



**Universidad Nacional del Comahue  
Facultad de Ciencias Agrarias**

**“EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES DEL  
SISTEMA ANTIOXIDANTE Y DEL DAÑO  
OXIDATIVO EN POBLACIONES DE  
CAMPO DE ADULTOS DE *Cydia  
pomonella*”**

**Trabajo de Tesis para optar al Título de Magister en  
Ciencias Agrarias y Biotecnología**

**Autora:** Ing. Agr. Elizabeth del Valle Maero

**Directora:** Mg. Olga Liliana Anguiano

**Cinco Saltos (Río Negro), 2016**



Universidad Nacional del Comahue  
Facultad de Ciencias Agrarias

**“EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES DEL  
SISTEMA ANTIOXIDANTE Y DEL DAÑO  
OXIDATIVO EN POBLACIONES DE CAMPO DE  
ADULTOS DE *Cydia pomonella*”**

Tesis de Maestría presentada por Elizabeth del Valle Maero  
Para optar para el grado de Magister en Ciencias Agrarias y Biotecnología  
Directora: Mg. Olga Liliana Anguiano

Lugar de trabajo: LIBIQUIMA, Facultad de Ingeniería - Universidad Nacional del  
Comahue

Cinco Saltos (Río Negro), 2016



*“Lo que la oruga interpreta como el fin del mundo, es lo que el Maestro denomina mariposa”  
(Richard Bach)*

Agradezco a quienes me acompañaron en los momentos más difíciles:

Ante todo a Dios por haberme permitido llegar hasta este momento.

A las autoridades de la Universidad y de la Facultad de Ciencias Agrarias, y en particular a las gestiones del Ing. Agr. Ferragut y del Dr. Bramardi que han hecho posible la realización de esta Maestría.

A la Mg. Olga Liliana Anguiano por ser mi directora de tesis, por su confianza en mi trabajo, su dedicación y compromiso.

Al Ing. Agr. Ricardo González Junyent por su comprensión.

Al Dr. Pablo Reeb por su aporte en parte del análisis de los datos.

A mi PADRE. A mi MADRE por ser los pilares fundamentales de todo lo que soy.

A MIGUEL por su apoyo incondicional y permanente a través del tiempo.

A Mónica, mi amiga de los momentos buenos y también de los otros.

A los compañeros del LIBIQUIMA, quienes me acompañaron en las diferentes etapas de mi trabajo en el laboratorio y a todos quienes de una u otra manera me ayudaron para llegar a buen puerto.

GRACIAS

**A Miguel, mi buen amor**



## RESUMEN

En los organismos aerobios el oxígeno es esencial para la producción eficiente de la energía aunque produce estrés oxidativo en las células. El estrés oxidativo se origina cuando la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) excede la capacidad de defensa antioxidante de las células para eliminarlas. Todos los organismos vivos están constantemente expuestos a agentes oxidantes que derivan de fuentes endógenas y exógenas capaces de alterar las biomoléculas y producir daños celulares e incluso apoptosis. Los organismos aeróbicos tienen sistemas de protección que le permiten la adaptación al entorno oxidativo.

La carpocapsa, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae), es una importante plaga de los frutales de pepita en el mundo y es de importancia cuarentenaria en Argentina. En la región de la Patagonia Norte, para la producción de peras y manzanas, se ha tornado en un factor crítico de extrema gravedad debido a que resulta limitante para el mantenimiento y la expansión del agronegocio frutícola al condicionar el mercado externo. El control de carpocapsa es fundamental para lograr una producción sustentable y con calidad de exportación. Su control se ha realizado mediante la aplicación intensiva de insecticidas neurotóxicos de amplio espectro, muy utilizados en la última década. En la actualidad han sido reemplazados por otros grupos de insecticidas más específicos. Además, los programas de manejo integrado de plagas - MIP-, que emplean herramientas sustentables en el tiempo y seguras para el medioambiente, como el uso de bioinsecticidas y prácticas culturales, permiten la optimización del control de la plaga. El objetivo de este trabajo fue evaluar biomarcadores del sistema antioxidante y de daño oxidativo en organismos adultos de *C. pomonella* de diferentes poblaciones de campo y de una cepa de referencia o laboratorio y estudiar el efecto sobre estos parámetros de la exposición *in vivo* al insecticida clorantraniliprol.

Los parámetros del sistema antioxidante evaluados fueron: las enzimas glutatión S-transferasa (GST), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) y los biomarcadores del daño oxidativo: nivel de glutatión endógeno (GSH) y malondialdehído (MDA). También, se evaluó sobre estos parámetros bioquímicos el efecto de la exposición durante 24 h a concentraciones crecientes (0; 12,5; 25; 50; 100; 1000 y 2000 mg x L<sup>-1</sup>) del insecticida clorantraniliprol formulación comercial Coragen® 20 SC.



Se recolectaron larvas diapausantes de *C. pomonella* de ocho huertos con manejo convencional, orgánico y sin tratamiento de la Patagonia Argentina, mediante bandas de cartón corrugado, durante las temporadas 2012 y 2013. Como población de referencia se utilizaron larvas de carpocapsa procedentes de una colonia de laboratorio, provista por el INTA Alto Valle. Se conservaron a 4°C para satisfacer las necesidades de frío hasta la emergencia de los adultos.

Las actividades GST detectadas en las polillas de *C. pomonella* provenientes de todas las poblaciones de campo analizadas resultaron significativamente menores a la observada en los organismos de la cepa de laboratorio. La actividad CAT en los individuos provenientes de Gral. Roca1 fue estadísticamente diferente y resultó 2,13 veces menor a la determinada en la población de referencia. No se encontraron diferencias significativas en la actividad SOD en las diferentes poblaciones ensayadas. A excepción del nivel de GSH obtenido en la población de Sarmiento2 y de Gral. Godoy, las otras poblaciones de campo analizadas presentaron niveles significativamente menores en comparación con el de la cepa de laboratorio. El nivel de GSH medido en insectos adultos de Sarmiento2 resultó significativamente mayor al determinado en los individuos de laboratorio ( $34,90 \pm 2,10$  nmoles GSH x mg proteína<sup>-1</sup> y  $22,17 \pm 0,48$  nmoles GSH x mg proteína<sup>-1</sup>, respectivamente). El nivel de GSH en las polillas de Gral. Godoy fue similar al detectado en la cepa de laboratorio ( $20,64 \pm 1,14$  nmoles GSH x mg proteína<sup>-1</sup>). Se determinaron niveles similares de MDA en las polillas de referencia, Centenario y Sarmiento2 que resultaron significativamente mayores a los obtenidos en las poblaciones de Sarmiento1, Gral. Godoy y Allen.

La exposición de insectos adultos de *C. pomonella* a concentraciones crecientes de clorraniliprol no produjo mortalidad; no obstante se detectó una notable letargia en los individuos expuestos que resultó dependiente de la concentración del tóxico. No se observaron cambios significativos en la actividad CAT ni en el nivel de GSH endógeno en las polillas de carpocapsa expuestas a clorraniliprol. La exposición de insectos adultos a 50 mg x L<sup>-1</sup> del insecticida -equivalente a la dosis de aplicación a campo- durante 24 h causó disminuciones significativas de las actividades GST y SOD (36,4% y 52,5%, respectivamente) y en el nivel de MDA (56,8%,) comparados con los niveles determinados en los organismos control.

Este estudio es una contribución al conocimiento creciente de la fisiología de *C. pomonella* que posibilitará una mejor interpretación de su respuesta bioquímica a la exposición al insecticida clorraniliprol, lo que resultará en la optimización del control



de esta importante plaga. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis demuestran que las alteraciones observadas en los biomarcadores de estrés oxidativo, nivel de GSH endógeno y actividad GST, sugieren la exposición a contaminantes y/o factores ambientales prooxidantes de adultos de *C. pomonella* provenientes de diferentes huertos de la Patagonia Argentina.



## ABSTRACT

In aerobic organisms, oxygen is essential for efficient energy production but produces toxic stress in cells. Oxidative stress results when production of reactive oxygen species (ROS) exceeds the capacity of cellular antioxidant defenses to remove these toxic species. All living organisms are constantly exposed to oxidant agents deriving from both endogenous and exogenous sources capable to modify biomolecules and induce damages and even apoptosis. Diverse protective systems exist in Arthropods and in all living organisms to enable adaptation to oxidative environments.

The codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae), is a severe pest of pome fruits and walnuts worldwide and it is an important quarantine pest in Argentina. It has been the main pest affecting fruit production in Northern Patagonia during the last decades since it has become a factor of extreme gravity in the production of pears and apples, as a consequence, its control is critical in order to obtain a sustainable production and the maintenance and expansion of agribusiness and fresh fruit external market conditions. During the last decades organophosphorus insecticides were widely used to control the cogling moth. At present, to mitigate negative effects of its indiscriminate use they are being replaced by more specific insecticides groups. In addition, programs of integrated pest management -MIP-, which combines different management strategies and sustainable practices such as the use of bioinsecticides, are being used to achieve the optimization of pest control. The aim of this study was to evaluate biomarkers of antioxidant defense system and oxidative damage in *C. pomonella* adults from different field populations as well as in a laboratory strain and to study the effect on these parameters of *in vivo* exposure to chlorantraniliprole.

The antioxidant system parameters evaluated were: the enzymes glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) and biomarkers of oxidative damage were: the level of endogenous glutathione (GSH) and malodialdehyde (MDA). Also, these biochemical parameters were evaluated because of the exposure during 24 h at increasing concentrations (0; 12.5; 25; 50; 100; 1000 to 2000 mg x L<sup>-1</sup>) of chlorantraniliprole (20 Coragen<sup>®</sup> SC) treatment commercial formulation Coragen<sup>®</sup> 20 SC.

*C. pomonella* diapausing larvae from eight field populations from Argentinean Patagonia with conventional, organic and untreated management where collected using corrugated paper strips, during 2012 and 2013. A laboratory larvae strain, used as a



reference, was established in laboratory and provided by INTA Alto Valle. They were stored at 4 ° C in order to satisfy the chilling requirement for the emergence of adults.

GST activity detected in *C. pomonella* moths from all field populations were significantly lower than laboratory ones. CAT activity in Gral. Roca1 population was statistically different and turned 2.13 times lower than that from the reference strain. No significant differences in SOD activities between different populations were evident. Except Sarmiento2 and Gral. Godoy populations GSH levels obtained in all the others were significantly lower related to the laboratory strain. GSH level in Sarmiento2 codling moths was significantly higher than those from laboratory ( $34.90 \pm 2.10$  nmol GSH x mg protein<sup>-1</sup> and  $22.17 \pm 0.48$  nmol GSH x mg protein<sup>-1</sup>, respectively). GSH level in adult insects from Gral. Godoy was similar to those from the laboratory strain ( $20.64 \pm 1.14$  nmol GSH x mg protein<sup>-1</sup>). Similar MDA levels were detected in laboratory, Centenario and Sarmiento2 codling moth populations, which were significantly higher than those from Sarmiento1, Gral. Godoy and Allen populations.

No mortality was observed in any of the tested concentrations by exposure of *C. pomonella* adults to increasing concentrations of chlorantraniliprole insecticide, however a significant lethargy was detected in a dose dependent manner. No significant changes were observed in CAT nor GSH activities in codling moths exposed to the insecticide. Exposure of codling moths to 50 mg x L<sup>-1</sup> chlorantraniliprole insecticide –equivalent to field application dose- for 24 h caused significant decreases in GST and SOD activities (36.4% and 52.5%, respectively) as well as in MDA level (56.8%) in comparison with the laboratory ones.

This study contribute to knowledge about *C. pomonella* physiology which will enable a better understanding of the biochemical response respect to the exposure to chlorantraniliprole allowing the optimization of the control of this important pest. The results obtained in this thesis study show that changes in biomarkers of oxidative stress observed, endogenous GSH level and GST activity suggest the exposure to pollutants and/or environmental prooxidants of *C. pomonella* codling moths from different field populations from Argentinean Patagonia.



## RÉSUMÉ

Dans les organismes aérobies, l'oxygène est essentiel pour la production d'énergie efficace, mais paradoxalement, produit un stress toxique dans les cellules. Le stress oxydatif survient lorsque la production de dérivés réactifs de l'oxygène (DROs) dépasse la capacité des défenses antioxydants cellulaires pour supprimer ces espèces toxiques. C'est un état qui résulte d'un déséquilibre de la balance prooxydants/antioxydants en faveur des premiers. Tous les organismes vivants sont constamment exposés à des agents oxydants provenant de deux sources endogènes et exogènes qui entraînent des dommages oxydatifs des biomolécules. Les organismes aérobies disposent d'un ensemble d'enzymes antioxydantes qui protègent ses cellules de l'action des ROS, afin de prévenir les dommages oxydatifs et permettre l'adaptation à des environnements oxydants.

Le carpocapse de la pomme, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae), est un ravageur très important des fruits à pépins dans le monde entier et c'est l'une des ravageurs les plus importantes d'Argentine. La pomiculture occupe depuis toujours une place importante dans l'économie agricole au nord de la Patagonie. Dans les dernières années le carpocapse a été le principal bio-agresseurs qui a affecté la production régionale des fruits. Ce petit papillon devenu un facteur de gravité extrême dans la production de poires et de pommes, en conséquence, son contrôle est essentielle pour obtenir une production durable et le maintien ou sur l'expansion des marchés internationaux des fruits frais. La lutte contre le carpocapse *C. pomonella* s'est longtemps basée essentiellement sur l'usage des esters phosphoriques. Des programmes efficaces de gestion intégrée des ravageurs sont d'une importance vital pour assurer un croissance économique et développement durable. Dans les jours présents pratiques de lutte intégrée -IMP- comprennent le développement récent des alternatives de contrôle, c'est le cas de la carpovirusine, un baculovirus spécifique au carpocapse et inoffensif pour les organismes non ciblés. Mais l'utilisation de microorganismes n'est pas la seule méthode de contrôle, une autre voie est l'utilisation des une toute nouvelle classe d'insecticide doté d'un nouveau mode d'action à risque réduit, tels que le chlorantraniliprole, appartient à la classe chimique des diamides de l'acide anthranilique de première génération, ce qu'est largement utilisé à la lutte généralisée contre le carpocapse *C. pomonella* dans la région nord de la Patagonie. Le but de cette étude était d'évaluer les biomarqueurs de système antioxydant et les dommages oxydatifs dans les insectes adultes de différentes populations de *C. pomonella* des vergers et la souche de référence est une souche d'un laboratoire et



aussi d'étudier l'effet sur ces paramètres dans l'exposition in vivo à l'insecticide chlorantraniliprole.

Les paramètres du système antioxydant évalués étaient: les enzymes glutathion-S-transférase (GST), la catalase (CAT) et le superoxyde dismutase (SOD) et les biomarqueurs de dommages oxydatifs étaient: le niveau de glutathion endogène (GSH) et le contenu d'acide malonedialdéhyde (MDA). En outre, ces paramètres biochimiques ont été évalués par l'exposition pendant 24 h à des concentrations croissantes (0; 12,5; 25; 50; 100; 1000 à 2000 mg x L<sup>-1</sup>) avec traitement à base de chlorantraniliprole (20 Coragen® SC).

Les chenilles diapausantes de carposapse ont été récupérées en 2012 et 2013 dans des bandespièges installées dans huit vergers en la région patagonique (lutte classique, organique et non traités). Toutes les chenilles diapausantes ont été stockées pendant l'hiver dans des bandelettes de carton ondulé, en chambre froide à 4 °C afin de rompre la diapause, jusqu'à l'émergence des adultes. Une souche sensible de référence a été analysée, qui se maintient depuis 1991 dans le laboratoire sur l'INTA Alto Valle sans être en contact avec des pesticides.

L'activité enzymatique de la GST détectée chez les papillons de *C. pomonella* de toutes les populations des vergers était significativement plus faible que celles observées dans les insectes de la souche de laboratoire. L'activité de la CAT dans Gral. Roca1 population était statistiquement différente et se tourna 2,13 fois inférieure à celle de la souche de référence. Les niveaux d'activité de la SOD étaient similaires dans toutes les populations des carposapses de verger testés. Sauf pour les vergers de Sarmiento2 et Gral. Godoy les autres vergers étudiés ont montré des niveaux significativement plus faibles de GSH par rapport à la souche de laboratoire. Les taux de GSH mesurés en insectes adultes Sarmiento2 étaient significativement supérieurs à celui déterminé dans les individus de laboratoire ( $34,90 \pm 2,10$  nmol GSH x mg de protéine<sup>-1</sup> et  $22,17 \pm 0,48$  nmol GSH x mg de protéine<sup>-1</sup>, respectivement). Taux de GSH chez les insectes adultes de Gral. Godoy était similaire à ceux de la souche de laboratoire ( $20,64 \pm 1,14$  nmol GSH x mg de protéine<sup>-1</sup>). Des niveaux similaires de MDA ont été détectés chez les papillons de référence, Centenario et Sarmiento2, qui étaient significativement plus élevés que ceux obtenus dans les populations Sarmiento1, Gral. Godoy et Allen.

Il n'a pas été observé de mortalité des papillons exposés l'une quelconque des concentrations testées mais a été observée une léthargie significative dans tous les



organismes exposés d'une manière dépendante de la dose testée. Aucun changement significatif n'a été observé dans l'activité de CAT et le niveau de GSH endogène dans carpocapses exposés au chlorantraniliprole. L'exposition de carpocapses à 50 mg x L<sup>-1</sup> de l'insecticide -équivalent à la dose appliquées sur le terrain dose- pendant 24 h causé des diminutions significatives des activités de la GST et de la SOD (36,4% et 52,5%, respectivement), ainsi que dans le niveau MDA (56,8%) en comparaison avec celles de laboratoire.

Cette étude contribue à la connaissance de la physiologie de *C. pomonella* qui permettra une meilleure compréhension de la réponse biochimique égard à l'exposition au chlorantraniliprole permettant l'optimisation du contrôle de cet important ravageur. Les résultats obtenus dans cette thèse montrent que les changements observés dans les biomarqueurs du stress oxydatif, le taux de glutathion endogène et de l'activité de la GST suggèrent l'exposition aux polluants et/ou des facteurs environnementaux prooxydants du *C. pomonella* de différentes populations de la Patagonie Argentine.



<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Radical superóxido.....	5
1.1.2. Radical hidroxilo.....	6
1.1.3. Radicales alcoxilo y peroxilo.....	6
1.1.4. Peróxido de hidrógeno.....	6
1.1.5. Oxígeno singulete.....	7
<b>1.2. GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS EN LOS SERES VIVOS.....</b>	<b>7</b>
1.2.1. Fuentes endógenas de EROs.....	7
1.2.2. Fuentes exógenas de EROs.....	8
<b>1.3. ESTRÉS OXIDATIVO.....</b>	<b>9</b>
1.3.1. Efectos biológicos de las EROs.....	9
1.3.1.1 Daño oxidativo en lípidos.....	11
1.3.1.2 Daño oxidativo en proteínas.....	12
1.3.1.3 Daño oxidativo en el ADN.....	13
1.3.2. Detoxificación de las EROs.....	14
1.3.2.1 Glutación S transferasa (GST).....	15
1.3.2.2 Catalasa (CAT).....	17
1.3.2.3 Superóxido dismutasa (SOD).....	17
1.3.2.4 Glutación reducido (GSH).....	18
1.3.3. Estrés oxidativo en los insectos.....	20
<b>1.4. DESCRIPCIÓN Y FENOLOGÍA DE <i>Cydia pomonella</i>.....</b>	<b>21</b>
1.4.1. Importancia y control de <i>C. pomonella</i> .....	25
<b>1.5. Hipótesis.....</b>	<b>28</b>
1.5.1. Objetivo general.....	28
1.5.2. Objetivos específicos.....	28
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
<b>2.1. MATERIAL QUÍMICO.....</b>	<b>30</b>
<b>2.2. MATERIAL BIOLÓGICO.....</b>	<b>30</b>
<b>2.3. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS.....</b>	<b>32</b>
<b>2.4. ANÁLISIS BIOQUÍMICOS.....</b>	<b>33</b>
2.4.1. Determinación de la actividad enzimática de GST.....	33
2.4.2. Determinación de la actividad enzimática de CAT.....	33



2.4.3.	Determinación de la actividad enzimática de SOD .....	34
2.4.4.	Determinación de GSH endógeno .....	34
2.4.5.	Determinación del nivel de peroxidación lipídica .....	35
2.4.6.	Determinación de proteínas .....	35
<b>2.5.</b>	<b>BIOENSAYO TOXICOLÓGICO .....</b>	<b>35</b>
<b>2.6.</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>36</b>
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1.</b>	<b>ENSAYOS BIOQUÍMICOS .....</b>	<b>37</b>
3.1.1.	Determinación de la actividad enzimática de GST .....	37
3.1.2.	Determinación de la actividad enzimática de CAT .....	38
3.1.3.	Determinación de la actividad enzimática de SOD .....	39
3.1.4.	Determinación del nivel de GSH endógeno .....	40
3.1.5.	Determinación del contenido de MDA .....	41
<b>3.2.</b>	<b>EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN <i>in vivo</i> A CLORANTRANILIPROL SOBRE BIOMARCADORES ANTIOXIDANTES .....</b>	<b>42</b>
3.2.1.	Glutación S-transferasa .....	42
3.2.2.	Catalasa .....	43
3.2.3.	Superóxido dismutasa .....	44
3.2.4.	Contenido de GSH .....	45
3.2.5.	Contenido de MDA .....	46
<b>4.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>48</b>
<b>4.1.</b>	<b>EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES ANTIOXIDANTES EN ADULTOS DE <i>C. pomonella</i> .....</b>	<b>48</b>
<b>4.2.</b>	<b>EXPOSICIÓN <i>in vivo</i> DE ADULTOS DE <i>C. pomonella</i> AL INSECTICIDA CLORANTRANILIPROL: EFECTOS SOBRE BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO .....</b>	<b>54</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>61</b>
<b>5.1.</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>62</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>64</b>
<b>7.</b>	<b>PRESENTACIONES A CONGRESOS .....</b>	<b>86</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Algunas especies reactivas. ....	3
<b>Tabla 2.</b> Descripción de las poblaciones analizadas en este trabajo de tesis. ....	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Configuración electrónica de los orbitales moleculares de EROs. ....	4
<b>Figura 2.</b> Orígenes y respuestas celulares a las EROs. ....	10
<b>Figura 3.</b> Defensa antioxidante de GST contra los insecticidas. ....	16
<b>Figura 4 A y B.</b> Adulto de <i>C. pomonella</i> en reposo (A) y en vuelo (B). ....	22
<b>Figura 5 A y B.</b> Ala anterior de macho (A) y de hembra (B) de <i>C. pomonella</i> . ....	22
<b>Figura 6.</b> Ciclo biológico de carpocapsa. ....	24
<b>Figura 7.</b> Localización geográfica de las regiones muestreadas de la Patagonia Argentina. ....	31
<b>Figura 8.</b> Esquema de preparación de las muestras. ....	33
<b>Figura 9.</b> Actividad de GST en adultos de <i>C. pomonella</i> . ....	37
<b>Figura 10.</b> Actividad de CAT en adultos de <i>C. pomonella</i> . ....	38
<b>Figura 11.</b> Actividad de SOD en adultos de <i>C. pomonella</i> . ....	39
<b>Figura 12.</b> Niveles de GSH endógeno en adultos de <i>C. pomonella</i> . ....	40
<b>Figura 13.</b> Niveles de MDA en adultos de <i>C. pomonella</i> . ....	41
<b>Figura 14.</b> Efecto de la exposición a clorantraniliprol sobre la actividad GST. ....	43
<b>Figura 15.</b> Efecto de la exposición a clorantraniliprol sobre la actividad CAT. ....	44
<b>Figura 16.</b> Efecto de la exposición a clorantraniliprol sobre la actividad SOD. ....	45
<b>Figura 17.</b> Efecto de la exposición a clorantraniliprol sobre el nivel de GSH endógeno. ....	46
<b>Figura 18.</b> Efecto de la exposición a clorantraniliprol sobre el nivel de MDA. ....	47



# INTRODUCCIÓN



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

La respiración aeróbica y la liberación de oxígeno a través de la fotosíntesis han constituido la maquinaria básica de la vida durante casi tres mil millones de años y han impulsado la evolución de complejas formas de vida (Zharkov, 2013). Se desconocieron las implicancias de las propiedades tóxicas del oxígeno hasta que Harman (1956) propuso la hipótesis de los radicales libres en relación con el envejecimiento, la cual sugería que la naturaleza deletérea del oxígeno se debía a las formas parcialmente reducidas del mismo. Años más tarde, la detección de radicales libres en los sistemas biológicos, el descubrimiento de la enzima superóxido dismutasa por McCord y Fridovich (1969) y la demostración de la existencia de peróxido de hidrógeno *in vivo*, le dieron credibilidad a la hipótesis original que la elevaron al nivel de teoría. En 1972, Harman modificó su hipótesis de los radicales libres, otorgándole un rol central a las mitocondrias en la generación de gran cantidad de especies reactivas de oxígeno en las células. En las últimas décadas la hipótesis de Harman fue redefinida e incluyó a otras formas reactivas de oxígeno, que no son radicales libres pero que tienen un rol significativo en la producción de daño celular, y en la actualidad es denominada **teoría del estrés oxidativo del envejecimiento** (Harman, 2006; Rizvi y Pandey, 2012).

Un radical libre es una especie química que posee uno o varios electrones desapareados en su orbital (Valko y col. 2006), y en algunos casos son altamente reactivos no obstante, la reactividad química de los radicales varía ampliamente. Un electrón desapareado es un electrón solo que ocupa un orbital atómico o molecular. El oxígeno es un radical libre que tiene dos electrones en su orbital más externo con el mismo sentido de rotación, por lo que son electrones desapareados con el mismo *spin* (Halliwell, 2006).

Excepto para algunas especies anaeróbicas y aerotolerantes, todos los organismos requieren de O<sub>2</sub> para la producción eficiente de energía a través de la cadena transportadora de electrones que, por último, dona electrones a la molécula de oxígeno, tanto en las mitocondrias de las células eucariotas como en la membrana celular de muchas bacterias. Esta necesidad de O<sub>2</sub> opaca el hecho de que es un gas incoloro muy reactivo y puede ser tóxico. Los organismos aeróbicos sobreviven porque han desarrollado una efectiva defensa antioxidante ya que están sujetos a las



condiciones oxidativas resultantes del metabolismo normal y también, a la exposición a determinadas condiciones ambientales oxidantes. La **paradoja del oxígeno** es de hecho la paradoja de la evolución misma y se denomina así a la toxicidad del oxígeno; no obstante, ser este elemento esencial para el metabolismo energético y la respiración de todos los organismos aeróbicos (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Si bien los organismos aeróbicos necesitan oxígeno para la producción eficiente de energía, pueden sufrir daño oxidativo cuando se exponen a altas concentraciones, aunque se ha encontrado que ocurre daño oxidativo aún a niveles normales de  $O_2$ . El ambiente del medio celular ofrece amplias oportunidades para la reducción no programada del oxígeno generando productos intermedios reactivos que son los verdaderos responsables de su toxicidad (Halliwell, 2006).

**Especies reactivas de oxígeno, EROs**, es un descriptor colectivo que incluye tanto a radicales de oxígeno, como a ciertos no radicales que son agentes oxidantes y/o son rápidamente convertidos en radicales ( $HClO$ ,  $O_3$ ,  $ONOO^-$ ,  $H_2O_2$ ) (Halliwell, 2006). En otras palabras, todos los radicales de oxígeno son EROs, pero no todas las EROs son radicales de oxígeno (Halliwell y Whiteman, 2004). Hay también radicales libres o especies reactivas de nitrógeno (ERNs), que incluyen a radicales como el óxido nítrico ( $NO^*$ ), peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) y dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ), que juegan un rol importante como moléculas activas (Halliwell y col., 1999). Además hay especies reactivas de cloro, bromo, cobre, hierro y azufre, por lo que algunos autores las denominan genéricamente especies reactivas (Tabla 1) (Halliwell y Whiteman, 2004). Los radicales derivados del oxígeno representan la clase más importante de especies reactivas que se generan en los seres vivos (Valko y col, 2006).

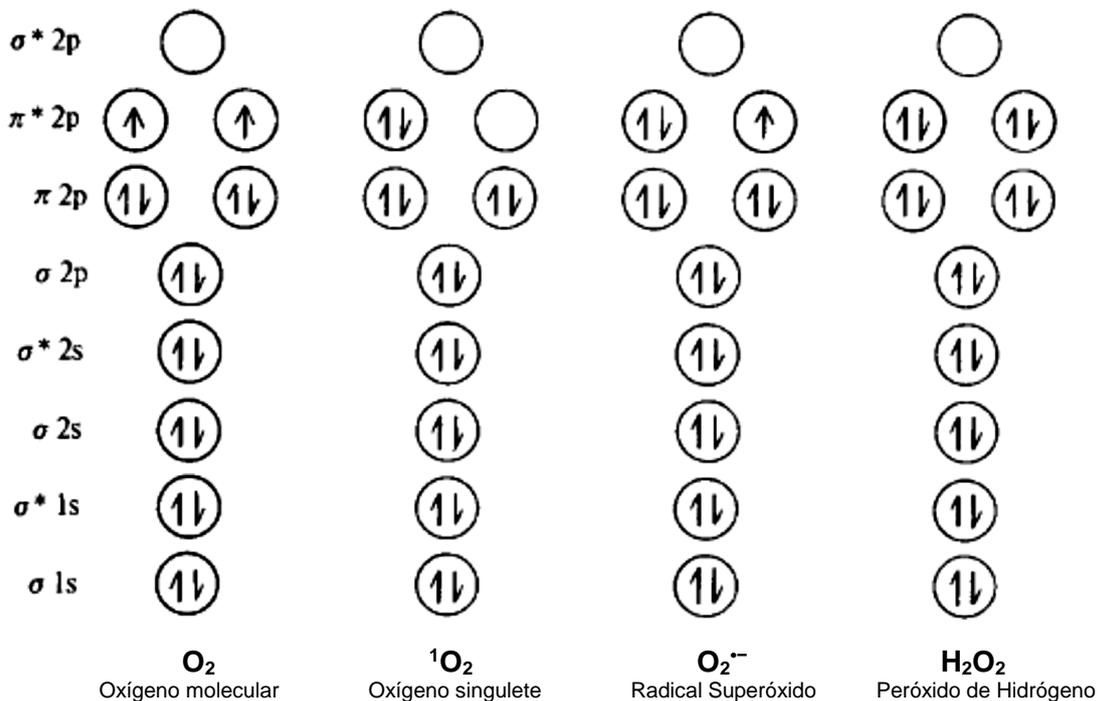
**Tabla 1.** Algunas especies reactivas. Adaptada de Halliwell y Whiteman (2004).

Radicales libres	No radicales
<b>EROs</b>	<b>EROs</b>
Superóxido, $O_2^{\cdot-}$	Peróxido de hidrogeno, $H_2O_2$
Hidroxilo, $OH^\bullet$	Acido hipobromoso, $HBrO^a$
Hidroperoxilo, $HO_2^\bullet$	Acido hipocloroso, $HClO^b$
Carbonato, $CO_3^{\cdot-}$	Ozono, $O_3^c$
Peroxilo, $RO_2^\bullet$	Peróxidos orgánicos, $ROOH$
Alcoxilo, $RO^\bullet$	Peroxinitrito, $ONOO^-d$
Radical dióxido de carbono, $CO_2^{\cdot-}$	Peroxinitrato, $O_2NOO^-d$
Oxígeno singulete, $^1O_2$	Acido peroxinitroso, $ONOOH^d$
<b>Especies reactivas de cloro</b>	<b>Especies reactivas de cloro</b>
Cloro atómico, $Cl$	Acido hipocloroso, $HClO^d$
	Cloruro de nitrilo, $NO_2Cl^e$
	Cloraminas
	Cloro gaseoso, $Cl_2$
	Cloruro de bromo, $BrCl^a$
	Dióxido de cloro, $ClO_2$
<b>Especies reactivas de bromo</b>	<b>Especies reactivas de bromo</b>
Bromo atómico, $Br^\bullet$	Acido hipobromoso, $HBrO$
	Bromo gaseoso, $Br_2$
	Cloruro de bromo, $BrCl^a$
<b>Especies reactivas de nitrógeno</b>	<b>Especies reactivas de nitrógeno</b>
Oxido nítrico, $NO^\bullet$	Acido nitroso, $HNO_2$
Dióxido de nitrógeno, $NO_2^{\cdot c}$	Peroxinitrito, $ONOO^-d$
Radical nitrato, $NO_3^{\cdot cf}$	Peroxinitrato, $O_2NOO^-d$
	Acido peroxinitroso, $ONOOH^d$
	Anión nitroxilo, $NO^\cdot$

<sup>a</sup>HBrO y BrCl podrían considerarse también como especies reactivas de bromo. <sup>b</sup>HClO y HBrO se incluyen a menudo entre las EROs. <sup>c</sup>Especies oxidantes formadas en el aire contaminado que son tóxicas para animales y plantas. <sup>d</sup>ONOO<sup>-</sup>, ONOOH y O<sub>2</sub>NOO<sup>-</sup> se incluyen frecuentemente como EROs. <sup>e</sup>NO<sub>2</sub>Cl también se puede considerar como una especie reactiva de nitrógeno. <sup>f</sup>Estas especies pueden originar la formación de proteínas nitradas alergénicas en el polen.



Las EROs incluyen al radical hidroxilo, al anión superóxido, al peroxilo, al alcoxilo y a otras especies no radicales como el peróxido de hidrógeno y el oxígeno singulete, un poderoso oxidante, entre otras especies químicas (Figura 1) (Halliwell y col., 1999; Scandalios, 2002). El anión superóxido es considerado una ERO “primaria” y puede interactuar con otras moléculas para generar EROs “secundarias”, principalmente a través de procesos catalizados por enzimas o metales (Valko y col., 2006).



**Figura 1.** Configuración electrónica de los orbitales moleculares de EROs (extraído y adaptado de Halliwell, 2006).

Las principales EROs fisiológicamente significativas producidas como resultado del metabolismo celular normal son: el O<sub>2</sub><sup>-</sup>, el OH<sup>•</sup> y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Birben y col., 2012). Las EROs/ERNs pueden desempeñar diferentes roles, incluso duales, durante los procesos celulares (Valko y col., 2006). Por ejemplo, bajo condiciones fisiológicas normales, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede tener un papel importante en la transducción de señales y en la activación del factor de transcripción NF-κB, pero en condiciones de estrés oxidativo, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede conducir a la apoptosis<sup>1</sup> o a la necrosis celular (Scandalios, 2002). Ambas clases

<sup>1</sup>Apoptosis: es una forma evolutivamente conservada de muerte celular programada mediante la cual se produce la eliminación de células dañadas, potencialmente peligrosas para el organismo.



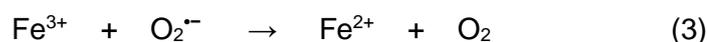
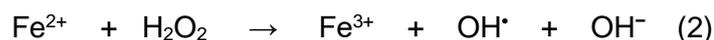
de especies reactivas son productos del metabolismo celular normal en todos los organismos aeróbicos (Valko y col., 2006).

### 1.1.1. Radical superóxido

El radical superóxido,  $O_2^{\cdot-}$ , es relativamente inestable y proviene de la reducción de una molécula de  $O_2$ , se origina en las células eucariotas como producto de reacciones enzimáticas o por autooxidación de compuestos tiólicos, xantinas y hemoproteínas en presencia de cantidades traza de metales (Fridovich, 1995; Valko y col., 2005). El principal lugar de producción de  $O_2^{\cdot-}$  es la mitocondria (Birben y col., 2012; Green y Reed, 1998).

Este radical, aunque no es un oxidante fuerte, es el precursor de la mayoría de las EROs y también está involucrado en la propagación de reacciones oxidativas en cadena dando origen a EROs secundarias (Valko y col., 2006). Además, el anión  $O_2^{\cdot-}$  es la principal fuente de formación de  $H_2O_2$  que es un subproducto estable capaz de atravesar membranas, lo que potencia los mecanismos oxidantes. Su producción en exceso puede tener consecuencias perjudiciales para el organismo (Turrens, 2003; Veal y col., 2007).

La dismutación del anión  $O_2^{\cdot-}$  localizado en los peroxisomas, ya sea espontáneamente o a través de una reacción catalizada por la superóxido dismutasa origina  $H_2O_2$  (ecuación 1) en presencia de iones metálicos, generalmente el catión  $Fe^{2+}$ , produce radicales  $OH^{\cdot}$  altamente reactivos conocida como reacción de Fenton. La combinación de la reacción de Fenton (ecuación 2) y la reducción del catión  $Fe^{3+}$  por el anión superóxido (ecuación 3) dan lugar a la reacción denominada de Haber-Weiss (ecuación 4) (Halliwell, 2006).





El hierro y el cobre son metales de transición muy comunes en las células. El daño producido por las reacciones de Fenton-Haber-Weiss dependerá de la disponibilidad y localización de estos metales y de  $H_2O_2$  (Barbehenn y col., 2005; Halliwell, 2006).

### **1.1.2. Radical hidroxilo**

El radical hidroxilo,  $OH^\bullet$ , es altamente reactivo, dañino, con baja capacidad de difusión y con un tiempo de vida media en solución acuosa menor a 1 nanosegundo, por lo tanto, cuando se produce *in vivo* reacciona cerca de su sitio de formación. Este radical ocasiona severos daños oxidativos en las células al reaccionar con ácidos nucleicos, lípidos y proteínas. Puede ser generado por una variedad de mecanismos, por ejemplo, mediante la descomposición del agua por radiación ionizante, la descomposición fotolítica de alquilhidroperóxidos y a través de las reacciones de Fenton-Haber-Weiss (ecuaciones 2; 3 y 4) (Valko y col., 2004; Barbehenn y col., 2005; Halliwell, 2006).

### **1.1.3. Radicales alcoxilo y peroxilo**

Los radicales alcoxilo,  $RO^\bullet$ , y peroxilo,  $ROO^\bullet$ , son especies reactivas generadas durante la peroxidación lipídica debido al ataque de algunos radicales libres sobre las cadenas carbonadas de los ácidos grasos. No son tan reactivos como el  $OH^\bullet$ , pero son importantes en el inicio y la propagación de la peroxidación lipídica por toda la membrana celular (Halliwell y Whiteman, 2004; Halliwell, 2006; Zharkov, 2013).

### **1.1.4. Peróxido de hidrógeno**

El peróxido de hidrogeno,  $H_2O_2$ , no es un radical libre ya que no posee electrones desapareados, pero se considera una especie reactiva muy importante por ser precursor de EROs secundarias (Veal y col., 2007). El  $H_2O_2$  es la forma menos reactiva de las EROs, su importancia radica en que puede difundir a través de las membranas biológicas y dar lugar a reacciones de oxidación que originan EROs en lugares alejados de la zona de producción de las mismas (Halliwell, 2006; Halliwell y Gutteridge, 2007). Además, esta molécula tiene vida relativamente larga lo que es muy adecuado para la señalización intracelular (Bonekamp y col., 2009).



### 1.1.5. Oxígeno singulete

El oxígeno singulete,  $^1\text{O}_2$ , y el  $\text{OH}^\bullet$  son las formas más reactivas de las EROs y por consiguiente son las más peligrosas para las biomoléculas (Halliwell, 2006). El  $^1\text{O}_2$  no es un radical libre, aunque debido a que es una forma excitada del oxígeno, reacciona fácilmente con otras moléculas. El  $^1\text{O}_2$  se produce por la absorción de energía electromagnética del  $\text{O}_2$  molecular y está restringido a sucesos fotoquímicos, a reacciones de oxidación de diversas especies o también a reacciones enzimáticas (Halliwell, 2006; Halliwell y Gutteridge, 2007).

## 1.2. GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS EN LOS SERES VIVOS

### 1.2.1. Fuentes endógenas de EROs

La evolución de los procesos metabólicos aeróbicos como la respiración y la fotosíntesis han conducido inevitablemente a la generación endógena de EROs por las mitocondrias, los peroxisomas y los cloroplastos como parte de los procesos de fosforilación oxidativa y fotosíntesis (Turrens, 2003; Apel y Hirt, 2004). Si bien, las mitocondrias son los principales organelos generadores de EROs en las células eucarióticas, existen otras fuentes endógenas que incluyen las reacciones inmunológicas y la oxidación de metales de transición (Finkel y Holbrook, 2000; Inoue y col., 2003; Circu y Aw, 2010; Rizvi y Pandey, 2012). Aproximadamente entre el 1 y el 2% del oxígeno consumido durante la respiración se convierte en radicales  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Ott y col., 2007). El nivel de producción de radicales libres en las mitocondrias es directamente proporcional al del daño oxidativo que originan. Durante la fase posreproductiva de la vida, en diversas especies animales, tiende a aumentar la producción del  $\text{O}_2^{\bullet-}$  mitocondrial sin un incremento compensatorio discernible de la defensa antioxidante (Ray y col., 2012; Sohal y Orr, 2012). Las mitocondrias a menudo están expuestas a altas concentraciones de oxidantes con consecuencias deletéreas generalizadas, como producto del daño oxidativo al ADN mitocondrial (ADNmt) (Desagher y Martinou, 2000; Wang, 2001; Jovanović-Galović y col., 2007; Orrenius y col., 2007; Ott y col., 2007). Las deleciones en el ADNmt inducidas por el estrés oxidativo se acumulan con el paso del tiempo en todos los organismos eucariotas. El aumento del daño en el ADNmt compromete inevitablemente la integridad y la función mitocondrial (Finkel y Holbrook, 2000; Rizvi y Pandey, 2012).



Si bien las mitocondrias son la fuente principal de generación de superóxido y de peróxido de hidrógeno en las células eucarióticas, los peroxisomas tienen también un rol crucial en la generación y en el secuestro de EROs. Los peroxisomas son orgánulos que cumplen un amplio rango de funciones relacionadas con la oxidación de los ácidos grasos, el catabolismo de las purinas y la biosíntesis de ácidos biliares (Antonenkov y col., 2010). En los peroxisomas las EROs se producen durante el metabolismo oxidativo que lleva a la formación de productos reactivos peligrosos para la célula (Cooke y col., 2003), especialmente durante la oxidación de los ácidos grasos o debido a la interacción con fuentes exógenas como los xenobióticos (Lopez-Huertas y col., 2000; Schrader y Fahimi, 2006). Algunas funciones metabólicas de los peroxisomas como la oxidación de los ácidos grasos y el metabolismo de los aminoácidos se llevan a cabo en cooperación con las mitocondrias, ya que ambos orgánulos están estrechamente relacionados (Lopez-Huertas y col., 2000; Valko y col., 2006; Bonekamp y col., 2009). En estos orgánulos se produce la mayor parte del  $H_2O_2$  citosólico y se ha demostrado que esta molécula señal de estrés incrementa la proliferación de los peroxisomas debido a la sobrerregulación de los componentes requeridos para su biogénesis (Lopez-Huertas y col., 2000). Los peroxisomas cumplen una importante función en la formación y en la descomposición de las EROs, tanto en animales como en vegetales, dado que la catalasa, una de las principales enzimas antioxidantes, se encuentra mayoritariamente en este orgánulo (Halliwell, 2006; Schrader y Fahimi, 2006; Antonenkov y col., 2010).

### **1.2.2. Fuentes exógenas de EROs**

La exposición a numerosos insecticidas de síntesis como organofosforados (Gupta y col., 1998; Kristoff y col., 2008; Büyükgüzel, 2009; Ferreira y col., 2010; Wu y col., 2011; Gupta y col., 2010), algunos carbamatos (Akbar y col., 2012; Rodríguez y col., 2012), piretroides (Fetoui y col., 2010; El-Demerdash, 2011) y organoclorados (Dorts y col., 2009), así como también la exposición a otros xenobióticos (Valko y col., 2005; Hyršl y col., 2007; Franco y col., 2009; Limón-Pacheco y Gonsebatt, 2009; Zheng y col., 2011), radiación ionizante y no ionizante (Riley, 1994; Buyukuslu y col., 2006; Pandir y Sahingoz, 2014), temperaturas extremas (Grubor-Lajsic y col., 1997; Cui y col., 2011; Jena y col., 2013) y condiciones de anoxia (Aucoin y col., 1991; Lopez-Martínez y Hahn, 2012), entre otros factores ambientales, puede producir EROs por alteración del sistema antioxidante celular en diversos organismos vertebrados e invertebrados. La respuesta inmediata a estos estresores es crítica para la supervivencia (Smith y Workman, 2012).



### 1.3. ESTRÉS OXIDATIVO

**Estrés oxidativo** es una expresión utilizada para describir varios procesos deletéreos en los organismos vivos, que resultan del desequilibrio entre la excesiva formación de EROs y la limitada capacidad del sistema biológico para detoxificarlas rápidamente o para reparar el daño resultante, es decir, es la disminución de la defensa antioxidante (Halliwell y Whiteman, 2004). Según Davies (2000) el estrés oxidativo es una consecuencia inevitable de la vida en una atmósfera rica en oxígeno.

Tradicionalmente se han considerado a las EROs como subproductos tóxicos del metabolismo aeróbico ya que la sola presencia de macromoléculas oxidadas resultan nocivas para los organismos. Las EROs se encuentran normalmente en equilibrio bioquímico con los antioxidantes, aunque incluso, bajo condiciones fisiológicas normales existe un estado crónico de estrés oxidativo debido al desequilibrio entre prooxidantes y antioxidantes (Halliwell, 2007). La completa eliminación de las EROs puede ser altamente peligrosa para la supervivencia de los distintos organismos (Sohal y Orr, 2012), dado que al disminuir los niveles por debajo del valor umbral homeostático, pueden interrumpir el rol fisiológico de los oxidantes en la proliferación celular y en la defensa del huésped (Finkel y Holbrook, 2000; Mittler, 2002; Valko y col., 2004; Bonekamp y col., 2009).

Rizvi y Pandey (2012) propusieron que el estrés oxidativo es uno de los principales factores involucrados en el proceso de envejecimiento de los organismos aeróbicos. El envejecimiento no es un proceso cronológico causado por el paso de tiempo sino que, más bien, se considera un proceso biológico determinado por la velocidad con que las EROS son asimiladas por el cuerpo, destruyendo las células, atacando los tejidos y afectando las funciones vitales.

#### 1.3.1. Efectos biológicos de las EROs

Según Lushchak y Semchyshyn (2012) los efectos biológicos de las EROs se basan en su interacción con los constituyentes celulares más que en su concentración, y el resultado final depende del componente celular que puede interactuar con EROs específicas.

Los oxidantes se generan como resultado del metabolismo intracelular normal en las mitocondrias y los peroxisomas, así como en una variedad de sistemas



enzimáticos citosólicos. Además, numerosos agentes externos pueden desencadenar la producción de EROs. Un sofisticado sistema enzimático y no enzimático de defensa antioxidante que incluye a la catalasa (CAT), a la superóxido dismutasa (SOD) y a la glutatión peroxidasa (GPx) contrarresta y regula los niveles generales de EROs para mantener la homeostasis fisiológica. Tradicionalmente, se considera que el deterioro causado por el aumento de las EROs puede conducir al daño oxidativo de proteínas, lípidos y ADN (Bonekamp y col., 2009; Sohal y Orr, 2012). Además, de estos efectos un incremento en los niveles de EROs también puede constituir una señal de estrés que activa vías de señalización específicas redox sensibles. Una vez activadas estas vías de señalización pueden tener funciones potencialmente perjudiciales o protectoras (Figura 2).

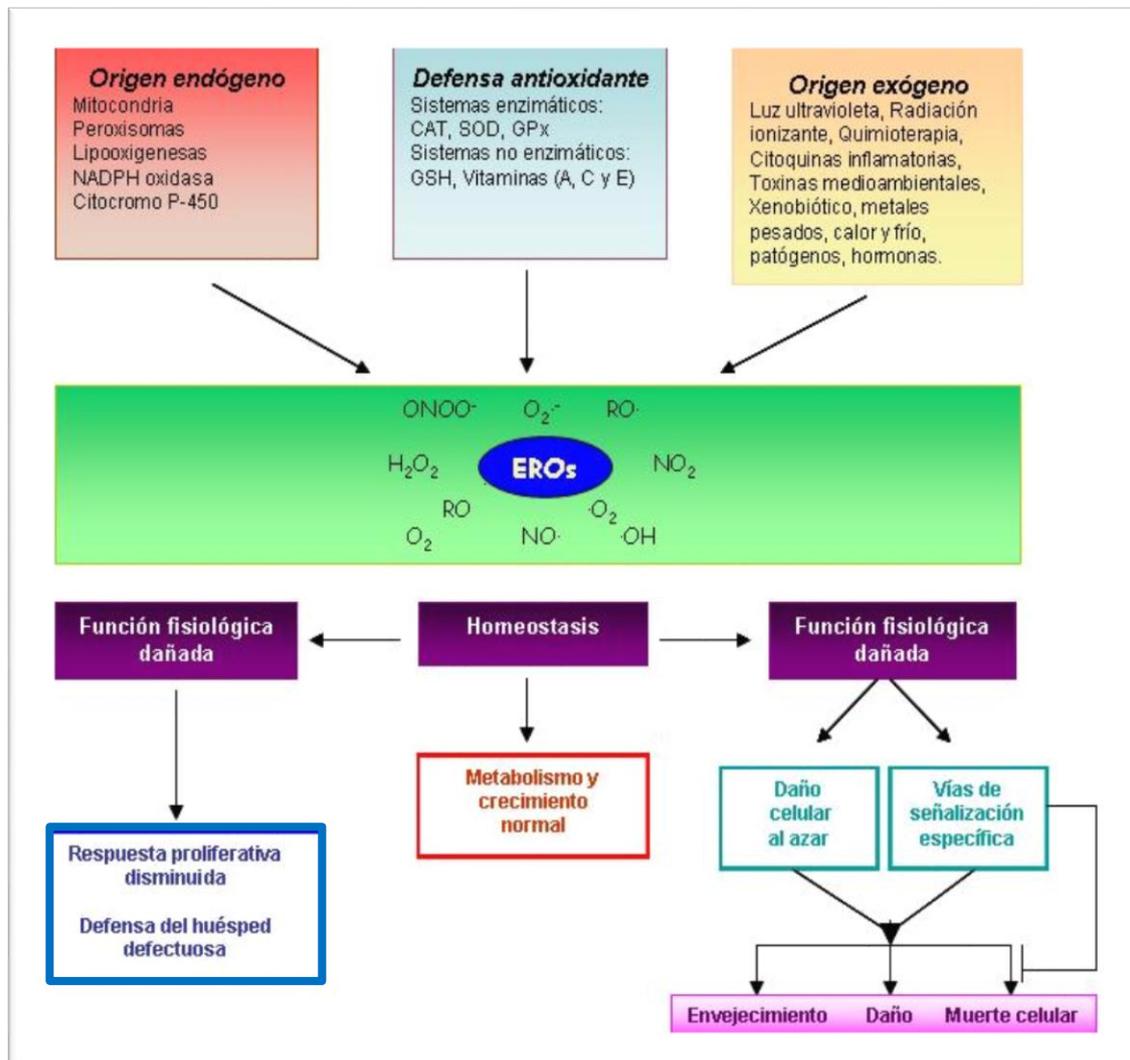


Figura 2. Orígenes y respuestas celulares a las EROs (extraído y adaptado de Finkel y Holbrook, 2000).



Cuando el daño oxidativo es severo, principalmente en el ADN, puede causar la muerte por apoptosis, necrosis o por mecanismos con características de ambos. En efecto, las EROs pueden actuar como desencadenantes de la apoptosis y como participantes si la misma es inducida por otros mecanismos, en vegetales y en animales (Halliwell, 2006). El proceso de apoptosis es de regulación mitocondrial en los insectos lepidópteros (Kumarswamy y col., 2009; Huang y col., 2013) al igual que en humanos (Desagher y Martinou, 2000; Orrenius y col., 2007; Ott y col., 2007).

### 1.3.1.1 Daño oxidativo en lípidos

Los lípidos, componentes principales de las membranas biológicas, son las macromoléculas más susceptibles de ser atacadas por EROs, especialmente aquellas que tienen mayor número de enlaces dobles en su molécula, es decir, los ácidos grasos poliinsaturados (Devasagayam y col., 2003; Valko y col., 2006). Dado que el proceso de deterioro oxidativo de los lípidos incluye la formación de peróxidos lipídicos, la oxidación de los lípidos inducida por EROs se denomina **peroxidación lipídica** o **lipoperoxidación, LPO** (Devasagayam y col., 2003). La LPO ocurre en tres etapas: iniciación, propagación y finalización. Una vez que se inicia el proceso, tiene lugar la propagación de reacciones en cadena hasta la fase de finalización, en la que se originan productos finales como el malondialdehído, MDA, que se acumulan en los sistemas biológicos (Kohen y Nyska, 2002; Rahal y col., 2014).

Los principales efectos de la LPO son: (i) la disminución de la fluidez de la membrana, que facilita el intercambio de fosfolípidos entre las dos partes de la bicapa, (ii) el incremento de la permeabilidad de la membrana a sustancias que normalmente no la atraviesan sino a través de canales específicos (Ej:  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ ) (iii) el daño a las proteínas de membrana con la consecuente inactivación de receptores, enzimas y canales iónicos y (iv) la disminución de la resistencia eléctrica de la membrana. También, las alteraciones estructurales, como la formación de uniones cruzadas entre fosfolípidos, y entre fosfolípidos y proteínas, restringen la movilidad de las proteínas de membrana. El ataque peroxidativo a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas biológicas compromete una de sus funciones principales que es la de actuar como barreras (Devasagayam y col., 2003). Debido a que las membranas celulares son constituyentes de mitocondrias, retículo endoplásmico, lisosomas, aparato de Golgi y peroxisomas, el daño causado por LPO es altamente perjudicial para el funcionamiento y la supervivencia celular (Green y Reed, 1998; Devasagayam y col., 2003). La



peroxidación lipídica es uno de los principales indicadores de daño oxidativo (Rahal y col., 2014).

El MDA es uno de los principales productos de la LPO y tiene efectos mutagénicos y citotóxicos para las células animales y bacterianas (Valko y col., 2006). El MDA puede reaccionar con las bases del ADN guanina, adenina y citocina para formar aductos mutagénicos inductores de transiciones<sup>2</sup> y de transversiones<sup>3</sup> (Fink y col., 1997; Valko y col., 2006). Este compuesto también produce graves alteraciones en la membrana celular en diversos organismos, entre los que se encuentran los insectos (Ahmad, 1995; Halliwell y Whiteman, 2004; Halliwell, 2006).

### 1.3.1.2 Daño oxidativo en proteínas

Las proteínas constituyen el componente mayoritario (68%) del peso seco de las células; dada su abundancia en los sistemas biológicos, son un objetivo importante para las EROs (Davies, 1995; 2005). Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de sufrir daño oxidativo, especialmente a nivel del grupo carbonilo (Rahal y col., 2014). El daño oxidativo en las proteínas ocasiona numerosas consecuencias funcionales ya que éstas actúan como receptores, transportadores, factores de transcripción, componentes del citoesqueleto y tienen, además, funciones enzimáticas (Davies y Goldberg, 1987). La oxidación puede ocurrir tanto en el esqueleto de la proteína como en las cadenas laterales de los aminoácidos (Stadtman y Levine, 2003). Algunos oxidantes producen daño limitado y específico para determinados residuos, mientras que otras EROs como el radical hidroxilo, dan lugar a daños generalizados, relativamente no específicos (Davies, 2005).

La **carbonilación proteica** puede producir la alteración de la estructura primaria y cambios conformacionales mediante la formación de enlaces intra e intermoleculares con la consiguiente modificación, pérdida de función, inactivación y/o proteólisis. La carbonilación proteica es un importante marcador del daño oxidativo celular (Davies, 2005; Braconi y col., 2011; Sohal y Orr, 2012; Sung y col., 2013).

---

<sup>2</sup>Transición: un par de bases es sustituido por otra del mismo tipo, es decir, purinas por purinas o pirimidinas por pirimidinas.

<sup>3</sup>Transversión: un par de bases es sustituido por otra de distinto tipo, es decir, purinas por pirimidinas o pirimidinas por purinas.



### 1.3.1.3 Daño oxidativo en el ADN

Gran parte de la respuesta celular está coordinada por la estructura y la accesibilidad del genoma. En las células eucariotas, el genoma se empaqueta y enrolla por las proteínas histonas para crear una serie de estructuras nucleares de ADN/histona conocidas como nucleosomas, que se condensan posteriormente para formar la cromatina. El grado y la naturaleza de la condensación determinan la transcripción de los genes. Las histonas se pueden modificar químicamente por un gran número de proteínas que son responsables de los cambios dinámicos en la expresión génica. La estructura de la cromatina y de las proteínas de unión determinan la respuesta celular a los cambios ambientales y a las situaciones de estrés (Smith y Workman, 2012).

El ADN, la macromolécula más importante de los organismos vivos, es susceptible a perder un electrón de alguna de sus bases nitrogenadas, lo que puede producir un daño irreversible en la doble hélice al originar bases estructuralmente modificadas (Kanvah y col., 2010; Singh y col., 2012). El daño oxidativo al ADN puede afectar los codones génicos, las bases púricas y pirimídicas, los enlaces fosfodiéster y los azúcares de su estructura, que conducen a la generación de mutaciones, roturas de enlaces simples y dobles y uniones cruzadas con otras macromoléculas (Beckman y Ames, 1997; Cooke y col., 2003; Salmon y col., 2004; Ott y col., 2007; Singh y col., 2012; Zharkov, 2013). Las funciones biológicas celulares normales se ven afectadas debido al daño oxidativo citotóxico o mutagénico que pueden inducir a errores en la traducción proteica, en la replicación del material genético y a la inestabilidad genómica (Cooke y col., 2003; Valko y col., 2006; Singh y col., 2012).

El radical  $\text{OH}\cdot$ , producido en cercanías del ADN nuclear o mitocondrial (ADNmt), reacciona con todos los componentes del ADN. El ADNmt parece ser particularmente sensible a la acción de las EROs debido a que carece de la protección de las histonas, por lo que es baja su eficiencia de reparación a diferencia del ADN nuclear (Valko y col., 2006). El daño oxidativo del ADNmt se acumula de manera muy notable a lo largo del ciclo de vida en diversos organismos y se considera un detonador del proceso de envejecimiento (Muller y col., 2007; Rizvi y Pandey, 2012).



### 1.3.2. Detoxificación de las EROs

La presión evolutiva ha generado mecanismos de defensa antioxidante para reducir los efectos tóxicos de las EROs. La primera defensa antioxidante contra la toxicidad del oxígeno en los organismos aeróbios es la adaptación a la acentuada diferencia entre el gradiente de presión del oxígeno en el ambiente (20%), y su concentración en los tejidos de los mamíferos (3 – 4 %) ya que los niveles tan bajos en los tejidos evitan que ocurra un mayor nivel de daño oxidativo (Davies, 2000). Los antioxidantes mantienen en equilibrio los niveles de EROs, permitiéndoles desempeñar sus funciones biológicas sin producir mayores daños (Halliwell y Gutteridge, 2007; Circu y Aw, 2010). Halliwell y Gutteridge (2007) propusieron que los antioxidantes pueden actuar en diferentes niveles de la secuencia oxidativa y pueden tener distintos mecanismos de acción.

El **sistema de defensa antioxidante** celular es amplio y provee protección a las macromoléculas biológicas contra el daño oxidativo. La defensa antioxidante desplegada por las células puede ser enzimática y no enzimática. El mecanismo de **defensa antioxidante enzimático** es el más importante para la rápida detoxificación y secuestro de las EROs. Entre las enzimas antioxidantes se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión S-transferasa (GST) y la glutatión peroxidasa (GPx) (Aucoin y col., 1991; Yu, 1994; Felton y Summers, 1995; Limón-Pacheco y Gonsebatt, 2009; Rizzo y col., 2010). La **defensa antioxidante no enzimática**, representada por el glutatión reducido (GSH), el ácido ascórbico o vitamina C, el  $\alpha$ -tocoferol o vitamina E, los carotenoides y los flavonoides entre otros, desempeñan un rol fundamental en la reducción de los niveles de EROs que neutralizan y regulan los niveles totales de oxidantes a efectos de mantener la homeostasis fisiológica como respuesta a las condiciones de estrés (Yu, 1994; Zablocka y Janusz, 2008; Birben y col, 2012). Los cambios en las enzimas antioxidantes específicas como SOD, CAT, GPx, los niveles de GSH y MDA pueden reflejar indirectamente la presencia de estrés oxidativo, por lo que pueden actuar como biomarcadores<sup>4</sup> de exposición o de efecto (Büyükgüzel, 2009; Sung y col., 2013).

El mecanismo de defensa antioxidante enzimático mantiene a las EROs en niveles inocuos, transformándolas en H<sub>2</sub>O y oxígeno (Rahal y col., 2014). Mientras que,

---

<sup>4</sup> Biomarcador: parámetro biológico, bioquímico, fisiológico o histológico medible, que refleja cambios en la condición o salud de un organismo o de una población como resultado de la exposición a xenobióticos y/o a otros factores de estrés ambiental.



el mecanismo no enzimático actúa, básicamente, secuestrando y removiendo las EROs generadas durante los procesos reductivos o durante las reacciones detrimentales producidas entre el exceso de radicales libres y las macromoléculas celulares (Krishnan y Kodrick, 2012). A efectos de mitigar o revertir el daño oxidativo en las proteínas, los lípidos y el ADN, las células deben restablecer importantes parámetros homeostáticos mediante la activación de mecanismos de protección (Brandes y col., 2009), la regulación redox de los factores de transcripción que conducen a la expresión de las enzimas de defensa antioxidante (Finkel y Holbrook, 2000; Halliwell, 2006; Ray y col., 2012) o al silenciamiento de genes (Scandalios, 2002; Rahal y col., 2014) y a la activación de enzimas de reparación/eliminación de daños y de proteínas estructurales como las chaperonas moleculares del tipo de las proteínas de shock térmico (Brandes y col., 2009; Dorts y col., 2009; Calabrese y col., 2010; Cui y col., 2011).

Las enzimas SOD y CAT constituyen la primera línea de defensa antioxidante; conjuntamente con la GPx y el GSH endógeno protegen a los organismos del daño oxidativo originado por las EROs (Halliwell, 2006; Schrader y Fahimi, 2006; Bonekamp y col., 2009; Antonenkov y col., 2010; Rizzo y col., 2010; Cui y col., 2011; Barbehenn y col., 2013).

### **1.3.2.1 Glutación S transferasa (GST)**

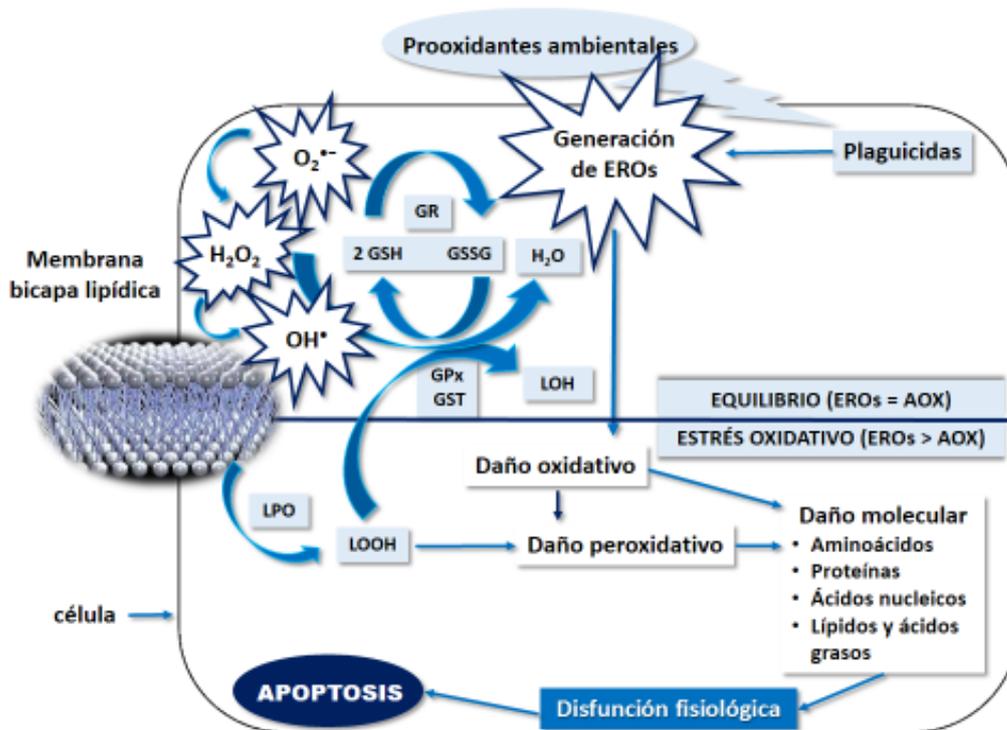
Las GSTs son una familia de enzimas implicadas en la detoxificación y la biotransformación de numerosos compuestos endógenos y xenobióticos que cumplen un rol fundamental en el transporte de proteínas y en la defensa antioxidante (Ding y col., 2003). Estas enzimas catalizan la conjugación de moléculas orgánicas con el grupo thiol del glutatión. Como resultado de esta reacción generalmente, una molécula lipofílica reactiva es convertida en otra soluble en agua mediante un conjugado no reactivo que puede ser más fácilmente excretable (Fukami, 1984; Clark, 1989). En particular, en los insectos las GSTs también participan en los procesos fisiológicos del desarrollo y la metamorfosis y son inducidas por las hormonas juveniles (Wu y Lu, 2008).

Las GSTs pueden clasificarse de acuerdo a su estructura y a la especificidad de sustrato (Mannervik y col., 1985). Se conocen tres familias no relacionadas de proteínas con actividad GSTs en los organismos eucariotas, es decir, (i) las microsomales asociadas a membrana, relacionadas al metabolismo del glutatión, (ii) las citosólicas o solubles y (iii) las mitocondriales o Kappa (Che-Mendoza y col., 2009; Birben y col.,



2012). Las GSTs citosólicas, presentes tanto en plantas como en animales, son proteínas diméricas, compuestas por dos subunidades con dos sitios de unión, uno al que se une el glutatión y el otro, muy variable en su estructura, es el sitio de unión al sustrato (Mannervik y col., 1985; Ding y col., 2003).

Las GSTs junto a otras enzimas antioxidantes (AOX), protegen a las células del daño oxidativo generado por xenobióticos. La peroxidación lipídica se inicia por las EROs al generar hidroperóxidos lipídicos, LOOH, que pueden propagar la cadena autocatalítica de la LPO por generación continua de radicales libres. Las GSTs evitan la LPO al inactivar el  $H_2O_2$  (defensa primaria) y al actuar como la segunda línea de defensa reduciendo LOOH a lípidos monohidroxilados, LOH, y conjugando el 4-hidroxi-2-nonenal, HNE, al GSH (defensa secundaria) (Figura 3).



**Figura 3.** Defensa antioxidante de la enzima GST contra los plaguicidas (extraído y adaptado de Che-Mendoza y col., 2009).

En los insectos, se han identificado seis isoformas de GSTs citosólicas: sigma, zeta, theta, delta, épsilon y omega. Las clases delta y épsilon están presentes en la mayoría de los genomas secuenciados de insectos y desempeñarían un rol importante en la detoxificación de los xenobióticos y en la resistencia a insecticidas (Li y col., 2007; Che-Mendoza y col., 2009; Fang, 2012; Hu y col., 2014). Particularmente, en el mosquito



*Anopheles gambiae* la sobreexpresión de los múltiples miembros de las GSTs clase épsilon estarían asociados a la resistencia al insecticida DDT (Ding y col., 2003).

Las enzimas metabolizantes de drogas, como las GSTs, actúan de manera coordinada con los sistemas antioxidantes para metabolizar los compuestos electrófilos y xenobióticos, y algunas de las moléculas involucradas en estos dos principales mecanismos de defensa son inducidas simultáneamente en respuesta a la exposición a éstos. Tal inducción génica coordinada del sistema metabolizante y del sistema de defensa antioxidante ocurre a través de una región reguladora de respuesta antioxidante (Prester y Talalay, 1995). Se ha demostrado la inducción de genes que codificaron enzimas GSTs, mediante el estudio de los perfiles de expresión génica, bajo condiciones de estrés oxidativo en la abeja *Apis cerana cerana* y en el gusano de seda, *Bombix mori* (Yu y col., 2011; Yan y col., 2012).

### 1.3.2.2 Catalasa (CAT)

La enzima antioxidante CAT está presente en la mayoría de las células de animales, plantas y bacterias aeróbicas. En insectos tiene alta actividad constitutiva y amplia localización subcelular (microsomas, mitocondrias, citosol y núcleo) (Ahmad y Pardini, 1990) mientras que, en plantas y en mamíferos se localiza en los peroxisomas (Halliwell, 2006). Su función principal es catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular (Fridovich, 1995; Wang y col., 2001) (ecuación 5).



### 1.3.2.3 Superóxido dismutasa (SOD)

Uno de los antioxidantes enzimáticos intracelulares más efectivos en la protección de células y tejidos contra el estrés oxidativo es la SOD, presente en todos los tipos celulares de organismos procariotas y eucariotas (Felton y Summers, 1995). Se han descrito varias isoformas, aunque todas catalizan la dismutación del radical



superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno (Wang y col., 2001; Halliwell, 2006; Valko y col., 2006) según la ecuación (6):



El  $\text{H}_2\text{O}_2$  producido es tóxico y se elimina rápidamente por acción de la enzima CAT o de la enzima GPx, que utiliza el poder reductor del GSH. Ambas enzimas catalizan la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua y oxígeno (Davies, 2000).

Todos los miembros de la familia SOD poseen metales de transición en sus sitios activos. En las bacterias y células vegetales se encuentra la Fe-SOD (Davies, 2000; Fridovich, 2004; Halliwell, 2006). Los mamíferos e insectos expresan tres tipos de SOD en sus tejidos, (i) SOD1 o CuZn-SOD, que está localizada en el citosol, (ii) SOD2 o Mn-SOD, localizada en la matriz mitocondrial y se considera la enzima más importante en la defensa antioxidante y (iii) SOD3 que es la forma extracelular (Fridovich, 2004; Valko y col., 2006; Brennan y col., 2012; Sung y col., 2013). En los insectos lepidópteros las fracciones soluble, microsómica y mitocondrial de esta enzima tienen roles importantes en la respuesta al estrés oxidativo celular (Ahmad y col., 1988). Wang y col. (2001) propusieron que aproximadamente un tercio de la actividad total de SOD en los lepidópteros correspondió a la MnSOD localizada en las mitocondrias.

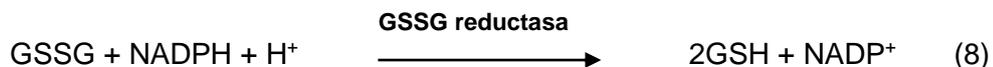
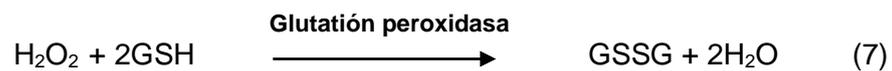
La acción coordinada de las enzimas CAT y SOD evita la formación del radical  $\text{OH}^\bullet$  a través de la reacción de Fenton (ecuación 2), lo cual protege a las células de los subproductos tóxicos generados durante la reducción del  $\text{O}_2$  (Halliwell, 2006).

#### 1.3.2.4 Glutación reducido (GSH)

El antioxidante no enzimático GSH es el tripéptido  $\gamma$ -glutamil-cisteína-glicina y es uno de los tioles de baja masa molecular más abundante de la célula. El GSH se caracteriza por su grupo tiol reactivo y es un efectivo reductor que juega un papel importante en diversos procesos de detoxificación (Felton y Summers, 1995). Además, está involucrado en múltiples funciones fisiopatológicas que incluyen el mantenimiento del estado redox celular, el transporte de los aminoácidos a través de la membrana plasmática, la síntesis y degradación de proteínas, la síntesis del ADN y la regulación de la expresión génica, así como también la detoxificación de sustancias endógenas y



exógenas. El GSH es muy abundante en el citosol, por ser su principal lugar de síntesis, aunque también se localiza en las mitocondrias y en el núcleo (Rebrin y Sohal, 2008). La concentración de GSH varía en los diferentes compartimentos celulares, lo que implica que existen distintos microambientes redox intracelulares dentro de los diferentes orgánulos. Esta molécula reacciona rápidamente con las EROs y las ERNs. Asimismo, participa en reacciones catalizadas por varias enzimas dependientes de GSH (GSH peroxidasas y GSTs). Estas reacciones conducen directa o indirectamente a la formación de glutatión oxidado (GSSG) (ecuación 7). El GSSG puede entonces ser excretado de las células o reconvertido a GSH por la actividad de la enzima GSSG reductasa dependiente de NADPH (ecuación 8) (Sohal y Orr, 2012). En los insectos, la enzima tioredoxina reductasa cataliza la reducción del GSSG a GSH (Kanzok y col., 2001).



Estas reacciones acopladas son esenciales para la defensa antioxidante celular (Valko y col., 2006). El complejo GSH-NADPH es el principal proveedor de energía reductora en las células y constituye el eje fundamental de la defensa antioxidante para la eliminación de EROs (Rebrin y Sohal, 2008).

El principal determinante del estado redox celular es la relación GSH/GSSG, que progresivamente es más prooxidante durante el proceso de envejecimiento debido al incremento en el contenido de GSSG y a la disminución de la capacidad de biosíntesis *de novo* de GSH, especialmente bajo condiciones de estrés (Rebrin y Sohar, 2008; Sohal y Orr, 2012). En los insectos, la acumulación de GSSG también se incrementa con el envejecimiento lo que sugiere un aumento del estrés oxidativo y del deterioro de la integridad de la membrana mitocondrial (Ahmad y Pardini, 1990).



### 1.3.3. Estrés oxidativo en los insectos

El estrés oxidativo en los insectos es una consecuencia inevitable de su estilo de vida aeróbico, debido a que el  $O_2^{\cdot-}$  y el  $H_2O_2$  se forman cada vez que el oxígeno molecular oxida químicamente a los transportadores de electrones (Krishnan y Kodrık, 2012). Todos los factores que provocan estrés oxidativo en los insectos incrementan la producción de EROs que perturban la homeostasis y activan mecanismos de defensa antioxidante, dado que poseen un conjunto de enzimas capaces de remover el exceso de EROs, similares a los de otros organismos eucariotas (Ahmad, 1992; Felton y Summers, 1995; Rizvi y Pandey, 2012).

En los insectos, como en los demás organismos aeróbicos, el estrés oxidativo puede causar daños en la membrana celular o en la célula misma debido a la peroxidación lipídica, a la oxidación de proteínas y enzimas y al agotamiento del GSH; estos procesos podrían conducir a la apoptosis descontrolada (Ott y col., 2007). Los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo en estos organismos también son inducidos por diversos factores como lesiones, infecciones, inanición, locomoción intensa, exposición a campos magnéticos, radiación, temperaturas extremas y contaminantes ambientales (Ahmad, 1995; Scandalios, 2002; Adamski y col., 2003; Krishnan y Kodrık, 2012; Pandir y Sahingoz, 2014). En particular en los insectos, durante el vuelo y la producción de bioluminescencia se ha observado un incremento significativo en la formación de EROs asociado a un notable incremento en los niveles de las enzimas antioxidantes SOD y CAT (Felton y Summers, 1995). También, los insectos fitófagos se ven afectados, a través de su alimentación, por los radicales libres de origen exógeno que forman parte de los mecanismos de defensa de los vegetales que constituyen su alimento. Por lo tanto, los niveles constitutivos de las enzimas de defensa antioxidante y de detoxificación se correlacionan con sus hábitos alimenticios en relación a la susceptibilidad relativa a los aleloquímicos de los vegetales (Ahmad y Pardini, 1990; Lee, 1991; Ahmad, 1992; Felton y Summers, 1995; Barbehenn y col., 2005; Krishnan y col., 2007). Se ha reportado que la SOD en estos organismos cumple un rol crucial en la respuesta antioxidante en condiciones dietarias prooxidantes (Ahmad y Pardini, 1990; Ahmad y col., 1992; Felton y Summers, 1995).

Los insectos controlan el impacto del estrés en sus organismos mediante diferentes procesos bioquímicos y fisiológicos (Velki, y col., 2011; Krishnan y Kodrık, 2012). La defensa antioxidante más simple consiste en minimizar la presión intracorpórea del oxígeno mediante la apertura y cierre de los espiráculos a efectos de



mantener baja pero constante la presión de oxígeno, sin perjuicio de la necesidad de permitir la salida del anhídrido carbónico (Burmester, 2005; Halliwell, 2007). Hetz y Bradley (2005) indicaron que a pesar de su elevada tasa metabólica numerosos insectos, entre los que se encuentran los lepidópteros, presentan patrones altamente discontinuos de intercambio gaseoso con el objetivo de evitar el daño oxidativo en sus tejidos. Además, en los insectos como en otros organismos, las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx y GST protegen a las células del daño oxidativo producido por EROs (Ahmad y Pardini, 1990; Aucoin y col., 1991; Felton y Duffey, 1991; Ahmad, 1992; Felton y Summers, 1995; Jovanović-Galović y col., 2004, 2007; Krishnan y col., 2007).

En insectos lepidópteros, las enzimas antioxidantes se encuentran en niveles elevados en el cuerpo graso<sup>5</sup> y en los tejidos metabólicamente activos como los tubos de Malpighi y el intestino medio que presenta un ambiente altamente oxidante (Felton y Duffey, 1991; Felton y Summers, 1995; Hyršl y col., 2007). Felton y Duffey (1991) detectaron actividad de la enzima CAT en el lumen digestivo de larvas de lepidópteros, principalmente. En relación con los diferentes estadios del desarrollo, Krishnan y col. (2007) reportaron en individuos adultos del escarabajo *Leptinotarsa decemlineata* una mayor actividad de enzimas antioxidantes y menor nivel de EROs en comparación con lo observado en larvas, que resultó en una respuesta de la defensa más eficiente.

#### 1.4. DESCRIPCIÓN Y FENOLOGÍA DE *Cydia pomonella*

La “carpocapsa” o también llamada “polilla de la pera y la manzana”, *C. pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae), se considera una plaga clave por su peligrosidad en los huertos de pomáceas<sup>6</sup> en todo el mundo con excepción de algunos lugares del este de Asia y el oeste de Australia. La familia Tortricidae constituye uno de los principales grupos de lepidópteros en términos de riqueza de especies e importancia económica (Evenden y McClaughlin, 2005; Kührt y col., 2006; Alford, 2007; Pajac y col., 2011).

Los adultos de *C. pomonella* son las típicas “polillas” de hábito crepuscular de color gris, con las alas anteriores que caen en forma de techo a dos aguas cuando están

---

<sup>5</sup>Cuerpo graso: componente del sistema excretor de los insectos asociado con la acumulación de sustancias metabólicas de desecho que se vierten posteriormente a la hemolinfa y finalmente a los tubos de Malpighi que tienen la función de filtrarla. La función del cuerpo graso en los insectos es similar a la función del hígado en los vertebrados.

<sup>6</sup>Pomáceas: perales, manzanos, membrilleros.

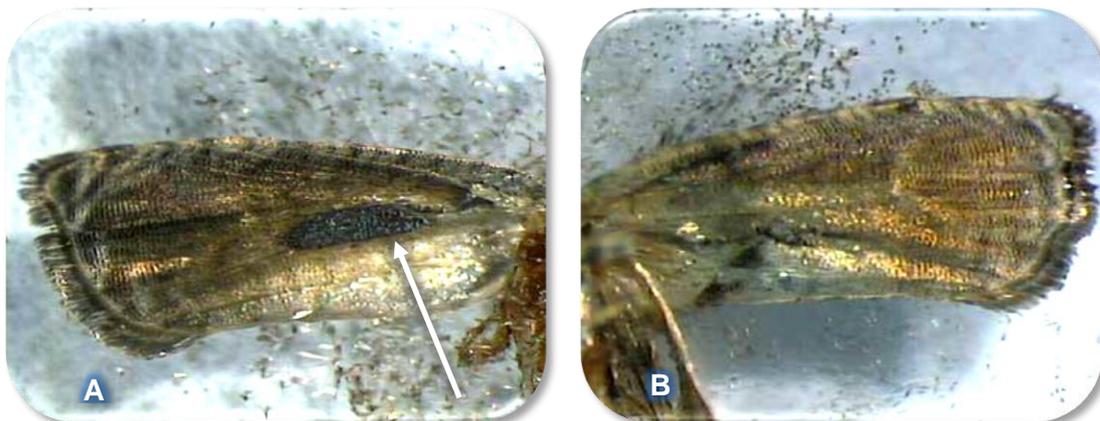


en reposo (Figura 4 A), miden de 15 a 20 mm de largo y generalmente es más pequeño el macho que la hembra. Las alas anteriores son largas, de color gris ceniza, con un diseño de bandas dispersas de color plateado y escamas cobrizas en el extremo de cada una de ellas (Figuras 4 A y B). Las alas posteriores son de tonalidad marrón con reflejos dorados (Figura 4 B) (Fernández y col., 2006; Fernández, 2012).



**Figura 4 A y B.** Adulto de *C. pomonella* en reposo (A) y en vuelo (B).

Los machos tienen una mancha negra en la cara inferior de las alas anteriores, que constituye una característica confiable como carácter sexual secundario y permite diferenciar a los machos (Figura 5 A) de las hembras de la especie (Figura 5 B).



**Figura 5 A y B.** Ala anterior de macho y de hembra *C. pomonella*. (A) Cara inferior del ala anterior del macho con la mancha negra y (B) de la hembra sin la mancha (extraído de Fernández, 2012).

La biología de *C. pomonella* responde a la temperatura, por lo que los procesos se suceden en relación a la cantidad de calor acumulado que se definen técnicamente



como días-grado o “carpogrados” (Fernández, 2012). En la Norpatagonia se han validado las unidades fisiológicas<sup>7</sup> determinadas por el modelo lineal de Vermeulen y col. (1988). El “Sistema Termoacumulativo” para el control de la carpocapsa utilizado actualmente en la Norpatagonia se basa en este modelo fenológico (Fernández, 2012).

La carpocapsa, como todos los lepidópteros, tiene reproducción sexual y es un insecto holometábolo<sup>8</sup>, por lo que su ciclo de vida consta de cuatro estadios diferentes: huevo, larva, pupa y adulto o polilla y se cumple en 49 a 54 días aproximadamente, en función de la temperatura. Las larvas recién eclosionadas son de color blanco cremoso con la cabeza negra y su tamaño es de 2 a 2,5 mm de largo. Las larvas de *C. pomonella* pasan por cinco estadios antes de transformarse en pupas o crisálidas. En la primavera emergen de las pupas los adultos alados, produciéndose el primer vuelo de la temporada. En la región de la Patagonia Norte la emergencia de las polillas provenientes de las larvas diapausantes o invernantes se inicia en el mes de septiembre a partir de 70 - 90 °D, según el modelo fenológico de Vermeulen y col. (1988), y coincide con el período de floración de los manzanos (Fernández, 2012). El vuelo de las polillas de la última generación del año anterior se prolonga hasta principios de diciembre y abarca un período total de casi tres meses, durante el cual se produce la oviposición (Urretabizkaya y col., 2010, Fernández, 2012). Los nacimientos se incrementan hasta hacerse máximos entre mediados y fines de noviembre (400 a 650 °D), para luego declinar. Las larvas de la primera generación del año nacen a partir de los 250 °D e ingresan a los frutos originando galerías y se dirigen a la zona carpelar donde se encuentran las semillas<sup>9</sup>. El desarrollo larval completo se cumple entre 21 y 25 días, luego las orugas abandonan el fruto y se refugian en lugares protegidos para transformarse en pupas y posteriormente en polillas, que se aparean y dan origen a la segunda generación a mediados de diciembre (Figura 6) (Urretabizkaya y col., 2010; Cichón y Fernández, 2012). No todas las larvas se transforman en pupas y posteriormente en adultos, es decir, en distintos momentos de la temporada una proporción creciente de larvas no continúa con su desarrollo y se refugian en lugares

<sup>7</sup>Unidades fisiológicas de desarrollo necesarias para cada estadio del insecto: se determinan por la aproximación lineal de la tasa de desarrollo entre las temperaturas por debajo de un umbral máximo de 31°C y por encima de un umbral mínimo de 10°C.

<sup>8</sup>Holometábolos: tienen metamorfosis completa.

<sup>9</sup>El hábito alimenticio de *C. pomonella* implica un daño estético a la fruta que altera su calidad comercial.



protegidos donde permanecerán como larvas diapausantes<sup>10</sup> hasta la primavera siguiente. Esta parte de la población se comporta como univoltina ya que solamente cumplirá con una generación anual (Fernández, 2012).

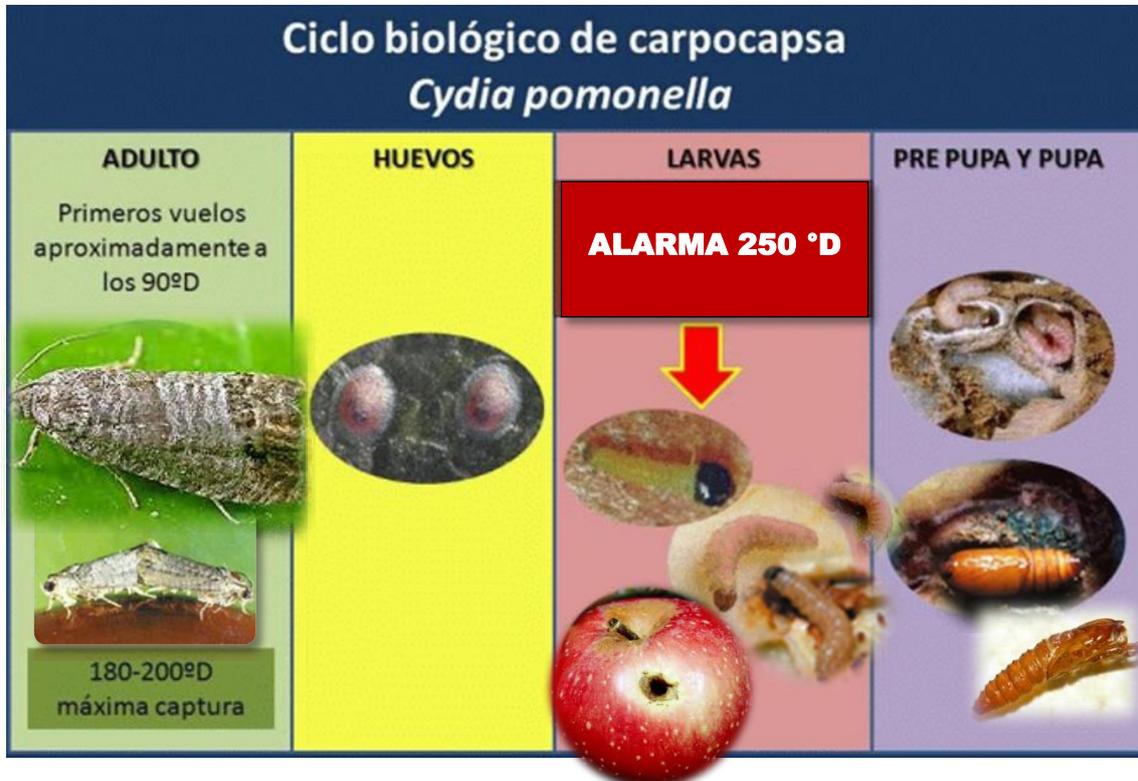


Figura 6. Ciclo biológico de carpocapsa (extraído y modificado de Bado e Iglesias, 2014).

En la región de la Patagonia Norte, durante la primera quincena de diciembre finaliza el nacimiento de las larvas de la primera generación. A partir de este momento comienza a producirse la superposición de generaciones y se hace muy difícil distinguir la procedencia generacional de los distintos individuos, complicando el control poblacional de esta plaga (Cichón y Fernández, 2012). *C. pomonella* es una especie multivoltina<sup>11</sup> y en esta región, generalmente completa tres generaciones anuales y en algunos años excepcionalmente calurosos puede llegar a cuatro generaciones incompletas. En este caso, las larvas permanecen hasta la primavera siguiente como larvas encapulladas diapausantes protegidas bajo las resquebrajaduras de la corteza, en la base de las ramas principales de los árboles frutales, también dentro de los cajones

<sup>10</sup>Diapausa: estado fisiológico de detención del desarrollo, que le permite a un organismo sobrevivir a condiciones desfavorables. Puede ser obligatoria (independiente de estímulos externos) o facultativa (dependiente de estímulos externos).

<sup>11</sup>Multivoltina: completa varias generaciones anuales.



bins y en el suelo entre la hojarasca, aunque en menor proporción (Urretabizkaya y col., 2010; Fernández, 2012).

En general, se considera que la carpocapsa es una plaga sedentaria, aunque la capacidad de vuelo de los adultos es altamente variable. Schumacher y col. (1997) estimaron que aproximadamente el 10% de los individuos realizan vuelos de largo alcance, lo que puede aumentar significativamente la dispersión de esta plaga entre huertos y/o localidades distantes.

### 1.4.1. Importancia y control de *C. pomonella*

En Argentina, *C. pomonella* es una de las plagas endémicas más comunes e importantes que afectan a los frutales de pepita y que, además, condiciona el mercado externo por ser una plaga cuarentenaria<sup>12</sup> de gran importancia. En el año 1963, fue declarada plaga nacional de la agricultura lo cual significa que su control es obligatorio por la Ley N° 6704.

El complejo frutícola de la región de la Patagonia Norte se desarrolla fundamentalmente en los valles irrigados de las provincias de Río Negro y Neuquén y es la principal actividad económica regional que además, representa una de las economías más dinámicas del país debido a que produce tradicionalmente el 85% de las manzanas y el 75% de las peras de la producción nacional (Villarreal y col., 2011; Salvador, 2012; SENASA, 2014). Actualmente está sumida en una profunda crisis sin precedentes, producto de numerosas variables tanto estructurales como coyunturales. El nivel de infestación de perales y manzanos es de gran importancia económica ya que en los huertos sin tratamiento puede alcanzar hasta el 100%. Para lograr una producción sustentable y con calidad de exportación es de fundamental importancia el control de la carpocapsa en la región Norpatagónica (Cichón y col., 2001; Giganti y col., 2007). Esta situación se ha materializado progresivamente en las últimas temporadas, por la anunciada pérdida de registros comerciales y la reducción de los límites máximos de residuos de varios insecticidas organofosforados sobre las frutas, con la consiguiente restricción de la expansión comercial y el acceso limitado de Argentina a mercados

---

<sup>12</sup>Plaga cuarentenaria: plaga de importancia económica y/o ambiental cuya introducción se evita o se limita su distribución en el territorio nacional debido a que provoca efectos negativos sobre los recursos agrícolas.



como Taiwán, India, Japón y otros países emergentes del sudeste asiático (Villarreal y col., 2011; SENASA, 2013).

El sector frutícola nacional se enfrenta actualmente a severas restricciones comerciales impuestas por los principales mercados internacionales en los que Argentina desea afianzarse y ampliar su mercado, estas restricciones están relacionadas con aspectos sanitarios y ambientales. El tipo de estrategias a seguir para el control de plagas y en especial para el control de *C. pomonella*, se ve condicionado por las exigencias de los mercados compradores respecto de la calidad e inocuidad alimentaria a efectos de garantizar la ausencia de plagas cuarentenarias y los niveles de tolerancia aceptados por los países importadores respecto de los residuos de plaguicidas (Cichón y col., 2012). Por esta razón, el manejo sanitario regional se ha desarrollado en un marco orientado fuertemente a la exportación, mediante la implementación de estrategias de manejo de acuerdo a los estándares internacionales de calidad impuestos por los principales países importadores (Villarreal y col., 2011; SENASA, 2014).

Desde el año 2006 el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), ha impulsado el “Programa Nacional de Supresión de Carpocapsa para la producción frutícola en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén”. Este Programa tiene como objetivo principal la disminución de la densidad poblacional de *C. pomonella* por debajo del 0.1% de daño a la cosecha y el mantenimiento de dicho valor en el largo plazo, con el objetivo de garantizar el mínimo número de aplicaciones de insecticidas de amplio espectro. Mediante la aplicación del mencionado programa se logró la disminución del porcentaje de daño producido por carpocapsa a nivel regional del 6% al 0,26%, y la disminución del número de aplicaciones de insecticidas de síntesis en más del 40% (Cichón y Garrido, 2012; SENASA, 2013).

Debido a que el control biológico de esta plaga es muy limitado y que es bajo el umbral de daño económico<sup>13</sup>, que se alcanza cuando se ve afectado el 1% de los frutos, el control regional de *C. pomonella* en los valles irrigados de la Patagonia Norte se ha basado hasta el año 2010, principalmente en el uso de insecticidas neurotóxicos de amplio espectro con los objetivos de garantizar la sanidad y favorecer el rendimiento de los cultivos de pomáceas. Debido a la necesidad de mitigar los efectos negativos del uso indiscriminado de insecticidas, se implementan programas de Manejo Integrado de

---

<sup>13</sup>Umbral de daño económico: densidad poblacional de la plaga a la que debe aplicarse tratamiento para evitar que la población aumente hasta alcanzar el nivel económico de daño.



Plagas (MIP) que los fueron reemplazando progresivamente (Cichón y Garrido, 2012). El MIP consiste, básicamente, en el empleo de herramientas sustentables en el tiempo y seguras para el medioambiente, como el sistema de alarma termoacumulativo, las técnicas de confusión sexual y del insecto estéril, el control biológico, el monitoreo semanal de la plaga por medio de trampas de feromonas para estimar los niveles poblacionales y determinar el momento óptimo de aplicación racional de insecticidas, en combinación con prácticas de manejo cultural (Villareal y col., 2010). También son muy utilizados para el control de esta plaga los productos basados en el virus de la granulosis de *C. pomonella* o granulovirus (CpGV). El Carpovirus Plus fue el primer insecticida biológico desarrollado íntegramente en Argentina por investigadores del INTA Castelar y registrado para su comercialización en el año 2000 (Haase y col., 2015). Tras su ingestión, el CpGV destruye las células de las larvas al producirse su replicación. El CpGV conjuntamente con la técnica de confusión sexual, constituyen la piedra angular para el control de esta plaga en programas de manejo orgánico o biológico (Cichón y col., 2001; Quintana y col., 2004; Eberle y col., 2008; Jehle, 2008).

En la actualidad, uno de los plaguicidas más usados en la región de la Patagonia Norte para el control de la carpocapsa es el clorantraniliprol. Este compuesto fue el primer insecticida del grupo de las diamidas antranílicas en ser comercializado y pertenece a la clase 28 de acuerdo a la clasificación según el modo de acción de la IRAC (Insecticide Resistance Action Committee, 2009). El clorantraniliprol ejerce su acción tóxica debido a su unión selectiva a los receptores de rianodina localizados en los músculos de los insectos, lo cual resulta en la liberación del calcio intracelular que afecta la homeostasis en las células nerviosas y musculares. Este insecticida actúa por ingestión y por contacto principalmente sobre las larvas y en menor proporción sobre los adultos de un amplio rango de lepidópteros, dípteros, isópteros, hemípteros y coleópteros (Cordova y col., 2006; Sattelle y col., 2008; Lahm y col., 2009; Bentley y col., 2010). El clorantraniliprol, por su especificidad, baja toxicidad para mamíferos y reducido impacto ambiental es muy utilizado en programas de MIP para el control de la carpocapsa (Milanesi y col., 2008; Witzgall y col., 2008; Weddle y col., 2009; Pluciennik, 2012).

Si bien los insecticidas utilizados para el control de *C. pomonella* son aplicados en los estadios tempranos de su ciclo de vida, los insectos adultos también están expuestos a estos químicos (Knight y Flexner, 2007). En la actualidad no hay insecticidas específicos que se apliquen directamente en la etapa adulta de este insecto plaga. Más aún, Reyes y col. (2004) informaron que las altas actividades de GST y de



oxidasas de función mixta en adultos de carpocapsa estarían asociadas a la reducción de la susceptibilidad a metilazinfos de larvas de tres huertos de Chile. Los autores sugirieron que estas enzimas estarían involucradas en la degradación del metilazinfos, lo que podría resultar en individuos resistentes a la acción de este producto. Esta correlación entre la respuesta de estadios larvales con las actividades enzimáticas de adultos de *C. pomonella* proporciona un antecedente fundamental para evaluar parámetros bioquímicos antioxidantes y de detoxificación en la etapa adulta de esta importante plaga. Hasta la fecha no existen trabajos en carpocapsa que hayan evaluado el efecto de la exposición a xenobióticos ambientales sobre estos parámetros.

## 1.5. Hipótesis

- ✓ Adultos de *C. pomonella* provenientes de diferentes huertos de manzanos de la Patagonia Argentina expuestos a factores ambientales prooxidantes, incluidos los plaguicidas, presentan alteraciones en la respuesta del sistema de defensa antioxidante respecto a la de una población de referencia de laboratorio.
- ✓ La exposición de adultos de *C. pomonella* a clorantraniliprol modifica la respuesta bioquímica del sistema antioxidante.

### 1.5.1. Objetivo general

Evaluar biomarcadores del sistema antioxidante – GST, CAT, SOD y GSH- y de daño oxidativo -MDA- en organismos adultos de *C. pomonella* de diferentes poblaciones de campo y de una cepa de referencia de laboratorio y estudiar el efecto de la exposición *in vivo* al insecticida clorantraniliprol sobre estos parámetros.

### 1.5.2. Objetivos específicos

- ✓ Determinar las actividades de las enzimas antioxidantes GST, CAT y SOD en adultos de *C. pomonella* provenientes de poblaciones de campo y de una población de laboratorio.



- ✓ Establecer el contenido de GSH endógeno en adultos de *C. pomonella* de poblaciones de campo de la Patagonia Argentina y de una población de referencia.
  
- ✓ Evaluar el daño oxidativo sobre lípidos de adultos *C. pomonella* provenientes de distintos huertos de manzanos localizadas en la Patagonia Argentina y de la cepa de laboratorio.
  
- ✓ Analizar el efecto de la exposición *in vivo* de polillas de *C. pomonella* a clorantraniliprol sobre los parámetros bioquímicos antioxidantes mencionados.



# MATERIALES Y MÉTODOS



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. 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-dinitrobenceno (CDNB), la epinefrina ((+)-hidrocloruro 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, formulación comercial Corangen® 20 SC, fue donado por el INTA Alto Valle. El resto de las drogas y solventes usados fueron de calidad analítica.

### 2.2. MATERIAL BIOLÓGICO

La totalidad de las determinaciones bioquímicas se realizaron en polillas de *C. pomonella* de 1 o 2 días de emergidas. Los insectos adultos se obtuvieron en el laboratorio a partir de las larvas diapausantes recolectadas en cartones corrugados colocados en la base de los árboles frutales de huertos con manejo convencional, orgánico y sin tratamiento de diferentes localidades patagónicas (Tabla 2 y Figura 7), en las temporadas 2012 y 2013. Las larvas se conservaron a 4°C con un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad durante tres meses, para satisfacer el requerimiento de horas de frío. Las larvas diapausantes fueron suministradas por el INTA Alto Valle.

**Tabla 2.** Descripción de las poblaciones analizadas en este trabajo de tesis.

Región	Localización	Población	Protección
Neuquén	38°49'00"S, 68°08'00"O	Centenario	Química
Río Negro	39°02'45,7"S, 67°43'34,5"O	Allen	Química
Río Negro	39°02'31,4"S, 67°33'51,6"O	Gral. Roca1	No tratada*
Río Negro	39°00'36,7"S, 67°41'48,9"O	Gral. Roca2	Química
Río Negro	39°02'12"S, 67°36'56"O	Gral. Roca3	Química
Río Negro	39°05'50,8"S, 67°10'08,7"O	Gral. Godoy	Química
Chubut	31°32'15"S, 68°31'11"O	Sarmiento1	Orgánica
Chubut	31°32'15"S, 68°32'25"O	Sarmiento2	Química

\* Chacra abandonada desde el año 2001.



**Figura 7.** Localización geográfica de las regiones muestreadas de la Patagonia Argentina (imágenes satelitales de Google Earth).

Como población de referencia se utilizaron polillas de carpocapsa procedentes de una colonia de laboratorio, que fueron criadas en condiciones controladas de temperatura, fotoperíodo, humedad y sin contacto con plaguicidas. Esta colonia se estableció en 1991 mediante la colecta de larvas diapausantes provenientes de una chacra de manzanos abandonada, de la localidad de Gral. Roca (Río Negro), que se ha mantenido desde entonces con la introducción regular (cada 3 años) de material biológico de otra colonia de laboratorio para evitar los efectos de la depresión por consanguinidad<sup>14</sup>.

<sup>14</sup>Depresión por consanguinidad: pérdida de adaptación (vigor, viabilidad, fecundidad) producida por la disminución de la variación genética debida a la homocigosis, que impide la supervivencia de la especie.



Una vez cumplido el período de frío, para inducir el término de la diapausa y favorecer la emergencia de los adultos, las larvas provenientes de laboratorio y las obtenidas en el campo se transfirieron a envases de tergopol con cubierta de malla mosquitera hasta la emergencia. Diariamente se recolectaron las polillas, se colocaron en eppendorf y se conservaron en ultrafreezer a -80 °C hasta la realización de las determinaciones bioquímicas.

Los adultos recién emergidos de la población de Centenario se expusieron a concentraciones crecientes de Coragen® 20 SC para evaluar el efecto sobre biomarcadores del estrés oxidativo.

### **2.3. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS**

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 + 6,3 mmolar EDTA con un homogeneizador Ultrasónico Eléctrico PRO 200, siempre trabajando sobre hielo. Los homogenados se centrifugaron a 1.000 x g a 4°C durante 15 min. De los sobrenadantes obtenidos se separaron 150 µL para la determinación del nivel de GSH a los que se le agregaron 150 µL de ácido tricloroacético 10% y se centrifugaron a 10.000 x g a 4°C durante 10 min y 200 µL para evaluar el contenido de MDA. Ambas determinaciones se realizaron inmediatamente después de la homogeneización. El resto del sobrenadante se centrifugó a 16.000 x g a 4 °C durante 20 min y el sobrenadante obtenido se conservó en ultrafreezer a -80 °C hasta su utilización para las determinaciones bioquímicas (Figura 8).

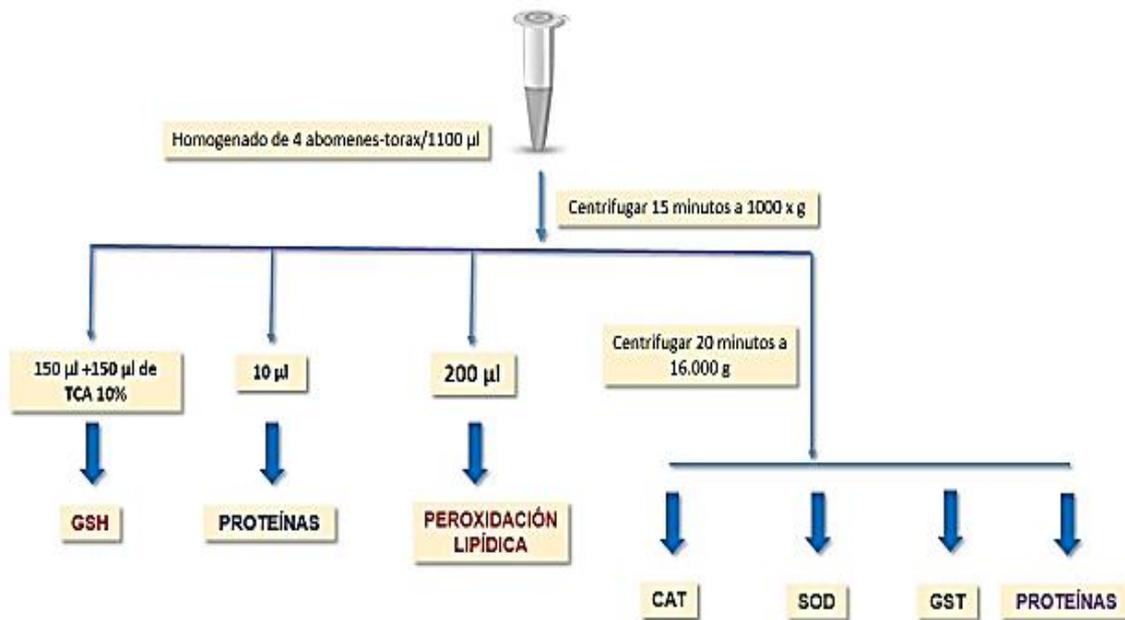


Figura 8. Esquema de preparación de las muestras.

## 2.4. ANÁLISIS BIOQUÍMICOS

### 2.4.1. Determinación de la actividad enzimática de GST

La habilidad de los preparados enzimáticos para catalizar la conjugación del sustrato CDNB se determinó usando la técnica espectrofotométrica desarrollada por Habig y col. (1974). La mezcla de reacción consistió en 920 µL de buffer fosfato de Na 0,1 M, pH: 6,5; 10 µL de CDNB 50 mM en acetonitrilo y 50 µL de GSH 0,1 mM. La actividad enzimática se determinó registrando el cambio en la absorbancia a 340 nm durante 120 segundos en un espectrofotómetro Shimadzu 1603 UV-Vis de doble haz a 25 °C. La actividad específica de GST se expresó como µmoles de CDNB conjugados x min<sup>-1</sup> x mg proteína<sup>-1</sup> usándose el coeficiente de extinción molar 9,6 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

### 2.4.2. Determinación de la actividad enzimática de CAT

La actividad de la CAT se determinó cinéticamente según la técnica de Beers y Sizer (1952) que se basa en la descomposición del peróxido de hidrógeno por la enzima CAT presente en el homogenado. La reacción se realizó en 30 mL de buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7,2 que contenía H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 25 mM. Para iniciar la reacción se agregaron



10  $\mu\text{L}$  del sobrenadante centrifugado a 16.000 x g y la actividad enzimática se determinó registrando de manera continua la disminución en la absorbancia a 240 nm durante 60 segundos en un espectrofotómetro Shimadzu 1603 UV-Visible de doble haz a 25 °C. La actividad específica de la CAT se expresó como mmoles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumidos  $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$  usando un coeficiente de extinción molar de  $39 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Büyükgüzel y col., 2013).

### **2.4.3. Determinación de la actividad enzimática de SOD**

La actividad de la SOD total se determinó por el método de la epinefrina descrito por Misra y Fridovich (1972), basado en la habilidad de esta enzima para inhibir la autooxidación de la epinefrina por el adrenocromo a pH alcalino. El volumen de reacción fue de 1.140  $\mu\text{L}$  y contenía buffer glicina 50 mM, pH 10,2 y 20  $\mu\text{L}$  de epinefrina 60 mM a pH 2,0. Se monitoreó el cambio en la absorbancia a 480 nm durante 600 segundos y a 30°C para cada medición. Los resultados se expresaron como unidades de SOD  $\times \text{mg de proteínas}^{-1}$  ( $\text{U mg}^{-1}$ ), donde 1 U de SOD se define como la cantidad de muestra que causa el 50% de inhibición de la autooxidación de la epinefrina.

### **2.4.4. Determinación de GSH endógeno**

El contenido de GSH endógeno se determinó colorimétricamente como tioles ácidos solubles por la técnica descrita por Ellman (1959) y modificada por Venturino (2001). A una alícuota de 150  $\mu\text{L}$  del sobrenadante se le agregaron 150  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético al 10% y se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para determinar el contenido de GSH.

Se determinó el contenido de GSH en 100  $\mu\text{L}$  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. La mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 412 nm en un espectrofotómetro Shimadzu 1603 UV-Vis de doble haz. Los tioles ácidos solubles se cuantificaron usando una curva de GSH puro como estándar. El contenido de GSH endógeno se expresó como nmoles de GSH  $\times \text{mg de proteína}^{-1}$ .



### 2.4.5. Determinación del nivel de peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica se estimó midiendo el contenido de MDA mediante el test del ácido tiobarbitúrico descrito por Ortega-Villasante y col. (2005). A 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante a 1.000 x g de cada muestra se le agregaron 400  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción que contenía ácido tiobarbitúrico al 0,375%, ácido tricloroacético al 15% y ácido clorhídrico 0,25 N en una relación 1:1:1. Las mezclas se colocaron en agua a 100 °C durante 10 min, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron a 3.000 x g durante 10 minutos. El nivel de MDA se determinó a punto fijo a 532 nm y se usó un coeficiente de extinción molar igual de 156  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . Los resultados se expresaron como nmoles de MDA x mg proteína<sup>-1</sup>.

### 2.4.6. Determinación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó aplicando el método descrito por Lowry y col. (1951) y se usó albúmina sérica bovina como estándar. Se agregó la mezcla compuesta por  $\text{NaCO}_3$  en NaOH, tartrato de Na al 1% y  $\text{CuSO}_4$  al 0,5% a las muestras. Se dejó actuar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se agregó Folin y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los valores de absorbancia se registraron a 750 nm en espectrofotómetro Shimadzu 1603 UV-Vis de doble haz. Las muestras se analizaron por triplicado.

## 2.5. BIOENSAYO TOXICOLÓGICO

Para evaluar el efecto de la exposición al insecticida clorantraniliprol, formulación comercial Coragen® 20 SC -equivalente a 200 g de ingrediente activo x L<sup>-1</sup>- sobre biomarcadores del sistema antioxidante de adultos de *C. pomonella* se utilizaron polillas de la población de Centenario, provincia de Neuquén. Los bioensayos se realizaron de acuerdo a Knight (2010). Los individuos adultos de 1 día de emergidos se expusieron a concentraciones crecientes (0; 12,5; 25; 50; 100; 1.000 y 2.000 mg x L<sup>-1</sup>) del insecticida depositado de forma homogénea en la superficie interna y en las tapas de frascos de vidrio de 200 mL (1.000  $\mu\text{L}$  de cada dilución del insecticida en agua) y secados al aire durante 24 h. Para los controles se agregaron 1.000  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Se realizaron 2 repeticiones con 20 insectos adultos (n= 40) para cada una de las concentraciones evaluadas. La mortalidad se registró a las 24 h y los individuos sobrevivientes se



conservaron en eppendorf en un ultrafreezer a -80 °C hasta la determinación de los parámetros bioquímicos.

## 2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como promedios  $\pm$  errores estándar de 10 muestras independientes. La normalidad de los datos se evaluó mediante el análisis de los residuales y la homocedasticidad a través del test de Levene. Las diferencias estadísticas de los parámetros bioquímicos evaluados entre las poblaciones se analizaron por ANOVA de un factor seguido del test de Tukey, usando el Software Statistica 7.1. Los datos de GST en función de las poblaciones se transformaron con raíz cuadrada para lograr la uniformidad de las varianzas. El nivel de significancia  $p < 0,05$  se utilizó en todos los análisis estadísticos.

El efecto de la exposición de insectos adultos de *C. pomonella* a concentraciones crecientes del insecticida clorantraniliprol sobre los parámetros antioxidantes ensayados se analizó de manera análoga.

A efectos de observar posibles vínculos entre los parámetros bioquímicos analizados en las diferentes poblaciones se realizó un análisis de correlación de Pearson usando el software mencionado.



# RESULTADOS

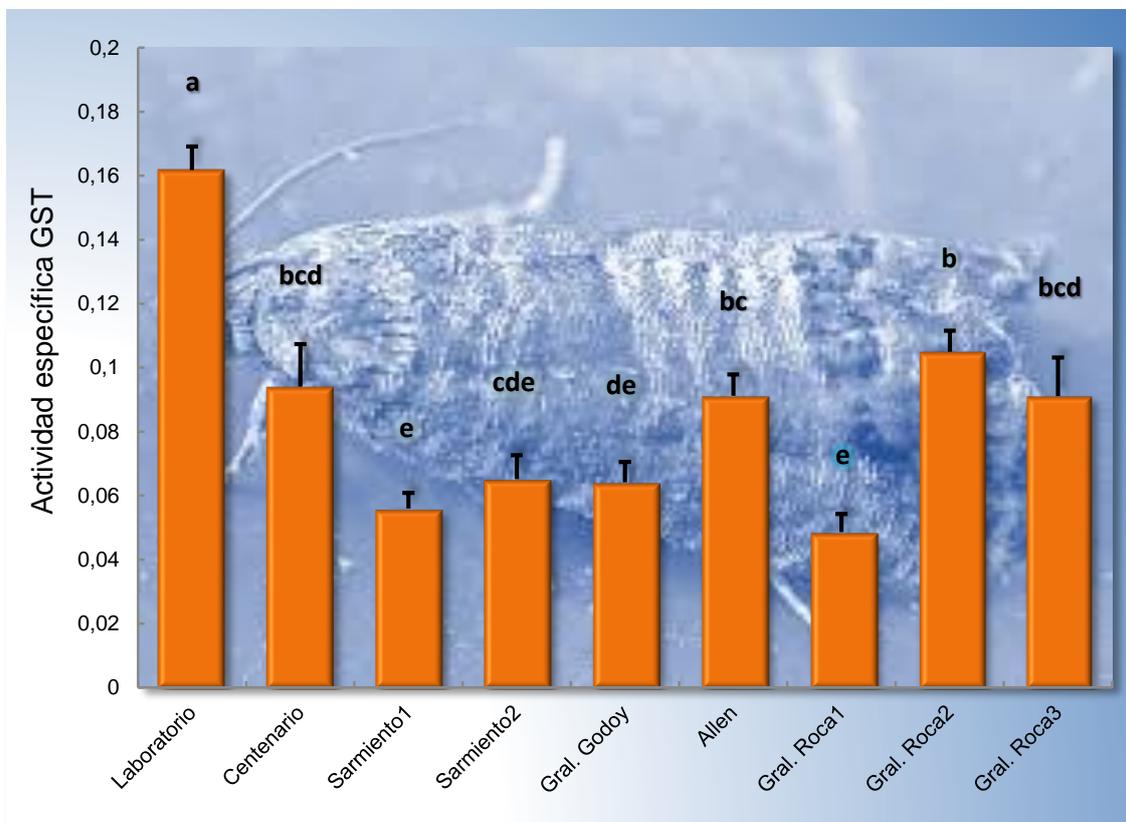


### 3. RESULTADOS

#### 3.1. ENSAYOS BIOQUÍMICOS

##### 3.1.1. Determinación de la actividad enzimática de GST

Los niveles de actividad enzimática promedio de GST determinados en insectos adultos de *C. pomonella* de diferentes poblaciones de campo y en la cepa de laboratorio son significativamente diferentes (Figura 9).



**Figura 9.** Actividad de GST en adultos de *C. pomonella* provenientes de ocho de manzanos localizadas en la Patagonia Argentina y en una cepa de laboratorio. Cada uno de los puntos representa la actividad promedio  $\pm$  el error estándar de diez muestras independientes. La actividad está expresada como  $\mu\text{moles de CDNB conjugado} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$ . Valores similares se representan con la misma letra. Letras distintas indican diferencias significativas entre poblaciones,  $p < 0,05$ .

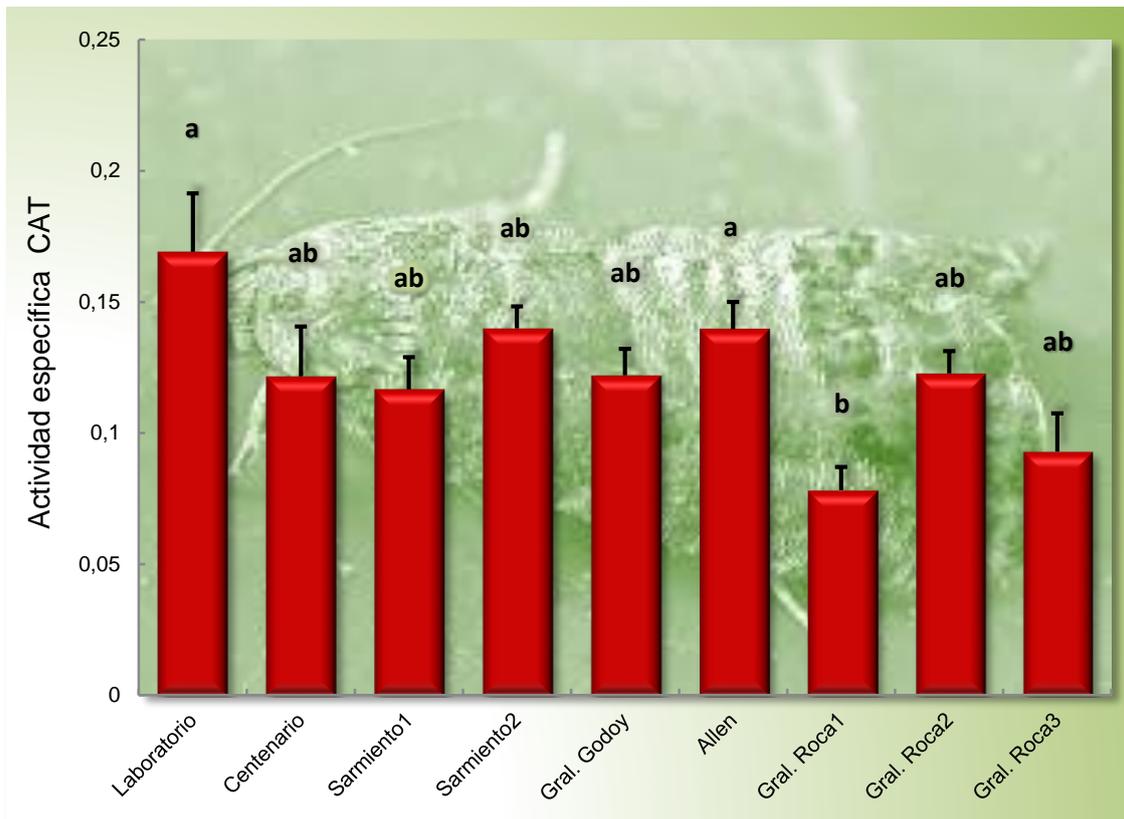
La mayor actividad enzimática de GST se determinó en la cepa de referencia de laboratorio ( $0,16 \pm 0,02 \mu\text{moles CDNB} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$ ). El ANOVA reveló que la actividad de GST detectada en los adultos de Centenario, Sarmiento1, Sarmiento2, Gral. Godoy, Allen, Gral. Roca1, Gral. Roca2 y Gral. Roca3 fue estadísticamente inferior a la



expresada por la cepa de laboratorio ( $p < 0,001$ ). Las polillas de Gral. Roca1 ( $0,05 \pm 0,01 \mu\text{moles CDNB} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteina}^{-1}$ ) presentaron el valor más bajo de actividad de GST.

### 3.1.2. Determinación de la actividad enzimática de CAT

Las actividades de CAT determinadas en las poblaciones de laboratorio y de Allen fueron 2,13 y 1,80 veces mayores a la estimada en los individuos provenientes de Gral. Roca1, que resultó estadísticamente diferente ( $p < 0,01$ ). No se observaron diferencias significativas entre las actividades enzimáticas de las otras poblaciones analizadas (Figura 10).

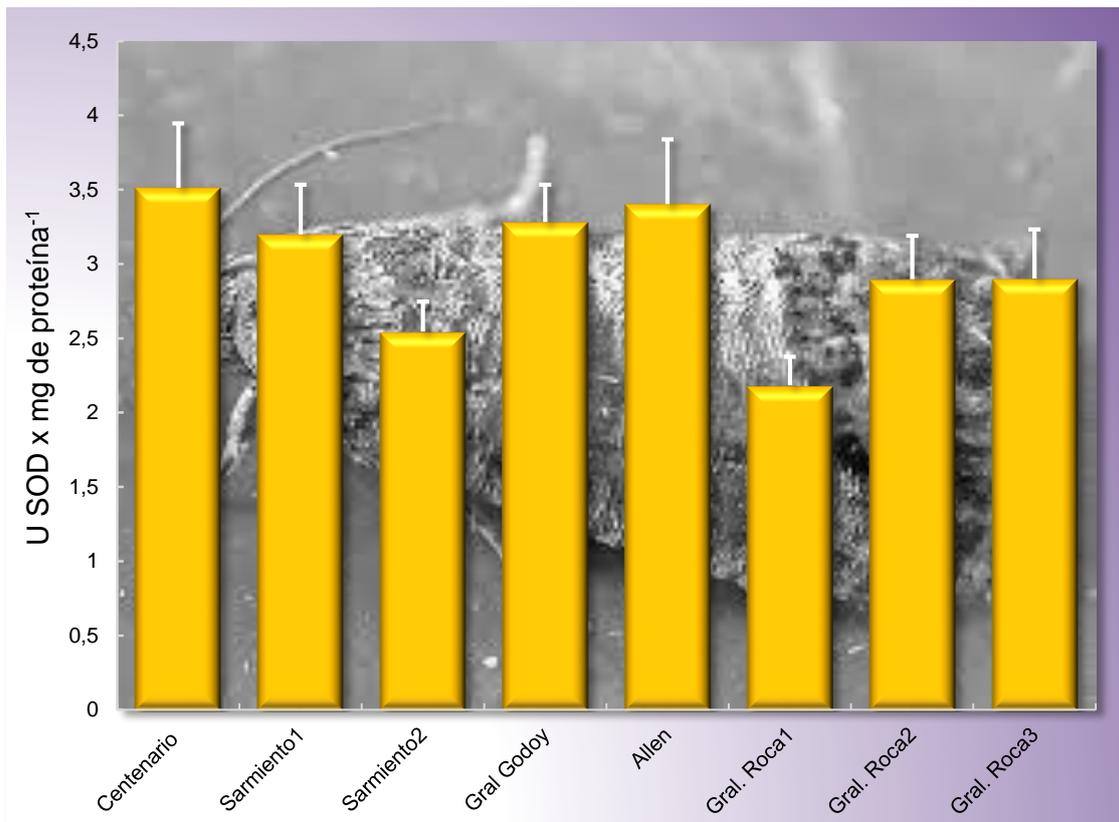


**Figura 10.** Actividad de CAT en adultos de *C. pomonella* determinada en ocho poblaciones de campo y en una de laboratorio. Los valores representan la actividad promedio  $\pm$  el error estándar de diez muestras independientes. La actividad específica se expresa como  $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2$  consumido  $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteina}^{-1}$ . Letras distintas indican diferencias significativas entre poblaciones,  $p < 0,05$ .



### 3.1.3. Determinación de la actividad enzimática de SOD

Los niveles de actividad de SOD resultaron similares en las polillas de las diferentes poblaciones de campo ensayadas (Figura 11). En particular, los insectos de la población de Gral. Roca1 expresaron el menor nivel de actividad enzimática que no resultó estadísticamente diferente comparado con los determinados en las restantes poblaciones ( $p > 0,05$ ).



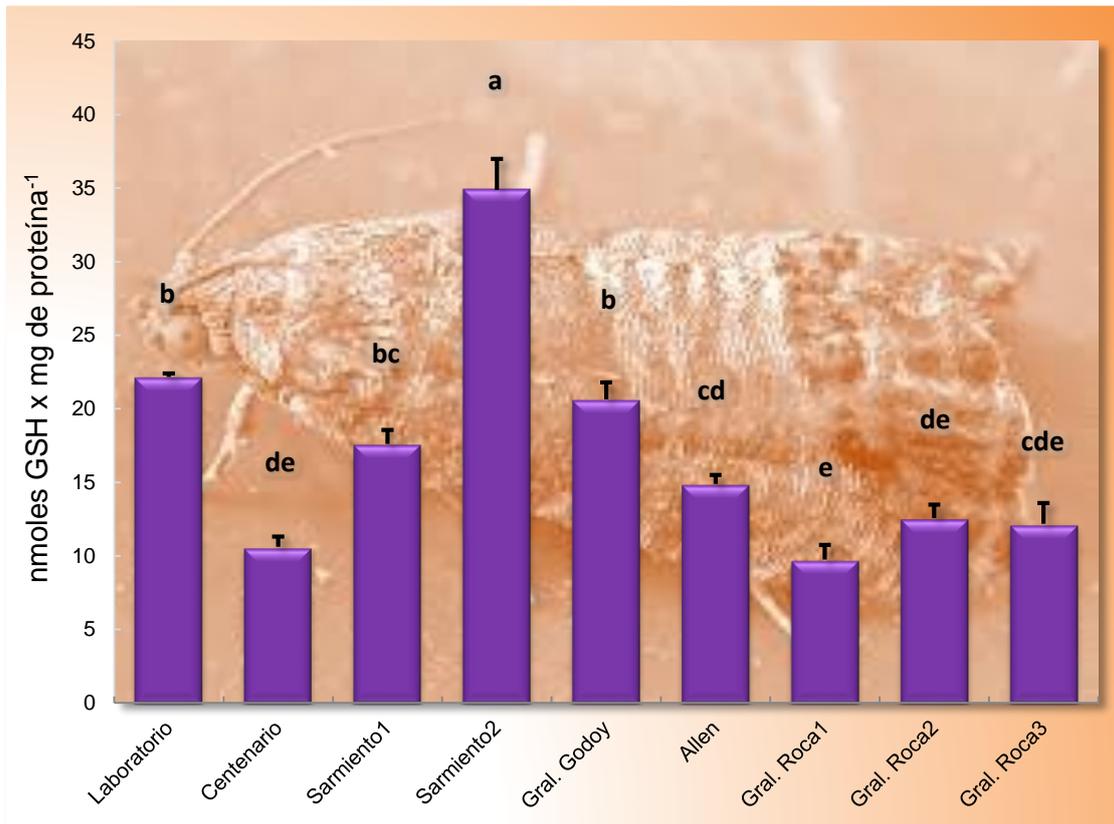
**Figura 11.** Actividad de SOD en adultos de *C. pomonella* de diferentes poblaciones de campo. Una unidad de SOD (U SOD) se define como la cantidad de muestra que causa el 50% de inhibición de la autooxidación de la epinefrina. Los valores representan la actividad promedio  $\pm$  el error estándar de diez muestras independientes.

No se presentó el nivel basal de actividad SOD de la cepa de laboratorio debido a que los preparados enzimáticos se dañaron, y fue imposible obtener más insectos adultos de la misma.



### 3.1.4. Determinación del nivel de GSH endógeno

El contenido de GSH endógeno determinado en insectos adultos de *C. pomonella* de las poblaciones de campo y de la cepa de laboratorio presentaron diferencias significativas (Figura 12).



**Figura 12.** Niveles de GSH endógeno en adultos de *C. pomonella* obtenidos en ocho poblaciones de campo y en la cepa de laboratorio. Los valores representan el nivel promedio  $\pm$  el error estándar de diez muestras independientes. Valores similares se representan con la misma letra. Letras distintas indican diferencias significativas entre poblaciones,  $p < 0,05$ .

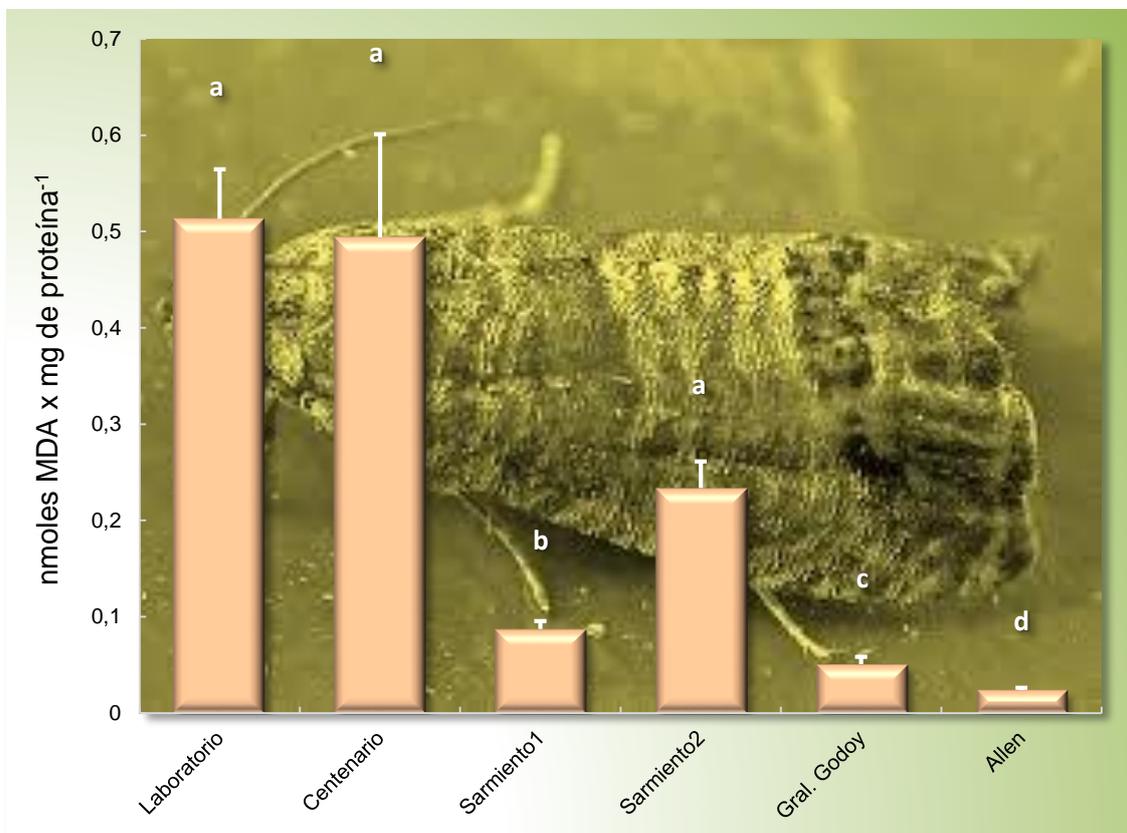
El contenido de GSH determinado en las polillas de referencia y de Gral. Godoy fue similar ( $22,17 \pm 0,48$  nmoles GSH x mg proteína<sup>-1</sup> y  $20,64 \pm 1,14$  nmoles GSH x mg proteína<sup>-1</sup>, respectivamente). A excepción del nivel obtenido en la población de Sarmiento 2, las otras poblaciones de campo analizadas presentaron niveles significativamente menores de GSH comparados con el de la cepa de laboratorio. Los individuos provenientes de Sarmiento2 presentaron el mayor nivel de GSH ( $34,90 \pm 2,10$  nmoles GSH x mg proteína<sup>-1</sup>) que resultó significativamente diferente ( $p = 0,000135$ ) del determinado en el resto de las poblaciones y fue 1,57 veces mayor al nivel de GSH detectado en las polillas de referencia. Por el contrario, los insectos adultos provenientes



de Gral. Roca1 mostraron el menor contenido de GSH que resultó 2,27 veces menor al valor obtenido en la cepa de laboratorio.

### 3.1.5. Determinación del contenido de MDA

Los efectos deletéreos del estrés oxidativo sobre los lípidos de la membrana celular se determinaron mediante la cuantificación del nivel de MDA, un producto de la peroxidación lipídica. En la Figura 13 se muestran los valores detectados en insectos adultos de *C. pomonella* de diferentes poblaciones.



**Figura 13.** Niveles de MDA en adultos de *C. pomonella* obtenido en cinco poblaciones de campo y en la cepa de laboratorio. Los valores representan el nivel promedio  $\pm$  el error estándar de al menos cinco muestras independientes. Letras distintas indican diferencias significativas entre poblaciones,  $p < 0,05$ .

El contenido de MDA varió entre 0,22 a 0,51 nmoles MDA x mg proteína<sup>-1</sup>. Niveles similares de MDA se detectaron en las polillas de referencia, Centenario y Sarmiento2, que resultaron significativamente mayores a los determinados en las poblaciones de Sarmiento1, Gral. Godoy y Allen ( $p < 0,001$ ). El menor nivel de MDA se



observó en los insectos adultos provenientes de Allen ( $0,02 \pm 0,01$  nmoles MDA x mg proteína<sup>-1</sup>) y fue significativamente diferente a los valores medidos en las restantes poblaciones ensayadas ( $p < 0,001$ ).

No se presentan los datos del nivel de MDA de polillas provenientes de Gral. Roca debido a que las muestras se inutilizaron y no fue posible obtener más insectos adultos de estas poblaciones para realizar nuevas determinaciones.

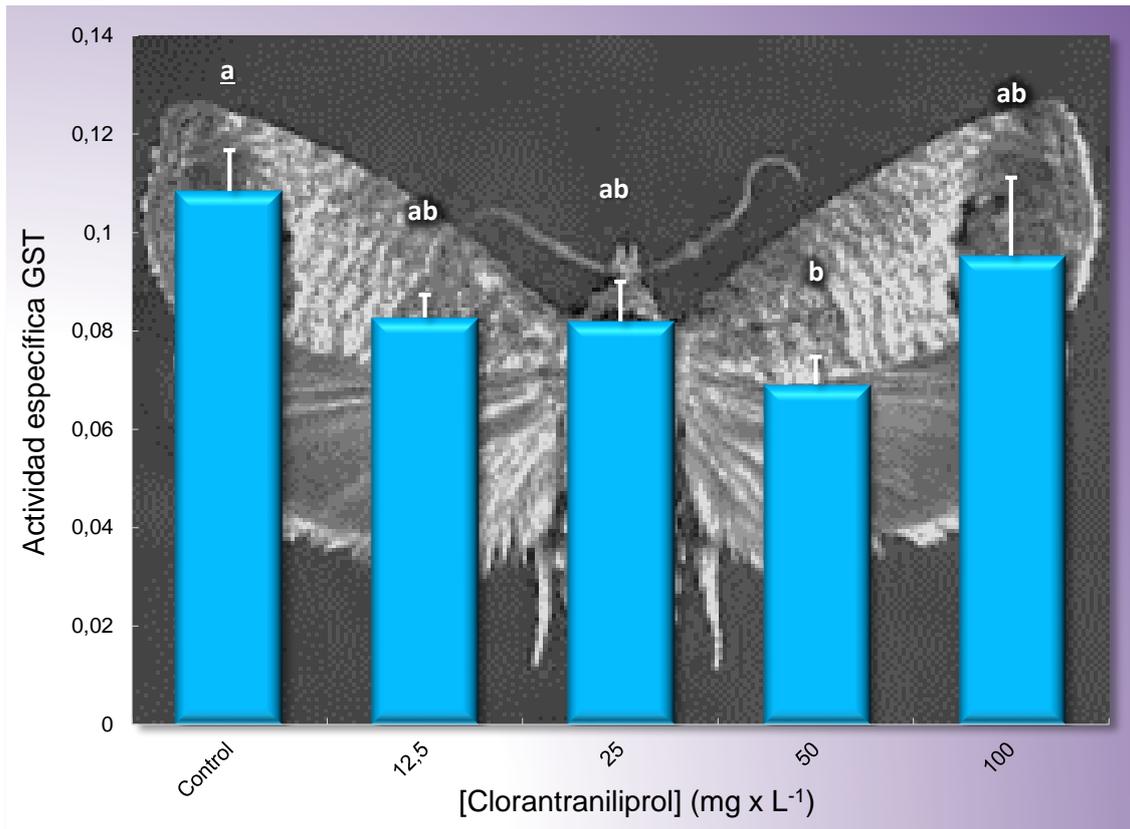
El análisis de correlación entre los parámetros bioquímicos analizados en las polillas de *C. pomonella* reveló una correlación negativa estadísticamente significativa entre GSH y GST de -0,51 y entre GSH y MDA de -0,50.

### **3.2. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN *in vivo* A CLORANTRANILIPROL SOBRE BIOMARCADORES ANTIOXIDANTES**

Si bien, se realizaron exposiciones de polillas de *C. pomonella* a 1.000 y 2.000 mg x L<sup>-1</sup> de clorantraniliprol, no se presentan los resultados de las determinaciones bioquímicas correspondientes debido al escaso número de adultos emergidos que impidió realizar repeticiones. En las concentraciones evaluadas no se observó mortalidad, no obstante, los individuos adultos expuestos mostraron una notable letargia, dependiente de la concentración del tóxico. Se realizaron correlaciones parciales debido a los datos faltantes de algunas poblaciones.

#### **3.2.1. Glutación S-transferasa**

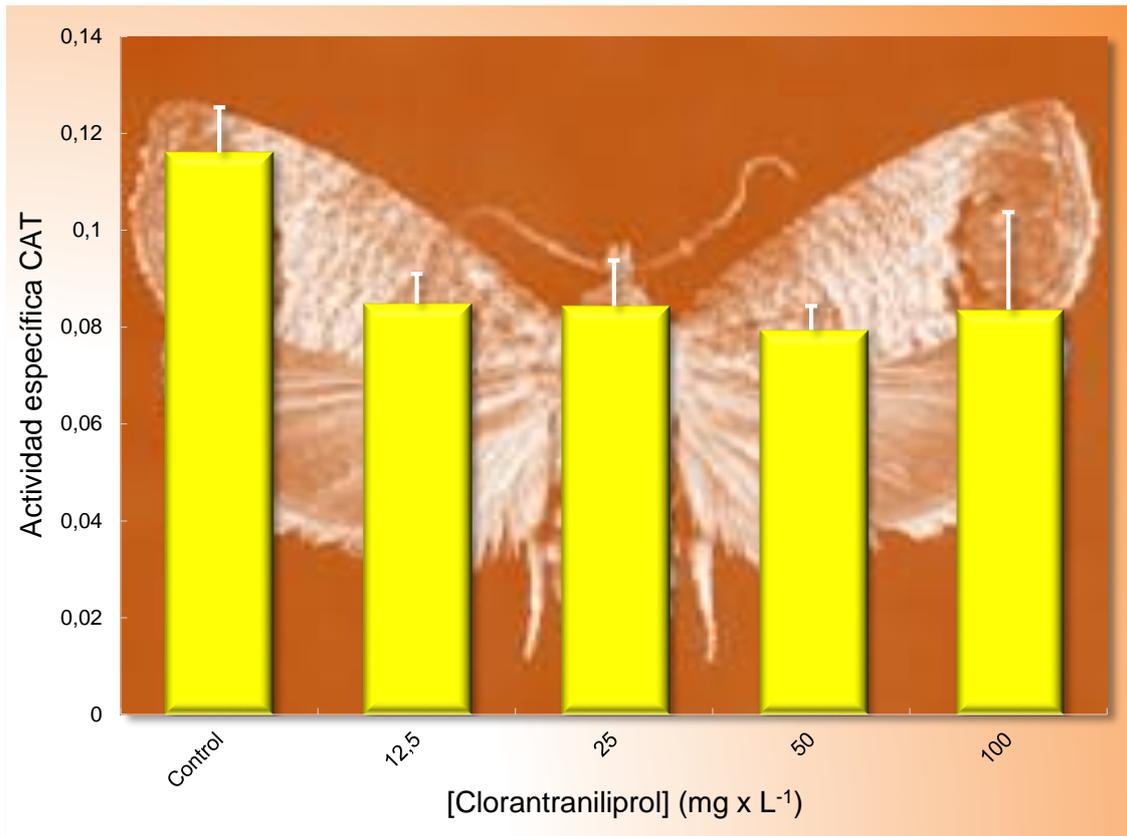
La exposición de los insectos a 12,5; 25 y 50 mg x L<sup>-1</sup> de clorantraniliprol produjo una disminución en la actividad GST respecto a la determinada en los controles, que resultó estadísticamente diferente a 50 mg x L<sup>-1</sup>. A 100 mg x L<sup>-1</sup> del insecticida la actividad enzimática aumentó, si bien no alcanzó el nivel de actividad de los organismos control (Figura 14).



**Figura 14.** Efecto sobre la actividad de GST en adultos de *C. pomonella* por la exposición durante 24 h a concentraciones crecientes de clorantraniliprol. La actividad está expresada como  $\mu\text{moles CDNB conjugado} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$ . Los valores representan la actividad promedio  $\pm$  el error estándar de al menos tres muestras independientes. Letras distintas indican diferencias significativas entre las concentraciones,  $p < 0,05$ .

### 3.2.2. Catalasa

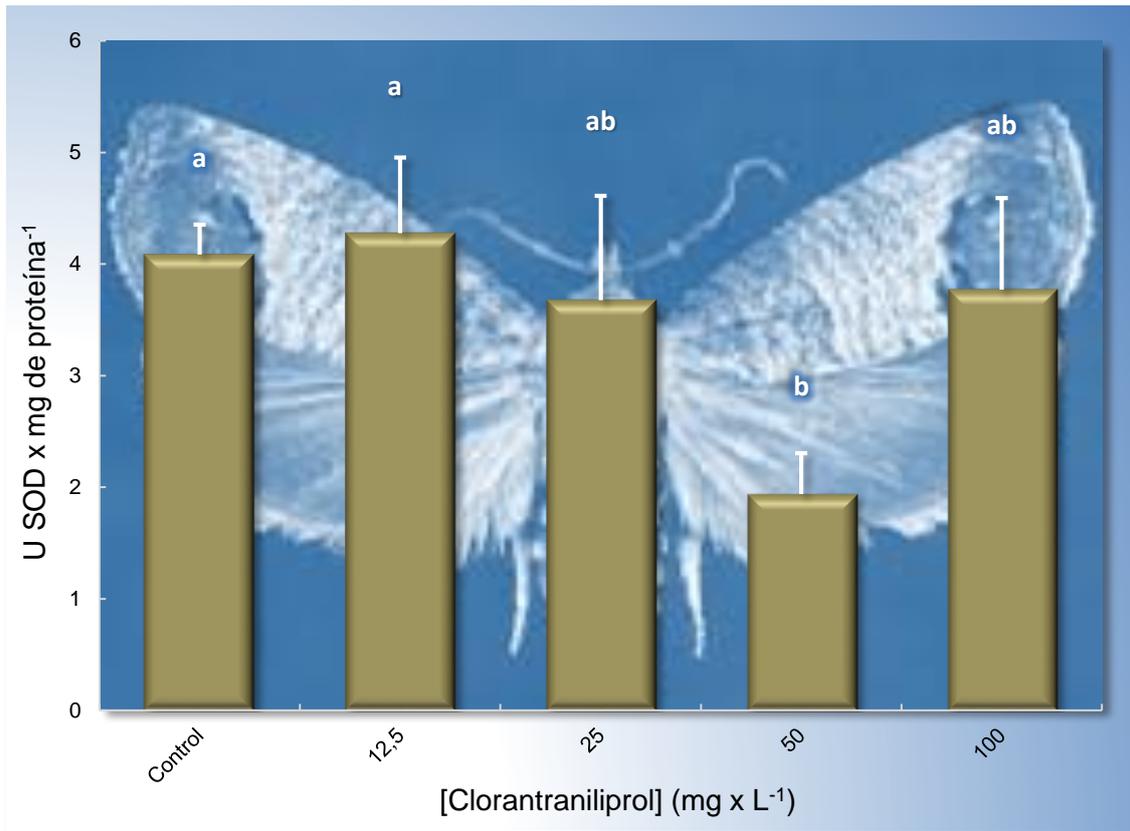
El mayor nivel de actividad promedio se determinó en los organismos control ( $0,12 \pm 0,03 \text{ mmoles H}_2\text{O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$ ). En todas las concentraciones del insecticida ensayadas se observó una disminución en la actividad de la enzima. Sin embargo, no resultó significativamente diferente de la actividad promedio determinada en las polillas no expuestas ( $p > 0,05$ ) (Figura 15).



**Figura 15.** Efecto de la exposición a 0; 12,5; 25; 50 y 100 mg x L<sup>-1</sup> de clorantraniliprol sobre la actividad de CAT en adultos de *C. pomonella*. La actividad se expresa como mmoles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumido x min<sup>-1</sup> x mg proteína<sup>-1</sup>. Los valores representan la actividad promedio ± el error estándar de al menos tres muestras independientes.

### 3.2.3. Superóxido dismutasa

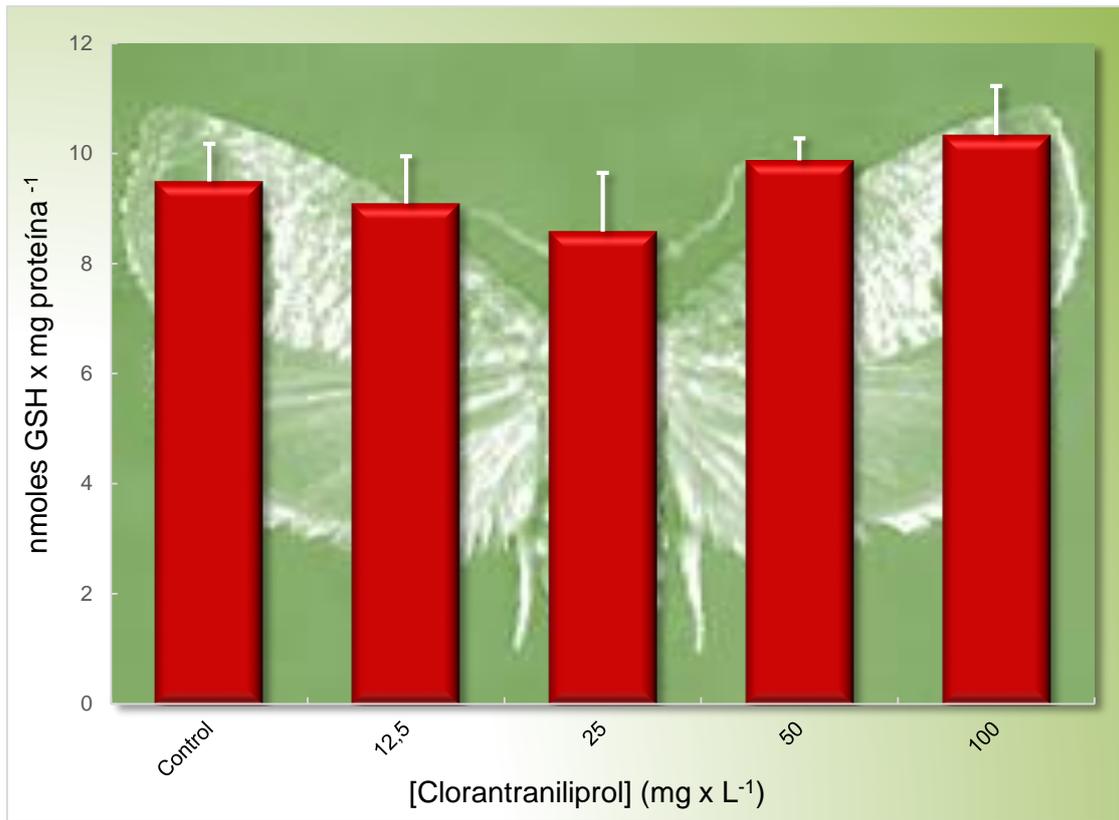
El nivel de actividad enzimática detectado en los insectos adultos expuestos a 12,5 mg x L<sup>-1</sup> de clorantraniliprol resultó similar al observado en los controles (4,28 ± 1,36 y 4,08 ± 0,60 U SOD x mg proteína<sup>-1</sup>, respectivamente) (Figura 16). La actividad de SOD en los organismos expuestos a 50 mg x L<sup>-1</sup> del insecticida fue significativamente menor en comparación con los insectos control (1,94 ± 0,82 U SOD x mg proteína<sup>-1</sup>). La exposición de adultos de carpocapsa a las restantes concentraciones evaluadas del insecticida no tuvo efecto sobre la actividad de SOD.



**Figura 16.** Efecto de la exposición a concentraciones crecientes de clorantraniliprol sobre la actividad de SOD en adultos de *C. pomonella*. Una unidad de SOD (U SOD) se define como la cantidad de muestra que causa el 50% de inhibición de la autooxidación de la epinefrina. Los datos representan la actividad promedio  $\pm$  el error estándar de al menos tres muestras independientes. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos,  $p < 0,05$ .

### 3.2.4. Contenido de GSH

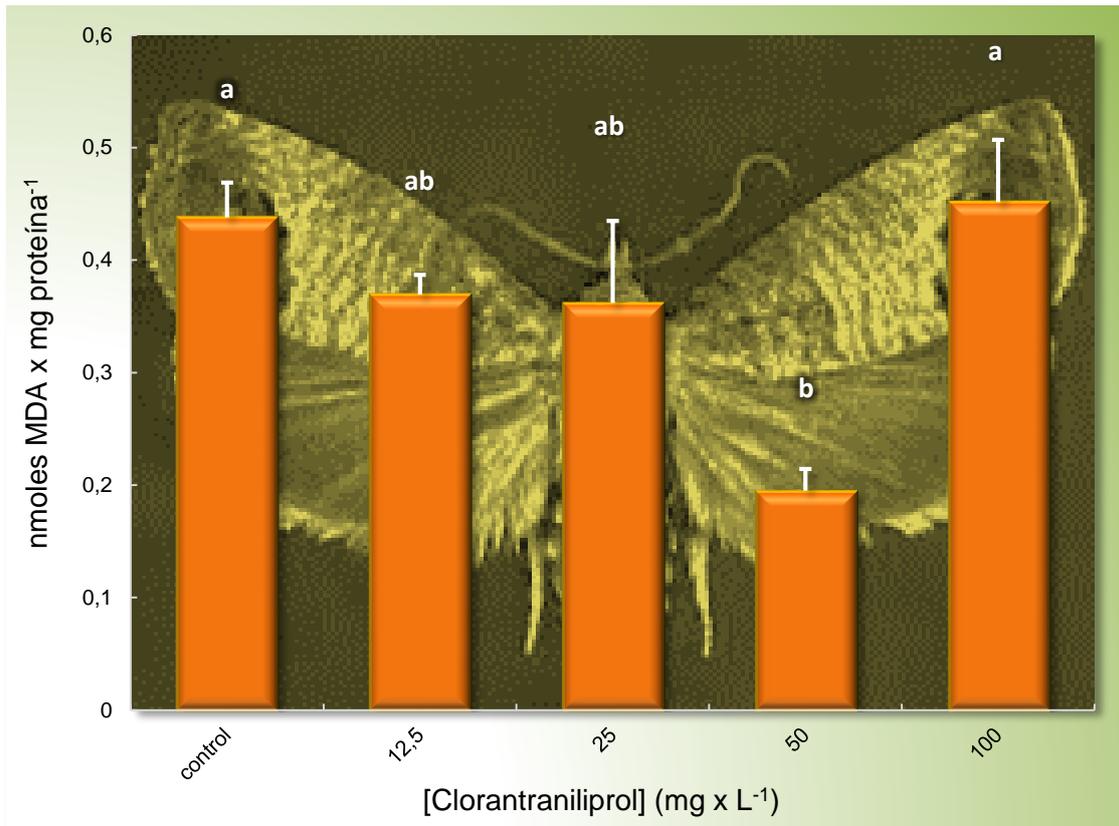
No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de GSH endógeno determinado en las polillas expuestas a concentraciones crecientes del insecticida ( $p > 0,05$ ) (Figura 17).



**Figura 17.** Efecto de la exposición a 0; 12,5; 25; 50 y 100 mg x L<sup>-1</sup> de clorantraniliprol durante 24 h sobre el nivel de GSH endógeno en adultos de *C. pomonella*. Los valores representan el nivel promedio  $\pm$  el error estándar de al menos tres muestras independientes.

### 3.2.5. Contenido de MDA

En la Figura 18 se presenta el efecto de la exposición de polillas de *C. pomonella* a clorantraniliprol sobre el contenido de MDA, un indicador del nivel de oxidación de los fosfolípidos de membrana. La exposición de adultos a 12,5 y 25 mg x L<sup>-1</sup> del insecticida produjo niveles de MDA menores al determinado en los controles (15,9% y 18,2%, respectivamente), que no fueron estadísticamente diferentes. Mientras que, la exposición a 50 mg x L<sup>-1</sup> produjo una disminución del 56,8% ( $p < 0,01$ ) en el nivel de MDA comparada con el determinado en los insectos control y del 57,8% ( $p < 0,05$ ), respecto del nivel detectado en los organismos expuestos a la concentración más alta analizada (100 mg x L<sup>-1</sup>).



**Figura 18.** Efecto de la exposición a concentraciones crecientes de clorantraniliprol sobre el nivel de MDA en adultos de *C. pomonella*. Los valores representan el nivel promedio  $\pm$  el error estándar de al menos tres muestras independientes. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos,  $p < 0,05$ .



## DISCUSIÓN



## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES ANTIOXIDANTES EN ADULTOS DE *C. pomonella*

Numerosos agentes tóxicos y factores ambientales (radiación UV, oxígeno, temperaturas extremas, etc.) pueden producir radicales libres y, por lo tanto, alterar el *status* antioxidante en los sistemas biológicos. Un exceso de EROs no detoxificadas por el sistema antioxidante podría facilitar la producción, por ejemplo, de radicales hidroxilos con el consecuente aumento de la peroxidación lipídica. Hay evidencias de que algunos plaguicidas deben su acción tóxica a la producción de estrés oxidativo (Abdollahi, 2004; Lukaszewicz-Hussain, 2010). La mayoría de los estudios de estrés oxidativo se han realizado en mamíferos y especies acuáticas, sin embargo, muy pocos trabajos se han llevado a cabo en insectos. La carpocapsa es la principal plaga de perales y manzanos, cultivos que constituyen el eje de la producción frutícola regional de la Patagonia Norte. Este es el primer estudio que evaluó el *status* antioxidante en insectos adultos de *C. pomonella* en poblaciones de campo y en una cepa de laboratorio.

Además de detoxificar xenobióticos electrófilos, como los químicos carcinogénicos, contaminantes ambientales y agentes antitumorales, las enzimas GST inactivan a compuestos endógenos como  $\alpha,\beta$ -aldehidos insaturados, quinonas, epóxidos e hidroperóxidos formados como metabolitos secundarios durante el estrés oxidativo. Las GSTs y otras enzimas antioxidantes como la GPx1 Se-dependiente, proveen a la célula de protección contra un rango de electrófilos nocivos producidos durante el daño oxidativo a membranas (Hayes y col., 2005). Las GSTs son muy estudiadas en insectos por su asociación con la resistencia desarrollada a insecticidas (Vontas y col., 2001; Ding y col., 2003; Lumjuan y col., 2005, 2011; Che-Mendoza y col., 2009; Rodríguez y col., 2010, 2012; Pavlidi y col., 2015; Zhu y col., 2015). En los últimos años hay un interés creciente en el estudio de estas enzimas en artrópodos por su rol potencial en el mantenimiento del estado redox celular (Ranson y Hemingway, 2005; Li y col., 2007; Fang, 2012).

En este trabajo se analizó la actividad GST en diferentes poblaciones de insectos adultos de *C. pomonella*. La actividad enzimática presentó diferencias significativas entre las poblaciones de campo y la cepa de referencia. Todos los insectos adultos provenientes de las poblaciones de campo ensayadas presentaron actividades GST



significativamente menores (Figura 9). En particular, la actividad enzimática de las polillas de Sarmiento1 y Gral. Roca1 fueron 2,7 y 3,2 veces menores que la actividad determinada en la población de referencia. La población de Gral. Roca1 corresponde a una chacra abandonada ubicada en el corazón del valle productivo de la Patagonia Norte, que si bien no se encontraría bajo presión de plaguicidas, estaría expuesta a tóxicos y factores ambientales prooxidantes capaces de producir la inhibición de las GSTs. Mientras que, el control de *C. pomonella* en Sarmiento1 se realizó mediante manejo orgánico que incluyó el tratamiento con carpovirus. En la actualidad, no existen datos sobre el efecto de este bioinsecticida sobre las enzimas GSTs en artrópodos. No obstante, se ha demostrado que el estado redox celular es un factor importante para la supervivencia de patógenos y parásitos en los insectos, por lo que, la respuesta inmune involucra la respuesta oxidativa. Este mecanismo de defensa contra la invasión de parásitos y patógenos requiere del equilibrio del sistema antioxidante para prevenir daños al huésped (Kumar y col., 2003). Se ha reportado actividad de enzimas antioxidantes en hemocitos y en hemolinfa de larvas del gusano de seda, *Bombyx mori*, con infección bacteriana (Krishnan y col., 2002) y en hembras adultas del mosquito *Anopheles gambiae* infectadas con el parásito *Plasmodium berghei* (Kumar y col., 2003). Más aún, Subramanian y col. (2005) informaron que el proceso de infección con granulovirus en larvas de la polilla *Spodoptera litura* tuvo un impacto negativo en la expresión génica y en la síntesis de proteínas del huésped y, por ende, en la inducción de las enzimas detoxificantes.

En resumen, la disminución en la actividad GST detectada en todas las polillas de campo analizadas en este estudio, evidenciaría su rol protector reducido y dejaría a la célula expuesta a los efectos deletéreos de las EROs producidas durante el estrés oxidativo. La disminución de la actividad GST podría ser explicada por dos hipótesis diferentes. Según Egaas y col. (1999) en la primera etapa de la biotransformación de xenobióticos catalizados por las enzimas citocromo P450 se produciría un cóctel de diferentes metabolitos, los cuales competirían con los sustratos de las GSTs por su sitio activo. De acuerdo a Gallagher y Sheehy (2000) la menor actividad enzimática podría deberse a la inhibición de la síntesis de las GSTs.

Frenzilli y col. (2004) también, detectaron una disminución significativa de la actividad GST en mejillones *Mytilus galloprovincialis* después de la primera semana de trasplantados a sitios contaminados en el puerto de Génova. Además, De Luca-Abbott y col. (2005) evaluaron la actividad GST en hepatopáncreas y branquias de mejillones *Perna viridis*, obtenidos de un lugar prístino y trasplantados a cuatro sitios sospechados



de contaminación química. En hepatopáncreas, la actividad GST disminuyó significativamente a los 28 días de exposición; mientras que, en tejido branquial la GST aumentó a los 14 días en todos los sitios. Asimismo, Konus (2015) informó aumentos significativos de la GST en dos poblaciones de campo de larvas de la polilla del tomate, *Tuta absoluta*, comparada con la actividad expresada en la cepa de laboratorio. Su y col. (2012) determinaron actividades de GST significativamente superiores en larvas de *Spodoptera litura* de poblaciones de campo tolerantes a clorfaniliprol. Es bien conocido que las enzimas GST pueden ser inducidas por exposición a un amplio espectro de xenobióticos, incluidos los plaguicidas, y un aumento en la actividad en los tejidos se asociaría con el desarrollo de un mecanismo defensivo eficaz contra la toxicidad de estos compuestos (Monteiro y col., 2006).

Por otra parte, las enzimas SOD y CAT constituyen la primera línea de defensa antioxidante contra las EROs en organismos procariontes y eucariotes (Felton y Summers, 1995; Wang y col., 2001). La CAT facilita la remoción del  $H_2O_2$ , que es metabolizado a oxígeno molecular y agua sin producir nuevas EROs. Este trabajo de tesis es el primer estudio que evalúa las actividades enzimáticas de CAT y SOD en polillas de *C. pomonella*. El nivel más alto de CAT se detectó en la cepa de laboratorio y resultó estadísticamente similar al de la población de Allen. La menor actividad se observó en los insectos provenientes de Gral. Roca1 (Figura 10). Si bien las actividades enzimáticas determinadas en las restantes poblaciones de campo fueron menores comparadas con la de referencia, no resultaron estadísticamente diferentes. La inhibición significativa de la actividad CAT observada en las polillas de Gral. Roca1 sugeriría la detoxificación deficiente del  $H_2O_2$ . La disminución en los niveles de CAT podría ser interpretada como una inhibición indirecta de esta enzima por su enlace con moléculas oxidativas producidas por el metabolismo de los plaguicidas. Más aún, Kono y Fridovich (1982) informaron que esta disminución podría deberse al flujo del radical superóxido, el cual inhibe la actividad enzimática de la CAT.

La actividad CAT de mejillones *Mytilus galloprovincialis* trasplantados a sitios contaminados en el Lago Venecia, Italia, resultó significativamente inhibida (Pampanin y col., 2005). Asimismo Vioque-Fernández y col. (2009) encontraron la actividad CAT disminuida en cangrejos *Procambarus clarkii* recolectados de sitios contaminados cercanos a cultivos de arroz en el sur de España. Por el contrario, Dohri y Sayah (2009) reportaron un incremento en la actividad CAT de dos invertebrados marinos, *Nereis diversicolor* y *Patella vulgata*, provenientes de sitios contaminados de Marruecos. En un estudio realizado por Pérez y col. (2004) se observó un incremento de 7 veces en la



actividad CAT y de 2 veces en la actividad GST en gusanos poliquetos *Nereis diversicolor* recolectados en un medio contaminado de la bahía de Cádiz, España. Del mismo modo, aumentos significativos en la actividad CAT fueron encontrados en mejillones *Mytilus galloprovincialis* provenientes de sitios altamente contaminados comparados con la actividad enzimática determinada en organismos recolectados en ambientes con bajo impacto antropogénico (Box y col., 2007; Vlahogianni y col., 2007). Las alteraciones de la actividad CAT indicarían la presencia de químicos inductores de estrés oxidativo.

En insectos, Felton y Summers (1995) propusieron que la SOD está presente en todos los tipos celulares y es uno de los antioxidantes enzimáticos intracelulares más efectivos en la protección de las células y tejidos contra el estrés oxidativo. El papel clave de la SOD en la protección de los insectos contra los tóxicos prooxidantes se demostró cuando su inhibición resultó en un incremento del efecto tóxico de las EROs (Ahmad y Pardini, 1990). Se puede concluir, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, que no se encontraron diferencias significativas entre las actividades promedio de SOD determinadas en las poblaciones de campo analizadas.

Numerosos contaminantes ambientales son capaces de alterar el sistema antioxidante en diferentes especies. Pandey y col. (2003) determinaron aumentos significativos en la actividad SOD en hígado, riñón y branquia del pez *Wallago attu* recolectados en un sitio contaminado del río Yamuna, India. También, en diferentes tejidos del mejillón *Mytilus galloprovincialis*, provenientes de ambientes acuáticos contaminados, se han detectado marcados incrementos en el nivel de actividad SOD (Box y col., 2007; Vlahogianni y col., 2007). Además, los organismos que habitan en regiones con condiciones ambientales extremas estarían predispuestos a estrés oxidativo. Tal es el caso de las vieiras *Adamussium colbecki* del Mar de Ross en la región Antártica que presentaron en sus branquias actividades de SOD significativamente mayores en comparación a la actividad detectada en vieiras del Mediterráneo, *Pecten jacobaeus* (Viarengo y col., 1995).

El GSH cumple un rol importante en la detoxificación de compuestos electrofílicos, en la prevención del estrés oxidativo y participa en varios procesos celulares críticos que incluyen la regulación de la proliferación y la división celular (Allen y Balin, 1989; Rudneva, 1999; Sies, 1999). Hasta el presente, no existen datos sobre el nivel de GSH endógeno en adultos de *C. pomonella* por lo que este trabajo de tesis es el primero en evaluarlo en diferentes poblaciones de campo y en una cepa de



laboratorio. El mayor nivel de este antioxidante no enzimático se detectó en las polillas provenientes de Sarmiento<sup>2</sup>, que resultó estadísticamente diferente al determinado en las demás poblaciones (Figura 12). El aumento en el contenido de GSH sugiere un papel protector y adaptativo de esta biomolécula contra el estrés oxidativo inducido por compuestos prooxidantes. Similares resultados fueron citados por Pandey y col. (2003) que detectaron altos niveles de GSH en el pez de agua dulce, *Wallago attu*, proveniente de zonas contaminadas de la India. De Luca-Abbott y col. (2005) determinaron aumentos significativos en el contenido de GSH en branquias de almejas y mejillones trasplantados a sitios contaminados en la costa de Hong Kong, luego de 14 y 28 días de exposición. También, Farombi y col. (2007) detectaron altos niveles de GSH en hígado, riñón y corazón del pez gato, *Clarias gariepinus*, proveniente de un río contaminado de Nigeria y observaron una disminución significativa del mismo en las branquias. Mulcahy y col. (1997) propusieron que un incremento del nivel de GSH en presencia de contaminantes sería un mecanismo de defensa adaptativo asociado a la inducción de las enzimas que participan de su síntesis. Más aún, el incremento de GSH se ha relacionado en diversos organismos con un aumento de la resistencia a plaguicidas (Peña y col., 2000; Peña-Llopis et al., 2001).

Por otra parte, y a excepción de Gral. Godoy, el resto de las poblaciones analizadas presentaron niveles de GSH significativamente menores al detectado en la cepa de laboratorio. La disminución en el contenido de este antioxidante podría deberse a su utilización como sustrato de enzimas detoxificantes y/o antioxidantes (GST, GPx) y/o a su oxidación directa al reaccionar con EROs, en una situación de estrés oxidativo. En este trabajo se detectó una correlación inversa entre GSH y GST que sugiere la utilización del antioxidante no enzimático como sustrato de la enzima GST. La disminución del nivel de GSH puede ser usada como un biomarcador de estrés ambiental y Jokanović (2001) propuso que una disminución igual o mayor al 20% en el contenido de este antioxidante no enzimático resulta altamente perjudicial para la supervivencia de la célula.

Las EROs se producen en los organismos vivos como resultado del metabolismo celular normal. A bajas concentraciones, estas especies reactivas actúan en los procesos fisiológicos normales, pero a elevadas concentraciones, pueden producir modificaciones adversas en los componentes celulares, particularmente en lípidos, proteínas y ADN (Birben y col., 2012). La peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados es una característica en numerosos tipos de daño celular y es un



proceso mediado por radicales libres (Devasagayam y col., 2013). El nivel de MDA es muy utilizado como un indicador de la peroxidación lipídica (Pampanin y col., 2005).

En este estudio se determinó el contenido de MDA en distintas poblaciones de insectos adultos de *C. pomonella*. Las polillas provenientes de laboratorio, Centenario y Sarmiento2 presentaron niveles similares de MDA. Inesperadamente, en los individuos adultos de Sarmiento1, Gral. Godoy y Allen se midieron valores de MDA que resultaron significativamente menores al obtenido en la cepa de laboratorio. El nivel basal de MDA detectado en la cepa de laboratorio resultó similar al medido en el intestino medio (Büyükgüzel y col., 2013) y en el cuerpo graso de larvas del lepidóptero *Galleria mellonella* (Hyršl y col., 2007). Los niveles menores de MDA determinados en los insectos provenientes de Sarmiento1, Gral. Godoy y Allen se asociarían al valor promedio estadísticamente significativo más alto de proteínas ( $8,18 \pm 2,03$  mg de proteína  $\times$  mL<sup>-1</sup>) respecto del obtenido en la cepa de laboratorio ( $2,67 \pm 0,17$  mg de proteína  $\times$  mL<sup>-1</sup>). La correlación inversa detectada entre GSH y MDA de -0,50 indicaría el rol protector del GSH frente al daño oxidativo de los lípidos de membrana. Según Meng y col. (2010) los insectos pueden percibir las señales de estrés y responder con varias estrategias para defenderse del mismo, una de las cuales sería la regulación de la expresión proteica. Estudios posteriores serán necesarios para caracterizar y obtener información funcional del conjunto de proteínas expresadas, en estos insectos plaga, en condiciones de estrés a efectos de interpretar los resultados obtenidos.

El nivel de MDA determinado en diferentes tejidos de mejillones *Mytilus galloprovincialis* provenientes de sitios contaminados fue sustancialmente mayor al reportado en mejillones recolectados en ambientes acuáticos prístinos (Pampanin y col., 2005; Vlahogianni y col., 2007). Estevez y col., (2002) reportaron un mayor nivel de peroxidación lipídica en bivalvos *Laternula elliptica* del Antártico, expuestos a condiciones ambientales extremas, comparado con el determinado en bivalvos *Mya arenaria* de zonas templadas. En la vieira antártica, *Colbecki adamussium*, se determinó en glándula digestiva un nivel basal elevado de MDA en comparación con el detectado en la vieira del Mediterráneo, *Pecten jacobaeus*, (Viarengo y col., 1995). Además, en hígado, riñón y branquias del pez *Wallago attu* que habita en sitios con alto nivel de polución se detectaron elevados niveles de MDA (Pandey y col., 2003).



## 4.2. EXPOSICIÓN *in vivo* DE ADULTOS DE *C. pomonella* AL INSECTICIDA CLORANTRANILIPROL: EFECTOS SOBRE BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

Numerosos contaminantes ambientales son importantes fuentes de radicales libres en los sistemas biológicos (Bacchetta, 2011). En particular, algunos plaguicidas pueden causar daño oxidativo al estimular la formación de EROs, la inducción de peroxidación lídica y la alteración de la capacidad antioxidante (Abdollahi y col., 2004). En los insectos, numerosos xenobióticos se detoxifican a través de la oxidación y esta respuesta puede ser el resultado de un mecanismo de retroalimentación para aumentar la producción de EROs (James y Xu, 2012).

En años recientes se ha incrementado el uso del insecticida clorantraniliprol en la región de la Patagonia Norte, recientemente introducido en el mercado global para el control de *C. pomonella*. Hasta el presente hay escasa información del efecto de este químico sobre biomarcadores de estrés oxidativo. Por lo tanto, en este estudio se evaluó el efecto de la exposición durante 24 h a clorantraniliprol sobre parámetros bioquímicos antioxidantes en insectos adultos de esta importante plaga. No se observó mortalidad de polillas en ninguna de las concentraciones ensayadas del insecticida; sin embargo, se detectó letargia dependiente de la concentración en todos los organismos expuestos. Este insecticida debe su acción tóxica a la activación de los receptores de rianodina que produce la liberación descontrolada de iones calcio de los reservorios internos de este ion. Esto conduce al cese inmediato de la alimentación, letargia, parálisis por contracción muscular y muerte de los insectos por inanición en el transcurso de 1 a 3 días (Lahm y col., 2007, 2011).

Knight y Flexner (2007) reportaron que la exposición a campo de insectos adultos de *C. pomonella* a 56 mg x L<sup>-1</sup> de clorantraniliprol tuvo un efecto mínimo en la supervivencia y fecundidad; sin embargo alteró el comportamiento sexual y el patrón de vuelo de los machos, que causó una disminución en el número de apareamientos. Asimismo, Zhang y col., (2013) encontraron que la exposición de larvas del lepidóptero *Helicoverpa armigera* a concentraciones subletales de clorantraniliprol redujo el porcentaje de eclosión de los huevos, el peso de las larvas, las tasas de empupado y de emergencia y la longevidad de los adultos tanto en la generación parental como en la descendencia. También observaron una marcada disminución en el número de apareamientos que afectó seriamente la reproducción tanto en los progenitores como



en la progenie, aún cuando sólo uno de los parentales hubiera estado expuesto a clorfaniliprol en estadio larval. Además, la exposición de larvas de *Plutella xylostella* (Han y col., 2012; Guo y col., 2013; Ribeiro y col., 2014), de *Spodoptera exigua* (Lai y Su, 2011), de *Chironomus riparius* (Rodrigues y col., 2015) y de adultos de *Rhagoletis pomonella* (Teixeira y col., 2009) a concentraciones subletales de este insecticida impactó negativamente sobre diferentes parámetros biológicos que resultaron en la disminución de la eficacia biológica<sup>15</sup> de los insectos. Por lo tanto, el clorfaniliprol aún a concentraciones subletales tendría efectos significativos sobre la dinámica poblacional de estos organismos.

En este estudio se observó que la exposición de polillas de *C. pomonella* a 50 mg x L<sup>-1</sup> de clorfaniliprol, equivalente a la dosis recomendada a campo, produjo una disminución significativa del 36,4% de la actividad GST comparada con la determinada en los organismos no expuestos (Figura 14). La exposición durante 24 h de larvas del mosquito *Chironomus riparius* a este insecticida causó una disminución significativa en la actividad GST (Rodrigues y col., 2015). Por el contrario, en larvas del lepidóptero *Helicoverpa armigera* la exposición a este químico produjo un incremento significativo en la actividad GST (Cao y col., 2010). Además, la aplicación tópica de las concentraciones más bajas ensayadas de malatión en la langosta *Oxya chinensis* produjo el aumento de la actividad GST; mientras que a las concentraciones más altas causó disminución en la actividad de esta enzima (Wu y col., 2011). Los autores propusieron que las enzimas GSTs podrían detoxificar el malatión a bajas concentraciones, mientras que a las concentraciones más altas del insecticida se inhibiría la actividad enzimática. En otras palabras, la respuesta de las GSTs a los tóxicos es controvertida debido a que es altamente dependiente del tipo de xenobiótico, de la concentración, del tiempo de exposición y de la especie involucrada (Oruç y col., 2000).

Numerosos trabajos informan que la actividad de las enzimas GSTs de invertebrados puede ser alterada por la exposición a un amplio espectro de xenobióticos, incluidos los plaguicidas (Papadopoulos y col. 2004; Gravato y col., 2005; Mosleh y col., 2007; Muthusamy y col., 2011; Yu y col., 2011; Fahmy, 2012; Büyükgüzél y col., 2013; Altuntaş, 2015; Dere y col., 2015). La disminución de la actividad GST reduciría su rol protector antioxidante. Mientras que, según Monteiro y col. (2006) un

---

<sup>15</sup> Eficacia biológica: cantidad de individuos adultos que pueden adaptarse y reproducirse en un determinado ambiente.



incremento de esta enzima en los tejidos indicaría el desarrollo de un eficaz mecanismo de defensa contra la toxicidad de los xenobióticos. Más aún, varios autores demostraron la correlación entre altos niveles de GST y la resistencia a insecticidas en diferentes organismos. De hecho, actividades incrementadas de GST en adultos de *C. pomonella* de poblaciones de campo en Chile estarían involucradas en la resistencia al carbamato carbaril, a los organofosforados etilclorpirifos, fosalón y metilazinfos y al regulador del crecimiento de insectos tebufenocide (Reyes y col., 2004; Fuentes-Contreras y col., 2007; Rodríguez y col., 2010 y 2012). Altos niveles de actividad GST en larvas diapausantes de carpocapsa de diferentes poblaciones en Grecia también estarían asociadas con la resistencia a los insecticidas fosalón, deltametrina, tiacloprid, tebufenocide, metoxifenocide y diflubenzurón (Voudouris y col., 2011). Vontas y col. (2001) determinaron que elevados niveles de GST en cepas resistentes del saltamontes *Nilaparvata lugens* atenuaron la peroxidación lipídica inducida por los insecticidas piretroides permetrina y  $\lambda$ -cihalotrina; mientras que, la inhibición de esta enzima eliminó su rol protector. Un estudio reciente realizado con el sinergista dietilmaleato, en adultos de *Plutella xylostella* expuestos a clorantraniliprol sugirió la asociación de la actividad GST aumentada con la resistencia desarrollada a este insecticida (Wang y col., 2013).

La CAT es un componente fundamental del sistema antioxidante celular. En este estudio, la exposición a clorantraniliprol no produjo cambios significativos sobre la actividad CAT en las polillas de *C. pomonella*, a las concentraciones utilizadas. No obstante, se midieron actividades promedio más bajas que no resultaron estadísticamente significativas. Un aumento en el nivel de CAT protegería a los organismos de las EROs producidas durante la metabolización de prooxidantes; mientras que la disminución de la misma reflejaría alteraciones en el sistema antioxidante celular. La exposición a clorantraniliprol de los peces *Ctenopharyngodon idella* (Rathnamma y Nagaraju, 2014) y *Labeo rohita* (Nagaraju y col., 2013) produjo incrementos significativos de la actividad CAT en los distintos tejidos analizados. Del mismo modo, Rodrigues y col. (2015) informaron que la exposición durante 24 h a 9,6  $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$  de clorantraniliprol de larvas del mosquito *Chironomus riparius* disminuyó significativamente la actividad enzimática de CAT.

Büyükgüzel y col. (2013) reportaron la disminución de la actividad CAT en el cuerpo graso de larvas de la polilla *Galleria mellonella* expuestas a ácido bórico, un antiguo insecticida utilizado en la agricultura. Adamski y col., (2003) reportaron que larvas del tercer estadio del gorgojo *Tenebrio molitor* expuestas hasta alcanzar el estado de pupa al organofosforado fenitrotión presentaron una disminución significativa en la



actividad CAT. También, Dere y col. (2015) reportaron una disminución en la actividad CAT de *Galleria mellonella* expuestas durante 24 h al insecticida azadaractina, de origen vegetal. Por el contrario, se han reportado aumentos significativos en la actividad CAT de larvas de insectos de los géneros *Spodoptera* y *Oxa* expuestas a insecticidas de diferentes grupos químicos (Adamski y col., 2003; Wu y col., 2011; Fahmy, 2012).

Otro componente esencial de la defensa antioxidante celular es la SOD que cataliza la dismutación del anión superóxido dando origen a nuevas EROs. En este trabajo también se evaluó el efecto de la exposición a concentraciones crecientes de clorantraniliprol sobre la actividad SOD en polillas de *C. pomonella*. Una disminución altamente significativa del 52,5% de la actividad SOD se detectó en los individuos expuestos a 50 mg x L<sup>-1</sup> de clorantraniliprol, equivalente a la dosis de aplicación recomendada a campo, en comparación con el nivel determinado en los insectos control. Dado que la enzima SOD es susceptible al estrés oxidativo podría ser inactivada por elevados niveles de EROs producidas durante la detoxificación del plaguicida. Asimismo, Büyükgüzel (2009) observó una disminución significativa en la actividad enzimática de SOD en larvas de *Galleria mellonella* expuestas a 10 mg x L<sup>-1</sup> del organofosforado malatión. En la hemolinfa de larvas de esta especie expuestas durante 24 y 72 h a azadaractina se observó una disminución en la actividad SOD a todas las dosis ensayadas (Dere y col., 2015). En el himenóptero endoparásito *Pimpla turionellae* se observó, también, una disminución significativa de SOD por la exposición obligada<sup>16</sup> a las concentraciones más altas de malatión evaluadas (Büyükgüzel, 2006).

Por el contrario, en estudios recientes realizados en los peces *Labeo rohita* (Nagaraju y col., 2013) y *Ctenopharyngodon idella* (Rathnamma y Nagaraju, 2014) expuestos a concentraciones subletales de clorantraniliprol se observaron incrementos significativos de la actividad SOD en todos los órganos analizados después de 15 días de tratamiento. Del mismo modo, incrementos significativos en la actividad SOD se detectaron en cuerpo graso e intestino medio de larvas de *Galleria mellonella* expuestas a 620 mg x L<sup>-1</sup> de ácido bórico (Büyükgüzel y col., 2013). Un significativo aumento de la actividad MnSOD se observó cuando adultos de *Bemisia tabaci*, la mosca blanca del tabaco, se alimentaron sobre plantas de algodón tratadas con el insecticida imidacloprid (Gao y col., 2013a). La exposición durante 24 y 48 h a 15 µg x L<sup>-1</sup> de clorpirifos de larvas de *Drosophila melanogaster* produjo un incremento significativo en las actividades enzimáticas SOD y CAT (Gupta y col., 2010). Gao y col. (2013b) sugirieron que los

---

<sup>16</sup>Exposición obligada: las avispas parasitaron a las pupas de *G. mellonella* tratadas con el insecticida.



diferentes perfiles de expresión de 4 genes SOD del díptero *Bactrocera dorsalis* se asociarían con los diferentes roles que cumplen en la protección contra el estrés oxidativo. Diversos plaguicidas y factores ambientales pueden causar estrés oxidativo y la actividad SOD incrementada protegería a los organismos contra sus efectos tóxicos.

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 y Kodrík, 2012). En este trabajo no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de GSH endógeno en los adultos de *C. pomonella* expuestos a concentraciones crecientes de clorantraniliprol. La exposición durante 12 h al bioinsecticida *Bacillus thuringiensis kurstaki* de larvas del mosquito *Aedes caspius* no produjo cambios en el nivel de GSH, sin embargo, a las 24 h fue significativamente menor al determinado en los organismos control (Ahmed, 2011). Se informó que ninfas de la langosta *Oxya chinensis* y larvas de *Drosophila melanogaster* expuestas durante 24 h al organofosforado clorpirifos mostraron una disminución significativa en el nivel de GSH (Gupta y col., 2010; Wu y col., 2011).

Por el contrario, Mosleh y col. (2007) observaron un incremento significativo en el contenido de GSH a las 48 y 96 h de exposición al fungicida quitosano en el oligoqueto *Tubiflex tubifex*. El contenido de GSH de larvas de *Galleria mellonella* expuestas a malation aumentó significativamente a las concentraciones más bajas mientras que, disminuyó marcadamente a las concentraciones más altas ensayadas (Büyükgüzel, 2009). Un incremento significativo en el nivel de GSH de larvas de *Spodoptera littoralis* se determinó a las 24 y 48 h postratamiento con el insecticida buprofezin, disminuyó a las 72 h y a las 120 h fue significativamente menor al determinado en los organismos control (Fahmy, 2012). En los bivalvos marinos *Mytilus galloprovincialis* y *Flexopecten flexuosus* expuestos al insecticida organofosforado fenitrotión se detectaron altos niveles de GSH que estarían asociados con el incremento en la tolerancia a este compuesto (Peña-Llopis y col., 2001).

Por otra parte, en organismos invertebrados, y en particular, en insectos la peroxidación lipídica es potencialmente muy peligrosa porque puede afectar funciones fisiológicas críticas lípido dependientes, que conducirían a deficiencias en el desarrollo y comprometerían la supervivencia del insecto. Los lípidos son biomoléculas esenciales en vertebrados e invertebrados como componentes principales de las membranas celulares. En los insectos también son importantes para la síntesis de la ecdisona, las



hormonas juveniles isopropanoides y otros lípidos que actúan como feromonas (Ahmad, 1995). Además, los productos de la peroxidación lipídica no son sólo marcadores de daño oxidativo sino que también pueden desencadenar la regulación de los mecanismos de defensa antioxidante (Lushchak y Bagnyukova, 2006).

En este trabajo de tesis se evaluó el efecto de la exposición a clorantraniliprol sobre el nivel de MDA, otro biomarcador del *status* oxidativo, en adultos de *C. pomonella*. Se observó una disminución significativa del 56,8% en el nivel de MDA en los insectos expuestos a  $50 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$  de clorantraniliprol respecto del valor determinado en los controles. Içen y col. (2005) propusieron que la disminución del nivel de MDA determinado en larvas de *Galleria mellonella* expuestas al insecticida metilparatión 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.

La aplicación tópica de  $0,75 \text{ } \mu\text{g} \times \mu\text{L}^{-1}$  de malatión a ninfas de la langosta *Oxya chinensis* causó un aumento significativo en el nivel de MDA. Mientras que, la aplicación tópica de  $0,08 \text{ } \mu\text{g} \times \mu\text{L}^{-1}$  de clorpirifos a ninfas de este insecto produjo una disminución significativa en el contenido de MDA (Wu y col., 2011). Larvas de *Galleria mellonella* expuestas durante 48 h al bioinsecticida *Bacillus thuringiensis* presentaron niveles de MDA en el intestino medio significativamente menores al determinado en los organismos control (Dubovskiy y col., 2008). Por el contrario, se observaron incrementos significativos en el nivel de peroxidación lipídica en varios tejidos y en diferentes estadios del desarrollo de este insecto expuestos a ácido bórico (Büyükgüzel y col., 2013), a malatión (Büyükgüzel, 2006; 2009) y a azadaractina (Dere y col., 2015). También, Içen y col. (2005) observaron en larvas de este insecto plaga expuestas a la concentración más baja ensayada del insecticida metilparatión ( $0,01 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ ) un aumento significativo en el nivel de MDA; mientras que, a  $0,1$  y  $1 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$  detectaron una marcada disminución. Contrariamente a lo observado con metilparatión, los autores informaron que la exposición de larvas de esta especie a  $1 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$  de etilparatión produjo niveles mayores de MDA respecto del determinado en los organismos control. En la avispa endoparásita *Pimpla turionellae*, por exposición obligada a malatión, se observó un incremento significativo en el nivel de MDA a las concentraciones más altas evaluadas (Büyükgüzel, 2006). La exposición de larvas del gusano de seda, *Bombix mori*, al organofosforado foxim causó aumentos significativos en el nivel de MDA en el cuerpo graso e intestino medio (Yu y col., 2011). Del mismo modo, Nagaraju y col. (2013) informaron que la exposición del pez *Labeo rohita* a una concentración subletal de



clorantraniliprol causó un marcado incremento en el contenido de MDA en branquia, hígado, riñón y músculo.

En conclusión, este estudio es una contribución al conocimiento creciente de la fisiología de *C. pomonella* que posibilitará una mejor interpretación de su respuesta bioquímica a la exposición a insecticidas y a otros contaminantes prooxidantes. Además, la comprensión de los efectos generales del clorantraniliprol en este importante insecto plaga nos permitirá optimizar la gestión de programas de control y el manejo de la resistencia.



## CONCLUSIONES



## 5. CONCLUSIONES

- ✓ La actividad enzimática significativamente menor de GST determinada en adultos *C. pomonella* provenientes de ocho huertos con cultivos de manzanos, comparada con la de la cepa de laboratorio, expresa su papel protector disminuido frente a xenobióticos tóxicos.
- ✓ La actividad CAT significativamente menor determinada en las polillas de *C. pomonella* provenientes de Gral. Roca<sup>1</sup> revela la exposición de estos organismos a químicos inductores de estrés oxidativo.
- ✓ El nivel de GSH significativamente mayor determinado en las polillas de *C. pomonella* de Sarmiento<sup>2</sup> indica una respuesta adaptativa de estos organismos a la exposición a prooxidantes.
- ✓ Con excepción de los organismos provenientes de Gral. Godoy, el resto de las poblaciones de adultos de *C. pomonella* ensayadas presentaron niveles de GSH significativamente menores al determinado en la cepa de laboratorio, lo que podría sugerir su oxidación por EROs en situación de estrés oxidativo.
- ✓ Los adultos de *C. pomonella* provenientes de Sarmiento<sup>1</sup>, Gral. Godoy y Allen presentaron niveles de MDA significativamente menores al determinado en la cepa de laboratorio que se asociarían con el incremento de la expresión proteica.
- ✓ Las alteraciones observadas en los biomarcadores de estrés oxidativo, nivel de GSH endógeno y actividad GST, sugieren la exposición a contaminantes y/o factores ambientales prooxidantes de adultos de *C. pomonella* provenientes de diferentes huertos de la Patagonia Argentina.



- ✓ **La exposición de polillas de *C. pomonella* a clorantraniliprol durante 24 h causó letargia dependiente de la concentración.**
- ✓ **La exposición de polillas de *C. pomonella* a 50 mg x L<sup>-1</sup> de clorantraniliprol produjo una disminución significativa en las actividades GST y SOD, equivalente a la dosis de aplicación a campo, que resulta en la desprotección de los organismos frente al daño oxidativo inducido por el insecticida.**

### **5.1. PERSPECTIVAS FUTURAS**

Los resultados de este trabajo demuestran que los biomarcadores de estrés oxidativo, GST y GSH, en polillas de *C. pomonella* provenientes de 8 poblaciones de campo presentaron significativas alteraciones, lo que sugiere la exposición de estos organismos a prooxidantes. Estudios futuros serán necesarios para evaluar si la disminución de la actividad GST, importante enzima involucrada en la metabolización de xenobióticos y en la defensa antioxidante, determinada en adultos podría afectar la susceptibilidad a insecticidas de las larvas neonatas de la siguiente generación. Asimismo, sería interesante estudiar si la actividad GST disminuida en las polillas de *C. pomonella* afecta la supervivencia y la reproducción. Esta información resultaría útil para la planificación de rotaciones y el uso combinado de insecticidas.

Niveles reducidos de antioxidantes intracelulares pueden conducir a la acumulación de EROs, es decir, si la producción de GSH se reduce, si hay menos vitaminas antioxidantes en la célula, si las enzimas que eliminan las EROs se inhiben, o si existe una combinación de estos factores se incrementará el nivel celular de EROs. Algunas de estas condiciones han sido reportadas en el presente trabajo. Una de las estrategias de defensa de los insectos frente a situaciones de estrés es mediante la regulación de la expresión de proteínas. Por lo tanto, otro aspecto interesante a considerar en estudios posteriores sería profundizar el análisis del perfil de expresión proteico en los adultos de *C. pomonella* bajo condiciones de estrés oxidativo. El uso de las herramientas emergentes *omics* -genómicas, proteómicas y metabolómicas- permitirá evaluar rápidamente cómo los adultos de *C. pomonella* responden al estrés oxidativo producido por la exposición a prooxidantes.



Las polillas de *C. pomonella* expuestas a clorantraniliprol en los agroecosistemas tratados podrían presentar alteraciones en los parámetros asociados a la eficacia biológica que afectarían la dinámica poblacional de estos insectos. Hasta la fecha, hay escasa información de los efectos subletales del clorantraniliprol a pesar de su crucial importancia en la evaluación de riesgo de este insecticida tanto en especies no blanco como en los insectos plaga. En este estudio se detectaron disminuciones significativas en las actividades enzimáticas de GST y SOD y en el nivel de MDA en adultos expuestos a 50 mg x L<sup>-1</sup> de clorantraniliprol, equivalente a la dosis recomendada de aplicación a campo. Estudios posteriores de los efectos de la toxicidad residual del clorantraniliprol contribuirán a la optimización del manejo integrado de esta plaga.

Por último, el clorantraniliprol representa un nuevo modo de acción insecticida, tiene un perfil ecotoxicológico muy favorable, que hace de este químico una herramienta útil en el manejo integrado de *C. pomonella*. No obstante, el riesgo del desarrollo de resistencia a este insecticida no debería ser ignorado.



## BIBLIOGRAFÍA



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., Rezaie, A. «Pesticides and oxidative stress: a review.» *Medical Science Monitor* 10, nº 6 (2004): 141-147.
- Adamski, A., Ziemnicki, K., Fila, K., Ikie, R.V., Tajn, A. «Effects of long-term exposure to fenitrothion on *Spodoptera exigua* and *Tenebrio molitor* larval development and antioxidant enzyme activity.» *Biology Letters* 40, nº 1 (2003): 43-52.
- Ahmad, S., Pritsos, C. A., Bowen, S.M., Heisler, C. R., Bloomquist, G.J., Pardini, R. S. «Antioxidant enzymes of larvae of the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*: subcellular distribution and activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase.» *Free Radical Research Community* 4 (1988): 403-408.
- Ahmad S., Pardini, R.S. «Mechanisms for regulating oxygen toxicity in phytophagous insects.» *Free Radical Biology & Medicine* 8, nº 4 (1990): 401-13.
- Ahmad, S. «Biochemical defense of pro-oxidant plant allelochemicals by herbivorous.» *Biochemical Systematics and Ecology* 20 (1992): 269-296.
- Ahmad, S. «Oxidative stress from environmental pollutants.» *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 29 (1995): 135-157.
- Ahmed, A. M. «Immune and antioxidant defenses in an autogenous *Aedes caspius* mosquito upon infection with *Bacillus thuringiensis kurstaki*.» *African journal of microbiology research* 5, nº 22 (2011): 3848-3857.
- Akbar, S.M., Sharm, H.C., Jayalakshmi, S.K., Sreeramulu, K. «Methylparathion- and carbofuran-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress in *Helicoverpa armigera* (Noctuidae: Lepidoptera).» *Pesticide Biochemistry and Physiology*, nº 103 (2012): 31-37.
- Alford, D.V. *Pests of Fruit Crops: A Colour Handbook*. 2º Ed. Editado por Manson Publishing Ltd. CRC Press, 2007.
- Allen, R.G., Balin, A.K. «Oxidative influence on development and differentiation: an overview of a free radical theory of development.» *Free Radical Biology & Medicine* 6 (1989): 631-661.
- Altuntaş, H. «Determination of Gibberellic Acid (GA3)-Induced Oxidative Stress in a Model Organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae).» *Environmental Entomology* 44, nº 1 (2015): 100–105.



- Antonenkov, V.D., Grunau, S., Ohlmeier, S., Hiltunen, J.K. «Peroxisomes are oxidative organelles.» *Antioxidants & Redox Signaling* 13, n° 4 (2010): 525-537.
- Apel, K., Hirt, H. «Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction.» *Annual Review of Plant Biology* 55 (2004): 373–99.
- Aucoin, R., Bernard, J., Philogène, R., Arnason, J. «Antioxidant enzymes as biochemical defenses against phototoxin-induced oxidative stress in three species of herbivorous lepidoptera.» *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 16 (1991): 139-152.
- Bacchetta, C., Cazenave, J., Parma, M.J. «Responses of biochemical markers in the fish *Prochilodus lineatus* exposed to a commercial formulation of endosulfan.» *Water, Air & Soil Pollution* 216 (2011): 39-49.
- Bado, S.G., Iglesias, M. E. *INTA-Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*. 15 de Octubre de 2014. <http://inta.gob.ar/noticias/carpocapsa-sistema-de-alarma-para-control> (último acceso: 10 de Junio de 2015).
- Barbehenn, J., Kochmanski, J., Menachem, B. «Allocation of cysteine for glutathione production in caterpillars with different antioxidant defenses strategies: a comparison of *Lymantria dispar* and *Malacosoma disstria*.» *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 84, n° 2 (2013): 90-103.
- Barbehenn, R., Dodick, T., Poopat, U., Spencer, B. «Fenton-Type reactions and iron concentrations in the midgut fluids of tree-feeding caterpillars.» *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 60 (2005): 32–43.
- Beckman, K.B., Ames, B.N. «Oxidative decay of DNA.» *Journal of Biological Chemistry* 272, n° 32 (1997): 19633–19636.
- Beers, R.F., Sizer J.W. «A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase.» *Journal of Biological Chemical* 195, n° 1 (1952): 133-140.
- Bentley, K.S., Fletcher, J.L., Woodward, M.D. «Chlorantraniliprole: An Insecticide of the Anthranilic Diamide Class.» En *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology - Third Edition*, editado por Krieger Robert, 2231-2242. Elviesier Inc., 2010.
- Birben, E., Sahiner, UM, Sackesen, C, Erzurum, S., Kalaysi, O. «Oxidative stress and antioxidant defense - Review article.» *WAO Journal* 5 (2012): 9-19.



- Bonekamp, N.A., Volkl, A., Fahimi, D., Schrader, M. «Reactive oxygen species and peroxisomes: struggling for balance.» *BioFactors* 35, n° 4 (2009): 346–355.
- Box, A., Sureda, A., Galgani, F., Pons, A., Deudero S. «Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*.» *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 146 (2007): 531-539.
- Braconi, D., Bernardini, G., Santucci, A. «Linking protein oxidation to environmental pollutants: Redox proteomic approaches.» *Journal of Proteomics* 74 (2011): 2324-2337.
- Brandes, N., Schmitt, S., Jakob, U. «Thiol-based redox switches in eukaryotic proteins.» *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (2009): 997–1014.
- Brennan, L.J., Haukedal, J.A., Earle, J.C., Keddie, B., Harris, H.L. «Disruption of redox homeostasis leads to oxidative DNA damage in spermatocytes of *Wolbachia*-infected *Drosophila simulans*.» *Insect Molecular Biology* 21, n° 5 (2012): 510-520.
- Burmester, T. «Physiology: A welcome shortage of breath.» *Nature* 433 (2005): 471-472.
- Buyukuslu, N., Çelik, O., Atak, C. «The effect of magnetic field on the activity of superoxide dismutase.» *Journal of Cell and Molecular Biology* 5 (2006): 57–62.
- Büyükgüzel, E. «Evidence of oxidative and antioxidative responses by *Galleria mellonella* larvae to malathion.» *Journal of Economic Entomology* 102 , n° 1 (2009): 152-159.
- Büyükgüzel, K. «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, n° 4 (2006): 1225–1234.
- Büyükgüzel, E., Büyükgüzel, K., Snela, M., Erdem, M., Radtke, K., Ziemnicki, K., Adamski, Z. «Effect of boric acid on antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation, and ultrastructure of midgut and fat body of *Galleria mellonella*.» *Cell Biology & Toxicology* 29 (2013): 117-129.
- Calabrese, V., Cornelius, C., Dinkova-Kostova. «Cellular stress responses, the hormesis paradigm, and vitagenes: novel targets for therapeutic intervention in neurodegenerative disorders.» *Antioxidants & Redox Signaling* 13, n° 11 (2010): 1764-1812.



- Cao, G., Lu, Q., Zhang, L., Guo, F., Liang, G., Wu, K., Wyckhuys, K.G. «Toxicity of chlorantraniliprole to CryAc-susceptible and resistant strain of *Helicoverpa armigera*.» *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98 (2010): 99–103.
- Che-Mendoza, A., Penilla, R., Rodríguez, A. «Insecticide resistance and glutathione S-transferases in mosquitoes: A review.» *African Journal of Biotechnology* 8, nº 8 (2009): 1386-1397.
- Cichón, L. I., Fernández, D. E., Raffo, D. «Carpocapsa, la plaga clave. Manzanos y perales del Valle.» *IDIA* 21, nº 1 (2001): 96-99.
- Cichón, L., Fernández, D. «Evaluación del daño producido por la primera generación de carpocapsa.» *Fruticultura & Diversificación* 47 (2012): 6-7.
- Cichón, L., Garrido, S. «Implicancia de los cambios en el manejo sanitario de los frutales de pepita en el Alto Valle.» *Fruticultura & Diversificación* 67 (2012): 8-15.
- Circu, M.L., Aw, T.Y. «Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis.» *Free Radical Biology and Medicine* 48, nº 6 (2010): 749-762.
- Clark, A.G. «The comparative enzymology of the glutathione S-transferases from non-vertebrates organisms. Review.» *Comparative Biochemistry and Physiology. B.* 92 (1989): 419-446.
- Cooke, M., Evans, M., Diguzdaroglu, M., Lunec, J. «Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease.» *The FASEB Journal* 17 (2003): 1195-1214.
- Cordova, D., Benner, E., Sacher, M., Rauh, J., Sopa, J., Lahm, G., Selby, T., Stevenson, T., Flexner, L., Gutteridge, S., Rhoades, D., Wu, L., Smith, R., Tao, Y. «Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation.» *Pesticide Biochemistry and Physiology* 84 (2006): 196-214.
- Cui, Y., Du, Y., Lu, M., Qiang, C. «Antioxidant responses of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae exposed to thermal stress.» *Journal of Thermal Biology* 36 (2011): 292-297.
- Davies, K.J., Goldberg, A. L. «Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes.» *Journal of Biological Chemistry* 262, nº 17 (1987): 8220-8226.
- Davies, K. «Oxidative stress: the paradox of aerobic life.» *Biochemical Society Symposia* 61 (1995): 1-32.



- Davies, K.J. «Critical review: Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage.» *Life* 50 (2000): 279-289.
- Davies, M.J. «The oxidative environment and protein damage.» *Biochimica et Biophysica Acta* 1703 (2005): 93-109.
- De Luca-Abbott, S.B., Richardson, B., McClellan, K., Zheng, G.J., Martin, M., Lam, P. «Field validation of antioxidant enzyme biomarkers in mussels (*Perna viridis*) and clams (*Ruditapes philippinarum*) transplanted in Hong Kong coastal waters.» *Marine Pollution Bulletin* (51), 2005: 694-707.
- Dere, B., Altuntaş, H., Nurulloğlu, Z.U. «Insecticidal and oxidative effects of azadarachtin on the model organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae).» *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 89, n° 3 (2015): 138-152.
- Desagher, S., Martinou, J.C. «Mitochondria as the central control point of apoptosis.» *Trends in Cell Biology* 10 (2000): 369–377.
- Devasagayam, T.P., Bloor, K., Ramasarma, T. «Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits.» *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 40 (2003): 300-308.
- Ding, Y., Ortelli, F., Rossiter, L.C., Hemingway, J., Ranson, H. «The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles.» *BMC Genomics* 4, n° 35 (2003): 1-16.
- Dorts, J., Silvestre, F., Thi Tu, H., Tyberghein, A.E., Phuong, N.T., Kestemont, K. «Oxidative stress, protein carbonylation and heat shock proteins in the black tiges shrimp, *Penaeus monodon*, following exposure to endosulfan and deltamethrin.» *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28 (2009): 302-310.
- Douhri, H., Sayad, F. «The use of enzymatic biomarkers in two marine invertebrates *Nereis diversicolor* and *Patella vulgata* for the biomonitoring of Tangier's bay (Morocco).» *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 (2009): 394-399.
- Dubovskiy, I.M., Martemyanov, V.V., Vorontsova, Y.L., Rantala, M.J., Gryzanova, E.V., Glupov, V.V. «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 (2008): 1–5.
- Eberle, K.E., Asser-Kaiser, S., Sayed, S.M., Nguyen, H.T., Jehle, J.A. «Overcoming the resistance of codling moth against conventional *Cydia pomonella* granulovirus



- (CpGV-M) by a new isolate CpGV-I12.» *Journal of Invertebrate Pathology* 98, n° 3 (2008): 293-298.
- Egaas, E., Sandvik M., Fjeld E., Kallqvist T., Goksoyr A., Svenson A. «Some effects of the fungicide propiconazole on cytochrome P450 and glutathione S-transferase in brown trout (*Salmo trutta*).» *Comparative Biochemistry and Physiology* 122 (1999): 337-344.
- El-Demerdash, F.M. «Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides.» *Food and Chemical Toxicology* 49 (2011): 1346-1352.
- Ellman, G.L. «Tissue sulfhydryl groups.» *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82, n° 1 (1959): 70-77.
- Estevez, M.S., Abele, D., Puntarulo, S. «Lipid radical generation in polar (*Laternula elliptica*) and temperate (*Mya arenaria*) bivalves.» *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 132, n° 4 (2002): 729–737.
- Evenden, M.L., McClaughlin, J.R. «Male oriental fruit moth response to a combined pheromone-based attracticide formulation targeting both oriental fruit moth and codling moth (Lepidoptera: Tortricidae).» *Journal of Economic Entomology* 98 (2005): 317-325.
- Fahmy, M.N. «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, n° 1 (2012): 137-149.
- Fang, S.M. «Insect glutathione S-transferase: a review of comparative genomic studies and response to xenobiotics.» *Bulletin of Insectology* 65 , n° 2 (2012): 265-271.
- Farombi, E.O., Adelowo, O.A., Ajimoko, Y.R. «Biomarkers of Oxidative Stress and Heavy Metal Levels as Indicators of Environmental Pollution in African Cat Fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River.» *International Journal of Environmental Research and Public Health* 4, n° 2 (2007): 158-165.
- Felton, G.W. and Duffey, S.S. «Protective action of midgut catalases in lepidopteran larvae.» *Journal of Chemical Ecology* 17 (1991): 1715-1732.
- Felton, G.W., Summers, C.B. «Antioxidant systems in insects.» *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 29 (1995): 187-197.



- Fernández, D. «*Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae), Aspectos de su taxonomía, comportamiento y monitoreo aplicado a programas de control de grandes áreas.» *Tesis Doctoral. Universidad de Lleida (España)*. 2012.
- Fernández, D., Bosch, D., Cichón, L., Avilla, J. «A secondary sexual character for sex determination of *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) adults, trapped with kairomone lures.» *IOBC/WPRS Bulletin* 30 (2006): 273-278.
- Ferreira, D., Costa da Motta, A., Kreutz, L.C., Toni C., Loro, V.L., Gil Barcellos, L.J. «Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrochemicals.» *Chemosphere* 79 (2010): 914-921.
- Fetoui, H., Makn, M., Garou, E.M., Zeghal, N. «Toxic effects of lambda-cyhalothrin, a synthetic pyrethroid pesticide on the rat kidney: Involvement of oxidative stress and protective role of ascorbic acid.» *Experimental and Toxicologic Pathology* 62 (2010): 593-599.
- Fink, S.P., Reddy, G.R., Marnett, L.J. «Mutagenicity in *Escherichia coli* of the major DNA adduct derived from the endogenous mutagen malondialdehyde.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (1997): 8652–8657.
- Finkel, T., Holbrook, N.J. «Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.» *Nature* 408 (2000): 239-246.
- Franco, R., Sanchez-Olea, R., Reyes-Reyes, E.M., Panayiotidis, M.I. «Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: menage a trois.» *Mutation Research* 674 (2009): 3-22.
- Frenzilli, G., Bocchetti, M., Nigro, M., Annarumma, F., Scarcelli, V., Fattorini, D., Regoli, F. «Time-course evaluation of ROS-mediated toxicity in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment.» *Marine Environmental Research* 58 (2004): 609-613.
- Fridovich, I. «Superoxide dismutase.» *Annual Review of Biochemistry* 44 (1995): 147-159.
- Fridovich, I. «Superoxide Dismutase.» *Enciclopedia of Biological Chemistry* 4 (2004): 135-138.
- Fuentes-Contreras, E., Reyes, M., Barros, W., Sauphanor B. «Evaluation of azinphos-methyl resistance and activity of detoxifying enzymes in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) from Central Chile.» *Journal of Economical Entomology* 100, n° 2 (2007): 551-556.



- Fukami, J.I. *Metabolism of several insecticides by glutathione S-transferase*. Vol. 4, de *Differential toxicities of insecticides and halogenated aromatics*, de F. Matsumura, 223-261. Oxford, England: Pergamon Press, 1984.
- Gallagher, E.P., Sheehy, K.M. «Altered glutathione S-transferase catalytic activities in female brown bullheads from a contaminated central Florida lake.» *Marine Environmental Research* 50 (2000): 399-403.
- Gao, X.L., Li, J.M., Jiu, M., Yan, G.H., Liu, S.S., Wang, X.W. «Cloning, expression and characterization of mitochondrial manganese superoxide dismutase from the whitefly, *Bemisia tabaci*.» *International Journal of Molecular Sciences* 14 (2013a): 871–887.
- Gao, X.M., Jia, F.X., Shen, G.M., Jiang, H.Q., Dou, W., Wang, J.J. «Involvement of superoxide dismutase in oxidative stress in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*: molecular cloning and expression profiles.» *Pest Management Science* 69 (2013b): 1315–1325.
- Giganti, H.E., Dapoto, G.L., Vermeulen, J.D. «Manejo Integrado de Plagas de los Frutales de Pepita.» Cap. 16 de *Árboles Frutales. Ecofisiología, Cultivo y Aprovechamiento.*, de G.O. Sozzi, 805. Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos, 2007.
- Gravato, C., Oliveira, M., Santos, M.A. «Oxidative stress and genotoxic responses to resin acids in Mediterranean mussels.» *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61 (2005): 221–229.
- Green, D.R., Reed, J.C. «Mitochondria and apoptosis.» *Science* 281 (1998): 1309–1312.
- Grubor-Lajsic, G., Block, W., Telesmanic, M., Jovanovic, A., Stevanovic, D., Baca, F. «Effect of cold acclimation on the antioxidant defense system of two larval lepidoptera (noctuidae).» *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 36, n° 1 (1997): 1-10.
- Guo, L., Desneux, N., Sonoda, S., Liang, P., Han, P., Gao, X. «Sublethal and transgenerational effects of chlorantraniliprole on biological traits of the diamondback moth, *Plutella xylostella* L.» *Crop Protection* 48 (2013): 29-34.
- Gupta, A., Gupta, A., Shukla, G.S. «Effects of neonatal quinalphos exposure and subsequent withdrawal on free radical generation and antioxidative defenses in developing rat brain.» *Journal of Applied Toxicology* 18 (1998): 71-78.



- Gupta, S., Mishra, M., Sharma, A., Balaji, D., Kumar, R., Mishra, R., Chowdhuri, D.K. «Chlorpyrifos induces apoptosis and DNA damage in *Drosophila* through generation of reactive oxygen species.» *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73 (2010): 1415-1423.
- Haase, S., Sciocco-Cap, A., Romanowski, V. «Baculovirus Insecticides in Latin America: Historical Overview, Current Status and Future Perspectives. Review.» *Viruses* 7 (2015): 2230-2267.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jacoby, W.B. «Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation.» *Journal of Biological Chemical* 249 (1974): 7130-7139.
- Halliwell, B., Zhao K., Whiteman, M. «Nitric oxide and peroxynitrite: the ugly, the uglier and not so good: a personal view of recent controversies.» *Free Radical Research* 31 (1999): 651-669.
- Halliwell B., Whiteman, M. «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 (2004): 231–255.
- Halliwell, B. «Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life.» *Plant Physiology* 141 (2006): 312-322.
- Halliwell B., Gutteridge, J. «Oxygen is a toxic gas - an introduction to oxygen toxicity and reactive species.» Cap. 1 de *Free Radicals in Biology and Medicine*, 1-28. Oxford University Press 4<sup>o</sup> Ed., 2007.
- Halliwell, B. «Biochemistry of oxidative stress.» *Biochemical Society Transactions* 35, n<sup>o</sup> 5 (2007): 1147-1150.
- Han, W., Zhang, S., Shen, F., Liu, M., Ren, C., Gao, X. «Residual toxicity and sublethal effects of chlorantraniliprole on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae).» *Pest Management Science* 68, n<sup>o</sup> 8 (2012): 1184-1190.
- Harman, D. «Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry.» *Journal of Gerontology* 11 (1956): 298-300.
- Harman, D. «The biologic clock: the mitochondria?» *Journal of the American Geriatrics Society* 20 (1972): 145-147.
- Harman, D. «Free radical theory of aging: an update - Increasing the functional life span.» *Annals of the New York Academy of Sciences* 1067 (2006): 10-21.



- Hayes, J., Flanagan, J., Jowsey, I. «Glutathione Transferases.» *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45 (2005): 51–88.
- Hetz, S.K., Bradley, T.J. «Insects breathe discontinuously to avoid oxygen toxicity.» *Nature* 433 (2005): 516-519.
- Hu, Z., Feng, X., Lin, Q., Chen, H., Li, Z., Yin, F., Liang, P., gao, X. «Biochemical Mechanism of Chlorantraniliprole Resistance in the Diamondback Moth, *Plutella xylostella* Linnaeus.» *Journal of Integrative Agriculture* 13, n° 11 (2014): 2452-2459.
- Huang, J.L., Hu, M., Zhong, G. «The Mitochondria-mediate apoptosis of lepidopteran cells induced by azadirachtin.» *PLoS ONE* 8, n° 3 (2013): 1-15.
- Hyršl, P., Büyükgüzel, E., Büyükgüzel, K. «The effects of boric acid-induced oxidative stress on antioxidant enzymes and survivorship in *Galleria mellonella*.» *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 66 (2007): 23–31.
- Içen, E., Armutcu, F., Büyükgüzel, K., Gurel, A. «Biochemical stress indicators of greater wax moth exposure to organophosphorus insecticides.» *Journal of Economic Entomology* 98, n° 2 (2005): 358–366.
- Inoue, M., Sato, E.F., Nishikawa, M., Park, A.M., Kira, Y., Imada, I., Utsumi, K. «Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life.» *Current Medicinal Chemistry* 10 (2003): 2495–2505.
- IRAC, Committee Insecticide Resistance Action. *Insecticide Resistance Management Global Guidelines for IRAC Group 28 (Diamide) Insecticides*. Marzo de 2010. [www.irc-online.org](http://www.irc-online.org) or [enquiries@irc-online.org](mailto:enquiries@irc-online.org) (último acceso: Agosto de 2015).
- James, R.R., Xu, J. «Mechanisms by which pesticides affect insect immunity.» *Journal of Invertebrate Pathology* 109 (2012): 175-182.
- Jehle, J.A. «The Future of *Cydia pomonella* Granulovirus in Biological Control of Codling Moth.» *13th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing: proceedings to the Conference*. Weinsberg(Germany): Boos, Markus (Ed.) Ecofruit, 2008. 265-270.
- Jena, K., KumarKar, P. , Kausar, Z., Sudhakara Babu, C. «Effects of temperature on modulation of oxidative stress and antioxidant defenses in testes of tropical tasar silk worm *Antheraea mylitta*.» *Journal of Thermal Biology* 38 (2013): 199–204.



- Jokanović, M. «Biotransformation of organophosphorus compounds.» *Toxicology* 166, n° 3 (2001): 139-160.
- Jovanović-Galović, A., Blagojević, D.P., Grubor-Lajsić, G., Worland, R., Spasic, M.B. «Role of antioxidant defense during different stages of preadult life cycle in European corn borer (*Ostrinia nubilalis*, Hubn.): Diapause and metamorphosis.» *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 55, n° 2 (2004): 79-89.
- Jovanović-Galović, A., Blagojević, D.P., Grubor-Lajšić, G., Worland, M.R., Spasić, M.R. «Antioxidant defense in mitochondria during diapause and postdiapause development of European corn borer (*Ostrinia nubilalis*, Hubn.).» *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 64, n° 3 (2007): 111-119.
- Kanvah, S., J. Joseph, G. Schuster, R. Barnett, y C., Landman, U. Cleveland. «Oxidation of DNA: Damage to Nucleobases.» *Accounts of Chemical Research* 43, n° 2 (2010): 280-287.
- Kanzok, S.M, Fechner. A., Bauer, H., Ulschmid, J.K., Muller, H.M., Botella-Munoz, J., Schneuwly, S., Schirmer, R., Becker, K. «Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*.» *Science* 291 (2001): 643-646.
- Knight, A., Flexner, L. «Disruption of mating in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) by chlorantraniliprole, an anthranilic diamide insecticide.» *Pest Management Science* 63 (2007): 180–189.
- Knight, A. «Targeting *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) adults with low-volume applications of insecticides alone and in combination with sex pheromone.» *Pest Management Science* 66, n° 7 (2010): 709-917.
- Kohen, R., Nyska, A. «Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantication - Invited review.» *Toxicologic Pathology* 30, n° 6 (2002): 620–650.
- Kono, Y., Fridovich, I. «Superoxide Radical Inhibits Catalase.» *The Journal of Biological Chemistry* 257, n° 10 (1982): 5751-5754.
- Konus, M. «Effects of Oxidative Stress on xenobiotic metabolizing enzymes in *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae).» *Turkish Journal of Biochemistry* 40, n° 2 (2015): 175–180.



- Krishnan, N., Chattopadhyay, S., Kundu, J.K., Chaudhuri, A. «Superoxide dismutase activity in haemocytes and haemolymph of *Bombyx mori* following bacterial infection.» *Current Science* 83, nº 10 (2002): 321-325.
- Krishnan, N., Kodrík, D., Turanlı, F., Frantisek, S. «Stage-specific distribution of oxidative radicals and antioxidant enzymes in the midgut of *Leptinotarsa decemlineata*.» *Journal of Insect Physiology* 53 (2007): 67–74.
- Krishnan, N., Kodrík, D. «Endocrine control of oxidative stress in insects.» Cap. 18 de *Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecular Aspects of Oxidative Stress on Cell Signalling*, de Farooqui and Farooqui, 261–270. New Jersey: Wiley-Black, 2012.
- Kristoff, G., Verrengia Guerrero, N.R., Cochón, A.C. «Effects of azinphos-methyl exposure on enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses in *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*.» *Chemosphere* 72, nº 9 (2008): 1333-1339.
- Kührt, U., Samietz, J., Dorn, S. «Thermal response in adult codling moth.» *Physiological Entomology* 31 (2006): 80-88.
- Kumar, S., Christophides, G., Cantera, R., Charles, B., Han, Y., Meister, S., Dimopoulos, G., Kafatos, F., Barillas-Mury, C. «The role of reactive oxygen species on *Plasmodium melanotic* encapsulation in *Anopheles gambiae*.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, nº 24 (2003): 14139–14144.
- Kumarswamy, R., Seth, R.K., Dwarakanath, B.S., Chandna, S. «Mitochondrial regulation of insect cell apoptosis: evidence for permeability transition pore-independent cytochrome-c release in the Lepidopteran Sf9 cells.» *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 41 (2009): 1430–1440.
- Lahm, G., Stevenson, T., Selby, T., Freudenberger, J., Cordova, D., Flexner, L., Bellin, C., Dubas, C., Smith, B., Hughes, K., Hollingshaus, J., Clark, C., Benner, E. «Rynaxypyr: a new insecticidal anthranilic diamide that acts as a potent and selective ryanodine receptor activator.» *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* 17 (2007): 6274-6279.
- Lahm, G.P., Cordova, D., Barry, J.D. «New and selective ryanodine receptor activators for insect control.» *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17 (2009): 4127–4133.
- Lahm, G., Cordova, D., Barry, J., Andoloro, J., Annan, I., Marcon, P., Portillo, H., Stevenson, T., Selby, T. «Anthranilic diamide insecticides: chlorantraniliprole and



- cyantraniliprole.» En *Modern Crop Protection Compounds*, de W. Schimer, U. (Eds) Kramer, 1409-1425. Wiley-VCH, Weinheim., 2011.
- Lai, T., Su, J. «Effects of chlorantraniliprole on development and reproduction of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hubner).» *Journal of Pest Science* 84 (2011): 381–386.
- Lee, K. «Glutathione S-transferase activities in phytofagous insects: induction and inhibition by plant phototoxins and phenols.» *Insect Biochemistry* 21, nº 4 (1991): 353-361.
- Li, X., Schuller, M. A., Berenbaum, M. R. «Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics.» *Annual Review of Entomology* 52 (2007): 231-253.
- Limón-Pacheco, J., Gonsebatt, M.E. «The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress.» *Mutation Research* 674, nº 1-2 (2009): 137-47.
- Lopez-Huertas, E., Charlton, W.L., Johnson, B., Graham, I.A., Baker, A. «Stress induces peroxisome biogenesis genes.» *EMBO Journal* 19, nº 24 (2000): 6770-6777.
- Lopez-Martínez, G., Hahn, D. «Short-term anoxic conditioning hormesis boosts antioxidant defenses, lowers oxidative damage following irradiation and enhances male sexual performance in the caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*.» *The Journal of Experimental Biology* 215 (2012): 2150-2161.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. «Protein measurement with the Folin phenol reagent.» *The Journal of Biological Chemistry* 193 (1951): 265-275.
- Lukaszewicz-Hussain, A. «Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity – Short review.» *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98 (2010): 145–150.
- Lumjuan, N., McCarroll, L, Prapanthdara, L. Hemingway, J., Ranson, H. «Elevated activity of an epsilon class glutathion transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypty*.» *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, nº 8 (2005): 861-871.
- Lumjuan, N., Rajatileka, S., Changsom, D., Wicheer, J., Leelapat, P. Propanthadara, I. Somboon, P. Licett, G., Ranson, H. «The role of the *Aedes aegypty* epsilon glutathion tranferase in conferring resistance to DDT and pyrethroid



- insecticides.» *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41, n° 3 (2011): 203-209.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V. «Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish.» *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 144 (2006): 283–289.
- Lushchak, V.I., Semchyshyn, H.M. «Introductory Chapter.» Cap. 1 de *Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates - Molecular Aspect of Cell Signaling*, de Farooqui and Farooqui, 3-12. New Jersey: Wiley -Blackwell, 2012.
- Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jenson, H., Kalim Tahir, M., Warholm, M. «Identification of three classes of cytosolic glutathione S-transferase common to several mammalian species: Correlation between structural data and enzymatic properties.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82 (1985): 7202-7206.
- McCord, J.M., Fridovich, I. «Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein).» *Journal of Biological Chemistry* 244 (1969): 6049-6055.
- Meng, J.Y., Zhang, C.Y., Lei, C.L. «A proteomic analysis of *Helicoverpa armigera* adults after exposure to UV light irradiation.» *Journal of Insect Physiology* 56 (2010): 405–411.
- Milanesi, L., Lodi, G., Audisio, M., Mangiapan, S., Fioretti, C. S. «Chlorantraniliprole (Rynaxypyr®, Coragen®): four-year results for control of *Cydia pomonella* on pome fruit.» *Giornate Fitopatologiche* 1 (2008): 85-92.
- Misra, H.P., Fridovich, I. «The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase.» *Journal of Biological Chemistry* 247, n° 10 (1972): 3170-3175.
- Mittler, R. «Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance.» *TRENDS in Plant Science* 7, n° 9 (2002): 405-410.
- Monteiro, D.M., Alves de Almeida, J., Tadeu Rantin, F., Kalinin, A. «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, n° 2 (2006): 165–172.



- Mosleh, Y., Paris-Palacios, S., Ahmed, M., Mahmoud, F., Osman, M., Biagianti-Risbourg, S. «Effects of chitosan on oxidative stress and metallothioneins in aquatic worm *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae).» *Chemosphere* 67 (2007): 167-175.
- Mulcahy, R.T., Wartman, M.A., Bailey, H.H., Gipp J.J. «Constitutive and  $\beta$ -naphthoflavone-induced expression of the human  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene is regulated by a distal antioxidant response element/TRE Sequence.» *The Journal of Biochemical Chemistry* 272, n° 11 (1997): 7445-7454.
- Muller, F.L., Lustgarten, M., Youngmok, J., Richardson, A., Van Remmen, H. «Trends in oxidative aging theories.» *Free Radical Biology & Medicine* 43 (2007): 477-503.
- Muthusamy, Shivakumar, Karthi, Ramkumar. «Pesticide detoxifying mechanism in field population of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: noctuidae) from South India.» *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences* 3, n° 1 (2011): 51-57.
- Nagaraju B., Rathnamma, V., Karra, S. «Effect of Chlorantraniliprole on Biochemical and Certain Biomarkers in Various Tissues of Freshwater Fish *Labeo rohita* (Hamilton).» *Environment and Ecology Research* 1, n° 4 (2013): 205-215.
- Orrenius, S., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B. «Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death.» *Annual Review of Pharmacology & Toxicology* 47 (2007): 143–183.
- Ortega-Villasante, C., Rellan-Alvarez, R., Del Campo, F.F., Carpena-Ruiz, R.O., Hernandez, L.E. «Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*.» *Journal of Experimental Botany* 418 (2005): 2239-2251.
- Oruç, E.Ö., Üner, N. «Combined effects of 2, 4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*.» *Comparative Biochemistry and Physiology* 127C (2000): 291–296.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. «Mitochondria, oxidative stress and cell death.» *Apoptosis* 12, n° 5 (2007): 913-22.
- Pajac, I., Pejic, I., Baric, B. «Review article – Codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) – Major pest in apple production: an overview of its biology, resistance, genetic structure and control strategies.» *Agriculturrae Cospectus Scientificus* 76, n° 2 (2011): 87-92.



- Pampanin, D.M., Camus, L., Gomiero, A., Marangon, I., Volpato, E., Nasci, C., «Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Venice Lagoon (Italy).» *Marine Pollution Bulletin* 50 (2005): 1548-1557.
- Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B., Raisuddin, S. «Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallagu attu* (Bl. & Schn.).» *The Science of the Total Environment* 309 (2003): 105-115.
- Pandir, D., Sahingoz, R. «Magnetic field-induced oxidative stress and DNA damage in Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) larvae.» *Journal of Pest Science* (2014): 79-84.
- Papadopoulos, A.I., Polemitou, I., Laifia, P., Yiangoua, A., Tananaki, C. «Glutathione S-transferase in the insect *Apis mellifera* macedonica kinetic characteristics and effect of stress on expression of GST isoenzymes in the adult worker bee.» *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology* 139 (2004): 93-97.
- Pavlidis, N., Tseliou, V., Riga, M., Nauen, R., Van, T. «Functional characterization of glutathione S-transferases associated with insecticide resistance in *Tetranychus urticae*.» *Pesticide Biochemical & Physiology* 121 (2015): 53-60.
- Peña, S., Peña, J.B., Ríos, C., Sancho, E., Fernández, C., Ferrando, M.D. «Role of glutathione in thiobencarb resistance in the European eel *Anguilla anguilla*.» *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46, nº 1 (2000): 51-56.
- Peña-Llopis, S., Peña, J.B., Sancho, E., Fernández-Vega, C., Ferrando, M.D. «Glutathione-dependent resistance of the European eel *Anguilla anguilla* to the herbicide molinate.» *Chemosphere* 45, nº 1 (2001): 671-681.
- Pérez, E., Blasco, J., Solé, M. «Biomarker responses to pollution in two invertebrate species: *Scrobicularia plana* and *Nereis diversicolor* from the Cádiz bay (SW Spain).» *Marine Environmental Research* 58 (2004): 275-279.
- Pluciennik, S. «The modern insecticide (chlorantraniliprole) used to control codling moth (*Cydia pomonella* L.).» *Journal of Fruit & Ornamental Plant Research* 20 , nº 2 (2012): 85-89.
- Pretera, T., Talalay, P. «Electrophile and antioxidant regulation of enzymes that detoxify carcinogens.» *Proceeding of the National Academy of Sciences* 92 (1995): 8965-8969.



- Quintana, G., Scholz, E., Scholz, C., Alvarado, L. *Control of codling moth (Cydia pomonella L.) with Carpovirus Plus, granulosis virus product, in pome orchards in Argentina: Three years of field trials.* Research reports from the 78th annual conference, Orchard Pest & Disease Management Conference, 2004.
- Rahal, A., Kumar., Singh, V., Yadav, B. Tiwari, R., Chakraborty, S., Dharma, K. «Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay.» Review Article. *BioMed Research International*, 2014: 1-19.
- Ranson, H., Hemingway, J. «Mosquito glutathione transferases.» *Methods in Enzymology* 401 (2005): 226-241.
- Rathnamma, V., Nagaraju, B. «Oxidative stress induced by clorantraniliprole in various tissues of freshwater fish *Ctenopharyngodon idella*.» *Journal of Medical Sciences and Public Health* 2, nº 1 (2014): 21-27.
- Ray, P.D., Huang, B.W., Tsuji, Y. «Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling.» *Cellular Signalling* 24 (2012): 981–990.
- Rebrin, I., Sohal, R.S. «Pro-oxidant shift in glutathione redox state during aging.» *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (2008): 1545–1552.
- Reyes, M., Bouvier, J.C., Boivin, T., Fuentes-Contreras, E., Sauphanor, B. «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, nº 3 (2004): 229-237.
- Ribeiro, L.M., Wanderley-Teixeira, V., Ferreira, H., Teixeira, A.A., Siqueira, H.A. «Fitness costs associated with field-evolved resistance to chlorantraniliprole in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae).» *Bulletin of Entomological Research* 104 (2014): 88–96.
- Riley, P.A. «Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation.» *International Journal of Radiation Biology* 65 (1994): 27–33.
- Rizvi, S.I., Pandey, K.B. «Oxidative stress and aging: a comparison between vertebrates and invertebrates.» Cap. 12 de *Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates - Molecular Aspects of Cell Signaling*, de T. and Farooki, A. Farooki, 167-174. New Jersey (EEUU): Wiley-Blackwell, 2012.
- Rizzo, A.M., Berselli, P., Zava, S., Montorfano, G., Negroni, M., Corsetto, P., Berra, B. «Endogenous antioxidants and radical scavengers.» *Advances in Experimental Medicine and Biology* 698 (2010): 52-67.



- Rodríguez, M.A., Bosch, D., Sauphanor, B., Avilla, J. «Susceptibility to organophosphate insecticides and activity of detoxifying enzymes in Spanish populations of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae).» *Journal of Economic Entomology* 103, n° 2 (2010): 482-491.
- Rodríguez, M.A., Bosch, D., Avila, J. «Azinphos-methyl and carbaryl resistance in adults of the codling moth (*Cydia pomonella* (L.), Lepidoptera: Tortricidae) from northeastern Spain.» *Pesticide Biochemistry and Physiology* 103 (2012): 43–48.
- Rodrigues, A.C.M., Gravato, C., Quintaneiro, C., Golovko, O., Žlábek, V. «Life history and biochemical effects of chlorantraniliprole on *Chironomus riparius*.» *Science of the Total Environment* 508 (2015): 506–513.
- Rudneva, I.I. «Antioxidant system of black sea animals in early development.» *Comparative Biochemistry and Physiology* 122C (1999): 265-271.
- Salmon, T., Evert, B., Song, B., Doetsch, P. «Biological consequences of oxidative stress-induced.» *Nucleic Acids Research* 32, n° 12 (2004): 3712-3723.
- Salvador, M.E. *Lineamientos estratégicos para el reposicionamiento de manzanas y peras con destino al mercado interno*. Disponible en: [http://www.cpymeadeneu.com.ar/Documentos/PerasManzanas/InformeFinal22\\_10\\_12.pdf](http://www.cpymeadeneu.com.ar/Documentos/PerasManzanas/InformeFinal22_10_12.pdf), Neuquén: Centro Federal de Inversiones (CFI), 2012, 126 P.
- Sattelle, D., Cordova, D., Cheek, T. «Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals.» *Invertebrates Neuroscience* 8, n° 3 (2008): 107-119.
- Scandalios, J.G. «The rise of ROS.» *Trends in Biochemical Sciences* 27 , n° 9 (2002): 483-486.
- Schrader, M., Fahimi, H. D. «Peroxisomes and oxidative stress.» *Biochimica et Biophysica Acta* 1763, n° 12 (2006): 1755-1766.
- Schumacher, P., Weyeneth, A., Weber, D.C., Dorn, S. «Long flights in *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) measured by a flight mill: influence of sex, mated status and age.» *Physiological Entomology* 22 (1997): 149-160.
- SENASA. «Anuario Estadístico 2012.» Centro Regional Patagonia Norte. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, 83. EEA INTA Alto Valle: Disponible en: [www.senasa.gov.ar](http://www.senasa.gov.ar), 2013.



- SENASA. «Anuario Estadístico 2013.» Centro Regional Patagonia Norte. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, 117. EEA INTA Alto Valle : Disponible en: [www.senasa.gov.ar](http://www.senasa.gov.ar), 2014.
- Sies, H. «Glutathione and its role in cellular functions.» *Free Radical Biology & Medicine* 27, nº 9-10 (1999): 916-921.
- Singh, H., Udawat, A. Franklin, T., Sarathi, S. «DNA oxidation, its consequences and efficacy of GC-MS and SPME-GC-MS for in vitro quantification of DNA oxidative products. Review.» *International Journal of Advancements in Research & Technology* 1, nº 5 (2012): 15-27.
- Smith, K.T., Workman, J.L. «Chromatin proteins: Key responders to stress.» *PLOS Biology* 10, nº 7 (2012): 1-4.
- Sohal, R.S., Orr, W.C. «The redox stress hypothesis of aging.» *Free Radical Biology & Medicine* 52 (2012): 539-555.
- Stadtman, E.R., Levine, E.L. «Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins.» *Amino Acids* 25 (2003): 207–218.
- Su, J., Lai, T., Li, J. «Susceptibility of field populations of *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) in China to chlorantraniliprole and the activities of detoxification enzymes.» *Crop Protection* 42 (2012): 217-222.
- Subramanian, S., Rabindra,R.J., Palaniswamy, S., Sathiah, N., Rajasekaran, B. «Impact of granulovirus infection on susceptibility of *Spodoptera litura* to insecticides.» *Biological Control* 33 (2005): 165–172.
- Sung, C., Chuan Hsu, Y., Chi Chen, C., Feng Lin, Y., Chao Wu, C. «Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic Kidney disease.» *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013: 1-15.
- Teixeira, L.A.F., Gut, L.J., Wise, J.C., Isaacs, R. «Lethal and sublethal effects of chlorantraniliprole on three species of *Rhagoletis* fruit flies (Diptera: Tephritidae).» *Pest Management Science* 65, nº 2 (2009): 137-143.
- Turrens, J.F. «Mitochondrial formation of reactive oxygen species - Topical Review.» *The Journal of Physiology* 552, nº 2 (2003): 335–344.
- Urretabizkaya, N., Vasicek, A., Saini, E. *Insectos Perjudiciales de Importancia Agronómica - Parte I: Lepidópteros*. Buenos Aires: Ediciones INTA, 2010.



- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J. «Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence.» *Molecular and Cellular Biochemistry* 266 (2004): 37-56.
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T.D. «Metals, toxicity and oxidative stress.» *Current Medicinal Chemistry* 12 (2005): 1161- 1208.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncola, J., Izakovic, M., Mazura, M. «Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.» *Chemico-Biological Interactions* 160 (2006): 1–40.
- Veal, E.A., Day, A.M., Morgan, B.A. «Hydrogen peroxide sensing and signalling.» *Molecular Cell* 26 (2007): 1–14.
- Velki, M., Kodrík, D., Vecera, J., Hackenberger, B., Socha, R. «Oxidative stress elicited by insecticides: a role for the adipokinetic hormone.» *General and Comparative Endocrinology* 172 (2011): 77–84.
- Venturino, A., Anguiano, O.L., Gauna, L., Cocca, C., Bergoc, R.M., Pechen de D'Angelo, A.M. «Thiols and polyamines in the potentiation of malathion toxicity in larval stages of the toad *Bufo arenarum*.» *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C* 130 (2001): 191–198.
- Vermeulen, J., Cichón, L., Parra, E. «Sistema de alarma termoacumulativo para el control de carpocapsa (*Cydia pomonella*, L.) para el Alto Valle del Río Negro y Neuquen.» *EEA Alto Valle (INTA)*, 1988: 16 pp.
- Viarengo, A., Canesi, L., Garcia Martinez, P., Peterst, P.D. «Pro-oxidant processes and antioxidant defence systems in the tissues of the Antarctic scallop (*Adamussium colbecki*) compared with the Mediterranean scallop (*Pecten jacobaeus*).» *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B* 111 , nº 1 (1995): 119-126.
- Villarreal, P., Mattei, S., Villegas Nigra, M., Forchetti, G. *Evaluación del impacto del programa nacional de supresión de carpocapsa en la fruticultura de pepita de los valles irrigados de la Norpatagonia*. Viedma (Río Negro): FunBaPa Ediciones, 2010.
- Villarreal, P., Leskovar, M., López, A., Malaspina, M., Zubeldía, H., Boltshauser, V., Avellá, B., Bondoni, M. «Balance frutícola. Temporada 2009-2010. Complejo Manzanas – Peras. Río Negro y Neuquén.» 2011, 82 p.
- Vioque-Fernández, A., Alves de Almeida, E.A., López-Barea, J. «Assessment of Doñana National Park contamination in *Procambarus clarkii*: Integration of conventional



- biomarkers and proteomic approaches.» *Science of the total Environment* 407, n° 5 (2009): 1784-179.
- Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M.J., Valavanidis, A. «Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece.» *Mar Pollution Bulletin* 54, n° 9 (2007): 1361-1371.
- Vontas, J.G., Small, G.J., Hemingway, J. «Glutathione S-transferases as antioxidant defense agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*.» *Biochemical Journal* 357 (2001): 65–72.
- Voudouris, C.Ch., Sauphanor, B., Franck, P., Reyes, M., Mamuris, Z., Tsitsipis, J.A., Vontas, J., Margaritopoulos, J.T. «Insecticide resistance status of the codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) from Greece.» *Pesticide Biochemistry and Physiology* 100 (2011): 229-238.
- Wang, X. «The expanding role of mitochondria in apoptosis.» *Genes & Development* 15 (2001): 2922–2933.
- Wang, Y., Oberley, L.W., Murhammer, D.W. «Antioxidant defense systems of two Lepidopteran insect cell lines.» *Free Radical Biology & Medicine* 30 (2001): 1254–1262.
- Wang, W., Khakame, S.K., Ye, C., Yang, Y., Wu, Y. «Characterisation of field-evolved resistance to chlorantraniliprole in the diamondback moth, *Plutella xylostella*, from China.» *Pest Management Science* 69 (2013): 661–665.
- Weddle, P.W., Welter, S.C., Thomson, D. «History of IPM in California pears -50 years of pesticide use and the transition to biologically intensive IMP.» *Pest Management Science* 65 (2009): 1287-1292.
- Witzgall, P., Stelinski, L., Gut, L., Thompson, D. «Codling moth management and chemical ecology.» *Annual Review of Entomology* 53 (2008): 503-522.
- Wu, H., Zhang, R., Jinyu Liu, J., Guo, Y., Ma, E. «Effects of malathion and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and antioxidant defense system in *Oxya chinensis* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae).» *Chemosphere* 83 (2011): 599–604.
- Wu, M.C., Lu, K.H. «Juvenile Hormone Induction of Glutathione S-Transferase Activity in the Larval Fat Body of the Common Cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera:



- Noctuidae).» *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 68 (2008): 232–240.
- Yan, H., Meng, F., Jia, H., Guo, X., Xu, B. «The identification and oxidative stress response of a zeta class glutathione S-transferase (GSTZ1) gene from *Apis cerana cerana*.» *Journal of Insect Physiology* 58 (2012): 782–791.
- Yu, B.P. «Cellular defences against damage from reactive oxygen species.» *Physiological Reviews* 74 (1994): 139–162.
- Yu, Q.Y., Fang, S.M., Zuo, W.D., Dai, F.Y., Zhang, Z., Lu, C. «Effect of organophosphate phoxim exposure on certain oxidative stress biomarkers in the silkworm.» *Journal of Economic Entomology* 104, n° 1 (2011): 101–106.
- Zabłocka, A., Janusz, M. «The two faces of reactive oxygen species.» *Postepy Hig Med Dosw* 62 (2008): 118-124.
- Zhang, R., Dong, J., Chen, J., Ji, Q., Cui, J. «The Sublethal Effects of Chlorantraniliprole on *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae).» *Journal of Integrative Agriculture* 12, n° 3 (2013): 457-466.
- Zharkov, D.O. «DNA oxidation.» *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 2013: 77-81.
- Zheng, X., Long, W., Guo, Y., Mai, E. «Effects of cadmium exposure on lipid peroxidation and the antioxidant system in fourth-instar larvae of *Prosilocerus akamusi* (Diptera: Chironomidae) under laboratory conditions.» *Journal of Economic Entomology* 104, n° 3 (2011): 827-83.
- Zhu Y., Blanco, C., Portilla, M., Adamczyk, J., Luttrell, R., Huang, F. «Evidence of multiple/cross resistance to Bt and organophosphate insecticides in Puerto Rico population of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*.» *Pesticide Biochemical Physiology* 122 (2015): 15-21.



# PRESENTACIONES A CONGRESOS



## 7. PRESENTACIONES A CONGRESOS

- **“Evaluation of oxidative stress biomarkers in *Cydia pomonella* adults from different field populations of Argentinean Patagonia”.**

Maero, E., Montagna, M., Cichón, L., Garrido, S. and Anguiano, L.

Publicado en el Anais do Resumos. XIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicología (ECOTOX). P. 229-230. 2014. Disponible en: [http://www.ecotox2014.com.br/site/submissao\\_trabalhos](http://www.ecotox2014.com.br/site/submissao_trabalhos)

- **“Evaluación del efecto de la exposición al insecticida clorantraniliprol sobre biomarcadores de estrés oxidativo de adultos de *Cydia pomonella*”.**

Maero, E., Montagna, M., Cichón, L., Garrido, S., Anguiano, L.

Publicado en el Libro de Resúmenes del V Congreso de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental Argentina (SETAC). P. 70. 2014. Disponible en: [www.congresosetacnqn.com.ar](http://www.congresosetacnqn.com.ar)

Mg. Olga Liliana Anguiano

Ing. Agr. Elizabeth del Valle Maero