



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Efecto del piretroide aletrin sobre la peroxidación
lipídica, muerte celular e inflamación en células
neuronales SH-SY5Y**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Toxicología

AUTOR

Giovana Alia CASTILLO HUMERES

ASESOR

Dr. José Luis RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ

Lima, Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Castillo G. Efecto del piretroide aletrin sobre la peroxidación lipídica, muerte celular e inflamación en células neuronales SH-SY5Y [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2022.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Giovana Alia Castillo Humeres
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	29695251
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-3159-090X
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	José Luis Rodríguez Gutiérrez
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	40523536
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-3962-2101
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Norma Julia Ramos Cevallos
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	25469870
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Yovani Martín Condorhuamán Figueroa
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09597625
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Luis Alberto Inostroza Ruiz
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	18089817
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.4.1.3. Fisiología animal

Grupo de investigación	Grupo de investigación en fisiología y fisiopatología en animales de trópico y de altura (GIFATA)
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Proyectos de Investigación con Financiamiento para Grupos de Investigación Año 2021 Resolución Rectoral N° 005753-2021-R/UNMSM con código de proyecto A21080401.
Ubicación geográfica de la investigación	Universidad Nacional Mayor de San Marcos País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: San Borja Urbanización: Los Jardines de Salamanca Avenida: Circunvalación Latitud: -12.0815915 Longitud: -76.9877331
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Mayo 2021 - diciembre 2021
URL de disciplinas OCDE	Toxicología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.07



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado



ACTA DE SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS PARA OPTAR
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN TOXICOLOGÍA

Siendo las **15:00 hrs. del 25 de febrero de 2022** se reunieron mediante la plataforma de Google meet de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Evaluador de Tesis, presidido por la Dra. Norma Julia Ramos Cevallos e integrado por los siguientes miembros: Dr. José Luis Rodríguez Gutiérrez (asesor), Dr. Yovani Martín Condorhuamán Figueroa y Mg. Luis Alberto Inostroza Ruiz; para la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada: **“EFECTO DEL PIRETROIDE ALETRIN SOBRE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA, MUERTE CELULAR E INFLAMACIÓN EN CÉLULAS NEURONALES SH-SY5Y”**, presentado por la Bachiller en Farmacia y Bioquímica **Giovana Alia Castillo Humeres**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la Tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Toxicología**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduanda.

A continuación, el Jurado Evaluador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

19 (Diecinueve) - Excelente

Luego, la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Bachiller en Farmacia y Bioquímica **Giovana Alia Castillo Humeres**, el Grado Académico de Magíster en **Toxicología**.

Siendo las 4.15 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 4.19 hrs. del 25 de febrero de 2022.

.....
Dra. Norma Julia Ramos Cevallos (P. P., T.C.)
Presidenta

.....
Dr. José Luis Rodríguez Gutiérrez (P. Asoc., D.E.)
Miembro - Asesor

.....
Dr. Yovani Martín Condorhuamán Figueroa (P. Asoc., T.P.)
Miembro

.....
Mg. Luis Alberto Inostroza Ruiz (P. Asoc, T.P)
Miembro

Observaciones:
.....

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi gratitud a la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, que me enseñó a ser mejor profesional y mejor persona.

A los docentes de la Maestría en Toxicología, por sus enseñanzas, consejos y tiempo, en especial al Dr. José Luis Rodríguez Gutiérrez, por su asesoramiento.

A la Dra. Norma Julia Ramos Cevallos, Dr. Yovani Martín Condorhuamán Figueroa y Mg. Luis Alberto Inostroza Ruiz, miembros del Jurado Examinador y Calificador, por sus aportes, correcciones y sugerencias, para culminar el presente trabajo.

Esta investigación fue financiada por la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por Resolución Rectoral N° 005753-2021-R/UNMSM con código de proyecto A21080401.

DEDICATORIA

Al Divino Niño por guiarme, acompañarme e iluminar mi camino.

Al motivo de mi vida, mi querida hijita Martha Fernanda.

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INDICE DE FIGURAS	8
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Objetivo general	10
1.2 Objetivos específicos	10
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	11
2.1. Antecedentes de la investigación	11
2.2. Bases teóricas	16
2.2.1. Aletrin	17
A. Estructura química	17
B. Usos	18
C. Mecanismo de acción	18
D. Preparados comerciales	19
2.2.2. Daño celular inducido por piretroides	19
A. ROS inducido por piretroides	20
B. Apoptosis	22
C. Reguladores de muerte celular	23
D. Complejo inflammasoma	27
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA	31
3.1. Tipo de Investigación	31
3.2. Consideraciones éticas	31
3.3. Diseño metodológico	31
Materiales y métodos	31
A. Cultivo celular	31
B. Ensayo de peroxidación lipídica, niveles de malonadehído (MDA)	32
C. Evaluación de estrés oxidativo, producción de óxido nítrico (NO) intracelular	33
D. Actividad apoptótica (ensayo de actividad de caspasa 3/7)	35
E. Expresión de genes relacionados al complejo inflammasoma	36
F. Materiales y reactivos	37
G. Equipos	38
3.5. Población de estudio	38
3.6. Muestra de estudio	39
3.7. Criterios de selección	39
3.7.1. Criterios de inclusión	39
3.7.2. Criterios de exclusión	39
3.8. Instrumento de recolección de datos	39
3.9. Procesamiento de los datos	39
CAPÍTULO IV. RESULTADOS	40

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN	45
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES	49
CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES	50
CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

RESUMEN

Objetivo: El presente trabajo evaluó el efecto del insecticida aletrin sobre la peroxidación lipídica, muerte celular e inflamación en células neuronales humanas SH-SY5Y, un tipo celular altamente especializado para ensayo de neurotoxicidad. **Métodos y Resultados:** El estrés oxidativo producido en células SH-SY5Y por efecto del aletrin (0.1-200 μ M) se determinó por la peroxidación lipídica, mediante el ensayo de malonaldehído (MDA) que se incrementó a 25 μ M (44 %, $P < 0.05$), 50 μ M (50%, $P < 0.01$), 100 μ M (160%, $P < 0.001$) y 200 μ M (255%, $P < 0.001$) de aletrin y por la producción de óxido nítrico (NO) intracelular, encontrando un incremento dosis-dependiente en comparación con el grupo vehículo, con la dosis de aletrin de 50 μ M (9%, $P < 0.01$), 100 μ M (103%, $P < 0.001$) y 200 μ M (135%, $P < 0.001$). Mediante el ensayo de caspasa 3/7 se observa que aletrin induce incremento de la señal apoptótica de las células SH-SY5Y, dicha actividad aumentó por efecto de aletrin a la dosis de 50 μ M (12%, $P < 0.05$), 100 μ M (118%, $P < 0.001$) y 200 μ M (121%, $P < 0.001$). El efecto oxidativo en las células SH-SY5Y producido por aletrin, pudo ser causante del aumento de la actividad del complejo inflammasoma, reflejado a través del incremento de la expresión génica de NLRP3 (1.6 veces, $P < 0.001$), PYCD1 (1.5 veces, $P < 0.001$) y CASP1 (2.5 veces, $P < 0.001$) tras la exposición de las células SH-SY5Y a 50 μ M de aletrin. **Conclusión:** Los efectos del piretroide aletrin en células neuronales humanas SH-SY5Y, muestran que es capaz de inducir citotoxicidad y neurotoxicidad a través del estrés oxidativo, mediante la activación del complejo inflammasoma y aumento de la actividad de biomarcadores de muerte celular.

Palabras clave: neurotoxicidad, inflammasoma, estrés oxidativo, apoptosis, aletrin

ABSTRACT

Objective: This study evaluated the effect of the insecticide allethrin on lipid peroxidation, cell death and inflammation in human neuronal cells SH-SY5Y, a highly specialized cell type for neurotoxicity assay. **Methods and Results:** The oxidative stress produced in SH-SY5Y cells, the effect of the allethrin (0.1-200 μM) was determined by lipid peroxidation, using the assay malonaldehido (MDA) was increased to 25 μM (44 %, $P<0.05$), 50 μM (50%, $P<0.01$), 100 μM (160%, $P<0.001$) and 200 μM (25%, $P<0.001$) of allethrin and by the production of nitric oxide (NO) intracellular, finding an increase in dose-dependent compared to the vehicle group, with the dose of allethrin of 50 μM (9%, $P<0.01$), 100 μM (103%, $P<0.001$) and 200 μM (135%, $P<0.001$). The caspase 3/7 assay shows that allethrin induces increased apoptotic signal from SH-SY5Y cells, increased activity by allethrin at doses of 50 μM (12%, $P<0.05$), 100 μM (118%, $P<0.001$) and 200 μM (121%, $P<0.001$). The oxidative effect on SH-SY5Y cells produced by allethrin may have caused increased inflammasome complex activity, reflected through increased gene expression of NLRP3 (1.6-fold, $P<0.001$), PYCD1 (1.5-fold, $P<0.001$) and CASP1 (2.5-fold, $P<0.001$) after exposure of SH-SY5Y cells to 50 μM allethrin. **Conclusion:** The effects of pyrethroid allethrin on human neuronal cells SH-SY5Y, show that it is capable of inducing cytotoxicity and neurotoxicity through oxidative stress, by activating the inflammasoma complex and increasing the activity of cell death biomarkers.

Key words: neurotoxicity, inflammasoma, oxidative stress, apoptosis, allethrin

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura química del piretroide tipo I aletrin	17
Figura 2	Absorción y mecanismo de acción de los piretroides	19
Figura 3	Estrés oxidativo celular inducido por piretroides (deltametrin)	21
Figura 4	Efecto apoptótico de los piretroides (cipermetrin)	23
Figura 5	Vías de señalización de apoptosis	26
Figura 6	Mecanismo de ensamblaje del inflamasoma-NLRP3	29
Figura 7	Preparación del medio de cultivo DMEM-F12 al 10% SFB.	32
Figura 8	Protocolo para la determinación de los niveles de MDA en células SH-SY5Y por efecto del piretroide aletrin.	33
Figura 9	Protocolo para la determinación de los niveles de NO intracelular en células SH-SY5Y por efecto del piretroide aletrin.	34
Figura 10	Protocolo del ensayo de actividad de caspasa 3/7 en células neuronales SH-SY5Y por efecto del piretroide aletrin.	35
Figura 11	Protocolo de extracción de RNA, síntesis de cDNA y cuantificación molecular a tiempo real de genes involucrados en la activación del complejo inflamasoma en células neuronales SH-SY5Y por efecto de aletrin a 50 μ M.	36
Figura 12	Peroxidación lipídica, niveles de MDA inducidos por aletrin (1-200 μ M) tras 24 de exposición en células SH-SY5Y.	40
Figura 13	Estrés oxidativo, niveles de NO intracelular inducidos por aletrin (1-200 μ M) tras 24 de exposición en células SH-SY5Y.	41
Figura 14	Apoptosis celular, actividad de la enzima caspasa 3/7 inducida por aletrin (1-200 μ M) tras 24 de exposición en células SH-SY5Y.	42
Figura 15	Activación del complejo inflamasoma, expresión molecular de NLRP3 inducida por aletrin a 50 μ M) tras 24 de exposición en células SH-SY5Y.	43
Figura 16	Activación del complejo inflamasoma, expresión molecular de PYCD1 inducida por aletrin a 50 μ M) tras 24 de exposición en células SH-SY5Y.	44
Figura 17	Activación del complejo inflamasoma, expresión molecular de Casp-1 inducida por aletrin a 50 μ M) tras 24 de exposición en células SH-SY5Y.	44

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Los piretroides son análogos sintéticos de las piretrinas, se utilizan como insecticidas en espacios públicos y domiciliarios, en humanos se consideran poco tóxicos, sin embargo, la exposición a estas sustancias puede causar trastornos cutáneos, respiratorios, gastrointestinales y neurológicos en humanos.

En la actualidad, en el mercado global existen muchos productos que contienen el piretroide aletrin, pero su uso sin las medidas de protección personal y un inadecuado cuidado del ambiente, pueda traer como consecuencia la sobreexposición masiva o la ingestión accidental del insecticida en humanos, con consecuencias neurológicas como temblores y convulsiones, puesto que este piretroide al igual que otros tienen como principal diana el sistema nervioso.

Aletrin, químicamente pertenece al tipo I de los piretroides sintéticos, debido a su estructura molecular que no contiene el grupo α -cyano, se encuentra presente en muchos plaguicidas y repelentes de insectos de uso doméstico e industrial, comercializados principalmente como aerosoles, lo cual genera nieblas que pueden ser inhaladas por la población en general, ocasionando peligros para la salud de la población en general.

También es posible observar una sustancial absorción dérmica de aletrin y su acumulación en la epidermis, constituyen un riesgo laboral muy común para los operarios que laboran con aerosoles o en la fabricación de estos compuestos químicos.

Algunos reportes mencionan que la exposición inhalatoria continua de aletrin provoca reducción del peso corporal y afectación en el sistema reproductivos en ratas machos, además de efectos neurotóxicos, hepatotóxicos y respuestas inflamatorias en pulmón de estos animales. También se ha determinado que de forma dosis-dependiente, aletrin es capaz de inducir un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno y la peroxidación lipídica, con disminución simultánea de la actividad antioxidante realizada por la superóxido dismutasa y la catalasa, esto en eritrocitos humanos aislados.

El aletrin, químicamente pertenece al tipo I de los piretroides, debido a su estructura molecular que no contiene el grupo α -cyano, se encuentra presente en muchos plaguicidas y repelentes de insectos de uso doméstico e industrial, comercializados principalmente como

aerosoles, lo cual genera nieblas que pueden ser inhaladas por la población en general, ocasionando peligros para la salud de la población en general.

Se considera que los piretroides como aletrin tienen bajos niveles de toxicidad, y por esa razón su uso se ha incrementado particularmente en países en vías de desarrollo, y actúan sobre el sistema nervioso al inhibir los canales de sodio. Sin embargo, en la actualidad esa "baja toxicidad" está en duda, por lo que es indispensable evaluar los efectos neurotóxicos del piretroide aletrin sobre la peroxidación lipídica, muerte celular y expresión de genes relacionados con el complejo inflamasoma en células neuronales humanas SH-SY5Y.

1.3 Objetivo general

Evaluar el efecto del piretroide aletrin sobre la peroxidación lipídica, muerte celular e inflamación en células neuronales humanas SH-SY5Y.

1.4 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto del piretroide aletrin sobre la peroxidación lipídica, en células neuronales humanas SH-SY5Y mediante el ensayo de malonaldehído (MDA).
2. Evaluar el efecto del piretroide aletrin sobre la muerte celular, en células neuronales humanas SH-SY5Y mediante la actividad de caspasa 3/7.
3. Evaluar el efecto del piretroide aletrin sobre la inducción molecular de genes (CASP1, NLRP3 y PYDC1) del complejo inflamasoma en células neuronales humanas SH-SY5Y.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

El efecto neurotóxico de los piretroides está siendo estudiado, intentando determinar mecanismos específicos de neurotoxicidad y otros efectos tóxicos *in vivo* e *in vitro*. De ahí que un estudio, donde se aplicó el insecticida bifentrina por 24 h de exposición a diferentes concentraciones (1-20 μM) sirvió para determinar el comportamiento de biomarcadores de estrés oxidativo (ROS, NO, MDA, H_2O_2), actividades enzimáticas antioxidantes (CAT, GPx, SOD) y respuesta inflamatoria (TNF- α , IL-6, PGE 2) en células SK-N-SH. También se evaluó la síntesis de proteínas y la expresión de ARNm de las enzimas implicadas en la síntesis de PGE 2 (COX-2, mPGES-1), así como el factor nuclear kappaB (NF- κB) y el factor 2 similar al eritroide-2-nuclear antioxidante (Nrf-2). La viabilidad celular se analizó mediante el ensayo de MTT-tetrazolio (MTT) y lactato deshidrogenasa (LDH). Se observó a dosis-dependiente de bifentrin una disminución de células viables SK-N-SH, también hubo un aumento significativo de la producción del estrés oxidativo medido a través de ROS, NO, MDA y H_2O_2 y disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y GPx). Así mismo se pudo observar un aumento de los niveles de citocinas proinflamatorias (TNF- α e IL-6), aumento de la expresión de ARNm de marcadores inflamatorios (COX-2, mPGES-1 y NF- κB) y una disminución de la expresión del ARNm de Nrf-2. Estos demuestran que bifentrin induce neuroinflamación y estrés oxidativo en células de neuroblastoma humano SK-N-SH (1)

Martinez et al. (2) evaluaron el efecto neurotóxico de dos piretroides (ciflutrin y alfa-cipermetrin) insecticidas sobre células SH-SY5Y. Los parámetros evaluados fueron la apoptosis, el estrés oxidativo a través ROS, activación de caspasa 3/7, expresión génica de Bax, Bcl-2, Casp-3, BNIP3, p53 y Nrf2 y la liberación de adenilato quinasa citosólica (AK) y las alteraciones transcripcionales de genes de neurodesarrollo TUBB3, NEFL, NEFH, GAP43, CAMK2A, CAMK2B, WNT3A, WNT5A, WNT7A, SYN1 y PIK3C3. Los resultados hallados indican que ciflutrin y la alfa-cipermetrin tienen la capacidad de provocar aumentos dosis-dependientes en la liberación de AK, producción de ROS, actividad de caspasa 3/7 y expresión génica de mediadores de apoptosis y estrés oxidativo. Además, ambos piretroides provocaron cambios en la expresión del ARNm

de genes claves vinculados al desarrollo neuronal. Esta investigación proporciona evidencia de que ciflutrin y la alfa-cipermetrin tienen el potencial de actuar como compuestos neurotóxicos del desarrollo neuronal.

En un estudio realizado por Martínez et al. (3) se ha podido demostrar que ciflutrin indujo un aumento significativo en la generación de ROS, la peroxidación lipídica (MDA) y la producción de óxido nítrico (NO), y una disminución significativa en la actividad de la enzima antioxidante NQO1 en células neuronales SH-SY5Y. Sin embargo, algunas moléculas antioxidantes fueron capaces de revertir parte del efecto neurotóxico producido por ciflutrin. Se examinó la actividad antioxidante de la melatonina (MEL), Trolox, N-acetilcisteína (NAC) y Sylibin contra el estrés oxidativo inducido por ciflutrin. También se observó que ciflutrin aumentó significativamente la expresión génica de mediadores de apoptosis, proinflamación y estrés oxidativo (Bax, Bcl-2, Casp-3, BNIP3, AKT1, p53, APAF1, NFκB1, TNFα y Nrf2). En la mayoría de los genes, los niveles de ARNm inducidos por ciflutrin se redujeron parcialmente por MEL (1 μM). Por otro lado, se analizó el efecto de ciflutrin sobre 84 genes relacionados exclusivamente sobre estrés oxidativo, detectándose cambios en los niveles de ARNm de 31 genes: 13 regulados positivamente y 18 regulados negativamente, siendo los genes de mayor expresión CYBB, DUOX1, DUOX2, AOX1, BNIP3, HSPA1A, NOS2 y NQO1. Estos resultados demostraron que el estrés oxidativo es un elemento clave en la neurotoxicidad inducida por ciflutrin y que MEL puede desempeñar un papel en la reducción del estrés oxidativo inducido por este piretroide.

Romero et al. (4) evaluaron el efecto neurotóxico del piretroide alfa-cipermetrin sobre las células del neuroblastoma humano SH-SY5Y a través de la inducción de estrés oxidativo y apoptosis. El piretroide alfa-cipermetrin (1-100 μM) produjo de forma dosis-dependiente un aumento significativo de la peroxidación lipídica y de los niveles de óxido nítrico. Además, se examinó el papel neuroprotector de tres antioxidantes, melatonina (MEL), Trolox y N-acetilcisteína (NAC) contra el estrés oxidativo inducido por α-CYPER. En comparación con los otros antioxidantes, el tratamiento con MEL (1 μM) mostró la protección más eficaz contra la peroxidación lipídica inducida por alfa-cipermetrin y la producción de NO. También se investigaron los efectos de alfa-

cipermetrin sobre el perfil de expresión génica de la vía de muerte celular en células SH-SY5Y. De los 84 genes examinados se detectaron cambios en los niveles de ARNm de 39 genes: 36 fueron regulados positivamente y 3 fueron regulados negativamente, siendo los genes de mayor expresión ATP6V1G2, BCL2, CASP9, FAS, GADD45A, SPATA2, SYCP2, ATG7, NFKB1, SNCA, ULK1 y JPH3. Estos resultados demuestran que el piretroide alfa-cipermetrin altera la expresión de los genes de apoptosis, autofagia y necrosis, así como induce estrés oxidativo que puede provocar daños en el ADN.

Romero et al. (5) evaluaron *in vitro* los efectos aditivos de dosis de una mezcla de piretroides tipo II. El objetivo de este estudio fue evaluar la potencia y eficacia de 6 piretroides tipo II (α -cipermetrin, ciflutrin, λ -cihalotrin, deltametrin, cifenotrin y esfenvalerato para inducir la producción de óxido nítrico y malondialdehído en tres modelos celulares humanos SH-SY5Y, HepG2 y Caco-2. La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y fue el modelo *in vitro* más sensible. El orden de potencia de la citotoxicidad de las células SH-SY5Y fue deltametrin > cifenotrin > λ -cihalotrin > ciflutrin > esfenvalerato > α -cipermetrin. Los resultados de este estudio son consistentes con informes previos de aditividad de piretroides *in vivo* e *in vitro*.

En otro estudio realizado por Romero et al. (6) estudiaron la capacidad neurotóxica *in vitro* de deltametrin y sus metabolitos: ácido 3-fenoxibenzoico (3-PBA), 2'-OH-deltametrin y 4'-OH-deltametrin, además de evaluar el efecto protector de melatonina (MEL, 0,1 - 1 μ M), trolox (0,3, 1 μ M) y N-acetilcisteína (500, 1000 μ M) en las células SH-SY5Y. Se pudo determinar que los niveles tanto de óxido nítrico y de MDA aumentaron significativamente en las células tratadas con deltametrin y 4'-OH-deltametrin, mientras que MEL (1 μ M) redujo los niveles de MDA inducidas por deltametrin y 4'-OH-deltametrin. Estos resultados sugieren que el estrés oxidativo observado es uno de los principales mecanismos de neurotoxicidad inducida por deltametrin y puede atribuirse en parte a la disponibilidad y el metabolismo de este piretroide.

El efecto neurotóxico de los piretroides también ha sido evaluado a través de ensayos de muerte celular. Es así que se evaluó el potencial citotóxico de cipermetrin en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Las células SH-SY5Y se trataron con CM a 0-200

μM durante 24, 48 y 72 h, *in vitro*. Se encontró que cipermetrin tuvo capacidad inductora de muerte celular de forma dosis-dependiente a través del ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH). Por otro lado, se determinó que cipermetrin sensibiliza a las células SH-SY5Y a la necroptosis. Finalmente, se demostró que pomalidomida provocó una reducción estadísticamente significativa de la citotoxicidad inducida por cipermetrin, que se demostró por la inhibición de TNF-alfa. En general, los datos obtenidos sugieren que cipermetrin induce neurotoxicidad en células SH-SY5Y por necroptosis (7).

Muchos plaguicidas distintos a los piretroides son capaces de producir efectos neurotóxicos, es el caso del clorpirifos un insecticida organofosforado que en una mezcla aditiva con cipermetrin fue administrada por vía dérmica, produciendo una fuerte inhibición de la actividad de la colinesterasa en el plasma y el cerebro de ratas. Mientras que, *in vitro* en células SH-SY5Y se determinó que la mezcla de clorpirifos y cipermetrin indujeron muerte celular en las células SH-SY5Y de forma dosis-dependiente, a través de la disminución de Bcl-2 y el aumento de la actividad de caspasa 3. En general, estos datos sugieren que las vías de señalización de FAS/TNF del sistema nervioso pueden verse afectados por la toxicidad de clorpirifos con cipermetrin (8).

Se ha informado que la exposición a fenpropatrin uno de los pesticidas piretroides más utilizados, podría ser un factor a considerar en la presentación de la enfermedad de Parkinson (EP). Es por ello que se desarrolló un estudio donde se investigó el rol de la proteasa lisosomal asparagina endopeptidasa (AEP) en la neurodegeneración inducida por fenpropatrin, encontrándose que fenpropatrin indujo la activación de la AEP, la agregación de α -sinucleína y la degeneración neuronal dopaminérgica tanto *in vitro* (células SH-SY5Y) como *in vivo* (ratones). Estos hallazgos demuestran que fenpropatrin es un modelo de neurotoxicidad a tomar en cuenta en el desarrollo de la AEP (9).

En un único paciente, quien se ha expuesto diariamente a fenpropatrin durante 6 meses hubo un desarrollo progresivo de síntomas de Parkinson. Por ello se investigó *in vitro* (células SH-SY5Y) e *in vivo* (roedores) el efecto de fenpropatrin sobre la producción de muerte celular, generación de ROS, agregación de proteínas asociadas a cuerpos de Lewy y formación de inclusiones intracitoplasmáticas similares a cuerpos de Lewy. En

los roedores se observó una disminución de la inmunorreactividad de la tirosina hidroxilasa (TH) y del transportador de monoamina vesicular 2 (VMAT2), mientras que se observó un aumento de la inmunorreactividad del transportador de dopamina (DAT). Sin embargo, el número de células TH-positivas en la sustancia nigra se redujeron significativamente por efecto del piretroide fenpropatrin. Estos resultados demuestran que la exposición a fenpropatrina podría inducir algunas características patológicas y patogénicas de la Enfermedad de Parkinson, especialmente tras exposición a largo plazo (10).

Ding et al. (11) realizaron un estudio en ratas para evaluar el efecto neurotóxico de deltametrin (DLT) por 7 días a dosis de 2, 5, 10, 20 y 40 mg/kg, observándose que DLT produjo de forma dosis dependiente un efecto neurotóxico y disfunción hepática. Así mismo, DLT provocó el aumento de ROS, una expresión elevada de p66shc en células SH-SY5Y y la translocación de p66shc del citoplasma a las mitocondrias. En conjunto, estos hallazgos indican un alto nivel de estrés oxidativo inducido por DLT mediado por p66shc, que puede ser en parte responsable de los efectos tóxicos en células SH-SY5Y expuestas a DLT.

La peligrosidad de los piretroides viene dada por su uso ampliamente extendido en el mundo como plaguicidas domésticos y agrícolas. Por ello es importante su continuo estudio, como el realizado en 2017 por Madhubabu et al. (12) quienes demostraron la actividad citotóxica de aletrin en células de carcinoma de Leydig (LC540), de forma dosis-dependiente. La toxicidad celular estuvo asociada a generación de especies reactivas de oxígeno, aumento de la peroxidación de lípidos, apoptosis y alteraciones en enzimas antioxidantes como catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa.

El estudio histológico de tejido hepático de ratones tratados con aletrin proveniente de bobinas para insectos, mostró apoptosis y una forma grave de necrosis e infiltración de células inflamatorias en hígado y pulmón de los animales tratados, el estudio fue realizado por Abdulla et al. (13), quienes llegaron a la conclusión que la exposición crónica a aletrin es responsable de complicaciones en la salud graves como el EPOC debido a alteraciones bioquímicas en sangre y cambios en tejidos hepático y pulmonar.

En el 2018, Na et al. (14), describieron efectos del aletrin y praletrina como inductores de la expresión de MUC5AC a través de la generación de especies reactivas de oxígeno en células epiteliales de las vías respiratorias humanas. La MUC5AC es una mucina polimérica muy glicosilada y marcador de metaplasia de células calciformes, tradicionalmente es asociado a condiciones inflamatorias en el tracto respiratorio.

Gargouri et al. (15) concluyeron que los piretroides afectan funciones en el Sistema Nervioso Central, causando lesión neuronal, siendo las microglías las células claves en la respuesta inmune innata del SNC y la activación de la microglia se ha relacionado con inflamación y neurotoxicidad, sin embargo, hay poca información sobre el proceso de toxicidad inducida por el piretroide estudiado.

En un estudio sobre estrés oxidativo e inflamación después de la exposición oral subletal de cipermetrin en ratas: potencial atenuante de la epicatequina, se demostró que la dosis de 25 mg/kg de peso corporal durante 14 días, puede producir estrés oxidativo, alteración del sistema antioxidante y promueve la inflamación, lo cual puede inducir daños al ADN (16).

2.2. Bases teóricas

Las neurotoxinas son sustancias químicas generalmente sintéticas que ocasiona daño estructural-funcional al sistema nervioso central (SNC), sistema nervioso periférico y órganos sensoriales (17). Por tanto, la exposición a las neurotoxinas puede provocar trastornos sensoriales, motores y neurocognitivos (18). Entre la variada gama de sustancias neurotóxicas, encontramos a los plaguicidas que han sido identificados como una de las causas más frecuentes de trastornos neurocognitivos en agricultores (19). Actualmente, la exposición ocupacional a plaguicidas sin las medidas de protección adecuadas se identifica como un problema de salud pública. Sin embargo, la mayor resistencia a las plagas y las demandas de la industria alimentaria han provocado un aumento en la venta y uso de plaguicidas a nivel mundial (20), lo que significa una mayor exposición para los trabajadores, lo que a largo plazo puede provocado varias enfermedades neurodegenerativas ocupacionales (21).

Los piretroides comercializados para su aplicación en el hogar, debido a su supuesta baja toxicidad para los humanos, están hechos de tres posibles compuestos: deltametrin, permetrin y cipermetrin. Sin embargo, estudios recientes muestran que no son del todo inofensivos para la salud humana, ya que se consideran sustancias neurotóxicas, y cada una ha sido identificada con efectos adversos específicos: por ejemplo permetrin afecta la fertilidad, el sistema inmunológico, la actividad enzimática, el metabolismo cardiovascular y hepático; deltametrin induce inflamación, nefrotoxicidad y hepatotoxicidad; y la alfa-cipermetrin puede afectar la inmunidad y aumentar los niveles de glucosa y lípidos en sangre (22).

2.2.1. Aletrín

A. Estructura química

Pertenece al grupo de los piretroides sintéticos, fue sintetizado en 1948, debido a su estructura química se clasifica en el grupo de piretroides de tipo I, ya que carece de un sustituyente α -ciano. Se considera uno de los piretroides menos persistentes con un peso molecular de 302.4 y fórmula empírica $C_{19}H_{26}O_3$. También denominado (2-metil-4-oxo-3-prop-2-enilcicloprop-2-en-1-il) 2,2-dimetil-3-(2-metilprop-1-enil) ciclopropano-1-carboxilato (23).

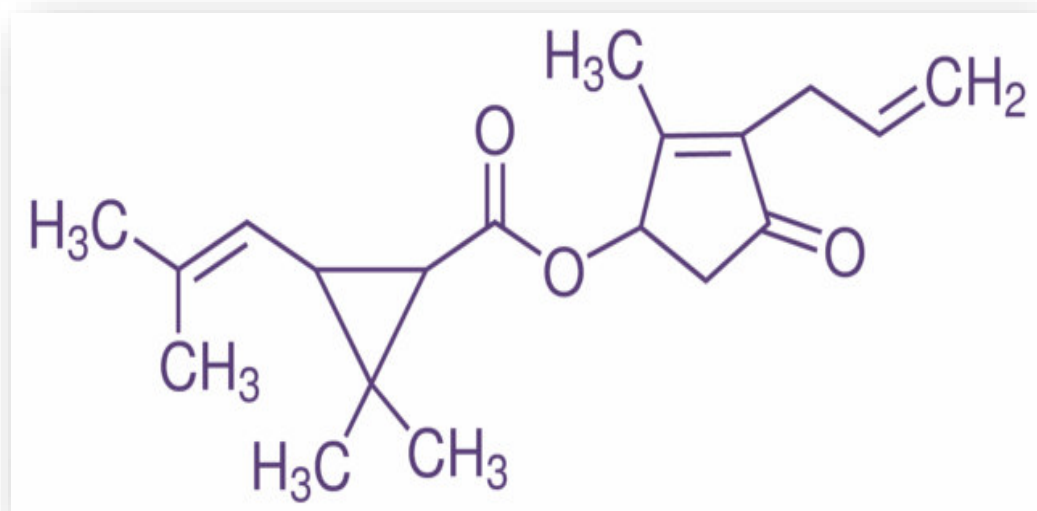


Figura 1. Estructura química del piretroide tipo I aletrín (25)

B. Usos

Se utiliza como plaguicida, del tipo insecticida, usualmente se formula con pesticidas residuales, los organismos objetivos son avispas, avispones, cucarachas, hormigas, pulgas y mosquitos. Se presenta en gran cantidad de preparados comerciales que incluyen aplicaciones industriales, residenciales e institucionales. Así como aplicaciones en horticultura para tratamiento foliar y nebulizador en plantas no alimentarias. A nivel residencial, incluye el control de plagas en viviendas y estructuras domésticas al aire libre, jardines y aplicación directa a mascotas (24).

C. Mecanismo de acción

Aletrin es el primer piretroide sintético y es un tóxico axónico que actúa a nivel de los axones, bloquean el ingreso de sodio a los nervios, por tanto, el potencial de membrana se prolonga y no retorna a su estado de reposo, lo que conduce a hiperactividad del sistema nervioso que puede resultar en parálisis y/o muerte. Aletrin se acumula en diferentes superficies del hogar y persiste en el medio ambiente durante un período de tiempo prolongado. La degradación de aletrin a través de la vía oxidativa conduce a la generación de radicales libres que causan daño al ADN y varios efectos adversos para la salud (25). La aletrina induce neurotoxicidad en roedores, genotoxicidad en sistemas bacterianos y genotoxicidad en linfocitos de sangre periférica humana (26) y ratones albinos suizos. El mecanismo molecular de la toxicidad por aletrin en las células epiteliales corneales involucró la apoptosis a través de activación mitocondrial (27). En las células de feocromocitoma de rata, el modo de acción de aletrin variaba según el subtipo de canales de calcio dependientes de voltaje (28). Los perfiles bioquímicos del plasma se alteraron en humanos expuestos a aletrin y praletrin (29).

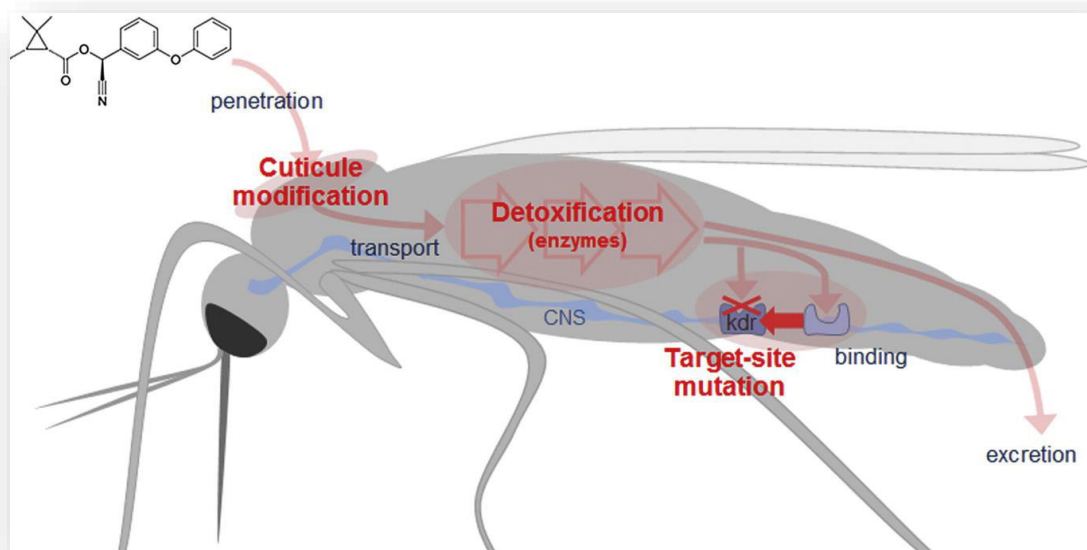


Figura 2. Absorción y mecanismo de acción de los piretroides. (30)

D. Preparados comerciales

Se comercializan como líquido presurizado, concentrados emulsionables, champús para mascotas, espirales y estrellitas para mosquitos. Estos preparados se aplican mediante pulverizador eléctrico, mecánico y comercial, sistemas de nebulización automáticos, aerosoles y nebulizadores térmicos.

La concentración en preparados para insectos rastreros y voladores oscila entre 0.05% y 0.25 %, los nebulizadores de liberación total en promedio están entre el 0.6 % al 3 %; las bobinas varían entre el 0.1 % y 0.3 %, liberan el principio activo al quemar la bobina y los sistemas de nebulización automáticos en general están al 0.05 % (24) (31).

2.2.2. Daño celular inducido por piretroides

Las células generan especies reactivas de oxígeno (ROS), de forma natural como consecuencia del metabolismo celular del oxígeno. Pero cuando las células son expuestas a condiciones de estrés sus niveles de ROS aumentan en niveles superiores a los normales, pudiendo producir daño celular e incluso apoptosis. Muchos estudios demostraron que los pesticidas inducen daño oxidativo y alteran los mecanismos de desintoxicación, produciendo cambios citotóxicos a través de la acción de radicales libres; demostrado por la disminución de las actividades de las enzimas del sistema antioxidante: superóxido dismutasa, catalasa y glutatión

peroxidasa. Además, el estrés oxidativo podría inducir importantes cambios en la célula como peroxidación de lípidos y alteración de proteínas (3,4,15,32).

A. ROS inducido por piretroides

Los radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS) son generados *in vivo* como productos del metabolismo normal, mediante mecanismos donde participan enzimas y células; en condiciones normales, la mayoría de los radicales libres proceden de la respiración aerobia y contienen oxígeno. El exceso de ROS tiene efectos nocivos graves que afectan los componentes celulares como lípidos, proteínas y ADN, conduciendo a estrés oxidativo, que está referido al desequilibrio entre las concentraciones de ROS y el mecanismo de defensa antioxidante propio del organismo (33). Cuando se pierde el equilibrio oxidante-antioxidante se genera estrés oxidativo, se dañan macromoléculas esenciales para llevar a cabo las funciones normales de una célula lo cual puede traducir en diversos procesos patológicos.

Muchos piretroides son capaces de inducir estrés oxidativo. Tras una defensa antioxidante inadecuada o la sobreproducción de radicales libres se podría provocar estrés oxidativo, que podría ser iniciado por ROS como radicales: hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), aniones superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) y radicales perhidroxilo ($\text{HOO}\cdot$), y por RNS, incluido el óxido nítrico (NO) (34). Permetrin (PER) puede inducir estrés oxidativo resultante de la producción de ROS y los efectos tóxicos relacionados *in vivo*. Cuando un grupo de roedores fueron tratados con PER (150 mg/kg) por 60 días, se observó que PER aumentó la producción de $\text{O}_2\cdot^-$ (33 veces) y la actividad del sistema de peróxido de hidrógeno-mieloperoxidasa (67 veces) en neutrófilos polimorfonucleares (35).

Por otro lado, deltametrin causa daño por estrés oxidativo a través de la generación de ROS y RNS (5). Deltametrin (10 μM) aumentó significativamente la producción de ROS en las células PC12 (36). De manera similar, deltametrin 25 y 50 μM durante 1 h elevaron los niveles de ROS que sirven como un marcador temprano de apoptosis en timocitos murinos (37). Además, deltametrin (1 y 5 μM)

indujo la muerte celular y la producción de ROS en hepatocitos primarios de rata (38). Estos estudios *in vitro* ilustran que deltametrin podría causar directamente daño por estrés oxidativo a través de la producción de ROS. *In vivo*, hubo una elevación significativa dependiente del tiempo y la dosis en la producción de ROS en la trucha arco iris tratada (39). Estos resultados sugieren que la generación de ROS mediada por deltametrin juega un papel vital para los efectos tóxicos oxidativos.

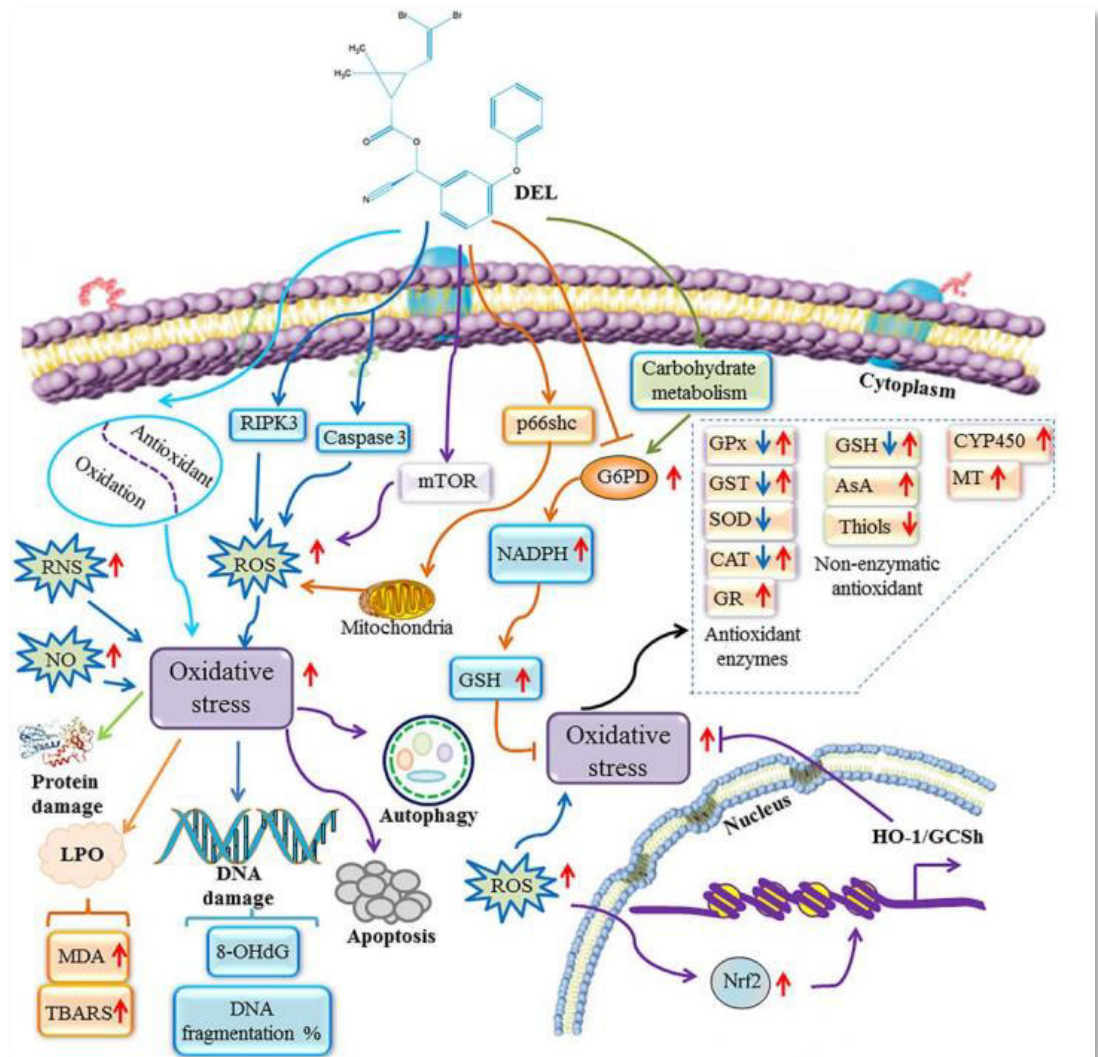


Figura 3. Estrés oxidativo celular inducido por piretroides (deltametrin). (40)

B. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada ocurre en un momento específico del desarrollo embrionario y también en los tejidos adultos. Los tejidos se remodelan mediante apoptosis bajo control genético sin dañar el tejido circundante. Tanto la mitosis (proliferación) como la apoptosis, durante la formación de los tejidos, están reguladas genéticamente (41). Sin embargo, los mecanismos que regulan la apoptosis pueden ser alterados por diferentes tipos de noxas como fármacos, productos químicos, luz UV, y otros muchos agentes externos. Es así que esta alteración también es ocasionada por productos químicos como los piretroides (4,42).

La vía Nrf2/ARE juega un papel protector en varias enfermedades del SNC (43) porque tiene un efecto protector frente a la apoptosis en neuronas corticales; sin embargo, este efecto protector es muy limitado. Respecto a la apoptosis, se ha evidenciado que el piretroide cipermetrin de forma dosis-dependiente incrementó la tasa de apoptosis en neuronas corticales. Además, cuanto mayor sea el tiempo de exposición, mayor será la tasa de apoptosis. El tratamiento con cipermetrin durante 24 y 48 h aumentó drásticamente la tasa de apoptosis; mientras tanto, la expresión de Nrf2 y la de los genes HO-1 y NQO1 también fueron fuertemente regulados negativamente. El nivel de proteína nuclear Nrf2 en neuronas corticales disminuyó gradualmente con un aumento en la dosis de exposición a cipermetrin por 24 y 48 h de tratamiento. Además, las proteínas HO-1 y NQO1 reguladas por Nrf2 también disminuyeron en estas condiciones. Por lo tanto, cipermetrin es capaz de inhibir la vía Nrf2/ARE y disminuir la actividad del sistema antioxidante contra el daño oxidativo, un posible mecanismo de lesión de las neuronas corticales.

En conclusión, la vía de señalización Nrf2/ARE tiene un efecto protector limitado en la apoptosis inducida por cipermetrin en las neuronas corticales de ratón C57BL/6. La activación de la vía Nrf2/ARE depende de la dosis de exposición y el período de exposición del cipermetrin, cuando la dosis de exposición de CYP

es baja o el tiempo de exposición es corto, la vía Nrf2/ARE puede proteger las neuronas hasta cierto punto. Cuando la dosis de exposición de cipermetrin es alta o el tiempo de exposición es largo, se inhibe la activación de la vía de señalización Nrf2/ARE y no se puede ejercer su efecto neuroprotector (44).

Así mismo, también se ha evaluado el efecto de cipermetrin *in vitro* en células SH-SY5Y, donde se pudo observar cambios en la expresión génica de 84 biomarcadores de autofagia y necrosis inducidas por estrés oxidativo que incluso pueden provocar daños en el ADN (4).

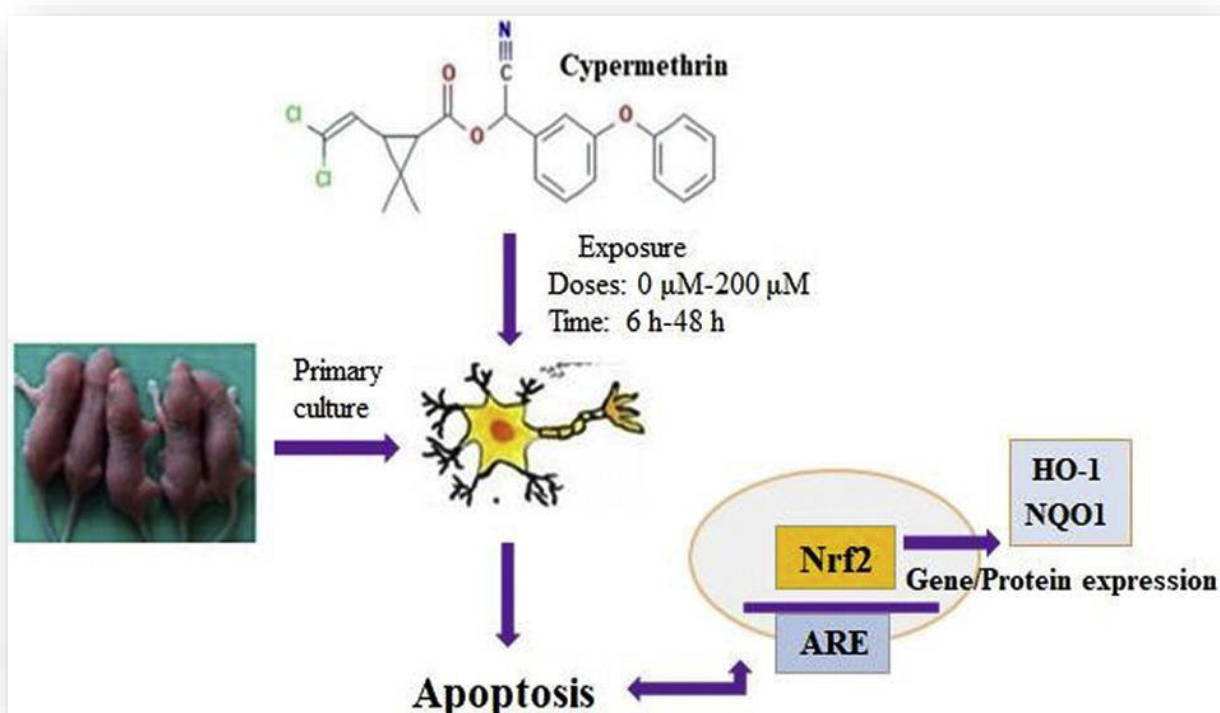


Figura 4. Efecto apoptótico de los piretroides (cipermetrin) (44)

C. Reguladores de muerte celular

La apoptosis es el proceso por el cual una célula deja de crecer y dividirse y, en cambio, entra en un proceso que finalmente da como resultado la muerte

controlada de la célula sin la salida del contenido en el entorno circundante. La apoptosis también se denomina a veces muerte celular programada (o más coloquialmente, "suicidio celular"). El inicio de la apoptosis depende de la activación de una serie de proteasas cisteína-aspárticas conocidas como caspasas. Hay dos categorías de caspasas, las caspasas iniciadoras y las caspasas verdugos (45). Una vez que se detecta el daño celular, las caspasas iniciadoras (caspasas 8 y 9) se activan a partir de las procaspasas inactivas y pasan a activar las caspasas ejecutoras (caspasas 3, 6 y 7). La activación de las caspasas ejecutoras inicia una cascada de eventos que resulta en la fragmentación del ADN a partir de la activación de endonucleasas, la destrucción de las proteínas nucleares y el citoesqueleto, el entrecruzamiento de proteínas, la expresión de ligandos para las células fagocíticas y la formación de cuerpos apoptóticos (46,47).

En términos generales, la apoptosis se puede distinguir de la forma no programada de muerte celular: necrosis, tanto visualmente bajo el microscopio como mediante diversas técnicas de biología molecular; incluida la citometría de flujo con tinción con anexina V-FITC y ensayos de fragmentación del ADN. En la apoptosis, los cuerpos apoptóticos que contienen el contenido de la célula muerta pueden ser fagocitados por las células circundantes, aunque este comportamiento se observa principalmente en cultivos celulares (45), las células como los macrófagos a menudo eliminan las células apoptóticas antes de que se fragmenten. Esto da como resultado una contención del tejido lesionado y, como resultado, reduce el riesgo de daño colateral a las células circundantes.

Dos vías distintas, pero en última instancia convergentes, inician la apoptosis (48): la vía intrínseca o de células de linfoma B-2 (BCL-2) y la vía extrínseca o del receptor de muerte celular.

La vía mitocondrial se inicia durante el desarrollo limitando de los niveles de factores de crecimiento, estrés metabólico, falta de soporte neurotrófico, falta de

flujo sanguíneo o pérdida de adhesión al sustrato y en enfermedad, o escenarios experimentales por daño del ADN y diversos agentes citotóxicos. La respuesta a estos estímulos está regulada por miembros de la familia de proteínas BCL-2 (49).

En respuesta a los estímulos que inducen la muerte, los miembros proapoptóticos de la familia (BIM, PUMA, BID, BMF, NOXA, BIK, BAD y HRK; denominadas colectivamente BH3 dominio 3 de homología de BCL-2) inhiben a los miembros de la familia antiapoptóticos BCL-2 (BCL-2, MCL-1, BCL-XL, BCL-W y A1/BFL-1) (49,50). Una vez activados, BAX y BAK forman poros dentro de la membrana externa mitocondrial, lo que conduce a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) y la liberación de citocromo C y otros factores apoptogénicos de las mitocondrias al citoplasma. El citocromo C se asocia con APAF-1 y caspasa-9 para formar el apoptosoma y esto estimula la activación de la caspasa-9, que a su vez escinde y, por lo tanto, activa el efector caspasa-3, -6 y -7. Estas caspasas efectoras escinden cientos de proteínas y, en ciertos casos, activan o inhiben proteolíticamente otras enzimas. Esto incluye la activación de endonucleasas que impulsan la fragmentación del ADN y la inhibición de flipasas. Estos procesos conducen a la condensación de la cromatina y al empaquetamiento del contenido celular en cuerpos apoptóticos y a la eliminación por fagocitosis.

En la vía del receptor de muerte celular, la apoptosis se inicia por la unión de ciertos miembros de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) a sus receptores afines que pertenecen a la familia del receptor de TNF (TNFR) (en particular, la unión del ligando FAS [FASL] a su receptor FAS. Esto puede poner en marcha dos series diferentes de eventos: si está disponible, se activa pro-caspasa-8, que activa directamente el efector caspasa-3, -6 y -7. Si la caspasa-8 está ausente o está inhibida, se puede iniciar otra forma de muerte celular regulada, denominada necroptosis a través de la serina/treonina-proteína quinasa

1 que interactúa con el receptor (RIPK1), RIPK3 y pseudoquinasa similar al dominio de quinasa de linaje mixto (MLKL). (51),

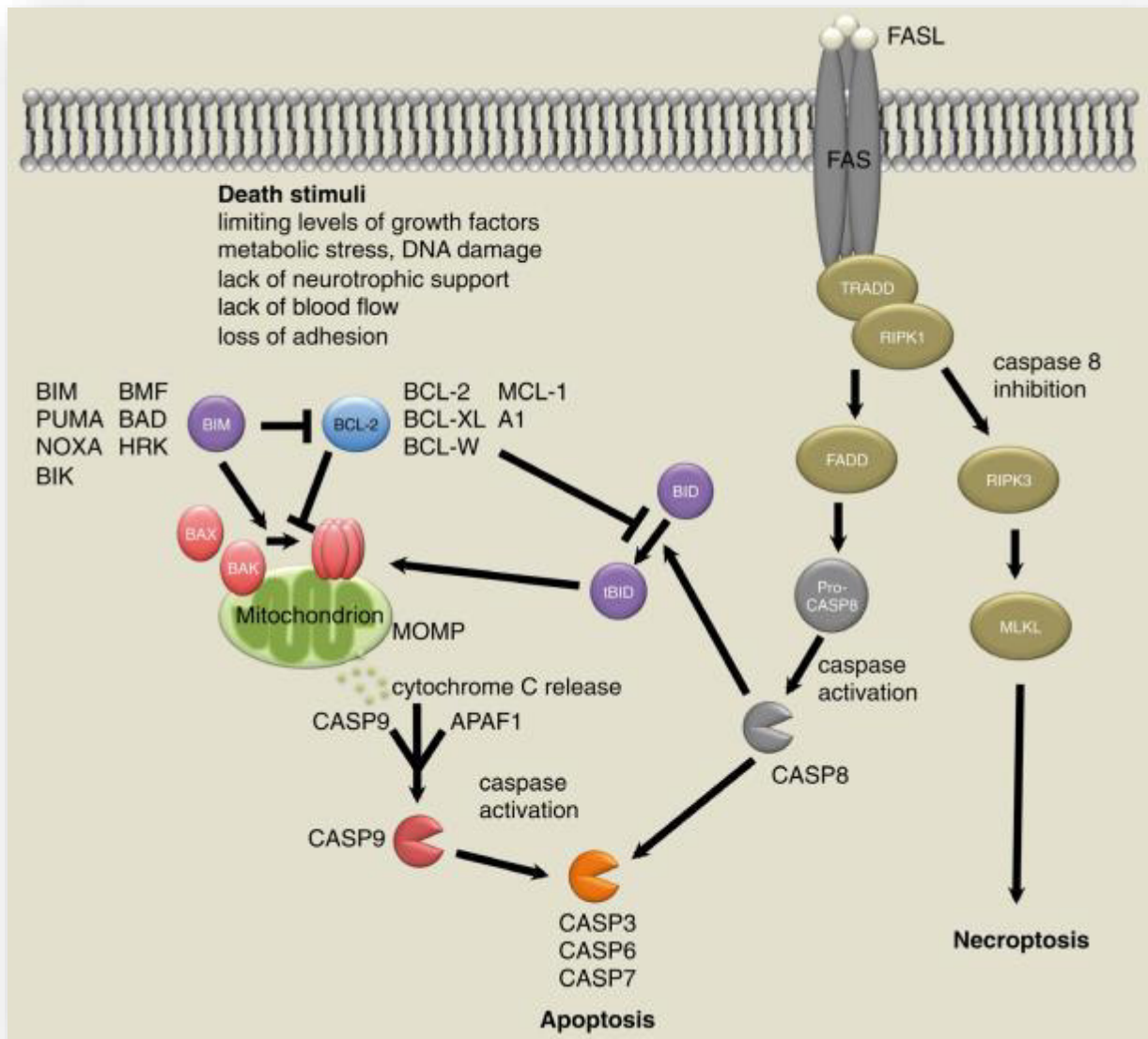


Figura 5. Vías de señalización de apoptosis. (52)

D. Complejo inflammasoma

Los inflammasomas son grandes complejos multimoleculares mejor conocidos por su capacidad para controlar la activación de la enzima proteolítica caspasa-1 (53). La caspasa-1 a su vez regula la maduración proteolítica de la interleucina-1 β e IL-18, así como una forma inflamatoria rápida, nociva e inflamatoria denominada piroptosis (54). El ensamblaje de complejos de inflammasomas depende de la detección citosólica de patrones moleculares asociados a patógenos que ingresan al citosol durante una infección microbiana. Además, las señales de peligro endógenas (patrones moleculares asociados al peligro) liberadas por las células dañadas o moribundas también activan los inflammasomas e impulsan la inflamación patológica en enfermedades inflamatorias estériles como la aterosclerosis, la enfermedad de Alzheimer, la diabetes y el cáncer (55).

Se han identificado varios inflammasomas distintos, cada uno diferenciado por activadores únicos, miembros de la familia NLR/ALR y efectores de caspasa. El complejo inflammasoma clásico o canónico consta de un sensor citosólico, una proteína adaptadora ASC y un efector pro-caspasa-1 (56). ASC es una molécula bipartita que contiene tanto un dominio de pirina N-terminal (PYD) como un dominio de activación y reclutamiento de caspasa C-terminal (CARD), lo que le permite unir los sensores (NLR/ALR) y el efector pro-caspasa-1. La pro-caspasa-1 se activa posteriormente, lo que conduce a la escisión de pro-IL-1 β y pro-IL-18 y a la generación de citocinas maduras biológicamente activas.

Aunque se aprecia bien la capacidad de los inflammasomas para controlar la maduración dependiente de la caspasa-1 de IL-1 β e IL-18, así como la muerte celular, también se han descrito varias funciones efectoras adicionales mucho menos bien caracterizadas de los complejos inflammasomas (57).

La exposición a tóxicos ambientales da como resultado daños en órganos específicos y enfermedades autoinmunes, en su mayoría mediadas por respuestas inflamatorias. Se ha descubierto que el inflammasoma NLRP3 es el principal

iniciador de la inflamación patológica. Se ha descubierto que los tóxicos ambientales pueden activar todas las señales necesarias para una respuesta mediada por NLRP3. La activación exagerada del inflamasoma NLRP3 y su producto final IL-1 β , es responsable de la patogénesis causada por muchos tóxicos ambientales, incluidos los plaguicidas, contaminantes orgánicos, metales pesados y compuestos cristalinos. Por lo tanto, un estudio extenso de estos productos químicos y sus mecanismos de activación del inflamasoma puede proporcionar la evidencia científica para un posible objetivo de esta vía, al proponer posibles agentes protectores que previamente se ha demostrado que afectan los compartimentos del inflamasoma y su activación. Por ejemplo: la melatonina y los ácidos grasos poliinsaturados se encuentran entre los más seguros y estudiados de estos agentes, que afectan a una amplia variedad de procesos celulares y fisiológicos. Se ha demostrado que estas moléculas suprimen el inflamasoma NLRP3 principalmente a través de la regulación del estado redox celular y la vía del factor nuclear κ B (NF- κ B), lo que las convierte en compuestos potencialmente prometedores para superar el daño orgánico mediado por tóxicos ambientales (58).

NLRP3 es un receptor de reconocimiento de patrones, que detecta señales de peligro mediante la formación de un complejo proteico citoplasmático, el llamado NLRP3-inflamasoma. Esta vía se activa durante la exposición a una amplia gama de compuestos que incluyen tóxicos ambientales, patógenos, moléculas de peligro endógenas, ATP y estructuras cristalinas. La activación del inflamasoma requiere dos señales, incluida la señal mediada por receptores tipo Toll (TLR) seguida de la activación de NF- κ B y la regulación ascendente posterior de pro IL-1 β , lo que da como resultado el ensamblaje del inflamasoma NLRP3. Esto conduce a la conversión de la procaspasa 1 en su forma activa. Los tóxicos ambientales pueden inducir procesos inflamatorios a través de la activación de los inflasomas. Algunos tóxicos pueden interactuar con los TLR y pueden mediar la translocación de NF- κ B, la disfunción mitocondrial, la generación excesiva de ROS y la alteración lisosómica seguida de la liberación

de cathepsina B que desencadenarán muerte celular. Finalmente, se sugiere que la melatonina y los PUFA serían agentes terapéuticos prometedores frente a patologías provocadas por toxicidades ambientales, que se deben principalmente a la activación exagerada de INF y la posterior respuesta inflamatoria (58).

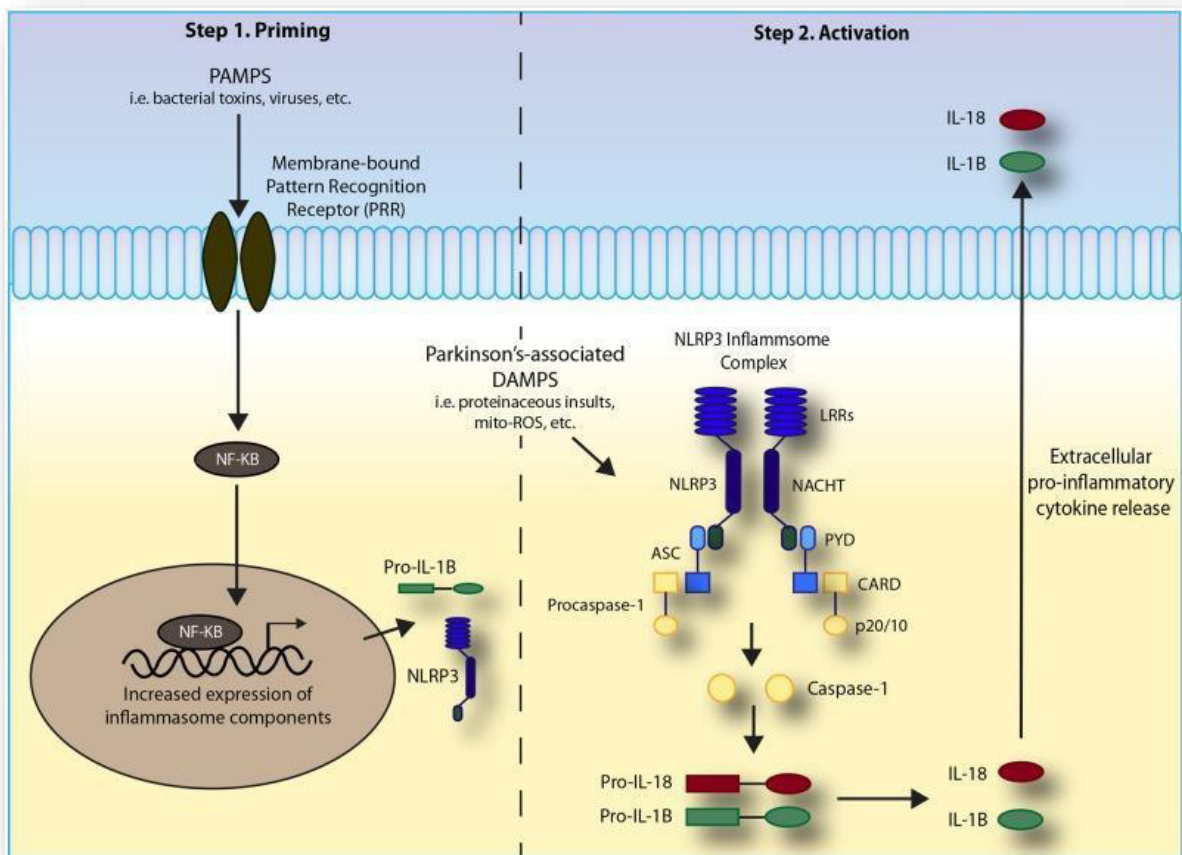


Figura 6. Mecanismo de ensamblaje del inflammasoma-NLRP3. (59)

Se requieren dos pasos principales para la formación del complejo del inflammasoma-NLRP3. Tras la activación, NF-κB se transloca al núcleo donde aumenta la expresión de proteínas relacionadas con el inflammasoma, incluidas la pro-IL-1B y NLRP3. Se requiere un segundo estímulo para la formación del complejo inflammasoma-NLRP3. Recientemente se ha identificado que los estímulos incluyen las ROS mitocondriales. Estructuralmente la proteína

NLRP3 se compone de tres dominios principales: un dominio efector de pirina amino-terminal (PYD), un dominio de unión de nucleótidos central (NACHT) y un residuo conservado rico en leucina carboxi-terminal (LRR). Una vez formado, este complejo puede interactuar con el PYD, con el dominio de reclutamiento de caspasa C-terminal (ASC). La pro-caspasa-1 se autoactiva cuando se une a NLRP3 oligomerizado, lo que resulta en la escisión en los fragmentos p10 y p20 de la caspasa-1. Estos fragmentos activos escinden y posteriormente activan las citocinas proinflamatorias pro-IL-1B y pro-IL-18. Una vez activadas, estas citocinas se transportan fuera de la célula donde pueden actuar de manera proinflamatoria (59).

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1. Tipo de Investigación

El presente trabajo es un estudio experimental, realizado con 6 experimentos independientes en células de neuronales humanas SH-SY5Y

3.2. Consideraciones éticas

Al ser un estudio *in vitro* con células neuronales, no implica en ningún momento el uso de animales experimentales u otro modelo que deba ser sometido a un comité de ética.

3.3. Diseño metodológico

Materiales y métodos

A. *Cultivo celular*

La línea celular neuronal SH-SY5Y fue adquirida de European Collection of Authenticated Cell Cultures (Sigma-Aldrich, USA). Las células se mantendrán en medio DMEM-F-12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor, conteniendo 100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Los cultivos se realizarán inicialmente en flask de 25 mL conteniendo medio de cultivo suplementado y a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂. Para los ensayos, las células SH-SY5Y se subcultivarán en placas de 96 pocillos negras, blancas o transparentes según el ensayo. Las células serán tratadas con la solución estándar de aletrin.

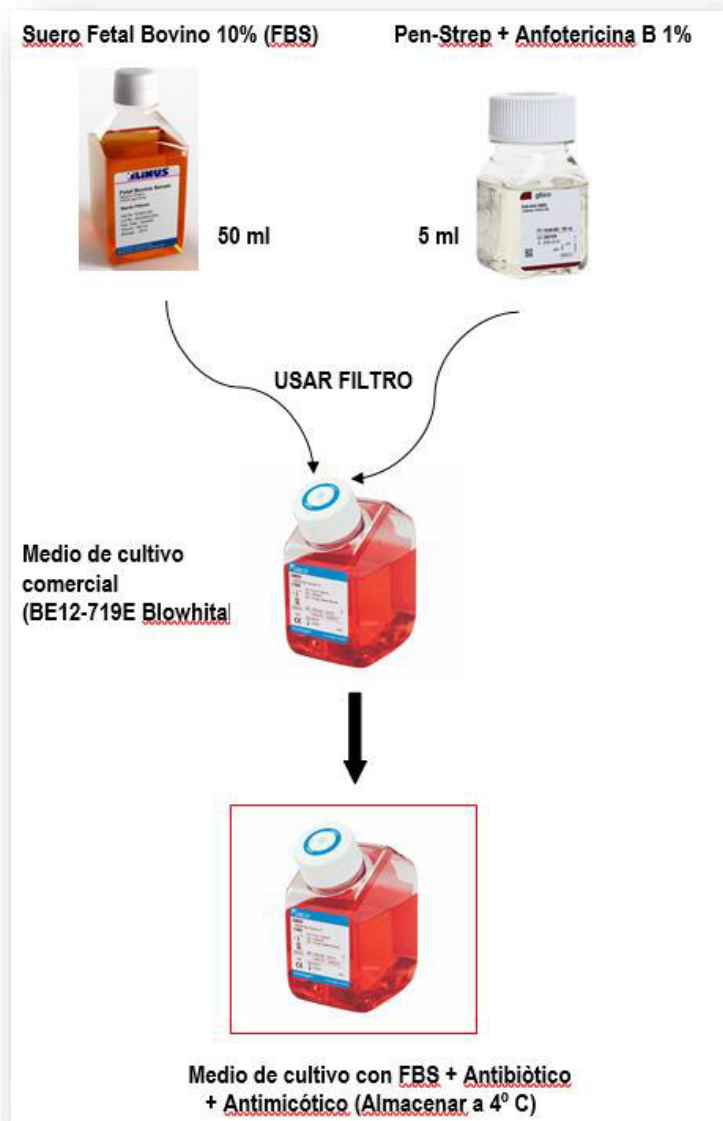


Figura 7. Preparación del medio de cultivo DMEM-F12 al 10% SFB.

B. Ensayo de peroxidación lipídica, niveles de malonadehído (MDA)

Las células al ser expuestas a alguna noxa como los agentes químicos, internamente generan mayor cantidad de radicales libres, estas moléculas principalmente ROS induce la degradación de los lípidos de las membranas celulares cuyo producto principal es el MDA. En nuestro estudio esta determinación se lleva a cabo de la siguiente forma: Las células neuronales SH-SY5Y fueron cultivadas en placas de 6

pocillos e incubadas con diferentes concentraciones de estándar de aletrín (0.1-200 μM), se determinó la actividad del MDA como producto secundario de los procesos de peroxidación lipídica. Mediante el uso de ácido tiobarbitúrico en condiciones de pH bajo y temperaturas altas, originando un compuesto de tono rosado cuantificable espectrofotométricamente a 532nm (32).

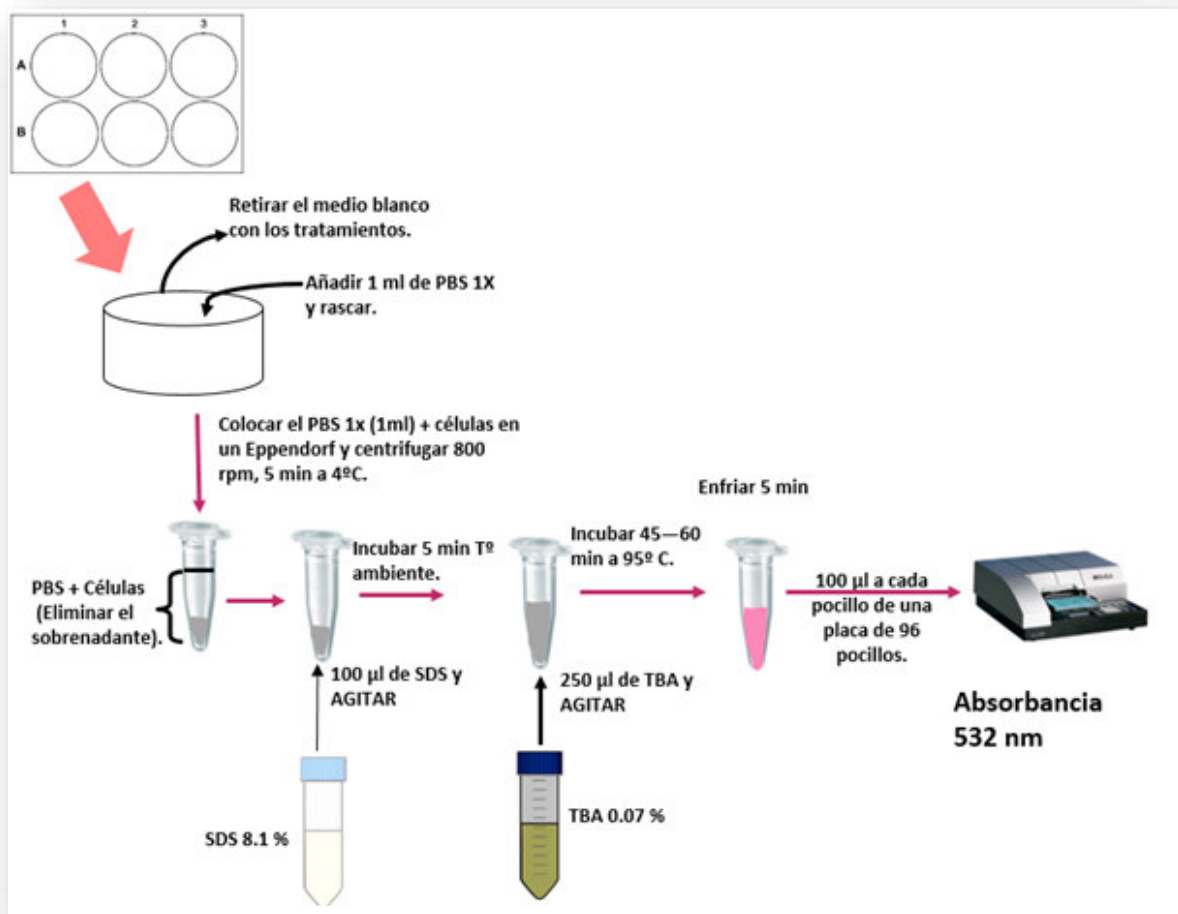


Figura 8. Protocolo para la determinación de los niveles de MDA en células SH-SY5Y por efecto del piretroide aletrín.

C. Evaluación de estrés oxidativo, producción de óxido nítrico (NO) intracelular

Las células neuronales SH-SY5Y fueron cultivadas en placas negras de 96 pocillos e incubadas con el piretroide aletrín (0.1-200 μM) por 24h. Luego, 10 μM de la sonda

fluorescente 4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluoresceína Diacetato (DAF-FM-DA) será adicionado a los pocillos por 30 minutos a 37°C. Posteriormente comenzará la oxidación de DAF-FM-DA por oxidantes intracelulares y se producirá la emisión de fluorescencia. La generación de NO intracelular será evaluada en un lector de microplaca de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 495 nm y una longitud de onda de emisión de 515 nm (Biotek, USA).

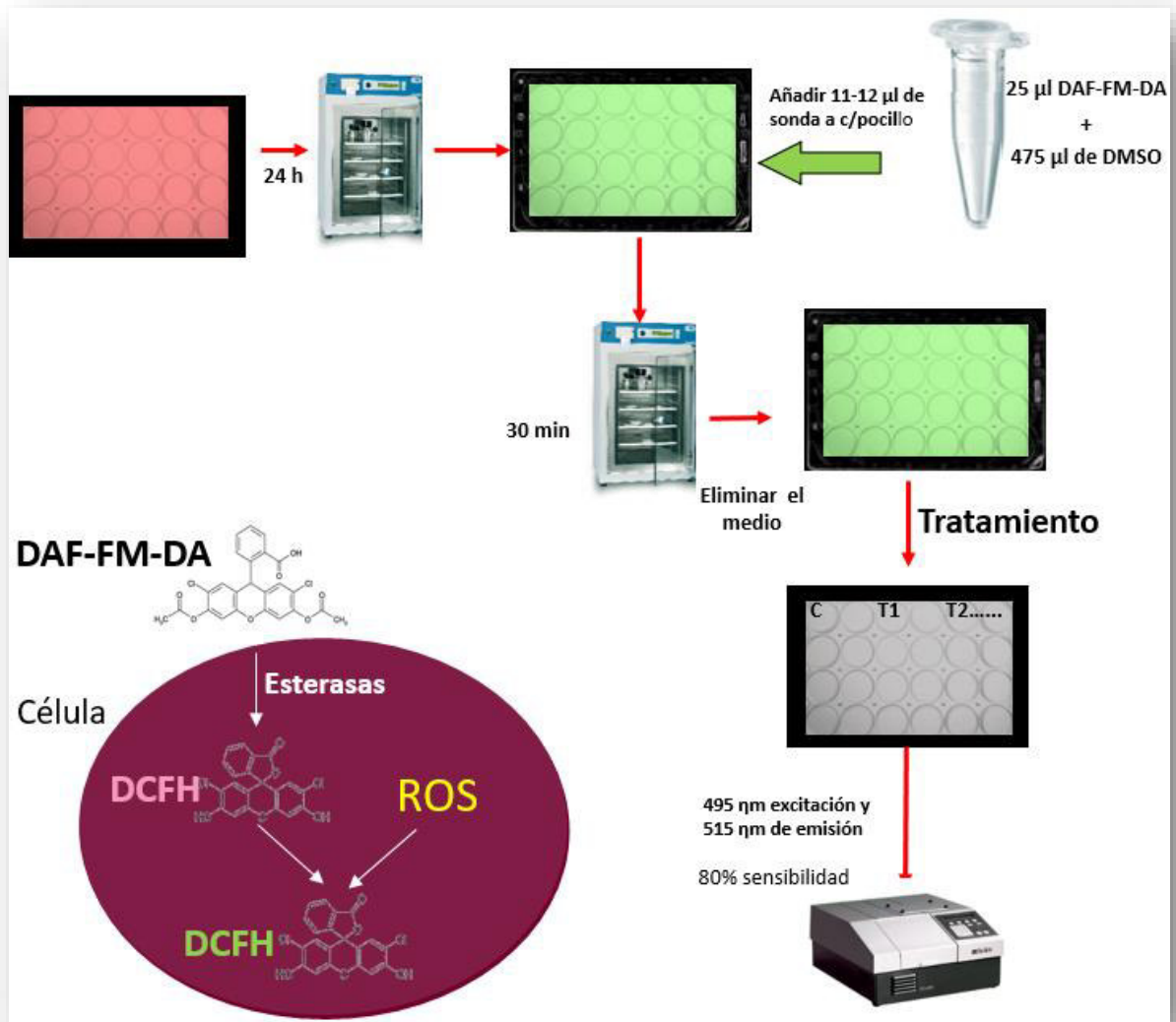


Figura 9. Protocolo para la determinación de los niveles de NO intracelular en células SH-SY5Y por efecto del piretroide aletrin.

D. Actividad apoptótica (ensayo de actividad de caspasa 3/7)

La apoptosis es un proceso de muerte celular que implica un aumento de la actividad de las enzimas caspasas 3 y 7, este proceso de apoptosis es un mecanismo celular de auxilio frente a diversos daños químicos o por patógenos. En nuestro estudio las células neuronales SH-SY5Y (15×10^3 células por pocillo) fueron sembradas en placa blanca de 96 pocillos y expuestas al piretroide aletrin ($0.1-200 \mu\text{M}$) durante 24 h. Después de los tratamientos, el kit de caspasa 3/7 se preparo de acuerdo con las pautas del fabricante. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, se añadió $50 \mu\text{l}$ del kit de caspasa 3/7 a $50 \mu\text{l}$ de medio de cultivo que contenía las células tratadas previamente en cada pocillo. Después de agitar la placa a 350 rpm durante 30 segundos, se incubó con la sonda de caspasa 3/7 por un período adicional de 60 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad para estabilizar la señal antes de la medición de luminiscencia con el luminómetro. La luminiscencia se determinó en un lector de microplacas (FLx800, BioTek) (3).



Figura 10. Protocolo del ensayo de actividad de caspasa 3/7 en células neuronales SH-SY5Y por efecto del piretroide aletrin.

E. Expresión de genes relacionados al complejo inflamasoma

Los inflamasomas son un grupo de oligómeros protéicos multiméricos que activan mediadores proinflamatorios como las citocinas en respuesta a infecciones y daño tisular; son parte del sistema inmunológico innato y desencadenan una respuesta inflamatoria mediante la activación de caspasas.

Las células neuronales SH-SY5Y fueron expuestas a una dosis única de 50 μ M de aletrin por 24 horas. Tras el tratamiento, las fueron retiradas de los flasks con PBS buferado, luego por centrifugación se obtuvo el pellet que fue sometido a **extracción de RNA total** mediante el KIT., para la extracción se usó las especificaciones del fabricante. El **cDNA** se obtuvo a partir de 5ug de ARN total por transcripción inversa utilizando el kit RT2 First Strand (Qiagen, USA), en este caso, la síntesis de cDNA se obtuvo siguiendo las especificaciones del fabricante. **La PCR a tiempo real (qPCR)**, se realizó con el uso de cDNA, agua libre de nucleasas, primers específicos (NLRP3, PYCD1, Casp-1), sonda fluorescente SYBR Green qPCR, el análisis cuantitativo se realizó mediante un termociclador a tiempo real BioRad CFX, usando el master mix RT2 (Qiagen, USA), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Los parámetros del termociclador son 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95° por 15 segundos y 60°C por 1 minuto (3) (60).

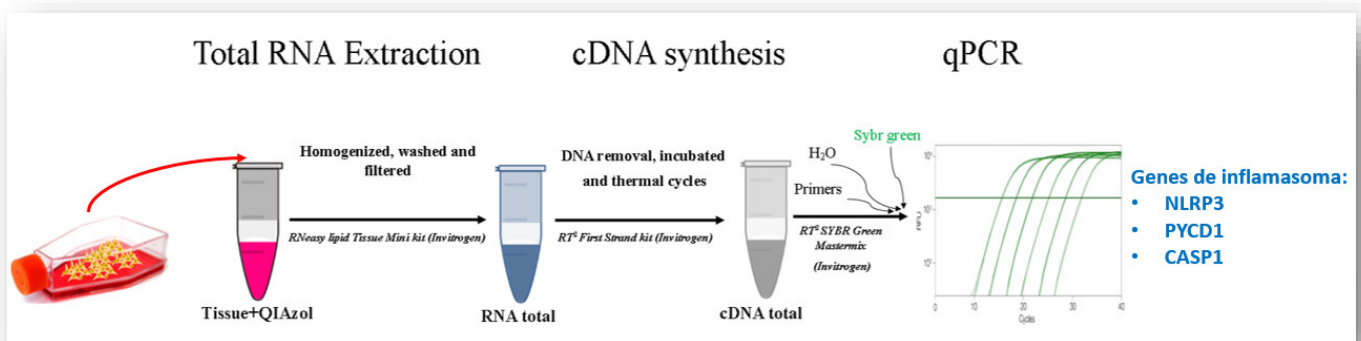


Figura 11. Protocolo de extracción de RNA, síntesis de cDNA y cuantificación molecular a tiempo real de genes involucrados en la activación del complejo inflamasoma en células neuronales SH-SY5Y por efecto de aletrin a 50 μ M.

F. Materiales y reactivos

<i>Reactivos y kits</i>	<i>Materiales</i>
Medio de cultivo DMEM-F12 (rojo fenol) de Dubelco	Pipetas Pasteur
Medio de cultivo DMEM-F12 (sin rojo fenol) De Dubelco	Flask 25 mL
Penicilina-estreptomocina con anfotericina B de Sigma-Aldrich, St Louis, MO 63103, EE. UU	Microplacas blancas 96
Reactivo SYBR GREEN Green qPCR (Qiagen, EE. UU)	Microplacas 96 PCR
Reactivo síntesis cDNA	Microplacas 6 pocillos
Tripsina frasco x 0.05%	Microplacas negras 96
Suero Fetal Bovino 500 mL de Sigma-Aldrich, St Louis, MO 63103, EE. UU	Tubos cónicos de 15 mL
Hidroperóxido de Tert-Butilo frasco 100 mL	Tubos cónicos de 50 mL
L-glutamina, frasco 200 mM	Rascadores celulares
Azul de Tiazolil Tetrazolio Bromuro	Rack para tubos de 1,5 mL
Reactivo para extracción de RNA Trizol Reagent (Invitrogen, EE. UU).	Puntas de pipeteo 1-1000 uL
Ácido tiobarbitúrico de Cell Biolabs Inc., EE. UU	Micropipetas 0.5-1000 uL
Buffer fosfato	Tubos cónicos de 1,5 mL
Kit de casapsa 3/7 Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 de Promega Corporation, Madison, WI, EE. UU	Crioviales de 2 mL

Agua libre de nucleasas	Filtros de 0.40 μ m
Agua ultrapura	Jeringas de 10 mL
Primers	Papel secante
DAF-FM-DA de Sigma-Aldrich, EE. UU	Cintas de autoclavado
Dimetil sulfóxido de Sigma-Aldrich, St Louis, MO 63103, EE. UU	Puntas cónicas azules

G. Equipos

Incubadora de CO₂,
 Termociclador a tiempo real BioRad CFX (Biorad, EE. UU.),
 Espectrofluorimetro FLx800, BioTek, EE. UU
 Lector de microplacas ELx800 BioTek, EE. UU
 Baño Maria
 Cabina de flujo laminar
 Balanza analítica
 Centrífuga refrigerada
 Refrigeradora/congeladora

3.5. Población de estudio

Cultivos celulares neuronales humanas SH-SY5Y de European Collection of Authenticated Cell Cultures (Sigma-Aldrich, USA). Estudio puede ser extrapolado a situaciones de neurotoxicidad *in vivo* en humanos.

El origen de la línea celular, es el neuroblastoma, originalmente derivado de una biopsia de tumor óseo metastásico, las células SH-SY5Y son una sublínea parental de la línea SK-N-SH, fueron depositadas en la ATCC en 1970 por June L. Biedler. Se deben considerar tres características al realizar estudios *in vitro*, en primer lugar, los cultivos incluyen células adherentes como flotantes, ambos viables, la mayoría de los estudios informados utilizan poblaciones adherentes y descartan las células flotantes durante los cambios de medios. En segundo lugar, las células contienen dos fenotipos

morfológicamente distintos: tipo neuroblasto y tipo epitelial, que corresponden a los tipos “N” y “S”. Finalmente, la línea SH-SY5Y se puede diferenciar en un fenotipo similar a una neurona más madura

3.6. Muestra de estudio

Cultivos celulares neuronales SH-SY5Y (ATCC® CRL2266™) de European Collection of Authenticated Cell Cultures (Sigma-Aldrich, USA)

3.7. Criterios de selección

3.7.1. Criterios de inclusión

Línea celular SH-SY5Y

Las células deben tener igual número de pases (< a 15)

Células sin contaminación microbiológica

3.7.2. Criterios de exclusión

Los cultivos de células que tienen distintos números de pases

Células con contaminación microbiológica

3.8. Instrumento de recolección de datos

Fichas de recolección de datos elaboradas por el tesista, Lector de ELISA, Software Origin Pro 9.0, GraphPad Prism 6.0, Lector de microplacas fluorescentes, Luminómetro

3.9. Procesamiento de los datos

Los datos son representados por la media \pm desviación estándar. La prueba estadística usada fue el análisis de varianza de una vía (ANOVA), mejorando el poder de la prueba por el uso de Tukey's test post hoc ($p < 0.05$). Los datos son los resultados de 6 experimentos independientes para cada ensayo. El software usado para el análisis estadístico GraphPad Prism 6.0.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

Para evaluar la peroxidación lipídica se ha utilizado el ensayo de MDA. Las absorbancias obtenidas determinan los niveles de MDA (μM) y representadas como medias \pm desviación estándar. En las células SH-SY5Y, tras un período de incubación de 24 horas con aletrin (1-200 μM), se observó un incremento dosis-dependiente de los niveles de MDA en comparación con el grupo vehículo (Figura 12), desde la dosis de 25 μM de aletrin. Los niveles de MDA se incrementaron a 25 μM (44 %, $*P<0.05$), 50 μM (50%, $**P<0.01$), 100 μM (160%, $***P<0.001$), 200 μM (255%, $***P<0.001$) aletrin.

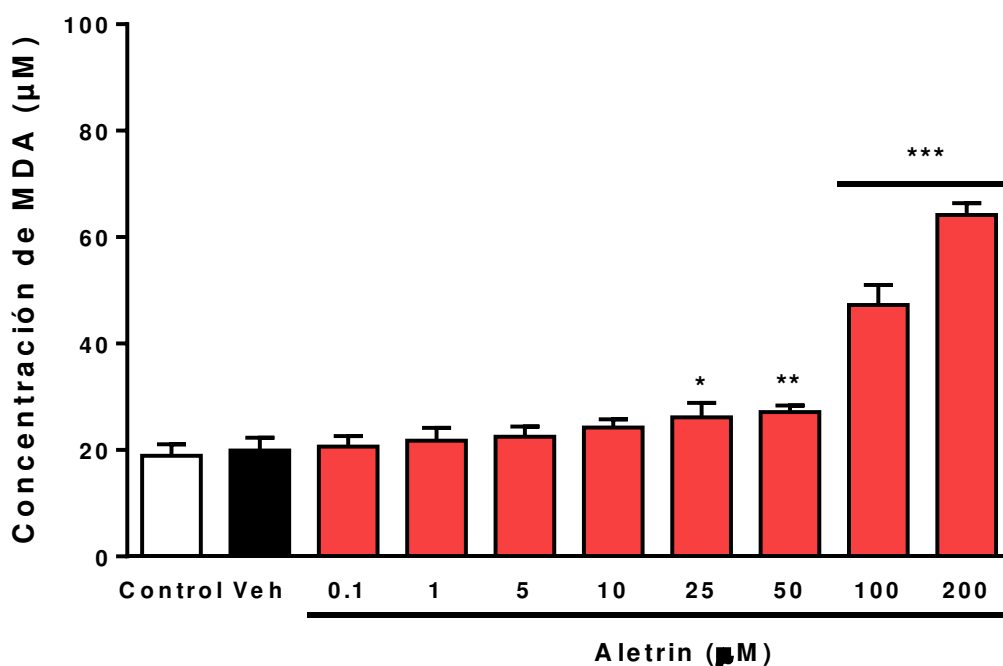


Figura 12. Peroxidación lipídica, niveles de MDA inducidos por aletrin (1-200 μM) tras 24 horas de exposición en células SH-SY5Y. Los datos se representan como la media \pm DE, de seis experimentos independientes. La significancia entre los grupos y frente al vehículo se determinó por ANOVA- Tukey pos hoc, $*P<0.05$, $**P<0.01$ y $***P<0.001$.

Para evaluar el estrés oxidativo se ha utilizado el ensayo fluorescente en la medición de NO intracelular. Los valores de la fluorescencia (unidades arbitrarias de fluorescencia) fueron normalizados respecto al control (100%) y representados como medias \pm desviación estándar. En las células SH-SY5Y, tras un período de incubación de 24 horas con aletrin (1-200 μ M), se observó un incremento dosis-dependiente de los niveles de NO intracelular en comparación con el grupo vehículo (Figura 13), desde la dosis de 50 μ M de aletrin. Los niveles de NO intracelular se incrementaron a 50 μ M (9%, $**P<0.01$), 100 μ M (103%, $***P<0.001$), 200 μ M (135%, $***P<0.001$) de aletrin.

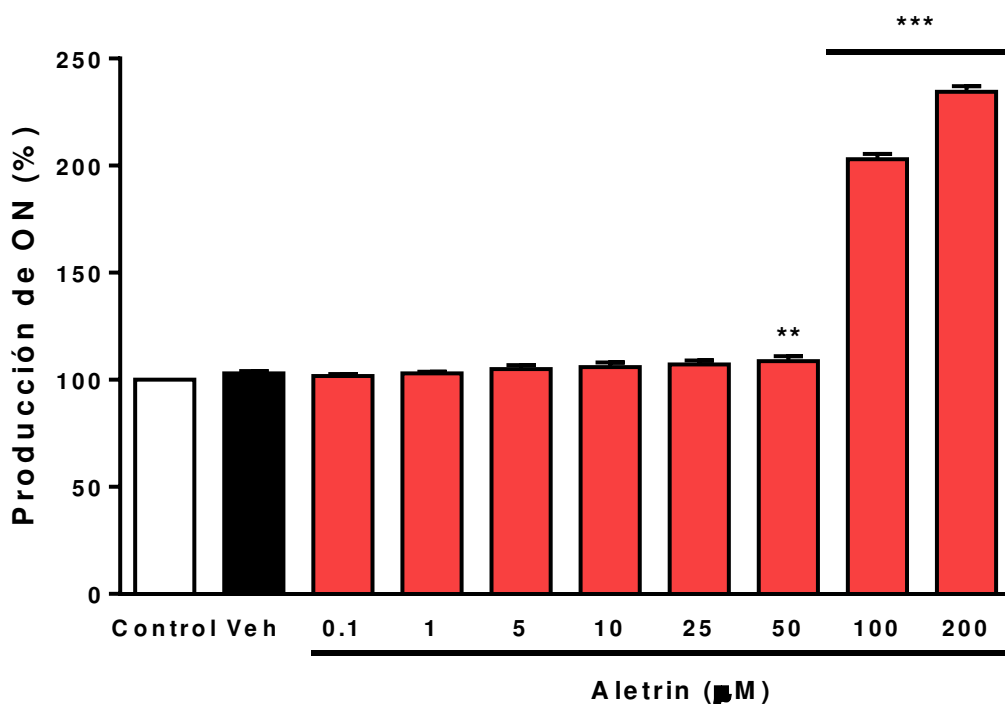


Figura 13. Estrés oxidativo, niveles de NO intracelular inducidos por aletrin (1-200 μ M) tras 24 horas de exposición en células SH-SY5Y. Los datos se representan como la media \pm DE, de seis experimentos independientes. La significancia entre los grupos y frente al vehículo se determinó por ANOVA- Tukey pos hoc, $**P<0.01$ y $***P<0.001$.

Para evaluar la apoptosis celular se ha utilizado el ensayo de luminiscencia de la actividad de la enzima caspasa 3/7. Los valores de la luminiscencia (unidades arbitrarias de luminiscencia) fueron normalizados respecto al control (100%) y representados como medias \pm desviación estándar. En las células SH-SY5Y, tras un período de incubación de 24 horas con aletrin (1-200 μ M), se observó un incremento dosis-dependiente de los niveles de la actividad caspasa 3/7 en comparación con el grupo vehículo (Figura 14), desde la dosis de 50 μ M de aletrin. La actividad de caspasa 3/7 se incrementó a 50 μ M (112%, * P <0.05), 100 μ M (118%, *** P <0.001), 200 μ M (121%, *** P <0.001) de aletrin.

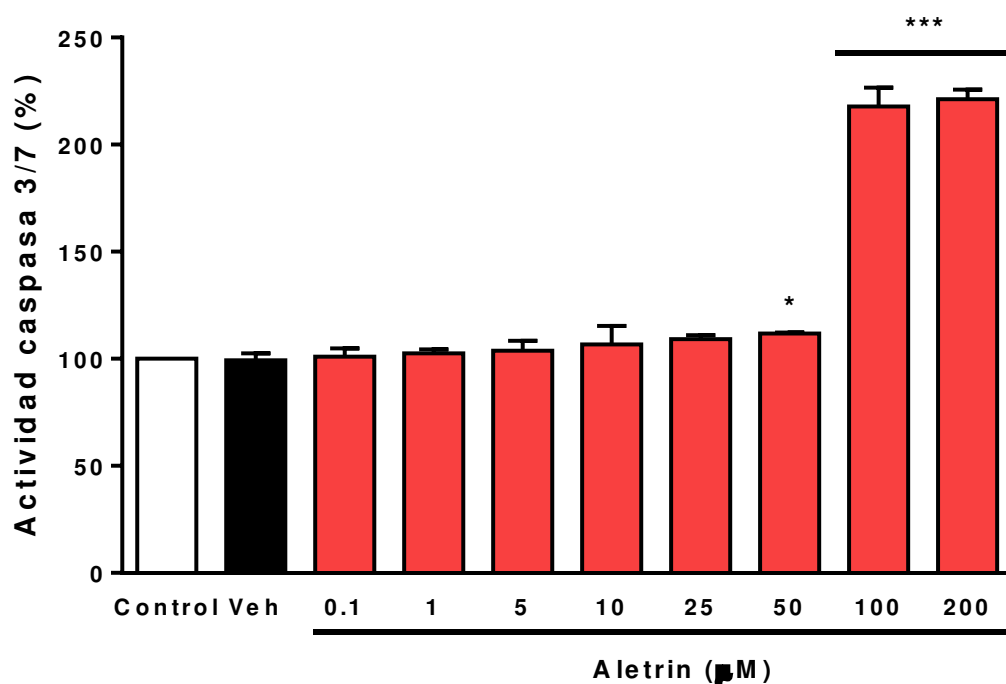


Figura 14. Apoptosis celular, actividad de la enzima caspasa 3/7 inducida por aletrin (1-200 μ M) tras 24 horas de exposición en células SH-SY5Y. Los datos se representan como la media \pm DE, de seis experimentos independientes. La significancia entre los grupos y frente al vehículo se determinó por ANOVA- Tukey pos hoc, * P <0.05 y *** P <0.001.

La activación del complejo inflammasoma fue determinado a partir del análisis de la expresión molecular de 3 genes (NLRP3, PYCD1 y CASP1) estrechamente ligados con este complejo. Los valores de la cuantificación de la amplificación de las cadenas de cDNA (Rt) fueron normalizados mediante la fórmula de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ y respecto al control en base al “fold-change” y representados como medias \pm desviación estándar. En las células SH-SY5Y, tras un período de incubación de 24 h con aletrín a 50 μ M, se observó un incremento de la expresión génica del gen NLRP3 en 1.6 veces respecto al vehículo ($***P<0.001$) (Figura 15); PYCD1 en 1.5 veces respecto al vehículo ($***P<0.001$) (Figura 16); y CASP1 en 2.5 veces respecto al vehículo ($***P<0.001$) (Figura 17).

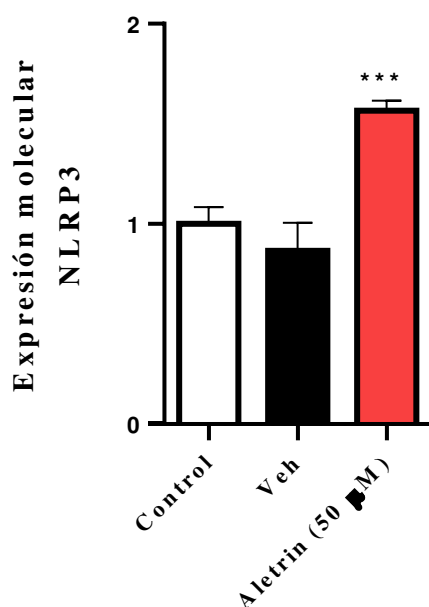


Figura 15. Activación del complejo inflammasoma, expresión molecular de NLRP3 inducida por aletrín a 50 μ M) tras 24 horas de exposición en células SH-SY5Y. Los datos se representan como la media \pm DE, de seis experimentos independientes. La significancia entre los grupos y frente al vehículo se determinó por ANOVA- Tukey pos hoc, $***P<0.001$.

Figura 16. Activación del complejo inflammasoma, expresión molecular de PYCD1 inducida por aletrín a 50 μ M) tras 24 horas de exposición en células SH-SY5Y. Los datos se representan como la media \pm DE, de seis experimentos independientes. La significancia entre los grupos y frente al vehículo se determinó por ANOVA- Tukey pos hoc, *** $P < 0.001$.

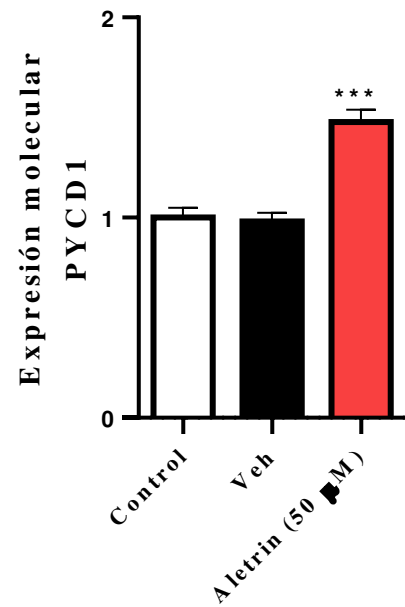
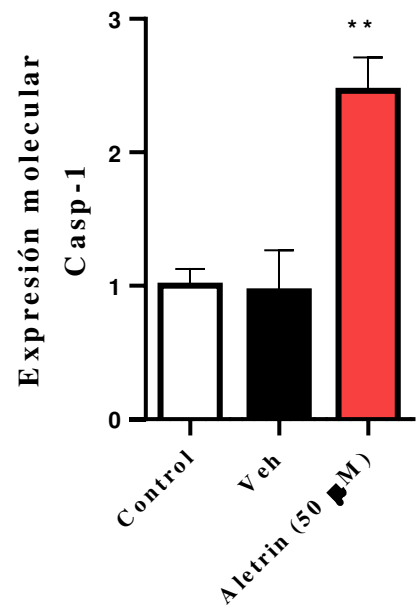


Figura 17. Activación del complejo inflammasoma, expresión molecular de Casp-1 inducida por aletrín a 50 μ M) tras 24 horas de exposición en células SH-SY5Y. Los datos se representan como la media \pm DE, de seis experimentos independientes. La significancia entre los grupos y frente al vehículo se determinó por ANOVA- Tukey pos hoc, *** $P < 0.001$.



CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

Aletrin es un piretroide sintético de tipo I, como muchos otros piretroides, se utiliza para combatir ectoparásitos en animales y en salud pública (61). Al ser de uso tan común, la exposición de forma ocupacional a estas sustancias y el riesgo de permanencia ambiental han aumentado en los últimos años. Este estudio proporciona nuevos conocimientos y datos sobre la neurotoxicidad de aletrin en las células neuronales SH-SY5Y. Otros estudios en este tipo celular también han sido desarrollados, por ejemplo, se ha demostrado efectos citotóxicos similares en otros estudios con plaguicidas ((3,62). El fipronil, un insecticida de amplio espectro de la familia del fenilpirazol que actúa sobre el receptor GABA, produjo neurotoxicidad *in vitro* en células SH-SY5Y, demostrado mediante ensayos de viabilidad celular, incluso su metabolito (fipronil sulfone) tuvo efectos más dañinos que el propio fipronil en concentraciones más bajas (100 μ M, 3 μ M, respectivamente) (63) (4). El glifosato, un herbicida de amplio espectro, también ha mostrado efectos citotóxicos sobre el desarrollo neuronal, la muerte celular y el estrés oxidativo a través de diferentes vías como apoptosis, autofagia y necrosis, lo que confirma que la exposición ambiental es un problema de salud (2). Por último, ciflutrin disminuyó la viabilidad celular en SH-SY5Y apoyando la hipótesis de neurotoxicidad inducida por piretroides (3).

En este trabajo, se expuso a las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y a diferentes concentraciones de piretroide aletrin (0,1-200 μ M), para ello hemos utilizado el ensayo de peroxidación lipídica (niveles de MDA) por un período de incubación de 24 horas. Varios estudios *in vitro* han demostrado los efectos que tienen los plaguicidas sobre la producción de estrés oxidativo (3,64–66). Diversos ensayos han demostrado que los pesticidas son capaces de incrementar la presencia de productos de estrés oxidativo celular como MDA y NOi en cultivos celulares (4,32). Aquí, mostramos que la exposición a aletrin es capaz de producir un aumento significativo en los niveles de NOi en este estudio, alcanzado niveles elevados a partir de la dosis de 50 μ M. Para evaluar el estrés oxidativo se ha utilizado el ensayo fluorescente de medición de NO intracelular, tras un período de incubación de 24 h con aletrin (1-200 μ M), se observó un incremento dosis-dependiente de los niveles de NO

intracelular a 50 μM (9%, ** $P < 0.01$), 100 μM (103%, *** $P < 0.001$), 200 μM (135%, *** $P < 0.001$) de aletrin. Otros estudios en piretroides han demostrado que NO intracelular es un biomarcador que es sensible a aumentar tras la exposición a estos compuestos, por ejemplo, se ha demostrado que ciflutrin de forma dosis-dependiente ha incrementado NO intracelular en células SH-SY5Y (3), mientras que cipermetrin también produjo un efecto similar sobre la forma indirecta de nitritos (4). También se ha demostrado que otros plaguicidas pueden producir un efecto neurotóxico a través de la inducción de NO intracelular, como por ejemplo clorpirifos (CPF) que indujo estrés oxidativo en células de microglía BV-2 de forma dosis-dependiente, elevándose los niveles de NO a dosis altas, mientras que la exposición a las concentraciones más bajas de CPF aumentó la producción de anión superóxido (66). La producción excesiva de NO se considera una de las principales causas de la patogenia de varias enfermedades neurodegenerativas, promoviendo la activación microglial y conduciendo a la formación de RNS (67,68). La combinación de NO y radicales libres, como anión superóxido, podría resultar en la formación de peroxinitrito altamente reactivo, que podría inducir la peroxidación de lípidos y causar daño al ADN (69).

El estrés oxidativo es capaz de producir la peroxidación lipídica de las membranas celulares, y entre los productos más reconocidos del daño celular por estrés oxidativo se encuentra la producción de malonaldehído (MDA). El análisis MDA nos da un buen indicador del daño celular por envejecimiento o por la acción de compuestos exógenos. En este estudio se ha podido determinar un elevado incremento en los niveles de MDA tras la exposición a aletrin a partir de una dosis de 25 μM , lo que indicaría que este compuesto a dosis bajas es capaz de producir daño celular por peroxidación de membranas celulares. Los niveles de MDA se incrementaron a 25 μM (44 %, * $P < 0.05$), 50 μM (50%, ** $P < 0.01$), 100 μM (160%, *** $P < 0.001$), 200 μM (255%, *** $P < 0.001$) aletrin. Otros estudios *in vitro* han podido demostrar que diversos compuestos plaguicidas piretroides dañan la membrana por estrés oxidativo, es el caso del piretroide ciflutrin, cipermetrin, deltametrin y permetrin (2,3,62,70). Así mismo, otros plaguicidas como paraquat mostraron que la MDA, un producto final de la peroxidación de lípidos, fue incrementada de forma dosis-dependiente en células SHSY5Y (70); de la misma forma CPF aumentó los niveles de MDA en las células microgliales tratadas con las concentraciones más altas de CPF (100 μM y 300 μM) asimismo, en el

estudio de Ma et al. (2013) la exposición a CPF aumentó los niveles de MDA, y produjo daño del ADN en hígado y riñón de ratones (71).

Una vez que el estrés oxidativo puede dañar las bases de los ácidos nucleicos, los lípidos, el ADN y las proteínas, lo que da como resultado la detención del ciclo celular, la apoptosis celular y efectos genotóxicos (72). En nuestro estudio mediante un ensayo de luminiscencia hemos evaluado la apoptosis a través de la actividad de la enzima caspasa 3/7, tras un período de incubación de 24 h con aletrin (1-200 μM) se observó un incremento dosis-dependiente de los niveles de la actividad caspasa 3/7 en comparación con el grupo vehículo, a 50 μM (12%, * $P < 0.05$), 100 μM (118%, *** $P < 0.001$), 200 μM (121%, *** $P < 0.001$) de aletrin. De la misma forma se ha observado que ciflutrin, cipermetrin y el herbicida glifosato también son capaces de inducir la actividad de caspasa 3/7 en células SH-SY5Y (2,3,32). Las vías de transducción de señales apoptóticas se caracterizan típicamente por la activación y cascada de caspasas. Las caspasas comienzan como precursores inactivos, pero al recibir una señal apoptótica, la pro-caspasa se someterá a un procesamiento proteolítico para generar una enzima activa. Después de que el receptor de muerte, ubicado en la membrana celular, recibe señales de estimulación, la caspasa inicial (caspasa-8 o caspasa-9) se activa por la vía extrínseca e intrínseca (vía mitocondrial). Finalmente, la caspasa ejecutora (caspasa-3 ó 7) se activa para inducir la apoptosis (73,74). Por lo general, tanto la vía intrínseca (mitocondrial) como la vía extrínseca iniciada por el receptor de muerte pueden conducir a la activación de la caspasa-3/7 (75). En un estudio con fipronil se indujo en células S2 la actividad de caspasa 9 y caspasa 3 (76).

El estrés oxidativo está estrechamente relacionado con la activación de varios factores de transcripción relacionados a su vez con la proinflamación y la muerte celular. Muchos procesos proinflamatorios que podrían producir enfermedades degenerativas y crónicas están relacionados con la activación del inflamasoma (77). Los inflamasomas son complejos de poliproteínas intracitoplasmáticas que son responsables del desarrollo y maduración de citocinas proinflamatorias como las interleucinas (IL-1 β e IL-18) y la piroptosis, un proceso de muerte celular altamente inflamatorio. La activación de inflamasomas que contienen el dominio 3 de la pirina (NLRP3) está altamente relacionada con los mecanismos moleculares

de diferentes enfermedades degenerativas, y se ha demostrado que es una de las formas de activarlos es por radicales libres (77).

Los inflamasomas NLRP3 desencadenan mecanismos inmunes innatos en una amplia gama de células, críticos para la respuesta inflamatoria en enfermedades crónico degenerativas (78–80). También hay evidencia que apoya que otras respuestas de daño celular pueden ser activadas por la acción de NLRP3 (81), y podrían estar relacionadas con piroptosis, glucólisis, metabolismo de lípidos y muerte celular (82–85). Estos procesos pueden comprometer la integridad y función de células y tejidos durante patologías crónicas como la enfermedad de Alzheimer, aterosclerosis, diabetes mellitus y otros trastornos metabólicos (86–88).

En este estudio ya se evidenció que aletrín, en forma dosis-dependiente, induce diversas formas de estrés oxidativo (NO, MDA) y muerte celular (caspasa 3/7), pero también a dosis de 50 μ M induce la expresión génica del ARNm del complejo inflamasoma. (NLRP3, Casp-1 y PYDC1). Se ha demostrado que el efecto de la aletrina NLRP3 induce 1,6 veces, Caspasa-1 2,5 veces y PYDC1 1,5 veces, lo que indicaría que este pesticida sería capaz de inducir la activación del complejo inflamasoma por estrés oxidativo. Se ha demostrado que otros plaguicidas como rotenona coestimulan con ATP el ensamblaje del inflamasoma y desencadena la activación de la caspasa 1 mediada por NLRP3, mientras que no se altera el nivel transcripcional de NLRP3 (89). Por otro lado, se ha mostrado la capacidad de clorpirifos al inducir estrés oxidativo, estimular la vía intrínseca de la apoptosis y aumentar los niveles de IL-1 β activa, que se asocia con enfermedades inflamatorias. El tratamiento de células HaCaT de queratinocitos humanos con clorpirifos produjo una disminución de la viabilidad celular de forma dosis-dependiente, que se debió a un aumento en las proteínas proapoptóticas Apaf-1 y caspasa 9, también se ha informado sobre la acción de clorpirifos sobre la inducción del inflamasoma e hipersensibilidad cutánea (90,91).

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

1. La exposición de células SH-SY5Y al piretroide Aletrin, ocasionó el incremento del estrés oxidativo de forma dosis-dependiente. Esto fue demostrado por el incremento del radical libre de óxido nítrico (NO) intracelular y por la peroxidación lipídica.
2. Aletrin, de forma dosis-dependiente, aumentó la actividad de la enzima caspasa 3/7, un biomarcador de apoptosis.
3. Aletrin a dosis de 50 μ M aumentó la expresión génica de biomarcadores estrechamente relacionados con el complejo inflamasoma.

CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES

Son necesarios más estudios para entender mejor los mecanismos de neurotoxicidad ocasionados por el piretroide aletrin y otros plaguicidas que pueden ocasionar enfermedad neurodegenerativa tras exposición a largo plazo.

CAPÍTULO VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

1. Gargouri B, Boukholda K, Kumar A, Benazzouz A. Bifenthrin insecticide promotes oxidative stress and increases in inflammatory mediators in human neuroblastoma cells through NF-kappaB pathway. *Toxicol Vitro*. 2020; 65:104792. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104792>
2. Martínez MA, Lopez-Torres B, Rodríguez JL, Martínez M, Maximiliano JE, Martínez-Larrañaga MR, et al. Toxicologic evidence of developmental neurotoxicity of Type II pyrethroids cyfluthrin and alpha-cypermethrin in SH-SY5Y cells. *Food Chem Toxicol*. 2020;137(January):111173. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111173>
3. Martínez M-A, Rodríguez J-L, Lopez-Torres B, Martínez M, Martínez-Larrañaga M-R, Anadón A, et al. Oxidative stress and related gene expression effects of cyfluthrin in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: Protective effect of melatonin. *Environ Res*. 2019;177(June):108579. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013935119303767>
4. Romero A, Ramos E, Ares I, Castellano V, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, et al. Oxidative stress and gene expression profiling of cell death pathways in alpha-cypermethrin-treated SH-SY5Y cells. *Arch Toxicol*. 2017;91(5):2151–64. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1864-y>
5. Romero A, Ares I, Ramos E, Castellano V, Martínez M, Anadón A, et al. Evidence for dose-additive effects of a type II pyrethroid mixture. In vitro assessment. *Environ Res*. 2015;138:58–66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2015.02.008>
6. Romero A, Ramos E, Castellano V, Martínez MA, Ares I, Martínez M, et al. Cytotoxicity induced by deltamethrin and its metabolites in SH-SY5Y cells can be differentially prevented by selected antioxidants. *Toxicol Vitro*. 2012;26(6):823–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2012.05.004>

7. Raszewski G, Lemieszek MK, Łukawski K. Cytotoxicity induced by cypermethrin in Human Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y. *Ann Agric Environ Med*. 2016;23(1):106–110.
<http://www.aaem.pl/pdf-72384-9613?filename=Cytotoxicity%20induced%20by.pdf>
8. Raszewski G, Lemieszek MK, Krzysztof Ł, Rzeski W. Chlorpyrifos and Cypermethrin Induce Apoptosis in Human Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2015;158–167. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12285>
9. Yu T, Wan F, Liu C, Zhang X, Liu Z, Zhang J, et al. Asparagine endopeptidase inhibitor protects against fenprothrin-induced neurodegeneration via suppressing α -synuclein aggregation and neuroinflammation. *Journal Pre of. Eur J Pharmacol*. 2020;173586. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173586>
10. Xiong J, Zhang X, Huang J, Chen C, Chen Z. Fenprothrin, a Widely Used Pesticide, Causes Dopaminergic Degeneration. *Mol Neurobiol*. 2015. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9057-2>
11. Ding R, Cao Z, Wang Y, Gao X, Luo H, Zhang C, et al. The implication of p66shc in oxidative stress induced by deltamethrin. *Chemico-Biological Interactions*. 2017;162-169. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.10.005>
12. Madhubabu G, Yenugu S. Allethrin toxicity causes reproductive dysfunction in male rats. *Environ Toxicol*. 2017;32(6):1701–10. <https://doi.org/10.1002/tox.22394>
13. Abdulla Al-Mamun M, Ataur Rahman M, Habibur Rahman M, Hoque KMF, Ferdousi Z, Matin MN, et al. Biochemical and histological alterations induced by the smoke of allethrin based mosquito coil on mice model. *BMC Clin Pathol*. 2017;17(1):4–11. <https://bmcclinpathol.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12907-017-0057-9.pdf>
14. Na HG, Kim YD, Choi YS, Bae CH, Song SY. Allethrin and prallethrin stimulates MUC5AC expression through oxidative stress in human airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;503(1):316–22. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.06.022>

15. Gargouri B, Yousif NM, Bouchard M, Fetoui H, Fiebich BL. Inflammatory and cytotoxic effects of bifenthrin in primary microglia and organotypic hippocampal slice cultures. *J Neuroinflammation*. 2018. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1198-1>
16. Afolabi OK, Aderibigbe FA, Folarin DT, Arinola A, Wusu AD. Oxidative stress and inflammation following sub-lethal oral exposure of cypermethrin in rats: mitigating potential of epicatechin. *Heliyon*. 2019;5(8):e02274. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02274>
17. Bai Y, Henry J, Campana O, Wlodkowic D. Science of the Total Environment Emerging prospects of integrated bioanalytical systems in neuro-behavioral toxicology. *Sci Total Environ*. 2021;756:143922. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143922>
18. Fishbein DH, Michael L, Guthrie C, Carr C, Raymer J. Associations Between Environmental Conditions and Executive Cognitive Functioning and Behavior During Late Childhood: A Pilot Study. *Front. Psychol*. 2019;10(May):1–12. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2019.01263>
19. Voorhees JR, Rohlman DS, Lein PJ. Neurotoxicity in Preclinical Models of Occupational Exposure to Organophosphorus Compounds. *Front. Neurosci*. 2017;10(January). <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00590>
20. Muñoz-quezada MT, Lucero BA, Gutiérrez-jara JP, Buralli RJ, Zúñiga-venegas L, Pía M, et al. Science of the Total Environment Longitudinal exposure to pyrethroids (3-BA and trans-DCCA) and 2 , 4-D herbicide in rural schoolchildren of Maule region , Chile. *Sci Total Environ*. 2020;749:141512. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141512>
21. Orozco FA, Cole DC, Ibrahim S, Wanigaratne S. Health promotion outcomes associated with a community-based program to reduce pesticide-related risks among small farm households. *Health Promotion International*. 2011;26(4):432–46. <http://dx.doi.org/10.1093/heapro/dar006>

22. Dziembowska I, Bogusiewicz J. Current Research on the Safety of Pyrethroids Used as Insecticides. *Medicina*. 2018;1–15. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6174339/pdf/medicina-54-00061.pdf>
23. Bhatt P, Zhang W, Lin Z, Pang S, Huang Y, Chen S. Biodegradation of allethrin by a novel fungus *Fusarium proliferatum* strain cf2, isolated from contaminated soils. *Microorganisms*. 2020;8(4). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7232317/pdf/microorganisms-08-00593.pdf>
24. Chen CD, Chin AC, Lau KW, Low VL, Lee HL, Lee PKY, et al. Bioefficacy evaluation of commercial mosquito coils containing metofluthrin, d-Allethrin, d-Trans Allethrin, and Prallethrin Against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Malaysia. *J Med Entomol*. 2018;55(6):1651–5. <https://doi.org/10.1093/jme/tjy130>
25. Srivastava AK, Srivastava PK, Al-Khedhairi AA, Musarrat J, Shukla Y. Allethrin-induced genotoxicity and oxidative stress in Swiss albino mice. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2012;747(1):22–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2012.03.003>
26. Ramos-Chavez LA, Sordo M, Calderon-Aranda E, Castañeda-Saucedo E, Ostrosky-Wegman P, Moreno-Godinez ME. A permethrin/allethrin mixture induces genotoxicity and cytotoxicity in human peripheral blood lymphocytes. *J Toxicol Environ Heal - Part A Curr Issues*. 2015;78(1):7–14. 10.1080/15287394.2015.956025
27. Gupta G, Chaitanya RK, Golla M, Karnati R. Allethrin toxicity on human corneal epithelial cells involves mitochondrial pathway mediated apoptosis. *Toxicol Vitro*. 2013;27(8):2242–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2013.09.011>
28. Neal AP, Yuan Y, Atchison WD. Allethrin differentially modulates voltage-gated calcium channel subtypes in rat PC12 cells. *Toxicol Sci*. 2010;116(2):604–13. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2905402/pdf/kfq139.pdf>

29. Narendra M, Kavitha G, Helah Kiranmai A, Raghava Rao N, Varadacharyulu NC. Chronic exposure to pyrethroid-based allethrin and prallethrin mosquito repellents alters plasma biochemical profile. *Chemosphere*. 2008;73(3):360–4. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.05.070>
30. Estomih T, Akhouayri I, Kisinza W, David J. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: Facts, evidences and prospects. *Insect Biochem Mol Biol*. 2013;43(4):407–16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.10.006>
31. Sayono S, Mudawamah PL, Meikawati W, Sumanto D. Effect of d-allethrin aerosol and coil to the mortality of mosquitoes. *J Arthropod Borne Dis*. 2019;13(3):259–67. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6928380/pdf/JAD-13-259.pdf>
32. Martínez MA, Rodríguez JL, Lopez-Torres B, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, Maximiliano JE, et al. Use of human neuroblastoma SH-SY5Y cells to evaluate glyphosate-induced effects on oxidative stress, neuronal development and cell death signaling pathways. *Environ Int*. 2020;135(September 2019). <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105414>
33. Lushchak VI, Matviishyn TM, Husak V V., Storey JM, Storey KB. Pesticide toxicity: A mechanistic approach. *EXCLI J*. 2018;17:1101–36. <https://doi.org/10.17179/excli2018-1710>
34. Adams L, Franco MC, Estevez AG. Reactive nitrogen species in cellular signaling. *Experimental Biology and Medicine*. 2015;1–7. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4935209/pdf/10.1177_1535370215581314.pdf
35. Gabbianelli R, Letizia M, Nasuti C, Cantalamessa F, Imada I, Inoue M. Chemico-Biological Interactions Effect of permethrin insecticide on rat polymorphonuclear neutrophils. *Chemico-Biological Interactions*. 2009;182:245–52. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.09.006>
36. Li HY, Zhong YF, Shi N. Effect of deltamethrin on production of reactive oxygen species in PC12 cells. 2008 Nov;26(11):654-8. Chinese. PMID: 19467182.

37. Kumar A, Sasmal D, Sharma N. Deltamethrin induced an apoptogenic signalling pathway in murine thymocytes: exploring the molecular mechanism. 2014;(September 2013):1303–10. <https://doi.org/10.1002/jat.2948>
38. Arora D, Siddiqui MH, Sharma PK, Shukla Y. AC. Deltamethrin induced RIPK3-mediated caspase-independent non-apoptotic cell death in rat primary hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.042>
39. Erdo O, Bu S, Ekinci D, Aksakal E. Impact of deltamethrin exposure on mRNA expression levels of metallothionein A, B and cytochrome P450 1A in rainbow trout muscles. *Gene.* 2011;484:13–7. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.05.026>
40. Lu Q, Sun Y, Ares I, Anadón A, Martínez M. Deltamethrin toxicity: A review of oxidative stress and metabolism. *Environ Res.* 2019;170(December 2018):260–81. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.12.045>
41. Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: A target for anticancer therapy. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2). <https://doi.org/10.3390/ijms19020448>
42. Rodríguez JL, Ares I, Castellano V, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, Anadón A, et al. Effects of exposure to pyrethroid cyfluthrin on serotonin and dopamine levels in brain regions of male rats. *Environ Res.* 2016;146:388–94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2016.01.023>
43. Yuan Z, Mi T, Han-dong W, Chao-chao G, Lin Z, Yi-xing L, et al. Activation of the Nrf2-ARE signal pathway after blast induced traumatic brain injury in mice. *International Journal of Neuroscience.* 2019;0(0):000. <http://dx.doi.org/10.1080/00207454.2019.1569652>
44. Zhou L, Zhou M, Tan H, Xiao M. Cypermethrin-induced cortical neurons apoptosis via the Nrf2 / ARE signaling pathway. *Pestic Biochem Physiol.* 2020;165(2600):104547. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.02.013>
45. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. 2007;495–516. <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1080/01926230701320337>

46. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A Induces Caspase-Independent Mitochondrial Damage, a Required First Step for Apoptosis. *Immunity*. 2005;22:355–70. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.02.004>
47. Poon IKH, Lucas CD, Rossi AG. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat Publ Gr*. 2014;(January). <http://dx.doi.org/10.1038/nri3607>
48. Strasser A, Harris AW, Huang DCS, Krammer PH, Cory S. Bcl-2 and Fas / APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. 1995;14(24):6136–47. https://www.researchgate.net/publication/14643559_Bcl-2_and_FASAPO-1_regulate_distinct_pathways_to_lymphocyte_apoptosis
49. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL - 2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Publ Gr*. 2014;15(1):49–63. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3722>
50. Green DR, Kroemer G, Green DR, Kroemer G. The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death. 2014;626(2004). <https://doi.org/10.1126/science.1099320>
51. Shan B, Pan H, Najafov A, Yuan J. Necroptosis in development and diseases. 2018;327–40. <https://doi.org/10.1101/gad.312561.118>
52. Voss AK, Strasser A. The essentials of developmental apoptosis [version 1; peer review: 3 approved]. *Genes & development*. 2020;9:1–12. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7047912/pdf/f1000research-9-23770.pdf>
53. Martinon F, Burns K, Boveresses C, Epalinges C-. The Inflammasome : A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- β . *Molecular Cell*. 2002;10:417–26. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00599-3](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00599-3)
54. Rathinam VAK, Vanaja SK, Fitzgerald KA. Regulation of inflammasome signaling. 2012;13(4). *Nature immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni.2237>
55. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(June). <https://doi.org/10.1038/nri3452>

56. Moltke J Von, Ayres JS, Kofoed EM, Chavarr J, Vance RE. Recognition of Bacteria by Inflammasomes. *Annu. Rev. Immunol.* 2013;31-73. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095944>
57. Rathinam VAK, Fitzgerald KA. HHS Public Access. Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions. *Cell.* 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.046>
58. Moloudizargari M, Moradkhani F, Asghari N, Fallah M. Review article NLRP inflammasome as a key role player in the pathogenesis of environmental toxicants Increased ROS Mitochondrial damage. *Life Sci.* 2019;231(June):116585. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116585>
59. Anderson FL, Coffey MM, Berwin BL, Havrda MC. Inflammasomes: An Emerging Mechanism Translating Environmental Toxicant Exposure Into Neuroinflammation in Parkinson ' s Disease. 2018;166(1):3–15. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy219>
60. Martínez MA, Rodríguez JL, Lopez-Torres B, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, Maximiliano JE, et al. Use of human neuroblastoma SH-SY5Y cells to evaluate glyphosate-induced effects on oxidative stress, neuronal development and cell death signaling pathways. *Environ Int.* 2020;135(September 2019):105414. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105414>
61. Anadón A, Martínez-Larrañaga MR, Martínez MA. Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. *Vet J.* 2009;182(1):7–20. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.04.008>
62. Wang X, Martínez MA, Dai M, Chen D, Ares I, Romero A, et al. Permethrin-induced oxidative stress and toxicity and metabolism. A review. *Environ Res.* 2016;149(November 2017):86–104. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2016.05.003>
63. Romero A, Egea J, García AG, López MG. Synergistic neuroprotective effect of combined low concentrations of galantamine and melatonin against oxidative stress in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Pineal Res.* 2010;49(2):141–8. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.2010.00778.x>

64. Fu D, Li P, Song J, Zhang S. Toxicology in Vitro Mechanisms of synergistic neurotoxicity induced by two high risk pesticide residues – Chlorpyrifos and Carbofuran via oxidative stress. *Toxicol Vitro*. 2019;54(August 2018):338–44. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.10.016>
65. Lungu-mitea S, Oskarsson A, Lundqvist J. Development of an oxidative stress in vitro assay in zebrafish (*Danio rerio*) cell lines. *Scientific Reports*. 2018;(June):1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30880-1>
66. Castagna G, Weis C, Elias C, Pillat MM, Andrade CM De, Rosa M, et al. Chlorpyrifos pesticide promotes oxidative stress and increases in inflammatory states in BV-2 microglial cells: A role in neuroinflammation. *Chemosphere*. 2021;278. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130417>
67. Meo S Di, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1245049>
68. Yuste JE, Tarragon E, Campuzano CM, Ros-bernal F. Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Front. Cell. Neurosci*. 2015;9(August):1–14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00322>
69. Ischiropulos Harry BJ. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: Cause, effect, or association?. *Journal of Clinical Investigation*. 2003. 10.1172/JCI200317638.
70. Hou L, Huang R, Sun F, Zhang L, Wang Q. NADPH oxidase regulates paraquat and maneb-induced dopaminergic neurodegeneration through ferroptosis. *Toxicology*. 2019;417(9):64–73. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.02.011>
71. Ma P, Wu Y, Zeng Q, Gan Y, Chen J, Ye X, et al. Oxidative damage induced by chlorpyrifos in the hepatic and renal tissue of Kunming mice and the antioxidant role of vitamin E. *Food Chem Toxicol*. 2013;58:177–83. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.04.032>

72. Navaei-nigjeh M, Asadi H, Baeri M, Pedram S, Rezvanfar A, Mohammadirad A, et al. In vitro protection of human lymphocytes from toxic effects of chlorpyrifos by selenium-enriched medicines. *Basic Med Sci.* 2015; 18:284-292. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4414995/pdf/IJBMS-18-284.pdf>
73. Fuchs Y, Steller H. Review Programmed Cell Death in Animal Development and Disease. *Cell.* 2011;147(4):742–58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.033>
74. Wang Q, Luo W, Zhang W, Dai Z, Chen Y, Chen J. Iron supplementation protects against lead-induced apoptosis through MAPK pathway in weanling rat cortex. *Neurotoxicology.* 2007;28:850–9. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2007.04.004>
75. Li J, Xia X, Ke Y, Nie H, Smith MA, Zhu X. Trichosanthin induced apoptosis in HL-60 cells via mitochondrial and endoplasmic reticulum stress signaling pathways. *BBA.* 2007;1770:1169–80. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.04.007>
76. Zhang B, Xu Z, Zhang Y, Shao X, Xu X. Fipronil induces apoptosis through caspase-dependent mitochondrial pathways in *Drosophila* S2 cells. *Pestic Biochem Physiol.* 2015;119:81–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.01.019>
77. Abais JM, Xia M, Zhang Y, Boini KM, Li P. Redox Regulation of NLRP3 Inflammasomes: ROS as Trigger or Effector?. *Antioxidants & Redox Signaling.* (804):1–80. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5994>
78. Lee JYM. Mitochondria and the NLRP3 inflammasome: physiological and pathological relevance. *Arch Pharm Res.* 2016;39(11):1503–18. <https://doi.org/10.1007/s12272-016-0827-4>
79. Sutterwala FS, Ogura Y, Flavell RA. The inflammasome in pathogen recognition and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 2007;82(August). <https://doi.org/10.1189/jlb.1206755>
80. Ozaki E, Campbell M, Doyle SL. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives. *Journal of Inflammation Research.* 2015;15–28. <https://doi.org/10.2147/jir.s51250>

81. Yang F, Wang Z, Wei X, Han H, Meng X, Zhang Y, et al. NLRP3 deficiency ameliorates neurovascular damage in experimental ischemic stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2014;34(4):660–7. <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2013.242>
82. Lamkanfi M. Emerging inflammasome effector mechanisms. *Nat Publ Gr*. 2011;11(3):213–20. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2936>
83. Meyers AK, Zhu X. cells The NLRP3 Inflammasome: Metabolic Regulation and Contribution to Inflammaging. *Cells*. 2020;2. <https://doi.org/10.3390/cells9081808>
84. Paik S, Kim JK, Silwal P. An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol*. 2021;(November 2020). <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-021-00670-3>
85. Sanman LE, Qian Y, Eisele NA, Ng TM, Linden WA Van Der, Monack DM, et al. Disruption of glycolytic flux is a signal for inflammasome signaling and pyroptotic cell death. *eLIFE*. 2016;1–33. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4846378/pdf/elife-13663.pdf>
86. Guo H, Callaway JB, Ting JP. ew Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature Medicine*. 2015;21(7):677–88. <https://doi.org/10.1038/nm.3893>
87. Masters SL. Specific inflammasomes in complex diseases. *Clin Immunol*. 2013;147(3):223–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2012.12.006>
88. Strowig T, Henao-mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature*. 2012. <https://doi.org/10.1038/nature10759>
89. Won J, Park S, Hong S, Son S, Yu J. Rotenone-induced Impairment of Mitochondrial Electron Transport Chain Confers a Selective Priming Signal for NLRP3 Inflammasome Activation. *J Biol Chem*. 2015;290(45):27425–37. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M115.667063>

90. Jang Y, Young A, Jeong S, Park K, Paik M, Cho N, et al. Chlorpyrifos induces NLRP3 inflammasome and pyroptosis / apoptosis via mitochondrial oxidative stress in human keratinocyte HaCaT cells. *Toxicology*. 2015;338:37–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2015.09.006>
91. Martinon F, Contassot E, Watanabe H, Gaide O, Pe V, Kummer JA. Activation of the IL-1 β -Processing Inflammasome Is Involved in Contact Hypersensitivity. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007;127. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700819>