

Efecto de la exposición al insecticida clorantraniliprol sobre biomarcadores de estrés oxidativo en adultos de *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae)

MAERO, Elizabeth¹ & ANGUIANO, Olga L.²

¹ Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue. (8303) Cinco Saltos, Río Negro, Argentina. E-mail: elizabeth.maero@faca.uncoma.edu.ar

² Facultad de Ingeniería, Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas, PROBIEN (CONICET-UNCo), Neuquén, Argentina.

Received 04 - X - 2017 | Accepted 06 - XII - 2017 | Published 30 - III - 2018

<https://doi.org/10.25085/rsea.770102>

Effect of chlorantraniliprole exposure on oxidative stress biomarkers in *Cydia pomonella* moths (Lepidoptera: Tortricidae)

ABSTRACT. Living organisms are constantly exposed to oxidant agents deriving from both endogenous and exogenous sources capable of altering the cellular antioxidant system and inducing damages to biomolecules. Protective systems exist in insects, as in all aerobic organisms, to enable adaptation to oxidative environments. Biochemical parameters evaluated in adult codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae), exposed during 24 h at increasing concentrations of chlorantraniliprole insecticide (0; 12.5; 25; 50 y 100 mg L⁻¹) were glutathione S-transferases (GST), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), reduced glutathione (GSH) and malondialdehyde level (MDA). No mortality was observed; however, a significant lethargy was detected in a dose dependent manner. The 24 h exposure regime to 50 mg x L⁻¹ chlorantraniliprole insecticide -equivalent to field application dose- caused significant decreases in GST and SOD activities (36.4% and 52.5%, respectively) and in MDA level (56.8%) as compared with untreated control. No significant changes were observed in CAT nor GSH activities in codling moths exposed to the insecticide. Decline in antioxidant defense due to chlorantraniliprole would induce oxidative stress in insects.

KEYWORDS. Biomarkers. Codling moth. Diamide insecticides. Oxidative stress.

RESUMEN. Los organismos vivos están constantemente expuestos a agentes oxidantes endógenos y exógenos, incluidos los insecticidas, capaces de alterar el sistema antioxidante celular y producir daños a las biomoléculas. Los insectos, como los demás organismos aeróbicos, controlan el impacto del estrés oxidativo mediante la activación de sistemas de protección que les permiten la adaptación al entorno. Se evaluó el efecto de la exposición al insecticida clorantraniliprol (0; 12,5; 25; 50 and 100 mg L⁻¹) durante 24 h en adultos de *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) sobre los biomarcadores antioxidantes glutatión S-transferasa (GST), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión reducido (GSH) y malondialdehído (MDA). No se observó mortalidad en los individuos expuestos, no obstante, se evidenció una notable letargia dependiente de la concentración del tóxico. En las polillas expuestas a 50 mg L⁻¹ del insecticida -equivalente a la dosis recomendada de aplicación a campo- se detectaron disminuciones significativas en las actividades GST y SOD (36,4% y 52,5%, respectivamente) y en el contenido de MDA (56,8%) comparados con los niveles determinados en los organismos control. La exposición de las polillas al tóxico no produjo

efectos en la actividad CAT ni en el nivel de GSH endógeno, a las concentraciones ensayadas. La disminución en la defensa antioxidante originada por el clorantrolilprol induciría estrés oxidativo en los insectos.

PALABRAS CLAVE. Biomarcadores antioxidantes. Carpocapsa. Estrés oxidativo. Insecticidas diamidas.

INTRODUCCIÓN

Numerosos contaminantes ambientales son importantes fuentes de radicales libres en los sistemas biológicos. En particular, la exposición a distintos insecticidas puede producir especies reactivas de oxígeno (EROs) por alteración del sistema antioxidante celular en los organismos aeróbicos (Kristoff et al., 2008; Ferreira et al., 2010; Akbar et al., 2012; Rodríguez et al., 2012). El estrés oxidativo se origina cuando la producción de EROs excede la capacidad de defensa antioxidante de las células para eliminarlas (Halliwell & Whiteman, 2004). Las EROs, principalmente el radical hidroxilo, pueden reaccionar con macromoléculas biológicas y conducir al daño oxidativo de proteínas, lípidos y ADN (Abdollahi et al., 2004; Bonekamp et al., 2009; Sohal & Orr, 2012). Los antioxidantes mantienen en equilibrio los niveles de las EROs, permitiéndoles desempeñar sus funciones biológicas sin producir mayores daños (Birben et al., 2012). Los insectos poseen un conjunto de enzimas capaces de remover el exceso de estas especies químicas, similares a las de otros organismos aeróbicos (Ahmad, 1995; Felton & Summers, 1995; Krishnan & Kodrík, 2012; Rizvi & Pandey, 2012). Entre las enzimas antioxidantes se encuentran: la glutatión S-transferasa (GST), la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPx) (Limón-Pacheco & Gonsebatt, 2009; Rizzo et al., 2010). Las GST son un grupo de enzimas que catalizan la conjugación de moléculas orgánicas con el grupo tiol de la biomolécula glutatión reducido (GSH). Como resultado de esta reacción, generalmente, una molécula lipofílica reactiva se transforma en otra más soluble en agua y fácilmente excretable (Enayati et al., 2005; Alias, 2016). El GSH tiene un rol central en los procesos metabólicos intracelulares ya que no sólo está implicado en la defensa contra las EROs sino también en la remoción final de los productos de oxidación (Krishnan & Kodrík, 2012). Las enzimas CAT y SOD constituyen la primera línea de defensa antioxidante celular y protegen a los organismos del daño oxidativo originado por las EROs junto a la enzima GPx (Halliwell, 2006; Schrader & Fahimi, 2006; Bonekamp et al., 2009; Antonenkov et al., 2010; Rizzo et al., 2010; Cui et al., 2011). Uno de los principales productos de la peroxidación lipídica es el malondialdehído (MDA), un indicador del nivel de oxidación de los fosfolípidos de membrana, la peroxidación de los lípidos altera la integridad de la membrana celular y conduce a la

reorganización de su estructura (Birben et al., 2012). La alteración de cualquiera de estos parámetros puede reflejar indirectamente la presencia de estrés oxidativo, por lo que pueden actuar como biomarcadores de exposición o de efecto frente a un xenobiótico (Monteiro et al., 2006; Büyükgözel, 2009).

La "carpocapsa", *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae), es una plaga clave de los frutales de pepita en el mundo y es de importancia cuarentenaria en Argentina (Rossini et al., 2015). En la región de la Patagonia Norte su control es crucial para la producción sustentable de peras y manzanas con calidad de exportación (Cichón et al., 2001; Giganti et al., 2007). A partir de 2006, con el inicio del Programa Nacional de Supresión de Carpocapsa para el control regional de este lepidóptero, los insecticidas neurotóxicos de amplio espectro se fueron reemplazando gradualmente por otros más selectivos (Cichón et al., 2013, 2015). Este programa consiste en el manejo integrado de plagas que emplea herramientas sustentables en el tiempo y seguras para el medioambiente (Villareal et al., 2010). En la actualidad uno de los compuestos más usados en esta región es el clorantrolilprol (grupo 28; IRAC, 2009). Este compuesto es el primer miembro de una clase nueva de insecticidas, las diamidas antranílicas, que presenta una excepcional actividad insecticida sobre un amplio rango de plagas de lepidópteros, dípteros, isópteros, hemípteros y coleópteros (Cordova et al., 2006; Sattelle et al., 2008; Lahm et al., 2009; Bentley et al., 2010).

Si bien los insecticidas utilizados para el control de "carpocapsa" se aplican en los estadios tempranos de su ciclo de vida, los insectos adultos también están expuestos a estos contaminantes (Knight & Flexner, 2007). Hasta el presente no se ha encontrado información del efecto de este químico sobre biomarcadores de estrés oxidativo en insectos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar en polillas de *C. pomonella* el efecto de la exposición al insecticida clorantrolilprol sobre biomarcadores de estrés oxidativo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material químico

El ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), la albúmina de suero bovino (ASB), el glutatión reducido (GSH), el 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB), la

epinefrina ((+)- hidrocloreto de epinefrina) y la glicina fueron comprados al laboratorio Sigma-Aldrich™ de Argentina S.A. Los fosfatos fueron provistos por Merck, Darmstadt, Alemania. La solución Folin Ciocalteu, el ácido tricloroacético, el ácido tiobarbitúrico y el peróxido de hidrógeno fueron provistos por Anedra. El insecticida clorantraniliprol 200 g L⁻¹ SC (Coragen®); DuPont™ Argentina S.R.L., Buenos Aires, fue provisto por el INTA Alto Valle. El resto de las drogas y solventes usados fueron de calidad analítica.

Material biológico

Las determinaciones bioquímicas se realizaron en polillas de *C. pomonella* de 1 día de edad. Los insectos adultos se obtuvieron en el laboratorio a partir de larvas diapausantes suministradas por el INTA Alto Valle, recolectadas en cartones corrugados que fueron colocados en la base de los árboles frutales de una chacra con manejo integrado de plagas localizada en Centenario, provincia de Neuquén (38°49'00"S; 68°08'00"O), durante la temporada 2012 - 2013. Las larvas se conservaron a 4 °C con un fotoperíodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad durante tres meses, para satisfacer el requerimiento de horas de frío.

Ensayo de toxicidad

El efecto de la exposición al insecticida clorantraniliprol, formulación comercial Coragen® 20 SC, sobre biomarcadores del sistema antioxidante se evaluó en adultos de *C. pomonella*. Se aplicaron 1.000 µL de cada dilución del insecticida en agua de forma homogénea en la superficie interna y en las tapas de frascos de vidrio de 200 mL y se secaron al aire durante 24 h (Knight, 2010). Se expusieron 20 polillas de 1 día de edad a los residuos secos de cada una de las concentraciones ensayadas de clorantraniliprol (0; 12,5; 25; 50 y 100 mg L⁻¹) durante 24 h a temperatura controlada (23 °C). Para los controles se utilizaron 1.000 µL de agua destilada. Se realizaron 2 repeticiones de cada concentración (n=40). La mortalidad se registró a las 24 h. Los individuos sobrevivientes se colocaron en tubos eppendorf y se conservaron en ultrafreezer a -80 °C hasta la determinación de los parámetros bioquímicos.

Preparación de los extractos

Se disectaron insectos adultos de *C. pomonella* y se utilizaron los abdómenes-tórax para realizar las determinaciones bioquímicas. Cada muestra estuvo compuesta por 4 abdómenes-tórax que se homogeneizaron en 1.100 µL de buffer fosfato de potasio 143 mM pH 7,5, EDTA 6,3 mM con un homogeneizador Ultrasónico Eléctrico PRO 200, siempre trabajando en hielo. Los homogenados se centrifugaron a 1.000 x g a 4 °C durante 15 min. De los sobrenadantes obtenidos se separaron 20; 150 y 200 µL para cuantificar proteínas, GSH y MDA. El resto del sobrenadante se centrifugó a 16.000 x g a 4 °C

durante 20 min y el sobrenadante obtenido se separó en alícuotas para determinar las actividades de SOD (300 µL), CAT y GST (200 µL) y 50 µL para cuantificar proteínas. Los niveles de GSH y MDA se determinaron inmediatamente, el resto de las muestras se conservó en ultrafreezer a -80 °C hasta su utilización para las determinaciones bioquímicas.

Análisis bioquímicos

La actividad GST se determinó usando la técnica desarrollada por Habig et al. (1974). La mezcla de reacción consistió en 920 µL de buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 6,5, 10 µL de CDNB 50 mM (en acetonitrilo) y 50 µL de GSH 0,1 mM. Los cambios en la absorbancia fueron registrados continuamente a 340 nm durante 120 segundos a 25 °C en un espectrofotómetro Shimadzu UV-visible. La actividad específica GST se expresó como µmoles de CDNB conjugados min⁻¹ mg prot⁻¹ y se utilizó el coeficiente de extinción molar 9,6 mM⁻¹ cm⁻¹.

La actividad CAT se determinó según la técnica de Beers & Sizer (1952). La mezcla de reacción consistió en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7,2 y H₂O₂ 25 mM. La actividad CAT se determinó registrando la disminución continua de la absorbancia a 240 nm durante 60 segundos a 25 °C. La actividad específica se expresó como mmoles de H₂O₂ consumidos min⁻¹ mg prot⁻¹ y se utilizó un coeficiente de extinción molar de 40 M⁻¹ cm⁻¹.

La actividad SOD se determinó por su habilidad de inhibir la autooxidación de la epinefrina según la técnica descrita por Misra & Fridovich (1972). La mezcla de reacción consistió de buffer glicina 50 mM pH 10,2, epinefrina 60 mM pH 2 y diferentes volúmenes del sobrenadante (40, 60, 80, 100 y 120 µL). Se monitoreó el cambio en la absorbancia a 480 nm durante 600 segundos y a 30 °C. Los resultados se expresaron como unidades de SOD mg de proteínas⁻¹ (U SOD mg prot⁻¹). Se define una unidad de SOD como la cantidad de muestra que causa el 50% de inhibición de la autooxidación de la epinefrina.

El contenido de GSH endógeno se determinó como tioles ácidos solubles mediante la técnica descrita por Ellman (1959) y modificada por Venturino (2001). Se determinó el contenido de GSH en 100 µL del sobrenadante a 10.000 x g al que se le agregó 1 mL de DTNB 1,5 mM en buffer fosfato de potasio 0,25 M, pH 8,0. Después de 20 minutos a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 412 nm. Los tioles ácidos solubles se cuantificaron usando una curva de calibración con GSH puro como estándar. El contenido de GSH endógeno se expresó como nmoles de GSH mg prot⁻¹.

La peroxidación lipídica se estimó midiendo el contenido de MDA mediante el test del ácido tiobarbitúrico descrito por Ortega-Villasante et al. (2005). A 200 µL del sobrenadante a 1.000 x g de cada muestra se le agregaron 400 µL de la mezcla de

reacción que contenía ácido tiobarbitúrico al 0,375%, ácido tricloroacético al 15% y ácido clorhídrico 0,25 N. La lectura de la reacción se realizó a temperatura ambiente después de 10 min de incubación a 100 °C, el nivel de MDA se determinó a una absorbancia de 532 nm y se usó un coeficiente de extinción molar de 156 mM⁻¹ cm⁻¹. Los resultados se expresaron como nmoles de MDA mg prot⁻¹.

La concentración de proteínas se determinó aplicando el método descrito por Lowry et al. (1951) y se usó albúmina sérica bovina como estándar.

Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizó con el Software Statistica 7.1. Los resultados se expresaron como promedios ± errores estándar de al menos tres muestras independientes. La normalidad de los datos se evaluó mediante el análisis de los residuales y la homocedasticidad a través del test de Levene. Se utilizó ANOVA de un factor seguido por el test de Tukey para comparar los parámetros bioquímicos evaluados entre los organismos expuestos y el control. El nivel de significancia $p < 0,05$ se utilizó en todos los análisis estadísticos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El clorraniliprol ejerce su acción tóxica por la activación de los receptores de rianodina lo cual implica la liberación descontrolada de iones calcio de los reservorios internos del retículo sarcoplásmico en las células musculares. Esto conduce al inmediato cese de la alimentación, letargia, parálisis por contracción muscular y muerte de los insectos por inanición en el transcurso de 1 a 3 días (Cordova et al., 2006; Lahm et al., 2009). Después de 24 h de exposición no se observó mortalidad de polillas en ninguna de las concentraciones del insecticida ensayadas. No obstante, se detectó en todos los organismos expuestos letargia dependiente de la concentración.

La exposición de los insectos a las concentraciones más bajas (12,5; 25 y 50 mg L⁻¹) de clorraniliprol produjo una disminución en la actividad GST respecto a la determinada en los controles que sólo resultó estadísticamente diferente a 50 mg L⁻¹. Es importante destacar que esta concentración de insecticida equivale a la recomendada de aplicación a campo. A 100 mg L⁻¹ del tóxico la actividad enzimática aumentó, aunque no alcanzó el nivel de actividad de los organismos control (Fig. 1). También, Rodrigues et al. (2015) observaron una disminución significativa en la actividad GST de larvas del mosquito *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) después de 24 h de exposición a este insecticida. Por el contrario, en larvas del lepidóptero *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), la exposición a este químico produjo un incremento significativo en la actividad GST (Cao et al., 2010). Además, la aplicación tópica de las

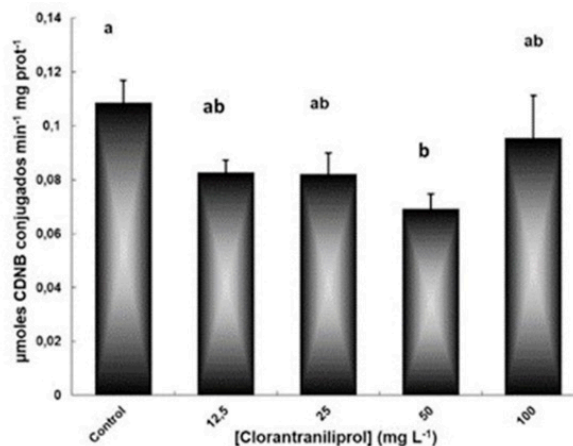


Fig. 1. Efecto de la exposición a concentraciones crecientes de clorraniliprol. La actividad GST se expresa como µmoles CDNB conjugado min⁻¹ mg prot⁻¹. Los valores representan la actividad promedio ± error estándar de al menos tres muestras independientes. Letras distintas indican diferencias significativas entre las concentraciones, $p < 0,05$.

concentraciones más bajas ensayadas del organofosforado malatión en la langosta *Oxya chinensis* Thunberg (Orthoptera: Acrididae) produjo el aumento de la actividad GST; mientras que, a las concentraciones más altas causó su disminución (Wu et al., 2011). La disminución de la actividad GST reduciría su rol protector antioxidante. Por el contrario, un incremento de esta enzima en los tejidos indicaría el desarrollo de un eficaz mecanismo de defensa contra la toxicidad de los xenobióticos (Monteiro et al., 2006). Varios autores encontraron una correlación entre los altos niveles de GST y la resistencia a insecticidas en *C. pomonella* (Reyes et al., 2004; Fuentes-Contreras et al., 2007; Voudouris et al., 2011; Rodríguez et al., 2012; Isci & Ay, 2017) y en otros insectos (Vontas et al., 2001; Ding et al., 2003; Ranson & Hemingway, 2005; Cao et al., 2017; Khalifa et al., 2017). Estudios recientes informaron que las enzimas GST estarían involucradas en la resistencia a clorraniliprol detectada en el lepidóptero *Plutella xylostella* Linnaeus (Lepidoptera: Plutellidae) (Lin et al., 2013; Hu et al., 2014; Zhu et al., 2017). En conclusión, la respuesta de las GST a los tóxicos es controvertida debido a que resulta altamente dependiente del tipo de xenobiótico, de la concentración, del tiempo de exposición y de la especie involucrada (Oruç et al., 2000).

Un aumento en el nivel de actividad CAT protegería a los organismos de las EROs producidas durante la metabolización de prooxidantes y la disminución de la misma reflejaría alteraciones en el sistema antioxidante celular. En las polillas expuestas a clorraniliprol no se detectaron cambios significativos en esta enzima (Fig. 2) mientras que Rodrigues et al. (2015) reportaron que la exposición de larvas del mosquito *C. riparius* durante

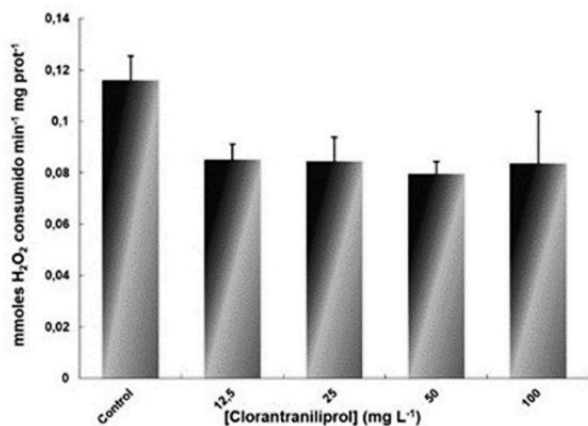


Fig. 2. Efecto de la exposición a 0; 12,5; 50 y 100 mg L⁻¹ de clorantraniliprol. La actividad CAT se expresa como mmoles H₂O₂ consumidos min⁻¹ mg prot⁻¹. Los valores representan la actividad promedio ± error estándar de al menos tres muestras independientes.

24 h a 9,6 µg L⁻¹ de clorantraniliprol disminuyó significativamente la actividad enzimática de CAT. Se ha informado tanto la disminución (Adamski et al., 2003; Büyükgüzel et al., 2013; Dere et al., 2015; Muthusamy & Rajakumar, 2016) como el aumento en la actividad CAT en diversas especies de insectos expuestas a diferentes grupos químicos de insecticidas (Adamski et al., 2003; Wu et al., 2011; Fahmy, 2012).

La SOD es susceptible al estrés oxidativo y podría ser inactivada por los elevados niveles de EROs producidos durante la detoxificación de prooxidantes. En las polillas de *C. pomonella* expuestas a 50 mg L⁻¹ de clorantraniliprol se detectó una disminución del 52,5% de la actividad SOD, altamente significativa, respecto al nivel determinado en los individuos control (Fig. 3). Las restantes concentraciones evaluadas del insecticida no produjeron cambios en la actividad de esta enzima. También, se observó una disminución significativa de la actividad SOD en larvas de *Galleria mellonella* Linnaeus (Lepidoptera: Pyralidae) expuestas a 10 mg L⁻¹ de malatión (Büyükgüzel, 2009) y al insecticida botánico azadaractina (Dere et al., 2015). Asimismo, Muthusamy & Rajakumar (2016) reportaron una disminución significativa de SOD en gusanos de seda, *Bombix mori* Linnaeus (Lepidoptera: Bombycidae), expuestos a 5 mg L⁻¹ del organofosforado diclorfós, y Büyükgüzel (2006) detectó disminución en la actividad SOD en el himenóptero endoparásito *Pimpla turionellae* Linnaeus (Ichneumonidae), expuesto a malatión. Por el contrario, la exposición a los insecticidas ácido bórico, al neonicotinoide imidacloprid y al organofosforado clorpirifos produjo incrementos significativos en la actividad SOD en larvas de *G. mellonella* (Büyükgüzel et al., 2013), en adultos de *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) (Gao et al. 2013) y en larvas de *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera:

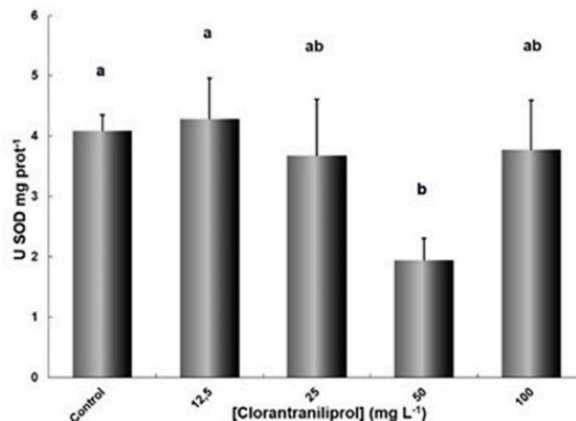


Fig. 3. Efecto de la exposición a concentraciones crecientes de clorantraniliprol sobre la actividad SOD. Los resultados están expresados como unidades de SOD mg prot⁻¹ (U SOD mg prot⁻¹). Se define 1 U de SOD como la cantidad de muestra que causa el 50% de inhibición de la autooxidación de la epinefrina. Los datos representan la actividad promedio ± error estándar de al menos tres muestras independientes. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos, p < 0,05.

Drosophilidae) (Gupta et al., 2010).

El GSH juega un rol central en los procesos metabólicos intracelulares en los insectos, ya que no sólo está implicado en la defensa contra las EROs sino también en la remoción final de los productos de oxidación (Krishnan & Kodrik, 2012). La exposición de adultos de *C. pomonella* a clorantraniliprol no causó cambios en el nivel de GSH endógeno (Fig. 4). También, Parra Morales et al., (2017) informaron que el contenido de GSH endógeno no se alteró en dos poblaciones de polillas de *C. pomonella* por la exposición durante 24 h a concentraciones crecientes del organofosforado clorpirifos. Ahmed (2011) reportó que la exposición de larvas del mosquito *Aedes caspius* Pallas (Diptera: Culicidae), durante 12 h al bioinsecticida *Bacillus thuringiensis kurstaki* no produjo cambios en el nivel de GSH; sin embargo, a las 24 h fue significativamente menor al determinado en los organismos control. La exposición durante 24 h a clorpirifos causó una disminución significativa en el nivel de GSH de ninfas de la langosta *O. chinensis* (Wu et al., 2011) y de larvas de *D. melanogaster* (Gupta et al., 2010). En larvas de *G. mellonella* expuestas a malatión se observó una disminución significativa en el nivel de GSH a las concentraciones más bajas ensayadas, mientras que, un aumento significativo en el GSH se detectó a las concentraciones más altas del insecticida (Büyükgüzel, 2009). También, Fahmy (2012) determinó un incremento significativo en el contenido de GSH en larvas del lepidóptero *Spodoptera littoralis* Boisduval (Noctuidae) a las 24 y 48 h postratamiento con el insecticida buprofezin, y una disminución a las 72 y 120

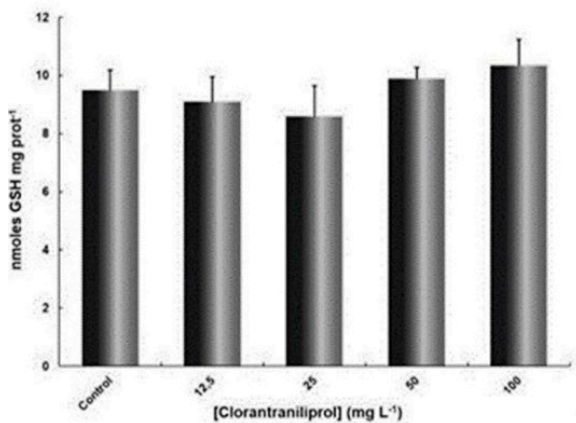


Fig. 4. Efecto de la exposición a 0; 12,5; 50 y 100 mg L⁻¹ de clorantraniliprol sobre el nivel de GSH endógeno en polillas de *Cydia pomonella*. Los resultados se expresan como nmoles GSH mg prot⁻¹. Los valores representan el nivel promedio ± error estándar de al menos tres muestras independientes.

horas. Indudablemente, las alteraciones observadas en el nivel de GSH por exposición a tóxicos depende del tipo de xenobiótico, del tiempo de exposición, de la concentración y de la especie evaluada.

En este trabajo se evaluó también el efecto de la exposición a clorantraniliprol en adultos de *C. pomonella* sobre el contenido de MDA, otro biomarcador del status oxidativo. Se observó una disminución estadísticamente significativa en el nivel de MDA en los organismos expuestos a 50 mg L⁻¹ (56,8%) del insecticida (Fig. 5). También, Dubovskiy et al. (2008) reportaron niveles de MDA significativamente menores al de los controles en el intestino medio de larvas de *G. mellonella* expuestas durante 48 h al bioinsecticida *B. thuringiensis*. İçen et al. (2005) observaron en larvas de este lepidóptero expuestas a 0,01 mg L⁻¹ del organofosforado metilparatión un aumento significativo en el nivel de MDA; mientras que, a 0,1 y 1 mg L⁻¹ detectaron una marcada disminución que podría ser el resultado de la transformación de este compuesto en diversas biomoléculas, como la lipofuscina, considerada un indicador de la tolerancia a largo plazo del estrés oxidativo. Resultados similares se observaron en ninfas de la langosta *O. chinensis* expuestas a clorpirifos, otro insecticida organofosforado (Wu et al., 2011).

CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran los efectos de la exposición de adultos de *C. pomonella* a concentraciones subletales del insecticida clorantraniliprol sobre biomarcadores de estrés oxidativo. La disminución detectada en las actividades de las enzimas antioxidantes GST y SOD a 50 mg L⁻¹

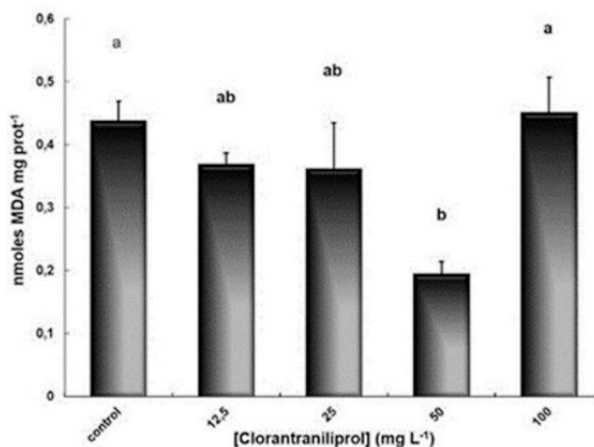


Fig. 5. Efecto de la exposición a concentraciones crecientes de clorantraniliprol sobre el nivel de MDA en adultos de *Cydia pomonella*. Los resultados se expresan como nmoles MDA mg prot⁻¹. Los valores representan el nivel promedio ± el error estándar de al menos tres muestras independientes. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos, p < 0,05.

del insecticida, equivalente a la dosis recomendada de aplicación a campo, sugiere un desequilibrio en el estado redox celular debido al estrés oxidativo inducido por el tóxico. Esta disminución estaría asociada a un aumento en el nivel de la peroxidación lipídica. En este trabajo se observó una disminución en el nivel de MDA probablemente debida a su rápida transformación en biomoléculas fluorescentes. En presencia del clorantraniliprol una respuesta de disminución inicial en el sistema antioxidante podría preceder a un incremento posterior. Estudios posteriores serán necesarios para comprender cómo afecta el estrés oxidativo originado por el insecticida a la eficacia biológica de los adultos de *C. pomonella*.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Liliana Cichón y al personal de campo del INTA Alto Valle por la provisión de los organismos utilizados en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., & Rezaie, A. (2004) Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical Science Monitor*, 10(6): 141-147.
- Adamski, A., Ziernicki, K., Fila, K., Ikie, R.V., & Tajn, A. (2003) Effects of long-term exposure to fenitrothion on *Spodoptera exigua* and *Tenebrio molitor* larval development and antioxidant enzyme activity. *Biology Letters*, 40(1): 43-52.
- Ahmad, S. (1995) Oxidative stress from environmental pollutants. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 29: 135-157.

- Ahmed, A.M. (2011) Immune and antioxidant defenses in an autogenous *Aedes caspius* mosquito upon infection with *Bacillus thuringiensis kurstaki*. *African Journal of Microbiology Research*, **5**(22): 3848-3857.
- Akbar, S.M., Sharm, H.C., Jayalakshmi, S.K., & Sreeramulu, K. (2012) Methylparathion- and carbofuran-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress in *Helicoverpa armigera* (Noctuidae: Lepidoptera). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **103**: 31-37.
- Alias, Z. (2016) The role of glutathione transferases in the development of insecticide resistance. *Insecticides Resistance* (ed. Trdan, S.), pp. 315-326. InTech.
- Antonenkov, V.D., Grunau, S., Ohlmeier, S., & Hiltunen, J.K. (2010) Peroxisomes are oxidative organelles. *Antioxidants and Redox Signaling*, **13**(4): 525-537.
- Beers, R.F., & Sizer, J.W. (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemical*, **195**(1): 133-140.
- Bentley, K.S., Fletcher, J.L., & Woodward, M.D. (2010) Chlorantraniliprole: An insecticide of the anthranilic diamide class. *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (ed. Krieger, R.), pp. 2231-2242. Elsevier Inc., USA.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalaysi, O. (2012) Oxidative stress and antioxidant defense. *WAO Journal*, **5**: 9-19.
- Bonekamp, N.A., Volkl, A., Fahimi, D., & Schrader, M. (2009) Reactive oxygen species and peroxisomes: struggling for balance. *BioFactors*, **35**(4): 346-355.
- Büyükgözel, E. (2009) Evidence of oxidative and antioxidant responses by *Galleria mellonella* larvae to malathion. *Journal of Economic Entomology*, **102**(1): 152-159.
- Büyükgözel, E., Büyükgözel, K., Snela, M., Erdem, M., Radtke, K., Ziemnicki, K., & Adamski, Z. (2013) Effect of boric acid on antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation, and ultrastructure of midgut and fat body of *Galleria mellonella*. *Cell Biology and Toxicology*, **29**: 117-129.
- Büyükgözel, K. (2006) Malathion-induced oxidative stress in a parasitoid wasp: effect on adult emergence, longevity, fecundity, and oxidative and antioxidative response of *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Journal of Economic Entomology*, **99**(4): 1225-1234.
- Cao, G., Lu, Q., Zhang, L., Guo, F., Liang, G., Wu, K., & Wyckhuys, K.G. (2010) Toxicity of chlorantraniliprole to CryAc-susceptible and resistant strain of *Helicoverpa armigera*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **98**: 99-103.
- Cao, G., Jia, M., Zhao, X., Wang, L., Tu, X., Wang, G., Nong, X., & Zhang, Z. (2017) Effects of chlorantraniliprole on detoxification enzymes activities in *Locusta migratoria* L. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, **20**: 741-746.
- Cichón, L.I., Fernández, D.E., & Raffo, D. (2001) Carpocapsa, la plaga clave. Manzanos y perales del Valle. *IDIA*, **21**(1): 96-99.
- Cichón, L.B., Soleño, J., Anguiano, O.L., Garrido, S.A., & Montagna, C.M. (2013) Evaluation of cytochrome P450 activity in field populations of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) resistant to azinphosmethyl, acetamiprid, and thiacloprid. *Economic Entomology*, **106**(2): 939-944.
- Cichón, L., Fernández, D.E., & Montagna, M. (2015) Evolución del control de carpocapsa en los últimos veinticinco años. *Revista Fruticultura y Diversificación*, **51**: 22-29.
- Cordova, D., Benner, E., Sacher, M., Rauh, J., Sopa, J., Lahm, G., Selby, T., Stevenson, T., Flexner, L., et al. (2006) Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **84**: 196-214.
- Cui, Y., Du, Y., Lu, M., & Qiang, C. (2011) Antioxidant responses of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae exposed to thermal stress. *Journal of Thermal Biology*, **36**: 292-297.
- Dere, B., Altuntaş, H., & Nurullahoğlu, Z.U. (2015) Insecticidal and oxidative effects of azadarachtin on the model organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **89**(3): 138-152.
- Ding, Y., Ortell, F., Rossiter, L.C., Hemingway, J., & Ranson, H. (2003) The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *BMC Genomics*, **4**(35): 1-16.
- Dubovskiy, I.M., Martemyanov, V.V., Vorontsova, Y.L., Rantala, M.J., Gryzanova, E.V., & Glupov, V.V. (2008). Effect of bacterial infection on antioxidant activity and lipid peroxidation in the midgut of *Galleria mellonella* L. larvae (Lepidoptera, Pyralidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **148**: 1-5.
- Ellman, G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **82**(1): 70-77.
- Enayati, A., Ranson, H., & Hemingway, J. (2005) Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*, **14**(1): 3-8.
- Fahmy, M.N. (2012) Impact of two insect growth regulators on the enhancement of oxidative stress and antioxidant efficiency of the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Biosd.). *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences*, **5**(1): 137-149.
- Felton, G.W., & Summers, C.B. (1995) Antioxidant systems in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **29**: 187-197.
- Ferreira, D., Costa da Motta, A., Kreutz, L.C., Toni, C., Loro, V.L., & Gil Barcellos, L.J. (2010) Assessment of oxidative stress in *Rhania quelen* exposed to agrochemicals. *Chemosphere*, **79**: 914-921.
- Fuentes-Contreras, E., Reyes, M., Barros, W., & Sauphanor, B. (2007) Evaluation of azinphos-methyl resistance and activity of detoxifying enzymes in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) from Central Chile. *Journal of Economical Entomology*, **100**(2): 551-556.
- Gao, X.L., Li, J.M., Jiu, M., Yan, G.H., Liu, S.S., & Wang, X.W. (2013) Cloning, expression and characterization of mitochondrial manganese superoxide dismutase from the whitefly, *Bemisia tabaci*. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**: 871-887.
- Giganti, H.E., Dapoto, G.L., & Vermeulen, J.D. (2007) Manejo Integrado de Plagas de los Frutales de Pepita. *Árboles Frutales. Ecofisiología, Cultivo y Aprovechamiento* (ed. Sozzi, G.O.), pp. 529-586. Editorial Facultad de Agronomía, UBA, Buenos Aires.
- Gupta, S., Mishra, M., Sharma, A., Balaji, D., Kumar, R., Mishra, R., & Chowdhuri, D.K. (2010) Chlorpyrifos induces apoptosis and DNA damage in *Drosophila* through generation of reactive oxygen species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **73**: 1415-1423.

- Habig, W.H., Pabst, M.J., & Jacoby, W.B. (1974) Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, **249**: 7130-7139.
- Halliwell, B. (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, **141**: 312-322.
- Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004) Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, **142**: 231-255.
- Hu, Z.D., Feng, X., Lin, Q., Chen, H., Li, Z., Yin, F., Liang, P., & Gao, X. (2014) Biochemical mechanism of chlorantraniliprole resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* Linnaeus. *Journal of Integrative Agriculture*, **13**: 2452-2459.
- Içen, E., Armatçü, F., Büyükgözel, K., & Gürel, A. (2005) Biochemical stress indicators of greater wax moth exposure to organophosphorus insecticides. *Journal of Economic Entomology*, **98**(2): 358-366.
- Insecticide Resistance Action Committee (IRAC) (2009) Mode of action classification, v.6.3, IRAC Mode of Action Working Group. Disponible en: http://www.irac-online.org/documents/MoA%20classification_v6.3.3_28july09.pdf.
- Isci, M., & Ay, R. (2017) Determination of resistance and resistance mechanisms to thiacloprid in *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) populations collected from apple orchards in Isparta Province, Turkey. *Crop Protection*, **91**: 82-88.
- Khalifa, M.H., El-Shahawi, F.I., & Mansour, N.A. (2017) Susceptibility of *Spodoptera littoralis*, field populations in Egypt to chlorantraniliprole and the role of detoxification enzymes. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, **11**(6): 390-396.
- Knight, A. (2010) Targeting *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) adults with low-volume applications of insecticides alone and in combination with sex pheromone. *Pest Management Science*, **66**(7): 709-917.
- Knight, A., & Flexner, L. (2007) Disruption of mating in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) by chlorantraniliprole, an anthranilic diamide insecticide. *Pest Management Science*, **63**: 180-189.
- Krishnan, N., & Kodrik, D. (2012) Endocrine control of oxidative stress in insects. *Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecular aspects of oxidative stress on cell signalling* (Ed. Farooqui, T., & Farooqui, A.), pp. 261-270. Wiley-Blackwell, New Jersey, USA.
- Kristoff, G., Verrengia Guerrero, N.R., & Cochón, A.C. (2008) Effects of azinphos-methyl exposure on enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses in *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*. *Chemosphere*, **72**(9): 1333-1339.
- Lahm, G.P., Cordova, D., & Barry, J.D. (2009) New and selective ryanodine receptor activators for insect control. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **17**: 4127-4133.
- Limón-Pacheco, J., & Gonsebatt, M.E. (2009) The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research*, **674**(1-2): 137-147.
- Lin, Q., Jin, F., Hu, Z., Chen, H., Yin, F., Li, Z., & Dong, X. (2013) Transcriptome analysis of chlorantraniliprole resistance development in the diamondback moth *Plutella xylostella*. *PLoS One*, **8**(8): e72314.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, **193**: 265-275.
- 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**(10): 3170-3175.
- Monteiro, D.M., Alves de Almeida, J., Tadeu Rantin, F., & Kalinin, A. (2006) Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*, **143**(2): 165-172.
- Muthusamy, R., & Rajakumar, S. (2016) Antioxidative response in a silkworm, *Bombyx mori* larvae to dichlorvos insecticide. *Free Radicals and Antioxidants*, **6**(1): 58-63.
- Ortega-Villasante, C., Rellan-Alvarez, R., Del Campo, F.F., Carpena-Ruiz, R.O., & Hernandez, L.E. (2005) Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. *Journal of Experimental Botany* **418**: 2239-2251.
- Oruç, E.Ö., & Üner, N. (2000) Combined effects of 2, 4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **127C**: 291-296.
- Parra Morales, L.B., Alzogaray, R., Cichón, L., Garrido, S., Soleño, J., & Montagna, C.M. (2017) Effects of chlorpyrifos on enzymatic systems of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) adults. *Insect Science*, **24**: 455-466.
- Ranson, H., & Hemingway, J. (2005) Mosquito glutathione transferases. *Methods in Enzymology*, **401**: 226-241.
- Reyes, M., Bouvier, J.C., Boivin, T., Fuentes-Contreras, E., & Sauphanor, B. (2004) Susceptibilidad a insecticidas y actividad enzimática de *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) proveniente de tres huertos de la región del Maule, Chile. *Agricultura Técnica*, **64**(3): 229-237.
- Rizvi, S.I., & Pandey, K.B. (2012) Oxidative stress and aging: a comparison between vertebrates and invertebrates. *Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates - Molecular aspects of cell signaling* (ed. Farooki, T., & Farooki, A.), pp. 167-174. Wiley-Blackwell, New Jersey, USA.
- Rizzo, A.M., Berselli, P., Zava, S., Montorfano, G., Negroni, M., Corsetto P., & Berra, B. (2010) Endogenous antioxidants and radical scavengers. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **698**: 52-67.
- Rodrigues, A.C.M., Gravato, C., Quintaneiro, C., Golovko, O., & Žlábek, V. (2015) Life history and biochemical effects of chlorantraniliprole on *Chironomus riparius*. *Science of the Total Environment*, **508**: 506-513.
- Rodríguez, M.A., Bosch, D., & Avila, J. (2012) Azinphos-methyl and carbaryl resistance in adults of the codling moth (*Cydia pomonella* (L.)), Lepidoptera: Tortricidae) from northeastern Spain. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **103**: 43-48.
- Rossini, M., Dummel, D., & Agostini, J. (2015) *Plagas cuarentenarias de frutales en la República Argentina*. Ediciones INTA, EEA Alto Valle. Argentina.
- Sattelle, D., Cordova, D., & Cheek, T. (2008) Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals. *Invertebrates Neuroscience*, **8**(3): 107-119.
- Schrader, M., & Fahimi, H.D. (2006) Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1763**(12): 1755-1766.
- Sohal, R.S., & Orr, W.C. (2012) The redox stress hypothesis of aging. *Free Radical Biology & Medicine*, **52**: 539-555.

- Venturino, A., Anguiano, O.L., Gauna, L., Cocca, C., Bergoc, R.M., & Pechen de D'Angelo, A.M. (2001) Thiols and polyamines in the potentiation of malathion toxicity in larval stages of the toad *Bufo arenarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **C130**: 191-198.
- Villarreal, P., Mattei, S., Villegas Nigra, M., & Forchetti, G. (2010) *Evaluación del impacto del programa nacional de supresión de carpocapsa en la fruticultura de pepita de los valles irrigados de la Norpatagonia*. FunBaPa Ediciones, Río Negro, Argentina.
- Vontas, J.G., Small, G.J., & Hemingway, J. (2001) Glutathione S-transferases as antioxidant defense agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochemical Journal*, **357**: 65-72.
- Voudouris, C.Ch., Sauphanor, B., Franck, P., Reyes, M., Mamuris, Z., Tsitsipis, J.A., Vontas, J., & Margaritopoulos, J.T. (2011) Insecticide resistance status of the codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) from Greece. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **100**: 229-238.
- Wu, H., Zhang, R., Jinyu 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.
- Zhu, B., Xu, M., Shi, H., Gao, X., & Liang, P. (2017) Genome-wide identification of lncRNAs associated with chlorantraniliprole resistance in diamondback moth *Plutella xylostella* (L.). *BMC Genomics*, **18**: 380.