Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

Neurotoxicidad relacionada a muerte celular producida por el piretroide Tipo I Aletrin en células neuronales SH-SY5Y

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinaria

AUTOR

Paola Natalí VIDAL CORTIJO

ASESOR

Mg. Luis Manuel BARRIOS ARPI

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

Vidal P. Neurotoxicidad relacionada a muerte celular producida por el piretroide Tipo I Aletrin en células neuronales SH-SY5Y [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2022.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Paola Natalí Vidal Cortijo
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	40795514
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-6521-4814
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Luis Manuel Barrios Arpi
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	43485699
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-5166-4136
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Pedro Angulo Herrera
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08517424
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	William Barrios Santos
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	41676357
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Boris Antonio Lira Mejia
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10131501
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 2019. Resolución Rectoral Nº 03556-R-19 con código de proyecto A19080231
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	Agosto 2019 - Diciembre 2021
URL de disciplinas OCDE	Neurociencias https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.04 Toxicología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.07 Fisiología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.08

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS EN MODALIDAD VIRTUAL
PARA OPTAR EL TÍTULO DE MEDICO VETERINARIA
Autorizado por R.D N° 304-D-FMV-2020

1. **FECHA DE LA SUSTENTACIÓN 11/07/2022**

HORA INICIO: 4 pm

HORA TÉRMINO: 5 pm

2. **MIEMBROS DEL JURADO**

PRESIDENTE: **Q.F. Dr. Angulo Herrera, Pedro**

MIEMBRO: **MV. Mg. Lira Mejía, Boris Antonio**

MIEMBRO: **MV. Dr. Barrios Santos, William Arthur**

ASESOR: **MV. Mg. Barrios Arpi, Luis Manuel**

3. **DATOS DEL TESISTA**

APELLIDOS Y NOMBRES: **VIDAL CORTIJO, PAOLA NATALÍ**

CÓDIGO: *01112454*

R.R. DE GRADO DE TESISTA NÚMERO: **N° 00178-2019-R09**

TÍTULO: **"NEUROTOXICIDAD RELACIONADA A MUERTE CELULAR PRODUCIDA POR EL PIRETROIDE TIPO I ALETRIN EN CÉLULAS NEURONALES SH-SY5Y"**

4. **RECOMENDACIONES**

Ninguna

Datos de la plataforma virtual institucional del acto de sustentación:
https:
ID:
Grabación archivada en:

5. **NOTA OBTENIDA: (17), Diecisiete**

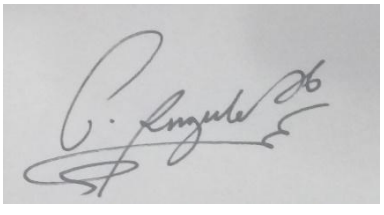
6. **PÚBLICO ASISTENTE:** (Nombre, apellido y DNI)

7. TESISTA	**1**	Paola Natali Vidal Cortijo		paolavidal7@gmail.com
JURADO	**2**	Pedro Angulo Herrera		panguloh@unmsm.edu.pe
	3	Luis Manuel Barrios Arpi		lbarriosa@unmsm.edu.pe
	4	Boris Lira Mejía		bliram@unmsm.edu.pe
	5	William Barrios Santos	41676357	wbarrioss@unmsm.edu.pe
MODERADOR	**6**	Víctor Hugo Castillo Doloriert	08703624	vcastillod@unmsm.edu.pe
COMITÉ DE SUSTENTACIONES	**7**	Luis Cerro Temoche	41341572	lcerrot@unmsm.edu.pe
	8	Faride Altamirano Zevallos	43695598	faltamiranoz@unmsm.edu.pe
	9	Luis Hoyos Sifuentes	41175479	luis.hoyos@unmsm.edu.pe
	10	Miryam Quevedo Urday	40064320	mquevedou@unmsm.edu.pe
INVITADOS POR EL TESISTA	**11**	Lidia Cortijo Traverso	07394085	margaritacortijo@gmail.com
	12	Pablo Vidal Vidal	07542379	pablovidal21@gmail.com
	13	Roger Calderon Romero	45193055	rccr.roger@gmail.com
	14	Antonio Yanayacu Flores		8535390@gmail.com
	15	Ozgul Caliskan		ozgulcaliskan@gmail.com
	16	Franklin Santa Cruz Jara	41348012	franklinscj@gmail.com
SOLICITUD DE ASISTENCIA DOCENTES	**17**	Virginia Rivadeneira		vrivadeneira@unmsm.edu.pe
	18	Antonio Ampuero Bustillo		aampuerob@unmsm.edu.pe
	19	Juan Olazabal Loayza		jolazaball@unmsm.edu.pe
	20	Zoyla Mirella Clavo Peralta		zclavop@unmsm.edu.pe
	21	Sergio Pezo Carreón		spezoc@unmsm.edu.pe

	22	Mariella Ramos González		mramosgo@unmsm.edu.pe
SOLICITUD DE ASISTENCIA ESTUDIANTES	**23**	Joel Jefferson Cuenca Chacca	48667693	joel.cuenca@unmsm.edu.pe
	24	Ana Dhalal Corso Guisabalo	71618364	ana.corso@unmsm.edu.pe
	25	Mary Consuelo Sánchez Chumbe	72217008	mary.sanchez@unmsm.edu.pe
	26	Camila Valeria Cortez Rodriguez	73542105	camila.cortez@unmsm.edu.pe
	27	Sharon Nicole Cabanillas Ruidiaz	77676886	sharon.cabanillas@unmsm.edu.pe
	28	Ruby Gómez Rios	73176170	ruby.gomez@unmsm.edu.pe
INGRESARON SIN INSCRIBIRSE	**29**	Raúl Lucas		jlucasl@unmsm.edu.pe
	30	María Mallqui Quintanilla		
INFORMÁTICA		Andrés Trujillo Peña	informatica.fmv@unmsm.edu.pe	

	ASISTIÓ
	NO ASISTIÓ

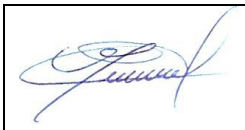
8. FIRMAS DE LOS MIEMBROS DEL JURADO



Firma

Q.F. Dr. Angulo Herrera, Pedro

Apellidos y Nombres
PRESIDENTE

 **Firma**	 **Firma**	 **Firma**
MV. Mg. Barrios Arpi, Luis Manuel **Apellidos y Nombres**	**MV. Mg. Lira Mejía, Boris Antonio** **Apellidos y Nombres**	**MV. Dr. Barrios Santos, William Arthur** **Apellidos y Nombres**
ASESOR DE LA TESIS	**MIEMBRO JURADO**	**MIEMBRO JURADO**

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria
ep.veterinaria@unmsm.edu.pe
"AÑO DE LA UNIVERSALIZACIÓN DE LA SALUD"

INFORME DE EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD

Tesis para optar el título profesional de Médico Veterinario

1. Facultad: Medicina Veterinaria
2. Escuela: Medicina Veterinaria
3. Autoridad académica que emite el informe de originalidad: Escuela Profesional de Medicina Veterinaria.
4. Apellidos y Nombres de la Autoridad Académica: Santiani Acosta, Alexei Vicent
5. Operador del Programa Informático de similitudes: Sandoval Monzón Rocío Silvia.
6. Documento evaluado: "Neurotoxicidad relacionada a muerte celular producida por el piretroide Tipo I Aletrin en células neuronales SH-SY5Y"
7. Autor del documento: Vidal Cortijo, Paola Natali
8. Fecha de recepción del documento: 08 de febrero del 2022
9. Fecha de aplicación del programa informático: 09 de febrero del 2022
10. Software utilizado
    - Turnitin
11. Configuración del programa detector de similitudes:
    - Excluye textos entrecomillados
    - Excluye bibliografía
    - Excluye cadenas menores de 40 palabras
    - Exclusión de fuentes para buscar similitud
12. Porcentaje de similitudes según programa detector de similitudes: 7%
13. Fuentes originales de similitudes encontradas:
    - Hrcak.srce.hr: 1%
    - www.ncbi.nlm.nih.gov: 1%
    - Wangxin Tang, Di Wang, Jiaqi Wang, Zhengwen Wu, Lingyu Li, Mingli Huang, Shaohui Xu, Dongyun Yan. "Pyrethroid pesticide residues in the global environment: An overview" , Chemosphere, 2018: 1%
    - Xiaoqing Ye, Jing Liu. "Effects of pyrethroid insecticides on hypothalamic-pituitarygonadal axis: A reproductive health perspective" , Environmental Pollution, 2019: 1%
    - A. Romero, E. Ramos, I. Ares, V. Castellano, M. Martínez, M.R. Martínez-Larrañaga, A. Anadón, M.A. Martínez. "Fipronil sulfone induced higher cytotoxicity than fipronil in SH-6: 1%
    - intl.molbiolcell.org: <1%
    - www.mdpi.com: <1%
    - Submitted to The University of Manchester: <1%

- Hamidreza Mohammadi, Nasrin GhassemiBarghi, Obeid Malakshah, Sorour Ashari. "Pyrethroid exposure and neurotoxicity: a mechanistic approach" , Archives of Industrial Hygiene and Toxicology, 2019: <1%
- "Draft Toxicological Profile for Pyrethrins and Pyrethroids" , ATSDR s Toxicological Profiles Web Version, 2002: <1%
- Mubarak Hossain, M.. "Differential effects of pyrethroid insecticides on extracellular dopamine in the striatum of freely moving rats" , Toxicology and Applied Pharmacology, 20061115: <1%
- Vania Lucia Loro, Bárbara Estevão Clasen. "Agrochemicals: Ecotoxicology and Excluir citas Activo Excluir bibliografía Apagado Excluir coincidencias Apagado management in aquaculture" , Elsevier BV, 2021: <1%

14. Observaciones: el mayor porcentaje de las similitudes halladas en la tesis evaluada se encuentra en la sección fuentes de internet.
15. Calificación de originalidad:
    DOCUMENTO CUMPLE CRITERIOS DE ORIGINALIDAD, SIN OBSERVACIONES
16. Fecha del informe: 09 de febrero del 2022

UNMSM
Firmado digitalmente por SANTIANI ACOSTA Alexei Vicent FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 10.02.2022 11:56:36 -05:00

Dr. Alexei Vicent Santiani Acosta
Director EPMV

AGRADECIMIENTOS

Expreso gratitud a mi alma mater, por darme un hogar antes que una casa, por guiarme en vez de ordenarme y enseñarme los diferentes tipos de amor que nos hacen verdaderos veterinarios.

A los docentes que me apoyaron en este camino, por sus enseñanzas, paciencia y dedicación, a mi asesor el Dr. Luis Manuel Barrios y en especial a mi amigo el Dr. José Luis Rodríguez Gutiérrez.

Esta investigación fue financiada por la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por Resolución Rectoral Nº 03556-R-19 con código de proyecto A19080231.

DEDICATORIA

A mis incondicionales, mis padres, por la suerte de tenerlos a mi lado.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN…… 1

ABSTRACT…… 2

I. INTRODUCCION…… 3

II. REVISION BIBLIOGRAFICA…… 5

2.1 PIRETROIDES…… 5

2.1.1 Generalidades…… 5

2.1.2 Mecanismos de acción …… 7

2.1.3 Clasificación…… 9

2.1.4 Toxicidad en mamíferos…… 11

2.1.4.1 Neurotoxicidad…… 12

2.1.4.2 Toxicidad reproductiva…… 14

2.1.4.3 Otras toxicidades…… 17

2.1.5 Usos y contaminación ambiental…… 19

2.2 PIRETROIDE ALETRIN…… 21

2.2.1 Estructura…… 21

2.2.2 Propiedades químicas y físicas…… 22

2.2.3 Cinética y metabolismo…… 22

2.2.4 Toxicidad del piretroide aletrin…… 24

2.2.4.1 Neurotoxicidad…… 24

2.2.4.2 Efectos reproductivos…… 24

2.2.4.3 Efectos genotóxicos…… 25

2.3 CELULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y…… 25

III. MATERIALES Y METODOS…… 28

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN…… 28

3.2 MATERIALES Y EQUIPOS…… 28

3.2.1 Materiales y reactivos…… 28

3.2.2 Equipos…… 29

3.3 DISENO EXPERIMENTAL…… 29

3.3.1 Preparación de medios de cultivo …… 29

3.3.2 Línea celular y condición de cultivo …… 30

3.3.3 Tratamientos…… 31

3.3.4 Ensayo de viabilidad celular (MTT)…… 32

3.3.5 Determinación de la producción de especies reactivas de oxígeno/especies reactivas de nitrógeno (ROS/RNS)…… 33

3.3.6 Expresión de genes relacionados al estrés oxidativo mediante PCR en tiempo real…… 34

3.3.7 Análisis estadístico…… 36

IV. RESULTADOS…… 37

4.1 ENSAYO DE CITOXICIDAD…… 37

4.2 EFECTO DEL PIRETROIDE ALETRIN SOBRE LA PRODUCCION DE ROS/RNS EN CELULAS SH-SY5Y…… 38

4.3 EFECTO DEL PIRETROIDE ALETRIN SOBRE LA EXPRESION MOLECULAR DE GENES BAX Y BCL-2 RELACIONADOS A MUERTE CELULAR …….. 39

V. DISCUSIÓN……. 42

VI. CONCLUSIONES…….……... 46

VII. LITERATURA CITADA...…….. 47

VIII. GLOSARIO……..…… 63

RESUMEN

Los piretroides se han utilizado en gran medida como insecticidas comerciales, incluyendo al aletrin. La toxicidad del aletrin es poco conocida, a pesar de ello y por los estudios en piretroides relacionados, podría provocar alteraciones a nivel del sistema nervioso. La exposición al aletrin a corto o largo plazo representaría un peligro para la salud ocupacional y no ocupacional. Para evaluar la neurotoxicidad del aletrin hemos utilizado células de neuroblastoma SH-SY5Y. El ensayo MTT se utilizó para evaluar la viabilidad celular, aletrin produjo un efecto dosis-dependiente sobre la reducción de la viabilidad celular, obteniéndose una IC_{50} para aletrin de 49,19 μM. La producción de ROS aumentó significativamente a dosis de 10-200 μM de aletrin entre 45,3 y 100,9 %. En este estudio, hemos encontrado que aletrin (50 μM) fue capaz de inducir la expresión del ARNm del gen de apoptosis Bax, alcanzando un nivel de expresión de 2,1 veces respecto al control. Además, nuestros resultados también indican que el piretroide aletrin es capaz de producir susceptibilidad a la apoptosis (2,3 veces) en las células SH-SY5Y. Estos resultados demostrarían que aletrin sería capaz de inducir efectos de neurotoxicidad en las células SH-SY5Y mediante la activación de la muerte celular y el estrés oxidativo, lo cual indicaría que los piretroides tipo I tendrían capacidad de inducir o ser elementos a tomar en cuenta en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas por lo que sería necesario su reevaluación para su uso.

Palabras clave:
Aletrin, neurotoxicidad, estrés oxidativo, muerte celular, células SH-SY5Y.

ABSTRACT

Pyrethroids have been widely used as commercial insecticides, including allethrin. The toxicity of allethrin is little known, despite this and due to studies on related pyrethroids, it could cause alterations at the level of the nervous system. Short-term or long-term exposure to allethrin would represent an occupational and non-occupational health hazard. To evaluate the neurotoxicity of allethrin we have used SH-SY5Y neuroblastoma cells. The MTT assay was used to evaluate cell viability. Alethrin produced a dose-dependent effect on the reduction of cell viability, obtaining an IC50 for allethrin of 49.19 μM. ROS production increased significantly at doses of 10-200 μM allethrin between 45.3 and 100.9%. In this study, we found that alethrin (50 μM) was able to induce the expression of the Bax apoptosis gene mRNA, reaching an expression level of 2.1 times compared to the control. Furthermore, our results also indicate that the pyrethroid alethrin is capable of producing apoptosis susceptibility (2.3-fold) in SH-SY5Y cells. These results would show that aletrin would be capable of inducing neurotoxic effects in SH-SY5Y cells by activating cell death and oxidative stress, which would indicate that type I pyrethroids would have the capacity to induce or be elements to be taken into account in the development of neurodegenerative diseases, so its reevaluation for its use would be necessary.

***Keywords*:**

Allethrin, neurotoxicity, oxidative stress, death cell, SH-SY5Y cells.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los piretroides son usados a nivel mundial y han reemplazado a otros plaguicidas como organofosforados y organoclorados debido a la menor peligrosidad que representa su uso. Los piretroides han sido usados por muchos años sin causar mayores efectos secundarios; sin embargo, su uso se ha incrementado en países de bajos ingresos económicos. En la actualidad, ya se conocen varios estudios *in vivo* e *in vitro* que demuestran los efectos neurotóxicos de estos compuestos (Romero *et al*., 2017; Barrios-Martínez *et al*., 2020; Arpi *et al*., 2022)

El piretroide aletrin se encuentra presente en formulaciones de plaguicidas y repelentes de insectos de uso doméstico e industrial, comercializados principalmente como aerosoles más usados en ambientes cerrados y abiertos, el cual puede quedar suspendida en el aire y pudiendo ser inhaladas por la población, ocasionando peligros para la salud (Pubchem, 2021).

El piretroide aletrin, así como otros piretroides, tiene como diana los canales de sodio dependientes de voltaje del sistema nervioso. La acción sobre estos canales induce un periodo prolongado del tiempo de conducción del ion sodio, ocasionando un aumento de la hiperexcitabilidad y consecuentemente neurotoxicidad. La absorción de aletrin también se puede producir a través de la epidermis, constituyendo un factor de toxicidad de forma ocupacional, que podría verse reflejado en efectos neurotóxicos como temblores y convulsiones (Ramos-Chavez *et al*., 2015).

Es posible que el uso de productos que contengan piretroides como aletrin, sin las medidas de protección personal y de cuidado del ambiente, pueda traer como consecuencia la sobreexposición masiva o la ingestión accidental del insecticida en humanos y en los que la exposición al piretroide ocasiona diversos signos clínicos como dolor abdominal, náuseas, vómitos, así como signos sistémicos como fatiga, cefalea, visión borrosa, convulsiones y coma, que pueden ocurrir entre las 4 y 48 horas posteriores a la exposición. En otras especies como los roedores, se tiene conocimiento que, ante una exposición temprana a piretroides, esto puede conllevar a una alteración permanente a nivel de las

actividades dopaminérgicas, serotoninérgicas y colinérgicas. Algunos trastornos neurodegenerativos, tales como la enfermedad de Parkinson, el cual se caracteriza por presentar una pérdida de neuronas dopaminérgicas nigroestriadas, pueden ver favorecida su presentación gracias a estos efectos (Wang *et al*., 2020).

Por lo mencionado, la exposición de los humanos a este tipo de insecticidas y el potencial riesgo del desarrollo de trastornos neurodegenerativos ha conllevado a desarrollar estudios por modelos experimentales ya sea *in vivo* o *in vitro* a fin de comprender los mecanismos a nivel celular y molecular involucrados. Por ello, el presente estudio pretende aportar información *in vitro* que pueda evidenciar que la exposición al piretroide aletrin representa un factor de riesgo tanto en agricultura, ganadería y a nivel doméstico para la presentación de enfermedades neurodegenerativas, por lo tanto, es de gran importancia para la salud pública y podría ser un precedente a futuros estudios *in vivo.*

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 PIRETROIDES

2.1.1 Generalidades

Los piretroides son una clase de plaguicidas sintéticos biodegradables, de amplio espectro, menos tóxicos y altamente efectivos; sin embargo, a pesar de la amplia aplicación de piretroides, existen problemas, tales como resistencia a insecticidas, toxicidad letal / subletal para organismos acuáticos, mamíferos y otros organismos beneficiosos. Los piretroides son utilizados principalmente para el control de vectores como insectos, sin embargo, debe tenerse en cuenta los efectos tóxicos ocasionados en los organismos no objetivo tales como mamíferos, organismos acuáticos, etc. La resistencia a los piretroides está presente no solo en los mosquitos y otros insectos, sino también en los microorganismos ambientales, lo que da como resultado cepas de resistencia a los antipiretroides; además, los dibenzofuranos, producto de la fotodegradación, son perjudiciales para los mamíferos y el medio ambiente; los metabolitos pueden ser más tóxicos, causando mayor disrupción endocrina que los propios piretroides, esta situación podría incrementarse cuando existe la exposición a piretroides en nanoformas vertidas al medio ambiente (Zhu *et al*., 2020).

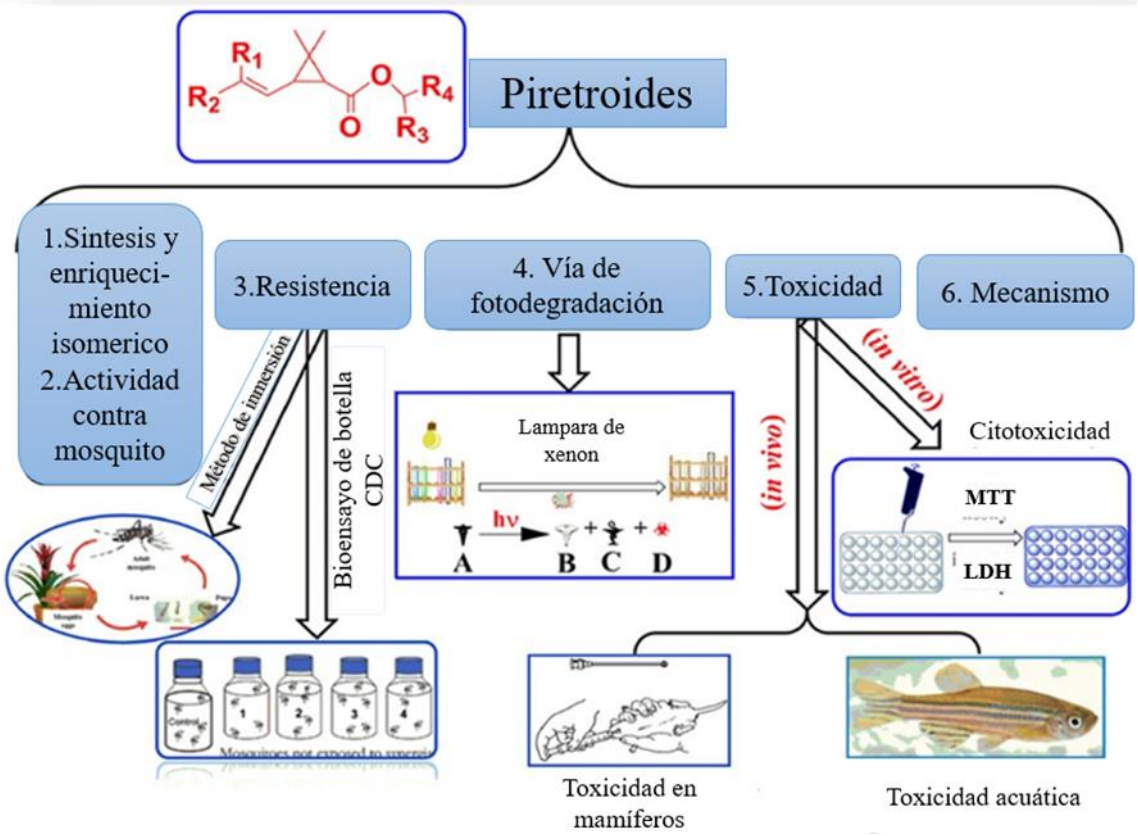


Figura 1. Síntesis, actividad insecticida, resistencia, fotodegradación y toxicidad de piretroides (Zhu *et al*., 2020).

En el siglo pasado, los piretroides se han utilizado para prevenir plagas y reducir las pérdidas de cultivos, sin embargo, su excesiva persistencia en el medio ambiente puede causar contaminación, como la de las aguas subterráneas, la interrupción de la producción agrícola, etc. Aunque se han hecho todos los esfuerzos posibles para reducir los efectos adversos de los insecticidas en el medio ambiente, todavía existe una necesidad urgente de explorar insecticidas más seguros; además, el rápido desarrollo de la resistencia a los insecticidas existentes también ha motivado la búsqueda de insecticidas más ecológicamente significativos (Spurlock y Lee, 2008; Dia et al., 2018; Okia et al., 2018).

2.1.2 Mecanismo de acción

Los canales de sodio activados por voltaje son las principales dianas de los efectos neurotóxicos de los piretroides en los insectos, mientras que los canales de calcio activados por voltaje y los canales de cloruro activados por voltaje son objetivos secundarios. Los piretroides afectan los canales iónicos de sodio en el sistema nervioso de los insectos, aumentan el tiempo de apertura, y finalmente estimulan las células nerviosas y causan parálisis. Además, las señales de calcio regulan una variedad de procesos de desarrollo neuronal, mientras que los canales de cloruro estabilizan el potencial de reposo de la membrana, regulan el volumen celular y el transporte transepitelial. Por otro lado, los canales de calcio dependientes de voltaje y los canales de cloruro pueden explicar la mayoría de los síntomas especiales de intoxicación causada por piretroides tipo II (Mukherjee *et al*., 2010; Soderlund, 2012; Frank *et al*., 2018).

Los piretroides tienen una alta tasa de absorción por vía oral en mamíferos como ratones y ratas, pero una baja tasa de absorción dérmica. En mamíferos, cuando la dosis oral administrada está por debajo del nivel seguro (<1/10 LD_{50}), los piretroides y sus metabolitos no se acumulan considerablemente en ningún tejido u órgano; además, las vías metabólicas constan de dos procesos principales: las reacciones de fase I que se dan por la oxidación e hidrólisis, y las reacciones de fase II que dan como producto sustancias hidrófilas y lipófilas, que serán excretadas rápida y completamente como residuos de piretroides ácidos o alcohólicos, unos días después de la exposición. Sin embargo, el carbono del grupo CN de los piretroides tiene un cierto grado de bioacumulación en la piel y el estómago, probablemente debido a su difusión en el líquido extracelular y a la unión con la albúmina sérica, lo que da como resultado tiocianato endógeno (Kaneko, 2010; Kaneko, 2011).

Debido a que los piretroides se metabolizan rápidamente y los metabolitos también se excretan fácilmente, no causan una bioacumulación grave en los mamíferos; sin embargo, los piretroides tienen un potencial moderado de biorretención en organismos acuáticos. Cuando los mamíferos (como los humanos) ingieren organismos acuáticos que están contaminados con piretroides, estos pueden causar toxicidad en mamíferos incluso acumulación en tejidos. Por encima de las dosis de seguridad, los mamíferos pueden desarrollar signos de intoxicación o incluso la muerte. Además, los piretroides podrían

acumularse de una generación a otra, cuando la madre está expuesta a piretroides, el recién nacido también puede desarrollar acumulación de piretroides después de tomar leche materna (Corcellas *et al*., 2012; Corcellas *et al*., 2015; Muggelberg *et al*., 2017).

El mal uso y el abuso de los piretroides traen consigo el desarrollo de resistencia anti-piretroides por diferentes insectos, siendo los mosquitos las especies con mayor número de casos reportados. Un abuso de estos compuestos reduce su eficacia y altera el mecanismo de acción de los piretroides debido a las resistencias en insectos. Por ejemplo, los vectores de la malaria tienen tres mecanismos principales de resistencia a los insecticidas: cambios en los genes o vías metabólicas, mutaciones en el sitio objetivo y engrosamiento epidérmico. El aumento de enzimas de desintoxicación como la monooxigenasa P450, glutatión *S*- transferasa y otras enzimas han acelerado el desarrollo de resistencia metabólica. Con relación a la resistencia fenotípica generalmente se asocia con mutaciones en los sitios diana de la enzima acetilcolinesterasa y del canal de sodio dependiente de voltaje. Las mutaciones en el sitio diana generalmente son causadas por alteraciones genéticas; por ejemplo, las mutaciones en la enzima acetilcolinesterasa y en el canal de sodio voltaje-dependiente son causadas por alteraciones en el gen *Ace-1* y gen *Vgsc*, respectivamente; además, los estudios también han indicado que el engrosamiento epidérmico también es uno de los mecanismos de resistencia, es decir, cuanto más gruesa es la cutícula de los insectos, más fuerte es la resistencia (Kwiatkowska *et al*., 2013; Edi *et al*., 2014; Ibrahim *et al*., 2016; Antonio-Nkondjio *et al*., 2017; Yahouédo *et al*., 2017; Hancock *et al*., 2018).

Se ha documentado que los organismos acuáticos desarrollan resistencia a los piretroides. Las altas concentraciones de piretroides en el agua o los sedimentos suelen ser fatales para los organismos acuáticos, pero la exposición también puede acelerar la evolución y el desarrollo de la resistencia a los insecticidas, a través de cambios en genes, vías metabólicas y mutaciones en el sitio diana de acción. Por lo tanto, la principal intención de las prácticas de manejo de plaguicidas es minimizar los desarrollos de resistencia a los piretroides (Phillips *et al*., 2012; Weston *et al*., 2013; Dong *et al*., 2014; Feyereisen *et al*., 2015; Major *et al*., 2018).

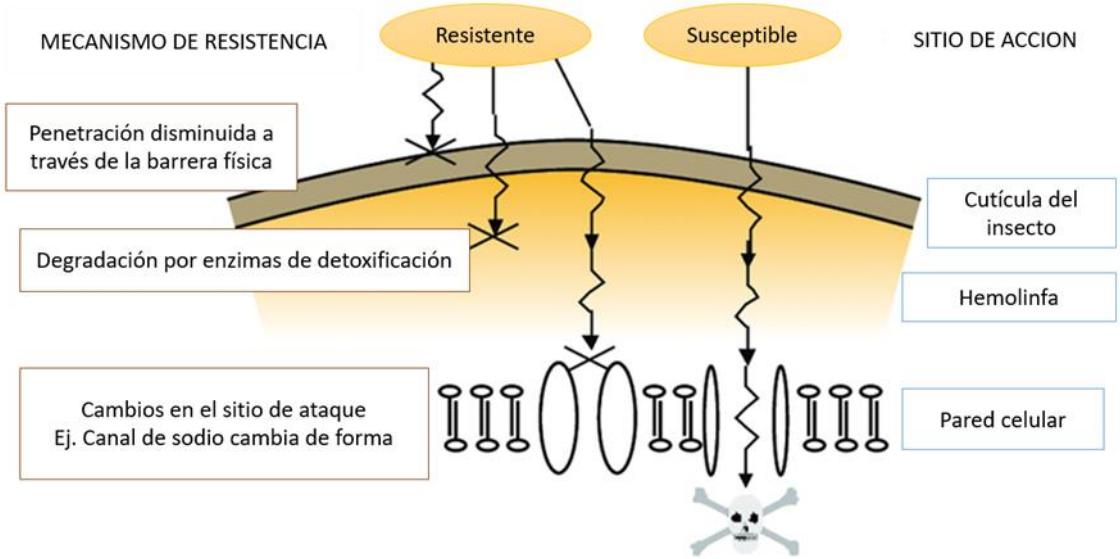


Figura 2. Mecanismos de acción de los piretroides y sus tres principales "dianas" de resistencia a los piretroides (Martin *et al*., 2002).

2.1.3 Clasificación

Las piretrinas son componentes tóxicos naturales con propiedades insecticidas que se encuentran en el extracto de piretro de las flores de *Chrysanthemum cinerariae folium.* Los piretroides son los derivados sintéticos obtenidos de las piretrinas, tienen propiedades insecticidas con baja toxicidad para los mamíferos y permanecen poco tiempo en el medio ambiente. Los piretroides se dividen en dos grupos según sus estructuras químicas: los piretroides de tipo I carecen de un grupo ciano en la posición α (como la permetrina), mientras que los piretroides de tipo II tienen un grupo α-ciano (como la cipermetrina), que muestra efectos toxicológicos distintivos sobre los organismos objetivo (Soderlund *et al*., 2002; Breckenridge *et al*., 2009).

Los principales efectos de intoxicación por piretroides están relacionados a signos de neurotoxicidad excitadora. Los piretroides son agrupados en dos subclases, tipos I y II. Los piretroides tipo I causan el síndrome de intoxicación T (temblor), que se caracteriza en ratas por comportamiento agresivo, hiperexcitación, ataxia, temblor de todo el cuerpo, convulsiones y en otros mamíferos por parálisis progresiva. Los compuestos piretroides de tipo I provocan descargas repetidas en respuesta a un único estímulo y producen hiperactividad y convulsiones que son evidentes durante la intoxicación, mientras que los

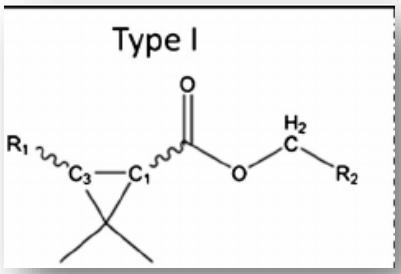
piretroides tipo II inducen un síndrome de coreoatetosis, conocido como " *Síndrome CS* " (coreoatetosis con salivación), que en ratas produce hipersensibilidad, coreoatetosis, temblores, convulsiones clónicas y salivación profusa; mientras que los piretroides de tipo II provocan una despolarización de la membrana acompañada de un bloqueo de la conductancia de impulsos y parálisis flácida de los insectos seguido de la administración intravenosa o intracerebral a roedores (Verschoyle y Aldridge, 1980; Narahashi, 1985; Soderlund *et al*., 2002).

El síndrome de tipo I afecta nervios periféricos, mientras que el tipo II, el sistema nervioso central. Luego de estudios con el piretroide del tipo II, deltametrina, se pudo demostrar la correlación de síntomas tipo II y la concentración de este piretroide en el cerebro. (Barnes y Verschoyle, 1974; Lawrence y Casida, 1982).

Se sabe que los canales de sodio son los sitios diana más importantes de los piretroides. Los piretroides parecen desestabilizar la activación del canal de sodio, lo que da como resultado retardo en la activación e inactivación del canal, modificando la configuración y la actividad hiperdespolarizante del canal de sodio. Estos cambios provocan un flujo prolongado de sodio hacia la célula, lo que produce una despolarización sostenida de la membrana. Aunque las acciones básicas de los piretroides sobre los canales de sodio son similares entre los dos tipos de piretroides, el grado de modificación de las corrientes de sodio es diferente; el flujo de sodio a través de sus canales se prolonga en mayor medida por efecto de los piretroides tipo II que los de tipo I. Algunos autores afirman que esta diferencia de comportamiento entre los dos grupos de piretroides puede estar vinculada no solo a la diferente afinidad de unión al sitio de los canales de sodio, sino también a las propiedades fisicoquímicas (por ejemplo, lipofilicidad), que permiten que estos compuestos permanezcan en la fase de membrana (Yamamoto *et al*., 1983; Soderlund y Bloomquist, 1989; Motomura y Narahashi, 2001).

Los principales mecanismos que subyacen a los efectos tóxicos de los insecticidas piretroides es modificar la cinética de las puertas de activación e inactivación de los canales de sodio activados por voltaje, resultando en una prolongación de la apertura del canal (Narahashi, 2000; Ray y Fry, 2006).

Piretroide	Canal Na+	Canal Ca2+	Canal Cl-
Tipo I			
S-Bioaletrin	I	I	I[a]
Cismetrin	I	I	I
Resmetrin	NE	NE	NE
Teflutrin	I	I	I
Bifetrin	I/II	I	I
Permetrin	I	II	I
Función mixta (Tipo I y Tipo II)			
Esfenvalerato	I/II	II	I
Fenpropatrin	I/II	I	II
Tipo II			
ß-Ciflutrin	II	II	II
Cipermetrina	II	II	II
λ- Cialotrin	II	II	II[b]
Deltametrina	II	II	II



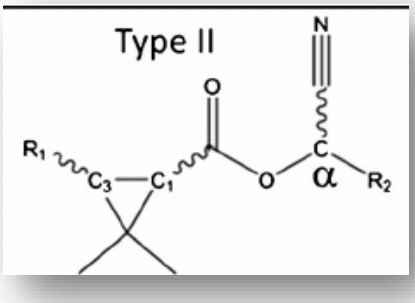


Figura 3. Clasificación de los piretroides Tipo I, tipo II y de función mixta, en base a su efecto sobre los canales de Na +, Ca 2+ y Cl (Breckenridge *et al*., 2009; Corcellas *et al*., 2015).

2.1.4 Toxicidad en mamíferos

Los piretroides son una clase de insecticidas sintéticos usados ampliamente en y alrededor de los hogares para controlar plagas. Las preocupaciones sobre la exposición a este grupo de pesticidas están relacionadas principalmente con su neurotoxicidad y la neurodegeneración dopaminérgica nigroestriatal observada en la enfermedad de Parkinson. El estrés oxidativo, inflamación, pérdida de células neuronales y disfunción mitocondrial son los principales mecanismos neurotóxicos, siendo los canales iónicos el principal objetivo; sin embargo, otros receptores, enzimas y varias vías de señalización también pueden participar en los trastornos inducidos por piretroides (Mohammadi *et al*., 2019).

2.1.4.1 Neurotoxicidad

El estrés oxidativo es un conjunto de alteraciones que se producen tras la exposición de tejidos biológicos, células y macromoléculas a un exceso de agentes oxidantes (Kudryavtseva *et al*., 2016). Las especies reactivas (radicales libres y especies reactivas de oxígeno) se producen durante el metabolismo de la célula, sin embargo, cuando se eleva su concentración, sea debido a una sobreproducción o como consecuencia de la disminución de los niveles de antioxidantes puede ser dañino para las células (Li *et al*., 2016). Los radicales libres no son los únicos responsables del estrés oxidativo, también existen otros elementos con diferente estructura química llamados "especies químicas oxidantes no radicales" que, a diferencia de los radicales libres, que poseen un electrón desapareado, tienen sus electrones pareados y ligados a enlaces covalentes, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Sies, 2015). A pesar de ser estructuralmente diferentes, ambos (radicales libres y especies químicas oxidantes no radicales) poseen una capacidad intrínseca oxidante. Generalmente cuando se habla de radicales libres, se refiere a moléculas que contienen oxígeno, como el anión radical superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales hidroxilo.

Las especies reactivas (RS) se dividen en especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS), especies reactivas de cloro (RClS), especies reactivas de azufre (RSS) y especies reactivas de bromo (RBrS), sin embargo, los más importantes son ROS y RNS. En todos los organismos aeróbicos existe un equilibrio redox entre las sustancias oxidantes producidas, incluyendo ROS, y el sistema de defensa antioxidante que tiene la función de prevenir y reparar el daño inducido por ellas (Sies, 2015). La sobreproducción de agentes oxidantes a consecuencia de un sistema defensivo eficaz podría, a largo plazo, desencadenar una cascada de reacciones oxidativas altamente dañinas para las células. Sin embargo, no todos los radicales libres deben considerarse dañinos, en condiciones normales, el organismo produce una pequeña cantidad, el cual juega un papel protector. Varios procesos bioquímicos en nuestro organismo producen continuamente ROS y otros RS (Uttara *et al*., 2009), y ciertas cantidades de sustancias oxidantes ayudan a mantener el correcto funcionamiento celular y los mecanismos de homeostasis (Alkadi, 2020).

El estrés oxidativo también es considerado el mecanismo más importante de la toxicidad de los plaguicidas, el cual es el resultado frente a la diferencia entre la producción de radicales libres y la defensa antioxidante, se dañan macromoléculas esenciales para llevar a cabo las funciones normales de una célula lo cual se puede traducir en diversos procesos patológicos. Durante el estrés oxidativo se generan grandes cantidades de radicales libres y para ello es necesario un alto consumo de oxígeno, por esta razón el sistema nervioso se vería fuertemente afectado debido a que es un tejido altamente metabólico. Se ha demostrado que en células nerviosas expuestas a la deltametrina aumentan los niveles de óxido nítrico y malondialdehido, este último, producto de la peroxidación lipídica inducida por radicales libres (Li *et al*., 2011; Romero *et al*.,2012; Nieradko-Iwanicka y Borzęcki, 2015; Ogaly *et al*., 2015).

Se ha reportado daño oxidativo en el cerebro de rata y otros tejidos por efecto de cipermetrin, observándose niveles elevados de nitritos (un indicador de estrés por nitrosamina) y malondialdehído (indicador de estrés oxidativo) en el cuerpo estriado. Los niveles de nitrito y la peroxidación de lípidos también aumentaron en sangre periférica de ratas expuestas a una dosis de cipermetrina que induce la neurodegeneración dopaminérgica nigroestriatal (Giray *et al*., 2001; Tripathi *et al*., 2014; Singh *et al*. 2016) Por otro lado, también se informó que la deltametrina es capaz de disminuir sustancialmente las actividades antioxidantes de SOD, CAT, GPx y GSH en el tejido cerebral de ratas. El estrés oxidativo causado por los piretroides genera vías de señalización, tales como Nrf2 y NF-kB, y también es capaz de conducir a la apoptosis debido a la disfunción mitocondrial (Martínez *et al*., 2018; Martinez *et al*., 2019).

Inflamación. La microglía, son los macrófagos del cerebro, los cuales ayudan al buen funcionamiento del mismo. La microglía proinflamatoria M1, actúa produciendo citocinas y proteínas proinflamatorias, también el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), la interleucina 12a (IL12a), CD16 (receptor Fc, FcyRIII) y el óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). La microglía antiinflamatoria M2, a su vez, produce varios componentes neuroprotectores como el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1) y el factor neurotrófico derivado del cerebro. Cuando la activación microglial es excesiva, se producen citocinas, quimiocinas y radicales libres, lo que está asociado a la enfermedad de Parkinson. En el cuerpo estriado de pacientes con enfermedad de

Parkinson y la sustancia negra contienen muchas células microgliales reactivas. La exposición a la cipermetrina provoca la activación microglíal y la posterior sobreexpresión de las proteínas proinflamatorias, siendo dicha inflamación clave para la degeneración de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales, y el factor de transcripción NF-kB regula los genes involucrados en respuestas inflamatorias. Normalmente NF-kB esta unido a la proteína inhibidora llamada IkB (inactiva) en el citoplasma; sin embargo, la estimulación externa desencadena la fosforilación de IkB a través del complejo de quinasa IkB (IKK). NF-kB se transloca al núcleo y estimula la transcripción de genes que inducen la respuesta de citocinas proinflamatorias como IL-1b y TNF-α (Tornatore *et al*., 2012; Edison *et al*., 2013; Agrawal *et al*., 2015; Singh *et al*., 2016; Takahashi *et al*., 2018).

Los niveles elevados de TNF-α pueden causar estrés oxidativo a través de la acumulación de ROS, y varios estudios han demostrado que la cipermetrina puede aumentar los niveles de TNF-α. También se ha demostrado que la cipermetrina aumenta los niveles de IL-1 en el cuerpo estriado del cerebro (Tiwari *et al*., 2012; Pacheco *et al*., 2014; Singh *et al*., 2016).

La apoptosis o muerte celular programada se desencadena por toxinas, radiación, hipoxia, estrés oxidativo, isquemia/reperfusión y daño del ADN. La vía mitocondrial (intrínseca) y la vía del receptor de muerte celular (extrínseca) son las dos principales vías de señalización que inducen apoptosis.

Se ha sugerido que la vía mitocondrial es la principal vía de apoptosis inducida por pesticidas como el paraquat, y varios estudios han demostrado que la exposición a piretroides afecta significativamente la supervivencia de las neuronas en el cerebro de la rata a través de la apoptosis mitocondrial (Fei *et al*., 2008; Eum K-H y Lee, 2011; Cottini *et al*., 2014; Redza-Dutordoir y Averill-Bates, 2016; Hsu *et al*., 2018).

Los piretroides pueden desencadenar la apoptosis a través de ROS como H_2O_2 u OH y citotoxinas. Por ejemplo, se ha demostrado que la deltametrina induce la apoptosis en las células neuronales de la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado. La apoptosis también puede desencadenarse a través del daño mitocondrial y la activación de caspasa-3 y 9, como se evidencia para ciflutrin en células SH-SY5Y. La caspasa-3 tiene una función vital en las vías extrínsecas e intrínsecas de la apoptosis. En un estudio de Gasmi

et al. (2017) la exposición a deltametrina resultó en una mayor actividad de la caspasa-3, seguido de apoptosis, lo que confirmó el daño mitocondrial (hinchazón y permeabilidad); así mismo, otros estudios indican que los piretroides son capaces de inducir una mayor actividad de la caspasa-3 como lo refiere Gasmi *et al*. (2017) (Li *et al*., 2007; El-Demerdash, 2011; Martinez *et al*., 2010; Martínez *et al*., 2020).

El estrés induce daño del ADN, incrementándose la expresión de la proteína p53, este a su vez incrementa los niveles de gen apoptótico COX2, que generalmente se expresa en el cerebro; por lo tanto, p53 juega un papel crítico en la apoptosis. Galal *et al*. (2014) publicaron que la deltametrina aumentaba la expresión de ARNm de p53 y COX2; asimismo, se reportó que cipermetrin aumentaba la expresión de p53 junto con caspasa-3 en el cuerpo estriado y la sustancia negra de rata, y estos hallazgos se asociaron con apoptosis. Asi mismo, en células cerebrales de la carpa común (*Cyprinus carpio*) se pudo demostrar que el piretroide cipermetrin fue capaz de producir apoptosis a través de la vía extrínseca de muerte celular, lo que se determinó por los niveles elevados de caspasa 8 (Kumagai *et al*., 2015; Singh *et al*., 2016; Arslan *et al.,* 2017).

Una de las vías importantes que regulan la apoptosis involucra las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), que también participan en el desarrollo de trastornos neurodegenerativos y se han informado en la apoptosis inducida por pesticidas en células de neuroblastoma humano (SH- SY5Y). Se ha podido determinar que los piretroides serían capaces de alterar la vía de señalización intracelular MAPK en el cuerpo estriado y la sustancia negra (Ray *et al*., 2015). En otro estudio, Park *et al*. (2017) observaron que la activación de la vía de señalización MAPK fue inducida en células neuronales por el piretroide deltametrina.

2.1.4.2 Toxicidad reproductiva

Los piretroides son considerados disruptores endocrinos. Muchos estudios han implicado los efectos de los piretroides sobre el eje hipotálamo-pituitaria-gónada (HPG), sin embargo, pocos explican sus efectos en mamíferos y humanos, especialmente los nuevos avances de investigación realizados en esta área (Madhubabu y Yenugu, 2014).

Las principales vías de exposición de los insecticidas piretroides en mamíferos son la ingestión y la absorción dérmica tras exposición ambiental. Los piretroides se metabolizan rápidamente en los seres humanos con una vida media de aproximadamente 6 horas mediante hidrólisis y oxidación. Los metabolitos de los piretroides se unen con moléculas endógenas las cuales son excretadas en la orina, estos metabolitos urinarios se utilizan como biomarcadores para evaluar la exposición de piretroides en humanos. Los principales metabolitos utilizados como biomarcadores para controlar la exposición a piretroides en humanos incluyen ácido 3-fenoxibenzoico (3-PBA), ácido 4-fluro-3-fenoxibenzoico (4-F-3-PBA), cis- y trans- (2, 2). ácido-diclorovinil) -2,2-dimetilciclopropano-1-carboxílico (cis- y trans-DCCA) y ácido cis- (2, 2-dibromovinil) -2,2-dimetilciclopropano-1-carboxílico (cis-DBCA). Por ejemplo, la tasa de detección de 3-PBA en orina fue de hasta 98,7% en 463 niños de procedencia china. En 132 personas sanas del norte de Polonia, los niveles de 3-PBA fueron superiores al límite de detección en el 79,7% de todas las muestras de orina; asimismo, se hallaron metabolitos de piretroide en el 94% en la orina de mujeres embarazadas en 10 países del Caribe. Sin embargo, solo unos pocos estudios se centraron en las asociaciones entre la exposición a los piretroides y los resultados reproductivos en humanos (Leng *et al*., 1997; Stout *et al*., 2009; Barr *et al*., 2010; Ding *et al*., 2012; Wielgomas *et al*., 2013; Dewailly *et al*., 2014; Saillenfait *et al*., 2015; Chen *et al*., 2016; Ye *et al*., 2017).

Algunos estudios epidemiológicos han informado asociaciones de los niveles de metabolitos piretroides en orina con las hormonas reproductivas producidas por el eje hipotalámico-pituitario-gonadal (HPG) en los hombres adultos. En un estudio, Yoshinaga *et al*. (2014) informaron una asociación negativa de trans-DCCA con testosterona y una relación positiva de los niveles urinarios de 3-PBA con los niveles séricos de LH y FSH en hombres adultos estadounidenses. También encontraron una correlación positiva entre los niveles urinarios de 3-PBA y LH sérica en pacientes chinos con infertilidad masculina. Se podría decir que los piretroides pueden tener efectos inhibidores sobre la producción de esteroides en los hombres, lo que, a su vez, podría aumentar la producción de FSH y LH pituitaria por retroalimentación negativa del eje HPG (Perry *et al*., 2007; Han *et al*., 2008; Meeker *et al*., 2009; Ji *et al*., 2011; Radwan *et al*., 2014; Yoshinaga *et al*., 2014).

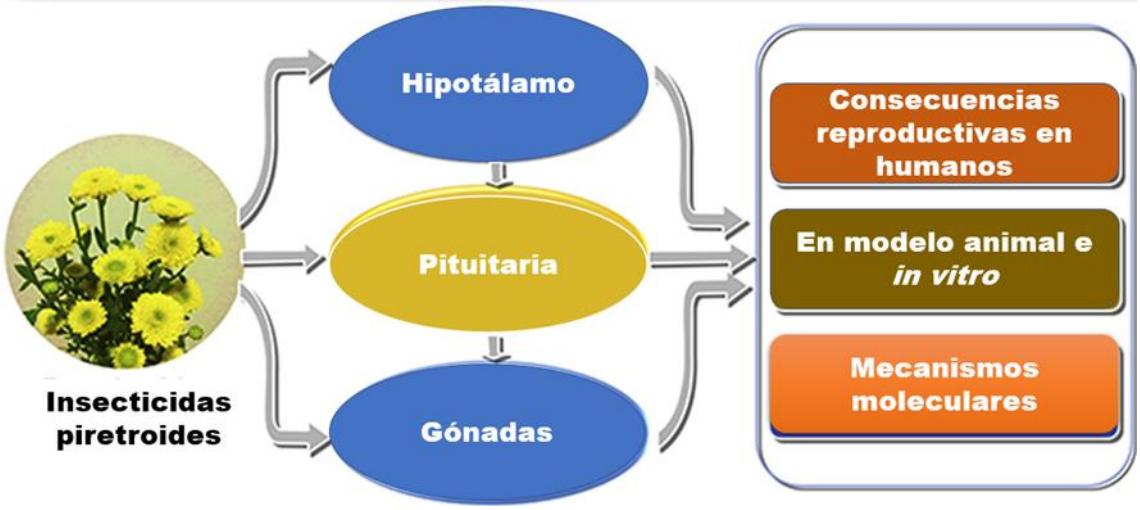


Figura 4. Efectos de los insecticidas piretroides en el eje hipotalámico-pituitario-gonadal (Ye y Liu, 2019).

2.1.4.3 Otras toxicidades

La deltametrina presenta efectos tóxicos bajos en los animales. Por ejemplo, perros de raza Beagle fueron expuestos a la deltametrina durante 24 meses a dosis de 1, 10 y 40 µg/g, no se hallaron efectos adversos; sin embargo, a una dosis de 10 mg / kg de peso corporal por día, se observaron cambios en los parámetros bioquímicos en la sangre, convulsiones y movimientos anormales. Cabe señalar que la DL50 para ratas es de 30 mg / kg a 5000 mg / kg, para conejos 2000 mg / kg para exposición cutánea, para ratas de 700 mg / kg a 2940 mg / kg. La toxicidad respiratoria de la deltametrina en ratas es baja. La CL50 por inhalación de 4 h es de 2,2 mg / L y la CL50 para una exposición de 2 h es de 4,6 mg / L (Khalatbary *et al*., 2015).

Se han observado cambios en la respuesta inmune en ratas dosificadas con deltametrina por vía oral durante 84 días a dosis de 6 mg/kg, o durante 14 días a dosis de 15 mg/kg, así como la disminución de la cantidad y función de linfocitos, células formadoras de placa esplénica y linfocitos formadores de rosetas. Se ha demostrado la afinidad de deltametrina por los receptores CD45 y CD28, y dependiendo de la concentración, es capaz de inducir la apoptosis de esplenocitos murinos y de células del timo en ratas. En resumen, deltametrina es un potente agente inmunotóxico que afecta tanto a la inmunidad

humoral como celular (Kumar *et al*., 2016; Kumar y Sharma, 2015; Skolarczyk *et al*., 2017; Kumar *et al*., 2018).

En ratones expuestos a deltametrina se puede observar un aumento de la actividad de superóxido dismutasa (SOD) y alanina aminotransferasa (ALT); asimismo, la deltametrina disminuye los niveles de eritrocitos y la actividad del glutatión peroxidasa (GPx) en sangre. La administración oral de deltametrina a 5mg/kg, induce estrés oxidativo y activa la vía mitocondrial de la apoptosis mediante la activación de caspasas. Por otra parte, también se ha demostrado que la deltametrina es capaz de activar la vía de señalización de caspasa-3 sobre las células del bazo, induciéndolas a la apoptosis (Kumar y Sharma, 2015; Kumar et al., 2018).

Se ha demostrado que el piretroide deltametrina administrado por vía oral a dosis de 1,5 y 35 mg / kg, induce hepato y nefrotoxicidad en ratas, encontrándose que la deltametrina causa cambios en los niveles del producto de peroxidación lipídica (MDA) y disminuye la capacidad antioxidante celular a través de la disminución de las actividades de SOD y catalasa (CAT), también se observó un aumento de la actividad de ALT y aspartato aminotransferasa (AST), así como una disminución de la concentración de GSH, lo que puede indicar hepatotoxicidad. Así mismo, se ha observado que la glutamina podría ser protectiva frente a la hepatotoxicidad inducida por los piretroides (Gündüz et al., 2015).

Otro estudio también demostró que la deltametrina, a dosis de administración oral de 2mg/kg por cuatro semanas, indujo nefrotoxicidad; así mismo, cambios en los parámetros bioquímicos séricos, tales como urea, creatinina, ácido úrico y daño renal. Además, la deltametrina redujo la actividad de la acetilcolinesterasa (ACh) en la sangre y provocó cambios en los niveles del factor de necrosis tumoral α (TNF-α). Sin embargo, estos efectos de la deltametrina podrían disminuir si se usaran dosis moderadas de ceftriaxona y ácido úrico (Abdel-Daim y El-Ghoneimy, 2015).

2.1.5 Usos y contaminación ambiental

Los piretroides son una clase de insecticidas orgánicos sintéticos derivados de las piretrinas y debido a su efectividad y baja toxicidad comparado con organofosforados y carbamatos vienen siendo utilizados desde la década de 1980 (Yoo et al., 2016). El mercado mundial de piretroides sintéticos está valorado en 1633,03 millones de dólares en 2016 (QYResearch Group, 2017). De acuerdo a su uso, los piretroides se pueden dividir en piretroides agrícolas (alfa-, con toxicidad media) y piretroides urbanos (que no contienen alfa-, con baja toxicidad); asimismo, los piretroides son empleados en productos de cuidado personal como champú y perfume repelente de mosquitos.

En los últimos años, la cipermetrina, deltametrina, fenpropatrin, esfenvalerato, bifentrin, permetrin, λ-cialotrin y ciflutrin han sido utilizados ampliamente a nivel mundial (Gong, 2013). Los pesticidas piretroides tienen menor potencial de contaminar el medio ambiente en comparación con los pesticidas tradicionales, sin embargo, pueden ingresar por la cadena alimentaria y son muy tóxicos para el medio ambiente acuático, causando efectos negativos a largo plazo (Zhao, 2014).

Los piretroides pueden causar enfermedades crónicas y afectar el sistema nervioso, cardiovascular, inmunológico y genético, induciendo teratogenicidad, carcinogenicidad y mutagenicidad a los organismos cuando son expuestos a dosis bajas de manera prolongada. Koureas *et al*. (2012) demostraron los efectos adversos al sistema reproductor masculino a la exposición a piretroides. Radwan y col. (2014) encontraron que los niveles urinarios de metabolitos de piretroides están relacionados significativamente con la aneuploidía de los espermatozoides.

En Shanghai y Shanxi en China, un estudio muestra que pacientes tienen las concentraciones medias geométricas de los metabolitos piretroides en la orina más altas que la de niños sanos, lo que sugiere la asociación a un mayor riesgo de tumores cerebrales infantiles, leucemia linfocítica aguda infantil y enfermedad coronaria a la exposición de los piretroides (Ding *et al*., 2012; Chen *et al*., 2016; Han *et al*., 2017). Además, los niños con niveles urinarios de ácido 3-fenoxibenzoico (3-PBA) por encima del límite de detección (LOD) tienen el doble de probabilidades de tener un trastorno por

déficit de atención con hiperactividad en comparación con aquellos con niveles urinarios de 3-PBA por debajo del LOD; los síntomas de hiperactividad-impulsividad aumentaron en un 50% por cada aumento de 10 veces en los niveles de 3-PBA (Wagner-Schuman *et al*., 2015).

En el 2015, se midieron pesticidas en el polvo de alfombras de las casas de 277 niños con leucemia y 306 controles en el norte y centro de California, Estados Unidos, los residuos de piretroides derivaron de tratamientos de plagas en el hogar y el jardín. Se detectó ciflutrin en 25% y cipermetrina en 49% de los hogares, siendo la permetrina el que tuvo la concentración media más alta de 1062 ng/g^{-1} (Deziel *et al*., 2015).

Los piretroides han sido investigados a nivel mundial. Li et al. (2018) reportaron su hallazgo en sedimentos y sus efectos tóxicos en invertebrados bentónicos; sin embargo, se considera que faltan más investigaciones sobre insecticidas piretroides en otra variedad de medios a nivel global.

La cipermetrina y el fenvalerato son piretroides agrícolas, siendo la cipermetrina el piretroide más reportado en medio ambiente y organismos vivos (102 veces), con excepción de los seres humanos; a su vez, el fenvalerato (incluidos fenvalerato y *cis*-fenvalerato) se reportó 59 veces. Las concentraciones de estos piretroides (cipermetrina y fenvalerato) disminuyen en el siguiente orden: cultivos > sedimentos > suelos > agua, mientras que la frecuencia de detección de la cipermetrina - fenvalerato en estos medios fue de 52,5 - 27,5%, 44,4 - 33,3%, 57,9 - 33,3% y 44,0 - 26,0%, respectivamente (Tang *et al*., 2018).

Si bien el uso de plaguicidas es generalmente superficial en la agricultura y los piretroides se mueven rápidamente en arroyos y ríos, éstos se acumulan en suelos o ingresan a los ríos por efecto de las lluvias y otros mecanismos que le sirven de transporte, disminuyendo su concentración en el trayecto; sin embargo, se han encontrado algunas concentraciones de cipermetrina y fenvalerato más altas en los sedimentos que en los suelos y el agua, posiblemente debido a sus propiedades hidrófobas. Se ha detectado cipermetrina y fenvalerato en entornos de áreas residenciales, organismos acuáticos y organismos, aunque los datos disponibles fueron limitados (Riederer *et al*., 2010).

Deltametrina es también un piretroide agrícola, el cual ha sido reportado con mucha frecuencia en el medio ambiente, donde se ha observado su permanencia. Deltametrina muestra una distribución equilibrada en comparación con la cipermetrina y el fenvalerato entre los medios ambientales y los organismos (entre el 21,4% y el 42,9%). Las concentraciones más altas (59,74 μg g^{-1}) han sido halladas en los sedimentos de los ríos en Hanoi y Ciudad Ho Chi Minh, Vietnam. Así mismo, se detectaron altas concentraciones en el tejido adiposo adyacente a los tumores mamarios en perras de Brasil (55,00 μg g -1) y en muestras de polvo de entornos residenciales en Berlín (54,50 μg kg^{-1}) (Olutona *et al*., 2016).

La permetrina se usa en productos para el hogar como acaricida, insecticida, también en lociones para piel y champús para el tratamiento médico de piojos y ectoparásitos como la sarna, este piretroide es el segundo detectado con mayor frecuencia (Olutona *et al*., 2016).

Olutona *et al*. (2016) reportaron en entornos residenciales 73 veces la permetrina, con la más alta concentración (800,00 mg kg^{-1}) y una frecuencia de detección de 65%, seguida de sedimentos, con una concentración de 6410,00 ng g^{-1}y frecuencia de detección del 46,3%; sin embargo, los niveles de permetrina en otros medios, fueron mucho más bajos.

La permetrina y la bifentrina, al no tener el grupo ciano en su estructura, los hace menos tóxicos que la cipermetrina y la deltametrina. La bifentrina solo se informó una vez en área residencial, lo que sugiere que es raro su uso como insecticida doméstico. Sin embargo, fue el piretroide más comúnmente detectado en California y su mayor frecuencia de detección fue en sedimentos (44,5%). La bifentrina también se detectó con frecuencia en el agua de la cuenca del río Pearl y en el agua de mar de Fujian en el sur de China. Las frecuencias de detección de la permetrina en agua y cultivos fueron de 22,0% y 17,5%, respectivamente, sin embargo, las concentraciones son más altas en cultivos que en agua. Los principales metabolitos de permetrina y cipermetrina, 3-PBA, *cis* -DCCA y *trans* -DCCA se detectaron comúnmente en el cuerpo humano. Esto comprueba el libre uso de la permetrina y cipermetrina en China y otros (Tang *et al*., 2018).

Si bien es cierto que los reportes apuntan a que los residuos son más frecuentes en sedimentos, agua y cultivos que en el cuerpo humano y áreas residenciales, esto puede deberse a la facilidad de recolección de las muestras o a las frecuencias y alcance del uso de los plaguicidas. A pesar de las dificultades de seguimiento, se debe prestar más atención a los residuos de plaguicidas en entornos residenciales y en el humano (Tang *et al*., 2018).

2.2 PIRETROIDE ALETRIN

2.2.1 Estructura

El insecticida aletrin es un compuesto piretroide Tipo I cuya composición química es Ácido ciclopropanocarboxílico, 2,2-dimetil-3- (2-metil-1-propenil) - , 2-metil-4-oxo-3- (2-propenil) -2-ciclopenten-1-ilo éster.

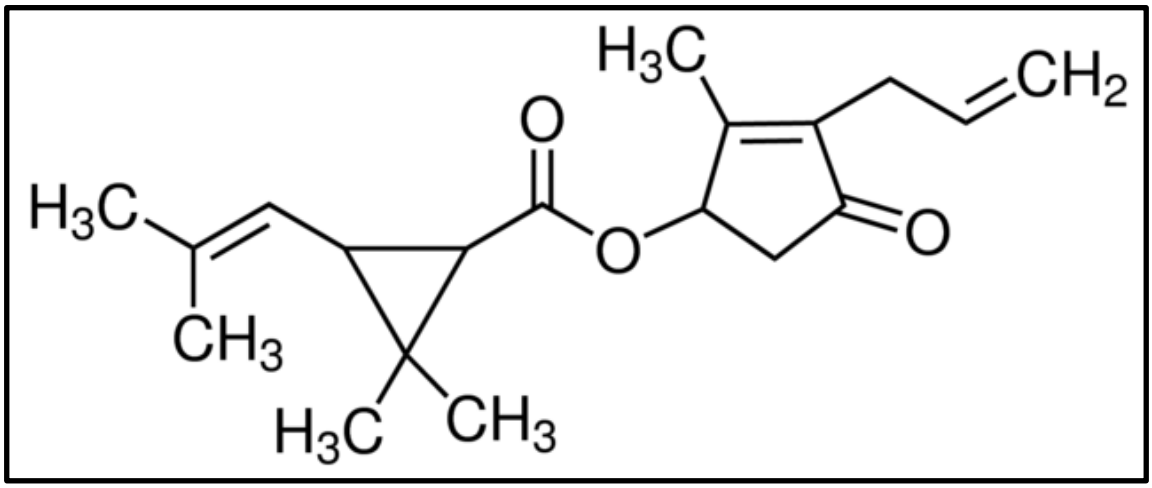


Figura 5. Estructura química del piretroide Tipo I aletrin (Sigma Aldrich Co.).

2.2.2 Propiedades químicas y físicas

Aletrin es como un líquido viscoso de color ámbar claro, insoluble y más denso que el agua y es tóxico por las vías oral, inhalatoria y cutánea, es un insecticida doméstico sintético frente a moscas, mosquitos, insectos de jardín, etc, que se vaporiza sin descomponerse cuando se calienta a 150°C, y que tiene un punto de fusión de -40ºC y un punto de inflamación mayor de 60ºF, y si es calentado hasta la descomposición elimina vapores acres. Su solubilidad es de 1.52e-05 M con una densidad relativa de 1.01, lo que

determina su carácter aceitoso y de color amarillo pálido. Su gravedad específica es de 20/4: 1,005-1,015, con una presión de vapor: 1.2X10-4 mm Hg a 30°C y miscible con la mayoría de disolventes orgánicos a 20-25°C. Su relación con la Constante de Henry = 1.04X10-7 atm-cu m/mol a 21°C, siendo más estable a la luz UV que las piretrinas naturales, aunque también puede ser descompuesto por la luz UV (Hartley y Kidd, 1987; Pubchem, 2021). Estructuralmente, aletrin se clasifican como un piretroide de tipo I, ya que carece de un sustituyente alfa-ciano (Tomlin, 2004).

2.2.3 Cinética y metabolismo

Diversos estudios han demostrado la capacidad de absorción y metabolismo del piretroide Tipo I aletrin. Cuando el piretroide aletrin-radiactivo es administrado oralmente a los mamíferos, se absorbe rápidamente en el tracto intestinal y se distribuye en cada tejido examinado en ratas (isómero trans a dosis: 500 mg/kg; intervalo 20 días; orina 36%; heces 64%; total 100%.). Los piretroides como aletrin se absorben a través de la piel intacta cuando se aplican tópicamente. Los animales que han sido expuestos a aerosoles de piretrinas con la liberación de butóxido de piperonilo al aire, poco o nada de la combinación se absorbió sistémicamente; por ende, aunque la absorción es limitada, ésta puede explicar la baja toxicidad de algunos piretroides; así mismo, la rápida biodegradación de las piretrinas por las enzimas hepáticas de mamíferos (hidrólisis y oxidación de ésteres) es probable que sea el factor principal de la rápida eliminación de estos compuestos, lo que además permite una rápida excreción de sus metabolitos, principalmente por el riñón (USEPA, 1999).

En otro reporte, no se observaron diferencias importantes metabólicas entre sexos, entre los grupos de dosis baja y alta, ni entre los grupos de dosis única y los grupos de dosis repetida. La mayor parte de la radiactividad se eliminó en 3 días; mientras que, la eliminación urinaria osciló entre aproximadamente el 25 y el 50%, y la eliminación fecal osciló entre el 50 y el 70%. No hubo bioacumulación de residuos en los tejidos (USEPA, 2007).

En un estudio, se administró aletrin vía oral por 48 horas a ratas macho Sprague Dawley, marcada con C^{14} a las dosis de 1 a 5 mg/kg de peso corporal, encontrándose una eliminación en la orina del 30% y 20,7%, respectivamente y en heces en un 29% y 27%,

respectivamente. Los metabolitos excretados eran en forma de éster junto con dos productos hidrolizados (ácido dicarboxílico de crisantemo CDCA y aletrona) (OMS, 1989). Después de la administración de aletrin radiomarcado en ratas machos, los principales metabolitos encontrados fueron alcohol-ácidos por espectro de masas, se identificó un tercer metabolito de aletrin, un ciclopropano metil hidroxilado y oxidación del transmetilo a un grupo carboxilo. Aletrin se oxida no solo en el resto de isobutenilo de crisantemato al correspondiente alcohol primario, sino también en el grupo alilo a derivados de 1'-hidroxiprop-2'-enilo y 2 ', 3'-dihidroxipropilo, o en un grupo metilo en el resto ciclopropilo a un derivado hidroxi, también puede convertirse en ácido dicarboxílico de crisantemo y aletrolona; o cuando se aplica por via tópica, la cromatografía indicó la presencia de aletrona y ácido crisantémico además de aletrina y tres compuestos no identificados (Elliott et al., 1972).

2.2.4 Toxicidad del piretroide aletrin

2.2.4.1 Neurotoxicidad

En un estudio realizado por Mubarak et al. (2006), respecto a la neurotoxicidad inducida por aletrin, se pudo observar su efecto sobre los niveles extracelulares de dopamina y los metabolitos de este neurotransmisor en el cuerpo estriado de ratas conscientes mediante microdiálisis. Las ratas fueron tratadas con aletrin y un vehículo, lo que duplicó el efecto del aletrin sobre la liberación de dopamina. El aumento en el nivel extracelular de dopamina estriatal a 10 mg/kg de aletrin alcanzó un máximo del 178% del valor basal, pero a 20 y 60 mg / kg de peso corporal inhibieron la liberación de dopamina hasta niveles de 63% y 52% del valor basal con un efecto máximo a los 60-80 min. Aletrin alteró los niveles extracelulares de los metabolitos de dopamina DOPAC, 3-MT y HVA a 20 y 60 mg / kg de peso corporal, asimismo, la recaptación de dopamina disminuyó en ratas expuestas a 60 mg/kg de aletrin, demostrándose con estos datos que la liberación de dopamina estriatal y la recaptación de dopamina se ven afectadas de forma diferencial por los piretroides de tipo I como aletrin, lo que indica que los circuitos dopaminérgicos, en particular la dopamina estriatal, pueden ser lugares dianas de aletrin mediante múltiples mecanismos que impliquen la liberación de neurotransmisores.

2.2.4.2 Efectos reproductivos

Se sabe que los piretroides son neurotóxicos; sin embargo, no se han aclarado sus efectos tóxicos (incluido del aletrin) en el tracto reproductivo del macho. En un estudio realizado por Madhubabu y Yenugu (2014), al administrar aletrin vía oral a ratas machos adultas a dosis de 25, 50, 100 y 150 mg/kg de peso corporal durante 60 días, se observó un incremento de la peroxidación lipídica ($p<0,001$) en las células del testículo, la producción de óxido nítrico también se incrementó ($p<0,001$) en la cabeza del epidídimo, pero no se alteró en la cola del epidídimo ni en los testículos. Por otro lado, en este mismo estudio las actividades de las enzimas catalasa, el glutatión peroxidasa, el glutatión-S-transferasa y el superóxido dismutasa disminuyeron en la cabeza y la cola del epidídimo por efecto de aletrin. Así mismo, en los epidídimos y testículos, se observó un daño en la citoarquitectura tubular como congestión, degeneración del revestimiento de las células epiteliales, edema intestinal, y se observó la presencia de células espermátidas muertas y degeneración de forma dosis-dependiente. También se pudo observar que aletrin tuvo un efecto reductor de la expresión de genes implicados en la espermatogénesis (Tgf-beta1), la maduración de los espermatozoides (Spag11e) y la función de los espermatozoides (Defb22). Además, en este estudio se observó la disminución de la expresión del gen p53 y el aumento de la expresión de MAPK (p42/p44) en los tejidos del tracto reproductor masculino de las ratas. Los resultados de este estudio demuestran que la exposición oral a la aletrin podría afectar la fertilidad y contribuir a la desregulación del ciclo celular en el tracto reproductivo masculino.

2.2.4.3 Efectos genotóxicos

Los piretroides como permetrina y aletrin, a menudo se combinan para su uso a gran escala en programas de salud pública para controlar las enfermedades transmitidas por vectores. Existe un potencial genotóxico en la fórmula comercial permetrin y aletrin y para evaluar la genotoxicidad, se realizó un estudio por Ramos-Chavez *et al*. (2015) donde utilizaron cultivos de linfocitos de sangre periférica humana, usándose el ensayo de citoma de micronúcleos de bloqueo de citonesis (CBMN cyt), se midió la frecuencia de micronúcleos (MN), el índice de división nuclear (NDI), la formación de puentes nucleoplasmáticos (NPB) y brotes nucleares (NBUD), apoptóticos y células necróticas. La concentración más alta, aumentó la frecuencia de MN y el número de células apoptóticas luego de 24 o 36 horas de incubación. El NDI disminuyó después del

tratamiento con ambas concentraciones permetrin/aletrin en 24 o 36 hrs. La exposición a la mezcla de permetrina/aletrin no alteró significativamente la formación de NBUD, NPB o el porcentaje de células necróticas. La frecuencia de MN se correlacionó significativamente con el número de células apoptóticas y necróticas, pero se correlacionó inversamente con NDI. Los datos demostraron que una mezcla de permetrin y aletrin inducía daño citotóxico y genotóxico dependiente de la concentración y del tiempo en linfocitos de sangre periférica humana *in vitro*.

2.3 CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y

El uso de neuronas primarias derivadas de los tejidos embrionarios del sistema nervioso central mamífero es limitado, debido a que estas células una vez diferenciadas a neuronas maduras, ya no pueden realizar los mecanismos de mitosis. Las líneas celulares transformadas de tipo neuronal son usadas en investigaciones *in vitro* por superar esta limitación. Sin embargo, existen varias advertencias en el uso de células derivadas de tumores malignos. El cultivo de células proporciona una gran plataforma eficiente para la investigación en los campos de la neurobiología y neurociencias, teniendo la capacidad de comprender, aún más, los mecanismos moleculares de muchas patologías, evaluaciones toxicológicas preliminares, entre otras (Shipley *et al*., 2016).

Las células de la sub línea celular SH-SY5Y (ATCC ® CRL-2266 ™), son subclones de la línea celular de neuroblastoma parental SK-N-SH (ATCC ® HTB-11). Esta línea celular parental se generó en 1970 a partir de una biopsia de médula ósea de un tumor ósea metastásico que contenía células similares a neuroblastos y células epiteliales, una vez obtenida la línea parental, fueron subclonados tres veces; primero a SH-SY, luego a SH-SY5, y finalmente a SH-SY5Y (Biedler *et al*., 1976).

Las células SH-SY5Y son similares a los neuroblastos, presentan un cariotipo estable que consta de 47 cromosomas, y se pueden diferenciar de un estado similar de un neuroblasto a neuronas humanas maduras usando diversos mecanismos que incluyen el uso de ácido retinoico (RA), ésteres de forbol y neurotrofinas específicas como el factor neurotrófico derivado del cerebro. Los estudios sugieren que es posible seleccionar subtipos de neuronas específicas, tales como las adrenérgicas, colinérgicas y dopaminérgicas, usando

diferentes métodos (Biedler *et al*., 1975; Xie y Li, 2010). Este último aspecto hace que las células SH-SY5Y sean útiles para multitud de experimentos de neurobiología en sistemas *in vitro*.

La manipulación del medio de cultivo en las células de neuroblastoma SH-SY5Y, logrando la diferenciación de éstas han proporcionado numerosos beneficios en el campo de la investigación en neurociencia. Las ventajas incluyen la capacidad de expansión a gran escala antes de la diferenciación con relativa facilidad y bajo costo para el cultivo, además, usar líneas celulares, apoya las consideraciones éticas en contraste con el cultivo neuronal humano primario (Kovalevich y Langford, 2013). Al ser derivadas del ser humano, las células SH-SY5Y, expresan varias proteínas e isoformas de proteínas específicas humanas que no estarían inherentemente presentes en los cultivos primarios de roedores, además, la diferenciación sincroniza el ciclo celular, logrando producir poblaciones celulares neuronales homogéneas (Encinas *et al*., 2000).

Los modelos experimentales *in vitro* tradicionales utilizados en neurobiología, incluyen cultivos neuronales primarios de ratas y ratones, líneas celulares de neuroblastoma que incluyen células B35 de ratas (Otey *et al*., 2003), células Neuro-2A de ratón (LePage *et al*., 2005) y células PC12 de rata (Shafer y Atchison, 1991). Aunque el uso de tales líneas celulares ha avanzado significativamente en el campo, existen varios factores de confusión asociados con el manejo de células y tejidos no humanos. Estos incluyen comprender las diferencias específicas de la especie en los procesos metabólicos, los fenotipos de manifestación de la enfermedad y la patogénesis en comparación con los humanos. También es importante tener en cuenta que existen diferencias significativas entre la expresión génica de ratones y humanos y la señalización del factor de transcripción, destacando las limitaciones de los modelos de roedores y la importancia de comprender qué vías se conservan entre roedores y humanos (Xie y Li, 2010). Cabe resaltar que las neuronas pueden tener cariotipos inestables, lo que dificultaría estudios de expresión genética y estudios reproducibles de señalización celular, por ello, se necesitaría desarrollar modelos más estables de enfermedad neurológica humana (Shipley *et al*., 2016).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

El estudio se llevó a cabo en las instalaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en el Laboratorio de Fisiología Animal se realizaron los ensayos moleculares, los estudios de viabilidad celular y los de estrés oxidativo y en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, los de cultivos celulares.

3.2 MATERIALES Y EQUIPOS

3.2.1 Materiales y reactivos

- Agua ultrapura.
- Cinta Masking Tape.
- Cofias.
- Contenedores de plástico (7 litros).
- Filtros de jeringa estériles (0.20 µm).
- Frascos para cultivo celular estériles de 25 cm^2.
- Gradilla para tubos cónicos de 50 ml.
- Guantes.
- Jeringas de 10 ml estériles con aguja 21 x 1 ½".
- Mascarillas.
- Papel absorbente para limpieza de materiales y equipos.
- Pipetas estériles de 10 ml.
- Plumón marcador indeleble.
- Recipientes para desechos.
- Frascos de plástico 25 cm^2 (Flask)
- Placas de 96 pocillos para cultivo celular.
- Placas de PCR.
- Tubos de polipropileno con tapa Falcon™ de 50 ml.
- Alcohol al 70%
- Antibiótico y antimicótico (Pen-Strep + Anfotericina B al 1%)
- DCFH-DA (cas: 4091-99-0, Sigma Aldrich, USA)

- Médio de cultivo DMEM/F-12 (Lonza/BioWhittaker, USA)
- Suero Fetal Bovino al 10% (SFB).
- Kit de extracción de RNA (Qiagen, USA)
- Kit de retrotranscripción (Qiagen, USA)
- MasterMix, SYBRGreen (Qiagen, USA)

3.2.2 Equipos

- Baño María
- Cámara de flujo laminar
- Incubadora de CO2
- Microscopio invertido
- Termociclador a tiempo real CFX Biorad
- Refrigeradora -20ºC
- Micropipetas
- Centrífuga refrigerada
- Tanque de nitrógeno
- Espectrofluorimetro BioTek
- Lector de ELISA Biotek

3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

3.3.1 Preparación de medios de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo, se utilizaron reactivos comerciales de alta calidad para cultivo celular. El medio de cultivo comercial DMEM-F12 de 500 mL (BE 12-719E Biowhitaker) fue enriquecido con 50 ml de suero fetal bovino (FBS) y 5 ml de antibiótico que contenía Penicilina-Estreptomicina más Anfotericina B (1%). Para la preparación del medio de cultivo se utilizó filtros de 0.4µm, y tras su obtención fue almacenado en refrigeración (4°C) para su posterior uso (Fig. 6).

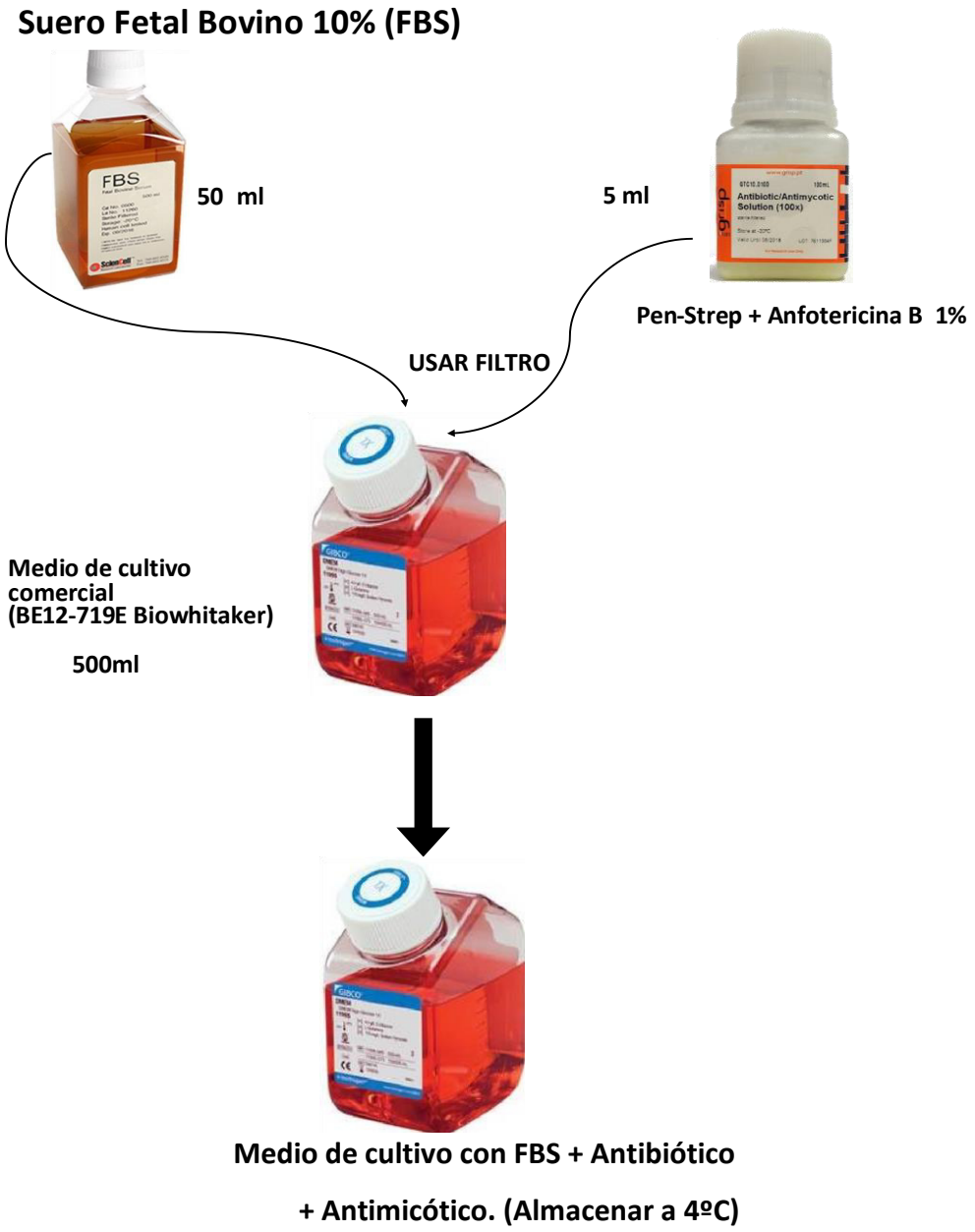


Figura 6. Preparación del medio de cultivo DMEM-F12 con FBS al 10%

3.3.2 Línea celular y condición de cultivo.

La línea celular neuronal SH-SY5Y fue adquirida de la European Collection of Authenticated Cell Cultures (Sigma-Aldrich), las cuales estuvieron almacenadas en crioviales en nitrógeno líquido a -196°C hasta su posterior uso. Las células fueron descongeladas lentamente en baño maría a 37°C por aproximadamente 10 minutos y se

mantuvieron en medio DMEM-F-12 suplementado con 10% de suero fetal bovino-inactivado por calor, 100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Los cultivos se realizaron inicialmente en frascos de plástico de 25 cm² (flask de 25 cm²) conteniendo medio de cultivo suplementado y se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5% de CO2 durante 24 horas; luego se retiró el medio de cultivo y usando el microscopio invertido se observó el nivel de confluencia, que es la proliferación y adhesión de la monocapa a la superficie del frasco de cultivo en el flask. Todas las células SH-SY5Y usadas estuvieron a una confluencia superior al 80%, las células fueron usadas a partir del 5to subcultivo, y por debajo del subcultivo 12vo.

Para los ensayos, los frascos de 25 cm² con células SH-SY5Y, con el número adecuado de subcultivos o pases, se retiraron de la incubadora y se añadió 3 ml de tripsina e incubó 5 por minutos a 37 °C a 5% de CO_2; luego, se retiraron las células y se colocaron en un tubo falcon de 15ml y se centrifugó a 1500 revoluciones por minuto (RPM) a 4°C por 5 minutos, luego se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet (células SH-SY5Y) con 10 ml de medio de cultivo transparente y se colocó 100µl en cada pocillo de las placas de 96 pocillos transparente, dejándose en incubación por 24 horas a 37 °C a 5% de CO_2. Pasadas las 24 horas, se retiró el medio de cultivo de cada pocillo y se adicionó 100 µL de tratamiento con aletrin a dosis de 0.1, 1, 5, 10, 25, 50, 100 y 200 µM, llevándose a incubación por 24 h a 37ºC, 5% CO2 y 95% de humedad.

3.3.3 Tratamientos

Aletrín es una sustancia soluble en solventes orgánicos, por esa razón se ha utilizado DMSO (Grupo vehículo) como solvente orgánico. En este estudio hemos querido evaluar el efecto citotóxico que vaya a producir el insecticida aletrín, de ahí que hemos utilizado este piretroide a dosis de (0.1 µM) a (200 µM) (adaptado de Martínez *et al*., 2020). Los cultivos tuvieron un periodo de incubación de 24 horas para todos los tratamientos mencionados, realizándose 6 experimentos independientes por triplicado, utilizándose una única dosis de aletrín que corresponde a 50 µM, dosis similar a la IC_{50}, para el ensayo molecular.

3.3.4 Ensayo de viabilidad celular (MTT).

Mediante ensayo colorimétrico cuantitativo con MTT se midió la viabilidad celular (actividad mitocondrial de las células), previamente descrito por Denizot y Lang, 1986. Al término del tratamiento con aletrin con las diferentes dosis utilizadas en este estudio, se procedió a retirar los tratamientos, quedando las células adheridas a la superficie de cada pocillo y se añadieron 50 µL del reactivo de MTT a una concentración final de 0,5 mg/ml a cada pocillo. La placa fue colocada en una incubadora humidificada a 37°C, con 5% de CO2 y 95% de humedad (v/v), por 2 horas adicionales. Las células que presentan actividad metabólica transforman el compuesto amarillo de MTT tetrazolio en una sustancia púrpura de formazán, si la célula se encuentra viva su metabolismo mitocondrial estará activo, lo que permitirá que este proceso se produzca. El formazán insoluble fue disuelto con 150 µL de DMSO a una concentración de 0,5mg/ml, se dejó incubar por 5 min a 37ºC, 5% CO_2 y 95% de humedad y se llevó la placa al lector de ELISA La determinación colorimétrica de la reducción de MTT se midió a 540 nm a absorbancia. Las células controles fueron aquellas que sólo se cultivaron con DMEM-F12 y fueron consideradas con una viabilidad celular al 100%. El valor de la dosis efectiva (ED50) fue calculado por el efecto dosis-dependiente con el software OriginPro 9.0. (Fig. 7).



Figura 7. Protocolo para la evaluación de citotoxicidad inducida por el piretroide aletrin a dosis de 0,1 a 200 µM sobre las células SH-SY5Y

3.3.5 Determinación de la producción de especies reactivas de oxígeno/especies reactivas de nitrógeno (ROS/RNS).

El daño oxidativo a las células puede evaluarse por los niveles de producción celular de especies reactivas de oxígeno (ROS), la cual se determina por protocolos estandarizados. DCFH-DA es un tinte fluorogénico que mide la actividad de hidroxilo, peroxilo y otras especies reactivas de oxígeno (ROS) dentro de la célula. El protocolo de ensayo DCFDA se basa en la difusión de DCFH-DA en la célula. Luego es desacetilado por esterasas celulares a un compuesto no fluorescente, que luego es oxidado por ROS en 2', 7' - diclorofluoresceína (DCF). DCF es altamente fluorescente y se detecta por fluorescencia con una longitud de onda de excitación/emisión a 485 nm/535 nm.

Las células neuronales SH-SY5Y fueron descongeladas lentamente en baño maría a 37°C, luego fueron cultivadas en incubadora por 24 horas en placas negras de 96 pocillos, y se aplicaron los tratamientos de aletrin a las dosis de 0.1, 1, 5, 10, 25, 50, 100 y 200 µM sobre las células SH-SY5Y y se incubaron por 24 horas a 37 °C a 5% de CO_2. Luego, se añadieron 10µM de diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA) a los pocillos por un periodo de 30 minutos a 37°C. El DCFH-DA ingresa a la célula y es oxidado por esterasas intracelulares que permiten la liberación de DCFH (compuesto fluorescente), luego se llevó la placa de 96 pocillos al lector para cuantificar la producción de ROS a través del lector de microplaca de fluorescencia, con una longitud de onda de emisión de 530 nm y una longitud de onda de excitación de 485 nm, (Biotek, USA). Los valores recopilados de cada pocillo corresponden a unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF), los cuales son emitidos por la maquina en el programa Excel (Fig. 8).

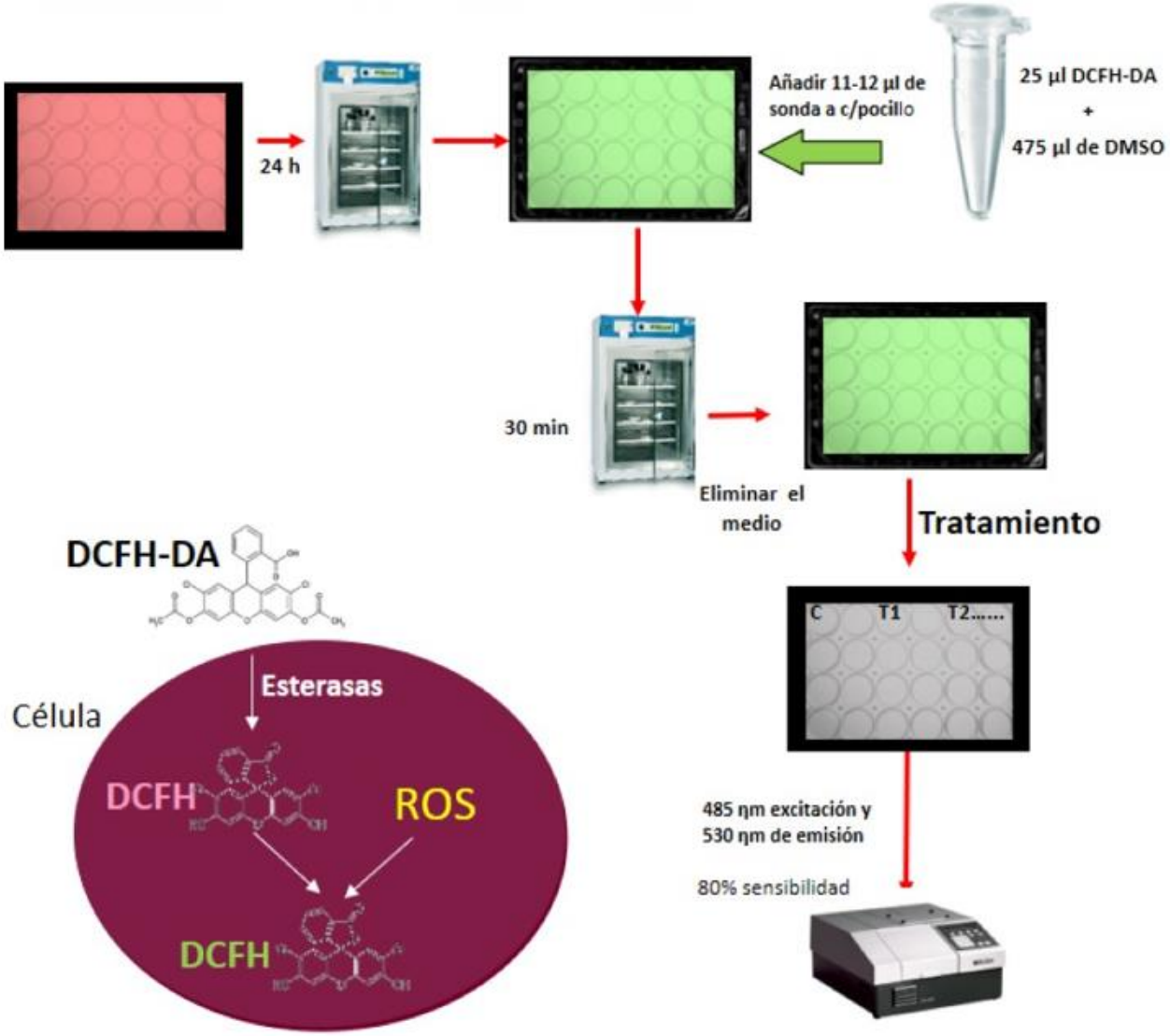


Figura 8. Protocolo para la evaluación del estrés oxidativo (ROS) inducido por el piretroide aletrin a dosis de 0,1 a 200 µM sobre las células SH-SY5Y

3.3.6 Expresión de genes relacionados al estrés oxidativo mediante PCR en tiempo real.

Las células de neuroblastoma SH-SY5Y se incubaron conjuntamente con los tratamientos por 24 h. Utilizando el método de reactivo Trizol se extrajo el ARN total (Invitrogen, USA), el cual fue purificado haciendo uso del kit de limpieza RNeasy MinElute según el protocolo del fabricante (Qiagen, USA). La concentración y pureza de ARN final se

determinó utilizando un espectrofotómetro Nano (Microdigital NABI, Korea), obteniendo relaciones A260/A280 entre 1.9 y 2.1 en todas las muestras.

A partir de 5 µg de ARN total, mediante transcripción inversa utilizando el RT^2 First Strand Kit se sintetizó el ADN monocatenario (Qiagen, Hilden, Alemania), según el protocolo del fabricante, iniciando con un paso de supresión de ADN genómico, utilizando las enzimas ADNasas. Finalmente, se procedió a diluir el ADNc en agua libre de nucleasas 1:10, y se almacenó a -80 ° C, para posterior análisis.

Se realizaron ensayos cuantitativos de PCR en tiempo real para Bax y BCL-2, analizando las expresiones génicas de sus respectivos ARNm. Se utilizaron cebadores específicos para Bax: 5´TTTTCGACTACGCGGTGACA3´3´GTTACCCAAGCGGTCCAGA5´, y Bcl-2: 5´ CCACTGCTGGGGATTGATGT3´ 3´ CGTGGTTTACTTTTTGCAAGCC5´.

Las reacciones fueron ejecutadas en un sistema de PCR en tiempo real, BioRad CFX96, utilizando la mezcla maestra RT^2 SYBR Green qPCR (Qiagen, USA) según el protocolo del fabricante. Cada cebador tuvo una concentración de 400nM. A continuación, se describe el protocolo térmico: i) 95 ° C durante 10 minutos, ii) 40 ciclos compuestos de 15 s a 95 ° C iii) 1 min a 60 ° C. En la Tabla I se presentan las secuencias de los cebadores. El cálculo de los cambios relativos en la expresión génica se realizó según Pfaffl (2001), mediante el uso del "housekeeping" GAPDH (sin diferencias probadas entre grupos). Para extraer las eficiencias de los datos sin procesar se utilizó el software libre LinRegPCR (Ramakers *et al*, 2003) (Fig. 9).

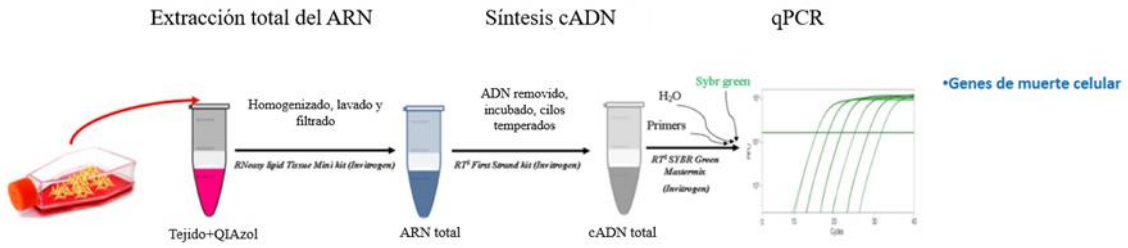


Figura 9. Protocolo para la evaluación de la expresión de genes relacionados a muerte celular inducidos por el piretroide aletrin a dosis de 0,1 a 200 µM sobre las células SH-SY5Y

3.3.7 Análisis estadístico.

Se realizaron seis réplicas para cada condición experimental, y los resultados obtenidos en cada replica fueron representativos. Los datos exhibidos se muestran como medias ± desviación estándar (DE). Mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía se realizaron las comparaciones estadísticas entre tratamientos, seguido por la prueba post-hoc de Tukey, usando GraphPad Prism 6. Se aceptó la diferencia estadística cuando $P<0.05$. La IC_{50} fue obtenida a partir de los datos de viabilidad celular (ensayo MTT), mediante una curva semilogarítmica y con el programa OriginPro 9.0.

IV. RESULTADOS

4.1. ENSAYO DE TOXICIDAD: Efecto del piretroide aletrin a dosis de 0,1, 1, 5, 10, 25, 50, 100 y 200µM sobre la viabilidad de las células SH-SY5Y.

Se evaluó el efecto citotóxico del piretroide tipo I Aletrin (0,1-200 µM) sobre las células SH-SY5Y mediante el ensayo MTT-triazol. Se observó un efecto significativo de citotoxicidad a partir de las dosis de aletrin de 25 µM (**p<0.01), las dosis de 50, 100 y 200 µM tuvieron un mayor efecto citotóxico en las células SH-SY5Y (***p<0.001). Las variaciones porcentuales (Var. %) representan el porcentaje de células no viables por efecto de aletrin a las dosis de 25 (32%), 50 (54,5%), 100 (77,7%) y 200 (91,6%) µM (Cuadro 1). Así mismo, se determinó la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) para aletrin que fue de 49,19 µM, que fue obtenida como una curva sigmoidea donde las dosis logarítmicas predijeron la CI_{50} (Figura 1).

Cuadro 1. Efecto citotóxico del piretroide aletrin (0,1-200 µM) sobre las células SH-SY5Y.

	Tratamientos									
	Control	**Vehículo**	**Aletrin µM**							
			0.1	**1**	**5**	**10**	**25**	**50**	**100**	**200**
Promedio	100	99,6	97,3	94,3	88,1	86,7	68**	45,5***	22,3***	8,4***
D.E.	14,1	7,5	15,3	14,7	13,4	5,7	16,8	17,3	8	3,6
Var. (%)							32	54,5	77,7	91,6

***p<0.01 y ***p<0.001 en comparación con el control.*

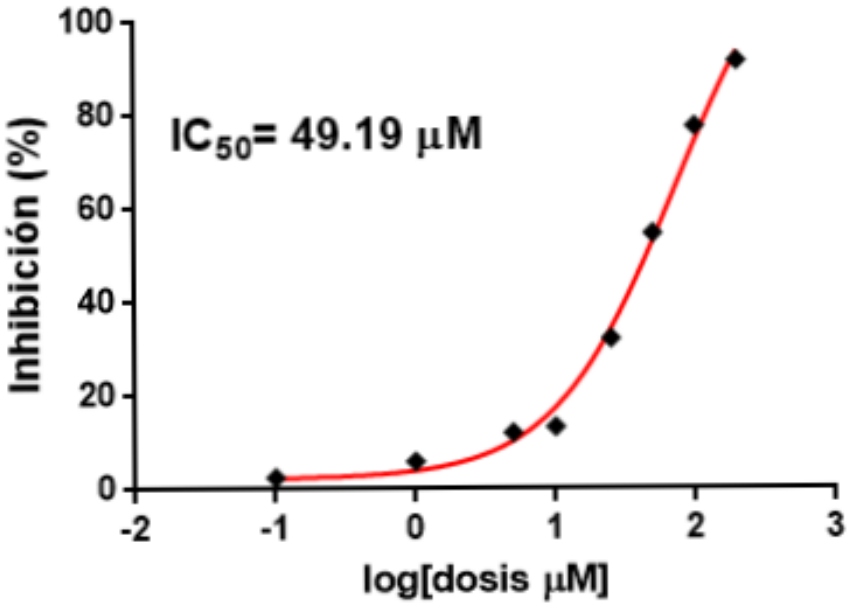


Figura 10. Curva dosis-respuesta de reducción de MTT (%) para determinar la viabilidad sobre células SH-SY5Y, usada para generar el valor IC_{50}

4.2 EFECTO DEL PIRETROIDE ALETRIN SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ROS EN CÉLULAS SH-SY5Y.

Se evaluó la generación de ROS por efecto del piretroide tipo I Aletrin (0,1-200µM) sobre las células SH-SY5Y mediante un ensayo fluorescente. Hemos observado un efecto significativo de citotoxicidad a partir de las dosis de aletrin de 10µM (*$p<0.05$), siendo las dosis de 25, 50, 100 y 200µM de aletrin más citotóxicas sobre las células SH-SY5Y (***$p<0.001$). Las variaciones porcentuales (Var. %) representan el porcentaje de producción de ROS por las células SH-SY5Y, por efecto de aletrin a las dosis de 10 (45,3%), 25 (55,1%), 50 (62,7%), 100 (74,7%) y 200 (100,9%) µM (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto del piretroide aletrin sobre la producción de ROS en células SH-SY5Y

	Tratamientos									
	Control	**Vehículo**	**Aletrin µM**							
			0.1	**1**	**5**	**10**	**25**	**50**	**100**	**200**
Promedio (UAF)	1596,3	1592,3	1899,7	2009	2106,2	2319,8*	2476***	2597,8***	2790***	3207,2***
D.E.	87,4	190,8	204,1	180,7	358	274,4	360,5	286	579,8	469,7
Var. (%)						45,3	55,1	62,7	74,7	100,9

*p<0.05 y ***p<0.001 en comparación con el control.

4.3 EFECTO DEL PIRETROIDE ALETRIN SOBRE LA EXPRESIÓN MOLECULAR DE GENES BAX Y BCL-2 RELACIONADOS A MUERTE CELULAR

Se evaluó la expresión de genes relacionados a muerte celular: Bax, gen proapoptótico; y Bcl-2, gen antiapoptótico. El mRNA de Bax se incrementó significativamente (2,1 veces respecto del control, ***p<0.001) por efecto del piretroide tipo I Aletrin (50 µM) sobre las células SH-SY5Y (Figura 11). Por otra parte, no se observó ningún efecto del piretroide aletrin sobre la expresión del mRNA de Bcl-2 (Figura 12). Así mismo, el ratio de muerte celular ($Ratio_{Bax/Bcl-2} = 2.3$) nos indica que el piretroide aletrin podría inducir 2.3 veces más la posibilidad de muerte celular por apoptosis en células SH-SY5Y (Figura 13).

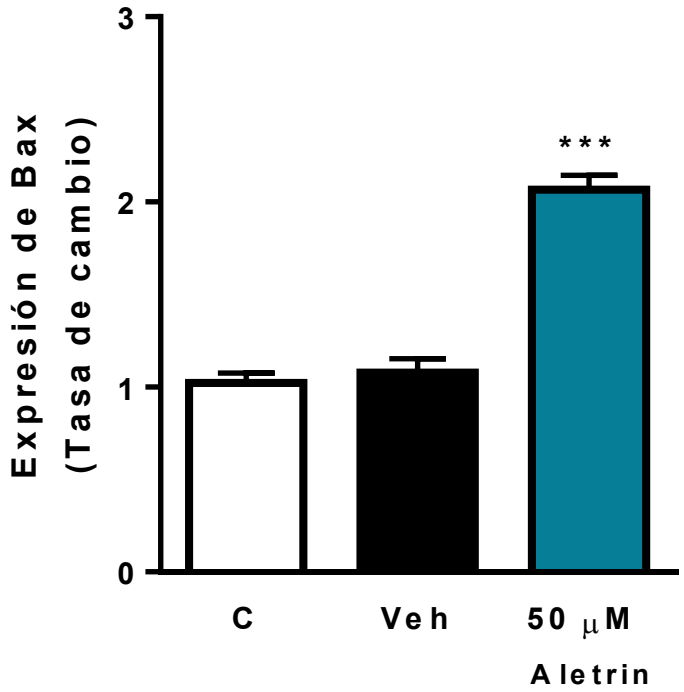


Figura 11. Efecto del piretroide aletrin (50 μM) sobre la expresión del gen pro-apoptotico Bax en células SH-SY5Y. Los datos se normalizaron a partir del control (barra blanca). Los datos representan la media ± DE de tres experimentos independientes. ***P<0.001, representa la diferencia estadística frente al vehículo (barra negra).

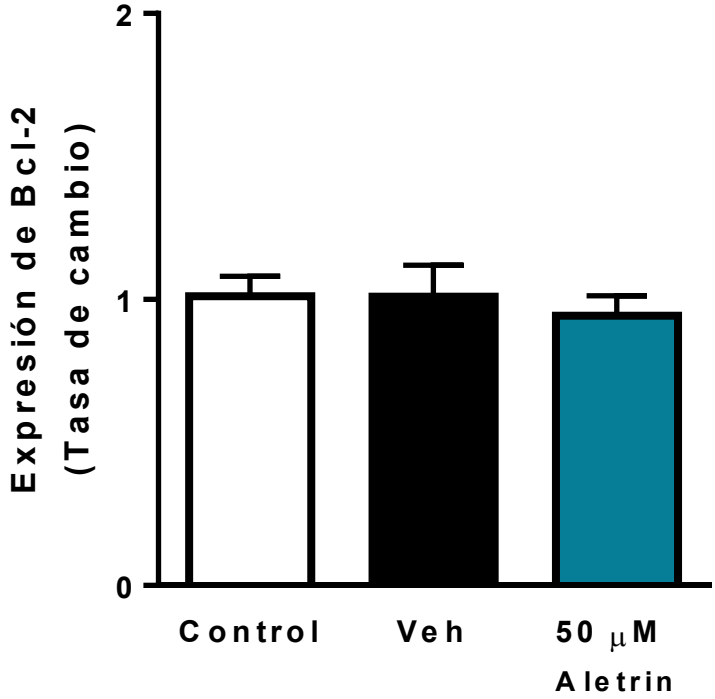


Figura 12. Efecto del piretroide aletrin (50 μM) sobre la expresión del gen anti-apoptotico Bcl-2 en células SH-SY5Y. Los datos se normalizaron a partir del control (barra blanca). Los datos representan la media ± DE de tres experimentos independientes.

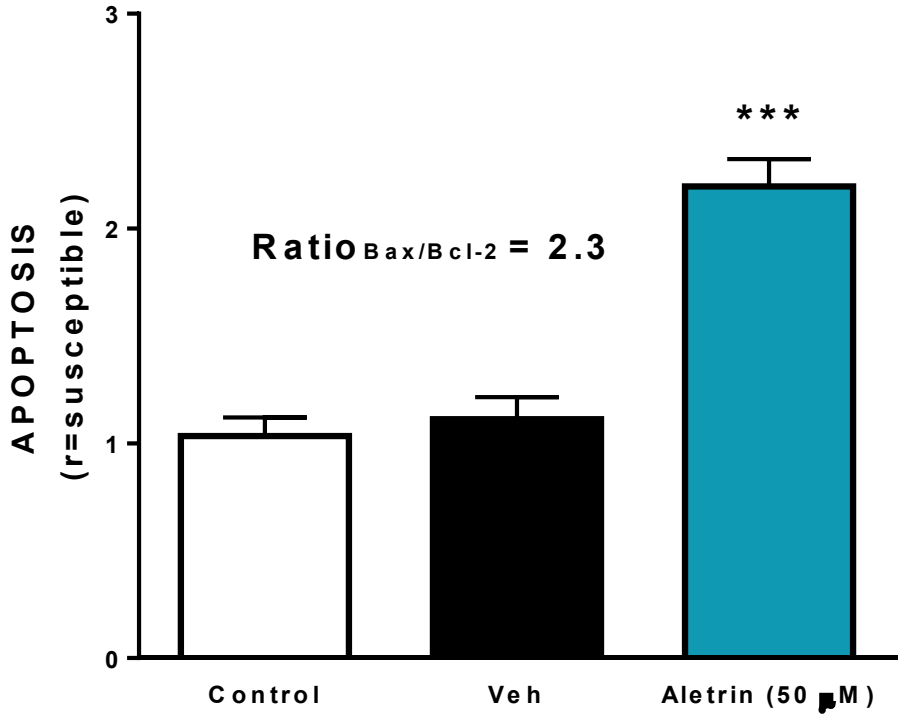


Figura 13. Efecto del piretroide aletrin (50 µM) sobre el ratio de susceptibilidad apoptosis Bax/Bcl-2 en células SH-SY5Y. Los datos se normalizaron a partir del control (barra blanca). Los datos representan la media ± DE de tres experimentos independientes. ***P<0.001, representa la diferencia estadística frente al vehículo (barra negra).

V. DISCUSIÓN

Aletrin es un piretroide sintético tipo I, y al igual que muchos otros piretroides se utiliza para combatir ectoparásitos en animales y para el control de vectores de mosquitos que puedan ocasionar problemas de salud pública (Anadón *et al*., 2009). Al ser de uso tan común, la exposición de los operarios a estas sustancias y el riesgo de permanencia ambiental han aumentado en los últimos años. El presente estudio proporciona nuevos datos sobre la neurotoxicidad de aletrin en células neuronales SH-SY5Y. En este trabajo, se ha utilizado el ensayo de viabilidad celular MTT en el cual las células SH-SY5Y se expusieron a diferentes concentraciones de aletrin (1-200 µM), observándose una reducción significativa en la viabilidad celular de forma dosis-dependiente a 25ºC. El cálculo de IC_{50} logarítmico para aletrin fue 49,19 µM, lo que muestra que el 50% de las células pierden su viabilidad a esa dosis. Este es el resultado del efecto citotóxico del aletrin sobre las células SH-SY5Y, lo que podría deberse a una disfunción citoplasmática producto de un desequilibrio del sistema enzimatico antioxidante que puede desencadenar en la activación de genes proapoptóticos (Girardot *et al*., 2017).

Se han demostrado efectos citotóxicos similares en diferentes estudios con plaguicidas (Romero *et al*., 2016; Martínez *et al*., 2019; Martinez *et al*., 2020); por ejemplo, un estudio demostró que el piretroide ciflutrin disminuyó la viabilidad celular en SH-SY5Y confirmando que éste compuesto es capaz de inducir neurotoxicidad (Martínez *et al*., 2019). Además, 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 lo cual fue demostrado a través de los ensayos de viabilidad celular MTT y de LDH, este último utilizado como marcador de muerte celular. Asímismo, fipronil sulfona (metabolito del fipronil) resultó más tóxico que el propio fipronil, obteniéndose una IC_{50} para fipronil de 100 µM y para fipronil sulfona de 3 µM (Romero et al., 2016). También se han observado efectos citotóxicos inducidos por glifosato sobre el desarrollo neuronal, a través de mecanismos de estrés oxidativo y muerte celular, lo que indicaría que estos efectos neurotóxicos no son exclusivos de los piretroides (Martínez *et al*., 2020).

En un estudio de Romero *et al.,* 2017, se evaluó la inducción del estrés oxidativo en células SH-SY5Y de neuroblastoma humano en respuesta a la exposición de ciflutrin,

llevándose a cabo el ensayo MTT de viabilidad celular para evaluar la citotoxicidad; Los valores IC30 y IC50 para ciflutrin se calcularon en 4,81 ± 0,92 μM y 19,39 ± 3,44 μM, respectivamente.

En el caso específico del sistema nervioso, debido al alto consumo de oxígeno por parte del cerebro (células neuronales) y un insuficiente sistema de defensa antioxidante, acompañado del alto contenido de lípidos poliinsaturados, propensos a la oxidación en las células neuronales, el estrés oxidativo tiene un efecto nocivo sobre las biomoléculas. Las biomoléculas (lípidos, proteínas, ADN/ARN, enzimas, etc.) son muy sensibles a los radicales libres (ROS/RNS), por lo tanto, condiciones de estrés producen cambios y modificaciones de estas biomoléculas, los cuales pueden utilizarse como marcadores de estrés oxidativo. Las bases heterocíclicas de ADN/ARN son más propensas al daño oxidativo, como la guanina que es más susceptible al ataque de ROS, como resultado se forma 8-hidroxiguanina y 8-hidroxi-2-desoxiguanosina. Los niveles elevados de estas bases modificadas se observan en cerebros con enfermedad de Parkinson, lo que muestra la participación de los radicales OH como especies oxidativas. Así mismo, la carbonilación de proteínas y la nitración son observados en cerebros con enfermedad de Alzheimer (Gabbita *et al*., 1998). Los lípidos juegan un papel fundamental en la función neuronal del cerebro, también se encuentran en gran parte de la membrana plasmática, donde actúan como barrera entre los espacios intracelular y extracelular (Brown y Murphy, 2009), esto los hace más propensos al ataque de radicales libres y sufren peroxidación lipídica, lo que aumenta la permeabilidad de la membrana, facilitando la entrada de esas sustancias al espacio intracelular, el que, en condiciones normales, no puede ser atravesado salvo por canales específicos (p. ej., K^+, Ca^{2+}, etc.); como consecuencia, estas sustancias mutilan proteínas de membrana, enzimas y receptores, entre otros (Halliwell y Gutteridge, 1984). Los lípidos de la membrana neuronal son muy ricos en ácidos grasos poliinsaturados, y las cadenas laterales son más vulnerables a ROS/RNS, esto provoca estrés oxidativo, jugando un papel importante como biomarcadores para estrés oxidativo.

ROS tiene un efecto nocivo sobre los lípidos al estar involucrados en la peroxidación de lípidos a malondialdehído (MDA), carbonilos de proteínas y oxidación de guanina a 8-oxo-desoxiguanosina en el ADN (Mariani, 2005). Así mismo, ROS tiene un efecto dañino

directo sobre las proteínas, dificulta la función bioenergética en las mitocondrias y provoca un efecto nocivo sobre el ADN mitocondrial, directamente relacionado con la inactivación de los promotores de expresión génica de proteínas de la cadena mitocondrial. Por lo tanto, niveles elevados de producción de ROS en las mitocondrias, pueden causar disfunción mitocondrial y obstaculizar los procesos biológicos que conducen a diversas enfermedades.

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan específicamente por apoptosis/necrosis y disfunción de las células neuronales, provocando un efecto dañino en el sistema neural. El cerebro tiene una mayor demanda de oxígeno, consume un 20 % más de oxígeno que otras partes del cuerpo. El cerebro también está enriquecido en metales con actividad redox (cobre y hierro) que participan activamente en la generación de ROS, como las membranas de las células cerebrales son ricas en ácidos grasos poliinsaturados, son más propensas a la peroxidación lipídica (Berg *et al*., 2004). Aunque, se encuentre en concentraciones normales, el antioxidante glutatión (GSH) cumple un rol importante en la desintoxicación de las especies de ROS en las células cerebrales, un nivel reducido de GSH en el cerebro está relacionado con niveles elevados de ROS lo cual conduce a enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Machado-Joseph (Dringen, 2000; Rougemont, *et al.,* 2002; Smith, 2006; Hritcu *et al*., 2008; Sultana *et al.,* 2008).

Los radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS) son generados de forma natural, sin embargo, niveles superiores al normal pueden 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. Además, el estrés oxidativo podría inducir importantes cambios en la célula como peroxidación de lípidos y alteración de proteínas (Romero *et al*., 2017; Gargouri *et al*., 2018; Martínez *et al*., 2019; Martínez *et al*., 2020).

Por definición los RNS también pueden clasificarse como ROS, debido a que los RNS son casi exclusivamente especies que contienen oxígeno. Por ejemplo, el peroxinitrito se

clasifica como un ROS o un RNS, y para simplificar, el término ROS se usa en todo el artículo para incluir tanto ROS como RNS (Li *et al*., 2016).

Diversos estudios *in vitro* han demostrado los efectos de los plaguicidas sobre la producción de estrés oxidativo (Martínez *et al*., 2020; Wang *et a*l., 2016); así como la presencia de productos de estrés oxidativo celular como MDA, ROS y NO en cultivos celulares (Martínez *et al*., 2020; Romero *et al*., 2016), resultados similares encontrados en el presente estudio utilizando el piretroide aletrin.

El presente estudio muestra un aumento significativo en los niveles de ROS después de la exposición al aletrin a dosis de 10 (45%), 25 (55%), 50 (63%), 100 (75%) y 200 µM (100%). Se han observado efectos similares por la acción de otros plaguicidas *in vitro,* como cipermetrina, ciflutrina y fipronil, que incrementaron significativamente la producción de ROS en células SH-SY5Y (Martínez et al., 2019; Romero *et al*., 2017). Además, los modelos *in vivo* mostraron que las neuronas colinérgicas son particularmente susceptibles a los desafíos oxidativos y a la acumulación de especies oxidativas reactivas (ROS) debido al efecto del paraquat (Musgrove *et al*., 2019), por otro lado, un efecto oxidativo relacionado al incremento de MDA fue observado en cerebro de rata por efecto de la administración oral de rotenone a dosis de 30 mg/kg de peso corporal (Wang *et al*., 2020).

Bcl-2 es una familia de proteínas que poseen propiedades pro-apoptóticas (Bax) o anti-apoptóticas (Bcl-2). La acción principal de las proteínas Bcl-2 ocurre en la mitocondria. En células sanas, Bax y Bak se moviliza entre el citosol y la membrana externa mitocondrial (Todt *et al*., 2015). Bax se encuentra en el citosol, pero al iniciarse la señalización apoptótica, Bax sufre un cambio conformacional. Tras la inducción de la apoptosis, BAX se asocia a la membrana de los orgánulos y, en particular, a la membrana mitocondrial. En el presente estudio también se ha observado que aletrin, a una dosis de 50 µM, indujo a la expresión de la molécula pro-apoptótica Bax (2,3 veces, respecto al control), lo que indicaría que este piretroide podría activar mecanismos de muerte celular, incluidos posiblemente la activación de las enzimas caspasas.

Otros estudios han podido demostrar que varios plaguicidas tienen la capacidad de inducir la muerte celular, como el glifosato y su metabolito AMPA, que indujo la expresión del gen Bax en células SH-SY5Y (Martínez *et al.,* 2020), como la cipermetrina, que indujo apoptosis neuronal a través de la vía de señalización Nrf2/ARE (Zhou *et al*., 2020), o la rotenona que produjo autofagia y apoptosis en modelos de células dopaminérgicas al aumentar la fosforilación de la proteína Bcl-2 (Liu *et al*., 2018). Otro estudio mostró que el organofosforado clorpirifos aumentó los niveles de Bax y caspasa-3 a nivel cortical en ratas (Albasher *et al*., 2020).

En el presente estudio, el. ratio Bax/Bcl-2, que mide la susceptibilidad de las células a sufrir apoptosis, ha mostrado ser alto (r = 2.3) y dosis-dependiente por efecto del piretroide aletrin. Similares resultados fueron hallados cuando las células SH-SY5Y fueron sometidas a atrazina, un herbicida mundialmente usado para controlar el crecimiento de maleza en diversos cultivos, se observó un ratio Bax/Bcl-2 elevado (Abarikwu y Farombi, 2015), o cuando el difenoconazol, fungicida e amplio espectro, induce daño oxidativo en el ADN y apoptosis, lo que se evidencia por la inducción de altos niveles del ratio Bax/Bcl-2 en células SH-SY5Y (Wang et al., 2021).

Todos los resultados encontrados en nuestro estudio indicarían una alta asociación entre la generación de estrés oxidativo y la inducción de muerte celular en células nerviosas SH-SY5Y por efecto del piretroide tipo I aletrin de forma dosis-dependiente, lo que también ha sido demostrado en otros estudios donde se han utilizado plaguicidas piretroides y no-piretroides (Radi *et al*., 2014; Mo *et al.*, 2019; Zhi *et al*., 2020; Barrios-Arpi *et al*., 2022). Además, el presente enfoque ofrece una estrategia eficiente para la identificación rápida de las vías moleculares subyacentes que conducen al daño oxidativo, la muerte de las células neuronales y la neurodegeneración asociada con la exposición a piretroides.

VI. CONCLUSIONES

- El piretroide tipo I aletrin produce un efecto citotóxico sobre células neuronales SH-SY5Y de forma dosis dependiente, evidenciado por la disminución de la viabilidad celular.

- El piretroide aletrin es capaz de inducir estrés oxidativo en células neuronales SH-SY5Y de forma dosis dependiente e inducir la sobreexpresión del gen proapoptótico Bax.

VII. LITERATURA CITADA

1. Abarikwu SO, Farombi EO. 2015. Atrazine induces apoptosis of SH-SY5Y human neuroblastoma cells via the regulation of Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3-dependent pathway. Pesticide Biochemistry and Physiology. 118:90-98. doi: 10.1016/j.pestbp.2014.12.006.
2. Abdel-Daim MM, El-Ghoneimy A. 2015. Synergistic protective effects of ceftriaxone and ascorbic acid against subacute deltamethrin induced nephrotoxicity in rats. Renal failure. 37:297–304. doi: 10.3109/0886022X.2014.983017.
3. Agrawal S, Dixit A, Singh A, Tripathi P, Singh D, Patel DK, Singh MP. 2015. Cyclosporine A and MnTMPyP alleviate α-synuclein expression and aggregation in cypermethrin induced Parkinsonism. Molecular neurobiology. 52:1619-1628. doi:10.1007/s12035-014-8954-8
4. Albasher G, Alsaleh AS, Alkubaisi N, Alfarraj S, Alkahtani S, Farhood M, Alotibi N, Almeer R. 2020. Red beetroot extract abrogates chlorpyrifos-induced cortical damage in rats. Oxidative medicine and cellular longevity. 2963020. doi: 10.1155/2020/2963020.
5. Alkadi H. 2020. A Review on Free Radicals and Antioxidants. Infectious disorders drug targets. 20(1):16-26. doi: 10.2174/1871526518666180628124323.
6. Anadón A, Martínez-Larrañaga MR, Martínez MA. 2009. Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. Veterinary journal. 182(1):7-20. doi: 10.1016/j.tvjl.2008.04.008.
7. Antonio-Nkondjio C, Sonhafouo-Chiana N, Ngadjeu CS, Doumbe-Belisse P, Talipouo A, Djamouko-Djonkam L, Kopya E, Bamou R, Awono-Ambene P, Wondji CS. 2017. Review of the evolution of insecticide resistance in main malaria vectors in Cameroon from 1990 to 2017. Parasites & Vectors 10(1):472. doi: 10.1186/s13071-017-2417-9.
8. Arslan H, Özdemir S, Altun S. 2017. Cypermethrin toxication leads to histopathological lesions and induces inflammation and apoptosis in common carp (Cyprinus carpio L.). Chemosphere. 180:491–499. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.04.057
9. Barnes JM, Verschoyle RD. 1974. Toxicity of new pyrethroid insecticide. Nature. 248(5450):711. doi: 10.1038/248711a0.
10. Barr DB, Olsson AO, Wong LY, Udunka S, Baker SE, Whitehead RD, Magsumbol MS, Williams BL, Needham LL. 2010. Urinary concentrations of metabolites of pyrethroid

insecticides in the general U.S. population: National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. Environmental health perspectives. 118(6):742-748. doi: 10.1289/ehp.0901275.

11. Barrios-Arpi L, Arias Y, Lopez-Torres B, Ramos-Gonzalez M, Ticli G, Prosperi E, Rodríguez JL. 2022. In Vitro Neurotoxicity of Flumethrin Pyrethroid on SH-SY5Y Neuroblastoma Cells: Apoptosis Associated with Oxidative Stress. Toxics. 10(3): 131. doi: 10.3390/toxics10030131
12. Berg D, Youdim MB, Riederer P. 2004. Redox imbalance. Cell and tissue research. 318(1):201-213. doi: 10.1007/s00441-004-0976-5.
13. Biedler JL, Riehm H, Peterson RH, Spengler BA. 1975. Membrane-mediated drug resistance and phenotypic reversion to normal growth behavior of Chinese hamster cells. Journal of the National Cancer Institute. 55(3):671-680. doi: 10.1093/jnci/55.3.671.
14. Biedler JL, Spengler BA. 1976. Metaphase chromosome anomaly: association with drug resistance and cell-specific products. Science. 191(4223):185-187. doi: 10.1126/science.942798.
15. Breckenridge CB, Holden L, Sturgess N, Weiner M, Sheets L, Sargent D, Soderlund DM, Choi JS, Symington S, Clark JM, Burr S, Ray D. 2009. Evidence for a separate mechanism of toxicity for the Type I and the Type II pyrethroid insecticides. Neurotoxicology. 1:S17-S31. doi: 10.1016/j.neuro.2009.09.002.
16. Brown HA, Murphy RC. 2009. Working towards an exegesis for lipids in biology. Nature chemical biology. 5(9):602-606. doi: 10.1038/nchembio0909-602.
17. Chen S, Gu S, Wang Y, Yao Y, Wang G, Jin Y, Wu Y. 2016. Exposure to pyrethroid pesticides and the risk of childhood brain tumors in East China. Environmental pollution. 218:1128-1134. doi:10.1016/j.envpol.2016.08.066.
18. Corcellas C, Eljarrat E, Barceló D. 2015. First report of pyrethroid bioaccumulation in wild river fish: a case study in Iberian river basins (Spain). Environmental international. 75:110-116. doi: 10.1016/j.envint.2014.11.007.
19. Corcellas C, Feo ML, Torres JP, Malm O, Ocampo-Duque W, Eljarrat E, Barceló D. 2012. Pyrethroids in human breast milk: occurrence and nursing daily intake estimation. Environmental international. 47:17-22. doi: 10.1016/j.envint.2012.05.007.
20. Cottini F, Hideshima T, Xu C, Sattler M, Dori M, Agnelli L, ten Hacken E, Bertilaccio MT, Antonini E, Neri A, Ponzoni M, Marcatti M, Richardson PG, Carrasco R, Kimmelman AC, Wong KK, Caligaris-Cappio F, Blandino G, Kuehl WM, Anderson KC,

Tonon G. 2014. Rescue of Hippo coactivator YAP1 triggers DNA damage-induced apoptosis in hematological cancers. Nature medicine. 20(6):599-606. doi:10.1038/nm.3562.

21. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. 2014. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. Nature review. Molecular Cell Biology. 15(1):49-63. doi: 10.1038/nrm3722.
22. Dewailly E, Forde M, Robertson L, Kaddar N, Laouan Sidi EA, Côté S, Gaudreau E, Drescher O, Ayotte P. 2014. Evaluation of pyrethroid exposures in pregnant women from 10 Caribbean countries. Environmental international. 63:201-206. doi:10.1016/j.envint.2013.11.014.
23. Deziel NC, Colt JS, Kent EE, Gunier RB, Reynolds P, Booth B, Metayer C, Ward MH. 2015. Associations between self-reported pest treatments and pesticide concentrations in carpet dust. Environmental health. 14:27. doi:10.1186/s12940-015-0015-x.
24. Dia AK, Guèye OK, Niang EA, Diédhiou SM, Sy MD, Konaté A, Samb B, Diop A, Konaté L, Faye O. 2018. Insecticide resistance in Anopheles arabiensis populations from Dakar and its suburbs: role of target site and metabolic resistance mechanisms. Malaria journal. 17(1):116. doi:10.1186/s12936-018-2269-6.
25. Ding G, Shi R, Gao Y, Zhang Y, Kamijima M, Sakai K, Wang G, Feng C, Tian Y. 2012. Pyrethroid pesticide exposure and risk of childhood acute lymphocytic leukemia in Shanghai. Environmental science & technology. 46(24):13480-13487. doi:10.1021/es303362a.
26. Dringen R. 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. Progress in neurobiology. 62(6):649-71. doi: 10.1016/s0301-0082(99)00060-x.
27. Dong K, Du Y, Rinkevich F, Nomura Y, Xu P, Wang L, Silver K, Zhorov BS. 2014. Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. Insect biochemistry and molecular biology. 50:1-17. doi:10.1016/j.ibmb.2014.03.012.
28. Edi CV, Djogbénou L, Jenkins AM, Regna K, Muskavitch MA, Poupardin R, Jones CM, Essandoh J, Kétoh GK, Paine MJ, Koudou BG, Donnelly MJ, Ranson H, Weetman D. 2014. CYP6 P450 enzymes and ACE-1 duplication produce extreme and multiple insecticide resistance in the malaria mosquito Anopheles gambiae. PLoS genetics. 10(3):e1004236. doi:10.1371/journal.pgen.1004236.

29. Edison P, Ahmed I, Fan Z, Hinz R, Gelosa G, Ray Chaudhuri K, Walker Z, Turkheimer FE, Brooks DJ. 2013. Microglia, amyloid, and glucose metabolism in Parkinson's disease with and without dementia. Neuropsychopharmacology. 38(6):938-949. doi:10.1038/npp.2012.255.
30. Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Ceña V, Gallego C, Comella JX. 2000. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. Journal of neurochemistry. 75(3):991-1003. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0750991.x.
31. El-Demerdash FM. 2011. Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. Food and chemical toxicology. 49(6):1346-1352. doi:10.1016/j.fct.2011.03.018.
32. Elliott M, Janes NF, Kimmel EC, Casida JE. 1972. Metabolic fate of pyrethrin I, Pyrethrin II, and allethrin administered orally to rats. Journal of agricultural and food chemistry. 20(2):300-313. doi:10.1021/jf60180a057
33. Eum KH, Lee M. 2011. Crosstalk between autophagy and apoptosis in the regulation of paclitaxel-induced cell death in v-Ha-ras-transformed fibroblasts. Molecular and cellular biochemistry. 348(1-2):61-68. doi:10.1007/s11010-010-0638-8.
34. Fei Q, McCormack AL, Di Monte DA, Ethell DW. 2008. Paraquat neurotoxicity is mediated by a Bak-dependent mechanism. The Journal of biological chemistry. 283(6):3357-3364. doi:10.1074/jbc.M708451200.
35. Feyereisen R, Dermauw W, Van Leeuwen T. 2015. Genotype to phenotype, the molecular and physiological dimensions of resistance in arthropods. Pesticide biochemistry and physiology. 121:61-77. doi:10.1016/j.pestbp.2015.01.004.
36. Frank DF, Miller GW, Harvey DJ, Brander SM, Geist J, Connon RE, Lein PJ. 2018. Bifenthrin causes transcriptomic alterations in mTOR and ryanodine receptor-dependent signaling and delayed hyperactivity in developing zebrafish (Danio rerio). Aquatic toxicology. 200:50-61. doi:10.1016/j.aquatox.2018.04.003
37. Gabbita SP, Lovell MA, Markesbery WR. 1998. Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. Journal of neurochemistry. 71(5):2034-2040. doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.71052034.x.

38. Galal MK, Khalaf AA, Ogaly HA, Ibrahim MA. 2014. Vitamin E attenuates neurotoxicity induced by deltamethrin in rats. BMC complementary and alternative medicine. 14:458. doi:10.1186/1472-6882-14-458.
39. Gargouri B, Yousif NM, Bouchard M, Fetoui H, Fiebich BL. 2018. Inflammatory and cytotoxic effects of bifenthrin in primary microglia and organotypic hippocampal slice cultures. Journal of neuroinflammation. 15(1):159. doi: 10.1186/s12974-018-1198-1.
40. Gasmi S, Rouabhi R, Kebieche M, Boussekine S, Salmi A, Toualbia N, Taib C, Bouteraa Z, Chenikher H, Henine S, Djabri B. 2017. Effects of Deltamethrin on striatum and hippocampus mitochondrial integrity and the protective role of Quercetin in rats. Environmental science and pollution research international. 24:16440–16457. doi:10.1007/s11356-017-9218-8
41. Girardot T, Rimmelé T, Venet F, Monneret G. 2017. Apoptosis-induced lymphopenia in sepsis and other severe injuries. Apoptosis. 22(2):295-305. doi:10.1007/s10495-016-1325-3.
42. Giray B, Gürbay A, Hincal F. 2001. Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin E or allopurinol. Toxicol letters. 118(3):139-146. doi:10.1016/s0378-4274(00)00277-0.
43. Gong DC. 2013. Pyrethroids Pesticides Residues and Their Behavior in a Multimedium Environment of Liangtan River Basin (Master thesis). Chongqing Univ, Chongqing.
44. Gündüz E, Ülger BV, İbiloğlu İ, Ekinci A, Dursun R, Zengin Y, İçer M, Uslukaya Ö, Ekinci C, Güloğlu C. 2015. Glutamine provides effective protection against deltamethrin-induced acute hepatotoxicity in rats but not against nephrotoxicity. Medical science monitor. 21:1107-1114. doi:10.12659/MSM.893180.
45. Halliwell B, Gutteridge JM. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. The biochemical journal. 219(1):1-14. doi: 10.1042/bj2190001.
46. Han Y, Xia Y, Han J, Zhou J, Wang S, Zhu P, Zhao R, Jin N, Song L, Wang X. 2008. The relationship of 3-PBA pyrethroids metabolite and male reproductive hormones among non-occupational exposure males. Chemosphere. 72(5):785-90. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.03.058.
47. Hancock PA, Wiebe A, Gleave KA, Bhatt S, Cameron E, Trett A, Weetman D, Smith DL, Hemingway J, Coleman M, Gething PW, Moyes CL. 2018. Associated patterns of insecticide resistance in field populations of malaria vectors across Africa. Proceedings

of the National Academy of Science of the United States of America. 115(23):5938-5943. doi: 10.1073/pnas.1801826115.

48. Hartley D, Kidd H. 1987. El Manual de agroquímicos 2ª ed. Inglaterra. The Royal Society of Chemistry. p. A008.
49. Hritcu L, Ciobica A, Artenie V. 2008. Effects of right-unilateral 6-hydroxydopamine infusion-induced memory impairment and oxidative stress: Relevance for Parkinson's disease. Central european journal of biology. 3:250-257. doi:10.2478/s11535-008-0023-8.
50. Hsu SS, Jan CR, Liang WZ. 2018. The investigation of the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin (LCT)-affected Ca^{2+} homeostasis and -activated Ca^{2+} -associated mitochondrial apoptotic pathway in normal human astrocytes: The evaluation of protective effects of BAPTA-AM (a selective Ca^{2+} chelator). Neurotoxicology. 69:97-107. doi: 10.1016/j.neuro.2018.09.009
51. Ibrahim SS, Riveron JM, Stott R, Irving H, Wondji CS. 2016. The cytochrome P450 CYP6P4 is responsible for the high pyrethroid resistance in knockdown resistance-free Anopheles arabiensis. Insect biochemistry and molecular biology. 68: 23-32. doi:10.1016/j.ibmb.2015.10.015.
52. Ji G, Xia Y, Gu A, Shi X, Long Y, Song L, Wang S, Wang X. 2011. Effects of non-occupational environmental exposure to pyrethroids on semen quality and sperm DNA integrity in Chinese men. Reproductive toxicology. 31(2):171-176. doi:10.1016/j.reprotox.2010.10.005.
53. Kaneko H. 2010. Pyrethroid chemistry and metabolism. En: Krieger, R. eds. Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology. 3ª ed. Elsevier. Amsterdam. The Netherlands. Chapter 76.
54. Kaneko H. 2011. Pyrethroids: mammalian metabolism and toxicity. Journal of agricultural and food chemistry. 59(7):2786-2791. doi: 10.1021/jf102567z.
55. Khalatbary AR, Ghaffari E, Mohammadnegad B. 2015. Protective Role of Oleuropein against Acute Deltamethrin-Induced Neurotoxicity in Rat Brain. Iranian biomedical journal. 19(4):247-253. doi: 10.7508/ibj.2015.04.009.
56. Koureas M, Tsakalof A, Tsatsakis A, Hadjichristodoulou C. 2012. Systematic review of biomonitoring studies to determine the association between exposure to organophosphorus and pyrethroid insecticides and human health outcomes. Toxicology letters. 210(2):155-168. doi: 10.1016/j.toxlet.2011.10.007

57. Kovalevich J, Langford D. 2013. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. Methods in molecular biology. 1078:9-21. doi: 10.1007/978-1-62703-640-5_2.
58. Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Dmitriev AA, Alekseev BY, Kardymon OL, Sadritdinova AF, Fedorova MS, Pokrovsky AV, Melnikova NV, Kaprin AD, Moskalev AA, Snezhkina AV. 2016. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. Oncotarget. 7(29):44879-44905. doi: 10.18632/oncotarget.9821.
59. Kumagai T, Usami H, Matsukawa N, Nakashima F, Chikazawa M, Shibata T, Noguchi N, Uchida K. Functional interaction between cyclooxygenase-2 and p53 in response to an endogenous electrophile. Redox biology. 4:74–86. doi: 10.1016/j.redox.2014.11.011
60. Kumar A, Sasmal D, Bhaskar A, Mukhopadhyay K, Thakur A, Sharma N. 2016. Deltamethrin-induced oxidative stress and mitochondrial caspase-dependent signaling pathways in murine splenocytes. Environmental toxicology. 31(7):808-819. doi: 10.1002/tox.22091.
61. Kumar A, Sasmal D, Sharma N. 2018. Mechanism of deltamethrin induced thymic and splenic toxicity in mice and its protection by piperine and curcumin: in vivo study. Drug and chemical toxicology. 41(1):33-41. doi: 10.1080/01480545.2017.1286352.
62. Kumar A, Sharma N. 2015. Comparative efficacy of piperine and curcumin in deltamethrin induced splenic apoptosis and altered immune functions. Pesticide biochemistry and physiology. 119:16-27. doi: 10.1016/j.pestbp.2015.03.003.
63. Kwiatkowska RM, Platt N, Poupardin R, Irving H, Dabire RK, Mitchell S, Jones CM, Diabaté A, Ranson H, Wondji CS. 2013. Dissecting the mechanisms responsible for the multiple insecticide resistance phenotype in Anopheles gambiae s.s., M form, from Vallée du Kou, Burkina Faso. Gene. 519(1):98-106. doi: 10.1016/j.gene.2013.01.036.
64. Lawrence LJ, Casida JE. 1982. Pyrethroid toxicology: mouse intracerebral structure-toxicity relationships. Pesticide Biochemistry and Physiology. 18(1):9-14. doi.org/10.1016/0048-3575(82)90082-7
65. Leng G, Kühn KH, Idel H. 1997. Biological monitoring of pyrethroids in blood and pyrethroid metabolites in urine: applications and limitations. The science of the total environment. 199(1-2):173-181. doi: 10.1016/s0048-9697(97)05493-4.
66. LePage KT, Dickey RW, Gerwick WH, Jester EL, Murray TF. 2005. On the use of neuro-2a neuroblastoma cells versus intact neurons in primary culture for neurotoxicity studies. Critical reviews in neurobiology. 17(1):27-50. doi: 10.1615/critrevneurobiol.v17.i1.20.

67. Li H, Wu S, Ma Q, Shi N. 2011. The pesticide deltamethrin increases free radical production and promotes nuclear translocation of the stress response transcription factor Nrf2 in rat brain. Toxicology and industrial health. 27:579–90. doi: 10.1177/0748233710393400
68. Li H, Wu S, Shi N. 2007. Transcription factor Nrf2 activation by deltamethrin in PC12 cells: involvement of ROS. Toxicology letters. 171:87-98. doi: 10.1016/j.toxlet.2007.04.007
69. Li F, Ma H, Liu J. 2018. Pyrethroid Insecticide Cypermethrin Modulates Gonadotropin Synthesis via Calcium Homeostasis and ERK1/2 Signaling in LβT2 Mouse Pituitary Cells. Toxicological Sciences. 162(1):43-52. doi: 10.1093/toxsci/kfx248.
70. Li R, Jia Z, Trush MA. 2016. Defining ROS in Biology and Medicine. Reactive oxygen species (Apex). 1(1):9-21. doi: 10.20455/ros.2016.803.
71. Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF. 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neuroscience Letters. 339(1):62-66. doi:10.1016/s0304-3940(02)01423-4.
72. Liu J, Liu W, Lu Y, Tian H, Duan C, Lu L, Gao G, Wu X, Wang X, Yang H. 2018. Piperlongumine restores the balance of autophagy and apoptosis by increasing BCL2 phosphorylation in rotenone-induced Parkinson disease models. Autophagy. 14(5):845-861. doi: 10.1080/15548627.2017.1390636.
73. Madhubabu G, Yenugu S. 2014. Allethrin induced toxicity in the male reproductive tract of rats contributes to disruption in the transcription of genes involved in germ cell production. Environmental toxicology. 29(11):1330-1345. doi: 10.1002/tox.21864.
74. Major KM, Weston DP, Lydy MJ, Wellborn GA, Poynton HC. 2018. Unintentional exposure to terrestrial pesticides drives widespread and predictable evolution of resistance in freshwater crustaceans. Evolutionary applications. 11(5):748-761. doi: 10.1111/eva.12584.
75. Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, Mecocci P. 2005. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences. 827(1):65-75. doi: 10.1016/j.jchromb.2005.04.023.
76. Martin SJ, Elzen PJ, Rubink WR. 2002. Effect of acaricide resistance on reproductive ability of the honey bee mite Varroa destructor. Experimental & applied acarology. 27(3):195-207. doi: 10.1023/a:1021675614116.

77. Martínez MA, Ares I, Rodríguez JL, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, Anadón A. 2018. Neurotransmitter changes in rat brain regions following glyphosate exposure. Environmental research. 161:212-219. doi: 10.1016/j.envres.2017.10.051.
78. Martínez MA, Rodríguez JL, Lopez-Torres B, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, Anadón A, Ares I. 2019. Oxidative stress and related gene expression effects of cyfluthrin in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: Protective effect of melatonin. Environmental research. 177:108579. doi: 10.1016/j.envres.2019.108579
79. Martínez MA, Rodríguez JL, Lopez-Torres B, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, Maximiliano JE, Anadón A, Ares I. 2020. Use of human neuroblastoma SH-SY5Y cells to evaluate glyphosate-induced effects on oxidative stress, neuronal development and cell death signaling pathways. Environment international. 135:105414. doi: 10.1016/j.envint.2019.105414.
80. Martinez MM, Reif RD, Pappas D. 2010. Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. Anal Methods. 2:996–1004. doi: 10.1039/C0AY00247J
81. Meeker JD, Barr DB, Hauser R. 2009. Pyrethroid insecticide metabolites are associated with serum hormone levels in adult men. Reproductive toxicology. 27(2):155-160. doi: 10.1016/j.reprotox.2008.12.012.
82. Mo J, Enkhjargal B, Travis ZD, Zhou K, Wu P, Zhang G, Zhu Q, Zhang T, Peng J, Xu W, Ocak U, Chen Y, Tang J, Zhang J, Zhang JH. 2019. AVE 0991 attenuates oxidative stress and neuronal apoptosis via Mas/PKA/CREB/UCP-2 pathway after subarachnoid hemorrhage in rats. Redox biology. 20:75-86. doi: 10.1016/j.redox.2018.09.022.
83. Mohammadi H, Ghassemi-Barghi N, Malakshah O, Ashari S. 2019. Pyrethroid exposure and neurotoxicity: a mechanistic approach. Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju. 70(2):74-89. doi: 10.2478/aiht-2019-70-3263.
84. Motomura H, Narahashi T. 2001. Interaction of tetramethrin and deltamethrin at the single sodium channel in rat hippocampal neurons. Neurotoxicology. 22(3):329-339. doi: 10.1016/s0161-813x(01)00023-7.
85. Mubarak Hossain M, Suzuki T, Sato N, Sato I, Takewaki T, Suzuki K, Tachikawa E, Kobayashi H. 2006. Differential effects of pyrethroid insecticides on extracellular dopamine in the striatum of freely moving rats. Toxicology and applied pharmacology. 217(1):25-34. doi: 10.1016/j.taap.2006.07.011.

86. Muggelberg LL, Huff Hartz KE, Nutile SA, Harwood AD, Heim JR, Derby AP, Weston DP, Lydy MJ. 2017. Do pyrethroid-resistant Hyalella azteca have greater bioaccumulation potential compared to non-resistant populations? Implications for bioaccumulation in fish. Environmental pollution. 220(Pt A):375-382. doi: 10.1016/j.envpol.2016.09.073.
87. Mukherjee I, Singh R, Govil JN. 2010. Risk assessment of a synthetic pyrethroid, bifenthrin on pulses. Bulletin of environmental contamination and toxicology. 84(3):294-300. doi: 10.1007/s00128-010-9940-0.
88. Musgrove RE, Helwig M, Bae EJ, Aboutalebi H, Lee SJ, Ulusoy A, Di Monte DA. 2019. Oxidative stress in vagal neurons promotes parkinsonian pathology and intercellular α-synuclein transfer. The Journal of clinical investigation. 129(9):3738-3753. doi: 10.1172/JCI127330.
89. Narahashi T. 1985. Nerve membrane ionic channels as the primary target of pyrethroids. Neurotoxicology. 6(2):3-22. PMID: 2410830.
90. Narahashi T. 2000. Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: past, present, and future. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 294(1):1-26. PMID: 10871290.
91. Nieradko-Iwanicka B, Borzęcki A. 2015. Subacute poisoning of mice with deltamethrin produces memory impairment, reduced locomotor activity, liver damage and changes in blood morphology in the mechanism of oxidative stress. Pharmacological reports. 67:535-541. doi: 10.1016/j.pharep.2014.12.012.
92. Ogaly HA, Khalaf A, Ibrahim MA, Galal MK, Abd-Elsalam RM. 2015. Influence of green tea extract on oxidative damage and apoptosis induced by deltamethrin in rat brain. Neurotoxicology and teratology. 50:23–31. doi: 10.1016/j.ntt.2015.05.005
93. Okia M, Hoel DF, Kirunda J, Rwakimari JB, Mpeka B, Ambayo D, Price A, Oguttu DW, Okui AP, Govere J. 2018. Insecticide resistance status of the malaria mosquitoes: Anopheles gambiae and Anopheles funestus in eastern and northern Uganda. Malar J. 17(1):157. doi: 10.1186/s12936-018-2293-6.
94. Olutona GO, Olatunji SO, Obisanya JF. 2016. Downstream assessment of chlorinated organic compounds in the bed-sediment of Aiba Stream, Iwo, South-Western, Nigeria. Springerplus. 5:67. doi: 10.1186/s40064-016-1664-0.

95. [OMS] Organización Mundial de la salud. 1989. Criterios de Salud Ambiental 87: aletrina, d- aletrina, bioaletrina, s-bioaletrina. Ginebra: OMS. Serie de Informes Técnicos. https://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc87.htm
96. Otey CA, Boukhelifa M, Maness P. 2003. B35 neuroblastoma cells: an easily transfected, cultured cell model of central nervous system neurons. Methods in cell biology. 71:287-304. doi: 10.1016/s0091-679x(03)01013-6.
97. Pacheco FJ, Almaguel FG, Evans W, Rios-Colon L, Filippov V, Leoh LS, Leoh LS, Rook-Arena E, Mediavilla-Varela M, De Leon M, Casiano CA. 2014. Docosahexanoic acid antagonizes TNF-α-induced necroptosis by attenuating oxidative stress, ceramide production, lysosomal dysfunction, and autophagic features. Inflammation research. 63:859-871. doi: 10.1007/s00011- 014-0760-2.
98. Park YS, Park JH, Ko J, Shin IC, Koh HC. 2017. mTOR inhibition by rapamycin protects against deltamethrin-induced apoptosis in PC12 Cells. Environmental toxicology. 32:109-121.
doi: 10.1002/tox.22216
99. Perry MJ, Venners SA, Barr DB, Xu X. 2007. Environmental pyrethroid and organophosphorus insecticide exposures and sperm concentration. Reproductive toxicology. 23(1):113-118. doi: 10.1016/j.reprotox.2006.08.005
100. Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic acids research. 29(9):e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
101. Phillips BM, Anderson BS, Hunt JW, Siegler K, Voorhees JP, Tjeerdema RS, McNeill K. 2012. Pyrethroid and organophosphate pesticide-associated toxicity in two coastal watersheds (California, USA). Environmental toxicology and chemistry. 31(7):1595-1603.
doi: 10.1002/etc.1860.
102. Pubchem. 2021. Allethrin. Disponible en: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/1511#section=Metabolism-Metabolites-(Complete)
103. QYResearch Group. 2017. Global Synthetic Pyrethroids Market Research Report. https://www.marketresearch.com/QYResearch-Group-v3531/Global-Synthetic-Pyrethroids-Research-10909246/.

104. Radi E, Formichi P, Battisti C, Federico A. 2014. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Journal of Alzheimer's disease: JAD. 42(3):S125-S152. doi: 10.3233/JAD-132738.
105. Radwan M, Jurewicz J, Wielgomas B, Sobala W, Piskunowicz M, Radwan P, Hanke W. 2014. Semen quality and the level of reproductive hormones after environmental exposure to pyrethroids. Journal of occupational and environmental medicine. 56(11):1113-1119. doi: 10.1097/JOM.0000000000000297.
106. Ramos-Chavez LA, Sordo M, Calderon-Aranda E, Castañeda-Saucedo E, Ostrosky-Wegman P, Moreno-Godinez ME. 2015. A permethrin/allethrin mixture induces genotoxicity and cytotoxicity in human peripheral blood lymphocytes. Journal of toxicology and environmental health. Part A. 78(1):7-14. doi: 10.1080/15287394.2015.956025.
107. Ray A, Sehgal N, Karunakaran S, Rangarajan G, Ravindranath V. 2015. MPTP activates ASK1-p38 MAPK signaling pathway through TNF-dependent Trx1 oxidation in parkinsonism mouse model. Free radical biology & medicine. 87:312-325. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.041
108. Ray DE, Fry JR. 2006. A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. Pharmacology & therapeutics. 111(1):174-193. doi: 10.1016/j.pharmthera.2005.10.003.
109. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. 2016. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. Biochimica et biophysica acta. 1863:2977-2992. doi: 10.1016/j. bbamcr.2016.09.012
110. Riederer AM, Smith KD, Barr DB, Hayden SW, Hunter RE Jr, Ryan PB. 2010. Current and historically used pesticides in residential soil from 11 homes in Atlanta, Georgia, USA. Archives of environmental contamination and toxicology. 58(4):908-917. doi: 10.1007/s00244-009-9439-z.
111. Romero A, Ramos E, Castellano V, Martínez MA, Ares I, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, Anadón A. 2012. Cytotoxicity induced by deltamethrin and its metabolites in SH-SY5Y cells can be differentially prevented by selected antioxidants. Toxicology in Vitro. 26:823–830. doi: 10.1016/j. tiv.2012.05.004.
112. Romero A, Ramos E, Ares I, Castellano V, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, Anadón A, Martínez MA. 2016. Fipronil sulfone induced higher cytotoxicity than fipronil in SH-SY5Y cells: Protection by antioxidants. Toxicology letters. 252:42-9. doi: 10.1016/j.toxlet.2016.04.005.

113. Romero A, Ramos E, Ares I, Castellano V, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, Anadón A, Martínez MA. 2017. Oxidative stress and gene expression profiling of cell death pathways in alpha-cypermethrin-treated SH-SY5Y cells. Archives of toxicology. 91(5):2151-2164. doi: 10.1007/s00204-016-1864-y.
114. Rougemont M, Do KQ, Castagné V. 2002. New model of glutathione deficit during development: Effect on lipid peroxidation in the rat brain. Journal of neuroscience research. 70(6):774-783. doi: 10.1002/jnr.10439.
115. Saillenfait AM, Ndiaye D, Sabaté JP. 2015. Pyrethroids: exposure and health effects--an update. International journal of hygiene and environmental health. 218(3):281-292. doi: 10.1016/j.ijheh.2015.01.002.
116. Shafer TJ, Atchison WD. 1991. Transmitter, ion channel and receptor properties of pheochromocytoma (PC12) cells: a model for neurotoxicological studies. Neurotoxicology. 12(3):473-492. PMID: 1720882.
117. Shipley MM, Mangold CA, Szpara ML. 2016. Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. Journal of visualized experiments. 108:53193. doi: 10.3791/53193.
118. Sies H. 1993. Strategies of antioxidant defense. European journal of biochemistry. 215(2):213-9. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18025.x.
119. Singh A, Tripathi P, Prakash O, Singh MP. 2016. Ibuprofen abates cypermethrin-induced expression of pro-inflammatory mediators and mitogen-activated protein kinases and averts the nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration. Molecular neurobiology. 53:6849-6858. doi: 10.1007/s12035-015-9577-4.
120. Skolarczyk J, Pekar J, Nieradko-Iwanicka B. 2017. Immune disorders induced by exposure to pyrethroid insecticides. Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online). 71(0):446-453. doi: 10.5604/01.3001.0010.3827.
121. Smith MA. 2006. Oxidative stress and iron imbalance in Alzheimer disease: how rust became the fuss! Journal of Alzheimer's disease: JAD. 9(3 Suppl):305-308. doi: 10.3233/jad-2006-9s334.
122. Soderlund DM, Bloomquist JR. 1989. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. Annual review of entomology. 34:77-96. doi: 10.1146/annurev.en.34.010189.000453.
123. Soderlund DM, Clark JM, Sheets LP, Mullin LS, Piccirillo VJ, Sargent D, Stevens JT, Weiner ML. 2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. Toxicology. 171(1):3-59. doi: 10.1016/s0300-483x(01)00569-8.

124. Soderlund DM. 2012. Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. Archives of toxicology. 86(2):165-181. doi: 10.1007/s00204-011-0726-x.
125. Spurlock F, Lee M. 2008. Synthetic pyrethroid use patterns, properties, and environmental effects. American Chemical Society. 1:3-25.
126. Stout DM 2nd, Bradham KD, Egeghy PP, Jones PA, Croghan CW, Ashley PA, Pinzer E, Friedman W, Brinkman MC, Nishioka MG, Cox DC. 2009. American Healthy Homes Survey: a national study of residential pesticides measured from floor wipes. Environmental science & technology. 43(12):4294-300. doi: 10.1021/es8030243.
127. Sultana R, Piroddi M, Galli F, Butterfield DA. 2008. Protein levels and activity of some antioxidant enzymes in hippocampus of subjects with amnestic mild cognitive impairment. Neurochemical research. 33(12):2540-2546. doi: 10.1007/s11064-008-9593-0.
128. Takahashi M, Komada M, Miyazawa K, Goto S, Ikeda Y. 2018. Bisphenol A exposure induces increased microglia and microglial related factors in the murine embryonic dorsal telencephalon and hypothalamus. Toxicology letters. 284:113-119. doi: 10.1016/j.toxlet.2017.12.010
129. Tang W, Wang D, Wang J, Wu Z, Li L, Huang M, Xu S, Yan D. 2018. Pyrethroid pesticide residues in the global environment: An overview. Chemosphere. 191:990-1007. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.10.115.
130. Tiwari MN, Singh AK, Agrawal S, Gupta SP, Jyoti A, Shanker R, Prakash O, Singh MP. 2012. Cypermethrin alters the expression profile of mRNAs in the adult rat striatum: a putative mechanism of postnatal pre-exposure followed by adulthood re-exposure-enhanced neurodegeneration. Neurotoxicity research. 22:321–334. doi: 10.1007/s12640-012-9317-8
131. Todt F, Cakir Z, Reichenbach F, Emschermann F, Lauterwasser J, Kaiser A, Ichim G, Tait SW, Frank S, Langer HF, Edlich F. 2015. Differential retrotranslocation of mitochondrial Bax and Bak. The EMBO journal. 34(1):67-80. doi: 10.15252/embj.201488806.
132. Tomlin CDS, ed. Bioaletrina S-ciclopentilo isómero (28434-00-6). En: The e-Pesticide Manual, 13a edición, versión 3.1 (2004-05). Surrey, Reino Unido, Consejo Británico de Protección de Cultivos.

133. Tornatore L, Thotakura AK, Bennett J, Moretti M, Franzoso G. 2012. The nuclear factor kappa B signaling pathway: integrating metabolism with inflammation. Trends in cell biology. 22:557-566. doi: 10.1016/j.tcb.2012.08.001.
134. Toshima H, Suzuki Y, Imai K, Yoshinaga J, Shiraishi H, Mizumoto Y, Hatakeyama S, Onohara C, Tokuoka S. 2012. Endocrine disrupting chemicals in urine of Japanese male partners of subfertile couples: a pilot study on exposure and semen quality. Int J Hyg Environmental health. 215(5):502-506. doi: 10.1016/j.ijheh.2011.09.005.
135. Tripathi P, Singh A, Agrawal S, Prakash O, Singh MP. 2014. Cypermethrin alters the status of oxidative stress in the peripheral blood: relevance to Parkinsonism. Journal of physiology and biochemistry. 70:915-924. doi: 10.1007/s13105-014-0359-7
136. USEPA (United States Environmental Protection Agency). 1999. Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances. Reigart, J.R., Roberts, J.R. Recognition and Management of Pesticide Poisonings. 5th ed. EPA Document No. EPA 735-R-98 003. p. 87. https://www.epa.gov/pesticides/safety/healthcare,
137. USEPA (United States Environmental Protection Agency). 2007. OPPTS. Aletrinas: Capítulo revisado de HED del documento de decisión de elegibilidad de reinscripción (RED). p.14 EPA-HQ-OPP-2006-0986-0012). https://www.regulations.gov/search/Regs/home.html#home.
138. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. 2009. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. Current neuropharmacology. 7(1):65-74. doi: 10.2174/157015909787602823.
139. Verschoyle RD, Aldridge WN. 1980. Structure-activity relationships of some pyrethroids in rats. Archives of toxicology. 45(4):325-329. doi: 10.1007/BF00293813
140. Wagner-Schuman M, Richardson JR, Auinger P, Braun JM, Lanphear BP, Epstein JN, Yolton K, Froehlich TE. 2015. Association of pyrethroid pesticide exposure with attention-deficit/hyperactivity disorder in a nationally representative sample of U.S. children. Environmental health. 14:44. doi: 10.1186/s12940-015-0030-y.
141. Wang N, Kuang L, Han B, Li Q, Chen Y, Zhu C, Chen Y, Xia F, Cang Z, Zhu C, Lu M, Meng Y, Guo H, Chen C, Lin D, Lu Y. 2016. Follicle-stimulating hormone associates with prediabetes and diabetes in postmenopausal women. Acta Diabetologica. 53(2):227-236. doi: 10.1007/s00592-015-0769-1.

142. Wang T, Li C, Han B, Wang Z, Meng X, Zhang L, He J, Fu F. 2020. Neuroprotective effects of Danshensu on rotenone-induced Parkinson's disease models in vitro and in vivo. BMC complementary medicine and therapies. 20(1):20. doi: 10.1186/s12906-019-2738-7.
143. Wang X, Ni H, Xu W, Wu B, Xie T, Zhang C, Cheng J, Li Z, Tao L, Zhang Y. 2021. Difenoconazole induces oxidative DNA damage and mitochondria mediated apoptosis in SH-SY5Y cells. Chemosphere. Nov. 283: 131160. doi: 10.1016/j.chemosphere.131160.
144. Weston DP, Poynton HC, Wellborn GA, Lydy MJ, Blalock BJ, Sepulveda MS, Colbourne JK. 2013. Multiple origins of pyrethroid insecticide resistance across the species complex of a nontarget aquatic crustacean, Hyalella azteca. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 110(41):16532-16537. doi: 10.1073/pnas.1302023110.
145. Wielgomas B, Nahorski W, Czarnowski W. 2013. Urinary concentrations of pyrethroid metabolites in the convenience sample of an urban population of Northern Poland. International journal of hygiene and environ health. 216(3):295-300. doi: 10.1016/j.ijheh.2012.09.001.
146. Xie HR, Hu LS, Li GY. 2010. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. Chinese medical journal (Engl). 123(8):1086-1092. PMID: 20497720.
147. Yahouédo GA, Chandre F, Rossignol M, Ginibre C, Balabanidou V, Mendez NGA, Pigeon O, Vontas J, Cornelie S. 2017. Contributions of cuticle permeability and enzyme detoxification to pyrethroid resistance in the major malaria vector Anopheles gambiae. Scientific reports. 7(1):11091. doi: 10.1038/s41598-017-11357-z.
148. Yamamoto D, Quandt FN, Narahashi T. 1983. Modification of single sodium channels by the insecticide tetramethrin. Brain Research. 274(2):344-349. doi: 10.1016/0006-8993(83)90716-3.
Ye X, Pan W, Zhao S, Zhao Y, Zhu Y, Liu J, Liu W. 2017. Relationships of Pyrethroid Exposure with Gonadotropin Levels and Pubertal Development in Chinese Boys. Environmental science & technology. 51(11):6379-6386. doi: 10.1021/acs.est.6b05984.
149. Ye X, Liu J. 2019. Effects of pyrethroid insecticides on hypothalamic-pituitary-gonadal axis: A reproductive health perspective. Environmental Pollution. 245:590-599. doi: 10.1016/j.envpol.2018.11.031.

150. Yoo M, Lim YH, Kim T, Lee D, Hong YC. 2016. Association between urinary 3-phenoxybenzoic acid and body mass index in Korean adults: 1(st) Korean National Environmental Health Survey. Annals of occupational and environmental medicine. 28:2. doi: 10.1186/s40557-015-0079-7.
151. Yoshinaga J, Imai K, Shiraishi H, Nozawa S, Yoshiike M, Mieno MN, Andersson AM, Iwamoto T. 2014. Pyrethroid insecticide exposure and reproductive hormone levels in healthy Japanese male subjects. Andrology. 2(3):416-420. doi: 10.1111/j.2047-2927.2014.00202.x.
152. Zhao M, Zhang Y, Zhuang S, Zhang Q, Lu C, Liu W. 2014. Disruption of the hormonal network and the enantioselectivity of bifenthrin in trophoblast: maternal-fetal health risk of chiral pesticides. Environmental science & technology. 48(14):8109-8116. doi: 10.1021/es501903b.
153. Zhi SM, Fang GX, Xie XM, Liu LH, Yan J, Liu DB, Yu HY. 2020. Melatonin reduces OGD/R-induced neuron injury by regulating redox/inflammation/apoptosis signaling. European review for medical pharmacological science. 24(3):1524-1536. doi: 10.26355/eurrev_202002_20211.
154. Zhou L, Zhou M, Tan H, Xiao M. 2020. Cypermethrin-induced cortical neurons apoptosis via the Nrf2/ARE signaling pathway. Pesticide biochemistry and physiology. 165:104547. doi: 10.1016/j.pestbp.2020.02.013.
155. Zhu Q, Yang Y, Zhong Y, Lao Z, O'Neill P, Hong D, Zhang K, Zhao S. 2020. Synthesis, insecticidal activity, resistance, photodegradation and toxicity of pyrethroids (A review). Chemosphere. 254:126779. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.126779.

VIII. GLOSARIO

3-PBA	Ácido 3-fenoxibenzoico
ADN	Ácido dexorribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Bax	Gen pro-apoptótico
Bcl-2	Gen anti-apoptótico
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CBMN cyt	Citoma de micronúcleos de bloqueo de citonesis
CD28 y CD45	Glicoproteínas de la familia de las inmunoglobulinas que actúa como receptor celular presente sobre la membrana de los linfocitos t.
DCCA	Ácido carboxílico dimetilciclopropano
CN	Ciano
COX2	Prostaglandina-endoperóxido sintasa 2. Es una ciclooxigenasa enzima relacionada con la inflamación.
DCF	Diclorofluoresceína
DCFH-DA	Diclorofluoresceina diacetato. Tinte fluorogénico que mide la actividad de hidroxilo, peroxilo y otras especies reactivas de oxígeno (ros) dentro de la célula.
DE	Desviación estándar
Defb22	Proteina beta-defensin 22, componente del glucocálix espermático.
DMSO	Dimetilsulfóxido (solvente orgánico)
ED50	Dosis efectiva
FBS	Suero fetal bovino
FSH	Hormona foliculoestimulante
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
HPG	Eje hipotalámico-hipofisario-gonadal

IC_{50}	Concentración inhibitoria media máxima
IGF1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IkB	Proteína inhibidora
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
LD_{50}	Dosis letal media
LDH	Lactato deshidrogenasa
LH	Hormona luteinizante límite de detección
LOD	Límite de detección
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MDA	Malondialdehido
MN	Micronúcleos
MTT	Ensayo de viabilidad celular
NBUD	Brotes nucleares
NDI	Índice de división nuclear
NF-kB	Factor de transcripción
NO	Oxido nitrico
NPB	Formación de puentes nucleoplasmáticos
Nrf2/ARE	Vías de señalización
PBL	Linfocitos de sangre periférica
PCR	Reacción en cadena polimerasa
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxigeno
SOD	Superóxido bismutasa
CAT	Catalasa
GPx	Glutation peroxidasa
GSH	Glutation reducido
Spag11b	(sperm-associated antigen 11b) antígeno asociado a esperma 11b es una proteína que en humanos esta codificada por el gen spag11b.
Tgf-beta1	Factor de crecimiento transformante beta 1.
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
UAF	Unidades arbitrarias de fluorescencia