decidió (en relación con el estrés por temperatura) cuantificar adicionalmente la concentración de los compuestos crioprotectores Gli y Glu (**secciones 2.5.4 y 2.5.5**).

## 2.13. Análisis estadístico

Los datos obtenidos para la totalidad de mediciones realizadas fueron tabulados en Microsoft Excel (Office®, Microsoft Corporation®) y procesados empleando lenguaje R versión 4.3.2 (R Core Team 2023) en entorno de desarrollo integrado Rstudio (Posit team 2023). Para representar gráficamente los resultados se recurrió al paquete "ggplot2" (Wickham 2016).

En cuanto a los experimentos de exposición tópica a insecticidas (ver **sección 2.12.1**), para las comparaciones entre los distintos grupos experimentales se empleó, cuando los supuestos correspondientes se cumplieron, Prueba t-Student (para dos muestras) y ANOVA de una vía (post hoc por Test de Tukey). El supuesto de normalidad se testeó aplicando la prueba de Shapiro-Wilk, la homogeneidad de varianzas se verificó con la prueba de Bartlett. Cuando por las características de los datos, las pruebas paramétricas no resultaron válidas, se recurrió a sus alternativas no paramétricas: prueba de los rangos con signo de Wilcoxon (para dos grupos) y prueba de Kruskal-Wallis (contraste post hoc: test de Bonferroni).

Para analizar los tiempos de permanencia obtenidos de las experiencias descritas en la **sección 2.12.2**, se planteó una prueba t-Student para una muestra, en la que se comparó una media poblacional hipotética igual a la mitad del tiempo de grabación (que representa una ausencia de preferencia por ninguna de las áreas del terrario en particular), con una media muestral correspondiente al tiempo de permanencia en el área control. Probar una diferencia significativa para una media muestral superior a la media hipotética implica un efecto de atracción del insecticida, una media muestral significativamente inferior implica un efecto repulsor del insecticida ensayado.

Las proporciones lipídicas y de AGs obtenidas de los experimentos de aclimatación a temperaturas (ver **sección 2.12.3**) se analizaron bajo el paradigma de Aitchison (1986) para el análisis de datos de tipo composición, en los cuales la información se encuentra en las relaciones entre proporciones y no en el valor absoluto de suma de todas ellas (van den Boogaart & Tolosana-Delgado 2013). Este procedimiento fue posible gracias a las funciones del paquete "compositions" (van den Boogaart & Tolosana-Delgado 2024) de R. Los modelos estadísticos lineales elaborados tuvieron como variable dependiente a la composición lipídica, adaptada a "simplex" de Aitchison y bajo transformación isométrica de relación logarítmica ("isometric logratio transformation", ILR). Las variables independientes fueron el tejido y la temperatura de aclimatación. El cumplimiento de los supuestos de los modelos se evaluó mediante inspección visual de residuos. La significancia de los coeficientes para cada modelo se obtuvo por ANOVA y los contrastes entre los niveles de cada variable independiente por la prueba *post hoc* tasa de descubrimiento falso ("false discovery rate", FDR).

Se evaluó el efecto conjunto de la aclimatación a temperaturas extremas y exposición a dosis de campo de CPF sobre medidas enzimáticas, ROS, Gli y Glu (sección **2.12.4**) mediante ANOVA de dos vías (TW-ANOVA). En estas pruebas, las variables predictoras (factores) fueron la temperatura y el tratamiento con CPF, considerándose a su vez la interacción entre ambas. Para el cumplimiento de los supuestos de homocedasticidad y normalidad de residuos, fue necesaria la transformación de la variable respuesta en varios casos (CAT:  $\ln(x)$ , SOD y GST:  $\sqrt[2]{x}$ ). Se empleó FDR como *post hoc* cuando se hallaron efectos significativos para alguno de los factores. Se consideró, para todas las pruebas estadísticas un  $\alpha = 0,05$ .



## 3. Objetivos

### 3.1. Objetivo general

El Orden Araneae incluye numerosas especies valiosas desde el punto de vista de su utilidad como enemigas naturales de insectos plaga. Sin embargo, la presencia de insecticidas en el ambiente, a consecuencia de su uso para control químico de dichas plagas, supone una fuente de estrés antropogénico que puede impactar negativamente en las poblaciones de arañas, incluso en concentraciones subletales. Al mismo tiempo, las arañas deben tolerar como todo organismo cambios de temperatura, un factor de estrés natural, que además es agravado por el cambio climático global. La especie sudamericana *P. pythagoricus*, habitante de ambientes cercanos a agroecosistemas (barreras forestales) y estudiada anteriormente desde el punto de vista bioquímico, sirve como un buen modelo experimental para abordar estas problemáticas.

Los objetivos de esta tesis son, por un lado, estudiar los mecanismos adaptativos de las arañas al estrés oxidativo ocasionado por insecticidas, concretamente el sistema antioxidante enzimático. Por otro, estudiar los mecanismos de la aclimatación prolongada a diferentes temperaturas, analizando la variación en la composición lipídica. Por último, estudiar la interacción entre estrés por temperatura y por insecticidas sobre el sistema antioxidante.

### 3.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto del insecticida CPF aplicado tópicamente y a distintos tiempos de exposición, sobre el nivel de estrés oxidativo en *P. pythagoricus*, evaluando comparativamente indicadores enzimáticos como SOD, CAT, GST, GR y GPx y no enzimáticos, como peroxidación lipídica.
- Determinar el efecto del insecticida ABM aplicado tópicamente sobre las enzimas AChE y CAT, y la peroxidación lipídica.
- Caracterizar la composición de HC cuticulares de *P. pythagoricus*.
- Determinar el efecto de CPF aplicado sobre superficies, en el comportamiento de *P. pythagoricus*.
- Describir desde el punto de vista histológico, el efecto sobre el DI de la exposición a CPF.
- Determinar de forma cuali y cuantitativa la composición lipídica y de AGs de distintos tejidos de *P. pythagoricus* en individuos adultos y juveniles, expuestos de forma prolongada a bajas y altas temperaturas.
- Determinar el efecto combinado de la aclimatación a diferentes temperaturas y del insecticida CPF, sobre las enzimas del sistema antioxidante, la concentración de ROS y concentración de los crioprotectores Gli y Glu.

## 4. Exposición al organofosforado clorpirifos

### 4.1. Introducción

El CPF es uno de los insecticidas organofosforados más empleados en la protección de toda clase de cultivos, en muchos de países a lo largo del mundo (Yang *et al.* 2015, Howell III *et al.* 2018, Foong *et al.* 2020, Raj & Kumar 2022). Este uso extendido y su persistencia en distintos compartimientos medioambientales, explica su creciente y preocupante presencia en el medio ambiente (Solomon *et al.* 2014, Huang *et al.* 2021, Raj & Kumar 2022, Wotejko *et al.* 2022). En general, la mayor parte del volumen de los plaguicidas aplicados se difunde en el ambiente (Pimentel 1995, Chishti *et al.* 2013) desencadenando consecuencias indeseadas sobre organismos no plaga y sobre el propio ser humano (Giesy *et al.* 2014).

Las poblaciones de arañas se cuentan entre las de organismos no blanco que entran en peligro ante este flujo de polución por insecticida (Pekár 2012). Las arañas pueden ayudar a limitar el crecimiento de las poblaciones de distintas plagas gracias a su hábitos depredadores generalistas y respuesta funcional (Riechert & Lockley 1984, Riechert 1999). La deriva y difusión atmosférica del CPF más allá de los puntos de aplicación (Mackay *et al.* 2014), implica la posibilidad de escenarios de exposición incluso para poblaciones de arañas que habiten por fuera de los cultivos propiamente dichos, por ejemplo en las barreras forestales que suelen rodearlos. Muchas barreras forestales están formadas por *Eucalyptus* spp. (Valentini & Bimbi 1993, Borzone *et al.* 2007) árboles que, como se comenta en la Introducción son un hábitat recurrente para *P. pythagoricus* (Simó *et al.* 2011).

La epicutícula, gracias a su composición fuertemente hidrofóbica cumple en los artrópodos, la función de impedir la deshidratación a través de la evaporación tegumentaria. Por otro lado, al considerar una ruta de absorción cuticular para los plaguicidas, esta epicutícula implica una barrera física que estas sustancias deben atravesar (Juárez *et al.* 2010, Zhu *et al.* 2013, Bass *et al.* 2014, Balabanidou *et al.* 2016). Los HC cuticulares presentes en la epicutícula de las arañas (Trabalon *et al.* 1997) podrían poseer un papel relevante en la protección contra la exposición a plaguicidas (Motoyama *et al.* 1992).

Además de su efecto letal directo, todo xenobiótico conlleva el riesgo de inducir diferentes efectos subletales sobre los organismos no blanco. Se ha registrado que el CPF puede ocasionar cambios histopatológicos, de comportamiento, estrés oxidativo, daño neurológico, genotoxicidad, cambios en patrones de desarrollo, en la reproducción y en el consumo potencial de presas en enemigos naturales (Santos *et al.* 2017, Rasheed *et al.* 2020, Huang *et al.* 2021, Xu *et al.* 2024). Independientemente de sus estructuras químicas y mecanismos específicos de toxicidad, muchos xenobióticos parecen ser capaces de inducir estrés oxidativo (**sección 1.5.1**) una vez que ingresan al organismo (Bagchi *et al.* 2002). Particularmente está bien documentado en distintos vertebrados e invertebrados que el CPF es capaz de inducir desequilibrios en el sistema antioxidante y/o daño oxidativo (Alvarez *et al.* 2008, Saulsbury *et al.* 2009, Rehman & Waliullah 2012, Uchendu *et al.* 2012, Elsharkawy *et al.* 2013, Narra 2014, Khalil 2015).

La preocupación por el impacto adverso de los plaguicidas convencionales como los organofosforados llevó al desarrollo del concepto de “manejo integrado de plagas”. Este enfoque implica un sistema de regulación, que teniendo en cuenta el hábitat y la dinámica poblacional de las

especies consideradas, utiliza todas las técnicas y métodos apropiados, con el objetivo de mantener las plagas en niveles que no causen daños económicos (Cucchi 2020). Para esto se emplean distintas herramientas amigables con el medio ambiente, como el uso de enemigos naturales e insecticidas de alta selectividad y baja persistencia (Stenberg 2017, Kumar *et al.* 2020). La ABM (**sección 1.7.2**) posee características químicas que la hacen aparentemente idónea para formar parte del manejo integrado de plagas. Numerosos estudios han confirmado la efectividad de este insecticida para controlar variedad de plagas selectivamente, esto es, manteniendo a su vez baja toxicidad para enemigos naturales (Bueno & Freitas 2004, Bacci *et al.* 2007, Jasmine *et al.* 2008, Arnaudov & Kutinkova 2009, Abo-El-Saad *et al.* 2013, Khalil 2013). Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de efectos más sutiles, subletales, sobre especies no blanco (Bai & Ogbourne 2016, Hong *et al.* 2020, Song *et al.* 2021, Guan *et al.* 2023, Reda *et al.* 2023).

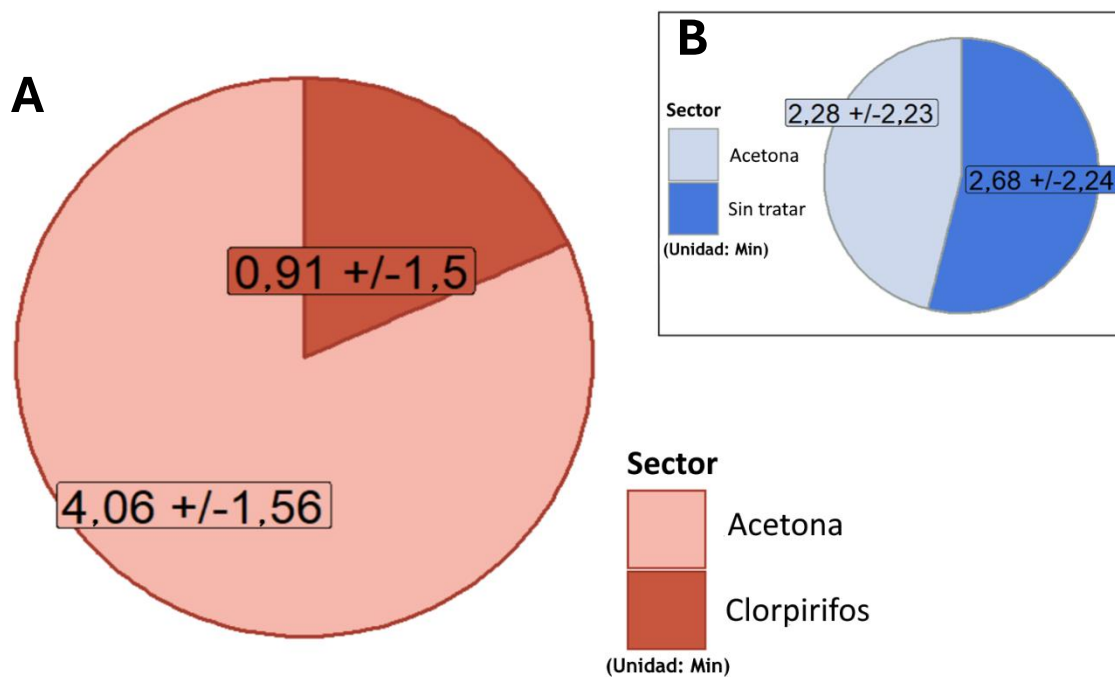
En el siguiente capítulo se analiza el comportamiento exploratorio frente a superficies expuestas a CPF y la composición de HC cuticulares de *P. pythagoricus*. Además, se avalúa el efecto de la exposición tópica a CPF sobre la actividad de algunos componentes del sistema antioxidante enzimático y el daño provocado a niveles de peroxidación lipídica e histológico. Por último, se determina el efecto de la ABM sobre algunas de las enzimas del sistema antioxidante. Las respectivas hipótesis de trabajo fueron las siguientes:

- *P. pythagoricus* es capaz de reconocer y reaccionar a la presencia de CPF en superficies modificando su comportamiento exploratorio.
- La epicutícula de *P. pythagoricus* posee una composición rica en HC consistente con lo previamente registrado en otras especies de arañas.
- La exposición tópica a la dosis de campo de CPF es capaz de afectar la actividad de las enzimas del sistema antioxidante y causar peroxidación lipídica en *P. pythagoricus*, además de inhibir la enzima blanco: AChE.
- La exposición tópica a la dosis de campo de CPF causa daño histopatológico al DI de *P. pythagoricus*.
- La exposición tópica a ABM es capaz de afectar la actividad de AChE y CAT, así como causar peroxidación lipídica a *P. pythagoricus*.

## 4.2. Resultados

### 4.2.1. Efecto del clorpirifos en superficie sobre comportamiento

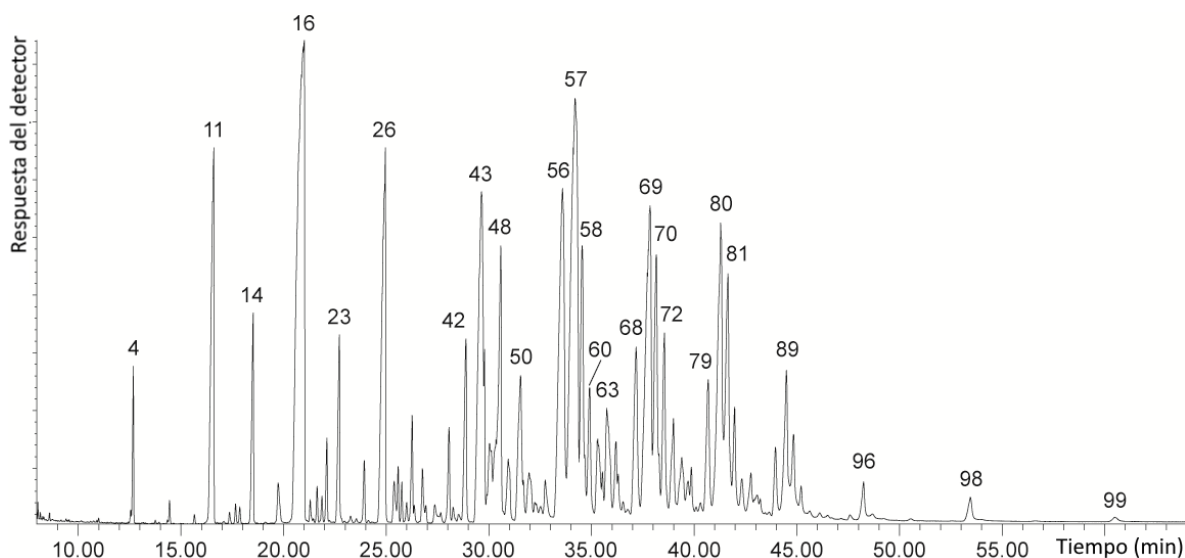
En la **Figura 4.1.** se resume el tiempo de permanencia promedio obtenido en los ensayos de comportamiento por exposición a superficies expuestas a CPF (valor promedio y desvío en etiquetas sobre cada porción). Para descartar que la acetona tuviera algún efecto sobre el comportamiento por sí misma, se realizó un ensayo con un sector expuesto con acetona y el otro sin expuesto. La **Figura 4.1-B.** ilustra los tiempos de permanencia entre el sector expuesto a acetona y el que no fue expuesto, evidenciando la ausencia de diferencias significativas entre ambos ( $t = 0,240$ ,  $p = 0,8113$ ). En cuanto al ensayo en sí, la **Figura 4.1-A.** muestra una evidente permanencia mayoritaria en el sector correspondiente a la acetona comparado con el sector de CPF ( $t = -4,332$ ,  $p = 0,0006$ ).



**Figura 4.1.** Tiempo de promedio (+/- desvío estándar) de permanencia sobre sectores de terrario (experimentos comportamiento **secc. 2.12.2**). Fueron empleados 12 individuos por experimento (N=24). **A.** Experimento con superficie tratada con el insecticida clorpirifos (CPF). **B.** Verificación de efecto del solvente acetona.

## 4.2.2. Caracterización hidrocarburos cuticulares

Dentro del perfil de los HC cuticulares de *P. pythagoricus* (**Figura 4.2.**), se pudieron identificar 99 HC, principalmente componentes multiisoméricos ramificados con metilo, dimetilo y trimetilo. Los componentes saturados de cadena ramificada de especies saturadas de dimetilo (44,8%) y monometilo (13,0%) de cadena muy larga, mayormente C35-C45, fueron los predominantes. En la mayoría de los picos se encontró una multiplicidad de isómeros de 11x, 13x y 15x, con x variando principalmente de 15 a 29. Además, el 26% de los HC lineales se encontraron entre C22 y C37. En la **Tabla 4.1** se enumera la identificación de cada HC realizada mediante espectrometría de masas GSC.



**Figura 4.2.** Cromatograma representativo de cromatografía gaseosa aplicada a hidrocarburos (HC) cuticulares de *P. pythagoricus*. Los picos numerados son la señal del detector correspondientes a HC en la muestra. Identidad de los picos en **Tabla 4.1**.

**Tabla 4.1** HC de *P. pythagoricus* (N = 3). Número de pico, tiempo de retención (TR), área porcentual, Índice de retención de Kovats (KI).

Pico	TR (min)	Área %	KI	Hidrocarburo	Iones diagnósticos
1	10,90	0,01	2195	C22:1	308
2	10,99	0,01	2200	nC22	310
3	12,55	0,04	2292	C23:1	322
4	12,68	0,59	2300	nC23	324
5	13,75	0,01	2361	4-metil C23	70/71,294/295;323
6	13,94	0,00	2371	3-metil C23	56/57,308/309;323
7	14,34	0,01	2394	C24:1	336
8	14,44	0,09	2400	nC24	338
9	15,66	0,04	2456	4-metil C24	70/71,308/309;337
10	16,28	0,02	2485	C25:1	350
11	16,60	3,84	2500	nC25	352
12	17,66	0,09	2555	4-metil C25	70/71,322/323;351
13	17,86	0,07	2566	3-metil C25	56/57,336/337;351
14	18,51	1,32	2600	nC26	366
15	19,74	0,33	2649	4-metil C26	70/71,336/337;365
16	21,00	12,18	2700	nC27	380
17	21,30	0,08	2717	11-; 13-metil C27	168/169,252/253;196/197,224/225;379
18	21,35	0,01	2720	9-metil C27	140/141,280/281;379
19	21,45	0,01	2726	7-metil C27	112/113,308/309;379
20	21,63	0,16	2737	5-metil C27	84/85,336/337;379
21	21,87	0,11	2751	4-metil C27	70/71,350/351;379
22	22,11	0,41	2764	3-metil C27	56/57,364/365;379
23	22,71	1,22	2800	nC28	394
24	23,26	0,04	2825	12-;13-;14-metil C28	182/183,252/253;196/197, 238/239;210/211,224/225;393
25	23,93	0,34	2854	4-metil C28	70/71,364/365;393
26	24,95	4,84	2900	nC29	408
27	25,39	0,24	2924	11-; 13-; 15-metil C29	168/169,280/281;196/197,252/253;224/225;407
28	25,45	0,05	2927	9-metil C29	140/141,308/309;407
29	25,58	0,27	2935	7-metil C29	112/113,336/337;407
30	25,76	0,18	2945	5-metil C29	84/85,364/365;407
31	25,99	0,11	2957	4-metil C29	70/71,378/379;407
32	26,26	0,59	2972	3-metil C29	56/57,392/393;407
33	26,37	0,07	2978	5,15-; 5,17-dimetil C29	84/85,379;196/197,267;224/225,239;421
34	26,76	0,33	3000	nC30	422
35	26,93	0,08	3008	3,7-; 3,11-; 3,15-dimetil C29	56/57,407;336/337,127;280/281,183;224/225,239;421
36	27,37	0,14	3029	x-metil C30 (x=10,11,12,13,14,15)	154/155,308/309;168/169,294/295;182/183,280/281;196/197, 266/267;210/211,252/253;224/225,238/239;421
37	27,48	0,04	3034	x-metil C30 (x=7,8,9)	112/113,350/351;126/127,336/337;140/141,322/323;421
38	27,65	0,07	3042	6-metil C30	98/99,364/365;421
39	28,06	0,60	3061	4-metil C30	70/71,392/393;421
40	28,26	0,09	3071	6,16-; 6,18-dimetil C30	98/99,379;224/225,253;196/197,281;435
				3-metil C30	56/57,406/407;421

**Tabla 4.1** (continuación)

41	28,54	0,06	3084	4,16-dimetil C30	70/71,407;224/225,253;435
42	28,88	1,47	3100	nC31	436
43	29,64	5,56	3139	9-, 11-, 13-, 15-metil C31	140/141,336/337;168/169,308/309;196/197,280/281;224/225,252/253;435
44	29,78	0,59	3146	7-metil C31	112/113,364/365,435
45	29,90	0,11	3152	5-metil C31	84/85,392/393,435
46	30,03	0,94	3159	11,15-, 13,17-dimetil C31	168/169,323;252/253,239;196/197,295;224/225,267;449
47	30,39	0,98	3176	7,19-dimetil C31; 3-metil C31	112/113,379,196/197,295,449; 56/57,420/421,435
48	30,58	2,63	3186	5,17-, 5,19-dimetil C31	84/85,407,224/225,267;196/197,295;449
49	30,94	0,72	3205	3,7-, 3,9-, 3,11-, 3,13-, 3,15-dimetil C31	56/57,435;364/365,127;336/337,155;308/309,183;280/281,211;252/253,239;449
50	31,54	1,75	3237	x-metil C32 (x=10,11,12,13,14,15,16)	154/155,336/337;168/169,322/323;182/183,308/309;196/197,294/295;210/211,280/281;224/225,266/267;238/239,252/253;449
51	31,68	0,19	3244	x-metil C32 (x=6,7,8)	98/99,392/393;112/113,378/379;126/127,364/365;449
52	31,96	0,59	3258	4-metil C32	70/71,420/421;449
				x,y-dimetil C32 (x=10,12,14; y=16,18,20)	154/155,351;182/183,323;210/211,295;463
				8,12-dimetil C32	126/127,379;308/309,197;463
53	32,23	0,13	3273	6,16-, 6,18-, 6,20-dimetil C32	98/99,407;224/225,253;196/197,281;168/169,309;463
54	32,52	0,08	3288	4,16-, 4,18-, 4,20-dimetil C32	70/71,435;224/225,253;196/197,281;168/169,309;463
55	32,74	0,31	3300	nC33	464
56	33,58	6,32	3344	9-, 11-, 13-, 15-, 17-methy C33	140/141,364/365;168/169,336/337;196/197,308/309;224/225,280/281;252/253;463
57	34,20	10,25	3375	9,x-dimetil C33 (x=19,21,23,25)	140/141,379;477
				11,x-dimetil C33 (x=15,17,19,21,23)	168/169,351;477
				13,x-dimetil C33 (x=15,17,19,21)	196/197,323;477
				15,x-dimetil C33 (x=17,19)	224/225,295;477
58	34,54	2,64	3393	5,15-, 5,17-, 5,19-dimetil C33	84/85,435;224/225,295;252/253,267;280/281,239;477
59	34,67	0,27	3400	7,11,17-, 7,13,17-trimetil C33	112/113,421;252/253,281;183,351;211,323;491
60	34,90	1,20	3412	3,11-, 3,13-, 3,15-dimetil C33	56/57,463;336/337,183;308/309,211;280/281,239;477
61	35,30	0,98	3433	x-metil C34 (x=10,11,12,13,14,15,16,17)	154/155,364/365;182/183,336/337;210/211,308/309;477
62	35,53	0,22	3445	3,7,9,13-tetrametil C33	56/57,491;127,421,169,379,308/309,239;505
63	35,74	1,54	3456	x,y-dimetil C34 (x=10,12,14; y=16,18,20,22)	154/155,379;182/183,351;210/211,323;491
64	36,19	0,61	3479	x,y,z-trimetil C34 (x=10,12; y=14,16; z=18,20)	154/155,393;182/183,365;225,323,253,295;505
65	36,30	0,20	3485	4,16-, 4,18-, 4,20-dimetil C34	70/71,463;280/281,253;252/253,281;224/225,309;491
66	36,53	0,08	3500	nC35	492
67	36,76	0,04	3508	4,12,18-, 4,12,20-trimetil C34	70/71,477;197,351;252/253,295;224/225,323;505
68	37,17	2,09	3530	11-, 13-, 15-, 17-metil C35	168/169,364/365;196/197,336/337;224/225,308/309;252/253,280/281;491
69	37,85	5,97	3568	9,x-dimetil C35 (x=17,19,21,23,25,27)	140/141,407;505
				11,x-dimetil C35 (x=17,19,21,23,25)	168/169,379;505
				13,x-dimetil C35 (x=17,19,21,23)	196/197,351;505
				15,x-dimetil C35 (x=17,19,21)	224/225,323;505
				17,19-dimetil C35	252/253,295;505
70	38,15	2,89	3585	5,17-, 5,19-, 5,21-dimetil C35	84/85,463;280/281,267;252/253,295;224/225,323;505
				11,15,19-trimetil C35	168/169,393;239,323;252/253,309;519
71	38,28	0,27	3593	7,11,17-trimetil C35	112/113,449;183,379;280/281,281;519

**Tabla 4.1** (continuación)

72	38,55	1,70	3608	3,11-; 3,15-; 3,17-dimetil C35	56/57,491;308/309,239;280/281,267;364/365,183;505
73	38,99	0,94	3633	x-metil C36 (x=14,16,18)	210/211,336/337;238/239,308/309;266/267,294/295;505
				3,9,15-; 3,11,15-trimetil C35	56/57,505;155,407;183,379;308/309,253;519
74	39,39	0,69	3655	12,18-;12,20-;14,18-;14,20-;16,20-dimetil C36	182/183,379;210/211,351;238/239,323;280/281,281;252/253,309;519
				10,18-dimetil C36	154/155,407;280/281,281;519
				8,18-dimetil C36	126/127,435;280/281,281;519
75	39,71	0,28	3673	10,14,18-; 12,16,20-trimetil C36	154/155,421,225,351,280/281,295;182/183,393,253,323,252/253,323;533
76	39,86	0,24	3682	4,14-; 4,16-; 4,18-dimetil C36	70/71,491;336/337,225;308/309,253;280/281,281;519
77	40,10	0,02	3700	nC37	520
78	40,31	0,06	3707	4,10,16-; 4,12,16-trimetil C36	70/71,505;169,407;197,379;308/309,267;533
79	40,68	1,44	3728	9-; 11-; 13-; 15-; 17-; 19-metil C37	140/141,420/421;168/169,392/393;196/197,364/365;224/225,336/337;252/253,308/309;280/281;519
80	41,29	4,65	3765	9,x-dimetil C37 (x=19,21,23,25,27,29)	140/141,435;533
				11,x-dimetil C37 (x=19,21,23,25,27)	168/169,407;533
				13,x-dimetil C37 (x=19,21,23,25)	196/197,379;533
				15,x-dimetil C37 (x=19,21,23)	224/225,351;533
				17,19-dimetil C37	252/253,323;533
81	41,65	2,90	3787	5,15-; 5,17-dimetil C37	84/85,491;336/337,239;308/309,267;533
				11,15,19-; 13,15,19-trimetil C37	168/169,421;196/197,393;239,351,280/281,309;547
82	41,75	0,17	3793	7,11,15-trimetil C37	112/113,477;183,407;336/337,253;547
83	41,97	0,83	3807	3,15-; 3,17-; 3,19-dimetil C37	56/57,519;336/337,239;308/309,267;280/281,295;533
				5,11,15-; 5,13,15-trimetil C37	84/85,505;183,407;211,379;336/337,253;547
84	42,32	0,27	3828	x-metil C38 (x=12,....,19)	182/183,392/393;210/211,364/365;238/239,336/337;533
				3,9,17-; 3,11,15-trimetil C37	56/57,533;155,407;183,379;308/309,281;336/337,253;547
85	42,76	0,38	3856	12,18-;12,22-;12,24-;14,18-;14,22-dimetil C38	182/183,407;210/211,379;308/309,281;252/253,337;224/225,365;547
				10,18-; 10,22-dimetil C38	154/155,435;308/309,281;252/253,337;547
				8,18-; 8,22-dimetil C38	126/127,463;308/309,281;252/253,337;547
86	43,07	0,25	3875	10,14,18-; 12,16,20-; 14,18,22-trimetil C38	154/155,449;225,379;308/309,295;182/183,421;253,351;280/281,323;210/211,393;281,323;252/253,351;561
87	43,22	0,09	3884	4,16-; 4,18-; 4,22-dimetil C38	70/71,519;336/337,253;308/309,281;252/253,337;547
88	43,95	0,63	3929	11-; 13-; 15-; 17-; 19-metil C39	168/169,420/421;196/197,392/393;224/225,364/365;252/253,336/337;280/281,308/309;547
89	44,49	1,79	3958	9,x-dimetil C39 (x=15,17,19,21,23,25,27,29,31)	140/141,463;561
				11,x-dimetil C39 (x=15,17,19,21,23,25,27,29)	168/169,435;561
				13,x-dimetil C39 (x=15,17,19,21,23,25,27)	196/197,407;561
				15,x-dimetil C39 (x=17,19,21,23,25)	224/225,379;561
				17,x-dimetil C39 (x=19,21,23)	252/253,351;561
				19,21-dimetil C39	280/281,323;561
90	44,84	0,88	3977	5,15-; 5,17-dimetil C39	84/85,519;364/365,239;336/337,267;561
				11,x,y-; 13,x,y-trimetil C39	168/169,449;196/197,421;575
91	45,21	0,24	3997	3,15-; 3,17-; 3,19-dimetil C39	56/57,547;364/365,239;336/337,267;308/309,295;561
				5,x,y-trimetil C39 (x=11,13,15; y=17,19,21,23)	84/85,533;575
92	45,63	0,05	4020	x-metil C40 (x=12,....,20)	182/183,420/421;238/239,364/365;266/267,308/309;561
93	46,11	0,04	4047	12,x-dimetil C40	182/183,435;575



**Tabla 4.1** (continuación)

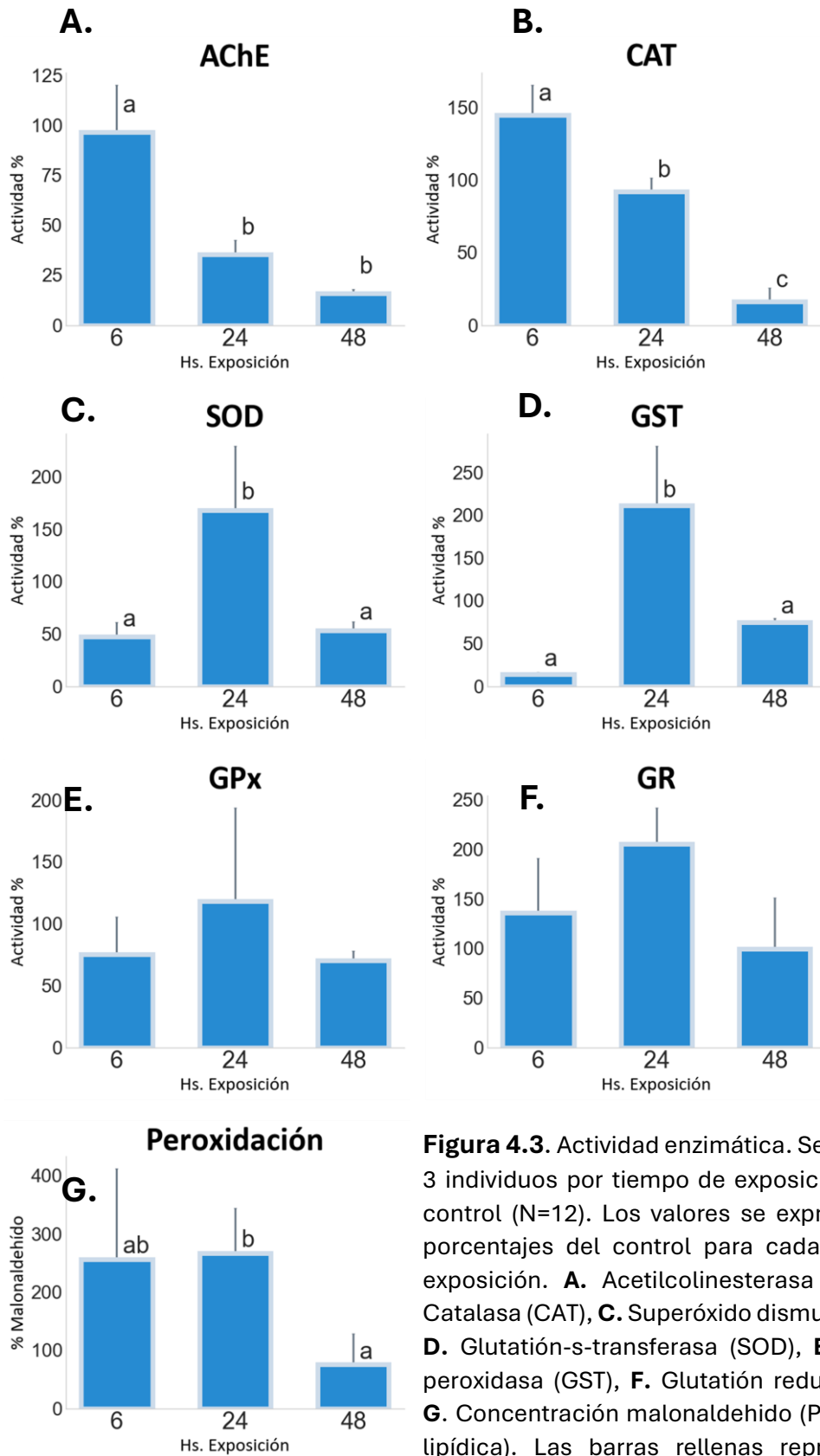
94	46,51	0,02	4068	4,x-dimetil C40	70/71,547;575
95	47,58	0,05	4127	13;-; 15;-; 17-metil C41	196/197,420/421;224/225,392/393;252/253,364/365;575
96	48,25	0,43	4155	11,15;-; 11,17-dimetil C41	168/169,463;364/365,267;392/393,239;589
				13,15;-; 13,17-dimetil C41	196/197,435;364/365,267;392/393,239;589
97	48,68	0,09	4175	5,15;-; 5,17-dimetil C41	84/85,547;392/393,239;364/365,267;589
				11,x,y-trimetil C41	168/169,477;603
98	53,45	0,36	4350	11,21;-; 11,23-dimetil C43	168/169,491;308/309,351;336/337,323;617
				13,21;-; 13,23-dimetil C43	196/197,463;308/309,351;336/337,323;617
99	60,50	0,10	4549	11,23-dimetil C45	168/169,519;336/337,351;645
				13,23-dimetil C45	196/197,491;336/337,351;645

### 4.2.3. Efectos de exposición a clorpirifos sobre sistema antioxidante

Ejemplares adultos de *P. pythagoricus* fueron expuestos tópicamente a la dosis de campo de CPF durante 6, 24 y 48 h. No se registró mortalidad a ninguno de los tiempos de exposición. La actividad de cada enzima y la concentración de MDA se expresó como porcentaje en relación con su control (siendo el valor del control correspondiente 100% en cada caso). Las medias de actividad enzimática porcentual para cada tiempo de exposición se grafican en la **Figura 4.3-A. – F.** y peroxidación lipídica en la **Figura 4.3-G.**

Luego de 24 y 48 h se puede observar un descenso en la actividad de AChE (**Figura 4.3-A.**). CAT mostró una mayor actividad a las 6 h ( $145 \pm 21\%$ ), con un evidente descenso a las 48 h del tratamiento con CPF ( $F = 60,71$ ,  $p = 0,0001$ ) (**Figura 4.3-B.**). SOD incrementó su actividad a  $168 \pm 61\%$  a las 24 h ( $F = 14,64$ ,  $p = 0,0049$ ) por sobre los tiempos de 6 y 48 h (**Figura 4.3-C.**). La actividad de las enzimas relacionadas al metabolismo del glutatión, GST, GPx, y GR (**Figura 4.3-D., E. y F.** respectivamente), incrementaron su actividad luego de las 24 h por sobre los valores correspondientes a 6 y 48 h de exposición. Sin embargo, solo la variación en la actividad de GST a ese tiempo fue significativa,  $211\% \pm 70\%$  ( $F = 6,71$ ,  $p = 0,027$ ).

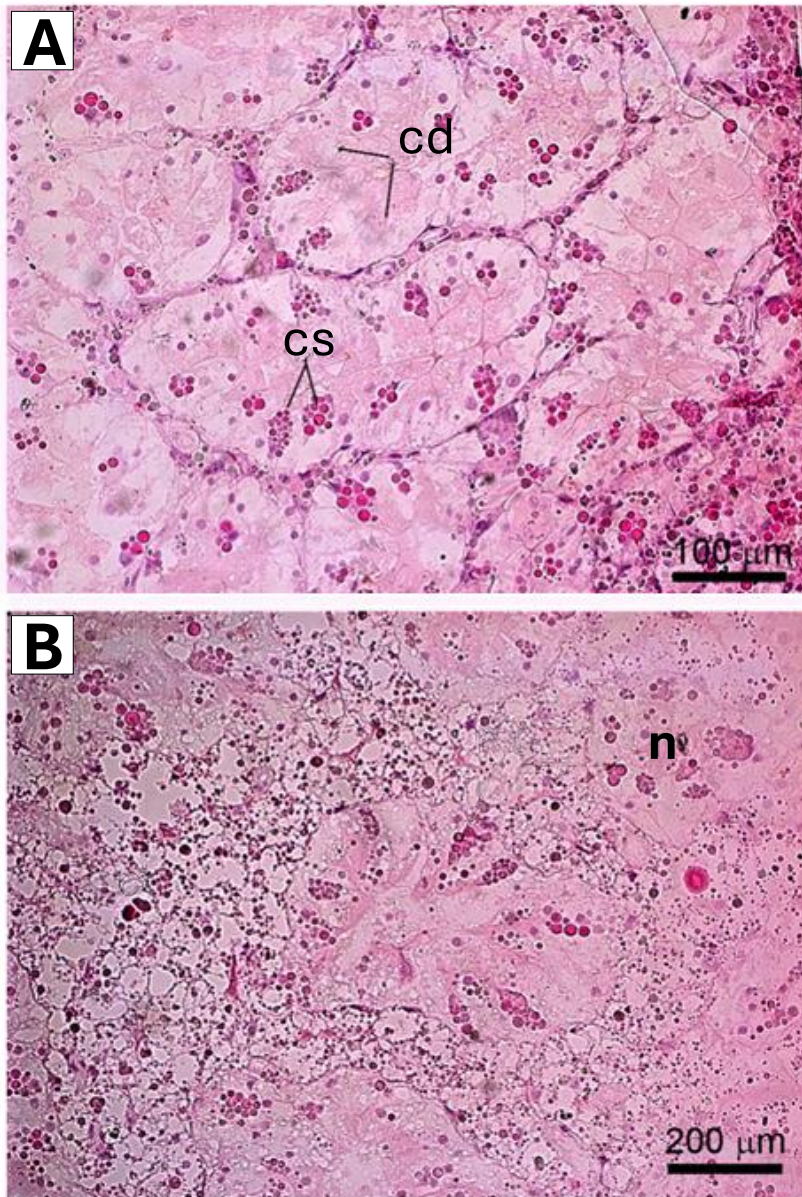
La peroxidación lipídica (**Figura 4.3-G.**), fue significativamente más alta a 6 y 24 h de exposición comparada con las 48 h ( $F = 6,700$ ,  $p = 0,0296$ ), con un valor final de  $75\% \pm 53\%$ .



**Figura 4.3.** Actividad enzimática. Se emplearon 3 individuos por tiempo de exposición a CPF y control (N=12). Los valores se expresan como porcentajes del control para cada tiempo de exposición. **A.** Acetilcolinesterasa (AChE), **B.** Catalasa (CAT), **C.** Superóxido dismutasa (SOD), **D.** Glutación-s-transferasa (SOD), **E.** Glutación peroxidasa (GST), **F.** Glutación reductasa (GR). **G.** Concentración malonaldehído (Peroxidación lipídica). Las barras rellenas representan la media, las barras de error representan el desvío estándar. Letras distintas marcan los grupos estadísticamente diferentes.

#### 4.2.4. Efectos histopatológicos de clorpirifos sobre divertículo intestinal

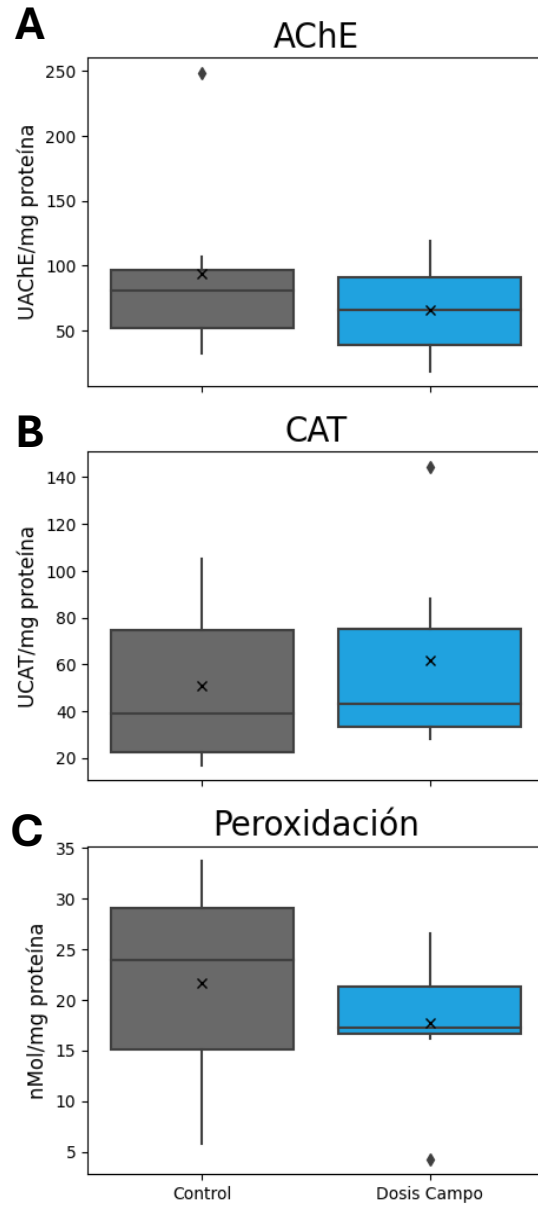
Se realizó el análisis histológico de arañas control y expuestas durante 24 h a CPF. El DI de las arañas control se pudo observar como un epitelio simple compuesto de células digestivas secretoras rodeadas por tejido conectivo intersticial (**Figura 4.4-A.**). Las células digestivas se mostraron largas y más numerosas que las secretoras, además de poseer cuerpos altamente coloreados. Luego de 24 h de exposición al CPF, las arañas exhibieron túbulos necróticos (**Figura 4.4-B.**).



**Figura 4.4.** Análisis histológico de divertículo intestinal (DI) de *P. pythagoricus*. **A.** Vista general del DI de una araña control que ilustra su estructura tubular. Células digestivas (cd), células secretoras (cs). **B.** Sección de una araña expuesta a una dosis de campo de CPF durante 24 h con parte del DI manifestando necrosis (n). Se emplearon 4 individuos por grupo (N=8).

#### 4.2.5. Efectos de la abamectina sobre el sistema antioxidante

Adultos de *P. pythagoricus* se expusieron tópicamente a dosis de campo del insecticida ABM (sección 2.3.1.), con un tiempo de exposición de 48 h (N= 16). No se registró mortalidad al término del tratamiento. En la **Figura 4.5.** se comparan los resultados obtenidos para controles y tratados con



**Figura 4.5.** Actividad enzimática en DI de adultos de *P. pythagoricus*, control y expuesta a dosis de campo de abamectina (ABM). Se emplearon 8 individuos por cada tratamiento (N=16). AChE (**A**), CAT (**B**) y Peroxidación lipídica (**C**) . “X” representa media.

el insecticida para las enzimas AChE (**A**) y CAT (**B**), y el marcador de peroxidación lipídica MDA (**C**). No se encontraron diferencias significativas entre grupos tratados y controles.

### 4.3. Discusión

El uso de insecticidas en la agricultura puede afectar aspectos conductuales además de procesos fisiológicos de los organismos no blanco, así como causar alteraciones en diferentes niveles tróficos influyendo en las relaciones entre los organismos (Beauvais *et al.* 1999, Galloway & Handy 2003, Bellas *et al.* 2005).

En los ensayos comportamentales de este capítulo se comprobó que *P. pythagoricus* es capaz de evitar superficies con el organofosforado CPF, probablemente debido a la sensibilidad otorgada por los quimiorreceptores de contacto en las patas (pretarso y tarso) y en los pedipalpos (Foelix & Chu-Wang 1973).

Aunque el impacto subletal de los plaguicidas varía claramente en relación con el método de exposición y el compuesto utilizado, así como con las especies modelo (Dinter & Poehling 1995, Evans *et al.* 2010), los presentes resultados se corresponden con las observaciones realizadas sobre *Clubiona* spp., *Dictyna* spp., *Pardosa* spp. y *Xysticus* spp. expuestas a superficies expuestas con el organofosforado fosfalona (Pekár & Haddad 2005) y también con resultados de *Pardosa palus* después de la exposición a Nurelle™ (CPF y cipermetrina) o Decis™ (deltametrina; Pekár y Benes (2008)). Durante las 4 h analizadas en nuestros experimentos, la primera reacción de las arañas fue salir de la zona contaminada, como también se observó en arañas *Oedothorax* sp. y otras especies relacionadas al control biológico (Everts *et al.* 1991, Michalková & Pekár 2009). Esto podría significar que los individuos reprimieron sus movimientos exploratorios en respuesta al entorno hostil (Wrinn *et al.* 2012). Es necesario recordar que, en los experimentos llevados a cabo para esta tesis fue empleado el principio activo del insecticida CPF, y no un formulado. Estos formulados son mezclas que contienen, además del principio activo, aditivos, coadyuvantes u otros ingredientes que pueden tener sus propios efectos tóxicos (Mesnage & Antoniou 2018).

Si bien la capacidad para reconocer y evitar el contacto con superficies contaminadas con este insecticida puede tomarse como una característica positiva desde el punto de vista del posible impacto sobre las poblaciones de *P. pythagoricus*, deben considerarse los posibles efectos indirectos de este cambio en el comportamiento. El efecto repelente del CPF podría interferir con la capacidad de las poblaciones de esta especie de ejercer su potencial como controladoras biológicas, al alejarlas de las potenciales presas que se desea que controlen (Desneux *et al.* 2007). Esta posibilidad ya se ha contemplado para otros grupos de enemigos naturales y numerosos insecticidas (Umoru *et al.* 1996, Fernandes *et al.* 2016, Ramos *et al.* 2017).

Sin embargo, a pesar de poder reconocer la presencia de insecticidas y eludirlos, en muchas ocasiones, es inevitable que estos entren en contacto con las arañas. En esta situación y dado que una de las vías de ingreso de los insecticidas es la cutícula, esta será la primera barrera entre el xenobiótico y el organismo, ya que los componentes de esta barrera pueden impedir su internalización (Juárez *et al.* 2010, Zhu *et al.* 2013, Bass *et al.* 2014, Balabanidou *et al.* 2016). Se ha demostrado que la remoción de lípidos cuticulares acelera la entrada de insecticidas en insectos (Motoyama *et al.* 1992). Además, la resistencia de estos organismos se correlacionó con un aumento de sus lípidos (Juárez 1994, Pedrini *et al.* 2009, Juárez *et al.* 2010). En las arañas, los HC cuticulares

son abundantes, constituyendo la mayoría de los lípidos observados como por ejemplo en *Tegenaria atrica*, donde representan alrededor del 86% del extracto lipídico (Trabalon *et al.* 1996). Para el caso de *P. pythagoricus* se ha reportado una posible síntesis en el DI y el transporte hacia la epicutícula a través de las lipoproteínas hemolinfáticas (Trabalon & Garcia 2021).

En el presente estudio se encontró una proporción considerable de HC de cadena larga (C33-C45), que son probablemente los principales responsables de inhibir la entrada de los diferentes insecticidas. Se ha demostrado que los HC de cadena más larga evitan la entrada y salida de moléculas de manera más efectiva, siendo buenos componentes impermeabilizantes (Gibbs & Pomonis 1995, Balabanidou *et al.* 2016). Además, se observó que el aumento de HC de cadena ramificada genera un engrosamiento de la cutícula, dificultando así la entrada de insecticidas (Balabanidou *et al.* 2018). En *P. pythagoricus* se observó una gran cantidad de HC (C28, C29, C30, dimetilC39 y dimetilC41) similares a los presentes en fenotipos de *Anopheles gambiae* resistentes a los piretroides y a los insecticidas organoclorados (Balabanidou *et al.* 2019).

Los biomarcadores se definen ampliamente como indicadores de eventos en sistemas biológicos (variaciones en número, estructura o función de componentes celulares o bioquímicos) (NRC 1992). Como se comenta en la **sección 1.7.1**, los organofosforados se caracterizan por su mecanismo de toxicidad vía inhibición de la enzima AChE, que sirve de este modo como evidencia de su acción tóxica sobre los individuos expuestos. La inhibición de la AChE es usada desde hace tiempo como biomarcador de toxicidad por organofosforados en vertebrados (Fairbrother 1991, Fulton & Key 2001, Sandahl *et al.* 2005, Yen *et al.* 2008, Bernal-Rey *et al.* 2020, Boccioni *et al.* 2021), invertebrados acuáticos (Day & Scott 1990, Edwards & Fisher 1991, Fulton & Key 2001, Hyne & Maher 2003, Lebrun *et al.* 2020, Gonçalves *et al.* 2021) y en menor grado invertebrados terrestres (Goven *et al.* 1993, Ribeiro *et al.* 1999, Scott-Fordsmann & Weeks 2000, Booth & O'Halloran 2001, Engenheiro *et al.* 2005).

Ensayos que emplean la actividad de AChE como biomarcador en arañas solo se han realizado en *Lycosa hiliaris* (Van Erp *et al.* 2002), *P. lugubris* (Babczyńska & Migula 2002), *Pardosa prativaga* (Pedersen *et al.* 2002) y *A. labyrinthica* (Babczyńska *et al.* 2006). Cuando *P. pythagoricus* se trató con CPF, no se observó inhibición de AChE a tiempos cortos (6 h). La ausencia de inhibición a las 6 h de exposición podría deberse a que la dosis incorporada de insecticida a ese tiempo no es suficiente para causar efectos observables sobre la actividad de AChE. A su vez, el transporte del insecticida en hemolinfa por parte de las lipoproteínas hemolinfáticas podría ser ineficaz a tiempos tempranos de exposición. En *P. pythagoricus* se ha propuesto que, si bien las lipoproteínas servirían como transportadoras del organofosforado fenitrotión, la interacción entre proteína e insecticida podría estar generando cambios estructurales que dificulten esta función transportadora (Cunningham *et al.* 2006). Eventualmente, a los tiempos más largos de exposición (24 y 48 h) se alcanzaría un equilibrio que permite al insecticida vehiculizarse hacia los tejidos.

A las 24 h se observó un 60% de inhibición, que se corresponde con lo reportado en un estudio sobre la exposición a dimetoato (insecticida organofosforado) de *A. labyrinthica* (Babczyńska *et al.* 2006). Esta inhibición irreversible es progresiva hasta las 48 h (alcanzado un 80%), similar a lo reportado por (Van Erp *et al.* 2002) para *L. hiliaris* (55% de inhibición). Es importante enfatizar que no se observó mortalidad en las condiciones de los ensayos de este capítulo, incluso con los altos porcentajes de inhibición a las 48 h. Esto contrasta con lo informado para *L. hiliaris*, donde con un 55%

de inhibición, se observó hasta un 30% de mortalidad (Van Erp *et al.* 2002), ocasionada por la acumulación de acetilcolina en las terminales nerviosas.

La peroxidación lipídica se considera una de las principales consecuencias del estrés oxidativo, conduciendo potencialmente a lisis celular y a un consecuente daño de tejidos y órganos (Kidd 1997, Rameshthangam & Ramasamy 2006). Los estudios toxicológicos en artrópodos en donde se realizan exposiciones agudas, normalmente analizan la peroxidación lipídica luego de las 24 y 48 h de tratamiento (Sarıkaya *et al.* 2011, Yuan *et al.* 2013, Alzahrani 2019). En estos, probablemente las ROS sean eliminadas durante ese periodo de exposición por el sistema antioxidante. En los experimentos presentados en esta sección con *P. pythagoricus*, los tratamientos con CPF a 6 y 24 h causaron altos niveles de peroxidación lipídica en el DI, posiblemente debido al gran porcentaje de AGs insaturados presentes en este órgano ( $\approx 75\%$ ) (Laino *et al.* 2009), los cuales son más susceptibles de peroxidación (Gahalain *et al.* 2011). Además, en línea con esta hipótesis, las enzimas antioxidantes mostraron baja actividad a estos tiempos de exposición más tempranos, y se registró su activación a las 48 h coincidiendo con un descenso de la peroxidación lipídica.

La primera línea de defensa contra las ROS se compone de SOD y CAT, enzimas que pueden actuar de manera complementaria, como se ha observado en la araña *X. nemoralis* (Lycosidae) (Wilczek *et al.* 2013) y en el insecto *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acrididae) (Wu *et al.* 2011), luego de la exposición a diferentes insecticidas organofosforados. En el caso de este estudio, no se observó una inducción simultánea de SOD y CAT debido a que CAT incrementó su actividad luego de las 6 h y SOD luego de las 24 h. Esta no inducción complementaria de las dos enzimas también fue observada en el insecto *Sogatella furcifera* (Delphacidae) luego de tratarse con ABM. Los autores de dicho trabajo reportaron que CAT fue inducida a su máxima actividad luego de 6 h de exposición, decreciendo luego de 48 h; mientras que SOD exhibió un porcentaje bajo de inducción a las 6 h, un máximo a las 12 h y finalmente un decrecimiento a las 48 h de tratamiento (Zhou *et al.* 2019).

El glutatión es un tripéptido que participa en las reacciones de detoxificación, frecuentemente encontrado en las células en su forma reducida (GSH). Esta molécula actúa como antioxidante, proveyendo equivalentes de reducción para las reacciones catalizadas por GPx, en la que GSH es oxidado a glutatión disulfuro (GSSG), el cual es reducido nuevamente a GSH por la enzima GR. A su vez, GSH actúa como sustrato para GST, la que cataliza su conjugación con compuestos orgánicos (Hermes-Lima *et al.* 2004, Tahir *et al.* 2016). La actividad de GPx y GR en *P. pythagoricus* fue en promedio más alta en individuos tratados con CPF luego de 24 h de exposición que en los tratados por 6 o 48 h, de manera similar al patrón de actividad de GPx en la araña *A. labyrinthica* tratada con un organofosforado por 24 h (Babczyńska *et al.* 2006). Por su parte, GST interviene en el metabolismo de xenobióticos, participando en su detoxificación. Las transferasas catalizan el ataque nucleofílico de un gran número de compuestos lipofílicos con GSH, lo que facilita la eliminación del conjugado resultante fuera del organismo (Hayes & Pulford 1995, Halliwell & Gutteridge 2015). Por ejemplo, aunque la inducción de GST se observó en larvas de *Trogoderma granarium* (Dermestidae) a intervalos cortos (5 h) luego de fumigación con bromuro de metilo, acrilonitrilo, dicloruro de etileno u otros agentes (Shivanandappa & Rajendran 1987), en las arañas *A. labyrinthica* y *P. lugubris* no se observó una inducción similar hasta 24 h de exposición a un organofosforado (Babczyńska *et al.* 2006). En nuestros experimentos con *P. pythagoricus*, el aumento en la actividad de GST luego de 24 h desde la aplicación del organofosforado fue ocasionado posiblemente por un aumento en la concentración del xenobiótico en el DI luego de su circulación, y el subsecuente descenso pasadas

48 h, probablemente sea atribuible a la propia actividad detoxificante de GST. Resultados similares luego de un tratamiento de 48 h fueron observados para actividad de GPx, GR y GST en juveniles de la araña lobo *P. saltans* luego de una exposición a concentraciones comparables a las del CPF (Laino et al. 2021).

La inhibición de AChE y el incremento en la peroxidación lipídica a 6 y 24 h de exposición permiten concluir que CPF es capaz de penetrar al organismo modelo. El insecticida produce un incremento en la actividad de SOD, CAT y GST a las 6 y 24 h de exposición, con un concomitante descenso de la peroxidación lipídica a las 48 h.

El daño histológico ha sido propuesto como biomarcador del efecto de plaguicidas (El-Saad et al. 2017, Arrighetti et al. 2018). Existen numerosos estudios en artrópodos que evalúan los cambios histológicos o citológicos provocados por insecticidas (Stentiford & Feist 2005, Kalita et al. 2016, Lavarías et al. 2017, dos Santos Junior et al. 2020, Plata-Rueda et al. 2020). Sin embargo, en arañas, esta clase de estudios son ciertamente escasos (Wilczek et al. 2014, El-Khouly et al. 2016, Gabellone et al. 2022). Wilczek y colaboradores (2014) estudiaron la interacción entre el organofosforado dimetoato (aplicado tópicamente por 5 días), y la exposición ambiental a metales pesados. Como resultado observaron que el insecticida aumenta por sí mismo varios indicadores de necrosis y apoptosis en el DI de la araña *X. nemoralis*. El-Khouly y colaboradores (2016) observaron luego de exposiciones de 48 h al insecticida organofosforado Reldan®, así como a los insecticidas Lannato® (Metomilo, carbamato) y Match® (lufenurón, benzoilurea) que se indujeron alteraciones tisulares en el DI de la araña *Anelosimus aulicus* (Theridiidae), incluyendo signos de necrosis en caso del Lannato®. Por otro lado, Gabellone y colaboradores (2022), observaron necrosis en DI de *M. maculisparsus* cuando se realizó un análisis histológico luego del tratamiento con el insecticida neonicotinoide imidacloprid por vía oral.

Estudios llevados a cabo en crustáceos también comprobaron alteraciones histológicas (necrosis y/o desorganización de núcleo celular, degeneración del tejido, vacuolización excesiva, entre otras) en el hepatopáncreas luego de exposición al CPF, como en los camarones *Penaeus monodon* y *Litopenaeus vannamei* (Nguyen Hong et al. 2015) y los cangrejos *Episesarma tetragonum* (Ravi et al. 2023) y *Zilchiopsis collastinensis* (Negro & Collins 2017). Formulados de CPF y cipermetrina (Nurocombi) también ocasionaron efectos histopatológicos similares en el cangrejo *Paratelphusa jacquemontii* (Maharajan et al. 2015). Existe registro de efectos comparables del CPF en otros invertebrados (Sharaf et al. 2013, Ahmed & El-Sobki 2021) y en vertebrados (Kammon et al. 2010, Verma et al. 2020).

Una de las consecuencias de la toxicidad de los organofosforados sobre las arañas parece ser el daño histopatológico, aunque aún es escasa la bibliografía al respecto. Se evidenció que *P. pythagoricus* tuvo daño tisular en DI a dosis de insecticida que son recomendadas para proteger cultivos, el cual debería interferir con la función de este órgano a largo o mediano plazo.

Las avermectinas se describieron inicialmente como fármacos antiparasitarios (Egerton et al. 1979, Miller et al. 1979), probándose poco después su potencial como insecticida (Ostlind et al. 1979), siendo la ABM la única con ambas funciones (Shoop et al. 1995). Se ha considerado a la ABM como segura para el ambiente debido a sus bajas tasas de aplicación, su corta vida media en distintas condiciones (alta sensibilidad a la fotodegradación) y su nula capacidad de bioacumulación (Lasota & Dybas 1991). En contraposición a esto, también existe evidencia de aumentos significativos de



mortalidad al ser expuestos a este insecticida en varias especies de enemigos naturales, como ácaros (Oliveira *et al.* 2020, Alhewairini & Al-Azzazy 2021), un himenóptero (Consoli *et al.* 1998) y un hemíptero (Cherif *et al.* 2022). En los ensayos desarrollados para este trabajo de tesis, no se registró mortalidad para *P. pythagoricus* a la dosis, vía y tiempo de exposición empleados. A su vez no se hallaron diferencias significativas entre control y tratado para las actividades enzimáticas ni concentración de MDA. Usualmente se recurre a la enzima AChE como biomarcador para organofosforados, pero ha sido propuesta también como posible biomarcador para ABM (Nassar 2016, El-Gendy *et al.* 2021). La ausencia de efectos sobre la actividad de AChE podría indicar que el insecticida no es absorbido por la vía cuticular (Balabanidou *et al.* 2018).

No se puede descartar que el insecticida haya traspasado la barrera epicuticular en una cantidad insuficiente como para provocar efectos detectables. Otra posibilidad es que el compuesto si haya sido absorbido, pero su metabolización no haya producido suficientes ROS como para desencadenar un aumento significativo en la actividad de CAT o en la concentración de MDA. Nuevos estudios son necesarios para poder continuar con este trabajo preliminar en este modelo insecticida-araña.

# 5. Composición lipídica en relación con la temperatura

## 5.1. Introducción

Como ya se comentó en la Introducción general (**sección 1.8**), la temperatura ambiental es una de las condiciones ecológicas más relevantes para la fisiología y distribución espacial de los organismos. Especialmente para el caso de los ectotermos, es necesario que cuenten con mecanismos para tolerar las fluctuaciones naturales de este parámetro medioambiental.

El rango de tolerancia térmica es delimitado por las temperaturas críticas máximas y mínimas (TC<sub>max</sub> y TC<sub>min</sub> respectivamente), por encima o por debajo de las cuales un organismo comienza a sufrir limitaciones locomotoras y/o incapacidad de responder a estímulos (Cowles & Bogert 1944, Hazell & Bale 2011, Cereja 2020, Barnes *et al.* 2023). En la literatura se pueden encontrar las TC<sub>max</sub> y TC<sub>min</sub> para numerosas especies de varias familias de arañas (**Tabla 5.1**). Se puede observar una TC<sub>min</sub> de -7,5 °C para el linídeo *Prinerigone vagans* y una TC<sub>max</sub> de 55,0 °C para el saltícido *Habronattus virgulatus*, con un intervalo promedio de temperaturas para todo el orden de 45,4 °C. Lo que implica un amplio rango de tolerancia para el grupo.

Sin embargo, no hay precedentes en cuanto a estudios bioquímicos que aborden los mecanismos detrás de esta destacable tolerancia ambiental.

Los lípidos poseen numerosas funciones en los organismos, incluyendo almacenamiento de energía, señalización y estructura, esta última como componentes vitales de las membranas biológicas (Harayama & Riezman 2018). Los aumentos o disminuciones en la temperatura ambiental ponen en riesgo el funcionamiento de las membranas, por lo que las células deben modificar la composición lipídica de estas para mantener su homeostasis (Hazel & Williams 1990, Guschina & Harwood 2006). El modelo de HVA predice cambios en las proporciones de ciertos grupos de lípidos (fosfolípidos, esteroides y AGs en particular) para mantener la fluidez de la membrana dentro de valores compatibles con sus funciones vitales.

En arácnidos, existe solo un precedente bibliográfico relacionado a aclimatación a temperaturas y composición lipídica, para dos especies de escorpiones de la familia Bothriuridae activas durante el invierno en un ambiente de altura (1900 m sobre el nivel del mar), *Urophonius achalensis* y *U. brachycentrus*. Garcia y colaboradores (2021) demostraron que la aclimatación prolongada (4 semanas) a temperaturas compatibles con la estación de verano en su hábitat, induce aumento en la proporción de AGs saturados (18:0 y 16:0), a la par de una disminución en insaturados (18:1 y 18:2), además de registrarse cambios en las clases de lípidos, principalmente TAG.

**Tabla 5.1.** Temperaturas críticas máximas (TCmax) y mínimas (TCmin) (°C) para distintas especies de arañas de varias familias. Tomado y modificado de Barnes y colaboradores (2023).

Familia	Especie	TCmin	TCmax	Rango	Fuente
Toxopidae	<i>Myro kerguelenensis</i>	-6,5	35,3	41,80	Jumbam y colaboradores (2008)
Linyphiidae	<i>Prinerigone vagans</i>	-7,5	35,6	43,10	Jumbam y colaboradores (2008)
Lycosidae	<i>Pardosa glacialis</i>	-5,7	46,6	52,30	Anthony y colaboradores (2019)
	<i>Pardosa moesta</i>	-4,5	44,7	49,20	Anthony y colaboradores (2019)
	<i>Rabidosa rabida</i>	0,0	42,9	42,90	Stork (2012)
Salticidae	<i>Habronattus clypeatus</i>	11,6	55,0	43,40	Brandt y colaboradores (2020)
	<i>Habronattus conjunctus</i>	12,1	52,5	40,40	Brandt y colaboradores (2020)
	<i>Habronattus geronimoi</i>	6,0	54,0	48,00	Brandt y colaboradores (2020)
	<i>Habronattus hallani</i>	9,5	53,1	43,60	Brandt y colaboradores (2020)
	<i>Habronattus pugillis</i>	9,3	53,1	43,80	Brandt y colaboradores (2020)
	<i>Habronattus virgulatus</i>	9,2	54,4	45,20	Brandt y colaboradores (2020)
Sicariidae	<i>Loxosceles laeta</i>	-4,1	48,4	52,50	Alfaro y colaboradores (2013)
	<i>Sicarius thomisoides</i>	6,6	44,2	37,60	Taucare-Rios y colaboradores (2018)
Scytodidae	<i>Scytodes globula</i>	-3,6	45,0	48,60	Alfaro y colaboradores (2013)
Theraphosidae	<i>Aphonopelma hentzi</i>	5,7	42,6	36,90	Punzo (1991)
	<i>Grammostola vachoni</i>	5,3	46,1	41,40	Schwerdt y colaboradores (2020)
Theridiidae	<i>Latrodectus geometricus</i>	3,2	51,5	48,30	Barnes y colaboradores (2023)
	<i>Latrodectus hesperus</i>	-1,9	49,6	51,50	Barnes y colaboradores (2023)
	<i>Latrodectus mactans</i>	1,9	52,4	50,50	Barnes y colaboradores (2023)
Thomisidae	<i>Misumenops asperatus</i>	-1,4	45,1	46,50	Schmalhofer (1999)
	<i>Misumenoides formosipes</i>	2,2	48,2	46,00	Schmalhofer (1999)
Eresidae	<i>Stegodyphus dumicola</i>	-	48,9	-	Malmos y colaboradores (2021)

Para avanzar sobre esta área del conocimiento aún no explorada para las arañas, se aclimataron adultos y juveniles de *P. pythagoricus* a 1, 4, 10, 25 y 35 °C durante 20 días. Al término de la aclimatación se realizó la cuantificación de grupos lipídicos y AGs. Las hipótesis de trabajo fueron:

- La aclimatación a distintas temperaturas induce un cambio en la proporción de grupos lipídicos relacionados al mantenimiento de la HVA.
- La aclimatación a distintas temperaturas produce, según la hipótesis de HVA, que los AGs insaturados aumenten de manera directamente proporcional al incremento de la temperatura de aclimatación.

## 5.2. Resultados

### 5.2.1. Efecto de la aclimatación en la composición lipídica

Adultos y juveniles de *P. pythagoricus* se aclimataron durante 20 días a 1, 4, 10, 25 y 35 °C.

Se elaboraron modelos lineales con la composición lipídica bajo el paradigma de Aitchison (1986), donde las relaciones entre las proporciones de lípidos son los componentes de la variable respuesta (formando un “simplex de Aitchison” (van den Boogaart & Tolosana-Delgado 2013)) para adultos y juveniles. La tabla ANOVA para dichos modelos se representa en las **Tablas 5.2 A y B**. En ambos casos las pendientes para el efecto de la temperatura y del tipo de tejido resultaron significativas. Esto implica una contundente influencia de la temperatura de aclimatación en la composición lipídica, y se condice con las esperadas diferencias entre tejidos. Además, para los adultos, se vio una interacción significativa entre temperatura y tejido, indicando que la variación provocada por el cambio de temperatura sobre la composición lipídica no es constante y depende del tejido considerado. En cambio, en juveniles no se halló interacción significativa entre temperatura y tejido, por lo que la variación en la composición debida a la temperatura no se ve modulada por el tejido.

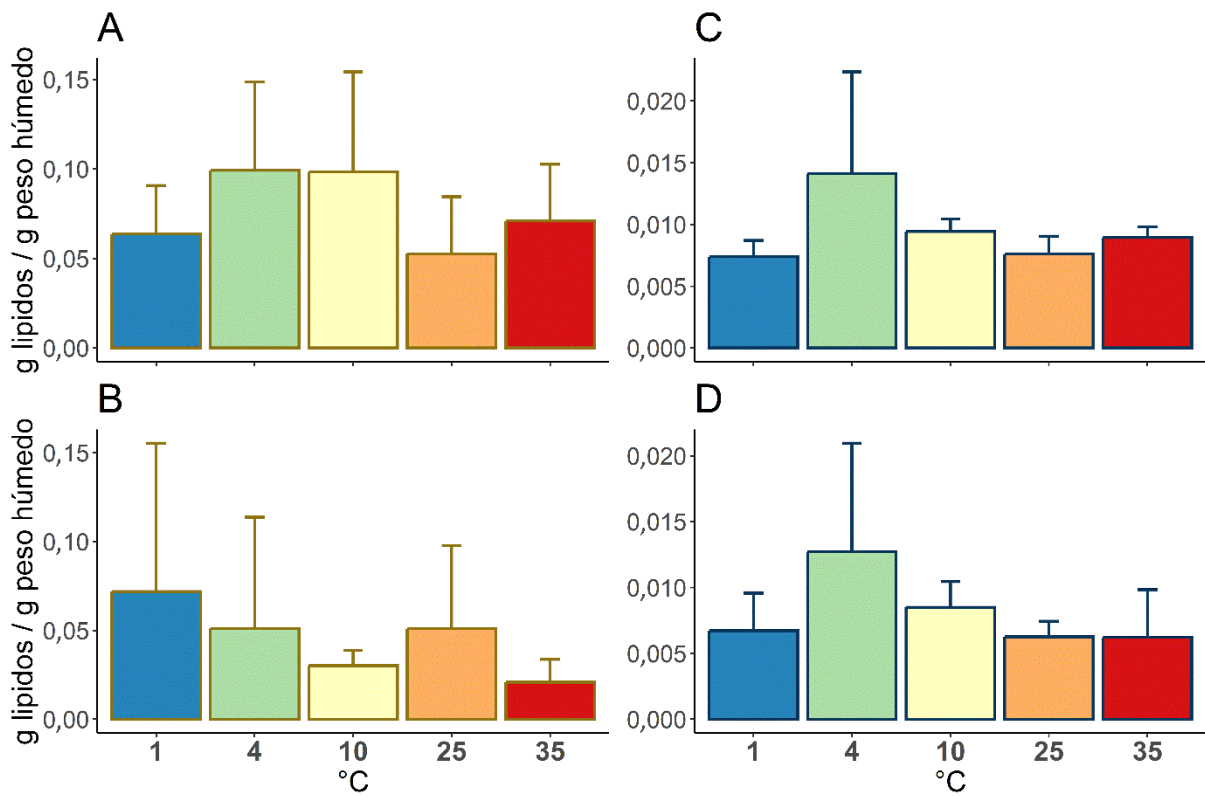
**Tabla 5.2** Tablas ANOVA para los modelos lineales múltiples de composición lipídica. **A.** Adultos. **B.** Juveniles. Referencias: F: valor de estadístico. GL: grados de libertad de variable predictora. GL<sub>num</sub>: grados de libertad del modelo. GL<sub>den</sub> grados de libertad del error. p-valor:  $\alpha=0,05$

<b>A.</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>GL</b>	<b>F</b>	<b>GL<sub>num</sub></b>	<b>GL<sub>den</sub></b>	<b>p-valor</b>
	(Ordenada)	1	136,42	8	38	1,44e-25
	Temperatura	4	2,72	32	164	1,96e-05
	Tejido	1	33,96	8	38	5,18e-15
	Temp.: Tej.	4	2,32	32	164	3,26e-04
	Residuos	45				

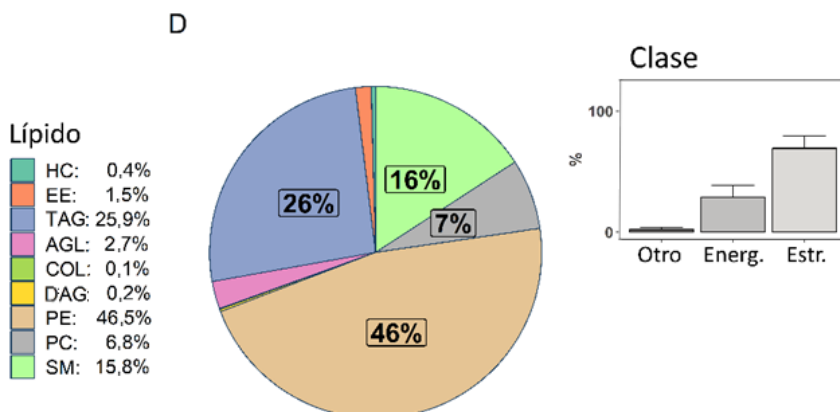
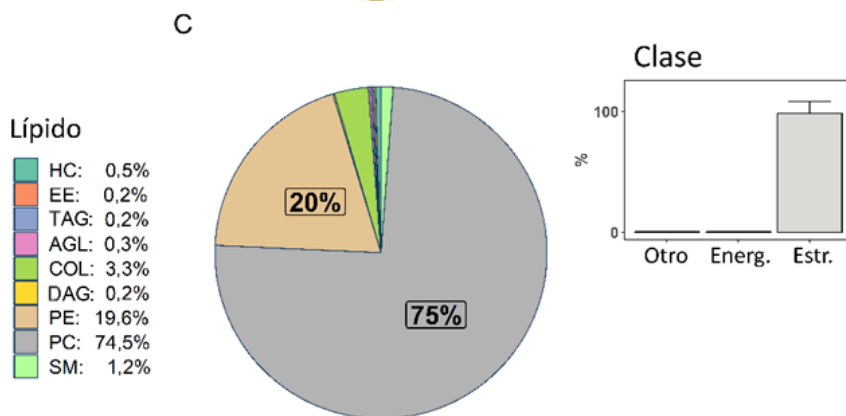
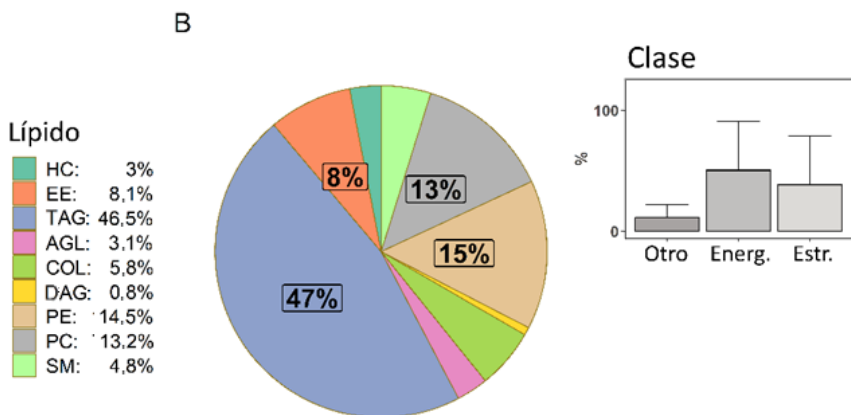
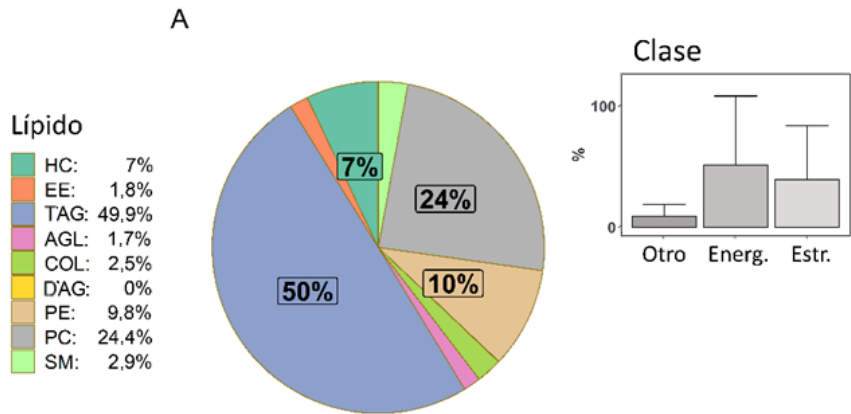
  

<b>B.</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>GL</b>	<b>F</b>	<b>GL<sub>1</sub></b>	<b>GL<sub>2</sub></b>	<b>p-valor</b>
	(Ordenada)	1	96,22	8	48	6,87e-27
	Temperatura	4	2,58	32	204	3,39e-05
	Tejido	1	11,68	8	48	4,90e-09
	Residuos	55				

El contenido lipídico total estandarizado por peso húmedo se presenta en la **Figura 5.1.** para los tejidos analizados (DI y TM) de adultos y juveniles. No se hallaron diferencias significativas entre temperaturas de aclimatación para ninguno de los tejidos de ambos modelos biológicos.



**Figura 5.1.** Contenido lipídico total por peso húmedo para cada temperatura de aclimatación. **A.** Divertículo intestinal (DI) de adultos **B.** DI de juveniles **C.** Tejido muscular (TM) de adultos. **D.** TM de juveniles. Se emplearon 5 individuos por temperatura (N=25 adultos y N= 25 juveniles).



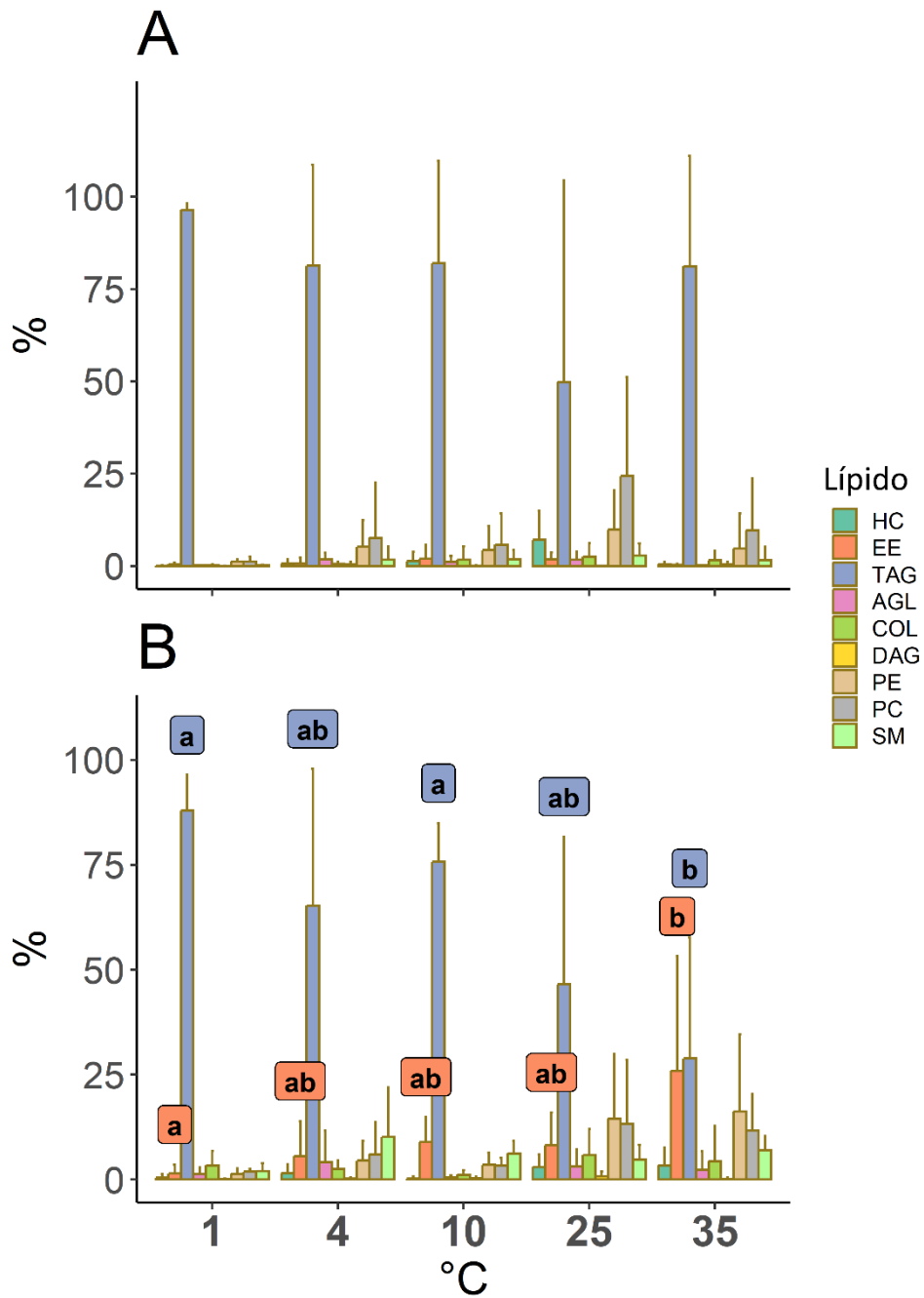
**Figura 5.2.** Proporciones lipídicas promedio correspondientes a individuos aclimatados a 25 °C (control). **A.** DI de adultos **B.** DI de juveniles **C.** TM de adultos. **D.** TM de juveniles. Se emplearon 5 individuos por temperatura (N=25 adultos y N= 25 juveniles).

Abreviaturas de lípidos: HC, hidrocarburos. EE, ésteres de colesterol. TAG, triacilglicerol. AGL, ácidos grasos libres. COL, colesterol. DAG, diacilglicerol. PE, fosfatidiletanolamina. PC, fosfatidiletanolcolina. SM, esfingomielina.

*Inset* de cada sub figura representa la sumatoria de lípidos: Energéticos: TAG+AGL+DAG, Estructurales: PE+PC+SM+COL y otros: HC+EE. Las barra de error representan el desvío estándar.

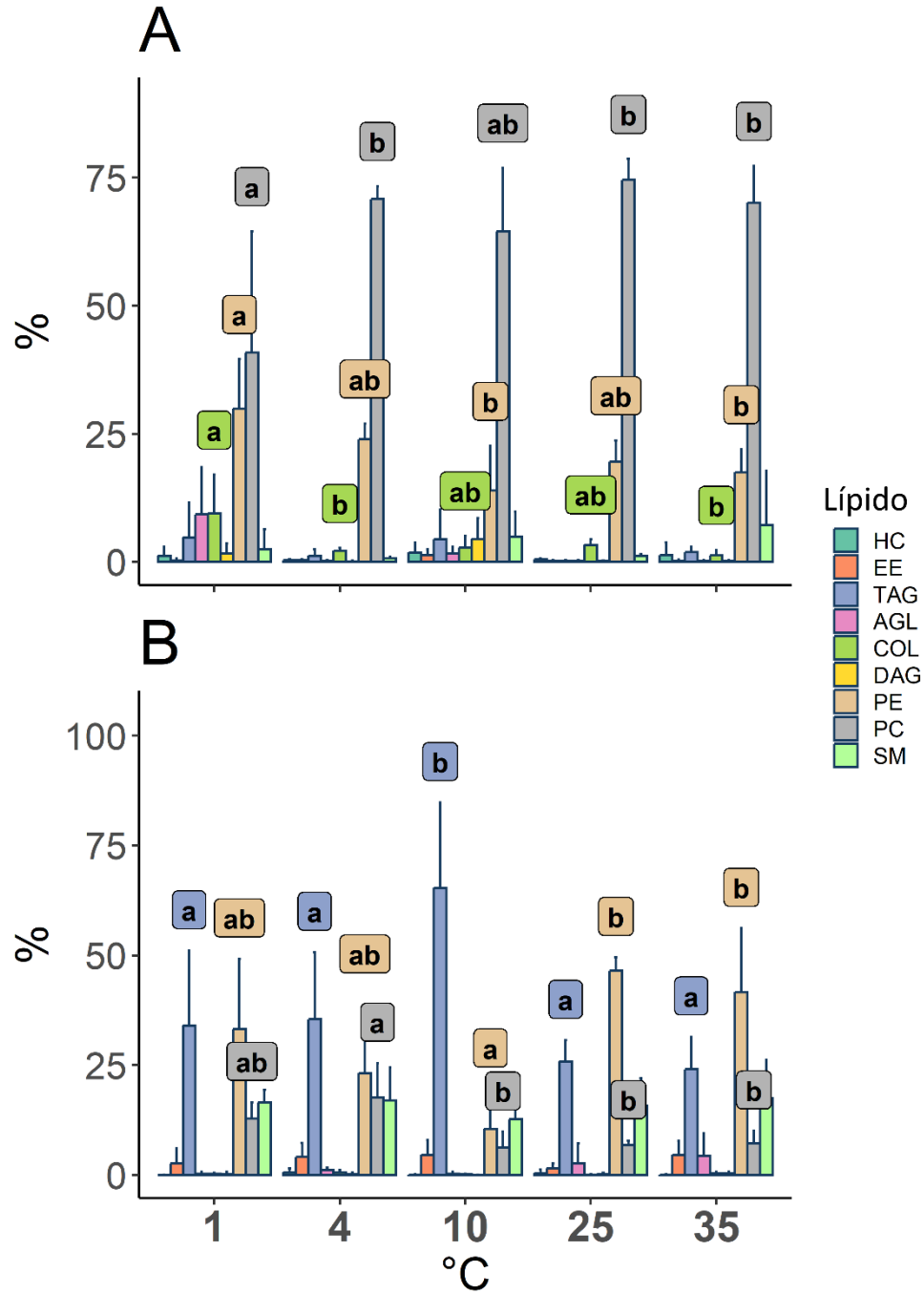
Tomando la temperatura de aclimatación de 25 °C como referencia, se representa en la **Figura 5.2.** el perfil lipídico del DI para adultos (**A**) y juveniles (**B**), y para TM adultos (**C**) y juveniles (**D**). Las 9 clases de lípidos identificados se clasificaron funcionalmente en: lípidos energéticos (TAG, AGL, DAG), estructurales (COL, PC, PE, SM) y otros (HC, EE) (representado en los *insets* de **Figura 5.2.**). En el caso de DI los lípidos dominantes fueron los TAG (~50% en ambos modelos). Las siguientes clases más representadas fueron los fosfolípidos, viéndose en adultos una mayor cantidad de PC (24%) sobre PE (10%) y lo contrario en juveniles donde se vio más PE (15%) que PC (13%). La relación entre esteroides (%COL / %EE) para el DI fue de 1,38 en adultos, y 0,7 para juveniles. En el TM, los perfiles lipídicos se diferenciaron sustancialmente entre adultos y juveniles. En los adultos, PC fue el lípido mayoritario (75%), PE fue el segundo más representado (20%) y el resto de las clases lipídicas sumaron un 5,9% restante. En juveniles, en cambio, se observó un aporte mayoritario de PE (46%) y como segundo lípido más representado el lípido energético TAG (26%), la SM fue el tercero en abundancia (16%). Al igual que en el DI, en el TM el contenido de esteroides fue principalmente COL en adultos y EE en juveniles, con una relación de esteroides del 16,5 para adultos y de 0,06 para juveniles.

Las composiciones lipídicas obtenidas mediante TLC-FID para cada temperatura de aclimatación se detallan en las **Figura 5.3.I.** para las medidas sobre DI y **Figura 5.3.II.** para las realizadas sobre TM (**A.** adultos, **B.** juveniles en ambas figuras). Los TAG fueron dominantes en el DI de adultos (entre el 96 y 81 %) independientemente de la temperatura de aclimatación, en cambio en el DI de juveniles, además de TAG (29 - 88%) se halló un porcentaje más alto de EE, alcanzando el 29% a los 35 °C. En cuanto a TM en adultos, los lípidos mayoritarios fueron PC (75 - 41%) y PE (30 - 14%), contrastando con juveniles, donde los lípidos mayoritarios fueron TAG (65 - 24%) y PE (46 - 11%).



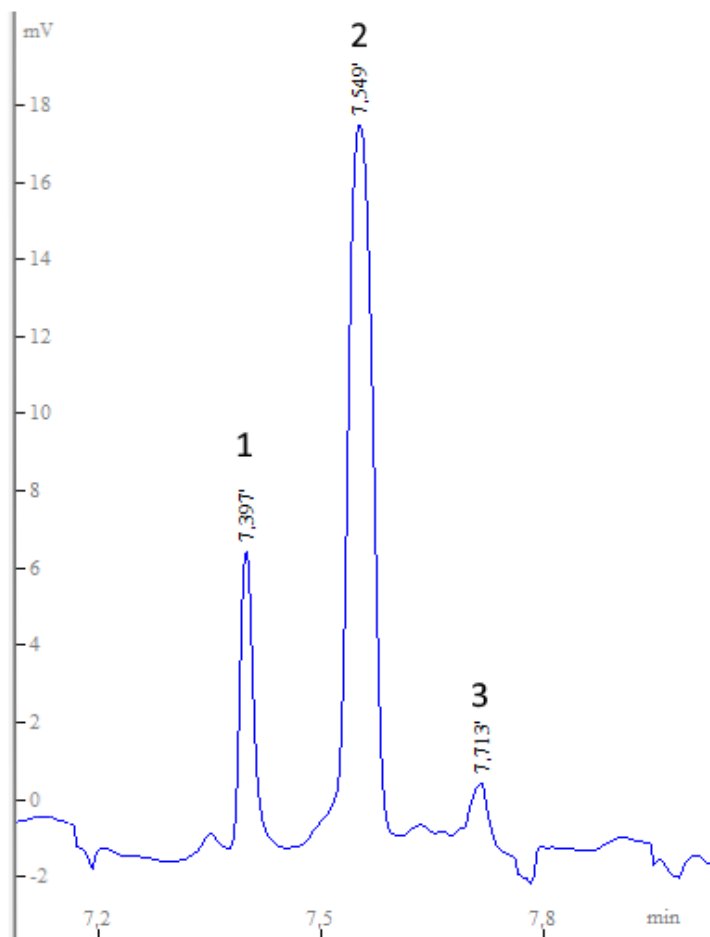
**Figura 5.3.I.** Composición lipídica del DI de *P. pythagoricus* a diferentes temperaturas de aclimatación. **A.** Adultos. **B.** Juveniles. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas entre grupos (color de la etiqueta se corresponde con color de grupo lipídico). Se emplearon 5 individuos por temperatura (N=25 adultos y N= 25 juveniles).





**Figura 5.3.II.** Composición lipídica porcentual del TM *P. pythagoricus* a diferentes temperaturas de aclimatación. **A.** Adultos. **B.** Juveniles. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas entre grupos (color de la etiqueta se corresponde con color de grupo lipídico). Se emplearon 5 individuos por temperatura (N=25 adultos y N= 25 juveniles).

Cromatogramas representativos obtenidos mediante TLC-FID (**sección 2.10**) se muestran en **Figura 5.4.** para lípidos polares y **Figura 5.5.** para neutros.

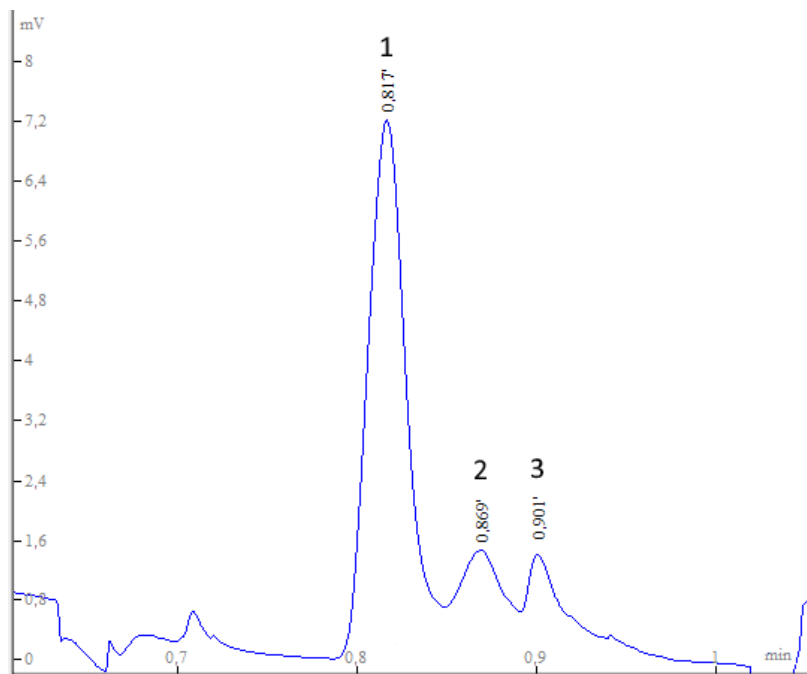


**Figura 5.4.** Cromatograma representativo (señal de mV en función del tiempo (min)) correspondiente al análisis cromatográfico usando un sistema de solventes para la resolución de lípidos polares (**sección 2.10**). Picos corresponden a: **1.** PC, **2.** PE y **3.** SM.

Por un lado, en el DI solo se hallaron diferencias significativas entre las temperaturas en juveniles: EE ( $p = 0,0176$ ) aumentó de 1,47% para el grupo de 1 °C, a 25,93% para el de 35 °C; y TAG ( $p = 0,0120$ ) disminuyó a un porcentaje del 28,90% a 35 °C con respecto a los 87,91% y 75,7% observados a 1 y 10 °C respectivamente.

Por otro lado, en el TM, se hallaron diferencias solo en el COL y para adultos ( $p = 0,0051$ ) observándose mayor proporción a 1 °C (9,5%) que a 4 (2,2%) y 35 °C (1,3%). Para los TAG se hallaron en juveniles ( $p = 0,001$ ) diferencias entre 10 °C (4,8%) y el resto de las temperaturas (por debajo del 2%). Para PE, en adultos se constataron diferencias ( $p = 0,006$ ) entre 1 °C (29,9%), 10 (14,0%) y 35 °C (17,5%). En juveniles, la proporción de PE ( $p = 0,001$ ) se mostró significativamente más baja a 10 °C (10,5%) que a 25 (35,4%) y 35 °C (41,6%). El último lípido para el que se encontraron diferencias

significativas fue PC, en adultos ( $p = 0,0376$ ) fue más bajo a 1 °C (40,8%) que a 4 (70,8%), 25 (74,5%) y 35 °C (70,1%); y en juveniles la proporción fue mayor a 4 °C (17,5%) que a 25 (5,6%) y 35 °C (7,2%).



**Figura 5.5.** Cromatograma representativo correspondiente a sistema de solventes para resolución de lípidos neutros. Picos corresponden a: **1.** TAG, **2.** AGL y **3.** COL.

## 5.2.2. Efecto de la aclimatación en composición de ácidos grasos

Se analizaron las composiciones relativas de AGs a partir de los extractos lipídicos de adultos y juveniles de *P. pythagoricus* aclimatados durante 20 días a 1, 4, 25 y 35 °C.

Los resultados para los modelos lineales para la composición de AGs bajo paradigma de Aitchison (1986) se muestran en **Tablas 5.3** para adultos (**A**) y juveniles (**B**). Del mismo modo que para las proporciones lipídicas, para ambos modelos, las pendientes de las variables explicativas correspondientes a “tejido” y “temperatura” son significativas, lo que implica ambos predictores influyen en la composición de AGs. Los resultados de las comparaciones estadísticas para cada AG se detallan en las **Tablas 5.4-A y B**.

**Tabla 5.3** Tablas ANOVA para los modelos lineales múltiples de composición de ácidos grasos. **A.** Adultos. **B.** Juveniles. Referencias: F: valor de estadístico. GL: grados de libertad de coeficiente. GL<sub>num</sub>: grados de libertad del modelo. GL<sub>den</sub>: grados de libertad del error. p-valor:  $\alpha = 0,05$ .

<b>A.</b>	<b>Coeficiente</b>	<b>GL</b>	<b>F</b>	<b>GL<sub>num</sub></b>	<b>GL<sub>den</sub></b>	<b>p-valor</b>
	(Ordenada)	1	1216,86	10	20	1,41e-25
	Temperatura	1	22,82	10	20	8,54e-09
	Tejido	3	2,02	30	66	8,96e-03
	Residuos	29				

<b>B.</b>	<b>Coeficiente</b>	<b>GL</b>	<b>F</b>	<b>GL<sub>1</sub></b>	<b>GL<sub>2</sub></b>	<b>p-valor</b>
	(Ordenada)	1	511,46	10	21	9,65e-23
	Temperatura	1	23,51	10	21	3,38e-09
	Tejido	3	3,12	30	69	5,02e-05
	Residuos	30				

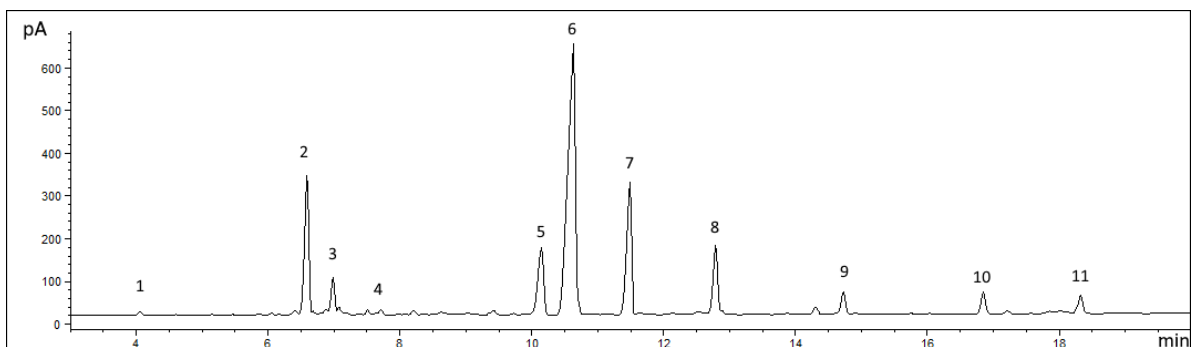
**Tabla 5.4-A.** Resultados para AGs por temperatura de aclimatación en DI de *P. pythagoricus*. En los casos correspondientes, las letras indican los grupos estadísticamente significativos para las comparaciones entre temperaturas. Se emplearon 5 individuos por temperatura (N=20 adultos y N=20 juveniles).

Divertículo Intestinal		Adultos				Juveniles			
Ácido graso	T° (°C)	Media (%)	Desv. Est	p-valor	SIG.	Media (%)	Desv. Est	p-valor	SIG.
<b>C14:0</b>	1	1%	1%	0,897		1%	0%	0,082	
	4	1%	0%						
	25	1%	1%						
	35	1%	0%						
<b>C16:0</b>	1	17%	2%	0,206		14%	1%	0,723	
	4	17%	3%						
	25	14%	5%						
	35	15%	6%						
<b>C16:1</b>	1	3%	2%	0,356		3%	1%	0,010	a
	4	5%	3%						
	25	4%	1%						
	35	6%	1%						
<b>C17:0</b>	1	0%	0%	0,307		0%	0%	0,027	a
	4	0%	0%						
	25	1%	1%						
	35	0%	3%						
<b>C18:0</b>	1	4%	1%	0,180		7%	1%	0,002	a
	4	9%	4%						
	25	11%	4%						
	35	7%	7%						
<b>C18:1</b>	1	47%	3%	0,388		41%	6%	0,025	ab
	4	50%	7%						
	25	44%	6%						
	35	53%	12%						
<b>C18:2n6</b>	1	21%	7%	0,329		32%	9%	0,034	a
	4	13%	10%						
	25	18%	7%						
	35	13%	21%						
<b>C18:3n3</b>	1	5%	1%	0,525		1%	2%	0,237	
	4	4%	2%						
	25	3%	3%						
	35	3%	1%						
<b>C20:0</b>	1	0%	0%	0,036	a	0%	0%	0,011	a
	4	1%	0%		ab				
	25	1%	1%		b				
	35	1%	1%		ab				
<b>C20:4n6</b>	1	1%	1%	0,238		1%	1%	0,627	
	4	1%	1%						
	25	3%	1%						
	35	1%	2%						

**Tabla 5.4-B.** Resultados para AG por temperatura de aclimatación en TM *P. pythagoricus*. En los casos correspondientes, las letras indican los grupos estadísticamente significativos para las comparaciones entre temperaturas. Se emplearon 5 individuos por temperatura (N=20 adultos y N= 20 juveniles).

Tejido Muscular		Adultos				Juveniles			
Ácido graso	T° (°C)	Media (%)	Desv. Est	p-valor	SIG.	Media (%)	Desv. Est	p-valor	SIG.
<b>C14:0</b>	1	0%	0%	0,091		1%	1%	0,044	
	4	0%	0%						
	25	0%	0%						
	35	0%	0%						
<b>C16:0</b>	1	11%	4%	0,045		21%	7%	0,315	
	4	10%	0%						
	25	8%	2%						
	35	8%	1%						
<b>C16:1</b>	1	1%	0%	0,144		2%	0%	0,001	ab
	4	1%	0%			a			
	25	1%	0%			b			
	35	1%	0%			b			
<b>C17:0</b>	1	1%	0%	0,299		3%	4%	0,010	
	4	1%	0%						
	25	1%	0%						
	35	1%	0%						
<b>C18:0</b>	1	12%	9%	0,898		29%	9%	0,092	
	4	9%	2%						
	25	9%	1%						
	35	9%	3%						
<b>C18:1</b>	1	32%	7%	0,054		30%	4%	0,315	
	4	26%	3%						
	25	24%	1%						
	35	27%	1%						
<b>C18:2n6</b>	1	31%	11%	0,354		12%	12%	0,575	
	4	38%	3%						
	25	37%	3%						
	35	36%	5%						
<b>C18:3n3</b>	1	3%	3%	0,084		1%	1%	0,785	
	4	6%	1%						
	25	3%	2%						
	35	3%	1%						
<b>C20:0</b>	1	0%	0%	0,129		1%	0%	0,171	
	4	1%	0%						
	25	1%	0%						
	35	0%	0%						
<b>C20:4n6</b>	1	8%	7%	0,017	a	1%	2%	0,438	
	4	10%	1%		a				
	25	16%	3%		b				
	35	14%	3%		ab				

En la **Figura 5.6.** se muestra un cromatograma representativo de GC-FID.

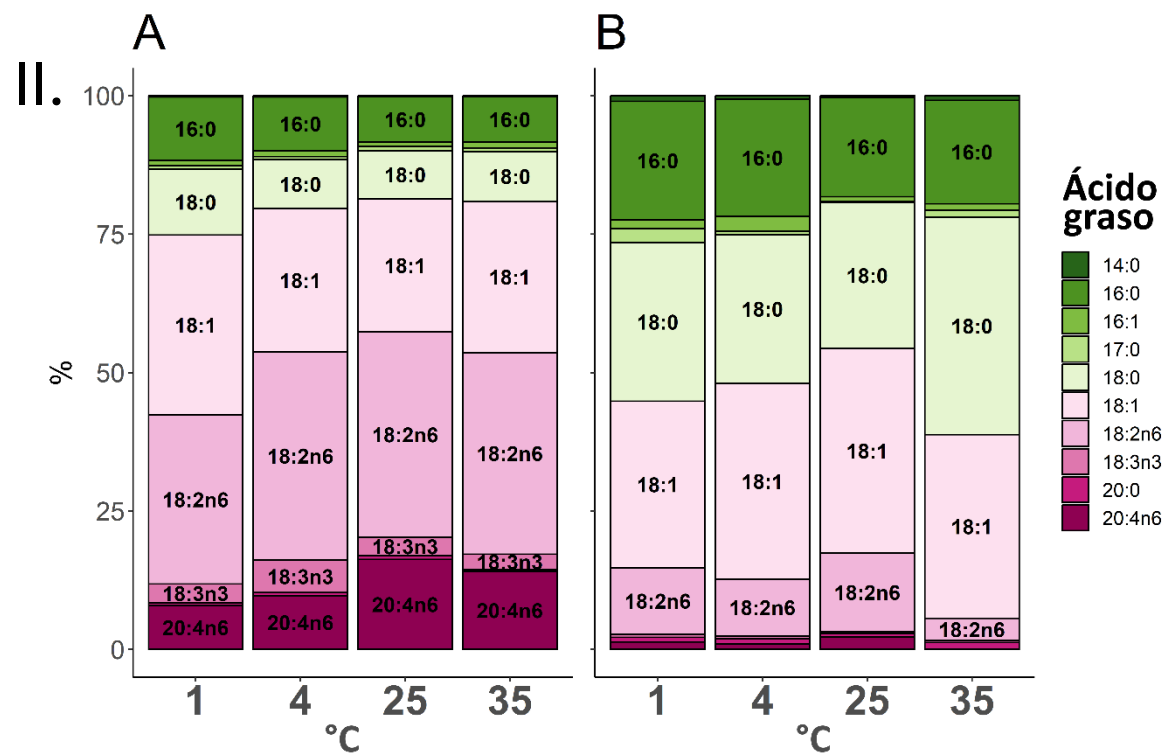
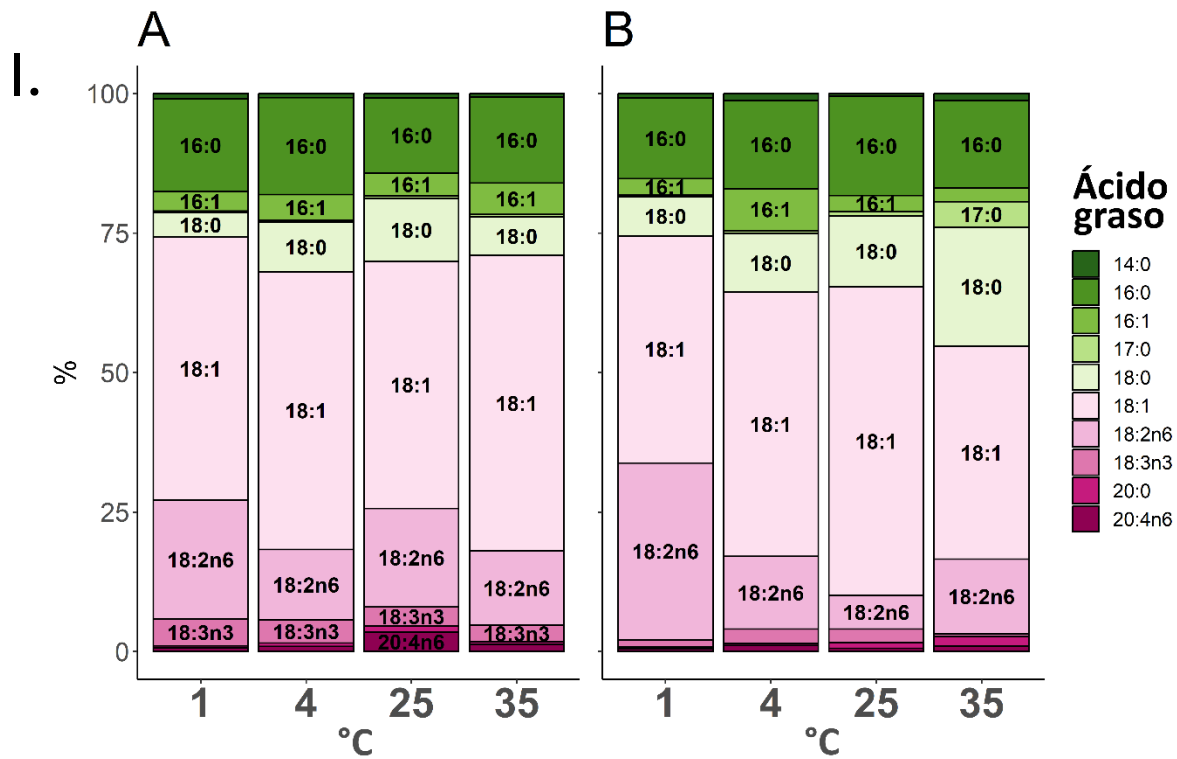


**Figura 5.6.** Cromatograma GC-FID representativo para AGs de *P. pythagoricus* derivatizados a ésteres metílicos. Referencias picos numerados AG: **1.** 14:0, **2.** 16:0, **3.** 16:1n7, **4.** 17:0, **5.** 18:0, **6.** 18:1 n9cyt, **7.** 18:2n6t, **8.** 18:3n3, **9.** 20:0, **10.** 20:4n6, **11.** 20:5n3.

En la **Figura 5.7.I.** se detallan los porcentajes promedio de AGs del DI, y en la **Figura 5.7-II.** de TM, para adultos (**A**) y juveniles (**B**).

En general se observó en DI que los AGs insaturados disminuyen a mayores temperaturas. Para los juveniles, ese fue el caso del 16:1 cuando se compara a 4 °C con 25 °C y 35 °C, del 18:1 entre 25 °C y 35 °C y el 18:2 entre 1 °C y 25 °C. Contrariamente se observa un concomitante aumento en AGs saturados 17:0 y 20:0 entre 1 y 4 °C comparado con 35 °C. En el DI de adultos se observó un cambio significativo en el 20:0 cuando se compara 1 °C con 25 °C.

Para el caso de TM los cambios con la temperatura son menores, con una disminución en juveniles del 16:1 entre 4 °C comparando con 25 y 35 °C, y un aumento del 20:4 a 1 y 4 °C comparado con 25 °C.



**Figura 5.7.** Composición de ácidos grasos en relación a la temperatura de aclimatación, en **I.** DI (arriba) y **II.** TM (Abajo); para **A.** adultos y **B.** Juveniles. Se emplearon 5 individuos por temperatura (N=20 adultos y N= 20 juveniles).



### 5.3. Discusión

Luego de la aclimatación, el contenido lipídico total de ambos modelos de *P. pythagoricus* no se vio afectado. Existen observaciones similares para los insectos *Gromphadorhina coquereliana* (Chowanski *et al.* 2015) y *Cymbalophora púdica* (Kostal & Simek 1998), y en vertebrados para *Oncorhynchus mykiss* (Ingemansson *et al.* 1993).

Los perfiles lipídicos obtenidos para el TM de adultos se asemejaron a los descriptos para este modelo en trabajos previos (Romero *et al.* 2018). Sin embargo, para los juveniles, se registró una inesperada abundancia de TAG a todas las temperaturas de aclimatación (**Figura 5.3.II.**). Las etapas inmaduras pueden ser más activas (Downer & Matthews 1976) algo registrado para *P. pythagoricus* por Romero *et al.* (2022), sobre todo en la etapa de dispersión. Estas reservas de TAG en juveniles podrían estar cumpliendo la función de suplir esa demanda energética propia de los estadios inmaduros. Los animales con estilos de vida activos y la asidua locomoción que se da en los períodos de dispersión, suele conllevar un incremento en la producción de energía a través de modificaciones en los tejidos, fenómeno descrito también para insectos, peces, anfibios y mamíferos (Swallow *et al.* 1998, Hayes & O'Connor 1999, Harrison & Roberts 2000, Gomes *et al.* 2004, Pang *et al.* 2020, Treidel *et al.* 2022).

La mayor parte de las arañas son predatoras “sit and wait” (Schmitz *et al.* 2017). Este método de caza implica sorprender a la presa con movimientos rápidos y en un breve lapso de tiempo. La demanda energética de esta estrategia es suplida principalmente por las reservas musculares de glucógeno y fosfágenos (Prestwich 1988, Paul 1990, Eschrich & Paul 1991). En el caso de *P. pythagoricus*, una importante fuente de ATP es la arginina fosfato (análoga a la creatina fosfato de vertebrados (Brown *et al.* 2004)) sintetizada por la enzima arginino kinasa (AK) descrita anteriormente por Laino y colaboradores (2017). Esta enzima que se encuentra principalmente en el TM es un importante componente del metabolismo anaeróbico permitiendo la disponibilidad de ATP en momentos de actividad intensa. Sin embargo, durante el período de recuperación, la energía necesaria para reponer las reservas musculares se obtiene principalmente de la oxidación de lípidos (Paul 1990) colocando a estas moléculas en un importante foco de estudio.

Es reconocido que varios invertebrados han perdido la capacidad de sintetizar esteroides (Hobson 1935, Clayton 1964, Carvalho *et al.* 2010) entre ellos, los artrópodos (Zandee 1966). A las arañas, al igual que los insectos, se las considera *auxótrofas* para los esteroides, porque al no poder sintetizar este grupo de moléculas, deben adquirirlas de la dieta y asegurar su homeostasis. Respecto a las diferencias en la composición de esteroides, Rasheed y colaboradores (2020) observaron en embriones de insectos que más de la mitad se encuentran almacenados como EE y que a medida que el organismo crece, disminuye la cantidad de EE y aumenta la cantidad de COL formando parte de las membranas (Jing & Behmer 2020). Esto es similar a lo que observamos en los organismos juveniles de *P. pythagoricus* donde la mayor parte de los esteroides se encuentran esterificados.

Se constató un efecto de la temperatura de aclimatación sobre la composición lipídica de *P. pythagoricus*, dependiente del modelo (adultos/juvenil) y el tejido considerado. Los juveniles presentaron una disminución de la proporción de TAG en DI inversamente proporcional a la temperatura de aclimatación. Garcia y colaboradores (2021) también observaron un efecto similar de la aclimatación en hembras y juveniles de dos especies de escorpiones del género *Urophonius*, sin

embargo, en ese caso los autores suponen que los TAG fueron empleados para biosíntesis de lípidos estructurales. La temperatura puede afectar el comportamiento de los ectotermos (Sevacherian & Lowrie 1972, DeVito & Formanowicz 2003), y el hábito activo de los juveniles de *P. pythagoricus*, el cual podría acrecentarse a temperaturas altas (Gillooly *et al.* 2001, Panchuk *et al.* 2023). Esto, en combinación con un elevado gasto metabólico invertido en el propio desarrollo post-embionario (Lee & Roh 2010) explicaría el consumo de TAG dependiente de la temperatura (teniendo en cuenta además que los animales no fueron alimentados durante los días que duró la aclimatación, **sección 2.12.3**). En Romero y colaboradores (2022), se observó un descenso en la concentración de TAG al comparar estadios inmaduros previos a la dispersión y juveniles móviles, evidenciando un consumo probablemente relacionado a la locomoción. Un fenómeno similar también se ha registrado en otras arañas como *P. saltans*. Los juveniles de esta especie aumentan el consumo de TAG al comienzo de su etapa de dispersión, disminuyendo el contenido de este lípido (Laino *et al.* 2020).

El aumento de EE en relación con la temperatura observado en DI de juveniles es difícil de explicar por la falta de información reportada en relación con el tema en arañas. Es claro que el estrés por temperatura altera el equilibrio entre el almacenamiento, el transporte y la utilización del COL. En este modelo, es probable que se altere la acción de enzimas vinculadas a su metabolismo, como podría ser la esterol O-aciltransferasa (“ACAT”) descrita para insectos (Macauley *et al.* 1986, Jing & Behmer 2020). Por otro lado, hasta la actualidad no existen registro de como circulan los EE en arañas, pero sí se ha caracterizado una destacable función de las VHDL de *P. pythagoricus* en la captación del COL libre (Cunningham *et al.* 1999).

Si bien numerosos trabajos en vertebrados, y otros invertebrados, correlacionan un aumento en la cantidad de COL con la aclimatación al calor debido a su efecto estabilizante en membranas fluidas (Hazel & Williams 1990, Crockett 1998, Gracia *et al.* 2010, Najafinobar *et al.* 2016), existen muy pocos trabajos que estudien la función del COL en membranas aclimatadas al frío. La plasticidad térmica de los organismos permite variar la composición lipídica de las membranas para poder regular la interacción de sus componentes, lo cual adquiere más importancia en los ectotermos (Logue *et al.* 2000, Snyder & Hennessey 2003, Košťál *et al.* 2013) como lo son las arañas. A bajas temperaturas el COL aumenta la fluidez en la fase gel (Cheng *et al.* 2022) y permite que la membrana no se rompa y pierda sus numerosas funciones (Miao *et al.* 2002, Waheed *et al.* 2012). El aumento observado de la cantidad de COL en células aclimatadas a bajas temperaturas también fue observado en células de una línea celular de ovario de hámster chino (células “CHO”) (Purdy *et al.* 2005).

Como se mencionó anteriormente, las arañas son animales COL dieta-dependiente, con lo cual la HVA probablemente no pueda depender en gran medida del COL, sino además de otros lípidos. En varios artrópodos se observó que existe una variación en la proporción de determinados fosfolípidos para mantener la fluidez de sus membranas, como es el caso de la PE (Seu *et al.* 2006, Dawaliby *et al.* 2016, de Mendoza & Pilon 2019, Trenti *et al.* 2022). Si bien en el TM de juveniles de *P. pythagoricus* se observó un cambio similar con un aumento significativo de PE y una concomitante disminución de PC, no es posible afirmar con seguridad que esté operando un efecto semejante, porque en adultos la temperatura generó un cambio contrario. Nuevos experimentos son necesarios para poder estudiar la naturaleza de esas variaciones.

Los juveniles de *P. pythagoricus* poseen mayores reservas de TAG en TM, y muestran mayor proporción de EE, posiblemente debido a los hábitos más activos y requerimientos del desarrollo en

comparación a estadios adultos. La aclimatación prolongada influye en la proporción lipídica del DI de juveniles induciendo un consumo de TAG con fines energéticos. El COL podría estar teniendo un rol fluidificante en las membranas del TM de juveniles.

Los datos actuales sugieren que efectivamente ocurre la desaturación de los AGs en las arañas aclimatadas al frío, dando como resultado un aumento de los 18:1 y 18:2n-6. Es claro que una de las principales estrategias empleadas por los organismos para adaptarse al frío es el incremento de las insaturaciones de los AGs (van Dooremalen & Ellers 2010, Teets & Denlinger 2013). Por otro lado, y en línea con dicha estrategia, la disminución de AGs saturados (17:0 y 20:0) colabora con la reducción de las interacciones de las cadenas hidrocarbonadas relacionada al mayor ordenamiento de la membrana a bajas temperaturas (Hazel & Williams 1990, Hazel 1995). El aumento de la proporción de AGs poliinsaturados, principalmente 18:2n-6, concomitante con el menor porcentaje de AGs saturados, también se ha verificado para varias especies de insectos sometidos a aclimatación a bajas temperaturas (Kostal & Simek 1998, Košťál *et al.* 2003, Overgaard *et al.* 2006, Overgaard *et al.* 2008, Rozsypal *et al.* 2014).

Mantener la adecuada fluidez de las membranas no solo asegura su correcto funcionamiento, sino que además mantiene los lípidos de almacenamientos asequibles para ser metabolizados (Joanisse & Storey 1996a), este probablemente sea el caso de los cambios en los AGs de los lípidos de los DI (Ohtsu *et al.* 1993).

Se encuentra muy bien descrito en la bibliografía que mayor cantidad de insaturaciones en los AGs de las membranas generan menor temperatura de fusión resultando en una mayor fluidez. En los resultados de esta sección se observa una aparente contradicción al respecto en los adultos: un aumento del 20:4n-6 cuando se aclimatan a 25 °C. Existen algunos precedentes para otros artrópodos de cambios similares en las proporciones de AGs poliinsaturados bajo aclimatación a altas temperaturas, como para el colémbolo *Orchesella cincta* (van Dooremalen & Ellers 2010, Van Dooremalen *et al.* 2011) y el heteróptero *Pyrrhocoris apterus* (Hodková *et al.* 1999). La hipótesis de HVA para el efecto de las insaturaciones sobre la fluidez parece cumplirse para los AGs de 1 y 2 insaturaciones. La magnitud del efecto fluidificante de los AGs insaturados podría ser comparable más allá del número de dobles enlaces que posean (De Santis *et al.* 2018). De hecho, membranas ricas en fosfolípidos con 16:0/16:1 o 16:0/22:6 poseen similar temperatura de fusión (-12 vs -10 °C, respectivamente) (Coolbear *et al.* 1983, Stubbs & Smith 1984). Por otro lado, el 20:4 no es un AG que posea solo una función estructural ya que se encuentra relacionado directamente con la síntesis de prostaglandinas (Stanley-Samuelson & Loher 1986). Estas juegan un importante rol en invertebrados, en varios procesos fisiológicos (Stanley-Samuelson & Loher 1986), incluida la síntesis de hormonas sexuales (Coman *et al.* 2011, Swetha *et al.* 2020).

Podemos concluir que en *P. pythagoricus* la aclimatación a diferentes temperaturas puede relacionarse a variaciones en los porcentajes de AGs, nunca descritas para arañas. Estas son, en algunos casos, específicas de cada órgano y en otras de su estado ontogenético. La falta de información sobre este tema en otras especies no nos permite extrapolar estos patrones a otros taxa, pero si brindar los primeros datos en relación al tema en un grupo tan abundante y diverso como son las arañas.

# 6. Aclimatación térmica y exposición a clorpirifos

## 6.1. Introducción

En el ambiente natural, los organismos deben afrontar simultáneamente numerosos factores de estrés bióticos y abióticos, tanto de origen natural como antropogénico. Con la creciente preocupación respecto al aumento de las temperaturas globales, cobra relevancia conocer los efectos de la aclimatación prolongada a extremos de temperatura y su interacción con otros factores producto de la injerencia humana en el ecosistema (Todgham & Stillman 2013), destacándose entre estos los plaguicidas (Mao *et al.* 2019a, Stahlschmidt *et al.* 2022). Es posible que algunas especies puedan tolerar el estrés debido a temperaturas extremas, pero esta capacidad puede tener implicancias fisiológicas que condicionen la respuesta a otras fuentes de estrés, como son los xenobióticos (Kaunisto *et al.* 2016) o viceversa. Por lo tanto, para poder comprender el riesgo al que se someten los organismos potencialmente vulnerables, es imperativo avanzar en el conocimiento sobre como enfrentan estos a la exposición a más de un estresor simultáneamente (Holmstrup *et al.* 2010, Laskowski *et al.* 2010).

Existen estudios realizados sobre arañas donde se describe la interacción entre estresores químicos, metales pesados e insecticidas. Por ejemplo, Babczyńska & Migula (2002) no encontraron interacción entre exposición oral al cadmio y tópica al insecticida fenitrotión sobre la araña lobo *P. lugubris*.

La variable de la temperatura es considerada también en escasos trabajos. Everts y colaboradores (1991) descubrieron que *Oedothorax apicatus* (Linyphiidae) es más sensible al piretroide deltametrina bajo estrés por temperatura y baja humedad. Wilczek (2005) estudió el estrés térmico agudo y exposición tópica al organofosforado dimetoato sobre *A. labyrinthica* y *P. lugubris* (provenientes de áreas contaminadas con metales pesados) comprobando mayor nivel de apoptosis en los tratamientos que combinaron las dos fuentes de estrés. Michalko y Kosulic (2016) determinaron que la letalidad del piretroide lambda cialotrina para una comunidad de especies de *Philodromus* se relaciona directamente con la temperatura de exposición; y vieron que el efecto negativo sobre la capacidad predatoria es mayor a temperaturas bajas.

Se plantea estudiar cómo es afectado el sistema antioxidante y las ROS totales por la combinación de un estresor natural como la temperatura, tanto bajas y altas, con un estresor antropogénico como el CPF. Para ello se realizó la aclimatación de *P. pythagoricus* adultas a 1 y 35 °C y posterior inmediata exposición a CPF. A su vez, se evalúa el efecto de la aclimatación sobre la concentración tisular de dos crioprotectores. Las hipótesis de trabajo correspondientes fueron:

- En DI de *P. pythagoricus* la aclimatación interactúa con la exposición al CPF para afectar la actividad de las enzimas del sistema antioxidante, AChE y la concentración de ROS total.
- En DI de *P. pythagoricus* la aclimatación y la exposición al CPF inducen cambios en la actividad de las enzimas del sistema antioxidante, actividad de AChE y concentración de ROS total.
- En DI de *P. pythagoricus* la aclimatación a 1 °C eleva las concentraciones de Gli y Glu.

## 6.2. Resultados

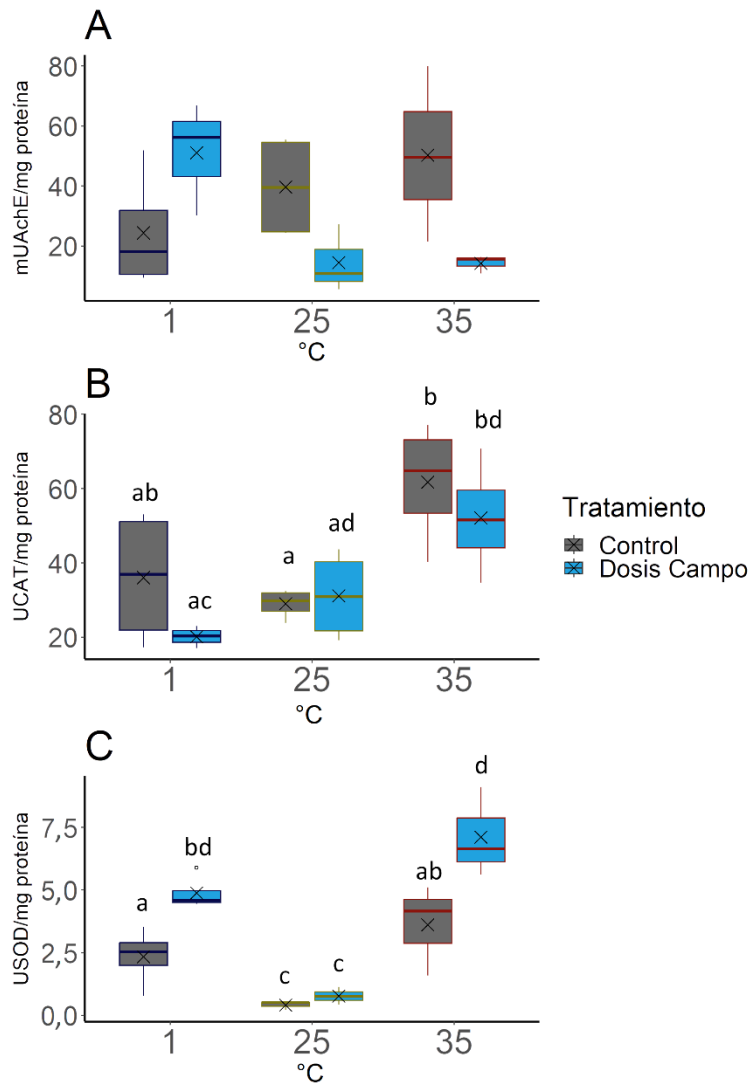
### 6.2.1. Estrés conjunto sobre sistema antioxidante enzimático

Adultos de *P. pythagoricus* aclimatados durante 20 días a 1, 25 y 35 °C fueron a su vez expuestos a la dosis de campo de CPF durante 24 h (**sección 2.12.4**). No se registró mortalidad durante el ensayo. La actividad de las enzimas del sistema antioxidante y AChE se presentan en las **Figuras 6.1. y 6.2.** Para evaluar el efecto conjunto de la aclimatación térmica y la exposición a insecticida sobre cada medida de actividad enzimática, se aplicó ANOVA de dos vías (TW-ANOVA) con la temperatura de aclimatación y tratamiento de CPF como factores. Se incluyó término de interacción entre factores en todos los modelos. Se aplicó la prueba post hoc “tasa de descubrimiento falso” (FDR) cuando se evidenciaron efectos significativos. Para lograr el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, se aplicaron transformaciones de la variable respuesta (**sección 2.13**).

No se hallaron diferencias significativas en la actividad de AChE entre temperaturas de aclimatación ni entre tratamientos. Sin embargo, se evidenció una interacción entre la aclimatación y la exposición a CPF ( $F = 5,43$ ;  $p = 0,0179$ ). Esta se puede apreciar en la **Figura 6.1-A.** donde se observa a 25 y 35 °C una tendencia a valores más bajos para el grupo tratado con respecto al control, en cambio, a 1 °C se observó una relación inversa.

La actividad de CAT no presentó diferencias significativas debidas a la exposición a CPF, pero si a causa de la aclimatación ( $F = 11,76$ ,  $p = 0,000541$ ). Tampoco fue significativa la interacción entre aclimatación y exposición a insecticida. Los grupos significativamente distintos se señalan con letras en la **Figura 6.1-B.** La actividad para el control a 35 °C fue significativamente más alta que las del control y el tratado con CPF a 25 °C, y el tratado a 1 °C. El tratado con CPF a 35 °C tuvo una actividad significativamente más alta que el tratado a 1 °C.

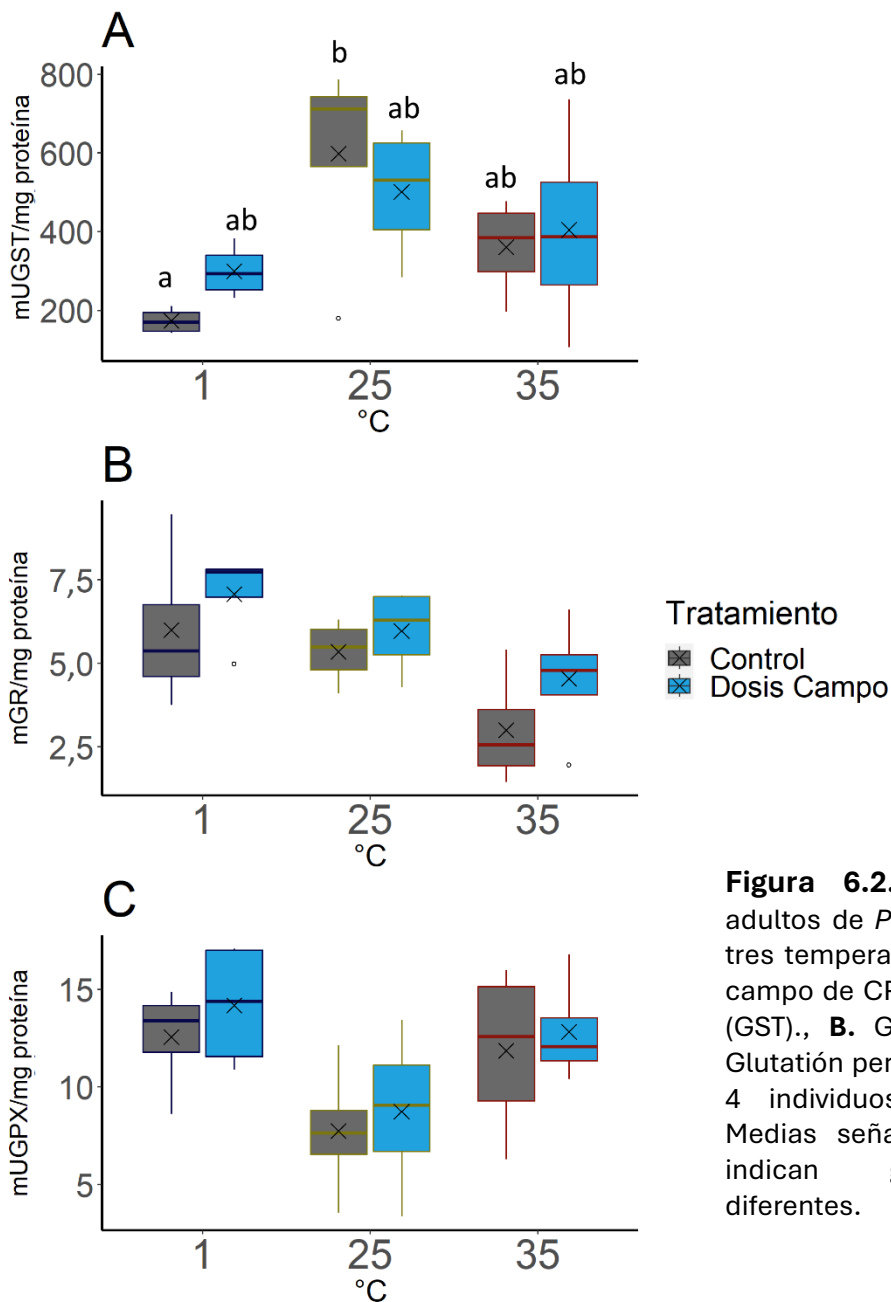
Para SOD se probó un cambio significativo en la actividad debido tanto a la aclimatación a temperatura ( $F = 33,693$ ;  $p = 4,46E-06$ ) como al tratamiento con CPF ( $F = 16,308$ ;  $p = 0,00122$ ), sin interacción entre ambas variables. En la **Figura 6.1-C.** se muestran los grupos estadísticamente significativos. Se observó que, si bien control y tratado para aclimatación a 25 °C no tuvieron valores distintos entre sí, resultaron con actividades más bajas que controles y tratados a temperaturas más bajas y altas por igual. Los tratados con CPF registraron actividades más altas que sus respectivos controles, tanto a 1 como a 35 °C. Las actividades de los tratados a 1 y 35 °C fueron estadísticamente distintas.



**Figura 6.1.** Actividad enzimática en adultos de *P. pythagoricus* Aclimatadas a tres temperaturas y expuestas a dosis de campo de clorpirifos (CPF). **A.** Acetilcolinesterasa (AChE), **B.** Catalasa (CAT), **C.** Superóxido dismutasa (SOD). Se emplearon 4 individuos por tratamiento (N=24). Medias señaladas con “X”. Las Letras indican grupos estadísticamente diferentes.

La actividad de GST varió significativamente solo en relación con la temperatura de aclimatación ( $F = 5,471$ ;  $p = 0,0139$ ) y no se registró interacción entre variables. En la **Figura 6.2-A**, se muestran los grupos estadísticamente distintos. La actividad del control a 1 °C fue significativamente más baja que el control a 25 °C.

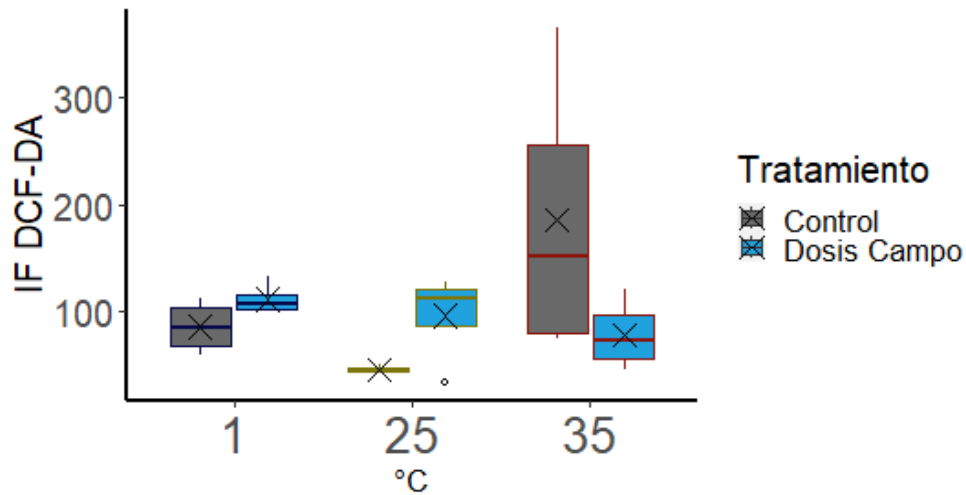
Se encontró un efecto significativo para la variable temperatura en los modelos TW-ANOVA para GR ( $F = 5,498$ ;  $p = 0,0137$ ) y GPx ( $F = 4,635$ ;  $p = 0,0238$ ) sin embargo, en ambos casos, la prueba post hoc no fue capaz de hallar contrastes significativos entre ningún grupo (**Figura 6.2-B. y C.**).



**Figura 6.2.** Actividad enzimática en adultos de *P. pythagoricus* aclimatadas a tres temperaturas y expuestas a dosis de campo de CPF. **A.** Glutación-S-transferasa (GST), **B.** Glutación reductasa (GR), **C.** Glutación peroxidasa (GPx). Se emplearon 4 individuos por tratamiento (N=24). Medias señaladas con "X". Las Letras indican grupos estadísticamente diferentes.

### 6.2.2. Estrés conjunto sobre especies reactivas del oxígeno

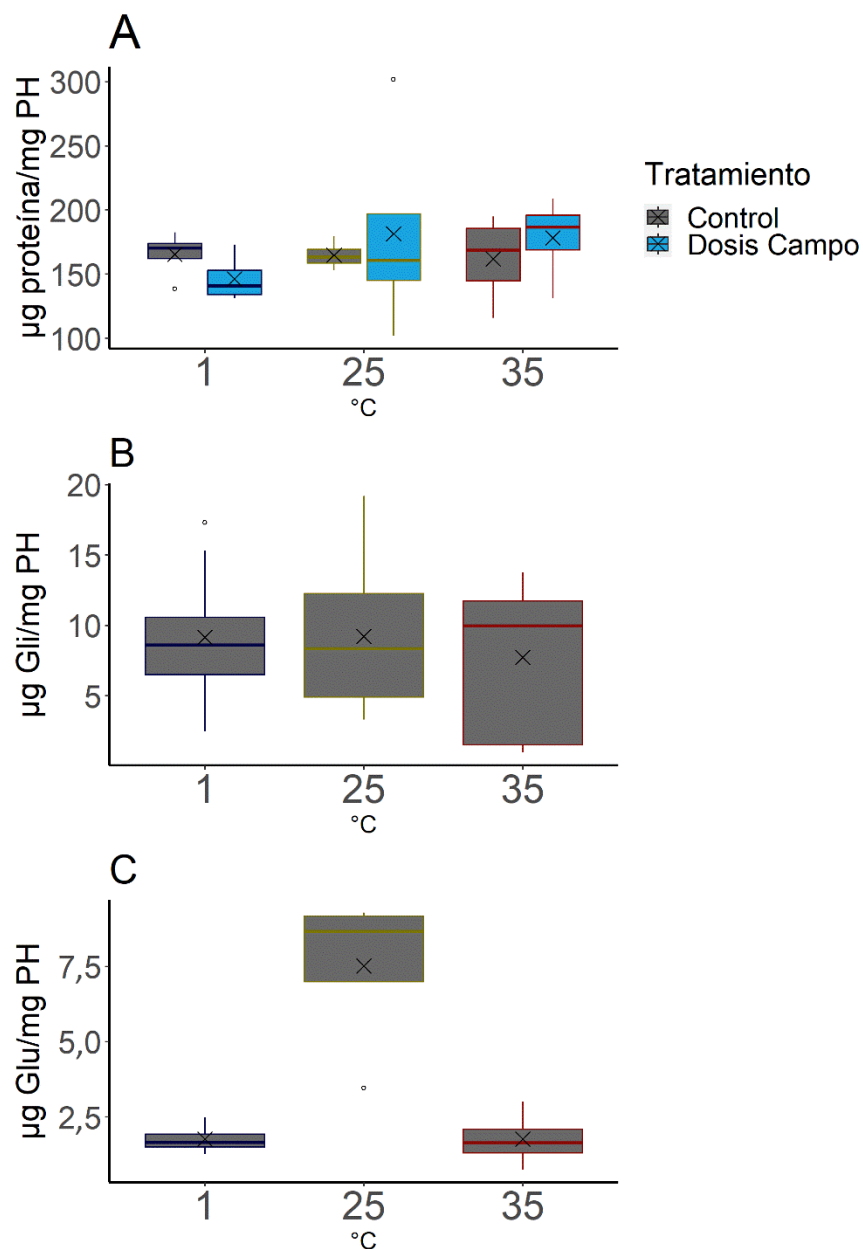
Al término del periodo de aclimatación y/o exposición de los adultos de *P. pythagoricus*, de manera inmediata luego de la eutanasia, se extrajeron células vivas de DI y se emplearon para la cuantificación de ROS por citometría de flujo. Los valores medios de intensidad de fluorescencia de DCF-DA (IF DCF-DA) obtenidos se representan en la **Figura 6.3**. No se hallaron efectos significativos para temperatura de exposición ni tratamiento con CPF, ni interacción entre ambos. Los valores medios para todos los grupos abarcaron entre 185,8 y 45,6 IF DCF-DA.



**Figura 6.3.** Intensidad de fluorescencia de (IF DCF-DA) para control y tratamiento, por temperatura de aclimatación. Se emplearon 4 individuos por tratamiento (N=24). Las “X” representan el promedio.

Los valores promedio de proteína total por temperatura de aclimatación y tratamiento con CPF, y de Gli y Glu por temperatura de aclimatación se representan en la **Figura 6.4., A., B. y C.** respectivamente. No se halló efecto significativo para la aclimatación ni la exposición sobre las proteínas totales, ni una interacción significativa entre ambos factores. Los valores promedio de Gli y Glu no variaron significativamente entre temperaturas. Sin embargo, el promedio de Glu a 25 °C (7,52 µg Glu/mg de peso húmedo) fue aproximadamente 4 veces mayor a los de 1 y 35 °C (1,77 y 1,76 µg Glu/mg de peso húmedo, respectivamente).





**Figura 6.4.** **A.** Proteína total por mg de peso húmedo, para cada temperatura de aclimatación y tratamiento con clorpirifos en divertículo intestinal . **B.** Glicerol (Gli) por g de peso húmedo, para cada temperatura de aclimatación en DI. **C.** Glucosa (Glu) por g de peso húmedo, para cada temperatura de aclimatación en DI. Se emplearon 4 individuos por tratamiento (N=24). Las “X” marcan el promedio.

### 6.3. Discusión

Durante el ensayo de estrés por aclimatación y exposición a CPF en *P. pythagoricus* no se registró mortalidad. Tampoco se comprobó interacción entre factores (temperatura de aclimatación y exposición a CPF) para ninguna de las enzimas relacionadas al estrés oxidativo, ni contenido de ROS. Esto permite sugerir que la aclimatación prolongada (20 días) a diferentes temperaturas (1 y 35 °C) no implica un coste metabólico suficiente como para afectar la respuesta al estrés que supone la exposición al insecticida. Sin embargo, sí se halló evidencia de una interacción entre las variables estresoras sobre la enzima blanco de CPF, AChE. Se puede apreciar en la **Figura 6.2.** que la relación entre control y tratado a 25 y 35 °C es inversa a la observada a 1 °C. Es importante destacar que hasta la fecha no existen estudios en arácnidos que relacionen la actividad de AChE con la aclimatación a distintas temperaturas. Trabajos en otros artrópodos como el anfípodo *Gammarus fossarum*, hallaron un resultado similar al presentado aquí (Xuereb *et al.* 2009). En otro crustáceo, *Aegla longirostri*, sin embargo, se comprobó que la actividad de AChE es mayor luego de aclimatación a temperaturas más altas (Cerezer *et al.* 2020). Por otro lado, en el insecto *Philosamia ricini* se observó que la aclimatación a baja temperatura puede aumentar la actividad de AChE en cuerpo graso (Singh *et al.* 2013). En concordancia con esto último, en los ensayos de este capítulo se observó una tendencia comparable, ya que el grupo tratado con CPF a 1 °C fue el que registró la media más alta de actividad de AChE (51,224 mUChE/mg de proteína), en contraste con los tratados a 25 y 35 °C para los que se obtuvieron valores 3 veces más bajos (14,468 y 14,212 mUChE/mg de proteína respectivamente). En el quironómido *Chironomus riparius*, se ha encontrado que si bien variables como temperatura y concentración de insecticida interactúan entre sí, no poseen efectos estadísticamente significativos por separado sobre la actividad de AChE (Callaghan *et al.* 2002).

Los dos estresores ensayados sobre *P. pythagoricus* demostraron no interactuar entre sí en este experimento en cuanto a la respuesta del sistema antioxidante. No obstante, la aclimatación sí indujo cambios en la actividad de CAT, SOD y GST. En un trabajo realizado por Zhao y colaboradores (2020b), en la araña *Hylyphantes graminicola* (Linyphiidae) se mostró que el shock de alta temperatura (40 °C) también induce a CAT y SOD (Zhao *et al.* 2020b). Para otros modelos de artrópodos a su vez se demostró el efecto del estrés térmico sobre la actividad enzimática antioxidante. La mosca *Bactrocera dorsalis*, al ser sometida a una aclimatación corta por debajo y sobre 27 °C mostró aumentos significativos de la actividad de SOD y CAT (Jia *et al.* 2011), así como distintas variedades de polilla de la seda *Bombyx mori* a temperaturas por encima de 25° C (Makwana *et al.* 2021). En otra mosca plaga, *Zeugodacus tau*, expuesta a varias temperaturas entre 25 y 40 °C se observó una gran variabilidad de respuestas en la actividad de SOD y CAT (Li *et al.* 2023). Por otro lado, empleando técnicas de biología molecular, se probó que varias isoformas de CAT son inducidas durante la aclimatación a altas temperaturas en el hemíptero *Bemisia tabaci* (Liang *et al.* 2023).

En la **sección 6.1** se comentaron trabajos previos que experimentaron en arañas con estrés químico y térmico. Es relevante recordar a Wilczek (2005) donde se estudió el efecto de la temperatura, exposición a organofosforado y metales pesados, sobre defensas bioquímicas y marcadores de daño celular, en las especies *A. labyrinthica* y *P. lugubris*, una especie de hábito móvil no-tejedor similar al de *P. pythagoricus* (cazadoras errantes). Solo para *P. lugubris*, considerando el grupo no afectado por metales pesados, se observó que el estrés térmico puede inducir a CAT con respecto al control, pero la exposición a dimetoato por sí misma no consigue este efecto. En cambio,

ambos estresores combinados inducen significativamente a CAT. SOD solo se ve inducida debido al shock térmico en *P. lugubris* no estresada por contaminantes metálicos. En el caso de nuestro modelo *P. pythagoricus*, en este experimento, tampoco se observó para CAT ni SOD un efecto de inducción debido únicamente a la exposición con CPF (**Figura 6.1-B. y C.** ver Controles 25 °C y 35 °C con respecto a sus respectivos tratados). La aclimatación a alta temperatura por sí misma condujo a mayores niveles de actividad de ambas enzimas (**Figura 6.1-B. y 6.1-C.**) al comparar los controles de 25 °C y 35 °C, tanto para *P. pythagoricus* como en *P. lugubris* descrito por Wilczek (2005).

Wilczek y colaboradores (2013) estudiando la interacción entre estrés por metales pesados, temperatura e insecticida, comprobó que la actividad de CAT en DI de hembras de *X. nemoralis* aumenta al exponerse a shock térmico, o bien a una combinación de este y exposición a dimetoato (para sitio de referencia no contaminado con metales) no obstante, no hallaron diferencias con el grupo expuesto solo a dimetoato. Este resultado coincide con lo observado en *P. pythagoricus*, donde control y tratado aclimatados a 25 °C no se diferenciaron estadísticamente, pero sí el control a 25 °C y tratado a 35 °C (comparable al estrés conjunto ensayado por estos autores). La actividad de SOD en *X. nemoralis* no aumentó significativamente bajo exposición a dimetoato, ni estrés combinado por temperatura e insecticida, solo bajo estrés térmico, a diferencia de *P. pythagoricus*. Para las hembras de *X. nemoralis*, a su vez, estos mismos autores hallaron aumentos en la actividad de GST bajo exposición a dimetoato y GPx bajo estrés térmico, contrastando con los resultados obtenidos en el presente estudio. Es importante señalar que estas dos especies pertenecen a familias distintas, y el tipo de aclimatación realizado fue mucho más prolongado en nuestro experimento para *P. pythagoricus*.

Para el caso de adultos de *P. pythagoricus* a diferencia de lo que se describió para otras arañas no se observaron cambios en la cantidad de proteínas o Gli cuando las arañas se aclimataron a bajas temperaturas. En la tarántula *Euathlus condorito*, bajo aclimatación a temperaturas inferiores a 0 °C, se ha verificado aumentos en de Gli en hemolinfa (Cubillos *et al.* 2018). Sin embargo, no hay precedentes de medidas realizadas sobre tejidos, como el DI, para este crioprotector en arañas aclimatadas. Las variaciones en la respuesta fisiológica de las diferentes especies de artrópodos frente a la aclimatación son extremadamente variables, no coincidiendo con lo reportado aquí en los pocos estudios de arañas en relación con la Glu, como *Schizocosa stridulans* (Potts *et al.* 2020) para la que se observaron aumentos de Glu y otros crioprotectores (incluyendo Gli) en los meses fríos del año.

## 7. Conclusiones

A partir de los experimentos realizados para esta tesis doctoral se concluye que, *P. pythagoricus* como modelo biológico del orden Araneae, es afectada tanto por los estresores de origen antropogénico como por el estresor natural que se testeó. El insecticida organofosforado CPF es capaz de provocar en esta especie un efecto significativo a nivel comportamental, a nivel de las defensas antioxidantes enzimáticas y a nivel histológico. En relación con la aclimatación a diferentes temperaturas, se verifica un efecto sobre los porcentajes de grupos lipídicos y AGs. Por último, no se observa que las fuentes de estrés por aclimatación a distintas temperaturas, en combinación con exposición a CPF, interactúen ni sinérgica ni antagónicamente sobre el sistema antioxidante de *P. pythagoricus*.

Las conclusiones específicas obtenidas se enumeran a continuación.

Sobre el efecto de la exposición tópica a insecticidas en el sistema antioxidante y estrés oxidativo.

- ❖ *P. pythagoricus* modifica su comportamiento exploratorio en presencia de superficies con CPF, sugiriendo que esta especie es capaz de reconocer y evitar este insecticida.
- ❖ La epicutícula de *P. pythagoricus* muestra una composición rica en HC de cadena larga (C33-C45), importantes para dificultar la absorción de insecticidas.
- ❖ El insecticida organofosforado CPF es capaz de penetrar en el organismo de *P. pythagoricus*, aumentando la peroxidación lipídica a las 6 h y produciendo la inhibición de la AChE luego de las 24 h.
- ❖ La dosis de campo de CPF induce un aumento de las actividades de SOD, CAT y GST a las 6 y 24 h de exposición en *P. pythagoricus*.
- ❖ La exposición tópica a la dosis de campo de CPF produce necrosis en DI luego de 24 y 48 h de exposición.
- ❖ La dosis de campo ensayada de la ivermectina ABM no causa efectos significativos sobre AChE, CAT, ni produce peroxidación lipídica.

Sobre el efecto en la composición lipídica de la aclimatación prolongada a diferentes temperaturas.

- ❖ Los juveniles de *P. pythagoricus* independientemente de la temperatura de aclimatación, almacenan TAG en TM.
- ❖ La aclimatación altera el porcentaje de PE y PC del TM, tanto en adultos como en juveniles de *P. pythagoricus*.
- ❖ El COL aumenta a bajas temperaturas en DI de *P. pythagoricus*, probablemente para regular la fluidez de estructuras lipídicas.
- ❖ Se observa una tendencia general en DI de juveniles y adultos, a la disminución del porcentaje de AGs insaturados 16:1, 18:1 y 18:2, a mayores temperaturas de aclimatación. Contrariamente, se observa un concomitante aumento en los AGs saturados 17:0 y 20:0. Por

su parte, en TM de juveniles se observa un descenso en el porcentaje de 16:1 con el aumento de la temperatura.

Efecto combinado de aclimatación y exposición a CPF.

- ❖ No se encontró interacción sinérgica ni antagónica entre la aclimatación a extremos de temperatura y exposición a CPF sobre la actividad del sistema antioxidante o concentración de ROS para *P. pythagoricus*.
- ❖ La aclimatación a 1 y 35 °C aumenta la actividad de SOD en *P. pythagoricus*.
- ❖ La aclimatación a 1 °C induce una disminución en la actividad de la enzima GST en *P. pythagoricus* y un aumento de la actividad de CAT a 35 °C.
- ❖ Se observó que la concentración de Gli y de Glu en DI de *P. pythagoricus* se mantiene constante en relación a las diferentes temperaturas de aclimatación.

## Bibliografía

- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., & Rezaie, A. 2004.** Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical Science Monitor* 10: 141-147.
- Abo-El-Saad, M. M., Elshafie, H. A., & Bou-Khowh, I. A. 2013.** Toxicity of bio-insecticide, Abamectin, on red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier). *International Journal of Agricultural Science Research* 2: 107-115.
- Aebi, H. 1984.** Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121-126.  
[https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)
- Ahmed, F. A. G., & El-Sobki, A. E. A. M. 2021.** Biochemical and histological responses of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* exposed to sub-lethal levels of different insecticide classes. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences* 13: 293-308.  
<https://doi.org/10.21608/eajbsf.2021.211778>
- Aitchison, J. 1986.** *The Statistical Analysis of Compositional Data*, Chapman & Hall Ltd., London (UK). pp. 416. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-4109-0>
- Aktar, W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. 2009.** Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology* 2: 1-12.  
<https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
- Al-Mohanna, S., Nott, J., & Lane, D. 1985.** Mitotic E-and secretory F-cells in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 65: 901-910.  
<https://doi.org/10.1017/s0025315400019408>
- Al-Mohanna, S. Y., & Nott, J. A. 1986.** B-Cells and digestion in the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). *Journal of the Marine Biological Association UK (JMBA)* 66: 403-414. <https://doi.org/10.1017/s0025315400043034>
- Alfaro, C., Figueroa, D. P., Torres, H., Veloso, C., Venegas, F., Canals, L., & Canals, M. 2013.** Effect of thermal acclimation on preferred temperatures in two mygalomorph spiders inhabiting contrasting habitats. *Physiological Entomology* 38: 20-25.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2012.00853.x>
- Alhewairini, S., & Al-Azzazy, M. 2021.** Side effects of abamectin and hexythiazox on seven predatory mites. *Brazilian Journal of Biology* 83: e251442.  
<https://doi.org/10.1590/1519-6984.251442>
- Alvarez, A., Ramirez-San Juan, E., & Canizales-Román, A. 2008.** Chlorpyrifos induces oxidative stress in rats. *Toxicological and Environmental Chemistry* 90: 1019-1025.  
<https://doi.org/10.1080/02772240701806576>
- Alzahrani, A. M. 2019.** Ultrastructural damage and biochemical alterations in the testes of red palm weevils (*Rhynchophorus ferrugineus*) exposed to imidacloprid. *Environmental Science and Pollution Research* <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04968-8>
- Anthony, S. E., Buddle, C. M., Høye, T. T., & Sinclair, B. J. 2019.** Thermal limits of summer-collected *Pardosa* wolf spiders (Araneae: Lycosidae) from the Yukon Territory (Canada) and Greenland. *Polar Biology* 42: 2055-2064.  
<https://doi.org/10.1080/02772240701806576>
- Arena, J. P., Liu, K. K., Paress, P. S., Frazier, E. G., Cully, D. F., Mrozik, H., & Schaeffer, J. M. 1995.** The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans*: correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane

- binding, and biological activity. *The Journal of Parasitology*: 286-294.  
<https://doi.org/10.2307/3283936>
- Armstrong, D. 2010.** Advanced protocols in oxidative stress II, vol. 28, Springer.  
<https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1>
- Arnaudov, V., & Kutinkova, H. 2009.** Controlling pear psylla with Abamectin in Bulgaria. *Scientific Works of the Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture* 28: 3-9.
- Arrese, E. L., & Soulages, J. L. 2010.** Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology* 55: 207-225. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085356>
- Arrighetti, F., Ambrosio, E., Astiz, M., Rodrigues Capítulo, A., & Lavarías, S. 2018.** Differential response between histological and biochemical biomarkers in the apple snail *Pomacea canaliculata* (Gasteropoda: Amullariidae) exposed to cypermethrin. *Aquatic Toxicology* 194: 140-151. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.11.014>
- Ayala, A., Munoz, M. F., & Arguelles, S. 2014.** Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014: 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Babczyńska, A., & Migula, P. 2002.** Cadmium-fenitrothion interaction in the spider *Pardosa lugubris* and the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 69: 586–592. <https://doi.org/10.1007/s00128-002-0101-y>
- Babczyńska, A., Wilczek, G., & Migula, P. 2006.** Effects of dimethoate on spiders from metal pollution gradient. *Science of The Total Environment* 370: 352-359.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.06.024>
- Babczyńska, A., Wilczek, G., Szulińska, E., & Franiel, I. 2011.** Quantitative immunodetection of metallothioneins in relation to metals concentration in spiders from variously polluted areas. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 1498-1503. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.05.019>
- Bacci, L., Crespo, A. L., Galvan, T. L., Pereira, E. J., Picanço, M. C., Silva, G. A., & Chediak, M. 2007.** Toxicity of insecticides to the sweetpotato whitefly (Hemiptera: Aleyrodidae) and its natural enemies. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science* 63: 699-706. <https://doi.org/10.1002/ps.1393>
- Bagchi, D., Balmoori, J., Bagchi, M., Ye, X., Williams, C. B., & Stohs, S. J. 2002.** Comparative effects of TCDD, endrin, naphthalene and chromium (VI) on oxidative stress and tissue damage in the liver and brain tissues of mice. *Toxicology* 175: 73-82.  
[https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(02\)00062-8](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(02)00062-8)
- Bai, S. H., & Ogbourne, S. 2016.** Eco-toxicological effects of the avermectin family with a focus on abamectin and ivermectin. *Chemosphere* 154: 204-214.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.113>
- Balabanidou, V., Grigoraki, L., & Vontas, V. 2018.** Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance. *Current Opinion in Insect Science* 27: 68-74.  
<https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.03.001>
- Balabanidou, V., Mary Kefi, M., Aivaliotis, M., Koidou, V., Girotti, J. R., Mijailovsky, S., Juárez, M., Papadogiorgaki, E., Chalepakis, G., Kampouraki, A., Nikolaou, C., Ranson, H., & Vontas, J. 2019.** Mosquitoes cloak their legs to resist insecticides. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 286  
<https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1091>

- Balabanidou, V., Kampouraki, A., MacLean, M., Blomquist, G., Tittiger, C., Juárez, M., Mijailovsky, S., Chalepakis, G., Anthousi, A., Lynd, A., Antoine, S., Hemingway, J., Ranson, H., Lycett, G., & Vontas, J. 2016.** Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences 113: 9268–9273. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821201116>
- Balali-Mood, M., & Abdollahi, M. 2014.** Basic and clinical toxicology of organophosphorus compounds, Springer. London. <https://doi.org/10.1007/978-1-4471-5625-3>
- Ballantyne, B., & Marrs, T. C. 2004.** Pesticides: an overview of fundamentals, vol. 21, Wiley & Sons. England. <https://doi.org/10.1002/0470091673.ch1>
- Banerjee, B., Seth, V., Bhattacharya, A., Pasha, S., & Chakraborty, A. 1999.** Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. Toxicology letters 107: 33-47. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(99\)00029-6](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(99)00029-6)
- Barnes, C. L., Blay, N. W., & Wilder, S. M. 2023.** Thermal tolerances of different life stages, sexes, and species of widow spiders (Araneae: Theridiidae). The Journal of Arachnology 51: 46-56. <https://doi.org/10.1636/joa-s-21-044>
- Bass, C., Puinean, A., Zimmer, C., Denholm, I., Field, L., Foster, S., Gutbrod, O., Nauen, R., Slater, R., & Williamson, M. 2014.** The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 51: 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.05.003>
- Baugh, P. J. 1993.** Gas chromatography. A practical approach, Irl. Press. Oxford. pp. 426. ISBN: 9780199632725, 0199632723.
- Beauvais, S. L., Atchison, G. J., Stenback, J. Z., & Crumpton, W. G. 1999.** Use of cholinesterase activity to monitor exposure of *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) to a pesticide mixture in hypoxic wetland mesocosms. Hydrobiologia 416: 163–170. <https://doi.org/10.1023/a:1003819621659>
- Bednarek, A., Sawadro, M., & Babczyńska, A. 2016.** Modulation of the response to stress factors of *Xerolycosa nemoralis* (Lycosidae) spiders living in contaminated environments. Ecotoxicology and Environmental Safety 131: 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.04.027>
- Bellas, J., Beiras, R., Marino-Balsa, J., & Fernandez, N. 2005.** Toxicity of organic compounds to marine invertebrate embryos and larvae: a comparison between the sea urchin embryogenesis bioassay and alternative test species. Ecotoxicology 14: 337–353. <https://doi.org/10.1007/s10646-004-6370-y>
- Bernal-Rey, D. L., Cantera, C. G., dos Santos Afonso, M., & Menéndez-Helman, R. J. 2020.** Seasonal variations in the dose-response relationship of acetylcholinesterase activity in freshwater fish exposed to chlorpyrifos and glyphosate. Ecotoxicology and Environmental Safety 187: 109673. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109673>
- Birkhofer, K., Gavish-Regev, E., Endlweber, K., Lubin, Y. D., von Berg, K., Wise, D. H., & al, e. 2008.** Cursorial spiders retard initial aphid population growth at low densities in winter wheat. Bulletin of Entomological Research 98: 249-255. <https://doi.org/10.1017/S0007485308006019>
- Boccioni, A. C. P., Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., & Martinuzzi, C. S. 2021.** Toxicity assessment at different experimental scenarios with glyphosate, chlorpyrifos and antibiotics in *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles. Chemosphere 128475 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128475>
- Booth, L. H., & O'Halloran, K. 2001.** A comparison of biomarker responses in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* to the organophosphorus insecticides diazinon and



- chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2494–2502.  
<https://doi.org/10.1002/etc.5620201115>
- Borzone, H. A., Bardi, J. F., & Laddaga, J. E. 2007.** Crecimiento de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh cultivado como cortina en un establecimiento agropecuario del Partido de Azul (Pcia. de Bs. As.). *Quebracho* 14: 65-73.
- Brandt, E. E., Roberts, K. T., Williams, C. M., & Elias, D. O. 2020.** Low temperatures impact species distributions of jumping spiders across a desert elevational cline. *Journal of Insect Physiology* 122: 104037. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2020.104037>
- Breitburg, D. L., Baxter, J. W., Hatfield, C. A., Howarth, R. W., Jones, C. G., Lovett, G. M., & Wigand, C. 1998.** Understanding effects of multiple stressors: ideas and challenges, pp. 416-431, *Successes, limitations, and frontiers in ecosystem science*. Springer [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1724-4\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1724-4_17)
- Brown, A. E., France, R. M., & Grossman, S. H. 2004.** Purification and characterization of arginine kinase from the American cockroach (*Periplaneta americana*). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America* 56: 51-60. <https://doi.org/10.1002/arch.10143>
- Brown, B. E. 1982.** The form and function of metal-containing 'granules' in invertebrate tissues. *Biological Reviews* 57: 621-667. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1982.tb00375.x>
- Buchman, T. G. 2002.** The community of the self. *Nature* 420: 246-251.  
<https://doi.org/10.1038/nature01260>
- Budd, G. E., & Telford, M. J. 2009.** The origin and evolution of arthropods. *Nature* 457: 812-817. <https://doi.org/10.1038/nature07890>
- Bueno, A., & Freitas, S. 2004.** Effect of the insecticides abamectin and lufenuron on eggs and larvae of *Chrysoperla externa* under laboratory conditions. *BioControl* 49: 277-283. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1724-4\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1724-4_17)
- Butcherine, P., Kelaher, B. P., & Benkendorff, K. 2022.** Assessment of acetylcholinesterase, catalase, and glutathione S-transferase as biomarkers for imidacloprid exposure in penaeid shrimp. *Aquatic Toxicology* 242: 106050.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.106050>
- Calberg, E., & Mannervik, A. 1985.** Glutathione reductase. *Methods in Enzymology* 113: 484-495. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(85\)13062-4](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(85)13062-4)
- Callaghan, A., Fisher, T. C., Grosso, A., Holloway, G. J., & Crane, M. 2002.** Effect of temperature and pirimiphos methyl on biochemical biomarkers in *Chironomus riparius* Meigen. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 52: 128-133.  
<https://doi.org/10.1006/eesa.2002.2160>
- Canavoso, L. E., Yun, H. K., Jouni, Z. E., & Wells, M. A. 2004.** Lipid transfer particle mediates the delivery of diacylglycerol from lipophorin to fat body in larval *Manduca sexta*. *Journal of Lipid Research* 45: 456-465. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300242-JLR200M300242-JLR200>
- Carriquiriborde, P., Valeria, A. M., Liliana, A. O., Jimena, C., Demetrio, P. M., Lorena, E. B., Ferrari, A., Gagneten, A. M., Laborde, M. R. R., Larramendy, M. L., Lo Nostro, F., Menone, M. L., Miglioranza, K. S. B., Monserrat, J. M., Ossana, N. A., Peluso, M. L., Regaldo, L., Rimodi, F., Ruiz de Arcaute, C., Soloneski, S., & Somoza, G. M. 2021.** *Principios de Ecotoxicología*, Editorial de la Universidad de La Plata. La Plata. ISBN: 9503419875.

- Carruthers, A., & Melchior, D. 1984.** Human erythrocyte hexose transporter activity is governed by bilayer lipid composition in reconstituted vesicles. *Biochemistry* 23: 6901-6911. <https://doi.org/10.1021/bi00321a096>
- Carvalho, M., Schwudke, D., Sampaio, J. L., Palm, W., Riezman, I., Dey, G., Gupta, G. D., Mayor, S., Riezman, H., Shevchenko, A., Kurzchalia, T. V., & Eaton, S. 2010.** Survival strategies of a sterol auxotroph. *Development* 137: 3675-3685. <https://doi.org/10.1242/dev.044560>
- Casarett, L. J., & Doull, J. 2008.** Casarett and Doull's toxicology: The basic Science of Poisons, 7th ed. McGraw-Hill. Reino Unido. ISBN: 9780071593519. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(96\)90054-5](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(96)90054-5)
- Cereja, R. 2020.** Critical thermal maxima in aquatic ectotherms. *Ecological Indicators* 119: 106856. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106856>
- Cerezer, C., Leitemperger, J. W., do Amaral, A. M. B., Ferreira, B. C., Marins, A. T., Loro, V. L., Bartholomei-Santos, M. L., & Santos, S. 2020.** Raising the water temperature: consequences in behavior and biochemical biomarkers of the freshwater crab *Aegla longirostri* (Crustacea, Anomura). *Environmental Science and Pollution Research* 27: 45349-45357. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10423-w>
- Chen, X., Zhong, Z., Xu, Z., Chen, L., & Wang, Y. 2010.** 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: forty years of application and controversy. *Free radical research* 44: 587-604. <https://doi.org/10.3109/10715761003709802>
- Cheng, C. Y., Lai, Y. F., Hsieh, Y. L., Wu, C. H., Chiu, C. c., & Yang, Y. M. 2022.** Divergent effects of cholesterol on the structure and fluidity of liposome and catanionic vesicle membranes. *FEBS Letters* 596: 1827-1838. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14375>
- Cherif, A., Mansour, R., Sun, C., & Grissa-Lebdi, K. 2022.** Lethal effects of nano and commercial formulations of abamectin on *Tutaabsoluta* (Meyrick) and its mirid predators *Macrolophuspygmaeus* and *Nesidiocoristenuis*. *International Journal of Tropical Insect Science* 42: 2183-2193. <https://doi.org/10.1007/s42690-022-00739-0>
- Chishti, Z., Hussain, S., Arshad, K. R., Khalid, A., & Arshad, M. 2013.** Microbial degradation of chlorpyrifos in liquid media and soil. *Journal of Environmental Management* 114: 372-380. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.10.032>
- Chovatiya, R., & Medzhitov, R. 2014.** Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Molecular cell* 54: 281-288. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.030>
- Chowanski, S., Lubawy, J., Spochacz, M., Ewelina, P., Grzegorz, S., Rosinski, G., & Slocinska, M. 2015.** Cold induced changes in lipid, protein and carbohydrate levels in the tropical insect *Gromphadorhina coquereliana*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 183: 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.01.007>
- Chrousos, G. P., & Gold, P. W. 1992.** The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 267: 1244-1252. <https://doi.org/10.1001/jama.267.9.1244>
- Clayton, R. B. 1964.** The utilization of sterols by insects. *J. Lipid Res.* 5: 3-19. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)40254-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)40254-8)
- Colinet, H., Sinclair, B. J., Vernon, P., & Renault, D. 2015.** Insects in fluctuating thermal environments. *Annual Review of Entomology* 60: 123-140. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-021017>
- Coman, G., Arnold, S., Barclay, M., & Smith, D. 2011.** Effect of arachidonic acid supplementation on reproductive performance of tank-domesticated *Penaeus*

- monodon*. *Aquaculture Nutrition* 17: 141-151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00716.x>
- Consoli, F., Parra, J. R. P., & Hassan, S. 1998.** Side-effects of insecticides used in tomato fields on the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum* Riley (Hym., Trichogrammatidae), a natural enemy of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lep., Gelechiidae). *Journal of Applied Entomology* 122: 43-47. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1998.tb01459.x>
- Coolbear, K., Berde, C., & Keough, K. 1983.** Gel to liquid-crystalline phase transitions of aqueous dispersions of polyunsaturated mixed-acid phosphatidylcholines. *Biochemistry* 22: 1466-1473. <https://doi.org/10.1021/bi00275a022>
- Cordeiro, E., Corrêa, A., Venzon, M., & Guedes, R. 2010.** Insecticide survival and behavioral avoidance in the lacewings *Chrysoperla externa* and *Ceraeochrysa cubana*. *Chemosphere* 81: 1352-1357. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.08.021>
- Cossarizza, A., Chang, H., Radbruch, A., Acs, A., Adam, D., Adam-Klages, S., Agace, W. W., Aghaeepour, N., Akdis, M., & Allez, M. 2019.** Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *European Journal of Immunology* 49: 1457-1973. <https://doi.org/10.1002/eji.201970107>
- Cossins, A. 2012.** *Temperature biology of animals*, Springer Science & Business Media. ISBN: 9400931271. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-3127-5>
- Costantini, D. 2014.** *Oxidative stress and hormesis in evolutionary ecology and physiology. A marriage between mechanistic and evolutionary approaches*, Springer. pp. 362. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-54663-1>
- Cowles, J. 2018.** *Amazing arachnids*, Princeton University Press. ISBN: 0691176582. <https://doi.org/10.2307/j.ctt1zkjxkx>
- Cowles, R. B., & Bogert, C. M. 1944.** A preliminary study of the thermal requirements of desert reptile. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 83: 261–296.
- Crane, A. L., Klein, K., & Olson, J. R. 2012.** Bioactivation of chlorpyrifos by CYP2B6 variants. *Xenobiotica* 42: 1255-1262. <https://doi.org/10.3109/00498254.2012.702246>
- Crockett, E. L. 1998.** Cholesterol Function in Plasma Membranes from Ectotherms: Membrane-Specific Roles in Adaptation to Temperature. *American Zoologist* 38 291-304. <https://doi.org/10.1093/icb/38.2.291>
- Cubillos, C., Cáceres, J. C., Villablanca, C., Villarreal, P., Baeza, M., Cabrera, R., Graether, S. P., & Veloso, C. 2018.** Cold tolerance mechanisms of two arthropods from the Andean Range of Central Chile: *Agathemera crassa* (Insecta: Agathemeridae) and *Euathlus condorito* (Arachnida: Theraphosidae). *Journal of Thermal Biology* 74: 133-139. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.03.018>
- Cucchi, N. J. 2020.** *Agricultura sin plaguicidas sintéticos: manejo agroecológico de plagas en cultivos argentinos*. 9878333264 Ediciones INTA. <http://hdl.handle.net/20.500.12123/7205>
- Cunningham, M., & Pollero, R. 1996.** Characterization of lipoprotein fraction with high content of hemocyanin in the hemolymphatic plasma of *Polybetes pythagoricus*. *Journal of Experimental Zoology* 274: 275-280. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19960401\)274:5<275::AID-JEZ2>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19960401)274:5<275::AID-JEZ2>3.0.CO;2-M)
- Cunningham, M., Pollero, R., & Gonzalez, A. 1994.** Lipid circulation in spiders. Transport of phospholipids, free acids and triacylglycerols as the major lipid classes by a high-density lipoprotein fraction isolated from plasma of *Polybetes pythagoricus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 109B [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(94\)90017-5](https://doi.org/10.1016/0305-0491(94)90017-5)

- Cunningham, M., Gómez, C., & Pollero, R. 1999.** Lipid binding capacity of spider hemocyanin. *Journal of Experimental Zoology* 284: 368-373. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-010x](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-010x)
- Cunningham, M., Garcia, F., & Pollero, R. J. 2007.** Arachnid lipoproteins: Comparative aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 146: 79-87. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.06.011>
- Cunningham, M., Garcia, C. F., González-Baró, M. R., Garda, H., & Pollero, R. 2002.** Organophosphorous insecticide fenitrothion alters the lipid dynamics in the spider *Polybetes pythagoricus* high density lipoproteins. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 73: 37-47. [https://doi.org/10.1016/s0048-3575\(02\)00016-0](https://doi.org/10.1016/s0048-3575(02)00016-0)
- Cunningham, M. L., Garcia, C. F., Garda, H., & Pollero, R. 2006.** Hemocyanin lipid uptake in *Polybetes pythagoricus* is altered by fenitrothion. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 86: 57-62. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2005.11.006>
- Dar, M. A., Kaushika, G., & Villarreal-Chiub, J. F. 2019.** Pollution status and bioremediation of chlorpyrifos in environmental matrices by the application of bacterial communities: A review. *Journal of Environmental Management* 239: 124-136. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.03.048>
- Dawaliby, R., Trubbia, C., Delporte, C., Noyon, C., Ruyschaert, J.-M., Van Antwerpen, P., & Govaerts, C. 2016.** Phosphatidylethanolamine is a key regulator of membrane fluidity in eukaryotic cells. *Journal of Biological Chemistry* 291: 3658-3667. <https://doi.org/10.1074/jbc.m115.706523>
- Day, K. E., & Scott, J. M. 1990.** Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. *Aquatic Toxicology* 18: 101-113. [https://doi.org/10.1016/0166-445x\(90\)90021-g](https://doi.org/10.1016/0166-445x(90)90021-g)
- de Mendoza, D., & Pilon, M. 2019.** Control of membrane lipid homeostasis by lipid-bilayer associated sensors: A mechanism conserved from bacteria to humans. *Progress in Lipid Research* 76: 100996. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.100996>
- De Santis, A., Varela, Y., Sot, J., D'Errico, G., Goñi, F. M., & Alonso, A. 2018.** Omega-3 polyunsaturated fatty acids do not fluidify bilayers in the liquid-crystalline state. *Scientific Reports* 8: 16240. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34264-3>
- Degrendele, C., Okonski, K., Melymuk, L., Landlová, L., Kukucka, P., Audy, O., Kohoutek, J., Cupr, P., & Klánová, J. 2016.** Pesticides in the atmosphere: a comparison of gas-particle partitioning and particle size distribution of legacy and current-use pesticides. *Atmospheric Chemistry and Physics* 16: 1531-1544. <https://doi.org/10.5194/acp-16-1531-2016>
- Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J. M. 2007.** The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology* 52: 81-106. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>
- Deutsch, C. A., Tewksbury, J. J., H., R. B., S., K. S., Ghalambor, C. K., H., D. C., & Martin, P. R. 2008.** Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 6668-6672. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709472105>
- DeVito, J., & Formanowicz, D. R. 2003.** The effects of size, sex, and reproductive condition on thermal and desiccation stress in a riparian spider (*Pirata sedentarius*, Araneae, Lycosidae). *The Journal of Arachnology* 31: 278-284. <https://doi.org/10.1636/02-20>
- Ding, T., Zhang, Y., Zhu, Y., Du, S., Zhang, J., Cao, Y., Wang, Y., Wang, G., & He, L. 2019.** Deriving water quality criteria for China for the organophosphorus pesticides

- dichlorvos and malathion. *Environmental Science and Pollution Research* 26: 34622-34632. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06546-4>
- Dinter, A., & Poehling, H.-M. 1995.** Side-effects of insecticides on two erigonid spider species. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 74: 151-163. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1995.tb01887.x>
- Division on Earth Life Studies Board on Environmental Studies Committee on Biologic Markers (NRC). 1992.** Biologic markers in immunotoxicology. National Academies Press. ISBN: 0309043891. <https://doi.org/10.17226/1591>
- dos Santos Junior, V. C., Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., Fernandes, F. L., de Souza Tavares, W., Zanuncio, J. C., & Serr, J. E. 2020.** Histopathological and cytotoxic changes induced by spinosad on midgut cells of the non-target predator *Podisus nigrispinus* Dallas (Heteroptera: Pentatomidae). *Chemosphere* 238: 124585. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124585>
- Downer, R., & Matthews, J. 1976.** Patterns of lipid distribution and utilisation in insects. *American Zoologist* 16: 733-745. <https://doi.org/10.1093/icb/16.4.733>
- Duarte-Restrepo, E., Jaramillo-Colorado, B. E., & Duarte-Jaramillo, L. 2020.** Effects of chlorpyrifos on the crustacean *Litopenaeus vannamei*. *PLoS One* 15: e0231310. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231310>
- Duman, J. G. 1979.** Subzero temperature tolerance in spiders: the role of thermal-hysteresis-factors. *Journal of Comparative Physiology B* 352: 347-352. <https://doi.org/10.1007/bf00688810>
- Duman, J. G. 2001.** Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods. *Annual Review of Physiology* 63: 327-357. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.63.1.327>
- Duque, T., Schäfer, R. B., & Entling, M. H. 2023.** Which temperature matters? Effects of origin, rearing and test conditions on the chemical sensitivity of *Pardosa amentata*. *Journal of Applied Entomology* <https://doi.org/10.1111/jen.13219>
- Edwards, C. A., & Fisher, S. W. 1991.** The use of cholinesterase measurements in assessing the impact of pesticides on terrestrial and aquatic invertebrates. In P. Mineau (ed.), *Cholinesterase inhibiting insecticides – impacts on wildlife and environment*. Elsevier
- Eeman, M., & Deleu, M. 2010.** From biological membranes to biomimetic model membranes. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 14
- Egerton, J., Ostlind, D., Blair, L., Eary, C., Suhayda, D., Cifelli, S., Riek, R. a., & Campbell, W. 1979.** Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: efficacy of the B1a component. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 15: 372-378. <https://doi.org/10.1128/AAC.15.3.372>
- El-Gendy, I. R., El-Banobi, M. I., & Villanueva-Jimenez, J. A. 2021.** Bio-pesticides alternative diazinon to control peach fruit fly, *Bactrocera zonata* (Saunders) (Diptera: Tephritidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 31: 1-8. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00398-2>
- El-Khouly, N. M., Rahil, A. A., & Dwidar, E. F. 2016.** Effect of three insecticides on some biological and histological aspect of the spider *Anelosimus aulicus* (Koch). *Fayoum Journal of Agricultural Research and Development* 30: 37-52. <https://doi.org/10.21608/fjard.2016.191746>
- El-Saad, A. M. A., Kheirallah, D. A., & El-Samad, L. M. 2017.** Biochemical and histological biomarkers in the midgut of *Apis mellifera* from polluted environment at Beheira Governorate, Egypt. *Environmental Science and Pollution Research* 24: 3181–3193. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8059-1>

- Ellman, G. L., Courtney, K. O., Anders, V., & Featherstone, R. M. 1961.** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemistry and Pharmacology* 7: 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Elsharkawy, E. E., Yahia, D., & El-Nisr, N. A. 2013.** Sub-chronic exposure to chlorpyrifos induces hematological, metabolic disorders and oxidative stress in rat: attenuation by glutathione. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 35: 218-227. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.12.009>
- Engenheiro, E. L., Hankard, P. K., Sousa, J. P., Lemos, M. F., Weeks, J. M., & Soares, A. M. V. M. 2005.** Influence of dimethoate on acetylcholinesterase activity and locomotor function in terrestrial isopods. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 603-609. <https://doi.org/10.1897/04-131r.1>
- Environmental Protection Agency (EPA). 2010.** Ecological risk assessment evaluating Abamectin for the registration of a new end-use product (Agri-MekBSC Miticidel Insecticide) for use on almonds, walnuts, apples, avocados, celeriac, citrus, cotton, cucurbit, eruiting vegetables, grapes, herbs, hops, leafy vegetables, mint, pears, plums, prunes and potatoes. Code: 122804. United States of America.
- Environmental Protection Agency (EPA). 2012.** Pesticide product label. "Chlorpyrifos 2.5%". 12202012. United States of America. Online en: [https://www3.epa.gov/pesticides/chem\\_search/ppls/000829-00292-20121220.pdf](https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/ppls/000829-00292-20121220.pdf).
- Ernst, R., Ejsing, C. S., & Antonny, B. 2016.** Homeoviscous adaptation and the regulation of membrane lipids. *Journal of Molecular Biology* 428: 4776-4791. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.013>
- Eschrich, J., & Paul, R. J. 1991.** Fluoreszenzspektroskopische in-vivo-messungen des zustandes biologischer redoxsysteme in verschiedenen gewebe bei der vogelspinne *Eurypelma californicum*. *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft* 84: 407.
- Evans, S. C., Shaw, E. M., & Rypstra, A. L. 2010.** Exposure to a glyphosate-based herbicide affects agrobiont predatory arthropod behaviour and long-term survival. *Ecotoxicology* 19: 1249–1257. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0509-9>
- Everts, J. W., Willemsen, I., Stulp, M., Simons, L., Aukema, B., & Kammenga, J. 1991.** The Toxic effect of deltamethrin on linyphiid and erigonid spiders in connection with ambient temperature, humidity, and predation. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 20: 20-24. <https://doi.org/10.1007/bf01065323>
- Fairbrother, K. 1991.** Methods used in determination of cholinesterase activity. *Chemicals in Agriculture*: 35-72.
- Feder, M. E., & Hofmann, G. E. 1999.** Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology* 61: 243-282. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.61.1.243>
- Fernandes, F. L., Bacci, L., & Fernandes, M. S. 2010.** Impact and selectivity of insecticides to predators and parasitoids. *EntomoBrasilis* 3: 1-10. <https://doi.org/10.12741/ebrasilis.v3i1.52>
- Fernandes, M. E., Alves, F. M., Pereira, R. C., Aquino, L. A., Fernandes, F. L., & Zanuncio, J. C. 2016.** Lethal and sublethal effects of seven insecticides on three beneficial insects in laboratory assays and field trials. *Chemosphere* 156: 45-55. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.115>
- Fernando-Warnakulasuriya, G. J., Tsuchida, K., & Wells, M. A. 1988.** Effect of dietary lipid content on lipid transport and storage during larval development of *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry* 18: 211-214. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(88\)90025-x](https://doi.org/10.1016/0020-1790(88)90025-x)

- Ferretti, N. E., Arnedo, M., & González, A. 2018.** Impact of climate change on spider species distribution along the La Plata River basin, southern South America: projecting future range shifts for the genus *Stenoterommata* (Araneae, Mygalomorphae, Nemesiidae). *Annales Zoologici Fennici* 55: 123-133. <https://doi.org/10.5735/086.055.0112>
- Fisher, M. H., & Mroczek, H. 1992.** The chemistry and pharmacology of avermectins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 32: 537-553. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.32.1.537>
- Flohé, L., & Gunzler, W. A. 1984.** Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymology* 105: 114-121. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05015-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05015-1)
- Foelix, R. F. 2011.** *Biology of Spiders*, Harvard University Press. pp. 419. ISBN: 9780199734825, 0199734828.
- Foelix, R. F., & Chu-Wang, I. W. 1973.** The morphology of spider sensilla II. chemoreceptors. *Tissue and Cell* 5: 461-478. [https://doi.org/10.1016/S0040-8166\(73\)80038-2](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(73)80038-2)
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. 1957.** A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226: 497-509. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)64849-5)
- Foong, S. Y., Ma, N. L., Lam, S. S., Peng, W., Low, F., Lee, B. H. K., Alstrup, A. K. O., & Sonne, C. 2020.** A recent global review of hazardous chlorpyrifos pesticide in fruit and vegetables: Prevalence, remediation and actions needed. *Journal of Hazardous Materials* 400: 123006. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123006>
- Fountain, M. T., Brown, V. K., Gange, A. C., Symondson, W. O., & Murray, P. J. 2007.** The effects of the insecticide chlorpyrifos on spider and Collembola communities. *Pedobiologia* 51: 147-158. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2007.03.001>
- FSN. 2019.** Food Safety News (FSN). Eu votes against renew. Chlorpyrifos approval. Online en: <https://www.foodsafetynews.com/2019/12/eu-votes-against-renewingchlorpyrifos-approval/> (Consultada el: 5/2023)
- Fulton, M. H., & Key, P. B. 2001.** Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 20: 37-45. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200104>
- Furlong, M. J., Zu-Hua, S., Yin-Quan, L., Shi-Jian, G., Yao-Bin, L., Shu-Sheng, L., & Zalucki, M. P. 2004.** Experimental analysis of the influence of pest management practice on the efficacy of an endemic arthropod natural enemy complex of the diamondback moth. *Journal of Economic Entomology* 97: 1814-1827. <https://doi.org/10.1093/jee/97.6.1814>
- Gabellone, C., Molina, G., Arrighetti, F., Laino, A., & Garcia, C. F. 2022.** Behavioral, histological, and physiological evaluation of the effect of imidacloprid on the spider *Misumenops maculissparsus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 41: 2152-2161. <https://doi.org/10.1002/etc.5411>
- Gahalain, N., Chaudhary, J., Kumar, A., Sharma, S., & Jain, A. 2011.** Lipid peroxidation: an overview. *Methods* 3: 18.
- Galiano, M. E. 1971.** El desarrollo postembrionario larval en especies de genero *Polybetes* Simon, 1897 (Araneae, Sparassidae). *Acta Zool. Lilloana* 28: 221-225.
- Galloway, T., & Handy, R. 2003.** Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 12: 345-363. <https://doi.org/10.1023/a:1022579416322>

- Garcia, C. F., Cunningham, M., González-Baró, M. R., Garda, H., & Pollero, R. 2002a.** Effect of fenitrothion on the physical properties of crustacean lipoproteins. *Lipids* 37: 673-679. <https://doi.org/10.1007/s11745-002-0948-5>
- Garcia, C. F., Oviedo-Diego, M., Laino, A., Peterson, G., Mattoni, C. I., Peretti, A. V., & Ojanguren-Affilastro, A. A. 2021.** Low temperatures induce physiological changes in lipids, fatty acids and hydrocarbons, in two rare winter scorpions of genus *Urophonius* (Scorpiones, Bothriuridae). *Journal of Thermal Biology* 96: 102841. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.102841>
- Garcia, C. F., Ojanguren, A., Seoane, A., Iuri, H., Gambaro, R., Molina, G., & Laino, A. 2024.** First biochemical and behavioural analysis of the response of the scorpion *Urophonius brachycentrus* (Thorell: 1876) upon exposure to an organophosphate. *Medical and Veterinary Entomology* <https://doi.org/10.1111/mve.12716>
- Garcia, F., Gonzalez-Baro, M., & Pollero, R. 2002b.** Transfer of lipids between hemolymph and hepatopancreas in the shrimp *Macrobrachium borellii*. *Lipids* 37: 581-585. <https://doi.org/10.1007/s11745-002-0936-9>
- Garcia, F., Gonzalez-Baró, M. R., Garda, H., Cunningham, M., & Pollero, R. 2004.** Fenitrothion-induced structural and functional perturbations in the yolk lipoproteins of the shrimp *Macrobrachium borellii*. *Lipids* 39: 389-396. <https://doi.org/10.1007/s11745-004-1243-1>
- GBIF.org. 2023.** *Polybetes pythagoricus* (Holmberg, 1875). Global Biodiversity Information Facility World Spider Catalog, Online en: <https://www.gbif.org/species/2161942> (Consultada el: 10/2023)
- Gersschman, B. d. P., & Schiapelli, R. 1965.** El género *Polybetes* Simon, 1897, en la Argentina. (Araneae-Sparassidae). *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales* 1: 313-319.
- Gibbs, A., & Pomonis, J. G. 1995.** Physical properties of insect cuticular hydrocarbons: The effects of chain length, methyl-branching and unsaturation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 112: 243-249. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(95\)00081-X](https://doi.org/10.1016/0305-0491(95)00081-X)
- Giesy, J. P., Solomon, K. R., Cutler, G. C., Giddings, J. M., Mackay, D., Moore, D. R., Purdy, J., & Williams, W. M. 2014.** Ecological risk assessment of the uses of the organophosphorus insecticide chlorpyrifos, in the United States. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*: 1-11. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-03865-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-03865-0_1)
- Gilbert, L. I., & Chino, H. 1974.** Transport of lipids in insects. *Journal of Lipid Research* 15: 439-456. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)36764-x](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)36764-x)
- Gillooly, J. F., Brown, J. H., West, G. B., Savage, V. M., & Charnov, E. L. 2001.** Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science* 293: 2248-2251. <https://doi.org/10.1126/science.1061967>
- Giribet, G., & Edgecombe, G. D. 2019.** The phylogeny and evolutionary history of arthropods. *Current Biology* 29: R592-R602. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.04.057>
- Gomes, F. R., Chauí-Berlinck, J. G., Bicudo, J. E. P. W., & Navas, C. A. 2004.** Intraspecific relationships between resting and activity metabolism in anuran amphibians: influence of ecology and behavior. *Physiological and Biochemical Zoology* 77: 197-208. <https://doi.org/10.1086/38147>
- Gonçalves, A. M., Rocha, C. P., Marques, J. C., & Gonçalves, F. J. 2021.** Enzymes as useful biomarkers to assess the response of freshwater communities to pesticide exposure-



- A review. *Ecological Indicators* 122: 107303.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.107303>
- Gonzalez-Baro, M. d. R., Irazu, C. E., & Pollero, R. J. 1990.** Palmitoyl-CoA ligase activity in hepatopancreas and gill microsomes of the freshwater shrimp *Macrobrachium borellii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 97: 129-133. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(90\)90190-5](https://doi.org/10.1016/0305-0491(90)90190-5)
- Gonzalez-Baró, M. d. R., & Pollero, R. J. 1988.** Lipid characterization and distribution among tissues of the freshwater crustacean *Macrobrachium borellii* during an annual cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 91: 711-715. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(88\)90197-6](https://doi.org/10.1016/0305-0491(88)90197-6)
- Gonzalez-Baró, M. d. R., & Pollero, R. J. 1993.** Palmitic acid metabolism in hepatopancreas of the freshwater shrimp *Macrobrachium borellii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 106: 71-75.  
[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(93\)90009-t](https://doi.org/10.1016/0305-0491(93)90009-t)
- González-Baró, M. d. R., & Pollero, R. J. 1998.** Fatty acid metabolism of *Macrobrachium borellii*: dietary origin of arachidonic and eicosapentaenoic acids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 119: 747-752.  
[https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(98\)01028-9](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(98)01028-9)
- Goven, A. J., Fitzpatrick, L. C., Eyambe, G. S., Venables, B. J., & Cooper, E. L. 1993.** Cellular biomarkers for measuring toxicity of xenobiotics: Effects of polychlorinated biphenyls on earthworm *Lumbricus terrestris* coelomocytes. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12: 863-870. <https://doi.org/10.1002/etc.5620120510>
- Govers-Riemslog, J. W., Janssen, M. P., Zwaal, R. F., & Rosing, J. 1992.** Effect of membrane fluidity and fatty acid composition on the prothrombin-converting activity of phospholipid vesicles. *Biochemistry* 31: 10000-10008.  
<https://doi.org/10.1021/bi00156a020>
- Gracia, R. S., Bezlyepkina, N., Knorr, R. L., Lipowsky, R., & Dimova, R. 2010.** Effect of cholesterol on the rigidity of saturated and unsaturated membranes: fluctuation and electrodeformation analysis of giant vesicles. *Soft Matter* 6: 1472-1482.  
<https://doi.org/10.1039/b920629a>
- Guan, T., Feng, J., Zhu, Q., Wang, L., Xie, P., Wang, H., & Li, J. 2023.** Effects of abamectin on nonspecific immunity, antioxidation, and apoptosis in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Fish & Shellfish Immunology* 142: 109137.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.109137>
- Guschina, I. A., & Harwood, J. L. 2006.** Mechanisms of temperature adaptation in poikilotherms. *FEBS Letters* 580: 5477-5483.  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.06.066>
- Habig, W., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. 1974.** Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 22: 7130-7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)
- Halliwel, B., & Gutteridge, J. M. C. 2015.** Free radicals in biology and medicine, oxford university press. ISBN: 0198717482, 9780198717485.  
<https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>
- Harayama, T., & Riezman, H. 2018.** Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nature reviews Molecular cell biology* 19: 281-296.  
<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.138>
- Harrison, J. F., & Roberts, S. P. 2000.** Flight respiration and energetics. *Annual Review of Physiology* 62: 179-205. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.62.1.179>

- Harvey, J. A., & Dong, Y. 2023.** Climate change, extreme temperatures and sex-related responses in spiders. *Biology* 12: 615. <https://doi.org/10.3390/biology12040615>
- Hayes, J. D., & Pulford, D. J. 1995.** The glutathione s-transferase supergene family: regulation of *gst* and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 30: 445-600. <https://doi.org/10.3109/10409239509083491>
- Hayes, J. P., & O'Connor, C. S. 1999.** Natural selection on thermogenic capacity of high-altitude deer mice. *Evolution* 53: 1280-1287. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1999.tb04540.x>
- Hazel, J. R. 1995.** Thermal adaptation in biological membranes: Is homeoviscous adaptation the explanation? *Annual Review of Physiology* 57: 19-42. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.57.030195.000315>
- Hazel, J. R. 1997.** Thermal adaptation in biological membranes: beyond homeoviscous adaptation, pp. 57-101, *Advances in molecular and cell biology*, vol. 19. Elsevier [https://doi.org/10.1016/s1569-2558\(08\)60075-2](https://doi.org/10.1016/s1569-2558(08)60075-2)
- Hazel, J. R., & Williams, E. E. 1990.** The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment *Progress in Lipid Research* 29: 167-227. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(90\)90002-3](https://doi.org/10.1016/0163-7827(90)90002-3)
- Hazell, S. P., & Bale, J. S. 2011.** Low temperature thresholds: are chill coma and CTmin synonymous? *Journal of Insect Physiology* 57: 1085-1089. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.04.004>
- Hermes-Lima, M., Ramos-VAconcelos, G. R., Cardoso, L. A., Rivera, P. M., & Drew, K. L. 2004.** Animal adaptability to oxidative stress: gastropod estivation and mammalian hibernation, life in the cold: evolution, mechanisms, adaptation, and application. twelfth international hibernation symposium. *Biological Papers of the University of Alaska*.
- Hobson, R. P. 1935.** On a fat-soluble growth factor required by blow-fly larvae: identity of the growth factor with cholesterol. *Biochemical Journal* 29: 2023.
- Hodková, M., Šimek, P., Zahradníčková, H., & Nováková, O. 1999.** Seasonal changes in the phospholipid composition in thoracic muscles of a heteropteran, *Pyrrhocoris apterus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29: 367-376. [https://doi.org/10.1016/s0965-1748\(99\)00011-9](https://doi.org/10.1016/s0965-1748(99)00011-9)
- Hoffmann, A. A., Chown, S. L., & Clusella-Trullas, S. 2013.** Upper thermal limits in terrestrial ectotherms: how constrained are they? *Functional Ecology* 27: 934-949. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2012.02036.x>
- Holm, T. 1999.** Aspects of the mechanism of the flame ionization detector. *Journal of Chromatography A* 842: 221-227. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(98\)00706-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(98)00706-7)
- Holmstrup, M., Bindesbøl, A.-M., Oostingh, G. J., Duschl, A., Scheil, V., Köhler, H.-R., Loureiro, S., Soares, A. M., Ferreira, A. L., & Kienle, C. 2010.** Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: a review. *Science of The Total Environment* 408: 3746-3762. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.067>
- Hong, Y., Yin, H., Huang, Y., Huang, Q., & Yang, X. 2020.** Immune response to abamectin-induced oxidative stress in Chinese mitten crab, *Eriocheirsinensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 188: 109889.
- Houslay, M. D., & Gordon, L. M. 1983.** The activity of adenylate cyclase is regulated by the nature of its lipid environment, pp. 179-231, *Current topics in membranes and transport*, vol. 18. Elsevier [https://doi.org/10.1016/s0070-2161\(08\)60531-6](https://doi.org/10.1016/s0070-2161(08)60531-6)

- Howell III, G. E., Kondakala, S., Holdridge, J., Lee, J. H., & Ross, M. K. 2018.** Inhibition of cholinergic and non-cholinergic targets following subacute exposure to chlorpyrifos in normal and high fat fed male C57BL/6J mice. *Food and Chemical Toxicology* 118: 821-829. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.06.051>
- Huang, P., Du, J., Cao, L., Gao, J., Li, Q., Sun, Y., Shao, N., Zhang, Y., & Xu, G. 2023.** Effects of prometryn on oxidative stress, immune response and apoptosis in the hepatopancreas of *Eriocheir sinensis* (Crustacea: Decapoda). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 262: 115159. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115159>
- Huang, X., Cui, H., & Duan, W. 2020.** Ecotoxicity of chlorpyrifos to aquatic organisms: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 200: 110731. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110731>
- Huang, Y., Zhang, W., Pang, S., Chen, J., Bhatt, P., Mishra, S., & Chen, S. 2021.** Insights into the microbial degradation and catalytic mechanisms of chlorpyrifos. *Environmental Research* 194: 110660. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110660>
- Hyne, R. V., & Maher, W. A. 2003.** Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 366–374. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00119-7](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00119-7)
- Ingemansson, T., Olsson, N., & Kaufmann, P. 1993.** Lipid composition of light and dark muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after thermal acclimation: a multivariate approach. *Aquaculture* 113: 153-165. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90348-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90348-3)
- Isbister, G. K., & Gray, M. R. 2003.** Latrodectism: a prospective cohort study of bites by formally identified redback spiders. *Medical journal of Australia* 179: 88-91. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.2003.tb05640.x>
- Jasmine, R. S., Kuttalam, S., & Stanley, J. 2008.** Bio-efficacy and safety of abamectin against two spotted spider mite and its predatory mite on rose. *Annals of Plant Protection Sciences* 16: 46-52.
- Jena, K., Kar, P. K., Kausar, Z., & Babu, C. S. 2013.** Effects of temperature on modulation of oxidative stress and antioxidant defenses in testes of tropical tasar silkworm *Antheraea mylitta*. *Journal of Thermal Biology* 38: 199-204. <https://doi.org/10.1242/jeb.199.7.1483>
- Jia, F.-X., Dou, W., Hu, F., & Wang, J.-J. 2011.** Effects of thermal stress on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist* 94: 956-963.
- Jing, X., & Behmer, S. T. 2020.** Insect sterol nutrition: physiological mechanisms, ecology, and applications. *Annual Review of Entomology* 65: 251-271. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-025017>
- Joanisse, D. R., & Storey, K. B. 1996a.** Fatty acid content and enzymes of fatty acid metabolism in overwintering cold-hardy gall insects. *Physiological and Biochemical Zoology* 69: 1079-1095. <https://doi.org/10.1086/physzool.69.5.30164247>
- Joanisse, D. R., & Storey, K. B. 1996b.** Oxidative stress and antioxidants in overwintering larvae of cold-hardy goldenrod gall insects. *Journal of Experimental Biology* 199: 1483-1491. <https://doi.org/10.1242/jeb.199.7.1483>
- John, E. M., & Shaik, J. M. 2015.** Chlorpyrifos: pollution and remediation. *Environmental Chemistry Letters* 13: 269–291. <https://doi.org/10.1007/s10311-015-0513-7>
- Juárez, M. P., Pedrini, N., Girotti, J. R., & Mijailovsky, S. J. 2010.** Pyrethroid resistance in Chagas disease vectors: The case of *Triatoma infestans* cuticle. Review, pp. 59-61, *Resistant Pest Management Newsletter*. Center for Integrated Plant Systems (CIPS)

Insecticide Resistance Action Committee (IRAC) Western Regional Coordinating Committee (WRCC-60).

- Juárez, P. 1994.** Inhibition of cuticular lipid synthesis and its effect on insect survival. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 25: 177-191. <https://doi.org/10.1002/arch.940250302>
- Jumbam, K. R., Terblanche, J. S., Deere, J. A., Somers, M. J., & Chown, S. L. 2008.** Critical thermal limits and their responses to acclimation in two sub-Antarctic spiders: *Myro kerguelenensis* and *Prinerigone vagans*. *Polar Biology* 31: 215-220. <https://doi.org/10.1007/s00300-007-0349-0>
- Kalita, M. K., Haloi, K., & Devi, D. 2016.** Larval exposure to chlorpyrifos affects nutritional physiology and induces genotoxicity in silkworm *Philosamia ricini* (lepidoptera: saturniidae). *Frontiers in Physiology* 7: 535. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00535>
- Kamal, A., Ahmad, F., & Shafeeque, M. A. 2020.** Toxicity of pesticides to plants and non-target organism: A comprehensive review. *Iranian Journal of Plant Physiology* 10: 3299-3313.
- Kammon, A. M., Brar, R. S., Banga, H. S., & Sodhi, S. 2010.** Patho-biochemical studies on hepatotoxicity and nephrotoxicity on exposure to chlorpyrifos and imidacloprid in layer chickens. *Veterinarski arhiv* 80: 663-672.
- Kanazawa, A., & Koshio, S. 1994.** Lipid nutrition of the spiny lobster *Panulirus japonicus* (Decapoda, Palinuridae): a review. *Crustaceana*: 226-232. <https://doi.org/10.1163/156854094x00585>
- Kaunisto, S., Ferguson, L. V., & Sinclair, B. J. 2016.** Can we predict the effects of multiple stressors on insects in a changing climate? *Current Opinion in Insect Science* 17: 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2016.07.001>
- Kehrer, J. P. 1993.** Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology* 23: 21-48. <https://doi.org/10.3109/10408449309104073>
- Kehrer, J. P., & Klotz, L. 2015.** Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for health. *Critical Reviews in Toxicology* 45: 765-798. <https://doi.org/10.3109/10408444.2015.1074159>
- Kelleher, M. J., Rickards, J., & Storey, K. B. 1987.** Strategies of freeze avoidance in larvae of the goldenrod gall moth, *Epiblema scudderiana* laboratory investigations of temperature cues in the regulation of cold hardiness. *Journal of Insect Physiology* 33: 581-586. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(87\)90073-4](https://doi.org/10.1016/0022-1910(87)90073-4)
- Khalil, A. M. 2015.** Toxicological effects and oxidative stress responses in freshwater snail, *Lanistes carinatus*, following exposure to chlorpyrifos. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 116: 137-142. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.03.010>
- Khalil, M. S. 2013.** Abamectin and azadirachtin as eco-friendly promising biorational tools in integrated nematodes management programs. *Journal of Plant Pathology & Microbiology* 4: 1-7. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000174>
- Kidd, P. M. 1997.** Glutathione: Systemic Protectant Against Oxidative and Free Radical Damage. *Alternative Medicine Review* 2: 155-176.
- Klotz, L., & Steinbrenner, H. 2017.** Cellular adaptation to xenobiotics: Interplay between xenosensors, reactive oxygen species and FOXO transcription factors. *Redox biology* 13: 646-654. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.07.015>
- Klowden, M. J. 2013.** *Physiological systems in insects.* Academic press. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-04120-0>

- Kostal, V., & Simek, P. 1998.** Changes in fatty acid composition of phospholipids and triacylglycerols after cold-acclimation of an aestivating insect prepupa. *Journal of Comparative Physiology B*. 168: 453-460. <https://doi.org/10.1007/s003600050165>
- Košťál, V., Urban, T., Římnáčová, L., Berková, P., & Šimek, P. 2013.** Seasonal changes in minor membrane phospholipid classes, sterols and tocopherols in overwintering insect, *Pyrrhocoris apterus*. *Journal of Insect Physiology* 59: 934-941. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.06.008>
- Košťál, V. r., Berková, P., & Šimek, P. 2003.** Remodelling of membrane phospholipids during transition to diapause and cold-acclimation in the larvae of *Chymomyza costata* (Drosophilidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 135: 407-419. [https://doi.org/10.1016/s1096-4959\(03\)00117-9](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(03)00117-9)
- Kovats, E. 1965.** Gas chromatographic comparison of organic substances in the retention index system. *Advances in Chromatography* 1: 229-247.
- Kralj, M. B., Černigoj, U., Franko, M., & Trebše, P. 2007.** Comparison of photocatalysis and photolysis of malathion, isomalathion, malaoxon, and commercial malathion-- products and toxicity studies. *Water Research* 41 4504–4514. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.016>
- Kukal, O., Serianni, A. S., & Duman, J. G. 1988.** Glycerol metabolism in a freeze-tolerant arctic insect: an in vivo <sup>13</sup>C NMR study. *Journal of Comparative Physiology B* 158: 175-183. <https://doi.org/10.1007/BF01075831>
- Kültz, D. 2020.** Defining biological stress and stress responses based on principles of physics. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology* 333: 350-358. <https://doi.org/10.1002/jez.2340>
- Kumar, A., Satpathy, S., Singh, T., Singh, R., & Pandey, A. 2020.** Integrated pest management of major vegetable crops: A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 8: 2271-2280.
- Laino, A. 2011.** Bioquímica y fisiología de lipoproteínas en arácnidos. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata, La Plata. <https://doi.org/10.35537/10915/35196>
- Laino, A., & Garcia, C. F. 2020.** Study of the effect of cypermethrin on the spider *Polybetes pythagoricus* in different energy states. *Pesticide Biochemistry and Physiology* <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104559>
- Laino, A., Garcia, C. F., & Cunningham, M. 2015a.** Protein characterization and fatty acid composition of VHDL subfraction II of the spider *Polybetes pythagoricus*. *Biocell* 39: 33-40.
- Laino, A., Cunningham, M. L., Garcia, F., & Heras, H. 2009.** First insight into the lipid uptake, storage and mobilization in arachnids: role of midgut diverticula and lipoproteins. *Journal of Insect Physiology* 55: 1118-1124. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.08.005>
- Laino, A., Cunningham, M. L., Heras, H., & Garcia, F. 2011a.** In vitro lipid transfer between lipoproteins and midgut-diverticula in the spider *Polybetes pythagoricus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 160: 181-186. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.08.003>
- Laino, A., Cunningham, M. L., Heras, H., & Garcia, F. 2011b.** Isolation and characterization of two vitellins from eggs of the spider *Polybetes pythagoricus* (Araneae: Sparassidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 158: 142-148. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.11.001>
- Laino, A., Cunningham, M., Garcia, F., & Trabalon, M. 2020.** Residual vitellus and energetic state of wolf spiderlings *Pardosa saltans* after emergence from egg-sac until first

- predation. *Journal of Comparative Physiology B, Biochemical, systemic, and environmental physiology* 190: 261-274. <https://doi.org/10.1007/s00360-020-01265-6>
- Laino, A., Mattoni, C., Ojanguren-Affilastro, A., Cunningham, A., & Garcia, F. 2015b.** Analysis of lipid and fatty acid composition of three species of scorpions with relation to different organs. *Comparative Biochemistry and Physiology* 190: 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2015.08.005>
- Laino, A., Lavarias, S., Suarez, G., Lino, A., & Cunningham, M. 2015c.** Characterization of phenoloxidase activity from spider *Polybetes pythagoricus* hemocyanin. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology* 323: 547-555. <https://doi.org/10.1002/jez.1947>
- Laino, A., Romero, S., Cunningham, M., Molina, G., Gabellone, C., Trabalon, M., & Garcia, C. F. 2021.** Can wolf spider mothers detect insecticides in the environment? Does the silk of the egg-sac protect juveniles from insecticides? *Environmental Toxicology and Chemistry* 40: 2861-2873. <https://doi.org/10.1002/etc.5157>
- Laino, A., Lopez-Zavala, A. A., Garcia-Orozco, K. D., Carrasco-Miranda, J. S., Santana, M., Stojanoff, V., Sotelo-Mundo, R. R., & Garcia, C. F. 2017.** Biochemical and structural characterization of a novel arginine kinase from the spider *Polybetes pythagoricus*. *Peer J*. 5: e3787. <https://doi.org/10.7717/peerj.3787>
- Lalouette, L., Williams, C., Hervant, F., Sinclair, B. J., & Renault, D. 2011.** Metabolic rate and oxidative stress in insects exposed to low temperature thermal fluctuations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 158: 229-234. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.11.007>
- Lane, R. P. 1993.** Introduction to the arthropods, pp. 30-47, *Medical Insects and Arachnids*. Springer [https://doi.org/10.1007/978-94-011-1554-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-011-1554-4_2)
- Laskowski, R., Bednarska, A. J., Kramarz, P. E., Loureiro, S., Scheil, V., Kudtek, J., & Holmstrup, M. 2010.** Interactions between toxic chemicals and natural environmental factors—A meta-analysis and case studies. *Science of The Total Environment* 408: 3763-3774. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.01.043>
- Lasota, J. A., & Dybas, R. A. 1991.** Avermectins, a novel class of compounds: implications for use in arthropod pest control. *Annual Review of Entomology* 36: 91-117. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.36.1.91>
- Lavarías, S., Arrighetti, F., & Siri, A. 2017.** Histopathological effects of cypermethrin and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on midgut of *Chironomus calligraphus* larvae (Diptera: Chironomidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 139: 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.04.002>
- Lavarías, S., Garcia, C. F., Crespo, R., Pedrini, N., & Heras, H. 2013.** Study of biochemical biomarkers in freshwater prawn *Macrobrachium borellii* (Crustacea: Palaemonidae) exposed to organophosphate fenitrothion. *Ecotoxicology Environmental Safety* 96: 10-16. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.05.040>
- Lavarías, S. M. L., Colpo, K., Landro, S. M., Ambrosio, E. S., Capítulo, A. R., & Arrighetti, F. 2022.** Deleterious effects of two pesticide formulations with different toxicological mechanisms in the hepatopancreas of a freshwater prawn. *Chemosphere* 286: 131920. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131920>
- Lebrun, J. D., De Jesus, K., Rouillac, L., Ravelli, M., Guenne, A., & Tournebize, J. 2020.** Single and combined effects of insecticides on multi-level biomarkers in the non-target amphipod *Gammarus fossarum* exposed to environmentally realistic levels. *Aquatic Toxicology* 218: 105357. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105357>

- Lee, K. P., & Roh, C. 2010.** Temperature-by-nutrient interactions affecting growth rate in an insect ectotherm. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 136: 151-163. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2010.01018.x>
- Levin, S. A. 2013.** *Encyclopedia of Biodiversity*, vol. 1, Elsevier Science. pp. 219. ISBN: 0123847192.
- Li, M., Wei, X.-M., Li, J., Wei, S.-M., Zhang, J.-L., Chen, G.-H., & Zhang, X.-M. 2023.** Effect of short-term exposure to high temperatures on the reproductive behavior and physiological enzyme activities in the fruit fly *Zeugodacus tau* (Walker). *Frontiers in Physiology* 14: 1036397. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1036397>
- Liang, P., Ning, J., Wang, W., Zhu, P., Gui, L., Xie, W., & Zhang, Y. 2023.** Catalase promotes whitefly adaptation to high temperature by eliminating reactive oxygen species. *Insect Science* 30: 1293-1308. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.13157>
- Logue, J. A., De Vries, A. L., Fodor, E., & Cossins, A. R. 2000.** Lipid compositional correlates of temperature-adaptive interspecific differences in membrane physical structure. *Journal of Experimental Biology* 203: 2105-2115. <https://doi.org/10.1242/jeb.203.14.2105>
- Longley, M., & Jepson, P. C. 1996.** Effects of honeydew and insecticide residues on the distribution of foraging aphid parasitoids under glasshouse and field conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 81: 189-198. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1996.tb02031.x>
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry* 193: 265-275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Lu, Q., Xu, S., Hao, Z., Li, Y., Huang, Y., Ying, S., Jing, W., Zou, S., Xu, Y., & Wang, H. 2023.** Dinotefuran exposure induces autophagy and apoptosis through oxidative stress in *Bombyx mori*. *Journal of Hazardous Materials* 458: 131997. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131997>
- Ludwig, M., & Alberti, G. 1988.** Mineral congregations, “spherites” in the midgut gland of *Coelotes terrestris* (Araneae): structure, composition and function. *Protoplasma* 143: 43-50.
- Lukaszewicz-Hussain, A. 2010.** Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity—Short review. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98: 145-150.
- Lumaret, J.-P., Errouissi, F., Floate, K., Rombke, J., & Wardhaugh, K. 2012.** A review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in terrestrial and aquatic environments. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 13: 1004-1060. <https://doi.org/10.2174/138920112800399257>
- Luo, J., Zhou, Q., Zhang, X., Zhu, T., Zhang, Y., Yang, Z., Guo, C., Xie, S., Lu, J., & Yuan, Y. 2021.** Dietary zinc levels affects lipid and fatty acid metabolism in hepatopancreas of mud crab (*Scylla paramamosain*). *Aquaculture* 545: 737274. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737274>
- Macauley, S. K., Billheimer, J., & Ritter, K. 1986.** Sterol substrate specificity of acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase from the corn earworm, *Heliothis zea*. *Journal of Lipid Research* 27: 64-71. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)38866-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)38866-0)
- Mackay, D., Giesy, J. P., & Solomon, K. R. 2014.** Fate in the environment and long-range atmospheric transport of the organophosphorus insecticide, chlorpyrifos and its oxon. Ecological risk assessment for chlorpyrifos in terrestrial and aquatic systems in the United States: 35-76. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-03865-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-03865-0_3)

- Maharajan, A., Narayanasamy, Y., Ganapiriya, V., & Shanmugavel, K. 2015.** Histological alterations of a combination of Chlorpyrifos and Cypermethrin (Nurocombi) insecticide in the fresh water crab, *Paratelphusa jacquemontii* (Rathbun). The Journal of Basic & Applied Zoology 72: 104-112. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2015.08.002>
- Makwana, P., Rahul, K., Chattopadhyaya, S., & Shivaprasad, V. 2021.** Effect of thermal stress on antioxidant responses in *Bombyx mori*. Chemical Science Review and Letters 10: 288-294.
- Malmos, K. G., Lüdeking, A. H., Vosegaard, T., Aagaard, A., Bechsgaard, J., Sørensen, J. G., & Bilde, T. 2021.** Behavioural and physiological responses to thermal stress in a social spider. Functional Ecology 35: 2728-2742. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13921>
- Mansour, F. 1984.** A malathion-tolerant strain of the spider *Chiracanthium mildei* and its response to chlorpyrifos. Phytoparasitica 12: 163-166. <https://doi.org/10.1007/bf02981168>
- Mao, K., Jin, R., Li, W., Ren, Z., Qin, X., He, S., Li, J., & Wan, H. 2019a.** The influence of temperature on the toxicity of insecticides to *Nilaparvata lugens* (Stål). Pesticide Biochemistry and Physiology 156: 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.02.009>
- Mao, T., Li, F., Fang, Y., Wang, H., Chen, J., Li, M., Lu, Z., Qu, J., Li, J., & Hu, J. 2019b.** Effects of chlorantraniliprole exposure on detoxification enzyme activities and detoxification-related gene expression in the fat body of the silkworm, *Bombyx mori*. Ecotoxicology and Environmental Safety 176: 58-63. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.074>
- Matthews, G., Bateman, R., & Miller, P. 2000.** Pesticide application methods, John Wiley & Sons. ISBN: 1118351304. <https://doi.org/10.1002/9780470760130>
- Mesnager, R., & Antoniou, M. N. 2018.** Ignoring Adjuvant Toxicity Falsifies the Safety Profile of Commercial Pesticides. Frontiers in Public Health 5 <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00361>
- Miao, L., Nielsen, M., Thewalt, J., Ipsen, J. H., Bloom, M., Zuckermann, M. J., & Mouritsen, O. G. 2002.** From lanosterol to cholesterol: structural evolution and differential effects on lipid bilayers. Biophysical Journal 82: 1429-1444. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75497-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75497-0)
- Michalko, R., & Košulič, O. 2016.** Temperature-dependent effect of two neurotoxic insecticides on predatory potential of *Philodromus* spiders. Journal of Pest Science 89: 517-527. <https://doi.org/10.1007/s10340-015-0696-5>
- Michalko, R., Pekár, S., & Entling, M. H. 2019.** An updated perspective on spiders as generalist predators in biological control. Oecologia 189: 21-36. <https://doi.org/10.1007/s00442-018-4313-1>
- Michalková, V., & Pekár, S. 2009.** How glyphosate altered the behaviour of agrobiont spiders (Araneae: Lycosidae) and beetles (Coleoptera: Carabidae). Biological Control 51 444-449. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.08.003>
- Milatovic, D., Gupta, R. C., & Aschner, M. 2006.** Anticholinesterase toxicity and oxidative stress. The Scientific World Journal 6: 295-310. <https://doi.org/10.1100/tsw.2006.38>
- Miller, J. M. 2005.** Chromatography: concepts and contrasts, John Wiley & Sons. pp. 520. ISBN: 0471980595, 9780471980599.
- Miller, T. W., Chaiet, L., Cole, D. J., Cole, L. J., Flor, J. E., Goegelman, R. T., Gullo, V. P., Joshua, H., Kempf, A. J., & Krellwitz, W. R. 1979.** Avermectins, new family of potent



- anthelmintic agents: isolation and chromatographic properties. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 15: 368-371. <https://doi.org/10.1128/AAC.15.3.368>
- Ministry of Agriculture and Rural Affairs. 2013.** Announcement No. 2032 (In Chinese). People's Republic of China, Online en: [http://www.moa.gov.cn/govpublic/ZZYGLS/201312/t20131219\\_3718683.htm](http://www.moa.gov.cn/govpublic/ZZYGLS/201312/t20131219_3718683.htm) (Consultada el: 05/2023)
- Misra, H. P., & Fridovich, I. 1972.** The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry* 247: 3170-3175. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)45228-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)45228-9)
- Morrison, W. R., & Smith, L. M. 1964.** Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *Journal of Lipid Research* 5: 600-608. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)40190-7](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)40190-7)
- Motoyama, N., Suganuma, T., & Maekoshi, Y. 1992.** Proc. of the Second International Workshop. Biochemical and Physiological Characteristics of Insecticide Resistance in Diamondback Moth, pp. 411-418. *In*, Diamondback Moth and Other Crucifer Pests, 1992, AVRDC, Tainan, Taiwan. Proc. of the Second International Workshop.
- Mullié, W. C., & Everts, J. W. 1991.** Uptake and elimination of [<sup>14</sup>C]deltamethrin by *Oedothorax apicatus* (Arachnida; Erigonidae) with respect to bioavailability. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 39: 27-34. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(91\)90210-D](https://doi.org/10.1016/0048-3575(91)90210-D)
- Mustafa, A., Butt, A., Tahir, H. M., & Bilal, M. 2011.** Susceptibility of wolf spider, *Lycosa terrestris* (Araneae: Lycosidae) to chlorpyrifos. *Pakistan Journal of Zoology* 43
- Najafinobar, N., Mellander, L. J., Kurczy, M. E., Dunevall, J., Angerer, T. B., Fletcher, J. S., & Cans, A.-S. 2016.** Cholesterol alters the dynamics of release in protein independent cell models for exocytosis. *Sci Rep* 6: 33702. <https://doi.org/10.1038/srep33702>
- Nam, T. 2011.** Lipid peroxidation and its toxicological implications. *Toxicological research* 27: 1-6. <https://doi.org/10.5487/TR.2011.27.1.001>
- Narra, M. R. 2014.** Tissue-specific recovery of oxidative and antioxidant effects of chlorpyrifos in the freshwater crab, *Barytelphusa guerini*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 67: 158-166. <https://doi.org/10.1007/s00244-014-0010-1>
- Nassar, A. M. K. 2016.** Acetylcholinesterase: a universal toxicity biomarker. *Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 15: 28.
- Ndava, J., Llera, S. D., & Manyanga, P. 2018.** The future of mosquito control: The role of spiders as biological control agents: A review. *International Journal of Mosquito research* 5: 6-11.
- Negro, C. L., & Collins, P. 2017.** Histopathological effects of chlorpyrifos on the gills, hepatopancreas and gonads of the freshwater crab *Zilchiopsis collastinensis*. Persistent effects after exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 140: 116-122. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.030>
- Nelson, D. L., & Lehninger, A. L. 2009.** Lehninger: Principípios de Bioquímica, 5ta ed. Ediciones Omega. Barcelona. ISBN: 978-84-282-1486-5.
- Newman, M. C. 2015.** Fundamentals of Ecotoxicology, CRC press. ISBN: 1439883122.
- Nguyen Hong, S., Viet, T. Q., Dang Hoang, O., Do Phuong, C., Lan Huong, B., Dinh Tien, D., & Nguyen Huy, M. 2015.** Acute toxic and hepatopancreas syndrome caused by Chlorpyrifos ethyl to black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and white shrimp

- (*Litopenaeus vannamei*) in Mekong River Delta of Vietnam. *International Journal of Agricultural Technology* 11: 1097-1108.
- Nyffeler, M., & Sunderland, K. D. 2003.** Composition, abundance and pest control potential of spider communities in agroecosystems: a comparison of European and US studies. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 95: 579–612. [https://doi.org/10.1016/s0167-8809\(02\)00181-0](https://doi.org/10.1016/s0167-8809(02)00181-0)
- O´Connor, J. M., & Gilbert, L. I. 1968.** Aspects of lipid metabolism in crustaceans. *American Zoologist* 8: 529-539. <https://doi.org/10.1093/icb/8.3.529>
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. 1979.** Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Annales of Biochemistry* 95: 351-358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Ohtsu, T., Katagiri, C., Kimura, M. T., & Hori, S. H. 1993.** Cold-adaptations in *Drosophila*: qualitative changes of triacylglycerols with relation to over-wintering. *Journal of Biological Chemistry* 268: 1830-1834. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)53929-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)53929-6)
- Oliveira, H., Soto-Giraldo, A., & Hernández-García, R. G. 2020.** Acaricides sublethal effects are more harmful to predatory mite *Phytoseiulus macropilis* Banks (Acari: Phytoseiidae) than to the pest *Tetranychusurticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural* 24: 43-52. <https://doi.org/10.17151/bccm.2020.24.2.3>
- Oraze, M. J., & Grigarick, A. A. 1989.** Biological control of aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) and midges (Diptera: Chironomidae) by *Pardosa ramulosa* (Araneae: Lycosidae) in California rice fields. *Journal of Economic Entomology* 82: 745-749. <https://doi.org/10.1093/jee/82.3.745>
- Ørsted, M., Jørgensen, L. B., & Overgaard, J. 2022.** Finding the right thermal limit: a framework to reconcile ecological, physiological and methodological aspects of CTmax in ectotherms. *Journal of Experimental Biology* 225: jeb244514. <https://doi.org/10.1242/jeb.244514>
- Ostlind, D., Cifelli, S. a., & Lang, R. 1979.** Insecticidal activity of the anti-parasitic avermectins. <https://doi.org/10.1136/vr.105.8.168-a>
- Overgaard, J., SØRENSEN, J. G., Petersen, S. O., Loeschcke, V., & Holmstrup, M. 2006.** Reorganization of membrane lipids during fast and slow cold hardening in *Drosophila melanogaster*. *Physiological Entomology* 31: 328-335. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2006.00522.x>
- Overgaard, J., Tomčala, A., Sørensen, J. G., Holmstrup, M., Krogh, P. H., Šimek, P., & Košťál, V. 2008.** Effects of acclimation temperature on thermal tolerance and membrane phospholipid composition in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* 54: 619-629. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.12.011>
- Paaijmans, K. P., Heinig, R. L., Seliga, R. A., Blanford, J. I., Blanford, S., Murdock, C. C., & Thomas, M. B. 2013.** Temperature variation makes ectotherms more sensitive to climate change. *Global Change Biology* 19: 2373-2380. <https://doi.org/10.1111/gcb.12240>
- Panchuk, J., Schwerdt, L., & Ferretti, N. 2023.** Differences between thermal preference and thermal performance in a wintry spider *Mecicobothrium thorelli*: Are the spiders under evolutionary pressures on their seasonal activity? *Canadian Journal of Zoology* <https://doi.org/10.1139/cjz-2023-0059>

- Pang, X., Shao, F., Ding, S. H., Fu, S. J., & Zhang, Y. G. 2020.** Interspecific differences and ecological correlations of energy metabolism traits in freshwater fishes. *Functional Ecology* 34: 616-630. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13505>
- Paul, R. J. 1990.** La respiration des arachnides. *La Recherche* 226: 1338-1347.
- Pedersen, L., Dall, L. G., Sørensen, B. C., Mayntz, D., & Toft, S. 2002.** Effects of hunger level and nutrient balance on survival and acetylcholinesterase activity of dimethoate exposed wolf spiders. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 103: 197-204. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2002.00976.x>
- Pedrini, N., Mijailovsky, S. J., Girotti, J. R., Stariolo, R., Cardozo, R. M., Gentile, A., & Juárez, M. P. 2009.** Control of pyrethroid-resistant chagas disease vectors with entomopathogenic fung. *Plos Neglected Tropical Diseases* 3: e434. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000434>
- Pekár, S. 2012.** Spiders (Araneae) in the pesticide world: an ecotoxicological review. *Pest Management Science* <https://doi.org/10.1002/ps.3397>
- Pekár, S., & Haddad, C. R. 2005.** Can agrobiont spiders (Araneae) avoid a surface with pesticide residues? *Pest Management Science* 61: 1179-1185. <https://doi.org/10.1002/ps.1110>
- Pekár, S., & Benes, J. 2008.** Aged pesticide residues are detrimental to agrobiont spiders (Araneae). *Journal of Applied Entomology* <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2008.01294.x>
- Perez, R., & Aron, S. 2020.** Adaptations to thermal stress in social insects: recent advances and future directions. *Biological Reviews* 95: 1535-1553. <https://doi.org/10.1111/brv.12628>
- Pimentel, D. 1995.** Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and environmental Ethics* 8: 17-29. <https://doi.org/10.1007/bf02286399>
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. 2017.** Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017 <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Plata-Rueda, A., Martins de Menezesa, C. H., dos Santos Cunha, W., Alvarenga, T. M., Barbosa, B. F., Zanuncio, J. C., Martínez, L. C., & Serrão, J. E. 2020.** Side-effects caused by chlorpyrifos in the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chemosphere*: 127530. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.12>
- Pong, S.-S., DeHaven, R., & Wang, C. C. 1982.** A comparative study of avermectin B1a and other modulators of the gamma-aminobutyric acid receptor. chloride ion channel complex. *Journal of Neuroscience* 2: 966-971.
- Posit team. 2023.** RStudio: Integrated Development Environment for R, Posit Software, PBC, Boston, MA. Online en: <http://www.posit.co/>
- Potts, L. J., Košťál, V., Simek, P., & Teets, N. M. 2020.** Energy balance and metabolic changes in an overwintering wolf spider, *Schizocosa stridulans*. *Journal of Insect Physiology* 126: 104112. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2020.104112>
- Prestwich, K. N. 1988.** The constraints on maximal activity in spiders: II. Limitations imposed by phosphagen depletion and anaerobic metabolism. *Journal of Comparative Physiology B* 158: 449-456.
- Punzo, F. 1991.** Intraspecific variation in responses to thermal stress in the tarantula, *Dugesiella echina* Chamberlin (Orthognatha, Theraphosidae). *Bulletin of the British Arachnological Society* 8: 277-283.

- Purdy, P., Fox, M., & Graham, J. 2005.** The fluidity of Chinese hamster ovary cell and bull sperm membranes after cholesterol addition. *Cryobiology* 51: 102-112. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.05.004>
- R Core Team. 2023.** R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Online en: <https://www.R-project.org/> (Consultada el: 11/2023)
- Raj, A., & Kumar, A. 2022.** Recent advances in assessment methods and mechanism of microbe-mediated chlorpyrifos remediation. *Environmental Research* 214: 114011. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114011>
- Rajashekhar, M., Kumar, P., Reddy, M., & Deshpande, A. 2020.** Role of Spiders in Agriculture. *EC Agriculture* 6: 21-23.
- Rameshthangam, P., & Ramasamy, P. 2006.** Antioxidant and membrane bound enzymes activity in WSSV-infected *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture* 254: 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.10.011>
- Ramos, R., Sediya, C., Queiroz, E., Costa, T., Martins, J., Araújo, T., & Picanço, M. 2017.** Toxicity of insecticides to *Chrysodeixis includens* and their direct and indirect effects on the predator *Blaptostethus pallescens*. *Journal of Applied Entomology* 141: 677-689. <https://doi.org/10.1111/jen.12382>
- Rasheed, M. A., Khan, M. M., Hafeez, M., Zhao, J., Islam, Y., Ali, S., Ur-Rehman, S., e-Hani, U., & Zhou, X. 2020.** Lethal and sublethal effects of chlorpyrifos on biological traits and feeding of the aphidophagous predator *Harmonia axyridis*. *Insects* 11: 491. <https://doi.org/10.3390/insects11080491>
- Ravi, R., Athisuyambulingam, M., Kanagaraj, S., Tresnakova, N., Impellitteri, F., Viswambaran, G., & Faggio, C. 2023.** Impact of chlorpyrifos on cytopathological indices in Mangrove crab, *Episesarma tetragonum* (Fabricius). *Veterinary Sciences* 10: 53. <https://doi.org/10.3390/vetsci10010053>
- Reda, R. M., Helmy, R. M., Osman, A., Ahmed, F. A. G., Kotb, G. A., & El-Fattah, A. H. A. 2023.** The potential effect of *Moringa oleifera* ethanolic leaf extract against oxidative stress, immune response disruption induced by abamectin exposure in *Oreochromis niloticus*. *Environmental Science and Pollution Research* 30: 58569-58587. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-26517-0>
- Rehman, S., & Waliullah, M. 2012.** Chlorpyrifos-induced neuro-oxidative damage in bee. *Toxicology and Environmental Health Sciences* 4: 30-36. <https://doi.org/10.1007/s13530-012-0114-9>
- Ribeiro, S., Guilhermino, L., Sousa, J. P., & Soares, A. M. V. M. 1999.** Novel bioassay based on acetylcholinesterase and lactate dehydrogenase activities to evaluate the toxicity of chemicals to soil isopods. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44: 287-293. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1837>
- Rickards, J., Kelleher, M. J., & Storey, K. B. 1987.** Strategies of freeze avoidance in larvae of the goldenrod gall moth, *Epiblema scudderiana*: winter profiles of a natural population. *Journal of Insect Physiology* 33: 443-450. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(87\)90024-2](https://doi.org/10.1016/0022-1910(87)90024-2)
- Riechert, S. E. 1999.** The hows and whys of successful pest suppression by spiders: insights from case studies. *Journal of Arachnology* 27: 387-396.
- Riechert, S. E., & Lockley, T. 1984.** Spiders as Biological Control Agents. *Annual Review of Entomology* 29: 299–320. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.29.010184.001503>

- Rojas, R. R., & Leopold, R. A. 1996.** Chilling injury in the housefly: evidence for the role of oxidative stress between pupariation and emergence. *Cryobiology* 33: 447-458. <https://doi.org/10.1006/cryo.1996.0045>
- Romero, S., Laino, A., Gabellone, C., & Garcia, C. 2024.** Effect of an organophosphate insecticide on the behaviour and physiology of the spider *Misumenops maculissparsus* (Araneae: Thomisidae). *Environmental Toxicology and Pharmacology*: 104525. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2024.104525>
- Romero, S., Laino, A., Arrighetti, F., Cunningham, M., & Garcia, C. F. 2018.** First study on lipid dynamics during the female reproductive cycle of *Polybetes phytagicus* (Araneae Saporassidae). *Canadian Journal of Zoology* 96: 847-858. <https://doi.org/10.1139/cjz-2017-0222>
- Romero, S., Laino, A., Arrighetti, F., Garcia, C. F., & Cunningham, M. 2019.** Vitellogenesis in spiders: first analysis of protein changes in different reproductive stages of *Polybetes pythagoricus*. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology* 189: 335-350. <https://doi.org/10.1007/s00360-019-01217-9>
- Romero, S., Laino, A., Molina, G., Cunningham, M., & Garcia, C. F. 2022.** Embryonic and post-embryonic development of the spider *Polybetes pythagoricus* (Sparassidae): A biochemical point of view. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 94 <https://doi.org/10.1590/0001-376520220210159>
- Rozsypal, J., Košťál, V., Zahradníčková, H., & Šimek, P. 2013.** Overwintering strategy and mechanisms of cold tolerance in the codling moth (*Cydia pomonella*). *PLoS One* 8: e61745. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-26517-0>
- Rozsypal, J., Kostal, V., Berkova, P., Zahradnickova, H., & Simek, P. 2014.** Seasonal changes in the composition of storage and membrane lipids in overwintering larvae of the codling moth, *Cydia pomonella*. *Journal of Thermal Biology* 45: 124-133. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2014.08.011>
- Ryan, R. O., & van der Horst, D. J. 2000.** Lipid transport biochemistry and its role in energy production. *Annual Review of Entomology* 45: 233-260. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.233>
- Sage, R. F. 2020.** Global change biology: a primer. *Global Change Biology* 26: 3-30. <https://doi.org/10.1111/gcb.14893>
- Sandahl, J. F., Baldwin, D. H., Jenkins, J. J., & Scholz, N. L. 2005.** Comparative thresholds for acetylcholinesterase inhibition and behavioral impairment in coho salmon exposed to chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 136-145. <https://doi.org/10.1897/04-195r.1>
- Santos, K. F. A., Zanardi, O. Z., de Moraes, M. R., Jacob, C. R. O., de Oliveira, M. B., & Yamamoto, P. T. 2017.** The impact of six insecticides commonly used in control of agricultural pests on the generalist predator *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae). *Chemosphere* 186: 218-226. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.165>
- Sarikaya, S. B. O., Topal, F., Şentürk, M., Gülçin, İ., & Supuran, C. T. 2011.** In vitro inhibition of  $\alpha$ -carbonic anhydrase isozymes by some phenolic compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21: 4259-4262. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.05.071>
- Sarkisyan, V., Bessonov, V., & Kochetkova, A. 2017.** Raw materials analysis and quality control, pp. 195-211, *Developing New Functional Food and Nutraceutical Products*. Elsevier <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802780-6.00011-0>

- Saulsbury, M. D., Heyliger, S. O., Wang, K., & Johnson, D. J. 2009.** Chlorpyrifos induces oxidative stress in oligodendrocyte progenitor cells. *Toxicology* 259: 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.12.026>
- Schmalhofer, V. R. 1999.** Thermal tolerances and preferences of the crab spiders *Misumenops asperatus* and *Misumenoides formosipes* (Araneae, Thomisidae). *Journal of Arachnology*: 470-480.
- Schmitz, O. J., Buchkowski, R. W., Smith, J. R., Telthorst, M., & Rosenblatt, A. E. 2017.** Predator community composition is linked to soil carbon retention across a human land use gradient. *Ecology* 98: 1256-1265. <https://doi.org/10.1002/ecy.1794>
- Schwerdt, L., de Villalobos, A. E., Pérez-Miles, F., & Ferretti, N. 2020.** Thermal preferences and effects of temperature on fitness parameters of an endemic Argentinean tarantula (*Grammostola vachoni*). *Canadian Journal of Zoology* 98: 134-141. <https://doi.org/10.1139/cjz-2019-0180>
- Scott-Fordsmand, J. J., & Weeks, J. M. 2000.** Biomarkers in earthworms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 165: 117-159. <https://doi.org/10.1002/etc.5620120510>
- Serrão, J. E., Plata-Rueda, A., Martínez, L. C., & Zanuncio, J. C. 2022.** Side-effects of pesticides on non-target insects in agriculture: A mini-review. *The Science of Nature* 109: 17. <https://doi.org/10.1007/s00114-022-01788-8>
- Seu, K. J., Cambrea, L. R., Everly, R. M., & Hovis, J. S. 2006.** Influence of lipid chemistry on membrane fluidity: tail and headgroup interactions. *Biophysical journal* 91: 3727-3735. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.084590>
- Sevacherian, V., & Lowrie, D. C. 1972.** Preferred temperatures of two species of lycosid spiders, *Pardosa sierra* and *P. ramulosa*. *Annals of the Entomological Society of America* 65: 111-114. <https://doi.org/10.1093/aesa/65.1.111>
- Shaffo, F. C., Grodzki, A. C., Schelegle, E. S., & Lein, P. J. 2018.** The organophosphorus pesticide chlorpyrifos induces sex-specific airway hyperreactivity in adult rats. *Toxicological Sciences* 165: 244-253. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy158>
- Sharaf, H. M., Salama, M. A., & Abd El-Atti, M. S. 2013.** Biochemical and histological alterations in the digestive gland of the land snail *Helicella vestalis* (Locard, 1882) exposed to methiocarb and chlorpyrifos in the laboratory. *International Journal of Science and Research* 4: 2319-7064. <https://doi.org/10.4172/2157-7099.1000327>
- Sharma, P. P. 2018.** Chelicerates. *Current Biology* 28: 774-778. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.036>
- Sheahan, M., Barrett, C. B., & Goldvale, C. 2016.** The unintended consequences of agricultural input intensification: Human health implications of agro-chemical use in sub-Saharan Africa, African Development Bank Abidjan, Côte d'Ivoire.
- Shivanandappa, T., & Rajendran, S. 1987.** Induction of glutathione S-transferase by fumigants in larvae of the Khapra beetle, *Trogoderma granarium* (E.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 28: 121-126. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(87\)90120-9](https://doi.org/10.1016/0048-3575(87)90120-9)
- Shoop, W. L., Mrozik, H., & Fisher, M. H. 1995.** Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Veterinary parasitology* 59: 139-156. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)00743-V](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)00743-V)
- Simó, M., Laborda, A., Jorge, C., & Castro, M. 2011.** Las arañas en agroecosistemas: bioindicadores terrestres de calidad ambiental. *Revista del laboratorio tecnológico del Uruguay* 6: 51-55. <https://doi.org/10.26461/06.11>

- Sinensky, M. 1974.** Homeoviscous adaptation—a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences 71: 522-525. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.2.522>
- Singh, A., Jaiswal, S. K., & Sharma, B. 2013.** Effect of low temperature stress on acetylcholinesterase activity and its kinetics in 5th instar larvae of *Philosamia ricini*. Journal of Biochemistry Research 1: 17-25.
- Snezhkina, A. V., Kudryavtseva, A. V., Kardymon, O. L., Savvateeva, M. V., Melnikova, N. V., Krasnov, G. S., & Dmitriev, A. A. 2019.** ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells. Oxidative medicine and cellular longevity 2019: 6175804. <https://doi.org/10.1155/2019/6175804>
- Snyder, R. J., & Hennessey, T. M. 2003.** Cold tolerance and homeoviscous adaptation in freshwater alewives (*Alosa pseudoharengus*). Fish Physiology and Biochemistry 29: 117-126. <https://doi.org/10.1023/b:fish.0000035920.60817.11>
- Soh, N. 2006.** Recent advances in fluorescent probes for the detection of reactive oxygen species. Analytical and bioanalytical chemistry 386: 532-543. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0366-9>
- Solomon, K. R., Williams, W. M., Mackay, D., Purdy, J., Giddings, J. M., & Giesy, J. P. 2014.** Properties and Uses of Chlorpyrifos in the United States. In J. P. Giesy, K. R. Solomon, G. C. Cutler, J. M. Giddings, D. Mackay, D. R. Moore, J. Purdy and W. M. Williams (eds.), Ecological risk assessment of the uses of the organophosphorus insecticide chlorpyrifos, in the United States. Springer, London. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-03865-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-03865-0_2)
- Somme, L. 1982.** Supercooling and winter survival in terrestrial arthropods. Comparative Biochemistry and Physiology 73: 519-543. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(82\)90260-2](https://doi.org/10.1016/0300-9629(82)90260-2)
- Song, Y., Li, L., Li, C., Lu, Z., Ouyang, F., Liu, L., Yu, Y., & Men, X. 2021.** Comparative ecotoxicity of insecticides with different modes of action to *Osmia excavata* (Hymenoptera: Megachilidae). Ecotoxicology and Environmental Safety 212: 112015. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112015>
- Stahlschmidt, Z. R., Whitlock, J., Vo, C., Evalen, P., & Bui, D. 2022.** Pesticides in a warmer world: Effects of glyphosate and warming across insect life stages. Environmental Pollution 307: 119508. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119508>
- Stanley-Samuelson, D. W., & Loher, W. 1986.** Prostaglandins in insect reproduction. Annals of the Entomological Society of America 79: 841-853. <https://doi.org/10.1093/aesa/79.6.841>
- Stenberg, J. A. 2017.** A conceptual framework for integrated pest management. Trends in Plant Science 22: 759-769. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.06.010>
- Stenberg, J. A., Sundh, I., Becher, P. G., Björkman, C., Dubey, M., Egan, P. A., Friberg, H., Gil, J. F., Jensen, D. F., & Jonsson, M. 2021.** When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. Journal of Pest Science 94: 665-676. <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01354-7>
- Stentiford, G. D., & Feist, S. W. 2005.** A histopathological survey of shore crab (*Carcinus maenas*) and brown shrimp (*Crangon crangon*) from six estuaries in the United Kingdom. Journal of Invertebrate Pathology 88: 136-146. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.01.006>
- Storey, K. B., & Storey, J. M. 1988.** Freeze tolerance in animals. Physiological reviews 68: 27-84. <https://doi.org/10.1152/physrev.1988.68.1.27>

- Stork, R. 2012.** Intraspecific variation in the thermal biology of *Rabidosa rabida* (Araneae: Lycosidae)(Walckenaer) from the mountains of Arkansas. *Environmental Entomology* 41: 1631-1637. <https://doi.org/10.1603/en12016>
- Stubbs, C. D., & Smith, A. D. 1984.** The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* 779: 89-137. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(84\)90005-4](https://doi.org/10.1016/0304-4157(84)90005-4)
- Sumon, K. A., Rashid, H., Peeters, E. T., Bosma, R. H., & Van den Brink, P. J. 2018.** Environmental monitoring and risk assessment of organophosphate pesticides in aquatic ecosystems of north-west Bangladesh. *Chemosphere* 206 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.167>
- Swallow, J. G., Carter, P. A., & Garland, T. 1998.** Artificial selection for increased wheel-running behavior in house mice. *Behavior genetics* 28: 227-237. <https://doi.org/10.1023/a:1021479331779>
- Swetha, C., Girish, B., Hemalatha, M., & Reddy, P. S. 2020.** Induction of vitellogenesis, methyl farnesoate synthesis and ecdysteroidogenesis in two edible crabs by arachidonic acid and prostaglandins. *Journal of Experimental Biology* 223: jeb212381. <https://doi.org/10.1242/jeb.212381>
- Tahir, H. M., Khizar, F., Naseem, S., Yaqoob, R., & Samiullah, K. 2016.** Insecticide resistance in the ground spider *Pardosa sumatra* (Thorell, 1890; Araneae: Lycosidae). *Insect Biochemistry and Physiology* 93: 55–64. <https://doi.org/10.1002/arch.21341>
- Tanaka, K., & Ito, K. 2015.** Accumulation of glycerol and myo-inositol in the overwintering nymphs of the wolf spider *Pardosa astrigera* (Araneae: Lycosidae). *Acta Arachnologica* 64: 1-4. <https://doi.org/10.2476/asjaa.64.1>
- Tarabaev, C. K., & Sheykin, A. A. 1990.** Spiders as predators in apple-tree crows in south-eastern in Kazakhstan. *Acta Zoologica Fennica* 190: 363.
- Taucare-Rios, A., Veloso, C., & Bustamante, R. 2018.** Thermal niche conservatism in an environmental gradient in the spider *Sicarius thomisoides* (Araneae: Sicariidae): implications for microhabitat selection. *Journal of Thermal Biology* 78: 298-303. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.10.018>
- Teets, N. M., & Denlinger, D. L. 2013.** Physiological mechanisms of seasonal and rapid cold-hardening in insects. *Physiological Entomology* 38: 105-116. <https://doi.org/10.1111/phen.12019>
- Testai, E., Buratti, F. M., & Di Consiglio, E. 2010.** Chlorpyrifos, pp. 1505-1526, Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology. Elsevier [https://doi.org/10.1007/978-3-540-48996-2\\_597](https://doi.org/10.1007/978-3-540-48996-2_597)
- Thorp, J. H. 2009.** Arthropoda and Related Groups, pp. 50–56, *Encyclopedia of Insects*. Academic Press <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374144-8.00014-x>
- Timbrell, J. 1999.** Principles of biochemical toxicology 3rd ed. Ed. Timbrell JA, CRC Press LLC, Taylor & Francis.
- Todgham, A. E., & Stillman, J. H. 2013.** Physiological responses to shifts in multiple environmental stressors: relevance in a changing world. *Integrative and Comparative Biology* 53: 539-544. <https://doi.org/10.1093/icb/ict086>
- Trabalon, M., & Garcia, C. F. 2021.** Transport pathways of hydrocarbon and free fatty acids to the cuticle in arthropods and hypothetical models in spiders. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 252: 110541. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2020.110541>



- Trabalon, M., Bagnères, A. G., & Roland, C. 1997.** Contact Sex Signals in Two Sympatric Spider Species, *Tegenaria domestica* and *Tegenaria pagana*. *Journal of Chemical Ecology* 23: 747–758. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000006408.60663.db>
- Trabalon, M., Bagnères, A. G., Hartman, N., & Vallet, A. M. 1996.** Change in cuticular compounds composition during the gregarious period and after dispersal of the young in *Tegenaria atrica*, (Araneae, Agelenidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 26: 77-84. [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(95\)00065-8](https://doi.org/10.1016/0965-1748(95)00065-8)
- Treidel, L. A., Quintanilla Ramirez, G. S., Chung, D. J., Menze, M. A., Vázquez-Medina, J. P., & Williams, C. M. 2022.** Selection on dispersal drives evolution of metabolic capacities for energy production in female wing-polymorphic sand field crickets, *Gryllus firmus*. *Journal of evolutionary biology* 35: 599-609. <https://doi.org/10.1111/jeb.13996>
- Trenti, F., Sandron, T., Guella, G., & Lencioni, V. 2022.** Insect cold-tolerance and lipidome: Membrane lipid composition of two chironomid species differently adapted to cold. *Cryobiology* 106: 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2022.03.004>
- Tsuchida, K., & Wells, M. A. 1988.** Digestion, absorption, transport and storage of fat during the last larval stadium of *Manduca sexta*. Changes in the role of lipophorin in the delivery of dietary lipid to the fat body. *Insect Biochemistry* 18: 263-268. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(88\)90090-x](https://doi.org/10.1016/0020-1790(88)90090-x)
- Tsukimura, B. 2001.** Crustacean vitellogenesis: its role in oocyte development. *American Zoologist* 41: 465-476. <https://doi.org/10.1093/icb/41.3.465>
- Tudi, M., Daniel Ruan, H., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., Chu, C., & Phung, D. T. 2021.** Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18: 1112. <https://doi.org/10.3390/ijerph18031112>
- Uchendu, C., Ambali, S. F., & Ayo, J. O. 2012.** The organophosphate, chlorpyrifos, oxidative stress and the role of some antioxidants: a review. *African Journal of Agricultural Research* 7 <https://doi.org/10.5897/ajar11.2510>
- Uçkun, M., Yologlu, E., Uçkun, A. A., & Oz, O. B. 2021.** Acute toxicity of insecticide thiamethoxam to crayfish (*Astacus leptodactylus*): alterations in oxidative stress markers, ATPases and cholinesterase. *Acta Chimica Slovenica* 68: 521-531. <https://doi.org/10.17344/acsi.2021.6823>
- Umoru, P., Powell, W., & Clark, S. 1996.** Effect of pirimicarb on the foraging behaviour of *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Braconidae) on host-free and infested oilseed rape plants. *Bulletin of Entomological Research* 86: 193-201. <https://doi.org/10.1017/s0007485300052445>
- Upadhyay, J., Das, S., & Chakrabarti, S. 2020.** Role of spider *Oxyopes birmanicus* (Araneae: Oxyopidae) in management of cowpea aphid *Aphis craccivora* (Homoptera: Aphididae). *Journal of Entomology and Zoology Studies* 8: 896-899.
- ur Rahman, H. U., Asghar, W., Nazir, W., Sandhu, M. A., Ahmed, A., & Khalid, N. 2021.** A comprehensive review on chlorpyrifos toxicity with special reference to endocrine disruption: Evidence of mechanisms, exposures and mitigation strategies. *Science of The Total Environment* 755: 142649. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142649>
- Ushio, H., & Watabe, S. 1993.** Effects of temperature acclimation on Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>-ATPase of the carp sarcoplasmic reticulum. *Journal of Experimental Zoology* 265: 9-17.
- Valentini, & Bimbi, R. 1993.** Effects of an eucalyptus shelterbelt in Coastal Central Italy on the microclimate and energy budget of maize, pp. 53-57, The fourth international symposium windbreaks and agroforestry.

- van den Boogaart, K. G., & Tolosana-Delgado, R. 2013.** Analyzing Compositional Data with R, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 258. ISBN: 9783642368097, 3642368093. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-36809-7>
- van den Boogaart, K. G., & Tolosana-Delgado, R. B. M. 2024.** compositions: Compositional Data Analysis. R package version 2.0-8, Online en: <https://CRAN.R-project.org/package=compositions> (Consultada el: 04/2024)
- van Dooremalen, C., & Ellers, J. 2010.** A moderate change in temperature induces changes in fatty acid composition of storage and membrane lipids in a soil arthropod. *Journal of Insect Physiology* 56: 178-184. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.10.002>
- Van Dooremalen, C., Koekkoek, J., & Ellers, J. 2011.** Temperature-induced plasticity in membrane and storage lipid composition: thermal reaction norms across five different temperatures. *Journal of Insect Physiology* 57: 285-291. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.11.018>
- Van Erp, S., Booth, L., Gooneratne, R., & K., O. H. 2002.** Sublethal responses of wolf spiders (Lycosidae) to organophosphorous insecticides. *Environmental Toxicology* 17: 449-456. <https://doi.org/10.1002/tox.10078>
- Verheyen, J., & Stoks, R. 2019.** Shrinking body size and physiology contribute to geographic variation and the higher toxicity of pesticides in a warming world. *Environmental Science & Technology* 53: 11515-11523. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03806.s001>
- Verma, D. K., Tripathi, R., Das, V. K., & Pandey, R. K. 2020.** Histopathological Changes in Liver and Kidney of *Heteropneustes fossilis* (Bloch) on Chlorpyrifos Exposure. *The Scientific Temper* 11: 141-147. <https://doi.org/10.15373/2249555X/July2014/72>
- Vogt, G. 1994.** Life-cycle and functional cytology of the hepatopancreatic cells of *Astacus astacus* (Crustacea, Decapoda). *Zoomorphology* 114: 83-101. <https://doi.org/10.1007/bf00396642>
- Vogt, G. 2019.** Functional cytology of the hepatopancreas of decapod crustaceans. *Journal of morphology* 280: 1405-1444. <https://doi.org/10.1002/jmor.21040>
- Waheed, Q., Tjörnhammar, R., & Edholm, O. 2012.** Phase transitions in coarse-grained lipid bilayers containing cholesterol by molecular dynamics simulations. *Biophysical journal* 103: 2125-2133. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.10.014>
- Warburg, M. R. 2011.** Scorpion reproductive strategies, allocation and potential; a partial review. *European Journal of Entomology* 108: 173. <https://doi.org/10.14411/eje.2011.023>
- Ware, G. W. 1980.** Effects of pesticides on nontarget organisms, pp. 173-201, *Residue Reviews: Residues of Pesticides and Other Contaminants in the Total Environment*, [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-6107-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-6107-0_9)
- Watts, M. 2012.** Chlorpyrifos as a possible global POP. *Pesticide Action Network North America*, Oakland, CA. <https://doi.org/10.6027/tn2008-520>
- Wei, K., & Yang, J. 2015.** Oxidative damage of hepatopancreas induced by pollution depresses humoral immunity response in the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Fish & Shellfish Immunology* 43: 510-519. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.013>
- Wheeler, W. C., Coddington, J. A., Crowley, L. M., Dimitrov, D., Goloboff, P. A., Griswold, C. E., Hormiga, G., Prendini, L., Ramírez, M. J., & Sierwald, P. 2017.** The spider tree of life: phylogeny of Araneae based on target-gene analyses from an extensive taxon sampling. *Cladistics* 33: 574-616. <https://doi.org/10.1111/cla.12182>

- Wickham, H. 2016.** ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis, Springer-Verlag, New York.  
Online en: <https://ggplot2.tidyverse.org> (Consultada el: 11/2023)
- Wieland, O. H. 1965.** Glycerol, pp. 211–214, Methods of Enzymatic Analysis. Cambridge, UK.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-395630-9.50046-3>
- Wilczek, G. 2005.** Apoptosis and biochemical biomarkers of stress in spiders from industrially polluted areas exposed to high temperature and dimethoate. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 141: 194-206. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.06.007>
- Wilczek, G., Babczyńska, A., & Wilczek, P. 2013.** Antioxidative responses in females and males of the spider *Xerolycosa nemoralis* (Lycosidae) exposed to natural and anthropogenic stressors. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology Supports 157: 119-131.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.10.005>
- Wilczek, G., Babczynska, A., Wilczek, P., Dolezych, B., Migula, P., & Mlynska, H. 2008.** Cellular stress reactions assessed by gender and species in spiders from areas variously polluted with heavy metals. Ecotoxicology and Environmental Safety 70: 127-137. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.03.005>
- Wilczek, G., Rost-Roszkowska, M., Wilczek, P., Babczyńska, A., Szulińska, E., Sonakowska, L., & Marek-Swędzioł, M. 2014.** Apoptotic and necrotic changes in the midgut glands of the wolf spider *Xerolycosa nemoralis* (Lycosidae) in response to starvation and dimethoate exposure. Ecotoxicology and Environmental Safety 101: 157-167. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.09.034>
- Wislocki, P. G., Grosso, L. S., & Dybas, R. A. 1989.** Environmental aspects of abamectin use in crop protection, pp. 182-200. In W. C. Campbell (ed.), Ivermectin and Abamectin. Springer New York, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3626-9\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3626-9_13)
- Wotejko, E., Łozowicka, B., Jabłońska-Trypuć, A., Pietruszyńska, M., & Wydro, U. 2022.** Chlorpyrifos occurrence and toxicological risk assessment: a review. International Journal of Environmental Research and Public Health 19: 12209.  
<https://doi.org/10.3390/ijerph191912209>
- World Spider Catalog. 2024.** World Spider Catalog. Version 25.5, Natural History Museum Bern. Online en: <http://wsc.nmbe.ch> (Consultada el: 03-2024) DOI: 10.24436/2
- Wrinn, K. M., Evans, S. C., & Rypstra, A. L. 2012.** Predator cues and an herbicide affect activity and emigration in an agrobiont wolf spider. Chemosphere 87: 390-396.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.030>
- Wu, H., Zhang, R., Liu, J., Guo, Y., & Ma, E. 2011.** Effects of malathion and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and antioxidant defense system in *Oxya chinensis* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae). Chemosphere 83: 599–604.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.12.004>
- Xu, S., Yao, Q., Quan, L., Dong, Y., Chen, B., & Zeng, D. 2024.** Sublethal effect of chlorpyrifos on predatory behavior and physiology of *Eocanthecona furcellata* (Hemiptera: Pentatomidae). Journal of Economic Entomology 117: 156-166.  
<https://doi.org/10.1093/jee/toad212>
- Xuereb, B., Chaumot, A., Mons, R., Garric, J., & Geffard, O. 2009.** Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys. Aquatic Toxicology 93: 225-233.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.05.006>
- Yadav, I. C., Devi, N. L., Syed, J. H., Cheng, Z., Li, J., Zhang, G., & Jones, K. C. 2015.** Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their

- possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India. *Science of The Total Environment* 511: 123-137. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.041>
- Yang, C., Pan, H., Liu, Y., & Zhou, X. 2015.** Stably expressed housekeeping genes across developmental stages in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *PLoS One* 10: e0120833. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120833>
- Yen, C. L. E., Stone, S. J., Koliwad, S., Harris, C., & Farese, R. V., Jr 2008.** Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *Journal of Lipid Research* 49: 2283-2301. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800018-JLR200>
- Yin, H., Xu, L., & Porter, N. A. 2011.** Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical Reviews* 111: 5944-5972. <https://doi.org/10.1021/cr200084z>
- Yuan, H.-X., Xu, X., Sima, Y.-H., & Xu, S.-Q. 2013.** Reproductive toxicity effects of 4-nonylphenol with known endocrine disrupting effects and induction of vitellogenin gene expression in silkworm, *Bombyx mori*. *Chemosphere* 93: 263-268. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.075>
- Zabeati, L. 2023.** Arthropodology the Earth's Most Diverse Group of Animals. 11: 187. <https://doi.org/10.35841/2320-9585-11.4.187>
- Zaller, J. G., & Brühl, C. A. 2019.** Non-target effects of pesticides on organisms inhabiting agroecosystems, pp. 75, *Frontiers Research Topics*, vol. 7. Frontiers Media SA <https://doi.org/10.3389/978-2-88945-976-6>
- Zandee, D. 1966.** Metabolism in the crayfish *Astacus astacus* (L.) III.–Absence of cholesterol synthesis. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie* 74: 435-441. <https://doi.org/10.3109/13813456609059922>
- Zhang, G.-H., Liu, H., Wang, J.-J., & Wang, Z.-Y. 2014.** Effects of thermal stress on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of the predatory mite, *Neoseiulus cucumeris* (Acari: Phytoseiidae). *Experimental and Applied acarology* 64: 73-85. <https://doi.org/10.1007/s10493-014-9806-y>
- Zhang, S., Fu, W., Li, N., Zhang, F., & Liu, T.-X. 2015.** Antioxidant responses of *Propylaea japonica* (Coleoptera: Coccinellidae) exposed to high temperature stress. *Journal of Insect Physiology* 73: 47-52. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.01.004>
- Zhang, Y., Li, Z., Kholodkevich, S., Sharov, A., Feng, Y., Ren, N., & Sun, K. 2019.** Cadmium-induced oxidative stress, histopathology, and transcriptome changes in the hepatopancreas of freshwater crayfish (*Procambarus clarkii*). *Science of The Total Environment* 666: 944-955. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.159>
- Zhao, G., Guo, H., Zhang, H., Zhang, X., Qian, H., Li, G., & Xu, A. 2020a.** Effects of pyriproxyfen exposure on immune signaling pathway and transcription of detoxification enzyme genes in fat body of silkworm, *Bombyx mori*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 168: 104621. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104621>
- Zhao, Y., Li, Y., He, M., Yun, Y., & Peng, Y. 2020b.** Antioxidant responses of the pest natural enemy *Hylyphantes graminicola* (Araneae: Linyphiidae) exposed to short-term heat stress. *Journal of Thermal Biology* 87: 102477. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.102477>
- Zhou, C., Zhu, C. X., Fu, H., Li, X., Chen, L., Lin, Y., Lai, Z., & Guo, Y. 2019.** Genome-wide investigation of superoxide dismutase (SOD) gene family and their regulatory miRNAs reveal the involvement in abiotic stress and hormone response in tea plant (*Camellia sinensis*). *PLoS One* 14: e0223609. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223609>

- Zhu, F., Gujar, H., Gordon, J., Haynes, K., Potter, M., & Palli, S. 2013.** Bed bugs evolved unique adaptive strategy to resist pyrethroid insecticides. *Sci Rep* 3  
<https://doi.org/10.1038/srep01456>
- Ziegenhorn, J., Neumann, U., Hagen, A., Bablok, W., & Stinshoff, K. 1977.** Kinetic enzymatic method for automated determination of glucose in blood and serum.  
<https://doi.org/10.1515/cclm.1977.15.1-12.13>
- Ziegler, R., & Ibrahim, M. M. 2001.** Formation of lipid reserves in fat body and eggs of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology* 47: 623-627.  
[https://doi.org/10.1016/s0022-1910\(00\)00158-x](https://doi.org/10.1016/s0022-1910(00)00158-x)

## Recursos gráficos tomados de Internet

- Anónimo, 2005.** (Imagen) Chemical structure of Chlorpyrifos. Wikipedia Commons, Online en: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chlorpyrifos.png> (Consultada el: 07/2024)
- Anónimo. 2009.** (Fotografía) Un segador (*Pachyloidellus* sp.) en Concón, Región de Valparaíso, Chile, Wikipedia Commons, Online en: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pseudo-ara%C3%B1a\\_nocturna\\_\(opilion\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pseudo-ara%C3%B1a_nocturna_(opilion).jpg) (Consultada el: 07/2024)
- Anónimo. 2014.** (Fotografía) White Tailless Whip Scorpion, Ecuador, Wikipedia Commons, Online en: [https://en.wikipedia.org/wiki/File:Heterophrynus\\_02.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/File:Heterophrynus_02.jpg) (Consultada el: 07/2024)
- Anónimo. 2023.** (Imagen) Anatomy of Spider. Freepik.com, Online en: [https://www.freepik.com/free-vector/spider-insect-flat-infographic-composition-with-anatomic-view-spider-with-text-captions-pointing-body-vector-illustration\\_58574094.htm#query=spider%20anatomy&position=0&from\\_view=keyword&track=ais](https://www.freepik.com/free-vector/spider-insect-flat-infographic-composition-with-anatomic-view-spider-with-text-captions-pointing-body-vector-illustration_58574094.htm#query=spider%20anatomy&position=0&from_view=keyword&track=ais) (Consultada el: 11/2023)
- Hedin, M. 2011.** (Fotografía) Schizomid *Hubbardia pentapeltis*. Taken in Valley Center, California, USA, Wikipedia Commons, Online en: <https://www.flickr.com/photos/23660854@N07/2278916242>
- Wysocki, G. 2023.** (Fotografía) unidentified species of mite; resembles *Trombidium*, Wikipedia Commons, Online en: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bibortetu.jpg> (Consultada el: 07/2024)