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

Neurotoxicidad y muerte celular en células SH-SY5Y producidas por la exposición del insecticida piretroide flumetrin

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Roger Carlos CALDERÓN ROMERO

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

Calderón R. Neurotoxicidad y muerte celular en células SH-SY5Y producidas por la exposición del insecticida piretroide flumetrin [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	ROGER CARLOS CALDERÓN ROMERO.
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	45193055
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-2165-820X
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	Nieves Sandoval Chaupe
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07011047
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	César Lázaro de la Torre
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	40628304
Datos de investigación	

Línea de investigación	B.4.1.3. Fisiología animal
Grupo de investigación	Grupo de investigación en fisiología y fisiopatología en animales de trópico y de altura (GIFATA)
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Proyectos de Investigación con Financiamiento para Grupos de Investigación Año 2021 Resolución Rectoral Nº 005753-2021-R/UNMSM con código de proyecto A21080401
Ubicación geográfica de la investigación	- Universidad Nacional Mayor de San Marcos País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: San Borja Urbanización: Los Jardines de Salamanca Avenida: Circunvalación Latitud: -12.0815915 Longitud: -76.9877331
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Julio 2019 – marzo 2020
URL de disciplinas OCDE	Toxicología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.07

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

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

1. **FECHA DE LA SUSTENTACIÓN 21/06/2022**

HORA INICIO: 12:00 horas

HORA TÉRMINO: 13:00 horas

2. **MIEMBROS DEL JURADO**

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

MIEMBRO: **MV. Mg. Sandoval Chaupe, Nieves Nancy**

MIEMBRO: **MV. Dr. Lazaro De La Torre, César Aquiles**

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

3. **DATOS DEL TESISTA**

APELLIDOS Y NOMBRES: **CALDERÓN ROMERO, ROGER CARLOS**

CÓDIGO: *11080045*

R.R. DE GRADO DE TESISTA NÚMERO: **N° 05210-R-17**

TÍTULO DE LA TESIS: **"NEUROTOXICIDAD Y MUERTE CELULAR EN CÉLULAS SH-SY5Y PRODUCIDAS POR LA EXPOSICIÓN DEL INSECTICIDA PIRETROIDE FLUMETRIN"**

4. **RECOMENDACIONES**

Ninguna

Datos de la plataforma virtual institucional del acto de sustentación:
https: meet,Google.com/owg-cqcs-ziw
ID:
archivada en:

NOTA OBTENIDA: Diecisiete

PÚBLICO ASISTENTE: (Nombre, apellido y DNI)

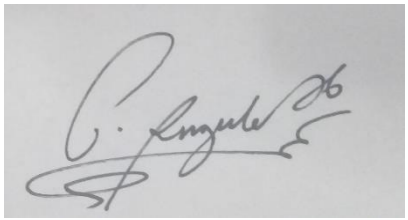
TESISTA	**1**	Roger Calderón Romero	-	taiz.rey@unmsm.edu.pe
JURADO	**2**	Pedro Angulo Herrera	-	panguloh@unmsm.edu.pe
	3	Luis Manuel Barrios Arpi	-	lbarriosa@unmsm.edu.pe
	4	Nieves Sandoval Chaupe	-	nsandovalc@unmsm.edu.pe
	5	César Lázaro de la Torre	-	clazarod@unmsm.edu.pe
MODERADOR	**6**	Mirvam Quevedo Urday	40064320	mquevedou@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 Hovos Sifuentes	41175479	luis.hovos@unmsm.edu.pe
	10	Víctor Hugo Castillo	08703624	vcastillod@unmsm.edu.pe
INVITADOS POR EL TESISTA	**11**	Jorge Luis Jara Romero	76680991	koshyfz@gmail.com
	12	Paola Vidal Cortijo	40795514	paolavidal7@gmail.com
	13	Gladys Romero Correa	31633070	gladysromero896@gmail.com
	14	Rene Calderón Tito	07861338	renecalderontito@gmail.com
	15	Ana Guillén Peñadillo	45486368	aguillenpenadillo@gmail.com
	16	Ketty Alfaro Farfán	70990072	kettyalfarovet@gmail.com
	17	Serbio Tulio Espinoza	21794924	serbio.espinoza@unica.edu.pe
	18	Ricardo Rojas Muñoz	21464689	ricardorojas8@gmail.com
	19	María Gamarra Romero	48203318	Marygamarra796@gmail.com
	20	Chistian Lopez Romero	46894296	chloro256@gmail.com
	21	José Ordaya Fierro	41544195	jorgeveter@gmail.com
SOLICITUD DE ASISTENCIA DOCENTES	**22**	Eva Casas Astos	-	ecasasa@unmsm.edu.pe
	23	Antonio Ampuero Bustillo	-	aampuerob@unmsm.edu.pe
	24	Madeline García Leandro	-	madeline.garcia@unmsm.edu.pe
	25	Nadia Fuentes Neira	-	nfuentesn@unmsm.edu.pe
	26	Juan Pavel Olazabal Loaiza	-	jolazaball@unmsm.edu.pe
	27	Sandra Bezada Quintana	-	sbezadaq@unmsm.edu.pe
	28	Alfonso Chavera Castillo	-	achaverac@unmsm.edu.pe

SOLICITUD DE ASISTENCIA ESTUDIANTES	**29**	Joel Jefferson Cuenca	48667693	joel.cuenca@unmsm.edu.pe
	30	Erick André Rojas Monzón	73741249	erickandre.rojas@unmsm.edu.pe
	31	Sharon Nicole Cabanillas	77676886	sharon.ncr@gmail.com
	32	Domingo Adrian Torres	72906079	domingo.torres@unmsm.edu.pe
	33	Jhovanna Yarin Carrizales	72880766	jhovanna.yarin@unmsm.edu.pe
	34	Richard Torres	70451073	ratorresg22@gmail.com
	35	Nataly Julissa Enrriquez	73815867	nataly.enrriquez@unmsm.edu.pe
	36	Ada Pilar Lescano Cuya	41919229	0810245@unmsm.edu.pe
	37	Camila Valeria Cortez R.	73542105	camila.cortez@unmsm.edu.pe
INGRESARON SIN INSCRIBIRSE	**38**	Renato Vignati	-	
	39	Mariella Ramos González	-	
	40	Josselyn Escano	-	
	41	Camila Gutierrez Grijalva	-	

INFORMÁTICA		Andrés Trujillo Peña	informatica.fmv@unmsm.edu.pe

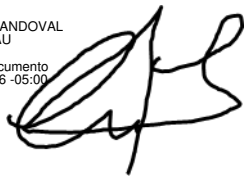
	ASISTIÓ
	NO ASISTIÓ

5. FIRMAS DE LOS MIEMBROS DEL JURADO



Q.F. Dr. Angulo Herrera, Pedro

PRESIDENTE

Firma	UNMSM Firmado digitalmente por SANDOVAL CHAUPE Nieves Nancy FAU 20148092282 soft Motivo: Soy el autor del documento Fecha: 27.06.2022 18:29:26 -05:00 **Firma**	
MV. Mg. Barrios Arpi, Luis Manuel **Apellidos y Nombres**	**MV. Mg. Sandoval Chaupe, Nieves Nancy** **Apellidos y Nombres**	**MV. Dr. Lázaro De La Torre, César Aquiles** **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:
5. Operador del Programa Informático de similitudes: Sandoval Monzón Rocío Silvia.
6. Documento evaluado: *Neurotoxicidad y muerte celular en células sh-sy5y producidas por la exposición del insecticida piretroide flumetrin.*
7. Autor del documento: Calderón Romero Roger Carlos
8. Fecha de recepción del documento: 29 de junio del 2021
9. Fecha de aplicación del programa informático: 30 de junio del 2021
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:
    - Eprints.ucm.es : 3%
    - www.jove.com: 2%
    - tpedi.wikispaces.com: 1%
14. Observaciones: el mayor porcentaje de las similitudes halladas en la tesis evaluada se encuentran en las secciones de índice de contenido.
15. Calificación de originalidad:
    DOCUMENTO CUMPLE CRITERIOS DE ORIGINALIDAD, SIN OBSERVACIONES
16. Fecha del informe: 30 de junio del 2021

DEDICATORIA

A mis abuelitos, Fulgencio y Alejandrina, quienes ya no se encuentran entre nosotros.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Barrios, por su mentoria, el seguimiento y las facilidades durante desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Rodriguez, por su amistad, por la confianza depositada, su constante apoyo, sus críticas constructivas, además de los valiosos consejos para mi devenir académico.

Al Dr. Huanca, quien muy amablemente nos brindó las facilidades para poder llevar a cabo la primera parte de este estudio en el Laboratorio de Reproducción Animal de nuestra facultad.

Al Dr, Lira y a todo el personal de apoyo del Laboratorio de Fisiología Animal de nuestra facultad.

A la familia y a los amigos que nunca abandonan.

Contenido

RESUMEN i
ABSTRACT ii
LISTA DE FIGURAS iii
LISTA DE TABLAS iv
I. INTRODUCCIÓN 1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 3
2.1. PIRETRINAS Y PIRETROIDES 3
2.2. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS PIRETROIDES 5
2.3. CLASIFICACIÓN DE LOS PIRETROIDES 10
2.4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS PIRETROIDES 11
2.4.1. Efectos sobre los canales de sodio dependientes de voltaje 12
2.4.2. Efectos sobre los canales de cloruro 16
2.4.3. Efecto sobre los canales de calcio 17
2.4.4. Efecto sobre receptores del ácido gamma animo butírico (GABA) 18
2.4.5. Efectos sobre el sistema nervioso central (SNC) 19
2.4.6. Efectos sobre el comportamiento 19
2.4.7. Actividad sobre la fosforilación de proteínas 20
2.4.8. Sinergismo entre plaguicidas 21
2.4.9. Otros 21
2.5. TOXICOCINÉTICA 22
2.5.1. Absorción 22
2.5.2. Metabolismo 23
2.5.3. Distribución 31
2.5.4. Excreción 31
2.6. TOXICIDAD 32
2.6.1. Neurotoxicidad 33
2.6.2. Toxicidad Dérmica 34
2.6.3. Toxicidad por inhalación 34
2.6.4. Teratología 35
2.6.5. Toxicidad subaguda y crónica 35
2.6.6. Carcinogenicidad 36
2.6.7. Toxicidad en el hombre 36
2.7. PIRETROIDE FLUMETRÍN 38

2.7.1. Estructura 39
2.7.2. Metabolismo y toxicidad de flumetrín 40
2.7.3. Usos 43
2.8. MUERTE CELULAR POR PLAGUICIDAS 44
2.8.1. Paraquat (PQ) 45
2.8.2. Clorpirifos (CPF) 45
2.8.3. Fipronil (FPN) 46
2.9. CELULAS DEL NEUROBLASTOMA SH-5YSY 47
2.9.1. Generalidades 47
2.9.2. Diferenciación neuronal 49
2.9.3. Fisiología 50
2.9.4. Usos de ensayo 55
2.10. APOPTOSIS 55
2.10.1. Vías apoptóticas 56
2.10.2. Vía extrínseca o del receptor de muerte 57
2.10.3. Vía intrínseca o mitocondrial 57
III. MATERIALES Y MÉTODOS 60
3.1. LUGAR DE ESTUDIO 60
3.2. MATERIALES Y REACTIVOS 60
3.3. EQUIPOS 61
3.4. VIABILIDAD CELULAR POR REDUCCION DE BROMURO DE 3-(4,5 DIMETILTIAZOL-2-IL)-2,5-DIFENILTETRAZOLIO (MTT) 61
3.4.1. Linea celular y condiciones de cultivo. 62
3.4.2. Preparación del medio de cultivo y crecimiento celular (con rojo fenol) 62
3.4.3. Cultivo celular SH-SY5Y 62
3.4.4. Pasajes celulares 63
3.4.5. Preparación del medio de cultivo celular crecimiento celular (sin rojo fenol). 64
3.4.6. Preparación de los tratamientos 64
3.6. EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS A MUERTE CELULAR (APOPTOSIS) POR RT-PCR 66
3.6.1. Extracción de RNA y síntesis de cDNA 66
3.6.2. Extracción de RNA total 67
3.6.3. Eliminación del DNA genómico 68
3.6.4. Preparación del mix de retrotranscripción 68
3.6.5. Reacción de la cadena de la polimerasa (qPCR). 69
3.7. ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN 69

IV. RESULTADOS 70
4.1. EFECTO DE FLUMETRÍN SOBRE LA VIABILIDAD POR MTT. 70
4.2. EFECTO DE FLUMETRÍN SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS A MUERTE EN CÉLULAS NEURONALES SH-SY5Y. 71
V. DISCUSIÓN 76
VI. CONCLUSIONES 81
VII. RECOMENDACIONES 82
VIII. BIBLIOGRAFÍA 83

RESUMEN

El uso de piretroides de manera cotidiana presenta una aparente baja toxicidad sobre mamíferos, aunque los estudios sobre neurotoxidad en modelos *in vivo* e *in vitro* parecen indicar lo contrario siendo necesario replantear las posturas sobre estos compuestos. El objetivo de este estudio es evaluar el efecto neurotóxico y la alteración en la expresión de genes de muerte celular, Bax, Bcl-2 y casp-3, por exposición al insecticida piretroide flumetrín en células del neuroblastoma SH-SY5Y. Los ensayos de viabilidad celular por reducción del MTT y expresiones de genes de muerte celular por RT-PCR se realizaron en el Laboratorio de Fisiología Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM. Para el ensayo de viabilidad celular, las células SH-SY5Y, fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de $8x10^4$ cel/pocillo y se incubaron durante 24 h con flumetrín en diferentes concentraciones (50, 100, 200, 500 y 1000 μM), luego se adicionó 150μL de DMSO al 5% (v/v) se dejó incubar por 5 min y se llevó al lector de ELISA a absorbancia a 540 nm. Para el ensayo de expresión de genes de muerte celular, las células SH-SY5Y, fueron incubadas por 24 h con flumetrín a diferentes concentraciones (20, 50 y 500 μM), se obtuvo el ARN usando el reactivo TRIzol y se purificó mediante el kit comercial de limpieza RNeasy MinElute y fueron corridas en RT-PCR, usando el master mix RT^2 SYBR Green qPCR. Los resultados de viabilidad celular determinaron la reducción en una forma dosis-dependiente (15 %, 22 %, 41 %, 43 % y 47 %, respectivamente); logarítmicamente se predijo la IC_{50} para flumetrín siendo 104 μM. Los resultados de la expresión de genes de muerte celular determinaron respectivamente un aumento significativo de la expresión de casp-3 en 1,34 ($P < 0.05$), 2,1 y 2,7 ($P < 0.001$) veces respecto al vehículo. Los niveles de Bax aumentaron respectivamente en 1,8 y 2.5 ($P < 0.001$) veces respecto al vehículo. La expresión de Bcl-2 no mostró cambios significativos en su expresión. El ratio muerte/sobrevivencia celular determinado por la relación Bax/Bcl-2, y se encontró que la susceptibilidad de sufrir muerte celular debido a la dosis tiene un correlación muy alta (r = 0.99). Con este estudio se evidencia el efecto neurotóxico del flumetrín en células SH-SY5Y, además se sugiere continuar con los estudios de este piretroide.

Palabras clave: Flumetrín, neurotoxicidad, SH-SY5Y, MTT, RT-PCR.

ABSTRACT

The daily use of pyrethroids shows apparent low toxicity about mammals, even though the studies about neurotoxicity in experimental models in vivo and in vitro seem to display the opposite, being required to reframe the position about these compunds. The aim of this study is to assess the neurotoxic effect and the disturbance into the cell death gene expression, Bax, Bcl-2 y casp-3, by exposure to pyrethroid flumethrin insecticide in neuroblastoma SH-SY5Y cells. Cell viability assays by reduction of MTT and cell death gene expression by RT-PCR were carried out in Animal Physiology Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine of the UNMSM. For the cell viability assay, SH-SY5Y cells were seeded in 96 well plates at a density of $8x10^4$ cells/well and incubated for 24 h, with flumethrin at different concentrations (50, 100, 200, 500 and 1000 µM), then 150 µL of 5% (v/v) DMSO was added and allowed to incubate for 5 min and the ELISA reader was taken to absorbance at 540 nm. For the cell death gene expression assay, SH-SY5Y cells were incubated for 24 h with flumethrin at different concentrations (20, 50 and 500 µM), RNA was obtained using TRIzol reagent and purified using the comercial RNeasy MinElute cleanup kit and were run in RT-PCR, using the RT2 SYBR Green qPCR master mix.Cell viability results determined the reduction in a dose-dependent manner (15 %, 22 %, 41 %, 43 % and 47 %, respectively); logarithmically the IC50 for flumethrin was predicted to be 104 µM. Cell death gene expression results respectively, determined a significant increase in casp-3 expression at 1,34 ($P < 0.05$), 2,1 and 2,7 ($P < 0.001$) times with respect to vehicle. Bax levels were also increased respectively by 1.8 y 2.5 ($P < 0.001$) times with respect to vehicle. The expression of Bcl-2 did not show significant changes in its expression. The cell death/survival ratio was determined by the Bax/Bcl-2 ratio, and the susceptibility to cell death due to dose was found to have a very high correlation ($r = 0.99$). With this study, the neurotoxic effect of flumethrin in SH-SY5Y cells is evidenced, and it is also suggested to continue with the studies of this pyrethoid.

Palabras clave: flumethrin, neurotoxicity, SH-SY5Y, MTT, RT-PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Estructura de la aletrín – piretroide tipo I.	8
2.	Estructura de la cifenotrín – piretroide tipo II (Presencia del grupo α -ciano).	9 9
3.	Tipos de piretroides y síndromes.	11
4.	Metabolismo de piretroides.	26
5.	Estructura química del piretroide flumetrín.	39
6.	Metabolismo del piretroide flumetrín.	41
7.	Condiciones de cultivo de células SH-SY5Y.	64
8.	Ensayo de viabilidad celular por MTT en células SH-SY5Y.	66
9.	Curva sigmoidea concentración-efecto de flumetrín sobre células SH-SY5Y para obtener la IC50 por el programa Origin Pro 8.6.	70
10.	Citotoxicidad inducida por flumetrín sobre la viabilidad celular de las células SH- 5Y-SY después de un periodo de incubación de 24h.	
11.	Citotoxicidad inducida por flumetrín sobre la expresión génica de Casp-3 en células SH-5YSY después de un periodo de incubación de 24h.	72
12.	Citotoxicidad inducida por flumetrin sobre la expresión génica de Bax en células SH-SY5Y después de un periodo de incubación de 24h.	73
13.	Citotoxicidad inducida por flumetrín sobre la expresión génica de Bcl-2 en células SH-SY5Y después de un periodo de incubación de 24h.	74
14.	Citotoxicidad inducida por flumetrín sobre el ratio Bax/Bcl.2 en células SH-SY5Y.	75

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Piretroides de tipo I y II	8

I. INTRODUCCIÓN

Los extractos naturales de las flores de las plantas del generó *Chrysanthemum*, son llamadas piretrinas o extractos de piretro y fueron usados desde la antigüedad para controlar piojos y otros ectoparásitos (Casida, 1980). A partir de estos compuestos se obtuvieron derivados sintéticos conocidos como piretroides, de mejor acción plaguicida y mayor estabilidad medio ambiental, respecto a las piretrinas (Casida, 1980; 1983; Kaneko, 2010; Matsuo, 2019).

En la actualidad, los piretroides son ampliamente usados e incluso han llegado a reemplazar a muchos otros insecticidas y plaguicidas, eso se debe a la "seguridad" que presentan sobre los mamíferos, tanto para el hombre y los animales, estos últimos, ya sean de producción o de compañía (Bloomquist, 1989; Narahashi, 1996; Ray y Forshaw 2000).

Estrucuturalmente los compuestos piretroides presentan entre si muchas características comunes: un resto ácido y un resto de alcohol, unidos por un enlace éster; aunque para poder clasificarlos, se estudiaron los efectos de la toxicidad aguda que producían sobre los roedores, caracterizando de ese modo los signos clínicos tóxicos, (Aldridge et al., 1978; Elliott et al., 1983; Martínez et al., 2020) dividiéndolos en:

Piretroides tipo I: Compuestos que producen el aumento de la sensibilidad a los estímulos externos, temblores finos, ataxia y parálisis, llamado síndrome de Tipo I o T (Forshaw et al., 1993; Soderlund et al., 2012, Matsuo, 2019; Martínez et al., 2020).

Piretroides tipo II: Compuestos que producen salivación profusa, hiperactividad, temblor grueso que progresa a coreoatetosis, ataxia y convulsiones clónicas, llamado síndrome tipo II o CS (Anadón et al., 2009; Kaneko, 2011; Rodríguez et al, 2018).

Los estudios basados en piretroides, sobretodo en los de tipo II, fueron clásicamente desarrollados en roedores y artrópodos *in vivo,* determinando así su su poca toxicidad aparente, sin embargo, en los últimos años, diversos estudios tanto *in vivo* e *in vitro*, nos hacen pensar que algunos de estos plaguicidas piretroides no son tan seguros como se afirmaban, teniendo el potencial de ocasionar efectos citotóxicos sobre diferentes células, dada la alteración de la homeostasis de estas (Breckenridge et al., 2009; Kaneko, 2011).

A lo largo del tiempo se han desarrollado muchos estudios que demuestran la acción de diferentes piretroides a nivel nervioso (Anadón, et al., 2009. Se sabe que los piretroides tienen múltiples mecanismos de acción, siendo los canales de sodio dependiente de voltaje a nivel neuronal el principal modelo para la explicación de la signología y la neurotoxicidad (Rodríguez et al., 2018; Ujihara, 2019).

En la actualidad, el uso de líneas células como SH-SY5Y, pueden aportar información de suma valía a fin de evaluar los efectos neurotóxicos a la exposición de estos compuestos plaguicidas y otros en general (Cheung et al., 2009; Shipley et al. 2016). En este contexto, la información que se encuentra en la literatura, es relativamente escasa respecto a estudios *in vitro* con compuestos piretroides en general y más escasa aún para el piretroide tipo II flumetrín, en comparación a otros miembros de mismo tipo y sus rangos de seguridad en mamíferos, tanto en humanos como en animales (Başçi y Eraslan, 2014).

Dado esto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto neurotóxico del piretroide flumetrín a través de la viabilidad celular en células SH-SY5Y y la expresión de genes (Bax, Bcl-2 y casp-3) involucrados en la vías de muerte celular, así como la ratio de muerte celular Bax/Bcl-2 para evaluar la susceptibilidad de muerte por efecto de dicho piretroide.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. PIRETRINAS Y PIRETROIDES

El uso de los extractos naturales de las cabezas de las flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium,* conocidas como piretrinas o piretro (pyrethrum), ya era conocido desde la antigüedad tanto en China y Persia para controlar piojos; posteriormente el comercio de las flores se expandió a Asia y África Oriental popularizando su uso (Casida, 1980).

Los estudios para determinar la estructura química de estos compuestos fue un largo proceso que duró aproximadamente 60 años (Anadón et al., 2009). El primer informe científico acerca de las piretrinas, fue publicado por el biólogo japonés, Fujitani, en 1909; que las describrió como ésteres; mientras que las investigaciones sobre las estructuras químicas principales de estos compuestos eran dilucidadas entre 1910 y 1924 (Casida, 1980).

En 1923, Yamamoto fue el primero en informar que la estructura química de los extractos de piretro contenía un anillo de ciclopropano. Por otro lado, los reportes de Staudinger y Ruzicka (1924), ambos ganadores del premio Nobel, revelaron una extensa investigación sobre los principios activos en dichos extractos, estos incluían a los ésteres derivados del ácido ciclopropanocarboxílico con hidroxiciclopentanonas, aunque la estructura del resto de alcohol al principio incorrecta, se dilucidaría con el tiempo (Matsuo, 2019). Luego en 1954, se terminó de dilucidar la configuración absoluta del resto ácido de piretrina I y poco después en 1955, el de la piretrina II (Yamamoto, 1923; Crombie y Harper, 1954; Inouye et al., 1955). En la actualidad sabemos que estos "extractos de pyrethrum" o piretro contienen seis ésteres estrechamente relacionados, las piretrinas I y II, las jasmolinas I y II, y las cinerinas I y II (Kaneko, 2010).

Por otro lado, los piretroides son derivados sintéticos de estas piretrinas; encontrando en ambas una estructura química muy similar. Se sabe que los piretroides presentan mayor fotoestabilidad, es decir que su permanencia en el medio ambiente es más prolongada, además de un mayor potencial plaguicida respecto a los anteriores compuestos (Elliott et

al., 1976; 1978; 1983; Soderlund et al., 2002); esto también genera un potencial tóxico más alto en mamíferos (Verschoyle y Aldridge, 1980; Soderlund et al., 2002).

Para poder clasificar estos compuestos, se tuvieron en cuenta muchos aspectos, entre los cuales destacan las características de sus estructuras moleculares y la acción fisiológica que generan en los roedores, para finalmente clasificarlos comercialmente en los tipos I y II. Los piretroides de tipo I, son ésteres del ácido crisantémico y alcoholes con restos de anillo furano, mientras que los tipos tipo II también son ésteres, pero entre el ácido pirétrico y un alcohol cíclico (Martínez et al., 2020; Matsuo, 2019).

El primer piretroide sintetizado fue el aletrín, desarrollado en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos en 1949 (Ujihara, 2019) y a partir de este, la producción de piretroides sintéticos fue aumentando con el paso de los años en las últimas 6 décadas, teniendo actualmente más de 1 000 compuestos diferentes, aunque de todos ellos, se han comercializado algo más de 30 tipos de piretroides, siendo incluso menos de una docena los de mayor demanda comercial, sobretodo en Estados unidos, entendiendo además que cada uno de estos compuestos tiene su propia historia de fondo. (Matsuo, 2019).

Los productos comerciales generalmente aprovechan el sinergismo, usando mezclas de piretrinas con piretroides, en el caso de estos últimos, son generalmente la combinación de ambos tipos de isómeros, tanto ópticos (R / S o D) y geométricos (*cis*/*trans*), aunque muchas veces, el efecto insecticida de estas combinaciones se debe a solamente uno o dos de esos dos isómeros (He, 1994). En líneas generales el isómero *cis* de estos compuestos es más tóxico que el isómero *trans* (Casida et al., 1983).

Los sinergistas evitan que ciertas enzimas degraden a las piretrinas y piretroides, aumentando así la eficacia y toxicidad; por otro lado, dicha toxicidad por parte de los piretroides hacia los mamíferos, es menor que la de otros grupos de pesticidas tales como organofosforados, insecticidas carbamatos u organoclorados, debido a sus propiedades farmacológicas y toxicológicas (Anadón et al., 2009). En consecuencia, es posible que tanto humanos como animales estén expuestos de diferentes maneras a estos compuestos, sin presentar manifestaciones clínicas graves (Bradberry et al., 2005).

Los piretroides se usan ampliamente como insecticidas tanto en el hogar como en el comercio, y en medicina veterinaria, para el tratamiento tópico de sarna y piojos en diferentes presentaciones, debido a una buena acción de volteo o de caída en los insectos (Elliott et al., 1973; 1978). El desarrollo de la bobina para el control de mosquitos fue y es sigue siendo ampliamente utilizado en todo el mundo para controlar tanto mosquitos como a otros insectos. En países tropicales, se usa comercialmente mosquiteros embebidos con deltametrín para evitar la propagación de enfermedades transmitidas por estos vectores, como el paludismo, tal actividad hace muy común la exposición de este insecticida a las personas, de diversas edades y diferentes estados de salud; esto podría generar a largo plazo la aparición de ciertas patologías neurológicas (Bradberry et al., 2005; Barlow et al., 2010; Rodríguez et al., 2018).

En nuestro país se usan muchos productos comerciales a base de muchas líneas de piretroides, tanto de laboratorios nacionales y extranjeros, siendo el caso de aletrín, ciflutrín, permetrín y deltametrín los de mayor uso, en el caso puntual de flumetrín, son menos los productos que se tienen como base a este compuesto; entre los más resaltantes encontramos a los collares de control de pulgas y garrapatas para animales menores (collar Seresto) y un grupo un poco mayor para animales producción (abejas, conejos, cuyes, carneros y vacas) en el control de ectoparásitos, tales como Bayticol y Bayvarol (Bayer), Ectickol Pour On (Agrovet Market), Ectolab Pour On y Ectolab 200 (Laebet SAC), Escarlat® Flu Pour On y Ectopro FY Pour On (Montana), Varroflum (Laboratorios Snaiwer), entre otros.

Para este último piretroide en particular la información y publicaciones respecto a sus estudios tanto *in vivo* e *in vitro* es bastante escasa comparada a otros piretroides de su mismo tipo.

2.2. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS PIRETROIDES

Desde los primeros ensayos de Fujitani en 1900 sobre las piretrinas, ya se establecía la presencia de un enlace éster en el compuesto del piretro, a ello se sumaron, posteriormente, los ensayos de Yamamoto en 1923 y de los prestigiosos químicos Stäudinger y Ružička en 1942, quienes tuvieron un gran aporte en del desarrollo de la química de estos compuestos. Debido al nivel científico en ese momento, ya que no había

instrumentos analíticos espectroscópicos, las estructuras propuestas inicialmente tenían algunos errores y fue recién en 1945 donde pudo dilucidarse correctamente la estructura plana de estos compuestos (LaForge y Barthel, 1945). En 1958 finalmente se determinó la estructura química completa, incluyendo la estereoquímica, (Katsuda et al., 1958). Esta información, fue la clave para el desarrollo posterior de la química molecular de estos compuestos piretroides.

A los componentes del piretro aislados por Stäudinger y Ružička, les denominaron piretrina I y II y propusieron estructuras para ambas sustancias. El resto de alcohol de los dos ésteres era la piretrolona, es decir eran idénticos, pero diferían en sus porciones del resto ácido. En el caso de la piretrina I, a nivel del resto ácido se encuentra el ácido crisantemo, y para la piretrina II, encontramos al ácido pirétrico. (Hoffmann y Krause, 2004). Los componentes originales del ácido crisantemo natural poseen estructuras de ciclopropano con centros quirales 1R, 3R (o 3S) como ingrediente activo como insecticida (Ohno et al., 1974; 1976).

El avance en los métodos de separación molecular, permitieron demostrar que el extracto de piretro era una mezcla, no de dos, sino de seis compuestos estructuralmente similares, sumándose a las ya descritas piretrinas I y II: Las cinerinas I y II descubiertas en 1944 y 1945, respectivamente (LaForge y Barthel, 1945) y las jasmolinas I y II (Godin P et al., 1966). Estos compuestos presentaban modificaciones de la cadena lateral de piretrolona. Entonces el extracto del piretro está formado por los seis ésteres, los cuales son las piretrinas I y II, las jasmolinas I y II, y las cinerinas I y II (Kaneko, 2010, Matsuo, 2019).

En las estructuras de las cinerinas, encontramos a la cinerolona, unida mediante un enlace éster ya sea con el ácido crisantémico, para la cinerina I o el ácido pirétrico, para la cinerina II, respectivamente; mientras en las jasmolinas, encontramos a la jasmolona unida al ácido crisantémico en el caso de la jasmolina I o el ácido pirétrico, para la jasmolina II, respectivamente (Anadón et al., 2009: Kaneko, 2010).

Las modificaciones en los restos de los ésteres de las moléculas de piretrinas naturales dieron origen a muchos compuestos denominados piretroides sintéticos, siendo del aletrín, el primer piretroide sintetizado en laboratorio en 1949 desarrollado en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos en 1949 (Schechter et al., 1949).

Las modificaciones de los restos ácidos y de alcohol en las estructuras químicas de los piretroides no se limitaron, aumentando el estudio en estos piretroides de primera generación (Anadón et al., 2009) y posteriormente en la década de los 70s ya se estudiaban a los piretroides de segunda generación (Matsuo, 2019).

El resto de ácido crisantemo fue modificado debido a la inestabilidad que presentaba con respecto al oxígeno, el calor y la luz. A nivel del resto de ácido crisantémico, se lograron identificar puntos débiles a niveles de los dos grupos metilo, determinando que el metilo en la posición *trans*– (E) era el más sensible. (Chen y Casida, 1969), de modo tal que llego a sintetizarse permetrín como piretroide de uso agrícola, evidenciando una mayor fotoestabilidad comparado a los primeros piretroides.

Debemos recordar que las moléculas de un par de enantiómeros tienen exactamente las mismas propiedades físicas como punto de ebullición y de fusión y solubilidad. Por otro lado, si un par de estereoisómeros no son el uno del otro como la imagen exacta en el espejo, se les llaman diasterómeros. La diferencia en estructura les confiere diferentes propiedades físicas, como por ejemplo diferentes puntos de ebullición y de fusión y diferente solubilidad. (Elliott et al, 1973; Jeanmart, 2003).

A finales de los 60s, la empresa "Badische Anilin und Soda Fabrik" (BASF) introdujo un grupo etinilo en la posición α de varios piretroides de tipo bencilo como el dimetrín y encontró una potencia mejorada en comparación con la de los derivados no sustituidos (Vollrath et al., 1972) Este hallazgo se aplicó inmediatamente a varios piretroides conocidos, como los derivados de fenotrín (Fujimoto et al., 1973; 1974), empezando a comercializarse bajo el nombre de cifenotrín, usado como ingrediente activo en el control de cucarachas (Matsuo et al., 1976). Fue entonces, el cifenotrín, el primer compuesto de una nueva línea llamada piretroides tipo II (en este punto, ya son considerados piretroides de tercera generación) estando caracterizada la presencia de un grupo α-ciano en su estructura (Matsuo, 2019).

Los piretroides tipos II, debido a su letalidad y eficiencia, son los que han tenido un mayor desarrollo y uso en el campo agrícola. Se sabe que estos compuestos, tienen un efecto principal a nivel de los canales de sodio, al igual que los piretroides de tipo I (Lund y Narahashi, 1983). La adición del grupo α-ciano a la estructura básica del éster

ciclopropano carboxílico, logró no solo una mayor fotoestabilidad (que no presentan las piretrinas), sino también una mayor potencia en el efecto insecticida (Lund y Narahashi, 1983; Soderlund y Bloomquist, 1989; Ujihara, 2019).

Debido a que la molécula piretroide, generalmente tiene dos centros quirales, cuatro isómeros son disponibles para cada especie. Tanto diasterómeros como enantiómeros pueden tener diferentes propiedades de insecticida y diferente toxicidad. Los concentrados de piretrinas y de piretroides de calidad técnica se mezclan generalmente con solventes para producir el producto de calidad comercial (Narahashi, 1986, Laskowski, 2002).

Piretroides	
Tipo I	**Tipo II (α-ciano)**
• Aletrín • Bifentrín • Bioaletrín • Cismetrín • Empentrín • Etofenprox • Fenotrín • Imiprotrín • Kadetrín • Metoflutrín • Permetrín • Praletrín • Resmetrín • Tetrametrín	• Cicloprotrín • Cifenotrín • Ciflutrín • Cipermetrín • Deltrametrín • Esfenvalerato • Fenpropantrín • Fenvarelato • Flucitrinato • Flumetrín • Fluvalinato • Tralometrín • λ-Cialotrín

Tabla 1: Piretroides de tipo I y II. Se puede observar que en la actualidad la variedad de los compuestos pertenecientes a los tipos de piretroides ha ido en aumento, cada compuesto con sus propias particularidades moleculares y toxicocinéticas.

En el caso de estos plaguicidas, las estructuras moleculares no son la única manera de poder diferenciar a este compuesto, sino también las manifestaciones clínicas agudas en roedores, asociadas a estos compuestos. Estos estudios fueron publicados en 1970, identificando los piretroides tipo I y los piretroides tipo II, según la presencia o ausencia del grupo α-ciano (Casida et al., 1983; Barnes y Verschoyle, 1974; Soderlund y Bloomquist, 1989; Breckenridge et al., 2009; Kaneko, 2011; Matsuo, 2019).

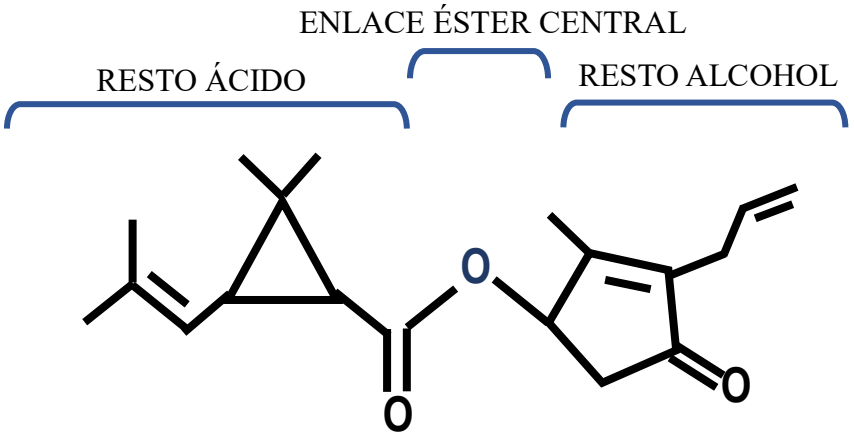


Figura 1. Estructura de la aletrín – piretroide tipo I. Este fue el primer piretroide sintetizado en laboratorio en 1949, en su estructura molecular encontramos un resto ácido y un resto de alcohol, unidos por un enlace éster, al modificar los ésteres de las piretrinas naturales se obtienen los piretroides sintéticos (Imagen adaptada de Matsuo, 2019).

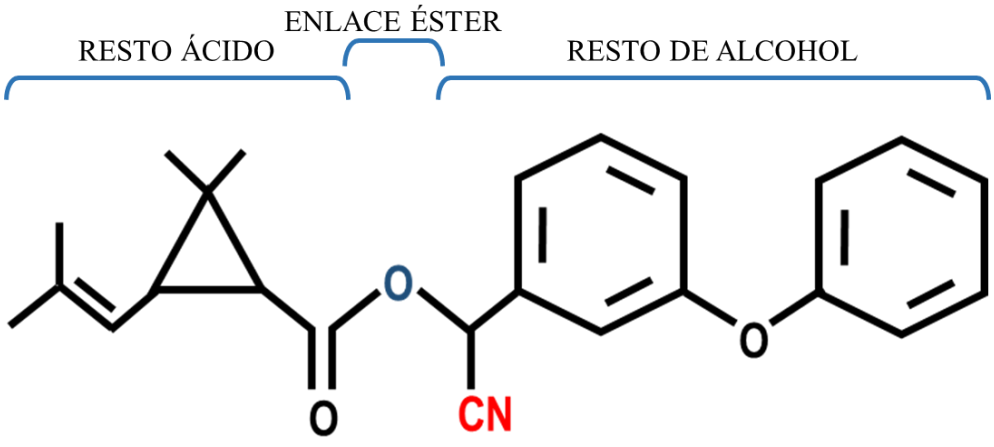


Figura 2. Estructura de la cifenotrín – piretroide tipo II (Presencia del grupo α -ciano). A inicios de los 70s, la adición de grupos ciano (CN) a los primeros piretroides, lograba mejorar

fotoestabillidad y acción plaguicida, siendo el cifenotrín el primer piretroide de tipo II (Imagen adaptada de Matsuo, 2019).

2.3. CLASIFICACIÓN DE LOS PIRETROIDES

El éster inestable que se obtenía a partir del crisantemo se expuso a insectos, peces y mamíferos, observando cuadros de excitación y parálisis, efectos ligados al sistema neuromuscular y nervioso (Fujitani, 1909). Luego, diferentes dosis se probaron en artrópodos, encontrando una de las primeras informaciones del mecanismo de acción del piretroide aletrín a través de registros intracelulares del potencial de acción en preparados nerviosos de los axones de insectos, como cucarachas (Gammon et al., 1981; Narahashi, 1986).

Los diferentes trabajos de manifestaciones clínicas por toxicidad aguda de los piretroides en roedores, sumado al estudio de su geometría molecular han sido relevantes para clasificar a estos compuestos en 2 tipos:

Los piretroides tipo I, son aquellos que carecen de un grupo α-ciano en el resto de alcohol fenoxibencil, que producen mayor sensibilidad a los estímulos externos, logrando así hiperactividad, hipertermia, temblor fino, ataxia y postración, llamado síndrome T o tipo I (Forshaw 1994; Ray y Forshaw 2000; Matsuo, 2019; Martínez et al., 2020).

Los piretroides tipo II, tienen la adición de un grupo α-ciano en el átomo de carbono bencílico del resto de alcohol, generando salivación profusa, temblor grueso que llega a progresar a convulsiones clónicas, coreoateosis, salivación hiperactividad en general (Verschoyle y Aldridge, 1980), llamado síndrome CS o tipo II (Soderlund y Bloomquist, 1989; Breckenridge et al., 2009; Soderlund et al. 2002; Matsuo, 2019; Martínez et al., 2020).

Aunque existen algunos piretroides como cifenotrín y flucitrinato que no entran en tal clasificación, debido a que a presentan efectos combinados en estos dos síndromes. (Soderlund et al., 2002; Ray y Alevines, 2006).

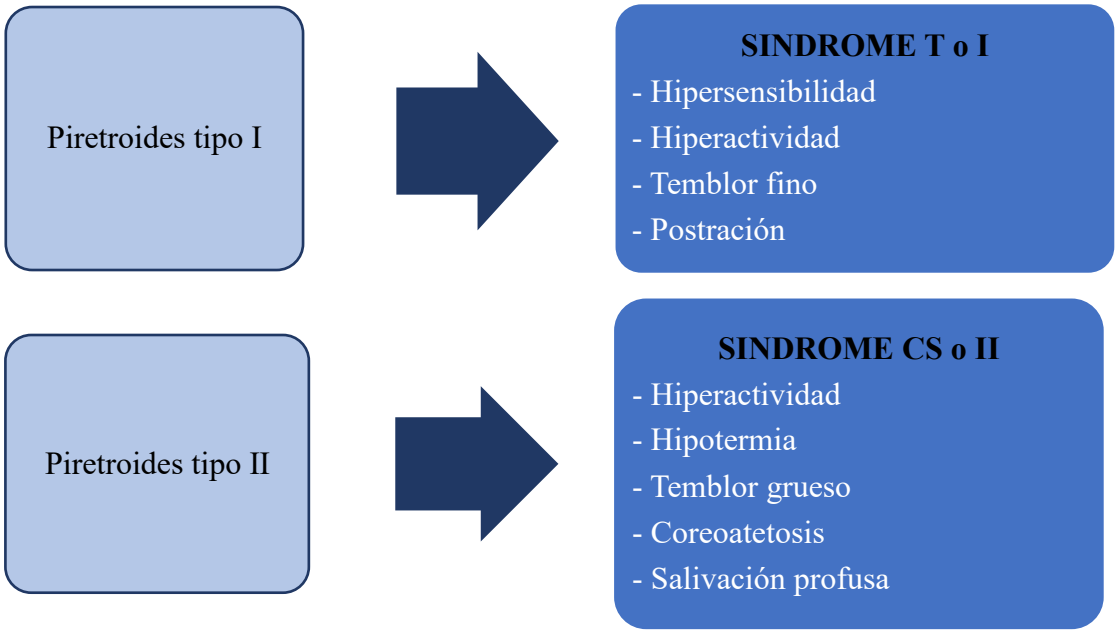


Figura 3. Tipos de piretroides y síndromes. Los estudios en los signos clínicos de los roedores tras la intoxicación aguda y la estereoisomería han sido determinantes para la clasificación de estos compuestos.

2.4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS PIRETROIDES

Los mecanismos de acción de estos compuestos a nivel celular son bastante amplios, estudiándose principalmente la capacidad de estos para unirse a los canales de sodio dependientes de voltaje, logrando así, desencadenar efectos neurotóxicos en mamíferos (Clark, 1995; Narahashi, 1996; Soderlund, 2012). Además, se han sumado estudios sobre los efectos que tienen sobre los canales de cloruro y calcio, apoyando la diferenciación de ambos síndromes (Soderlund et al., 2002; Breckenridge et al., 2009; Rodríguez et al., 2016, Mohammadi et al., 2019).

La interacción de estos compuestos con muchos canales iónicos, aún no es completa, pero en estudios *in vitro*, los piretroides tipo II a concentraciones bajas, estimularon las rutas de fosforilación de múltiples proteínas dependiente de quinasas (Enan y Matsumura, 1993).

Existe escasa información sobre las diferencias en la sensibilidad de los piretroides entre animales jóvenes y adultos. En estudios con ratas neonatales, se encontró un aumento de

6 a 17 veces más, la sensibilidad comparada a los adultos expuestos a los piretroides permetrín, cipermetrín y deltametrín, notando esta mayor sensibilidad de los animales jóvenes se debió a diferencias relacionadas a la farmacocinética, siendo intrínsecamente mayor la sensibilidad del SNC neonatal (Cantalamessa, 1993; Sheets et al., 1994).

La estereoespecifidad es clave para desarrollar la acción de piretroides en el organismo, los isómeros *cis* 1R y 1S se unen competitivamente a un sitio, y los 1R y 1S los isómeros *trans* se unen de manera no competitiva a otros de sus receptores iónicos (Narahashi, 1986).

Los ensayos en artrópodos, señalaron que tanto los piretroides I y II, ocasionaban las signologías características de cada síndrome respectivamente (Gammon et al. 1981).

2.4.1. Efectos sobre los canales de sodio dependientes de voltaje

Se han propuesto muchos modelos para explicar los mecanismos de acción de los piretroides, estableciendo principalmente que todos estos compuestos tienen un mecanismo de acción común sobre los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav) en las membranas celulares (Chinn y Narahashi, 1986; Soderlund, 2012 Matsuo, 2019; Martínez et al., 2020). Este mecanismo común genera acciones farmacológicas agudas debido a la interacción con estos compuestos (Ray, 2001).

La toxicidad aguda presenta manifestaciones clínicas diferentes de síndromes I y II, (Verschoyle y Aldridge, 1980; Bloomquist y Soderlund, 1988). Aunque, algunos piretroides producen una combinación de ambos síndromes, para diferenciarlos se hizo evaluaciones en ratas de experimentación y medir así, una serie de índices electrofisiológicos a nivel de las corrientes de sodio (Wright et al., 1988).

Los piretroides inhiben la desactivación e inactivación de los canales iónicos, causando, por ejemplo, una apertura prolongada de los canales de sodio (Bloomquist, 1996; Bloomquist y Soderlund, 1988; Toshio, 1992; Vijverberg et al., 1982; Vijverberg y van den Bercken, 1990).

Los canales Na_v en mamíferos están fromados por la subunidad α y las subunidades β. Las subunidades α, forman los poros transmembranas, se han identificado diez subunidades α diferentes ((Nav1.1–1.9, Nax) formada básicamente por 4 dominios (I-IV) y cuatro subunidades β (β1-β4), que se expresan de manera específica para cada tejido, región y tiempo. Los mamíferos tienen nueve genes de subunidades α, que codifican las isoformas de los canales de sodio con diferentes propiedades de activación y diferentes patrones de expresión en varios tipos de células, tejidos y etapas de desarrollo, presumiblemente para cumplir funciones fisiológicas únicas en células neuronales y no neuronales específicas (Goldin et al., 2000; Yu y Catterall, 2003; Dong, 2010).

En los mamíferos, las subunidades β (β1 a β4) juegan un papel importante en la modulación de la expresión, la activación y la sensibilidad del ligando de los canales de sodio de los mamíferos (Catterall, 2000).

Dentro del mecanismo de acción de los piretroides, se ha estudiado la alteración de la acción dinámica de los canales de sodio dependientes de voltaje en el tejido nervioso, tanto en insectos como en mamíferos (Anadón et al., 2009). La alteración de la fisiología de estos canales, ante la exposición de piretroides, es bastante estereoespecífica, siendo algunos isómeros más tóxicos que otros (Lund y Narashashi, 1982). Razón por la cual existe diferente acción entre los isómeros, siendo el isomero *cis*, generalmente más tóxicos que los isómeros *trans*. En mamíferos, los isómeros R1 son activos y los isómeros S1 son inactivos, haciendo que los isómeros 1S no sean tóxicos (Narahashi, 1986).

Al interactuar con las subunidades α de estos canales de sodio, los piretroides de tipo I, inhiben la desactivación e inactivación de los canales ionicos, logrando prolongar la apertura de estos, generando descargas repetitivas a nivel de las membranas neuronales, es decir potenciales de acciones repetidos a partir de impulsos únicos (Vijverberg y van den Bercken, 1990; Bloomquist y Soderlund, 1988; Toshio., 1992; Ray 2001; Shafer et al., 2005), aumentando sutilmente la activación del flujo de iones sodio, luego de este evento, el potencial negativo de las membranas neuronales es prolongado (Joy, 1994). Esto genera velocidades menores a los 10 m/s en mamíferos, causando una "menor" hiperexcitabilidad reflejada en temblor fino, efecto muy similar a los producidos por dicloro difenil tricloroetano (DDT) (Ray y Forshaw, 2000).

Los piretroides Tipo II, no inducen descargas repetitivas, lo que hacen, es mantener abiertos los canales en periodos de mayor duración, aumentando así el flujo de iones de sodio hacia el interior de las neuronas, logrando una despolarización más sostenida (hiperdespolarización), pasado esto, ocurre una ralentización en la repolarización de la membrana, inactivando la acción de estos canales dependientes de voltaje por un mayor tiempo, el efecto generará una despolarización tan persistente a nivel de la membrana neuronal que logra el bloqueo de la conducción nerviosa (Narahashi et al., 1998 ; Ray y Forshaw, 2000; Anadón, et al., 2009; Breckenridge et al., 2009; Martínez et al., 2020).

Un piretroide de Tipo I, aumenta el tiempo medio de apertura de los canales de sodio aproximadamente en 10 veces En contraste, los compuestos de tipo II, como deltametrín y el fenvalerato, aumentan hasta 200 veces los tiempos promedio de apertura de los canales de sodio, produciendo canales que permanecen abiertos al final de los pulsos de despolarización. Por lo cual se puede aceptar la acción estabilizadora y ralentizadora de los piretroides a nivel de muchos canales iónicos, en una transición entre el paso de un estado a otro (Soderlund, 2010; Maund et al., 2012). Los efectos de hiperexcitabilidad están relacionado con la dosis de piretroide, pero la naturaleza de esta excitabilidad depende de la estructura de estos compuestos (Ray y Forshaw, 2000).

A diferencia de los insectos, los mamíferos cuentan con varias isoformas del canal de sodio dependiente de voltaje distribuidas en sus diversos tejidos, logrando diferencias en sus propiedades biofísicas, farmacológicas y sensibles a los diversos piretroides (Goldin, 2001; 2003).

Normalmente, en una neurona podemos encontrar múltiples subunidades α y β de los canales de sodio, estos patrones sobre la expresión de las subunidades del canal de sodio en el SNC, modificarían la sensibilidad de las isoformas de los canales de sodio de mamíferos a los piretroides, además la unión de los piretroides con las diferentes isoformas de los canales de sodio dependientes de voltaje, generan un modificación o cambio conformacional de estos canales que presentan el receptor para la molécula de piretroide en la boca interna (Soderlund, 2010).

Los mamíferos son menos sensibles a la acción de los piretroides, incluso si comparamos a las isoformas de los canales de sodio de la rata, que ya son bastante sensibles, estas,

siguen presentando menor sensibilidad frente a los canales de sodio de los artrópodos, (Soderlund et al., 2019), los canales de sodio de los insectos son 100 veces más sensibles que el de la rata, además se sabe que el cerebro de estos roedores los canales de sodio son bastante sensible a los piretroides tipo II, pero no tanto a los de tipo I (Ray y Forshaw, 2000). Una diferencia clave, parece ser la presencia del aminoácido isoleucina en mamíferos mientras que los insectos se encuentra la metionina, lo que aumenta en gran medida la sensibilidad a los piretroides (Soderlund et al., 2012). Parece ser que los canales de sodio dependientes de voltaje en el hombre son menos sensibles a los canales de las ratas, aunque la base molecular para esta diferencia aun es desconocida (Tan y Soderlund, 2009a; 2009b).

Los canales de sodio de los nervios periféricos son muy sensibles a los piretroides, especialmente a los compuestos de tipo II, que pueden ser relevantes para la producción de parestesia, se sabe además que dicha parestesia producida por la exposición ante piretrinas y piretroides tipo I y II se deben exposiciones dérmicas (Ray y Forshaw, 2000; Ray, 2001).

Otro factor importante a considerar es la temperatura en la actúan los piretroides (Soderlund et al., 2002). Al disminuir la temperatura corporal de los mamíferos, el flujo de iones sodio es más prolongado, incrementando los impulsos nerviosos repetitivos; por otro lado, al aumentar la temperatura corporal esto cambia, es decir disminuye el flujo de iones, razón para considerar el efecto de la temperatura sobre la acción de los piretroides en los canales de sodio. (Vijverberg et al., 1990). Entonces podríamos decir que hay una selectividad multifactorial de la toxicidad de los piretroides entre insectos y mamíferos (Song et al., 1996).

La variación de tiempo de la abertura de los canales de sodio, contribuyen a diferenciar los tipos de síndromes ya sean T o CS, después de la exposición ante piretroides del tipo I y del tipo II respetivamente (Anadón, 2009).

Las disrupciones en los canales de sodio causan un aumento aproximado de 10 ms, cuando normalmente es de 0.5 ms en estos canales, es decir, las alteraciones en las corrientes de sodio desatan la signología clínica neurológica de incoordinación,

coreoatetosis, convulsiones tónicas y efectos directos sobre el músculo esquelético, cardíaco y glándulas salivales, en el síndrome CS (Ray y Forshaw, 2000).

2.4.2. Efectos sobre los canales de cloruro

Los piretroides pueden alterar la fisiología de estos canales de cloruro voltaje-dependientes de proteína quinasa C (PKC) del sistema nervioso. Son los piretroides de tipo II los que principalmente se unen a canales de iones de cloruro de la membrana neuronal, aunque estos canales no parecen ser lo suficientemente sensibles como para tener una influencia en dosis relevantes para la intoxicación sistémica, salvo en el caso de deltametrín (Gammon et al. 1982; Forshaw et al., 1993; 1994).

Los estudios en piretroides tipo I y II en sistema neuromuscular mostraron efectos de resistencia despolarizante en membrana muscular, lo que se sugiere un bloqueo de la permeabilidad al cloruro de la membrana muscular (Forshaw et al., 1987; Forshaw y Ray, 1990).

Los piretroides tipo II son antagonistas del receptor $GABA_A$, producen un efecto similar a la estricnina de uso insecticida (Anadón, 2009). A diferencia de los canales de sodio, los canales de cloruro funcionales son sensibles a piretroides, y pertenecen a los denominados “canales maxi” de cloruro (Franciolini y Petris, 1990). Los “canales maxi” cloruro, se activan por despolarización de la membrana y tienen alta conductancia, son independientes del calcio y están inactivados por fosforilación de la proteína quinasa C, los piretroides en altas dosis, disminuyen la acción de estos “canal maxi” cloruro, aumentando así excitabilidad y por lo tanto un logran generar un efecto sinérgico con los canales de sodio (Bradberry et al., 2005).

Agentes como la ivermectina y pentobarbital generan la apertura de canales de cloruro, es decir antagonizan los efectos provocados por los piretroides, tales como la salivación, coreoateosis, las acciones repetitivas en el musculo esquelético (Forshaw et al., 2000). A concentraciones relativamente altas, los piretroides también pueden actuar sobre los canales de cloruro para el ácido aminobutírico (GABA) (Bloomquist et al., 1986), es por ello que las acciones sobre el canal de cloruro, contribuyen más a las características del

síndrome tipo II o SC, aunque parece ser que los piretroides tipo II tienen una importancia clínica limitada para actuar con dicho receptor GABA (Bradberry et al., 2005).

Los estudios *in vitro* en cultivos neuronales de ratón desafiados a muchos tipos de piretroides, señalaron que tanto deltametrín como cipermetrín, suprimen eficazmente el estado abierto de los canales de cloruro activados por voltaje (Burr y Ray, 2004) como lo señalado años antes por Forshaw et al. (1993).

2.4.3. Efecto sobre los canales de calcio

La aplicación de piretroides tipo I y II en bioensayos de cerebros de rata, causaron aumento de la liberación de neurotransmisores como la noradrenalina a nivel de los sinaptosomas; siendo los piretroides tipo II los que mayor efecto. La liberación de noradrenalina y muchos otros neurotransmisores dependen en gran medida del ingreso de Ca ++ al citosol del sinaptosoma, eso supone que los piretroides como deltametrín, puede actuar sobre entidades transportadoras de Ca ++, como los canales de sodio y calcio dependientes de voltaje y el intercambiador Na + / Ca ++, entre otros (Clark y Brooks, 1989).

Varios estudios demuestran que la proteína kinasa C (PKC) puede ser estimulada por concentraciones bajas de deltametrín, esto debido a que este piretroide, causó un agotamiento casi completo de las vesículas sinápticas de las terminales nerviosas de las motoneuronas presinápticas, favoreciendo la aparición del síndrome CS, que tiene muchas similitudes con una crisis epiléptica (salvación, coreoatetosis, entro otros) (Clark y Brooks, 1989).

El aumento de la liberación de neurotransmisores inducida por piretroides también es evidente después de la despolarización del terminal nervioso (Soderlund, 2010).

Los estudios para detectar distintas corrientes de calcio de tipo L y T en células de neuronales de ratón, determinaron que los piretroides tipo I como tetrametrín, bloquearon el 75% de la corriente de calcio de tipo T pero solo el 30% de la corriente de tipo L (Yoshii et al., 1985). En contraste, los piretroides tipo II, como deltametrín y fenvalerato no tuvieron ningún efecto sobre la conducción eléctrica para calcio. Resultados similares se

encontraron en células de nódulo sinoauricular aisladas de corazón de conejo (Yoshii et al., 1985)

En estudios con células del músculo liso intestinal de cobayas, tetrametrín disminuyó y bloqueó la trasmisión eléctrica en el túbulo T de forma dosis-dependiente (Yabu et al., 1989). En las células neurosecretoras, teflutrín indujo un bloqueo parcial de la corriente generada por calcio en los canales de calcio tipo L (Wu et al., 2009).

2.4.4. Efecto sobre receptores del ácido gamma animo butírico (GABA)

Como ya se mencionó en la sección de canales de cloruro, los piretroides de tipo I y II pueden actuar como sustancias proconvulsivantes a través de la inhibcicón de GABAérgicos y sistemas glutamatérgicos. Piretroides en altas dosis pueden interactuar con estos canales receptores de GABA (Anadón et al., 2009).

Algunos ensayos electrofisiológicos para evaluar la sensibilidad relativa de los receptores GABA y canales de sodio dependientes de voltaje en cultivos de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal, indicaron que los receptores GABA eran mucho menos sensibles a las acciones de deltametrín que las poblaciones de canales de sodio dependientes de voltaje expresados en las mismas células (Forshaw et al., 1993; 1994).

Además, los registros electrofisiológicos de las vías GABAérgicas definidas en el hipocampo de rata (Gilbert et al., 1989; Joy et al., 1990) mostraron que los efectos de los piretroides fueron consistentes con un aumento de la inhibición, posiblemente como resultado de la excitación de los canales de sodio de neuronas presináptica GABAérgicas, en lugar de el antagonismo de inhibición que es típico de establecido bloqueadores del canal de cloruro controlado por GABA (Soderlund, 2010).

Los estudios sobre intoxicación *in vivo* por parte de piretroides tipo II han reportado el efecto para bloquear receptores GABA en el sistema nervioso de mamíferos, dicho efecto puede llevar a un estado neuroexcitatorio. La acción de los piretroides en los receptores GABA es algo estereoselectiva para los isómeros neurotóxicos de los compuestos α-ciano, pero no exhibe la estereoespecificidad absoluta en las relaciones estructura-toxicidad (Soderlund, 2010).

Se compararon los efectos de 9 piretroides sobre la actividad motora de ratas, tras la administración oral en aceite de maíz, la actividad de este efecto se evaluó 1,5 a 2 h en un laberinto post administración. Los piretroides ocasionaron una disminución dosis-dependiente de la actividad motora y no se observaron diferencias entre los efectos del piretroide I y II (Crofton y Reiter, 1984). Por otro lado, un estudio comparativo de 11 piretroides realizado en los 90s, (Wolansky, 2005) confirmaron la reducción de la actividad motora y otro estudio con 18 piretroides volvieron a confirmar los efectos resumidos anteriormente (Wolansky y Harrill, 2008).

2.4.5. Efectos sobre el sistema nervioso central (SNC)

Se han llevado muchos estudios acerca de la acción los piretroides en el SNC, se documentó por primera vez en el cerebro de ratas tratadas con deltametrín a nivel de los terminales nerviosos presinápticos, la liberación de neurotransmisores dependientes de piretroides (Aldridge et al., 1978). Estos compuestos actúan a través de la modulación de la transmisión colinérgica, reduciendo la sensibilidad del receptor adrenérgico pre sináptico periférico (Anadón et al., 1987), que conduce a un aumento de la liberación de noradrenalina (Clark y Brooks, 1989).

El permetrín a dosis capaz de producir temblores en ratas, aumentó los niveles de aspartato en tronco encefálico y cuerpo estriado; niveles de glutamato en tronco encefálico, niveles de metabolitos de 5-HT en el hipotálamo, además aumentaron los niveles de los metabolitos de dopamina en cuerpo estriado (Hudson et al., 1986). Este último aumento de metabolitos fue similar tras la administración de aletrín, fenvalerato, permetrín y cipermetrín, (Doherty et al., 1986; 1988).

2.4.6. Efectos sobre el comportamiento

La administración intraperitoneal en ratas de aletrín, deltametrín, fenvalerato y permetrín produjo una reducción del aprendizaje de forma dosis dependiente (Stein et al., 1987).

Asi mismo, la dosificación diaria de deltametrín en ratas por 15 días redujo el aprendizaje y la memoria, evaluadas en un laberinto, usando una respuesta de discriminación visual reforzada negativamente (Husain et al., 1996).

Se administraron 9 piretroides en aceite de maíz, por vía oral en ratas, a fin de evaluar los efectos en las respuestas de sobresalto a estímulos acústicos por parte de los roedores, esto parecen discriminarse entre los piretroides que producen los síndromes T y CS respectivamente. Los piretroides del síndrome de intoxicación T lograron un aumento en la amplitud de la respuesta de sobresalto sin afectar su latencia, mientras que piretroides del síndrome de intoxicación CS, produjeron efectos variados. En el último grupo, la cipermetrín y la deltametrín disminuyeron la amplitud y aumentaron la latencia de la respuesta de sobresalto, por otro lado el fenvalerato aumentó la amplitud, no afectó la latencia y, a diferencia de cualquier otro compuesto probado, aumentó la sensibilización a los estímulos acústicos de fondo (Crofton y Reiter, 1984).

El ciflutrín administrado por vía oral a en diferentes dosis durante 6 días en ratas macho, no produjeron cambios visibles en los índices neuroconductuales tras la exposición oral, solo la dosis más alta (20 mg/kg/día) indujo la contracción del músculo esquelético en las extremidades posteriores con una leve coordinación y sin signos de discinesia ni temblor (Rodríguez et al; 2016).

2.4.7. Actividad sobre la fosforilación de proteínas

Los aislados de sinaptosomas cerebrales de rata, demostraron que deltrametrín, causó un aumento significativo en el nivel de fosforilación de proteínas. Este efecto fue observable incluso 5 min después de la despolarización, cuando se observó al mismo tiempo que este aumento de la fosforilación inducido por deltametrín fue particularmente significativo para algunas proteínas específicas, es decir, fosfoproteínas de 87,48, y 38 kilodalton (kDa). Además, deltametrín produjo un aumento significativo en la fosforilación de dos proteínas ácidas con pesos moleculares de 87 y 48 kDa. (Enan y Matsumura, 1993).

Usando cerebros de rata, parcialmente purificados, incubados a diferentes concentraciones de deltametrín, demostraron que la actividad de la la proteín kinasa C

(PKC) estuvo estimulada por concentraciones muy bajas de este piretroide (Enan y Matsumura, 1993; Costa, 2015).

2.4.8. Sinergismo entre plaguicidas

En ratas que recibieron piretroide permetrín por vía subcutánea en conjunto con una dosis subletal de metilparatió, aumentaron significativamente la toxicidad del piretroide. En consecuencia, algunos organofosforados pueden aumentar la toxicidad de los piretroides, es decir, sinergizar con estos compuestos; esto se debe a la capacidad de los organofosforados para inhibir las carboxiesterasas, no necesariamente es paralela a su toxicidad (que se relaciona más con la inhibición de la acetilcolinesterasa). (Ray 2001; Costa, 2015).

La exposición a piretroides también puede interferir con el metabolismo de otros agentes, como la disminución del aclaramiento plasmático de la antipirina ante la administración de deltametrín (Ray, 2001).

La posible relación de sinergia entre los dos tipos de piretroides no se ha abordado sistemáticamente, sin embargo, en asilados de la raíz dorsal ganglionar de la rata, se descubrió que el tetrametrín, piretroide tipo I, antagoniza (o suplanta) la acción del fenvalerato, un piretroide tipo II (Song et al, 1996).

2.4.9. Otros

Tanto los piretroides tipo I y II ocasionaron un estimulo en la glándula suprarrenal marcada con aumentos en la adrenalina y noradrenalina acompañados de alteraciones motoras en mamíferos. (Ray, 2000).

Piretroides tipo II, como la deltametrín, aumentan la secreción de corticosteroides, incluso a dosis bajas, por lo tanto, al ocurrir un envenenamiento por estos compuestos, se produce una profunda activación suprarrenal (Anadón et al., 2009; Ray, 2000).

La inoculación de la dosis letal 50 (DL_{50}) de cipermetrín al 4%, en ratas y ratones durante los días post nacimiento, causó un aumento de los receptores de dopamina a nivel renal (D1), que persistieron hasta el aproximadamente el día 90 post nacimiento. De modo similar se inoculó bioaletrín a ratas de pocos días de nacidas, en dosis bajas, encontrando una disminución de la densidad de receptores muscarínicos en la neocorteza de ratones adultos, produciendo cambios en el comportamiento de estos animales (Ray, 2000).

Durante la intoxicación por piretroides, los niveles de glucosa en el cerebro de la rata y el flujo sanguíneo cerebral se elevaron en todas las áreas del cerebro, excepto en el cerebelo durante el retorcimiento después de una dosis letal de deltametrín, el flujo sanguíneo cerebral también se incrementó significativamente con cismetrín, pero no tuvo el mismo efecto a nivel del cerebelo (Cremer et al., 1983). En contraste, los niveles de glucosa en el cerebelo se agotaron, eso indica un alto nivel de utilización de glucosa en esta región. (Cremer et al., 1880; 1983). El cipermetrín produjo aumentos similares en los niveles endovenosos de glucosa y lactato cerebeloso (Lock y Berry, 1981).

2.5. TOXICOCINÉTICA

Los estudios de toxicocinéticos de los piretroides en mamíferos, principalmente en roedores, se iniciaron a finales de la década de 1960 (Miyamoto, 1976), después se examinaron exhaustivamente los destinos metabólicos en varias especies de mamíferos como cabras, gallinas ponedoras y ganado vacuno en diferentes estados de producción, tanto de piretroides tipo I y II. Además de los destinos metabólicos, se estudiaron los isómeros geométricos y núcleos quirales de algunos piretroides para dilucidar efectos biológicos específicos entre las diversas formas del compuesto (Kaneko, 2011; Mikata et al., 2012).

2.5.1. Absorción

Los estudios experimentales en roedores, señalan que las tasas de absorción oral son prácticamente insignificantes, mientras que la absorción gastrointestinal es rápida e incompleta y oscila entre el 30 a 70% para piretroides como deltametrín, permetrín y λ-cialotrín, que alcanzaron concentraciones plasmáticas máximas pasadas las 2-4 h

posterior a su ingesta (Anadón et al.; 2006); luego de esto, la distribución es ciertamente rápida para tejidos con contenido lipídico alto incluyendo al SNC; estas tasas de absorción, dependen de los vehículos y el volumen utilizados para la dosificación de estas (Anadón et al.; 2006; 2009; Mikata et al., 2012).

La concentración máxima (Cmax) se detecta comúnmente varias horas después de la administración oral a dosis bajas, pero se retrasa a dosis orales más altas (Crawford et al., 1981). Tras esto, se estima que la eliminación de estos compuestos es lenta, llegando a encontrarlos hasta 39 h en plasma y 35 h en el cerebro respectivamente, debida a la concentración de estos en el tejido graso, razón por la cual una dosis repetitiva puede potenciar la manifestación de los signos clínicos (Anadón et al.; 2006; 2009).

La estereoisomería también determina la velocidad de eliminación de estos plaguicidas, en el caso de los isómeros *trans* son hidrolizados por carboxilesterasas, mientras que los *cis* son oxidados, razón por la cual los isómeros *trans* tienen semividas de eliminación más cortas, siendo de 2 hasta 10 veces menores a la del *cis* (Anadón et al.; 2006; Kaneko, 2010).

Usando piretroides radioactivos, se pudo determinar básicamente que, administrando piretroides oralmente a los mamíferos (ratas, ratones, conejos, cobayos y perros), se absorben en el tracto intestinal y se distribuyen en los tejidos. La tasa de absorción parece ser bastante rápida, ya que la determinación de radioactividad en tejidos animales reveló que la Cmax de radioactividad en el cuerpo animal se alcanza aproximadamente 3 horas después de la administración, y a partir de entonces la radiactividad desaparece gradualmente de los tejidos (Miyamoto, 1976).

2.5.2. Metabolismo

El estudio del metabolismo de compuestos piretroides, se ha divido históricamente en 3 periodos. En el primer periodo, de los 60s a 70s, se estudió el metabolismo de los piretroides de primera generación usando la identificación de metabolitos en roedores (Miyamoto, 1976). En el segundo periodo, desde mediados de los 70s al 2000, se estudiaron las etapas del proceso metabólico en piretroides de primera y segunda generación, en ensayos tanto *in vivo* como *in vitro* de varias especies de mamíferos,

incluido el hombre; en su mayoría se usaron moléculas radiobiomarcadas como el carbono 14 o tritio en posiciones conocidas para dilucidar los destinos metabólicos finales y la influencia de la estereoisomería de estos compuestos en la en las reacciones químicas (Kaneko, 2011; Mikata et al., 2012). Finalmente, el tercer periodo, del 2000 hasta la actualidad, se desarrollaron estudios del metabolismo a nivel molecular por parte de las isoformas del citrocromo P-45 (CYP-450), las enzimas carboxilesterasas (CES) tanto de animales como del hombre y los microsomas hepáticos; detallando así ciertas particularidades metabólicas de la biodegradación de piretroides, tanto en el hombre como en los animales (Kaneko, 2010, 2011).

Los estudios de metabolismo *in vivo* e *in vitro* sobre piretroides incluyendo su quiralidad e isomería geométrica, se han llevado a cabo en evaluaciones de seguridad en mamíferos. Sin embargo, muchos datos detallados no han sido completamente dilucidados (Kaneko, 2010). Estos hechos pueden ser investigados en detalle a fin de de realizar evaluaciones de riesgo más precisas para un tipo de piretroide en específico (Kaneko, 2010).

Las principales vías del metabolismo de piretroides son comúnmente oxidación, hidrólisis de éster y conjugaciones (Crow et al., 2007; Kaneko, 2010). Estas reacciones metabólicas estudiadas en animales tienen básicamente 2 fases:

Reacciones de fase I: Son reacciones de oxidación e hidrólisis del éster, importantes para la detoxificación a la exposición de piretroides. Estas reacciones se dan en mayor medida en el isómero *trans* y derivados de alcoholes primarios en comparación al isomero *cis* y los derivados de alcoholes secundarios, respectivamente. La quiralidad (1S o 1R) en el resto ácido de fenotrín, tetrametrín y permetrín no afectan significativamente la hidrólisis del éster. (Kaneko et al., 1984; Izumi et al., 1984).

El metabolismo de piretroides, comienza básicamente con la hidrólisis del éster, estos metabolitos sufren posteriores hidroxilaciones en los restos ácidos y alcohólicos, para finalmente transformarse por reacciones de conjugación Casida y Ruzo, 1980; Anadón et al., 2006).

Las reacciones de oxidación ocurren en varios sitios de los restos ácidos y alcohólicos, dependiendo en la estructura química, por ejemplo, el isómero *trans* metilo del grupo

isobutenilo en crisantemos, se oxida preferentemente sobre el grupo *cis* metilo; mientras que la posición 4´- del anillo fenoxi se oxida en mayor medida en comparación con otras posiciones (Casida y Ruzo, 1980).

Reacciones de la fase II: Son reacciones de conjugación, para generar formas mayormente hidrofílicas y lipofílicas en menor grado (conjugados hidrofílicos como glucurónidos, sulfatos o conjugados de aminoácidos en mamíferos), se excretan fácilmente por la vía renal, debido a su solubilidad en agua (Huckle et al., 1981; Kaneko, 2010).

En casos menos frecuentes, los conjugados lipofílicos muestran una bioretención más prolongada comparados a los conjugados hidrofílicos. Aunque los datos son escasos, los metabolitos de los piretroides normalmente muestran una toxicidad aguda de menor grado al ser administrados por vía oral, que sus compuestos originales, haciendo que el metabolismo rápido de estos compuestos conduzca a una baja toxicidad en mamíferos. (Mikata et al., 2012; Kaneko, 2011).

En otra ruta, se ha observado que el carbono proveniente del grupo CN de piretroides tipo II, derivados del alcohol R-ciano-3-fenoxibencílico, muestra una excreción incompleta y una bioretención más prolongada a nivel de la piel y el estómago (Crawford et al., 1981). Es probable que ésta excreción lenta e incompleta se deba a la distribución a líquido extracelular y unión parcial con albúmina sérica; este grupo α-ciano se elimina parcialmente en orina (Kaneko, 2011).

La toxicidad de los piretroides *per se*, generalmente se ve disminuida desde que ocurre la escisión del enlace éster, aunque la velocidad de esta reacción ve disminuida por la presencia del grupo α-ciano (Aldridge, 1990). Una vez ocurrida la ruptura del grupo α-ciano, este se convierte a tiocianato, aunque cabe señalar que a veces, estas etapas de oxidación y/o hidroxilación podrían generar algún metabolito de mayor toxicidad (Anadón et al. 2009). Los procesos de conjugación son los que logran la detoxificación final del compuesto (Anadón et al., 1988).

El metabolismo de los piretroides ocurre principales en los hepatocitos, se han visto que otros órganos pueden compartir la función, incluidos los del SNC, entonces parece ser que la neurotoxicidad producida por piretroides debería deberse a la integridad de la

estructura de este compuesto o algún metabolito hidroxilado con tiempos prolongados de eliminación (Anadón et al., 2006).

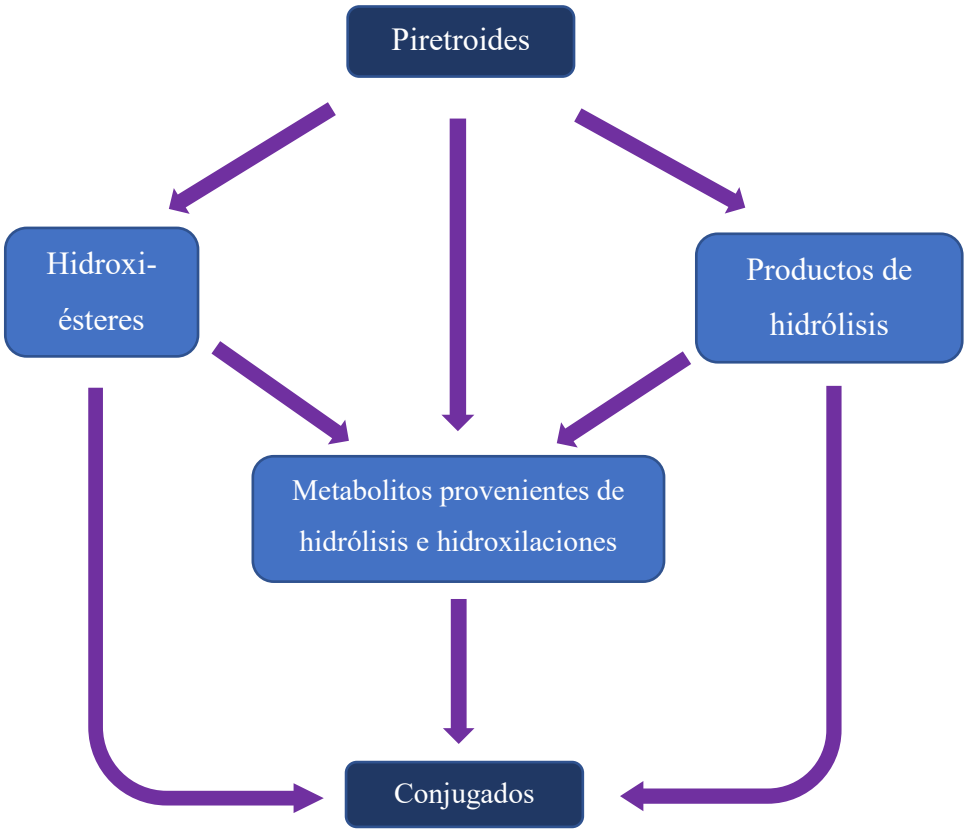


Figura 4. Metabolismo de piretroides. Las fases del metabolismo en mamíferos comprenden a las reacciones de hidrólisis, oxidación y conjugación de los piretroides. (Imagen adaptada de Soderlund et al., 2002).

La información acerca del metabolismo de piretroides en mamíferos e insectos, parece ser similar, siendo las esterasas y monoxigenasas las enzimas fundamentales dentro de estas rutas; con los peces el efecto de toxicidad por piretroides parece ser de mayor magnitud (Casida y Ruzo, 1980).

2.5.2.1. Acción del citocromo P-450 (CYP)

La acción de CYP se basa en el metabolismo oxidativo de los piretroides, en esta familia de proteínas, podemos encontrar muchas isoformas, encargadas de la biotransformación de estos compuestos, en las que destacan la CYP2C9 en humanos y CYP2C11 y CYP2C6

en ratas (Scollon et al., 2009), mientras algunos otros miembros de su misma familia intervienen en la biosíntesis y el metabolismo de compuestos endógenos; las oxidaciones catalizadas por CYP son reacciones de monooxigenación dependientes de NADPH dependientes de oxígeno molecular, acelerando el proceso de eliminación del organismo de gran número de fármacos y compuestos, en este caso piretroides (Anadón et al., 2009).

La metabolización de bioresmetrín y la cipermetrín por microsomas hepáticos de rata se metabolizaron tanto por vías oxidativas como hidrolíticas. El citocromo P450 (CYP: 1A1, 1A2, 2C6, 2C11, 3A1 y 3A2) de rata mostró actividad por efecto de estos piretroides. Mientras que los CYP humanos (2C8, 2C9, 2C19 y 3A4) mostraron mayor actividad hacia múltiples piretroides (Mikata et al., 2012).

Las diferencias en el metabolismo de deltametrín y esfenvalerato a nivel de los microsomas hepáticos de ratas y humanos con respecto a la vía de biotransformación (oxidación frente a hidrólisis) son responsables de su eliminación. LOS CYP de ratas: CYP1A1, CYP2C6, CYP2C11 y CYP3A2 y los CYP humanos: CYP2C8, CYP2C19 y CYP3A5, fueron capaces de metabolizar cualquiera de los piretroides. El CYP2C9 humano se metabolizó por efecto del esfenvalerato pero no por deltametrín. Los CYP de ratas y humanos que metabolizaron por esfenvalerato y deltametrín con una cinética similar (Godin et al, 2007).

El metabolismo de piretroides como bifentrín, S-bioaletrín, bioresmetrín, b-ciflutrín, cipermetrín, *cis*-permetrín y *trans*-permetrín se examinaron en microsomas hepáticos de rata y humanos (Scollon et al., 2009). El aclaramiento hepático de los piretroides fue de 5 a 15 veces mayor en la rata en relación con los microsomas humanos, excepto para el *trans*-permetrín. Mientras que, el metabolismo de bifentrín, S-bioaletrín y cis-permetrín en microsomas hepáticos de rata y humanos fue únicamente el resultado de procesos oxidativos (Kaneko, 2011).

2.5.2.2. Acción de las carboxiesterasas (CES)

Las carboxilesterasas catalizan la hidrólisis de los piretroides. La mayor actividad de hidrolasas en mamíferos está presente en el hígado, aunque también se detectan en otros órganos (Satoh y Hosokawa, 2006). Se demostró que dos CES principales expresados en

el hígado humano, hCE1 y hCE2, son productos genéticos diferentes (Ross y Crow, 2007).

Las tasas de eliminación y el aclaramiento hepático intrínseco de diversos piretroides, utilizando microsomas hepáticos de rata y humanos, se lograron con el metabolismo oxidativo dependiente de nicotina adenina dinucleótido (NADH) (Godin et al., 2006).

Se estima que las tasas de aclaramiento hepático para deltametrín son dos veces más rápidas en humanos que en ratas. Los resultados del metabolismo de piretroides revelaron que hCE1 era notablemente más activo hacia la deltametrín que los CES de Clase I; sin embargo, la hidrolasa A metabolizó el esfenvalerato dos veces más rápido que la hCE1, mientras que la hidrolasa B y la hCE1 hidrolizaron el esfenvalerato a velocidades iguales. Estos estudios demostraron una diferencia de especies significativa en las vías *in vitro* de biotransformación de deltametrín en microsomas hepáticos de ratas y humanos, lo que se debió en parte a las diferencias en las actividades intrínsecas de los CES humanos de ratas y humanos (Yang et al., 2008).

El piretroide *trans*-permetrín se hidrolizó efectivamente mediante microsomas intestinales humanos agrupados (hCE2), mientras que la deltametrín y la bioresmetrín, no. En contraste, los microsomas intestinales de rata agrupados, hidrolizaron *trans*-permetrín 4.5 veces más lento que los microsomas intestinales humanos. Además, se observó una variación interindividual seis veces mayor en la expresión de la proteína hCE1 en los citosoles hepáticos humanos (Mikata, 2012).

Aunque estas dos enzimas están presentes en varios tejidos, hCE1 y hCE2 contribuyen predominantemente a la actividad hidrolasa del hígado y el intestino delgado, respectivamente. También se ha demostrado que las CES exhiben diferencias de especies. Se demostró también que el plasma humano no contiene actividad CES; en contraste, el ratón, la rata, el conejo, el caballo, el gato y el tigre tienen altos niveles de CES plasmáticos (Li et al., 2005).

Otros datos, señalan las reacciones de hidrólisis selectiva de la estructura de varios piretroides por microsomas hepáticos humanos y hCE1 y hCE2 recombinantes. El tipo de piretroides puede servir como un mejor indicador de la hidrólisis general en el hígado,

con la única excepción del deltametriín. Los piretroides tipo I generalmente se hidrolizaron a altas velocidades por acción de los microsomas hepáticos. Por otro lado, la mayoría de los piretroides hidrolizados a tasas más bajas pertenecen a compuestos de Tipo II (Yang et al., 2008).

Estudios en el metabolismo de deltametrín por quimotripsina por CES hepáticos, mostraron un patrón consistente de hidrólisis estereoselectiva: el centro o los centros quirales en el resto ácido influyeron sobre la hidrólisis estereoselectiva que el centro quiral en el resto de alcohol (Yang et al., 2008).

Para los análogos de cipermetrín con un anillo de ciclopropano en el resto ácido, los isómeros *trans* generalmente se hidrolizaron más rápido que los isómeros *cis* correspondientes. Para los análogos de fenvalerato sin un anillo de ciclopropano en el resto ácido, los isómeros 2R fueron mejores sustratos que los isómeros 2S. Estos patrones hidrolíticos generales se examinaron modelando los análogos similares a los piretroides dentro del sitio activo de hCE1 (Mikata et al., 2012).

La resistencia de los mamíferos a los piretroides se basa en la capacidad de desintoxicación rápida por hidrólisis del éster, y un número de carboxiesterasas responsables de esto (Ray y Forshaw, 2000).

El proceso de desintoxicación, comienza con la escisión del enlace éster de la estructura piretroidal, estas reacciones son catalizadas por las esterasas de los microsomas hepáticos en las diferentes especies de mamíferos; los isómeros son oxidados por las enzimas oxidasas de función mixta (MFO) fortificados con NADPH (Miyamoto, 1976). Este proceso es muy activo en mamíferos comparado a los insectos, además la toxicidad es influida por la temperatura, vía de administración, adsorción, tasa de absorción, tasa de metabolismo, concentración en tejido adiposo, entre otros (Miyamoto et al., 1986; Aldridge, 1990).

Muchos de los isómeros *trans* han sido metabolizados principalmente a través de la escisión del enlace éster, liberando al alcohol que es posteriormente oxidado a ácidos carboxílicos, aunque en el aletrín, que es el éster *trans* del alcohol secundario, es muy resistente al ataque hidrolítico tanto *in vivo* e *in vitro*. (Miyamoto, 1976; 1986).

2.5.2.3. Metabolismo en el humano.

El nivel de exposición y el uso seguro de estos compuestos en humanos, es altamente importante debido a su cotiniadidad (Mikata et al., 2012). Los datos obtenidos en los estudios realizados respecto al metabolismo humano de estas sustancias piretroides son relativamente limitadas, aunque todo hace indicar que muchos efectos son muy similares a la de los roedores (Anadón et al., 2006; Kaneko, 2011).

Estudios de metabolismo *in vitro* de ^{14}C-*trans*-permetrín marcada en el resto de alcohol y ^{14}C-*trans*-fenotrín marcada en el resto ácido, en microsomas hepáticos humanos y de rata, indican que los productos derivados de la hidrólisis del éster son los principales metabolitos procedentes de la oxidación de estos compuestos, es decir no habría cambios aparentes en el metabolismo de mamíferos (Godin et al., 2007).

Por otro lado, se encontró que las isoformas de CYP humanos, tendrían una acción metabólica más lenta, comparada a otras especies en el proceso oxidación de piretroides (Godin et al., 2007; Leng et al., 2007; Kaneko, 2011).

Se dieron dosis orales de cipermetrín *cis* y t*rans* en cantidad iguales (cis: trans = 1:1) a varones voluntarios a dosis de 3,3 mg por persona, pudiéndose encontrar que los cuatro metabolitos principales de los restos ácido y de alcohol, se encontraban en cantidades iguales en orina y heces. Estos resultados en humanos, sugieren que la ruptura del enlace éster, es la principal vía metabólica de cipermetrín y que dicho mecanismo ocurrió más fácilmente para el isómero *trans* que para el *cis*, al igual que en ratas (Woollen et al., 1992).

Usando aplicaciones dérmicas de cipermetrín se encontraron diferencias en la proporción de metabolitos comparada la de dosis oral. El estudio dérmico demostró que cipermetrín podría metabolizarse significativamente antes de alcanzar la circulación sistémica, lo que resulta en un perfil de metabolitos que no se formó en gran medida después de la administración oral (Woollen et al., 1992).

Los estudios en varones voluntarios que se expusieron al piretroide ciflutrín en aerosol (inhalación) encontraron metabolitos que en 93% se excretaron dentro de las 24 h

posteriores a la dosis (Leng et al., 1997). Estos resultados fueron bastante coincidentes con los hallados en la administración de ciflutrín vía oral (Leng et al., 2007).

En estudios metabólicos comparativos de transpermetrín entre humanos y ratas, se identificaron la isoforma UDP-glucuroniltransferasa (UGT) responsable de la glucuronidación de ácido3-PB, que se conoce como un metabolito común de varios piretroides en mamíferos (Takaku et al., 2011).

2.5.3. Distribución

Los datos de esta sección son bastante escasos, asumiendo una vía similar para todos los piretroides en general (Anadón et al., 2006; 2009).

Los ensayos para cada tipo de piretroide en general señalan que la liposolubilidad (lipofília) de estas sustancias, facilita un acceso relativamente rápido hacia los tejidos periféricos (Aldridge, 1990), siendo los piretroides tipo I los de mayor acumulación en tejidos nervioso (Anadón et al., 2006; Kaneko, 2010).

Los estudios realizados en ratas con administración repetida de cipermetrín, indicaron niveles altos de piretroides tanto a nivel sanguíneo y tejido graso; hasta por 28 días en el caso de la sangre, niveles menores también fueron encontrados en hígado, glándula adrenal, riñon, intestino, ovario, entre otros (Rhodes et al., 1984).

2.5.4. Excreción

La excreción de estos compuestos en orina y heces, ocurre en proporciones semejantes (Anadón et al., 1996). Se encontró también que algunas porciones de piretroides se pueden excretar sin absorberse y esto podría ser una razón más para la baja toxicidad de estos compuestos en mamíferos, todo ello dependiendo del tipo de compuesto y también en la dosis administrada (Miyamoto, 1976).

Existe poca información acerca del grado de liposolubilidad de distintos piretroides, razón por la cual, la información toxicocinética de estos compuestos aún no está muy dilucidadas, además esa información sería valiosa en la evaluación de riesgo de estos plaguicidas (Anadón et al., 2006; 2009).

2.6. TOXICIDAD

El comportamiento aparentemente inocuo de los piretroides en mamíferos y humanos se debió a que se tenían pocos datos de toxicidad respecto a estos compuestos (Miyamoto, 1976).

Los mecanismos tóxicos de las piretrinas y piretroides son bastante complejos y se incrementan cuando se formulan conjuntamente con otras sustancias o algunos insecticidas organofosforados, de esa forma se manifiesta una fisiología desordenada y de daño a muchas estructuras corporales (Bradberry et al., 2005). Con el pasar del tiempo, los diversos estudios en animales, han demostrado una gran data, en la acción neurotóxica que tienen estos piretroides, sobretodo en la excitación aguda (Maund et al., 2012).

Las dosis casi letales en ratas de todas las clases de piretroides pueden dar lugar a una degeneración axonal a nivel de nervios periféricos, muy similares a la degeneración walleriana, (Aldridge, 1990); pero, este efecto es inherentemente reversible y solo se observa a niveles de dosis que producen signos motores prolongados y severos. Además de la toxicidad sistémica, se observan importantes efectos locales: contaminación de la piel que produce parestesia e ingestión que produce irritación gastrointestinal. La determinación de la toxicidad aguda de los isómeros ópticos de varios piretroides después de la administración intravenosa a ratas (Verschoyle y Aldridge, 1980) e intracerebral a ratones (Lawrence y Casida, 1982) permitió dilucidar las relaciones estructura-actividad para la toxicidad aguda en mamíferos.

Los rangos de ecotoxicidad aguda de piretroides sintéticos para los peces en varios grupos de especies acuáticas son iguales o superiores 0.01–2 mg/L para estos compuestos (Laskowski, 2002). Las pruebas de toxicidad aguda en algunas especies de invertebrados

acuáticos con exposiciones de 48 a 96 horas (por ejemplo, con *Daphnia magna*) relevaron efectos subletales en el crecimiento y la reproducción (Maund et al. 2012).

Por otro lado, el efecto neurotóxico en invertebrados como cucarachas y en mamíferos como roedores, parecen generar manifestaciones clínicas semejantes tras las exposiciones agudas, la intensidad de estas manifestaciones clínicas ante diferentes cocentraciones y piretroides sintéticos, aún es limitado (Gammon et al. 1981; Ray, 2000).

2.6.1. Neurotoxicidad

La neurotoxicidad de los piretroides en los mamíferos depende de la configuración estereoquímica en el C-1-ciclopropano o en la posición del compuesto homólogo que carece del ciclopropanocarboxilato solo los ésteres de los acidos ciclopropanocarboxilatos 1R y los isómeros isostéricos 2S de ácidos no ciclopropanos son neurotóxicos, mientras que los correspondientes 1S ciclopropanocarboxilatos y sus análogos acíclicos estéricamente equivalentes 2R, no exhibieron toxicidad medible incluso cuando se administraron a dosis altas directamente al SNC (Kaneko, 2011).

La neurotoxicidad aguda evidenciada tanto en mamíferos como en insectos, se ve aumentada en piretroides con un grupo α-ciano a nivel del resto de alcohol 3-fenoxibencílico; a además se sabe que en mamíferos, dicho efecto efecto es altamente relacionado al aspecto estereoespecífico (Ghiasuddin y Soderlund, 1985).

La exposición de estos compuestos piretroides, se han asociado con un mayor riesgo potencial de enfermedad de Parkinson debido a su uso fitosanitario y zoosanitario cotidiano; debido a que se ha visto que muchos compuestos piretroides inducen síntomas similares a las del cuadro parkinsoniano, este efecto puede explicarse a través de la neurotoxicidad y la neurodegeneración dopaminérgica nigroestriatal (Mohammadi et al, 2019; Wan et al., 2022).

Los mecanismos subyacentes aún se desconocen, aunque se postula la acumulación de metabolitos en tejidos nerviosos como inductores de las patologías nerviosas, (Wan et al., 2022), también se han planteado otras rutas neurodegenativas como estrés oxidativo,

inflamación, pérdida de células neuronales y disfunción mitocondrial (Mohammadi et al., 2019).

2.6.2. Toxicidad Dérmica

La mezcla racémica (+)-*trans*, (+)-*cis* de varios piretroides fue probado experimentalmente en ratones y ratas por vía intradérmica, usando las posibles dosis más altas, en estos estudios la mortalidad fue inferior al 50% , razón por la cual, estos resultados indicarían que los piretroides son incluso menos tóxicos en la administración dérmica respecto a la oral sin mostrar lesiones cutáneas, entre otras, Ninguno de los piretroides sintéticos es irritante ni para la piel ni para los ojos de los conejos según los criterios propuestos (Anonymous, 1972). Piretroides probados en cobayos, arrojaron que ninguno de los piretroides sintéticos es un sensibilizador de la piel, cuando se prueba por la administración intracutánea (Anonymous, 1965).

2.6.3. Toxicidad por inhalación

Al ser los piretroides muy utilizados como ingredientes activos de aerosoles y espirales repelentes de insectos, como mosquitos y otros, el estudio de la toxicidad por inhalación es de suma importancia.

Aunque los datos de toxicidad por inhalación subaguda están disponibles en las formulaciones, experimentalmente se expusieron ratas y ratones en preparados de piretroides como aletrín, permetrín, resmetrín, fenotrín, furametrín y tetrametrín en atomizadores de partículas finas de 1 a 2 µm, dentro de cámaras de exposición a diferentes concentraciones aéreas y en intervalos específicos; con ello, se pudo registrar la muerte de los animales ante dicha exposición, a excepción del aletrín, aunque también pudieron evidenciarse los síntomas a la acción tóxica de estos compuestos, tales como hipersensibilidad, ataxia motora e incontinencia urinaria, entre otros durante la exposición a estos compuestos insecticidas (Miyamoto, 1976).

2.6.4. Teratología

Se hicieron ensayos en conejos blancos Nueva Zelanda, ratones ICR y ratas Sprague-Dawley (SD) con la finalidad de determinar los efectos de estos compuestos en la línea materna y acción embriotóxica como el aborto y la resorción. La dosis máxima fue determinada por supresión de crecimiento y síntomas tóxicos en hembras preñadas, las crías se obtuvieron por cesárea antes de la finalización del período de gestación, no observándose efectos adversos durante el crecimiento y desarrollo de las crías (Miyamoto, 1976).

2.6.5. Toxicidad subaguda y crónica

Para evaluar la toxicidad subaguda y crónica de los piretroides, grupos de ratas fueron alimentadas con dietas que tenían aletrín, fenotrín, furametrín, permetrín y resmetrín a concentraciones específicas para cada compuesto; posteriormente se hicieron exámenes sobre comportamiento, mortalidad, crecimiento, ingesta de alimentos y de agua, análisis de orina durante la alimentación y en la necropsia terminal; se realizó hematología, bioquímica clínica, peso de órganos principales e histopatología de los siguientes órganos y tejidos como: cerebro, nervios periféricos, médula espinal, ojo, pituitaria, tiroides, glándulas suprarrenales, corazón, bronquios, pulmón, médula ósea, bazo, ganglio linfático mesentérico, timo, glándula salival, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso, hígado, páncreas, riñón, vejiga urinaria, testículo / ovario, próstata / útero, piel y otras masas tisulares a estudiar. Se encontró que a concentraciones muy altas causaban un ligero aumento del peso del hígado, así como cambios histopatológicos como hipertrofia, infiltración de células ovales y proliferación del conducto biliar. Hubo hallazgos similares en ratas alimentadas por 2 años con piretrín, es probable que el daño hepático sea un efecto adverso común del compuesto administrado. Finalmente, en ratas alimentadas con aletrín racémica durante 80 semanas no indicaron cambios histopatológicos indicativos o sugestivos de hiperplasia en cualquier tejido. (Miyamoto, 1976).

Es muy probable que la gran variedad de signos, síntomas, el cambio bioquímico y fisiológico sean consecuencias de una interacción lenta, por administración oral o

cutánea. La acción de la toxicidad crónica observada en estos compuestos, frecuentemente está asociada a los enlaces covalentes de gran estabilidad en la estructura molecular. Hay poca evidencia para dilucidar completamente este hecho, ya que en los piretroides se ha visto dichos enlaces no tienen ese comportamiento biologicamente. Las variaciones en los efectos neurotóxicos entre las especies estudiaban son multifacotoriales, ya que depende de la ruta de administración del compuesto a su sitio de acción y / o diferencias en la sensibilidad de su sistema nervioso, entre otros (Aldridge, 1990).

2.6.6. Carcinogenicidad

Se han dilucidado algunos modos de acción para la carcinogenicidad con piretroides. El ejemplo más típico es el de metoflutrín, responsable de generar tumores hepatocelulares en ratas, a través de mecanismos no genotóxicos que involucran inducción de CYP 2. La inducción de tumores hepáticos en la rata por parte de la exposición a metoflutrín, no parece ser irrelevante para el caso de lo humanos. Es importante destacar que, con respecto a la carcinogenicidad, no han aparecido informes sobre el cáncer en humanos después de la administración oral, exposición cutánea o por inhalación a piretroides (Kaneko, 2011).

2.6.7. Toxicidad en el hombre

Las piretrinas y los piretroides sintéticos, presentan poco peligro para el hombre en un uso normal, los cuadros de envenenamiento agudo pueden ser más probables al realizar mezclas de plaguicidas no autorizados.

El envenenamiento parece tener pocas consecuencias a largo plazo, pero el manejo de los signos excitadores agudos puede resultar difícil con anticonvulsivos clásicos. Casi todos los informes de envenenamiento en humanos se relacionan con piretroides tipo II; por lo tanto, no es tan seguro la descripción de ambos síndromes en el hombre, aunque lo que se sabe por observación clínica encaja bien con los datos experimentales de animales (Ray, 2000).

Hay relativamente pocos informes de intoxicaciones en humanos y solo una docena de muertes (Bradberry et al., 2005). La mayoría de las muertes ocurrieron después de la exposición accidental o intencional a los piretroides. Por ejemplo, un hombre de 45 años murió 3 horas después de comer frijoles y queso preparados usando una solución de cipermetrín al 10% en lugar de aceite (Poulos et al., 1982).

La experiencia de los trabajadores técnicos involucrados en el manejo de piretroides, ya sea durante su fabricación o uso, proporcionan una idea de los efectos de los piretroides en los humanos después de la exposición cutánea. Estas exposiciones ocupacionales, indican que estos compuestos pueden inducir sensaciones de ardor, picazón u hormigueo, generalmente en la cara, y con menos frecuencia en otras regiones de la piel, además de la parestesia que es transitoria y reversible a las pocas horas de la exposición, llegando a durar en algunos casos hasta 48 h. Estas sensaciones generalmente ocurrieron en ausencia de eritema, edema, vesiculación u otros signos de irritación cutánea manifiesta y generalmente se limitarán en las áreas directamente expuestas de la piel (Clark, 1995; Vijverberg y Van den Bercken, 1990).

Estas sensaciones anormales pueden exacerbarse al sudar o lavarse con agua tibia, pero desaparece fácilmente en varias horas o en un día después de la exposición. Ocasionalmente se han observado pápulas rojas transitorias, congestión y edema de la piel. La ingestión de piretroides induce envenenamiento agudo, pero las muertes son raras. (He et al, 1989; Gotoh et al., 1998).

Los informes de exposición ocupacional están respaldados y amplificados por los resultados de estudios con voluntarios humanos y con animales de experimentación. En voluntarios humanos, los efectos de cuatro piretroides se evaluaron mediante la aplicación al lóbulo de la oreja (Flannigan y Tucker, 1985). En este estudio, permetrín causó la parestesia menos pronunciada y el flucitrinato más pronunciado, mientras que cipermetrín y el fenvalerato fueron de efecto intermedio y aproximadamente igual. En cada caso, la parestesia se modificó dentro de los 30 min posteriores a la exposición, siendo su punto máximo a las 8 h, para disiparse a las 24 a 32 h después de la exposición (Soderlund, 2010).

Los síntomas y signos de intoxicación aguda por piretroides (deltametrín, fenvalerato, cipermetrín) son muy similares. Aparte de sensaciones faciales anormales, los síntomas sistémicos en casos leves incluyen mareos, dolor de cabeza, náuseas, anorexia y fatiga, con o sin signos de apatía, vómitos y aumento de la secreción gástrica, que generalmente resulta en cuadros clínicos de más de un día. Los pacientes moderados a menudo tienden a agravar los síntomas y signos sistémicos anteriores, presentando alteración leve de la conciencia o fasciculación muscular en las extremidades, recuperándose generalmente del primer al sexto día. Los pacientes gravemente envenenados, pueden tener frecuentes ataques convulsivos, coma o edema pulmonar. El período de hospitalización suele ser superior a 4 semanas, aunque dentro de la recuperación pueden experimentar convulsiones de hasta 55 días (Box y Lee, 1996; Gotoh et al., 1998).

Se debe tener cuidado de un diagnóstico erróneo, diferenciarlos de las intoxicaciones por organofosforados, ya que el olor de estas sustancias podría confundirnos. La aplicación de las buenas prácticas laborales y precauciones en la seguridad es determinante; es poco probable que los piretroides presenten toxicidad aguda ante su exposición, sin embargo, se han informado casos de intoxicación aguda debido a un manejo inapropiado (He et al, 1989; Anadón et al., 2006).

2.7. PIRETROIDE FLUMETRÍN

Flumetrín es un piretroide organofluorado-clorado, miembro de monoclorobencenos, compuesto por la mezcla de dos diastereoisómeros (*trans* Z-1 y *trans* Z-2) (EMEA, 1998; Kaneko, 2010).

El nombre químico bajo la nomenclatura de Carl Ingold Prelog (CIP) es α[ciano – (4 – fluoro – 3 – fenoxifenil) metil] 3 – [(Z) – 2 – cloro – 2 – (4 – clorofenil) etenil] – 2,2 – dimetilciclopropano – 1 – carboxilato o también (RS) – α – Ciano – 4 – fluoro – 3 – fenoxibencil 3 - (β, 4 - dicloroestiril) – 2,2 – dimetilciclopropanocarboxilato (Kaneko, 2010).

Su fórmula global es $C_{28}H_{22}C_{l2}FNO_3$, y en su composición centesimal encontramos la proporción de C: 65.89%, H: 4.34%, Cl: 13.89%, F: 3.72%, N: 2.74%, O: 9.40%, cuyo peso molecular es 510,38. A temperatura ambiente es un aceite amarillento y altamente

viscoso; log K_{ow}=6.2. Es menos soluble (0.001 mg / l) en agua a 20 ° C, pero es soluble en la mayoría de los solventes orgánicos (Kaneko, 2010).

Los nombres comerciales de flumetrín son clásicamente Bayticol y Bayvarol desarrollados por BAYER hace muchos años. Las designaciones de código incluyen BAY VI6045 y BAY Vq1950. El número de registro CAS es 69770-45-2. En los productos se encuentran en más del 90% la mezcla de isómeros *trans*-Z-1 y *trans*-Z-2, con contribuciones menores de isómeros *cis*-Z (<2%) y *trans*-E (<1%). (Evaluation of certain veterinary drug residues in food: eighty-fifth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives).

2.7.1. Estructura

Flumetrín es un éster (RS)-α-ciano-4-fluoro-3-fenoxibencil (1RS, 3RS; 1RS, 3SR)-3- (β, 4-diclorostiril)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato, presenta 4 centros para formar isómeros ópticos o estéricos. En el resto de alcohol fenoxifluorobencílico se une al anillo de clorofenilo del resto ácido (Kaneko, 2010).

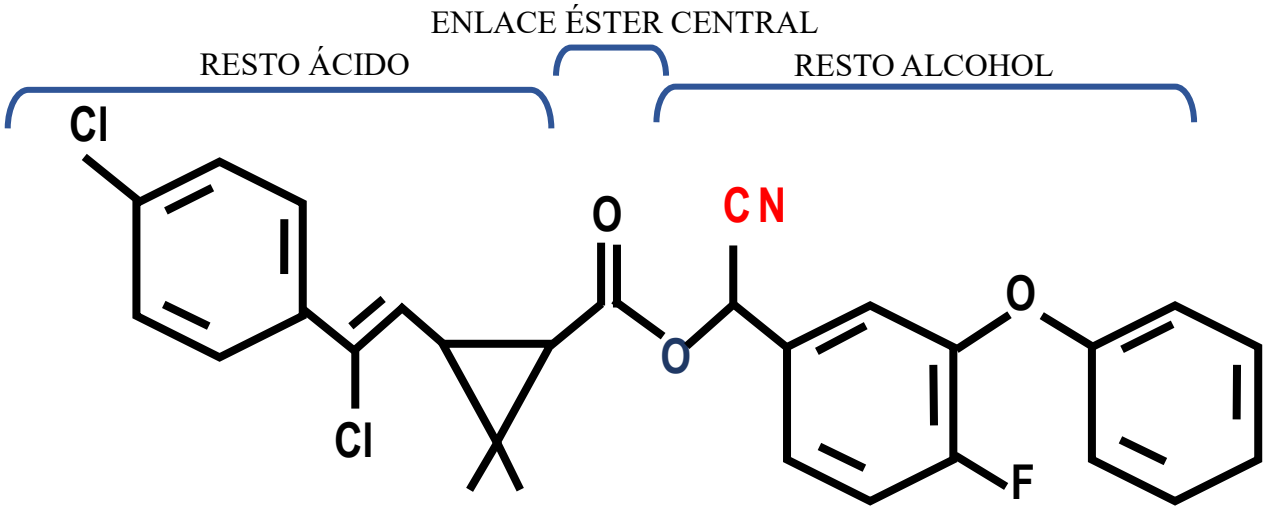


Figura 5. Estructura química del piretroide flumetrín. Todos piretroides tienen una estructura básica similar, en el caso del flumetrín el alcohol flourado se une a anillo de clorofenilo, mediante reacciones de condensación, finalmente es el éster en el une ambos restos moleculares, además de brindar las características lipofílicas de este compuesto (Imagen adaptada de Kaneko, 2010).

2.7.2. Metabolismo y toxicidad de flumetrín

Flumetrín es un compuesto que no se absorbe rápidamente comparado a permetrín y deltametrín. Estudios realizados en conejos, donde se administró flumetrín por vía oral e intravenosa, indicando que este compuesto se absorbió incompletamente a la circulación sistémica desde el sitio de absorción (Başçi y Eraslan, 2004) lo cual, también fue confirmado al utilizar ^{14}C-flumetrín radiomarcado en el resto ácido, a dosis de 1 a 5 mg / kg en ratas, la absorción fue rápida pero incompleta. Los niveles máximos de ^{14}C en plasma se obtuvieron aproximadamente 8 h después de la administración (FAO / OMS, 1996).

La vida media del flumetrín y el tiempo medio de residencia en el cuerpo es mayor en ambas formas de administración, comparado a otros tipos de piretroides que al permanecer más tiempo en el organismo, desarrollan y mantienen los efectos tóxicos en mamíferos (Başçi y Eraslan, 2004).

Estudios realizados en ratas Wistar, proporcionaron datos respecto a que la exposición al flumetrín, disminuye los niveles de enzimas hepáticas y las actividades catalíticas de los sistemas de monooxigenasas, NADPH-citocromo C reductasa y el contenido de citocromo p450 en microsomas hepáticos, entre otros efectos (Anadón et al, 2009).

Los principales metabolitos urinarios son 3- (2-cloro-2- (4-ácido clorofenil) etenil) -2,2-dimetilciclopropanocarboxílico (ácido flumetrín), sus glucurónidos del resto ácido, el ácido 4-fluoro-3-fenoxibenzoico (ácido FPB) y el ácido 4-fluoro-3-fenoxibenzoico (4´-OH-FPB), además de sus conjugados de glicina de la fracción de alcohol (Kaneko, 2010). Las principales reacciones metabólicas de flumetrín se dan por la hidrólisis del éster y la oxidación de la posición 4 del resto alcohólico (FAO / OMS, 1996).

Los estudios en ratas, demostraron que flumetrín se metaboliza por hidrólisis de su enlace éster central para formar ácido flumetrín y alcohol 3-fenoxi-4-fluorobencílico. En grupos de ratas macho administradas con dosis de 10 mg / kg pc ^{14}C [F]-flumetrin por vía oral,

se encontraron cuatro metabolitos derivados del alcohol 3-fenoxi-4-fluorobencílico (Alcohol 3-fenoxi-4-fluorobencílico, ácido 3- (hidroxifenoxi) -4-fluorobenzoico y sus respectivos conjugados de glicina (EMEA, 1998).

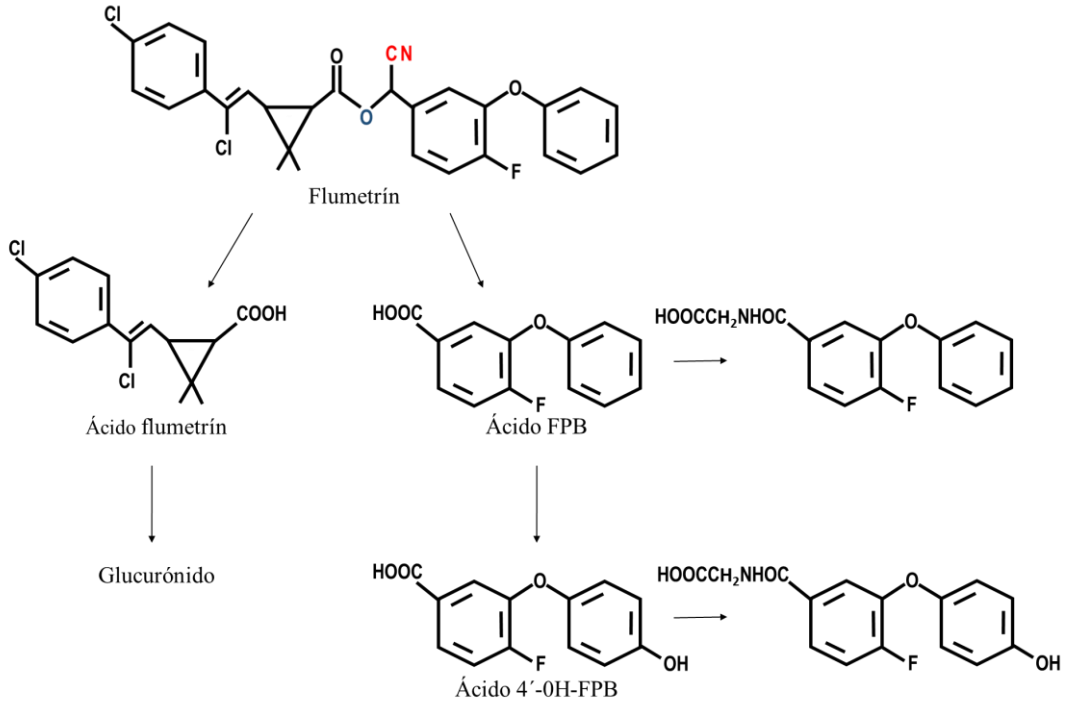


Figura 6. Metabolismo del piretroide flumetrín. La escisión del enlace éster genera 2 metabolitos: el ácido flumetrín que es conugado posteriormente y el ácido FPB, que se oxida a 4´-OH-FPB (Imagen adaptada de Kaneko, 2010).

Ensayos en ratas en la que se administró ^{14}C [CI] - flumetrín, determinó que el 68% de la radiactividad se eliminó en las heces durante las primeras 24 horas y aproximadamente 2% en la orina. Por el contrario, después de la administración oral de ^{14}C [F] - flumetrín, el 45% de la radioactividad se eliminó en la orina y el resto en las heces. Las hembras parecen absorber un porcentaje considerablemente mayor a los machos, tras la administración oral de este piretroide. La vida media de eliminación plasmática de ^{14}C[CI]- y ^{14}C [F]-flumetrín en ratas dosificadas por vía oral fueron aproximadamente 160 horas y 8 horas respectivamente (EMEA, 1998).

La dosificación oral diaria repetida de ^{14}C [Ci]-flumetrín a ratas macho, determinó una acumulación de radiactividad plasmática, encontrando que la mayor parte de la

radiactividad permaneció en el estómago por hasta 312 horas después de la administración (EMEA, 1998).

Cuando se administró flumetrín en aceite de maní, la DL_{50} oral fue de 662 mg/kg; cuando se administró en miglyol, la DL_{50} oral fue 2248 mg/kg; en acetona: aceite de maní (1:10), la DL_{50} oral fue de 138 mg/kg de peso corporal; y cuando se da en aceite de maíz (50% en volumen por volumen [v/v]), la DL_{50} oral fue de 175 mg/kg. La DL_{50} dérmica para flumetrín en aceite de maíz fue de 1436 mg / kg pc en ratas y la concentración letal media de inhalación (LC_{50}) para flumetrín fue 0.572 mg/L. Basicamente la toxicidad aguda por vía oral de flumetrín en ratas es depende del vehículo solvente usado. (EMEA, 1998).

En estudios in vivo para poder evaluar los efectos tóxicos en varios animales de experimentación, determinaron que la exposición a flumetrina, inducia a una alteración de los niveles enzimáticos hepáticos y en las actividades del sistema monooxigenasa, ademas de vías como el metabolismo anti-pirina, aumentando así los niveles del malondialdehído (MDA), la aspartato transaminasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT) y disminuyendo los niveles de catalasa y superóxido dismutasa (SOD), causando estrés oxidativo y efectos hepatotóxicos (Kara-Ertekin et al., 2021).

Se usaron grupos de ratas Wistar que fueron alimentadas con dietas diferentes de flumetrín hasta por 15 semanas. En los grupos alimentados con dosis altas, se observaron lesiones cutáneas graves, disminución de los valores de glóbulos rojos y aumento de los recuentos de leucocitos, que se asociaban a dichas lesiones; mientras que, en los grupos alimentados con concentraciones menores, se observaron lesiones cutáneas leves en algunos individuos. Al finalizar, los exámenes histopatológicos, revelaron lesiones cutáneas ulcerativas, aumento de hematopoyesis extramedular y almacenamiento de hemosiderina esplénica (EMEA, 1998).

Los estudios en grupos de perros alimentados con dietas que contenían flumetrín durante 13 semanas, señalaron lesiones cutáneas y emesis en los grupos que recibieron el piretroide en dosis intermedias, en los grupos de dosis altas se encontraron úlceras cutáneas. En el mismo tiempo, el peso corporal medio de los machos que recibieron dosis

intermedias disminuyó y las hembras de estos grupos ganaron peso, pero menor que los controles. Las concentraciones de nitrógeno ureico en sangre (BUN) aumentaron significativamente en perros que recibieron altas de flumetrín (EMEA, 1998).

En un estudio de reproducción de 2 generaciones en ratas, se administró flumetrín en la dieta a diferentes concentraciones en el alimento. La sustancia de prueba fue una premezcla con SiO coloidal. El consumo de alimentos y el aumento de peso corporal se redujeron en las líneas parentales de ambas generaciones. No hubo efectos sobre el apareamiento, la fertilidad o la duración de la gestación. En los grupos alimentados a dosis de 50 mg / kg, la viabilidad de los cachorros en los días 1 a 4 después del parto y los pesos corporales estaban deprimidos y los signos de envenenamiento por piretroides eran notorios. El nivel sin efecto adverso observable (NOEL) fue de 5 mg /kg de alimento, equivalente a 0.36 y 0.40 mg/kg/día, en machos y hembras respectivamente (EMEA, 1998).

Los experimentos con conejas inseminadas, recibieron dosis orales diarias a diferentes concentraciones de flumetrín de los días 7 a 19 de gestación, notandose ligera disminución de peso corporal en grupos tratados a dosis intermedias. No hubo evidencia de teratogenicidad en ningún nivel de dosis. El NOEL para toxicidad materna y fototoxicidad fue de 1,7 mg / kg/ día. La genotoxicidad del flumetrín se evaluó en ensayos in vivo y no se encontró evidencia de aue este piretroide genotóxico (EMEA, 1998). En ratones y ratas, estudios concluyeron que es poco probable que el flumetrín represente riesgo cancerígeno, quizá este comportamiento sea similar en los humanos. Aunque en ensayos in vitro se han sugerdio la acción xenoestrogénica de flumetrín además de inducir a la apoptosis (Kara-Ertekin et al., 2021).

2.7.3. Usos

Flumetrín se utiliza en medicina veterinaria frente a las infestaciones por garrapatas sensibles a los piretroides de uno o varios huéspedes en animales tales como bovinos, ovinos y caprinos (Lodesani, 2004). Los géneros de garrapatas sensibles a flumetrín son *Boophilus microplus, Boophilus annulatus, Amblyomma cajennense, Amblyomma imitator, Amblyomma maculatum, Dermacentor albipictus, Dermacentor occidentalis, Dermacentor dissimilis, Haemaphysalis spp, Ixodes spp, Otobius megnini.* En equinos

garrapatas del género A*nocentor nitens, Amblyomma cajennense, Amblyomma imitator, Dermacentor spp, Otobius megnini (*Lappin et al., 2013; Lappin et al., 2013).

Las presentaciones son variables siendo el pour-on e inmersión los más usados en el ganado bovino y ovino y caprino, teniendo actividad protectiva contra garrapatas *Ixodes ricinus, Dermacentor reticulatus* y *Rhipicephalus sanguineus,* en pelo y lana, incluso muchos días post esquila (Lappin et al., 2013).

Se usa en caninos para el control de garrapatas del género *Rhipicephalus sanguineus, Amblyomma spp* y *Dermacentor variabilis*; desde hace muchos años se ha popularizado hace el uso de collares impregnados de flumetrín y otros compuestos, para el control de ectoparásitos (pulgas y garrapatas) en animales de compañía como perros y gatos (Fourie et al., 2013; Lappin et al., 2013) y también infestaciones por otros ectoparásitos como piojos (chupadores y masticadores) la sarna soróptica, melófagos y ácaros de aves (EMEA, 1998; Mehlhorn et al., 2011); es ampliamente usado en apicultura para controlar ácaros del género Varroa en abejas (Lappin et al., 2013; Kara-Ertekin et al., 2021).

2.8. MUERTE CELULAR POR PLAGUICIDAS

Las manifestaciones clínicas evidenciadas por plaguicidas tanto en animales como humanos, son altamente variables, en algunos puntos de su fisiopatología, muchos pueden ocasionar signología parecida entre un compuesto y otro, tal es el caso de la salivación o el vómito, llegando en muchos casos a manifestaciones nerviosas y muerte.

Molecularmente se ha encontrado múltiples cambios en células y tejidos tratadas con plaguicidas, en las cuales habría un desbalance oxidativo/ no oxidativo, en donde la formación aumentada de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) activarían las rutas apoptóticas, asociándolos con muchas enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, incluyendo el cáncer y mecanismos inflamatorios (Sule et al.; 2022).

2.8.1. Paraquat (PQ)

Las intoxicaciones con PQ, generan manifestaciones clínicas sistémicas muy variables, siendo las patologías respiratorias muy comunes y característica, se han hecho ensayos *in vitro* en donde se señalan que el estrés oxidativo generaría repercusiones en tejido nervioso (Fei y Ethell., 2008).

Una característica importante de la enfermedad de Parkinson es la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia compacta *Nigra pars* compacta. El PQ y 1-metil-4-fenil-1, 2, 3,6-tetrahidropiridina (MPTP) causan la degeneración selectiva de estas neuronas *in vivo.* La elucidación de los mecanismos de muerte celular involucrados es importante para comprender cómo las múltiples toxinas ambientales pueden contribuir a la enfermedad esporádica de Parkinson (Fei y Ethell., 2008).

Se reportó también que PQ induce apoptosis neuronal a través de la activación de genes proapoptóticos como Bak, en contraste con MPP, el metabolito tóxico de MPTP, que se basa en Bax y p53 por estrés oxidativo (Fei y Ethell., 2008).

En estudios *in vitro* en células neuronales embrionarias humanas, se evidenció que PQ, aumentaba la expresión de genes de muerte celular apoptótica como la caspasa 3, en concentraciones altas (Chang et al., 2013). En otros trabajos también inducía activadores de proteínas Bax que incluían Bik y Bim. Esas respuestas favorecen la activación de las vías las apoptosis dependientes de Bax para el PQ, aunque en asociaciones de PQ con el fungicida maneb, esta ruta estaría siendo bloqueada (Fei y Ethell., 2008). Para estos casos los resultados sugieren efectos neurotóxicos y neurodegenerativos para PQ.

2.8.2. Clorpirifos (CPF)

Es uno de los insecticidas organofosforados más utilizados con varios efectos nocivos, incluida la neurotoxicidad. Aunque muchos estudios han abordado la neurotoxicidad inducida por CPF, la mayoría de los datos sobre el daño del neurodesarrollo se obtuvieron de modelos animales. Estudios en grupos de células precursoras neurales humanas (hNPC) derivadas de células madre embrionarias humanas (hESC) se usaron como modelo neuronal en desarrollo para evaluar los mecanismos involucrados en la

neurotoxicidad inducida por diferentes concentraciones de CPF, resultando el plaguicida en cuestión, citotóxico, eso se demuestra la disminución de la viabilidad celular y el aumento de la liberación de lactato deshidrogenasa. Además, CPF redujo la expresión de proteínas quinasas AKT y ERK que están involucradas en las vías de supervivencia intracelular (Lee et al., 2014).

La exposición de hNPC a CPF condujo a la producción de ROS y la N-acetil-cisteína antioxidante (NAC) atenuó la producción de estos radicales inducida por CPF. Además se observó aumentó la liberación de citocromo C citosólico y activación de caspasas 3 y 9, lo que indica que la muerte celular inducida por CPF en hNPC. De acuerdo con estos hallazgos, también se redujo el nivel de proteína antiapoptótica Bcl-2 y el aumento el nivel de proteína proapoptótica (Lee et al., 2014).

En conjunto, estos resultados representan una caracterización molecular única de la citotoxicidad inducida por CPF en hNPC, los cuales sugieren que CPF puede afectar el desarrollo neurológico de una manera similar a la de varios neurotóxicos conocidos y sospechosos (Lee et al., 2014).

2.8.3. Fipronil (FPN)

FPN es un insecticida de fenilpirazol que actúa sobre los receptores de insectos del ácido gamma-aminobutírico (GABA). Aunque la acción de FPN está restringida en el sistema transmisor neuronal o muscular de insectos, algunos estudios han evaluado los efectos de este neurotóxico en la muerte celular neuronal. Estudios *in vitro* de células SH-SY5Y dopaminérgicas humanas expuestas a FPN en diferentes concentraciones, indicaron citotoxicidad para estas células (Lee et al., 2011).

La muerte celular dopaminérgica inducida por FPN en células cultivadas, señaló un aumento de la generación de ROS, diminución de niveles de dopamina (DA). La muerte celular en respuesta a FPN se debió a la apoptosis ya que se encontró aumentó la liberación de citocromo C citosólico y activación de la caspasa3, además se evidenció también la acumulación nuclear de proteína p53 y reducción de los niveles de proteína Bcl-2 de manera dependiente de la concentración. (Lee et al., 2011).

2.9. CELULAS DEL NEUROBLASTOMA SH-5YSY

2.9.1. Generalidades

El uso de neuronas primarias derivadas de los tejidos embrionarios del sistema nervioso central del 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, 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 óseo 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, 1978). En la actualidad, estas células se encuentran en la Colección Europea de Cultivos Celulares Autenticados (European Collection of Authenticated Cell Cultures -ECACC 94030304).

Las células SH-SY5Y son similares a los neuroblastos; presentan un cariotipo estable que consta de 47 cromosomas, estas se pueden diferenciar desde estados similares al de los neuroblastos 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 (BDNF). La evidencia previa sugiere que el uso de diferentes métodos puede seleccionar subtipos de neuronas específicas, como las neuronas adrenérgicas, colinérgicas y dopaminérgicas. (Biedler,. 1978; Påhlman, et al., 1984). Esta potencialidad en la diferenciación celular hace que las células SH-SY5Y sean muy útiles para una multitud de experimentos de neurobiología en sistemas *in vitro*.

La manipulación del medio de cultivo en las células del neuroblastoma SH-SY5Y, ha permitido la diferenciación de estas, 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 hasta hace algunos años, 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 este 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 (Yue et al., 2014; Lin et al., 2014).

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 (Yue et al., 2014; Lin et al., 2014).

Además, aunque estas células son neuronas, pueden tener cariotipos inestables, lo que hace que su uso sea problemático para estudios de expresión génica y estudios reproducibles de señalización celular. Por lo tanto, es importante desarrollar modelos más consistentes de enfermedad neurológica humana. (Shipley et al, 2016).

2.9.2. Diferenciación neuronal

La diferenciación neuronal de estas líneas celulares, se logra a través de muchos pasos, entre ellos, están la formación y extensión de procesos neuríticos, el aumento de la excitabilidad eléctrica de las membranas plasmáticas, la formación de sinapsis funcionales positivas de sinaptofisina y la inducción de enzimas neuronales específicas, los neurotransmisores y los receptores de neurotransmisores (Adem et al., 1987; Lopes et al., 2010).

Las células SH-SY5Y indiferenciadas, se caracterizan morfológicamente por los cuerpos celulares no polarizados, similares a neuroblastos. Estas células tienden a crecer rápidamente en grupos y parecen crecer una encima de la otra (Kovalevich y Langford, 2013; Påhlman et al., 1995), además, expresan específicamente marcadores neuronales inmaduros, recordando en cierto modo a las neuronas catecolaminérgicas inmaduras (Lopes et al., 2010; Xie et al., 2010); en estas células indiferenciadas se ha observado la carencia de marcadores neuronales maduros (Påhlman et al, 1984).

Las células maduras pueden exhibir numerosos procesos distribuidos aleatoriamente o volverse claramente polarizados (Gimenez-Cassina et al., 2006; Kovalevich y Langford, 2013), dependiendo del método de inducción de diferenciación. La diferenciación de las células SH-SY5Y también induce una disminución en la tasa de proliferación, a medida que las células se retiran del ciclo celular, y un aumento en la actividad de la enolasa específica de neurona (NSE), la isoenzima enolasa dominante presente en los tejidos neuronales y neuroendocrinos (Påhlman et al., 1984; Encinas et al., 2000).

Las células SH-SY5Y pueden inducirse hacia una variedad de fenotipos neuronales adultos, incluidos los colinérgicos, adrenérgicos o dopaminérgicos, dependiendo de las condiciones de los medios de cutluvo (Xie et al., 2010).

Se ha demostrado que las células SH-SY5Y completamente diferenciadas expresan una variedad de marcadores diferentes de neuronas maduras que incluyen proteína asociada

al crecimiento (GAP-43), núcleos neuronales (NeuN), sinaptofisina (SYN), proteína de vesícula sináptica II (SV2), enolasa específica de neurona (NSE) y proteína asociada a microtúbulos (MAP) (Gimenez-Cassina et al., 2006; Påhlman et al., 1984; Xie et al., 2010; Cheung et al., 2009), y la falta de expresión de marcadores gliales como la proteína ácida fibrilar glial (Encinas et al, 2000). Además, las células SH-SY5Y diferenciadas representan una población neuronal homogénea, la eliminación de BDNF da como resultado la apoptosis celular (Encinas et al, 2000). Esto sugiere que la supervivencia de las células SH-SY5Y diferenciadas, depende de factores tróficos, similares a las neuronas maduras (Shipley et al., 2016). La diferenciación de las células SH-SY5Y puede dar como resultado una población relativamente homogénea del estadio G_0, células de tipo neuronal que muestran una ausencia de marcadores para otros tipos de células del SNC (Melino et al., 1997).

2.9.3. Fisiología

2.9.3.1. Con ácido retinoico (RA)

La inducción de la diferenciación de las células SH-SY5Y se logra mediante la adición de RA al medio de cultivo celular. El ácido retinoico, es un derivado de la vitamina A, que se sabe que posee potentes propiedades inhibidoras del crecimiento y promotoras de la diferenciación celular (Melino et al., 1997; Lopes et al., 2010). De hecho, la deficiencia de vitamina A está relacionada con el desarrollo de metaplasia escamosa en varios tejidos epiteliales, mientras que la administración de esta vitamina, puede revertir estos efectos y restaurar la diferenciación celular normal (Lotan, 1996; Melino et al., 1997; Påhlman et al, 1984; Cheung et al., 2009).

Se ha demostrado que el tratamiento con RA promueve la supervivencia de las células SH-SY5Y mediante la activación de la vía de señalización de fosfatidilinositol 3-quinasa / Akt y la regulación positiva de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Itano et al., 1996; Lopez-Carballo et al., 2002).

Algunos estudios muestran que las células diferenciadas por RA son menos vulnerables que las células no diferenciadas a la muerte celular mediada por toxinas inducidas por diversos agentes. (Cheung et al., 2009).

Las células SH-SY5Y se diferencian principalmente a un fenotipo de neurona colinérgica en respuesta al tratamiento de RA, como lo demuestra el aumento de la expresión de la actividad de la colinaacetiltransferasa (ChAT) y la expresión del transportador de monamina vesicular (VMAT) (Lopes et al., 2010; Påhlman et al., 1981).

Las células también pueden ser conducidas hacia un fenotipo dopaminérgico maduro mediante el tratamiento de la RA, pero esto generalmente requiere la administración conjunta de agentes adicionales como los ésteres de forbol (Presgraves et al., 2004).

Si bien existe controversia en la literatura sobre si los marcadores dopaminérgicos presentes en las células SH-SY5Y no diferenciadas aumentan significativamente durante la diferenciación inducida por el RA, los estudios demuestran aumentos en los subtipos de la tirosina hidroxilasa (TH), el receptor de dopamina 2 y 3 (D2R y D3R) y la expresión del transportador de dopamina (DAT), cuando la administración de RA es seguida por tratamiento con ésteres de forbol (Presgraves et al., 2004).

Se hicieron estudios de clasificación de las células indiferenciadas como de tipo S (adherente al sustrato) sin fenotipo similar a la neurona y de tipo N (neuroblástico) caracterizado por procesos neuríticos. Tras la diferenciación con RA durante 5 días, se informó que las células de tipo N adquieren características similares a las neuronas más fácilmente que las de tipo S. Sin embargo, en el día 10 después del RA, el porcentaje de células de tipo S en el cultivo aumentó y los cultivos fueron sobrecrecidos por la población de tipo S. Por lo tanto, el tratamiento de RA a corto plazo (hasta 5 días) pareció inducir la diferenciación de las células de tipo N, pero un tratamiento más prolongado (> 10 días) promovió la proliferación de las células de tipo S, promoviendo así la proporción desequilibrada de las células de tipo S a N. (Encinas et al., 2000).

En base a estos resultados, se debe considerar no solo el número de pasaje, sino también el fenotipo celular del cultivo al momento de diseñar experimentos *in vitro.* En los protocolos de diferenciación algunos autores sugieren usar solo células flotantes mientras que otros recomiendan usar solo células adherentes para la posterior diferenciación (Shipley et al., 2016).

2.9.3.2. Con ésteres de forbol

Estas células también se diferencian en presencia de ésteres de forbol como el acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol-13 (TPA), en ensayos donde las células se expusieron a TPA aparecieron diferenciadas morfológicas con procesos largos y rectos de apariencia desigual (Påhlman et al., 1981).

El tratamiento con TPA también resultó en una inhibición parcial del crecimiento, un aumento de aproximadamente el doble en la actividad de la NSE y la aparición de gránulos neurosecretores citoplasmáticos (Påhlman et al., 1981; 1984). Una diferencia notable entre la diferenciación inducida por TPA y RA de las células SH-SY5Y es que el tratamiento con TPA aumenta el contenido celular de noradrenalina hasta 200 veces, mientras que el tratamiento con RA provoca una inducción aproximada de cuatro veces en noradrenalina (Påhlman et al., 1984). Por lo tanto, el uso de TPA para inducir la diferenciación de las células SH-SY5Y produce un fenotipo celular predominantemente adrenérgico (Murphy et al., 1991; Scott et al., 1986).

2.9.3.3. Con el dibutiril-AMPc

Las hormonas y los neurotransmisores que regulan al alza los niveles intracelulares de AMP cíclico (cAMP) promueven la diferenciación y la potenciación a largo plazo en las células neuronales (Frey et al., 1993; Sanchez et al., 2004).

La exposición de células SH-SY5Y al dibutiril-AMPc (dbcAMP), da como resultado la extensión y ramificación de la neurita, así como una mayor expresión de la proteína 43

asociada al crecimiento del marcador neuronal maduro (GAP43) (Sanchez et al., 2004) y la disminución de la agregación celular (Kume et al., 2008). La exposición a dbcAMP también conduce a un aumento significativo en la inmunoreactividad de la tirosina hidroxilasa (TH) y en el contenido celular de noradrenalina de una manera dependiente de la proteína quinasa A (PKA) (Itano et al., 1996; Kume et al., 2008).

La diferenciación de las células SH-SY5Y con dbcAMP produce un fenotipo morfológico similar al observado en las células diferenciadas de RA y TPA, y que el cultivo diferenciado está compuesto principalmente por células neuronales adrenérgicas (Kovalevich y Langford, 2013).

2.9.3.4. Neuronas adrenérgicas

Las células SH-SY5Y pueden ser conducidas hacia un fenotipo adrenérgico por diferenciación inducida por RA. Nuevamente, se requiere la expresión de TH, ya que la nor-adrenalina y la adrenalina se derivan de la dopamina catalizada de manera dependiente de TH (Kume et al., 2008).

Los estudios demuestran que tanto las células SH-SY5Y diferenciadas como las de alto paso expresan niveles suficientes de dopamina-βhidroxilasa, enzima que cataliza la formación de nor-adrenalina a partir de dopamina, y son capaces de convertir la dopamina intracelular en nor-adrenalina. Además, las células SH-SY5Y expresan el transportador de noradrenalina (NET) y el transportador de monoamina vesicular (VMAT), característico de las neuronas adrenérgicas (Kovalevich y Langford, 2013).

2.9.3.5. Neuronas colinérgicas

Se han reportado receptores colinérgicos en células SH-SY5Y. Los receptores muscarínicos acoplados a la proteína G están presentes en las membranas de las células tanto indiferenciadas como diferenciadas en distintas magnitudes. Por ejemplo, el

tratamiento con TPA, disminuye el número de sitios para la union muscarínica, mientras que aumenta con el tratamiento con RA (Biedler et al., 1978).

Tanto las células tratadas con TPA como con RA muestran una actividad de acetilcolinesterasa significativamente mayor en comparación con las células no diferenciadas. Sin embargo, solo se ha demostrado que el tratamiento de la AR aumenta la actividad de la colina acetiltransferasa (Biedler et al., 1978).

Los receptores de acetilcolina nicotínicos del canal iónico dependientes de ligando (nAChR) también están presentes en las células SH-SY5Y y se consideran análogos a los nAChR de tipo ganglio humano (Gould et al., 1992; Lukas et al., 1993).

Las células SH-SY5Y indiferenciadas suelen parecerse a neuronas catecolaminérgicas inmaduras (Cuende et al., 2008). Las células indiferenciadas también expresan la diferenciación inhibiendo los factores básicos de transcripción hélice-asa-hélice, todos los cuales disminuyen significativamente después del tratamiento con RA o TPA, por la cual células de esta línea diferenciada expresan una serie de marcadores neuronales maduros (Lopez-Carballo et al., 2002).

Las células SH-SY5Y en estados indiferenciados y diferenciados expresan varios marcadores neuronales dopaminérgicos. Estas células expresan tirosina hidroxilada (TH), una enzima crítica para la catálisis de dopamina y, posteriormente, noradrenalina (norepinefrina) y adrenalina (epinefrina) (Kume et al., 2008). Es importante destacar que las células SH-SY5Y también expresan el transportador de dopamina (DAT), así como los subtipos de receptores de dopamina 2 y 3 (D2R y D3R), lo que los convierte en un sistema *in vitro* ejemplar para el estudio de la neurotoxicidad en las neuronas dopaminérgicas, así como para los medicamentos, (Romero et al., 2015), que se sabe que producen efectos primarios a través de la activación de los receptores de dopamina (Arun et al., 2008).

Se ha demostrado que la expresión de TH, DAT, D2R y D3R aumenta después de la diferenciación en varios estudios, particularmente cuando se utiliza una combinación de RA y TPA para inducir la diferenciación (Lopes et al., 2010; Presgraves et al., 2004). Sin embargo, también existe un cuerpo de literatura que informa que no hay diferencias significativas en los niveles de TH o DAT después de la diferenciación, aunque estos estudios generalmente utilizaron RA solo o agentes, que promueven un fenotipo no dopaminérgico para inducir la diferenciación (Cheung et al., 2009; Guarnieri et al., 2009).

2.9.4. Usos de ensayo

El uso de células SH-SY5Y en ensayos *in vitro* ha aumentado desde que se estableció el subclón en 1978 (Biedler, 1978). Algunos ejemplos de su uso incluyen la investigación de la enfermedad de Parkinson (Xie, 2010), la enfermedad de Alzheimer (Agholme et al., 2010) y la patogenia de la infección viral, incluido el poliovirus (La Monica y Racaniello, 1989), el enterovirus 71 (EV71) (Cordey et al., 2012; Xu et al., 2013), la varicela-zoster virus (VZV) (Christensen et al., 2011), citomegalovirus humano (Luo y Fortunato, 2007) y virus herpes simplex (HSV) (Gimenez-Cassina et al., 2006; Sun et al., 2020). Muchos estudios usan este tipo de células neuronales en su forma indiferenciada, especialmente en el campo de la neurovirología (Yun et al., 2014).

Desde ese punto, usar estas células neuronales SH-SY5Y como modelos de estudio para evaluar la neuotoxicidad, neurodegeneración entre otros, ofrece una herramienta valiosa para entender muchos mecanismos citomoleculares que hasta la fecha siguen no estando dilucidados del todo. Por lo tanto, es fundamental que al diseñar un experimento centrado en probar neuronas SH-SY5Y *in vitro*, este se haga ya sea en células indiferenciadas o diferenciadas a fin de obtener los resultados más precisos para la traducción y comparación con modelos *in vivo* (Shipley et al., 2016).

2.10. APOPTOSIS

La muerte celular es un proceso necesario para mantener la homeostasis (entre el número de células nuevas que se generan por procesos mitóticos y el número de células dañadas

o que no son requeridas) de un organismo (Youle 2007; D'Arcy, 2019). Este proceso puede ser accidental o ya contar con mecanismos intracelulares planificados; en ese contexto, la caracterización de la morfología y los mecanismos bioquímicos dependientes de la energía por parte de las células, han hecho que la muerte celular sea dividida clásicamente en 2 rutas diferentes: necrosis y apoptosis (Strasser, 2005; D'Arcy, 2019); sin embargo, se han descubierto muchas otras rutas o sub rutas de alguna de estas, como piroptosis o autofagia que se activan en determinados momentos de la vida o estados patológicos del individuo *per se* (D'Arcy, 2019).

El término apoptosis (a-po-toe-sis), referente a caída de las hojas, se utilizó por primera vez en los 70s para describir una forma morfológicamente distinta de muerte celular, aunque ciertos componentes de este concepto habían sido explícitamente descritos muchos años antes. Desde entonces, la apoptosis o muerte celular programada ha sido reconocida y aceptada como una manera distintiva dentro de los conceptos de muerte celular (Kerr, 2002).

Los cambios morfológicos característicos de la apoptosis señalan una disminución y aumento de la densidad citoplasmática, núcleos picnóticos con cromatinas condensadas y fragmentadas, y retículo endoplasmático dilatado que llegan a formar vesículas de fusión con el plasmalema (Elmore, 2007; D'Arcy, 2019).

Estos procesos tienen una regulación intracelular bastante compleja (Marsden y Strasser; 2003), estas rutas intracelulares son mediadas por proteínas caspasas tanto activadoras como efectoras, además del papel crucial que realizan las proteínas de la familia Bcl-2 (Youle 2007).

2.10.1. Vías apoptóticas

Se han estudiado 3 vías o rutas por las cuales pueden activarse las proteínas caspasas en pro de la actividad apoptótica, estas caspasas pueden ser tanto iniciadoras como efectoras; clásicamente son 2 las rutas más conocidas las cuales son: la extrínseca y la intrínseca (Elmore, 2007). La tercera ruta denominada: Vía de perforina/granzima, que es una variante de la hipersensibilidad tipo IV. Los linfocitos CD8+ matan a células portadoras

de antígenos; estos linfocitos activados, expresan ligandos de muerte celular (FasL) en su superficie, lo que permite la unión a su receptor en la superficie de las células blanco, empezando así la cascada de señalización por la vía extrínseca. También son capaces de ejercer efectos citotóxicos en células tumorales y células infectadas por virus a través de la secreción de poros transmembrana (perforinas) con una posterior liberación exofítica de gránulos citoplasmáticos a través del poro y hacia la célula diana, produciendo su muerte (Elmore, 2007). Las granzimas B también participan en la activación de la caspasa 10; estas granzimas pueden usar también las vías mitocondriales (Elmore, 2007; Youle 2007).

2.10.2. Vía extrínseca o del receptor de muerte

Esta vía comienza cuando los ligandos de muerte se unen a los receptores de muerte celular; se han identificado como los receptores de muerte más conocidos al factor de necrosis tumoral tipo 1 (TNFR1) y a la proteína Fas (CD95), los cuales interactúan con sus respectivos ligandos, TNF y Fas ligando (FasL). Estos receptores de muerte como TNFR1 comparten dominios extracelulares ricos en cisteína y tienen un "dominio de muerte" en la cara intracelular de 80 aminoácidos (Elmore, 2007); este dominio, tiene la capacidad de reclutar proteínas como es el caso del receptor de necrosis tumoral (TRADD), el dominio de muerte asociado a Fas (FADD), y caspasas iniciadoras como la 8 y 10 (Hsu et al., 1995); en el caso de la caspasa 8, la dimerización a nivel del dominio efector de la muerte, forma el complejo de señalización propapoptótica, clivando otras caspasas ejecutoras o de río abajo. (Elmore, 2007; D'Arcy, 2019).

2.10.3. Vía intrínseca o mitocondrial

En esta vía, la señal de inicio es intracelular; es decir, una serie de diversos estímulos no mediados por receptores podrían estar asociados a una injuria génica irreparable, a hipoxia celular o a altas concentraciones de calcio citosólico, además de romperse el equilibrio oxidante tras el estrés oxidativo con los aumentos de ROS Y RNS sustancialmente. Los estímulos pueden actuar de forma positiva o negativa. Las señales negativas implican la ausencia de ciertos factores de crecimiento, hormonas y citoquinas

que pueden conllevar al fracaso de los mecanismos de supresión de la muerte celular, siendo finalmente de carácter proapoptótico (Elmore, 2007).

Estos eventos pueden tener blancos intracelulares o actuar principalmente sobre las mitocondrias, aumentando su permeabilidad, tras la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPT), liberando así, moléculas proapoptóticas (que normalmente son secuestradas) tales como el citocromo C, desde el espacio intermembranoso mitocondrial hacia el citosol. (Saelens et al., 2004).

Esta vía está estrechamente regulada por un grupo de proteínas que pertenecen a la familia Bcl-2. En esta la familia, podemos encontramos tres sub grupos que compiten entre sí la función apoptótica, a fin de promoverla o bloquearla (Strasser, 2005; Youle 2007), y son: La subfamilia Bcl-2, formado por: MCL-1, BCL2A1, BCL-B, Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W; La subfamilia Bax, formada por: Bok, Bak, Bax; y la subfamilia BH3, formada por: PUMA, NOXA, BMF, HRK, Bad, Bid, Bik, Blk, BimL (Elmore, 2007; Youle 2007).

Las proteínas de las subfamilias Bax y BH3 son proapoptóticas, al permitir la salida del citocromo C hacia el citosol, mientras que la sub familia Bcl-2 es antiapoptótica, al realizar un efecto antagonista a la de las anteriores (Kerr, 2002; D'Arcy, 2019).

Los estudios de la estructura molecular de las proteínas de la subfamilia Bax, la han identificado originalmente como una proteína de unión a Bcl-2 y se pensaba que era inhibida por esta interacción. Sin embargo, contrario a este "modelo de reóstato", Bax no está unido a Bcl-2 en células sanas, pero existe como un monómero libre en el citosol (Strasser, 2005; Youle 2007).

Además, parece ser que algunos péptidos de proteínas de la subfamilia BH3 actuarían sinérgicamente con péptidos correspondientes de Bax, Bid y Bim, para inducir liberación de citocromo C de mitocondrias aisladas, comportándose entonces como activadores apoptóticos (Youle 2007).

El citocromo C es la pieza central de esta vía apoptótica, pero no la única. Se deben incluir también al factor inductor de la apoptosis (Por sus siglas en inglés AIF: apoptosis-inducing factor), al segundo activador de caspasa derivado de la mitocondria (Smarc), a la proteína de unión al IAP directo con bajo pH (DIABLO), a la proteína A de requerimiento de alta temperatura /Omi (HtrA2), entre otros; todos ellos de carácter proapoptótico, tras su salida de mitocondria por la apertura del MPT hacia el citosol (Cain et al., 2002; Ekert y Vaux, 2005).

El citocromo C a nivel citosólico induce la oligomerizacion de la proteasa activadora de apoptosis tipo 1 (APAF1) generando su activación y un cambio conformacional que le permite el ensamblarse a más APAF1s. Citocromo C, también activa a la procaspasa 9, que al unirse tanto a APAF y forman un apoptosoma. La activación de la caspasa 9 es el punto iniciador del proceso intrínseco, ya que una vez formado el apoptosoma, este permite la activación de caspasas efectoras como la 3 (Acehan et al., 2002; Cain et al., 2002).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE ESTUDIO

El proceso del cultivo de la línea SH -SY5Y al igual que los procesos de pasajes de los subcultivos celulares, se llevaron a cabo en el Laboratorio de Reproducción Animal; los ensayos de viabilidad celular, extracción de extracción de RNA, síntesis de cDNA y expresión de genes relacionados a apoptosis por RT-PCR, se realizaron en el Laboratorio de Fisiología Animal; ambos laboratorios de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

3.2. MATERIALES Y REACTIVOS

Placas de 96 pocillos transparentes
Placas de 96 pocillos para PCR
Frascos de cultivo celular de 25 cm^2
Tubos falcón de 15 mL
Pipetas de cultivo 10 mL
Pipetas Pasteur de plástico 3 mL
Pipetas automáticas monocanales (10, 100 y 1000 µL)
Placas Petri
Medio de cultivo con rojo fenol
Medio de cultivo sin rojo fenol
Kit de extracción de RNA (RNeasy MinElute Kits – Qiagen)
Kit para RT-PCR (Qiagen)
Master mix de retrotranscripción
Frasco de MTT Formazan (Sigma-Aldrich).
Frasco de dimetil sulfoxido DMSO (EMSURE® ACS)
Frascos de agua para biología molecular libre de nucleasas (RNase-free)
Frascos de 500 mL de suero fetal bovino (FBS) al 10% (Linus).
Frascos de 100 mL de solución antibiótica triple (Pen-Strep + Anfotericina B al 1%).
Frascos de 100 mL de L-glutamina (Lonza™)

Frascos de 500 mL de medio de cultivo comerial Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture (DMEM-F-12) (Lonza™)
Frascos de 500 mL de medio de cultivo Biowhitaker™ Dulbecco's Modified Eagle's Medium con 4.5g L-Glucosa , sin L-Glutamina (Biowhitaker DMEM) (Lonza™)
Frasco de flumetrín de 100 mg con una pureza ≥ 98% (Sigma Aldrich/MERCK - San Luis, USA).
Crioviales de la línea celuar del neuroblastoma humano SH-SY5Y, (Sigma Aldrich/MERCK - San Luis, USA).

3.3. EQUIPOS

Incubadora de CO_2
Centrifuga refrigerada
Balanza analítica
Cabina de flujo laminar
Baño maría
Tips de micropipetas (20, 200 y 1000 µL)
Termociclador
Espectrofotómetro UV (lector de Elisa)
Aspirador de liquidos
Cabina de PCR
Especrofotometro para microvolumenes

3.4. VIABILIDAD CELULAR POR REDUCCION DE BROMURO DE 3-(4,5 DIMETILTIAZOL-2-IL)-2,5-DIFENILTETRAZOLIO (MTT)

El ensayo de la viabilidad celular es una prueba colorimétrica cuantitativa, se fundamenta en la actividad celular metabólica mitocondrial de células vivas, debido a la reducción de las sales tetrazolio, como es MTT, de color amarillento y soluble en agua a un metabolito de la familia formazanos (sal de formazán), de color violeta e insoluble en agua. (Denizot y Lang, 1986), ésta ténica es utilizada ampliamente en aplicaciones histoquímicas,

viabilidad de células eucariotas y bacterias cuantificadas mediante absorbancia (Stockert et al., 2018). Los pasos se siguieron bajo protocolo del fabricante.

Los ensayos realizados sobre viabilidad celular y expresión de genes relacionados a muerte celular, tuvieron etapas previas, estas fueron los procesos de cultivo de la línea celular SH-SY5Y y sus posteriores pasajes celulares, explicadas líneas abajo.

3.4.1. Linea celular y condiciones de cultivo.

Los crioviales de células SH-SY5Y adquiridos, fueron congelados en nitrógeno líquido a -196 °C. Para su uso fueron retirados del tanque de nitrógeno y puestos en baño maría a 37 °C por 10 min, luego fueron sembradas en un frasco de cultivo celular de 25 cm^2 junto con 7 mL de medio de cultivo para el crecimiento celular con rojo fenol.

3.4.2. Preparación del medio de cultivo y crecimiento celular (con rojo fenol)

Para preparar este medio de cultivo que contenía rojo fenol, se adicionaron 50 ml de FBS al 10% y 5ml de Pen-Strep + Anfotericina B al 1%, al envase de 500mL de DMEM-F-12 y fue almacenado a 4°C en refrigeración hasta su posterior uso.

3.4.3. Cultivo celular SH-SY5Y

Para llevar a cabo este proceso, se mezclaron 1mL de las células SH-SY5Y con 7ml del medio de cultivo con rojo fenol, en un frasco de cultivo celular de 25 cm^2 y se llevó a incubación durante 24 horas a 37 °C a 5% de CO_2. Pasado este tiempo, se quitó el medio de cultivo, se llevó al microscopio invertido y se observó el nivel de confluencia, es decir la proliferación y adhesión de la monocapa celular sobre la superficie del frasco de cultivo.

Se observó niveles de confluencia entre los 80 a 90% aproximadamente, tras el periodo de incubación descrito líneas arriba.

Los cultivos con niveles de confluencia mayores a 80% se consideran bastante adecuados para hacer la división de estos en los posteriores pasajes de los subcultivos celulares (Shipley et al., 2016; Martínez et al., 2020).

3.4.4. Pasajes celulares

Luego de comprobar la proliferación y adhesión de la monocapa en los frascos de cultivo celular, se procedió a colocar de 3 mL de tripsina e incubó 5 por min a 37 °C y 5% de CO_2; después, se llevó esta suspensión a un tubo falcón de 15 ml y se centrifugó a 1500 revoluciones por minuto (RPM) a 4°C por 5 min, una vez precipitadas las células en porción inferior del tubo falcón (pellet de células), se eliminó el sobrenadante.

Posteriormente, el pellet se resuspendió con 8 ml de medio de cultivo con rojo fenol a 37 °C en un tubo falcón; posteriormente, esta suspensión, se depositó en 2 frascos de cultivo celular de 25 cm^2 (4mL en cada una), y se adicionó 3 mL de medio de cultivo con rojo fenol a 37 °C a cada matraz y se incubó por 24 horas a 37 °C y 5% de CO_2.

Luego de este lapso, se les adicionó 3 mL de tripsina a cada frasco de cultivo y se incubó nuevamente durante 5 min a 37 °C y 5% de CO_2; después, se repitieron los pasos de centrifugado y resuspención del pellet, para colocarlos nuevamente en frascos de cutlivo celular de 25 cm^2, haciendo el proceso de subcultivos celulares. Finalmente se usó subcultivos de 7 pasajes.

Se recomienda el uso de células que van desde el subcultivo 5 hasta un número de subcultivos $\leq$ 13 (Shipley et al., 2016).

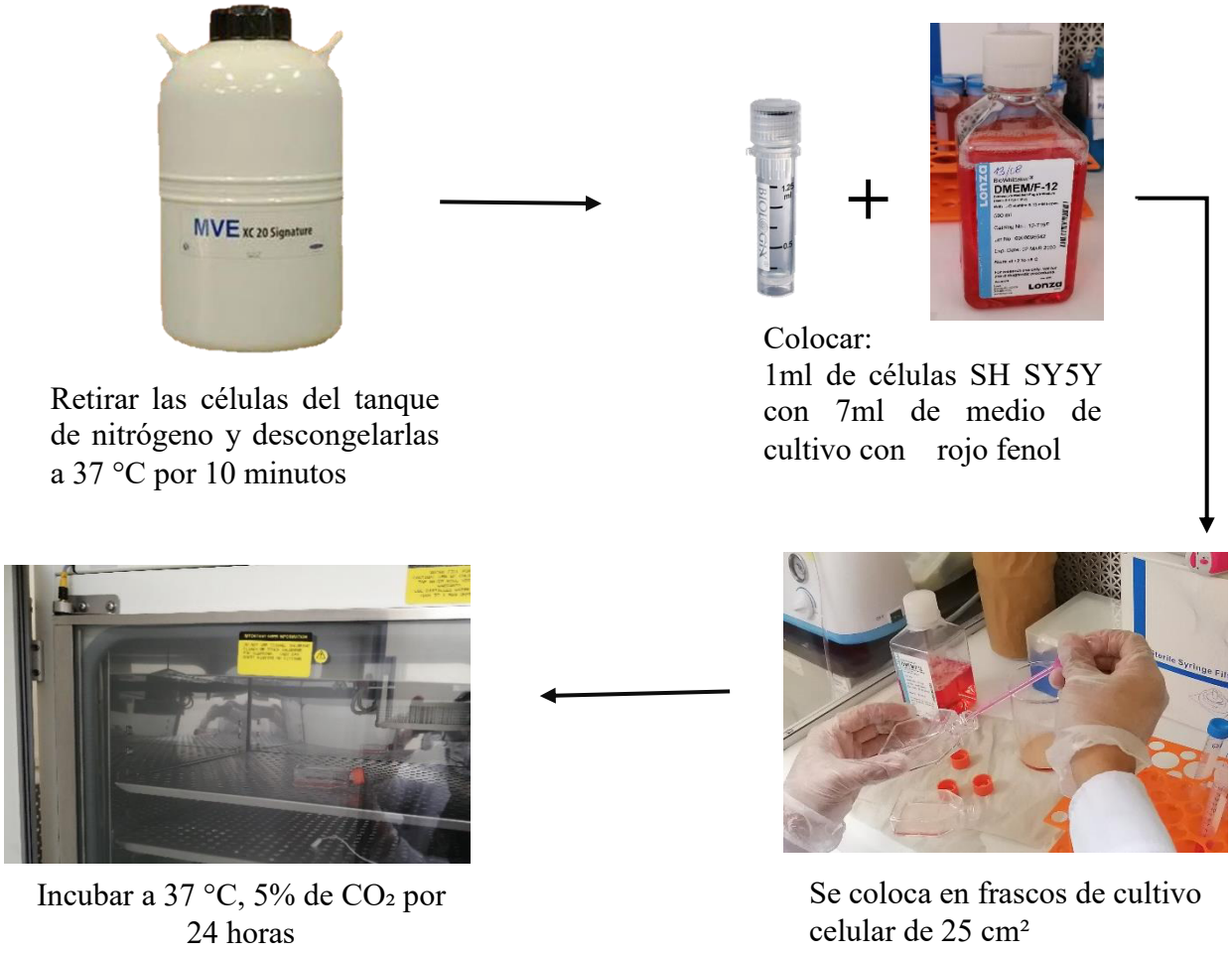


Figura 7. Condiciones de cultivo de células SH-SY5Y. Las etapas de cultivo de las células neuronales son muy importantes, teniendo en cuenta a los factores de crecimiento celular, incubación y número de pasajes celulares.

3.4.5. Preparación del medio de cultivo celular crecimiento celular (sin rojo fenol).

Para preparar este medio transparente, se usaron 5 ml de FBS al 1%, con 6.25 mL de L-glutamina a 200 mM y 5ml de Pen-Strep + Anfotericina B al 1%, vertidos al frasco de 500 ml de Biowhitaker DMEM (sin rojo fenol). Con este medio se evita el posible "ruido" en los ensayos colorimétricos (MTT).

3.4.6. Preparación de los tratamientos

El flumetrín se preparó en concentraciones de 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 y 1000 µM respecto al medio de cultivo transparente (sin rojo fenol) a un volumen final de 100 µL;

para su utilización en microplacas para ELISA. Los tratamientos a concentraciones de 20, 50 y 500 µM se prepararon a un volumen final de 7 mL para los ensayos de PCR.

Los frascos de cultivo celular de 25 cm^2 con células SH-SY5Y, se retiraron de la incubadora y se repitieron los procesos de adición de tripsina, incubación y centrifugación descritos en el proceso de pasajes celulares; una vez obtenido el pellet, se resuspendió con 10 mL de medio de cultivo transparente y se colocó 100 µl cada pocillo de las microplacas, se dejó en incubación por 24 horas a 37 °C a 5% de CO_2.

Pasado este lapso, se aspiró el medio de cultivo (con rojo fenol) de cada pocillo y se adicionó 100 µL de medio de cultivo transparente que contenían las concentraciones de flumetrín (tratamientos) antes descritos, se llevó a incubación por 24 h a 37 ºC, 5% CO2 y 95% de humedad.

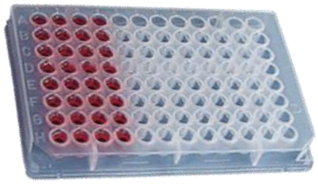
Luego, se retiraron los tratamientos mediante aspiración, y se añadió 22 µL de MTT a una concentración final de 0,5 mg/ml en cada pocillo, y pasado 2 h se colocó 150µL de dimetilsulfóxido (DMSO) al 5% (v/v) se dejó incubar por 5 min a 37 ºC, 5% CO_2 y 95% de humedad y se llevó la microplaca al lector de ELISA a absorbancia a 540 nm.



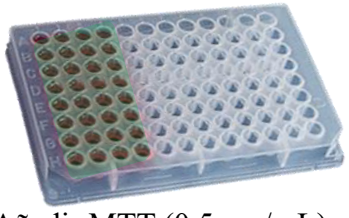
Sembrar las células en microplacas



Incubar a 37 °C y 5% de CO_2 por 24 horas



Aplicar tratamientos con flumetrín y volver a incubar por 24 horas



Añadir MTT (0,5 mg/mL)



Incubar a 37 °C, 5% de CO_2 por 2 horas



-Adicionar 150 µl de DMSO a cada pocillo.
Leer la absorbancia a 540 ηm

Fig 8. Ensayo de viabilidad celular por MTT en células SH-SY5Y. Esta prueba colorimétrica es un paso inicial e importante para evaluar el efecto dosis-respuesta a exposiciones a diferentes concentraciones de flumetrín,

3.6. EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS A MUERTE CELULAR (APOPTOSIS) POR RT-PCR

Las reacciones de la cadena de polimerasa a tiempo real (RT-PCR), se realizaron por un sistema de PCR en tiempo real (Singh et al., 2011), BioRad CFX, utilizando el mastermix RT^2 SYBR Green qPCR, según el protocolo del fabricante.

Se realizaron ensayos cuantitativos de PCR en tiempo real (RT-PCR) para Bax, Bcl-2 y Casp-3, analizando las expresiones génicas de sus respectivos ARNm. Se utilizaron cebadores específicos, los que van en sentido directo son denominados forward y los que van en sentido inverso, reverse.

En una placa de 96 pocillos, se colocaron 10 µL de SYBR Green qPCR, 6 µL de agua libre de RNasas, 2 µL de los primers (1 µL del forward y 1 µL del reverse; a una concentración de 400 nM de cada uno) y 2 µL del cDNA de cada tratamiento preparado (se explica líneas abajo).

Previo a estos pasos, se realizaron los procesos de extracción y purificación del RNA para poder sinterizar cDNA a fin de evaluar las concentraciones de estos genes relacionados a muerte celular. Estas de describen a las siguientes líneas.

3.6.1. Extracción de RNA y síntesis de cDNA

La línea celular SH-SY5Y se trató con flumetrín (20, 50 y 500 µM) durante 24 h. El ARN total se obtuvo mediante el método del reactivo TRIzol (Thermo Fisher, Waltham, MA, EE. UU.) y se purificó mediante el kit de limpieza RNeasy MinElute según las instrucciones del fabricante (Qiagen, Germantown, MD, EE. UU.).

3.6.2. Extracción de RNA total

Las células SH-SY5 con flumetrín a concentraciones de 20, 50 y 500 µM (tratamientos de 20, 50 y 500 µM), se incubaron durante 24 horas a 37 ºC, 5% CO_2 y 95% de humedad en un frasco de cultivo celular de 25 cm^2.

Para poder lisar las células, agregamos 350 µL del buffer RA1 y 3,5 µL de ß-mercaptoetanol (ß-ME) en un tubo de microcentrífuga Eppendorf™ de 1.5 mL, se llevó al vórtex por 5 segundos; y después se filtró este lisado celular usando un filtro NucleoSpin® (de color violeta) colocado en un tubo colector de 2mL en donde se puso el lisado anterior y se centrifugó a 11 000 x g por 1 minuto, luego, se desechó el filtró usado y se agregó 350 µL de etanol (al 70 %), ésto se homogenizó pipeteando unas 5 veces de arriba hacia abajo.

Posteriormente, se colocó una columna con la membrana de sílice, NucleoSpin® RNA (de color azul), en un tubo colector de 2mL y se adicionó todo el homogenizado con etanol y se centrifugó a 11 000 x g durante 30 segundos y se repitió este proceso 1 vez más.

Al precipitado se le agregó 350 µL de tampón de desalinización de membrana (MDB) y se centrifugó a 11.000 x g durante 1 minuto para secar esta membrana.

Luego se preparó la solución de la mezcla de reacción de ADNasas en un tubo de centrifuga de 1,5 ml se añadió 10 µL de rDNase reconstituida a 90 µL de tampón de reacción para rDNase y se movió vigorosamente el tubo para formar este mix.

Aplicamos 95 µL del mix de reacción de ADNasa directamente sobre el centro de la membrana de sílice de la columna y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min.

Luego, se hicieron 3 lavados:

1er lavado: Se agregó 200 µl de buffer RAW2 a la columna NucleoSpin® RNA y incubó a temperatura ambiente durante 2 min, se centrifugó a 11 000 x g. durante 30 segundos y se descartó el flujo continuo y se volvió a colocar la columna en un nuevo tubo de recolección.

2do lavado: se agregó 600 ml de buffer RA3 a la columna NucleoSpin® RNA y se centrifugó a 11 000 x g. durante 30 segundos. En este paso no se descartó el flujo continuo y se dejó la columna NucleoSpin® RNA Midi en el tubo colector.

3er lavado: Se agregó 250 ml de buffer RA3 en la columna NucleoSpin® RNA y se centrifugó a 11 000 x g. durante 2 min.

Finalmente, en un tubo de microcentrífuga Eppendorf™ de 2mL, se pipeteó 60 µL de H_2O libre de ARNasa directamente en el centro de la membrana de sílice y se incubó a temperatura ambiente durante 2 min y luego se llevó a centrifugación a 11 000 x g durante 1 minuto.

3.6.3. Eliminación del DNA genómico

En placas de 96 pocillos transparentes, se colocaron 2 µL del buffer GE con las extracciones de RNA obtenidas en el paso anterior (que oscilan entre los 25 ng a 5ug) y agua libre de RNasas (RNase-free) en proporciones a la concentración de cada muestra de RNA hasta el volumen de 10 µL. Llevamos los preparados a 42 °C por 5 min en el termociclador, los retiramos y se colocó sobre hielo. Luego, se anadió el mix de retrotranscripción.

3.6.4. Preparación del mix de retrotranscripción

Se colocó 160 µL del Buffer 5x BC3 con 40 µL del control PC2, 80 µL del mix Reverse transcriptase RE3 y 120 µL de agua libre de RNasas en un tubo de colección de 1.5 mL.

Posteriormente se colocó 10 µL de este mix en las placas con las muestras de RNA previamente tratadas con el kit de limpieza para estos ácidos nucleicos, se pipeteó

enérgicamente de arriba hacia abajo; luego, se llevaron las placas al termociclador, a 42 °C por 15 min, y luego a 95 °C por 5 min. Después, se añadieron 91 µL de agua libre de RNasas, se pipeteó y se almacenó a -80°C para su posterior análisis por qPCR.

3.6.5. Reacción de la cadena de la polimerasa (qPCR).

Se llevaron las placas a 3 ciclos de termociclación de a 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C, y 1 min a 60 °C. Los cebadores forward y reverse, para cada gen fueron respectivamente:
Para el gen Bax: Secuencia forward, 5´CCCCCGAGAGGTCTTTTTCC3´; secuencia reverse: 3´CCTTGAGCACCAGTTTGCTG5 (Martínez et al. 2019; 2020).
Para el gen Bcl-2: Secuencia forward, 5´TCTCATGCCAAGGGGGAAAC3´; secuencia reverse: 3´TCCCGGTTATCGTACCCTGT5´ (Martínez et al. 2019; 2020).
Para el gen Casp-3: Secuencia forward, 5´GTGGAGGCCGACTTCTTGTA3´; secuencia reverse: 3´TTTCAGCATGGCACAAAGCG5´ (Martínez et al. 2019; 2020).

Los cambios relativos en la expresión génica se calcularon de acuerdo con Pfaffl et al. (2001); utilizando GAPDH como housekeeping, sin diferencias probadas entre grupos, y para determinar la eficiencia de los datos sin procesar se utilizó el software LinRegPCR (Ramakers et al., 2003).

3.7. ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

Se realizaron seis réplicas para cada condición experimental, y los resultados obtenidos en cada replica fueron representativos. Los datos mostrados se representan como promedios ± desviación estándar (DE). Las comparaciones estadísticas entre los grupos sometidos a flumetrín frente al vehículo (no significativo frente al control) se realizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey, utilizando GraphPad Prism 6. La diferencia estadística se aceptó cuando $P < 0.05$. La IC_{50} se calculó mediante una curva dosis-respuesta, mediante ajuste sigmoidal con el software Origin-Pro 9.0.

IV. RESULTADOS

4.1. EFECTO DE FLUMETRÍN SOBRE LA VIABILIDAD POR MTT.

Para evaluar la viabilidad hemos utilizado el ensayo de MTT, descrito anteriormente. Las absorbancias obtenidas fueron normalizadas como porcentajes del control (100%). Tras un período de 24 horas de incubación de las células SH-SY5Y expuestas a concentraciones ascendentes de flumetrín (50, 100, 200, 500 y 1000 µM), se redujo la viabilidad celular en una forma dosis-dependiente (15 %, 22 %, 41 %, 43 % y 47 %, respectivamente), en comparación con el grupo vehículo (Figura 9, 10). En la figura 9, se muestra una curva sigmoidea concentración-efecto, donde las dosis en logaritmo, predijeron que la IC_{50} para flumetrín fue de 104 µM. Además, los resultados muestran que flumetrín produjo una disminución significativa ($P < 0.05$) a la dosis de 50 µM (15 %). Así mismo, a las dosis de 100, 200, 500 y 1000 µM, la viabilidad celular se redujo significativamente ($P < 0.001$) (Figura 10).

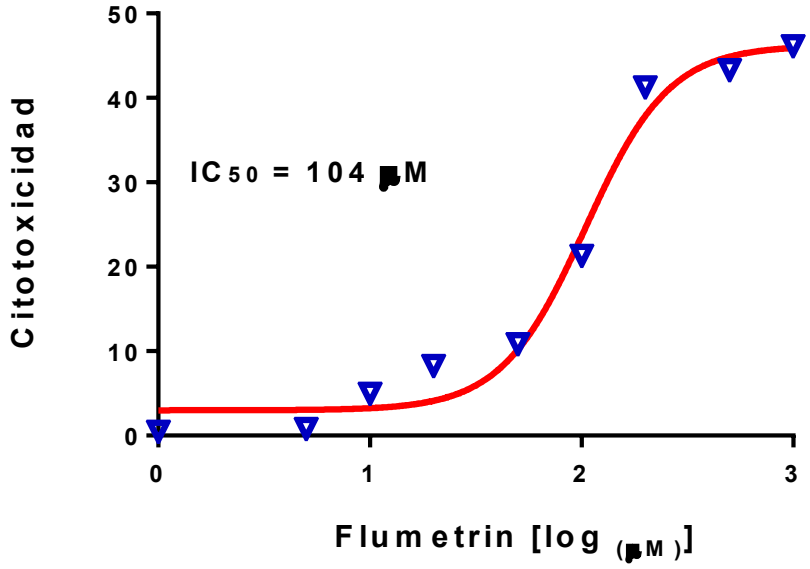


Figura 9. Curva sigmoidea concentración-efecto de flumetrín sobre células SH-SY5Y para obtener la IC_{50} por el programa Origin Pro 8.6.

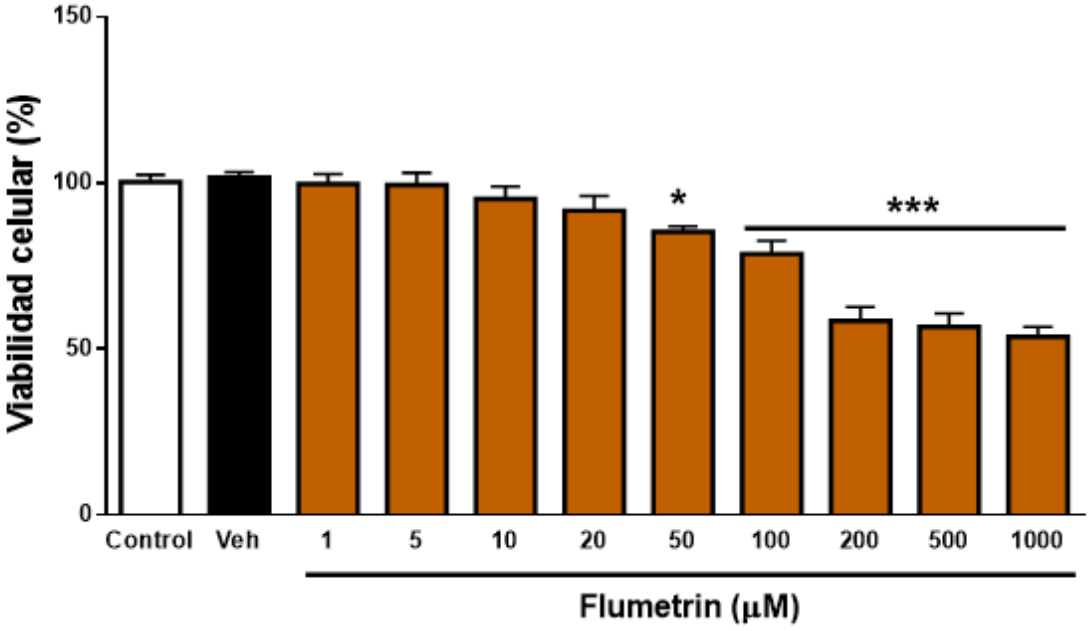


Fig 10. Citotoxicidad inducida por flumetrín sobre la viabilidad celular de las células SH- 5Y-SY después de un periodo de incubación de 24h. La viabilidad celular se midió como reducción de MTT. Los datos se normalizaron como % del vehículo (columna negra). Los datos representan la media ± DE de seis experimentos independientes por triplicado. *P < 0.05, ***P < 0.001 en comparación con el vehículo usando ANOVA-Tukey.

4.2. EFECTO DE FLUMETRÍN SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS A MUERTE EN CÉLULAS NEURONALES SH-SY5Y.

Evaluamos si flumetrín podría afectar la homeostasis muerte/sobrevivencia celular a través de la expresión de genes casp-3, Bax y Bcl-2, estrechamente implicados en la alteración de dicha homeostasis por el ensayo de RT-PCR. Flumetrín a partir de la concentración de 20 µM incrementó significativamente ($P < 0.05$) la expresión de casp-3 en 1,34 veces respecto al vehículo. Mientras que a las concentraciones de 50 y 500 µM de flumetrín, la expresión de casp-3 se incrementó significativamente ($P < 0.001$) en 2,1 y 2,7 veces más respecto al vehículo, respectivamente (Figura 11).

Por otro parte, el piretroide flumetrín a las concentraciones de 50 y 500 µM incrementaron significativamente ($P < 0.001$) la expresión de Bax en 1,8 y 2,5 veces más respecto al vehículo, respectivamente (Figura 12). La expresión de Bcl-2 no mostró cambios significativos en su expresión por efecto de este piretroide (Figura 13). También se evaluó el ratio muerte/sobrevivencia celular determinado por la relación Bax/Bcl-2, y se encontró que la susceptibilidad de sufrir muerte celular debido a la dosis tiene un correlación muy alta (r = 0.99), lo que significa que a mayor dosis de flumetrín, es mayor la posibilidad de producir citotoxicidad con muerte de células SH-SY5Y, siendo significativo a partir de una dosis de 50 µM de flumetrín (Figura 14).

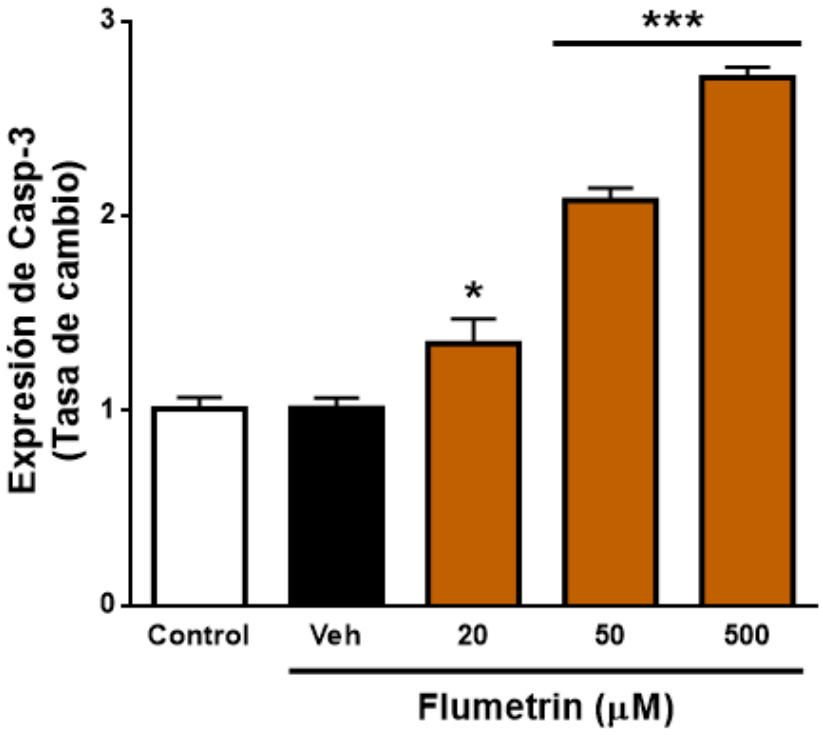


Fig 11. Citotoxicidad inducida por flumetrín sobre la expresión génica de Casp-3 en células SH-5YSY después de un periodo de incubación de 24h. Los datos se normalizaron a partir del vehículo (columna negra). Los datos representan la media ± DE de seis experimentos independientes por triplicado. *P < 0.05, ***P < 0.001 en comparación con vehículo, usando ANOVA – Tukey.

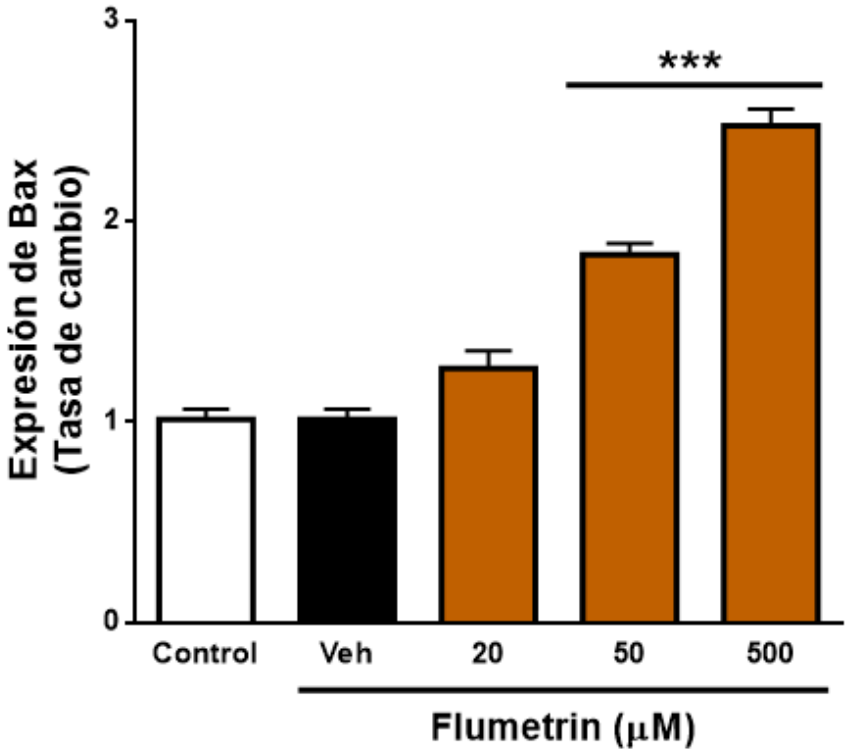


Fig 12. Citotoxicidad inducida por flumetrin sobre la expresión génica de Bax en células SH-SY5Y después de un periodo de incubación de 24h. Los datos se normalización a partir del vehículo (columna negra). Los datos representan la media ± DE de seis experimentos independientes por triplicado. ***P < 0.001 en comparación con vehículo, usando ANOVA – Tukey.

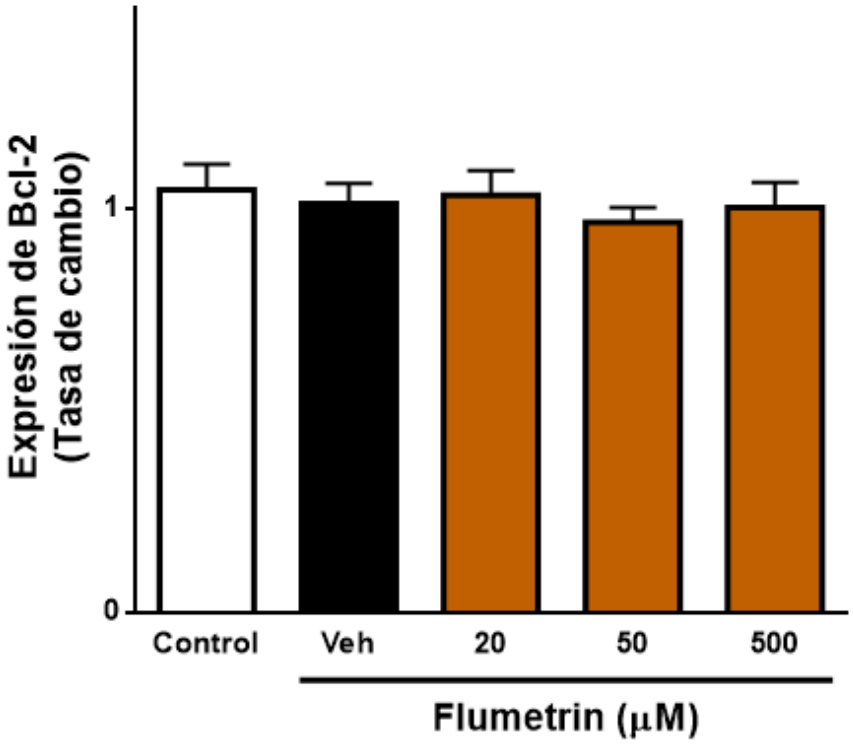


Fig 13. Citotoxicidad inducida por flumetrín sobre la expresión génica de Bcl-2 en células SH-SY5Y después de un periodo de incubación de 24h. Los datos se normalización a partir del vehículo (columna negra). Los datos representan la media ± DE de seis experimentos independientes por triplicado. Comparación con vehículo, usando ANOVA – Tukey.

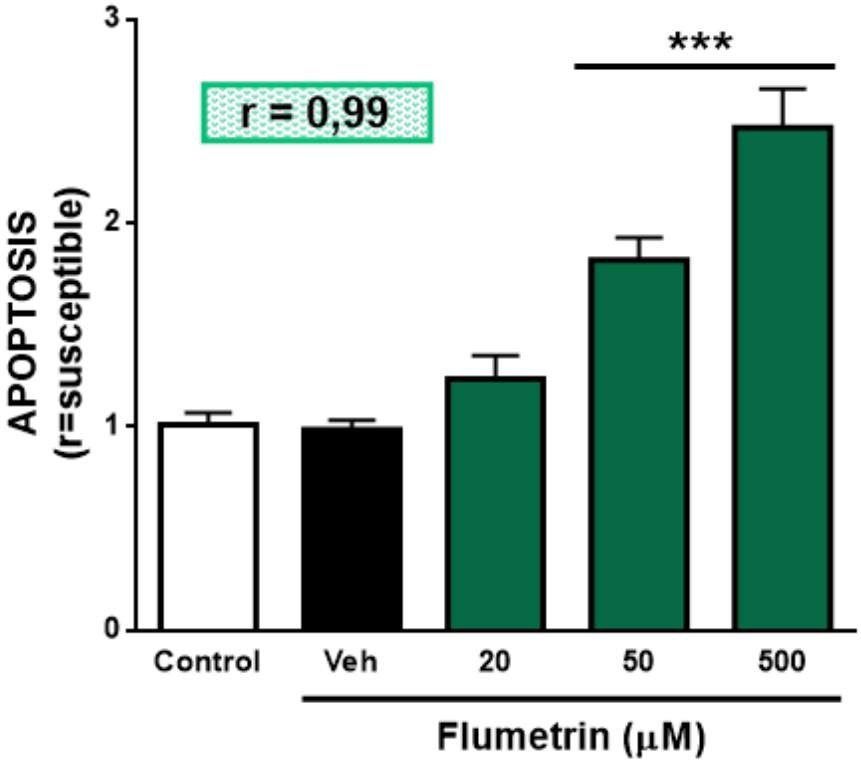


Fig 14. Citotoxicidad inducida por flumetrín sobre el ratio Bax/Bcl.2 en células SH-SY5Y. Los datos se normalización a partir del vehículo (columna negra). Los datos representan la media ± DE de seis experimentos independientes por triplicado ***P < 0.001 en comparación con vehículo, usando ANOVA – Tukey.

V. DISCUSIÓN

Flumetrín es un compuesto piretroide sintético del tipo II, actualmente es muy usado debido al efecto insecticida y acaricida en el ámbito de la medicina veterinaria y salud pública en general (Kaneko, 2010). Los escasos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* de este piretroide en específico, arrojan un efecto neurotóxico, alteración de la homeostasis celular, disfunción de los sistemas detoxificadores tanto citoplasmatícos como mitocondriales y la activación de las rutas de muerte celular en células neuronales; los mecanismos que desencadenarían de la expresión de genes proapoptóticos podrían ser los responsables de inducir efectos patológicos críticos de neurodegeneración.

Hasta la actualidad, este es el primer estudio *in vitro* acerca de los efectos del piretroide flumetrín sobre la viabilidad celular y la expresión de genes relacionados muerte celular (apoptosis) en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y. Los resultados obtenidos en este estudio *in vitro*, señalan que el piretroide flumetrín, en concentraciones inferiores a las que producen signos clínicos nerviosos por intoxicación, pueden tener efectos adversos evidentes sobre células neuronales.

El valor IC_{50} para este piretroide fue de 104 μM, fue numéricamente mayor comparado a otros piretroides como α-cipermetrín con 78,3 μM (Romero et al., 2016) y ciflutrín con 19,11 μM (Martínez et al., 2020), lo cual nos sugiere la menor toxicidad para el flumetrín en comparación a otros piretroides, observando el efecto citotóxico significativo a partir de concentraciones de 50 μM en células SH-SY5Y.

Estos valores obtenidos para el flumetrín y otros piretroides como α-cipermetrín y ciflutrín reportados por Romero et al. (2016) y Martínez et al. (2020) respectivamente; comparados a otros plaguicidas como los clorpirifos, donde la IC_{50} encontrada fue de 313 μM (Raszewski et al. 2014), indican que la magnitud de los valores concentración-efecto de citotoxicidad, son significativamente mayores en los compuestos piretroides a partir de concentraciones bajas.

Esta disminución de la viabilidad en células SH –SY5Y a partir de los de 50 µM por parte de flumetrín, comparados con los efectos significativos para ciflutrín a partir de los 5 µM reportado por Martínez et al., (2020), para α-cipermetrín a partir de los 42µM, reportados por Martínez et al., (2020) y 50 µM reportados por Raszewski et al. (2014), indican un mayor efecto citóxico para ciflutrín, comparados a α-cipermetrín y flumetrín.

Los ensayos de citotoxicidad por parte de algunos piretroides proporcionaron información sobre la magnitud del efecto de estos compuestos, considerando de menor a mayor potencia, el siguiente orden: deltametrín, cifenotrín, λ-cialotrín, ciflutrín, esfenvalerato, α-Cipermetrín (Romero et al., 2015). Estos datos reafirman que flumetrín tiene un menor efecto de toxicidad respecto a los piretroides estudiados, salvo el caso de cipermetrín donde los efectos a la misma concentración parecen ser bastante similares; es decir, flumetrín necesitaría dosis más elevadas para lograr efectos significativos en la disminución de la viabilidad celular, coherente a los valores encontrados para la $IC_{50.}$

Los efectos neurotóxicos en células SH- SY5Y del flumetrín respecto a otros plaguicidas como los clorpirifos a partir de 25 µM reportado por Raszewski et al. (2014), paraquat a partir de 0,05 mM reportado por Fujimori et al. (2011) y fipronil a partir de 25 µM reportado por Park et al. (2013), lograron una disminución significativa de la viabilidad celular tras tiempos de incubación similares. De este modo, el efecto citotóxico de paraquat parece ser ligermente menor al ejercido por flumetrín (Wang et al., 2014) y un carácter neurotóxico menor aún para el fipronil aparentemente; aunque, en concentraciones de 50 µM tanto para flumetrín y paraquat los efectos dosis-dependientes son más marcados en este último (Fujimori et al., 2011). Por otro lado, la mayor magnitud del efecto neurotóxico por fipronil se dio a concentraciones de 125 µM (Kanat y Selmanoğlu, 2019); lo cual nos haría pensar en mecanismos más signficativos para paraquat en comparación de flumetrín y fipronil sobre la vía de la disfunción mitocondrial.

Los niveles de caspasa-3 se vieron aumentados significativamente ante la exposición al flumetrín; esta tendencia también pudo encontrarse para ciflutín que a dosis de 5µM tuvo un amento de caspasa-3 de 1.56 veces (Martínez et al., 2019); para el α-cipermetrín

(Romero et al., 2016; Martínez et al., 2020) y ciflutrín (Martínez et al., 2020), los efectos parecen ser mayores a concentraciones similares respecto a flumetrín. Esto reflejaría la tendencia neurotóxica evidenciada por piretroides en la señalización apoptótica.

Como se describió anteriormente, la exposición a flumetrín a diferentes concentraciones (20, 50 y 500 µM) indujo la muerte celular apoptótica en células SH-SY5Y en dosis mayores a 20 µM, eso se evidenció mediante la regulación del incremento de niveles de concentración de caspasas efectoras, como caspasa-3 (1,3, 2,1 y 2,7 veces, respectivamente, en comparación al vehículo); todo ello, sumado a la disfunción mitocondrial ocasionada por exposición a piretroides, indicaría que flumetrín al igual que compuestos de su mismo tipo, activaron vías intrínsecas de muerte celular apoptótica (Ramírez y Salvesen, 2018). Estos resultados son similares a los reportados por Martínez et al. (2019), quienes encontraron un aumento de los niveles de caspasa-3 de hasta 7 veces respecto al vehículo en estudios con células SH SY5Y expuestas a piretroides del mismo tipo (ciflutrín frente a flumetrín).

Este efecto de aumento en los niveles de caspasas de caspasa-3 ante la exposición a flumetrín *in vitro* en células neuronales, también se observaron para paraquat (Chang et al., 2013), clorpirifos (Raszewski et al., 2014) y fipronil (Park et al., 2013), indicando en todos los casos la activación de las rutas apoptóticas de células neuronales por exposición a plaguicidas; para paraquat, estos resultados fueron observados a partir de 100 µM (Chang et al., 2013); sin embargo, la determinación sobre el efecto en el aumento de las concentraciones de caspasa-3 por parte de estos compuestos aún no está esclarecido usando métodos similares de cuantificación génica; todo esto, desmuestra el efecto de muerte celular por plaguidas (Rodríguez et al., 2016).

También se han encontrado aumento en los niveles de Bax por la exposición de flumetrín, al igual que lo reportado por Martínez et al, (2020) para el caso del ciflutrín y el α-cipermetrín en células neuronales SH-SY5Y tras 24 h de incubación. Estos resultados sobre la expresión de genes relacionados muerte celular son comparables con otros estudios que evaluaron los efectos de α-cipermetrín y ciflutrín en la expresión de una amplia variedad de moléculas pro-apoptóticas, incluidas caspasa-3 y Bax, importantes

reguladores endógenos de la actividad celular en respuesta a una amplia variedad de factores fisiológicos y daños potencialmente patológicos (Ramírez y Salvesen, 2018; Romero et al, 2016; Martínez et al. 2019; 2020).

El aumento de los niveles de Bax tras la exposición al flumetrín en celulares neuronales, también fue observado en otros plaguicidas como paraquat donde los efectos neurotóxicos también fueron reportados (Fei y Ethell., 2008). Estos resultados confirman la inducción de la expresión de genes proapoptóticos en células neuronales, tras la exposición a plaguicidas.

La exposición de células SH-SY5Y al flumetrín no generó cambios significativos en la concentración de Bcl-2 en contraste a lo encontrado en α-cipermetrín en donde estos niveles fueron aumentados (Martínez et al., 2020), esto nos sugiere un mayor efecto antiapoptótico para α-cipermetrín en exposiciones de estas células neuronales en tiempos similares.

Los resultados de los niveles de Bcl-2 ante la exposición de clorpirifos aumentaron mínimamente tras 24 h de exposición (Raszewski et al., 2014), comparado al efecto del piretroide flumetrín sobre niveles de estos genes. Los resultados parecen ser contrarios a la acción de los piretroides sobre la expresión de estos genes antiapoptóticos (Martínez et al., 2020) comparados a clorpirifos.

Las células SH-SY5Y tratadas con diferentes dosis de flumetrín expresaron aumentos en la concentración de expresión genes proapoptóticos como Bax y Casp-3 respecto al control; toda esta evidencia, confirma que estos compuestos son capaces de activar las vías de señalización de la inducción de muerte celular (apotosis) sobre las rutas asociadas a la disfunción de los sistemas mitocondriales intracitosólicos o intrínsecos (Ramírez y Salvesen, 2018).

Los datos obtenidos son indicadores de la posible neurotoxicidad que se asume el usar de forma indiscriminada y sin control los diversos plaguicidas como los compuestos

piretroides y que deben ser tomados en cuenta como factores de riesgo sobre la salud del sistema nervioso tanto humano como animal.

VI. CONCLUSIONES

- La exposición al piretroide flumetrín en células neuronales SH-SY5Y reduce la viabilidad celular debido a un efecto dosis-respuesta.

- La exposición al piretroide flumetrín en células neuronales SH-SY5Y induce el aumento de la expresión proapotótica de los genes Casp-3 y Bax respecto a Bcl-2 antiapoptótico.

- La línea celular SH-SY5Y demostró ser adecuada para evaluar los efectos de viabilidad celular y expresión de genes relacionados a muerte celular inducida por la exposición al piretroide flumetrín.

VII. RECOMENDACIONES

- Es necesario continuar con el desarrollo de más estudios que permitan entender los mecanismos de neurotoxicidad del piretroide flumetrín.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. 2002. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. Molecular cell 9(2): 423–432.
2. Adem A, Mattsson ME, Nordberg A, Påhlman S. 1987. Muscarinic receptors in human SH-SY5Y neuroblastoma cell line: Regulation by phorbol ester and retinoic acid-induced differentiation. Brain Res 430 (2): 235–242.
3. Agholme L, Lindström T, Kågedal K, Marcusson J. Hallbeck M. 2010. An *In Vitro* Model for Neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y Cells into Cells with Morphological and Biochemical Characteristics of Mature Neurons. Journal of Alzheimer's Disease 20(4): 1069–1082.
4. Aldridge WN. 1990. An assessment of the toxicological properties of pyrethroids and their neurotoxicity. Crit Rev Toxicol 21: 89–104.
5. Aldridge, WN, Clothier B, Forshaw P, Johnson MK, Parker VH, Price RJ, Skilleter DN, Verscholyle RD, Stevens C. 1978. The effect of DDT and the pyrethroids cismethrin and decamethrin on the acetylcholine and cyclic nucleotide content of rat brain. Biochemical Pharmacology, 27(12): 1703–1706.
6. Anonymous. 1965. Appraisal of the safety of chemicals in foods, drugs and cosmetics. Editorial Committee of the Association of Food and Drug Officials of the United States, Topeka, Kansas p 46.
7. Anonymous. 1972. Hazardous substances; test for eye irritation. Department of Health, Education and Welfare. Federal Register 37: 8534.
8. Anonymous. 1973. Evaluation of some pesticide residues in food WHO Pesticide Residues Ser 2- 435.
9. Anadón A, Diez MJ, Sierra M, Sanchez JA, Teran MT. 1988. Microsomal enzyme induction by permethrin in rats. Vet Hum Toxicol 30(4):309-12.
10. Anadón A, Martínez-Larrañaga MR, Diaz MJ. 2006. Toxicokinetics of lambda – cyhalothrin in rats. Toxicol App Pharmacol 132: 14-18.
11. Anadón A, Martínez-Larrañaga MR, Martínez MA. 2009. Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. Vet J 182:7–20.
12. Anadón A, Martínez M, Martínez M, Castellano V, Ares I, Romero A, Fernández R, Martínez-Larrañaga MR. 2013. Differential induction of cytochrome P450

isoforms and peroxisomal proliferation by cyfluthrin in male Wistar rats. Toxicol Lett 220: 135–142.

13. Arun P, Madhavarao CN, Moffett JR, Namboodiri AM. 2008. Antipsychotic drugs increase N-acetylaspartate and N-acetylaspartylglutamate in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. J Neurochem 106(4): 1669–1680.
14. Barlow SM, Sullivan FM, Lines J. 2010. Risk assessment of the use of deltamethrin bednets for the prevention of malaria. Food Chem Toxicol 39: 407-22.
15. Barnes J, Verschoyle R. 1974. Toxicity of new pyrethroid insecticide. Nature 248: 711.
16. Başçi Z, Eraslan G. 2014. Toxicokinetic of flumethrin in rabbits. Drug and Chemical Toxicology, 38(1): 92–97.
17. Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS. 1978. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. Cancer Res 38 (11 Pt 1): 3751–3757.
18. Bloomquist JR. 1993. Neuroreceptor mechanisms in pyrethroid mode of actionand resistance. Toxicology Communications, Raleigh, NC, Vol 2: 181-226.
19. Bloomquist JR. 1998. Chemistry and toxicology of the chlorinated cyclodienes and lindane. Reviews in Toxicology 2: 333-355.
20. Bloomquist JR, Soderlund DM. 1985. Neurotoxic insecticides inhibit GABA-dependent chloride uptake by mouse brain vesicles. Biochemical and Biophysical Research Communications 133: 37-43
21. Bloomquist JR, Adams PM, Soderlund DM. 1986. Inhibition of gamma-aminobutyric acid-stimulated chloride flux in mouse brain vesicles by polychloroalkane and pyrethroid insecticides. Neurotoxicology 7: 11–20.
22. Box SA, Lee MR. 1996. A systemic reaction following exposure to a pyrethroid insecticide. Hum. Exp. Toxicol 15: 389–390.
23. Bradberry SM, Cage SA, Proudfoot AT, Vale JA. 2005. Poisoning due to Pyrethroids. Toxicological Reviews 24 (2): 93–106.
24. Breckenridge CB, Holden L, Sturgess N, Weiner M, Sheets L, Sargent D, Ray D. 2009. Evidence for a separate mechanism of toxicity for the Type I and the Type II pyrethroid insecticides. NeuroToxicology 30: S17-S31.

25. Burr SA, Ray DE. 2004. Structure-Activity and Interaction Effects of 14 Different Pyrethroids on Voltage-Gated Chloride Ion Channels. Toxicological Sciences 77 (2): 341–346.
26. Cain K, Bratton SB, Cohen GM. 2002. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. Biochimie. 84(2): 203–14.
27. Cantalamessa F. 1993. Acute toxicity of two pyrethroids, permethrin and cypermethrin, in neonatal and adult rats. Arch. Toxicol 67: 510–513.
28. Casida JE. 1980. Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. Environ. Health Perspect 34: 189–202.
29. Casida JE, Gammon DW, Glickman AH, Lawrence LJ. 1983. Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides. Annu Rev Pharmacol Toxicol 23: 413–438.
30. Casida JE, Ruzo LO. 1980. Metabolic chemistry of pyrethroid insecticides. Pestic Sci 11: 257–269.
31. Catterall WA. 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. Neuron 26: 13–25.
32. Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. 2003. International Union of Pharmacology. XXXIX. Compendium of voltage-gated ion channels: sodium channels. Pharmacol Rev 55: 575–578.
33. Chang X, Lu W, Dou T, Wang X, Lou D, Sun X, Zhou Z. 2013. Paraquat inhibits cell viability via enhanced oxidative stress and apoptosis in human neural progenitor cells. Chem. Biol. Interact. 206: 248-255.
34. Chen YL, Casida JE, 1969. Photodecomposition of pyrethrin I, allethrin, phthalthrin, and dimethrin. Modifications in the acid moiety. J Agric Food Chem. 17: 208-215.
35. Cheung YT, Lau WK, Yu MS, Lai CS, Yeung SC, So KF, Chang RC. 2009. Effects of alltrans- retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as *in vitro* model in neurotoxicity research. Neurotoxicology 30 (1): 127–135.
36. Chinn K, Narahashi T. 1986. Stabilization of sodium channel states by deltamethrin in mouse neuroblastoma cells. J Physiol 380: 191–207.
37. Christensen, J, Steain M, Slobedman, B, Abendroth A. 2011. Differentiated Neuroblastoma Cells Provide a Highly Efficient Model for Studies of Productive Varicella-Zoster Virus Infection of Neuronal Cells. Journal of Virology 85 (16), 8436-8442.

38. Clark JM 1995. Effects and Mechanisms of Action of Pyrethrin and Pyrethroid Insecticides. Neurological disease and therapy 36.
39. Clark JM, Brooks MW. 1989. Neurotoxicology of pyrethroids: single or multiple mechanisms of action?. J Environ Toxicol Chem. 8: 361–372.
40. Clark JM, Brooks MW. 1989. Role of ion channels and intraterminal calcium homeostasis in the action of deltamethrin at presynaptic nerve terminals. Biochemical Pharmacology 38 (14): 2233–2245.
41. Cordey, S., Petty, T. J., Schibler, M., Martinez, Y., Gerlach, D., van Belle, S., Turin L, Zdobnov E, Kiaser L, Tapparel, C. 2012. Identification of Site-Specific Adaptations Conferring Increased Neural Cell Tropism during Human Enterovirus 71 Infection. PLoS Pathogens, 8 (7): e1002826.
42. Costa LG. 2015. The neurotoxicity of organochlorine and pyrethroid pesticides. Occupational Neurology, 135–148.
43. Crawford MJ, Croucher A, Hutson DH. 1981. The metabolism of the pyrethroid insecticide cypermethrin in rats: excreted metabolites. Pestic Sci 12: 399–411
44. Cremer JE, Cunningham VJ, Ray DE, Sarna GS. 1980. Regional changes in brain glucose utilization in rats given a pyrethroid insecticide. Brain Res. 194: 278–282.
45. Cremer JE, Cunningham VJ, Seville, MP. 1983. Relationships between Extraction and Metabolism of Glucose, Blood Flow, and Tissue Blood Volume in Regions of Rat Brain. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 3 (3): 291–302.
46. Crombie L, Harper SH. 1954. The chrysanthemum carboxylic acids. Part VI. The configuration of the chrysanthemic acids. J. Chem. Soc. 470 – 475.
47. Crofton KM, Reiter LW. 1984. Effects of two pyrethroid insecticides on motor activity and acoustic startle response in the rat. Toxicol Appl Pharmacol. 75: 318–328.
48. Crow JA, Borazjani A, Potter PM, Ross MK. 2007. Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. Toxicol Appl Pharmacol 221: 1–12.
49. Cuende J, Moreno S, Bolanos JP, Almeida A. 2008. Retinoic acid downregulates Rae1 leading to APC (Cdh1) activation and neuroblastoma SH-SY5Y differentiation. Oncogene 27(23): 3339–3344.
50. D'Arcy MS. 2019. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. Cell Biol Int. 43(6): 582-592.

51. Denizot F, Lang R. 1896. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J. Immunol. Methods. 89: 271–277.
52. Doherty JD; Lauter CJ; Salem NJr. 1986. Synaptic effects of the synthetic pyrethroid resmethrin in rat brain *in vitro*. Comp Biochem Physiol C 84: 373- 379.
53. Doherty JD, Morii N, Hiromori T, Ohnishi JI. 1988. Pyrethroids and the striatal dopaminergic system in vivo. Comp Biochem Physiol 91C: 371–375.
54. Dong K. 2010. Progress in insect sodium channel research. En: Insect Pharmacology, Channels, Receptors, Toxins and Enzymes. New York Academic Press pp. 25–27.
55. Elliott M. 1976. Properties and applications of pyrethroids. Environmental Health Perspectives, 14: 1–2.
56. Elliott M, Janes NF. 1973. Pyrethrum: The Natural Insecticides. En: Academic Press New York.
57. Elliott M, Farnham AW, Janes NF, Soderlund DM. 1978. Insecticidal activity of the pyrethrins and related compounds Part XI. Relative potencies of isomeric cyano-substituted 3-phenoxybenzyl esters. Pesticide Science 9: 112–116.
58. Elliott M, Janes NF, Khambay BP S, Pulman DA. 1983. Insecticidal activity of the pyrethrins and related-compounds 13 comparison of the effects of alpha-substituents in different esters. Pesticide Science 14(2): 182-190.
59. EMEA, 1998. Committee for Veterinary Medicinal Products. Flumethrin. Summary Report (1). EMEA/MRL/469/98-Final.
60. Ekert PG, Vaux DL. 2005. The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders? Current opinion in cell biology 17(6): 626–630.
61. Enan E, Matsumura, F. 1993. Activation of phosphoinositide/protein kinase C pathway in rat brain tissue by pyrethroids. Biochemical Pharmacology, 45 (3): 703–710.
62. Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Cena 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 neuronlike cells. J Neurochem 75(3): 991–1003.
63. Elmore S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicologic Pathology, 35:495–516

64. European Chemicals Agency. 2016. Regulation (EU) No 528/2012: Concerning the making available on the market and use of biocidal products. Evaluation of active substances. Assessment Report: Cyfluthrin.
65. Fei Q; Ethell, DW 2008. Maneb potentiates paraquat neurotoxicity by inducing key Bcl-2 family members. J. Neurochem. 105: 2091-2097.
66. Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO). 1996. Flumethrin. In "Pesticide Residues in Food: 1996 Toxicology Evaluations". FAO Plant Production and Protection Paper. FAO, Geneva.
67. Forshaw PJ, Lister T, Ray DE. 1987. The effects of two types of pyrethroid on rat skeletal muscle. European Journal of Pharmacology, 134(1): 89–96.
68. Forshaw PJ, Ray DE. 1990. A novel action of deltamethrin on membrane resistance in mammalian skeletal muscle and nonmyelinated nerve fibers. Neuropharmacology 29: 75–81.
69. Forshaw PJ, Lister T, Ray DE. 1993. Inhibition of a neuronal voltage-dependent chloride channel by the type II pyrethroid, deltamethrin. Neuropharmacology, 32(2): 105–111.
70. Forshaw PJ, Ray DE. 1994. A voltage-dependent chloride channel in niel 15 neuroblastoma cells is inactivated by protein kinase C and also by the pyrethroid deltamethrin. J Physiol 467: 252. 21.
71. Forshaw PJ, Lister T, Ray DE. 2000. The Role of Voltage-Gated Chloride Channels in Type II Pyrethroid Insecticide Poisoning. Toxicology and Applied Pharmacology, 163(1): 1–8.
72. Fourie LJ, Stanneck D, Horak IG. 2003. The efficacy of collars impregnated with flumethrin and propoxur against experimental infestations of adult Rhipicephalus sanguineus on dogs. JS Af Vet Assoc 74: 123–126.
73. Fourie JJ, Stanneck D, Jongejan F. 2013. Prevention of transmission of Babesia canis by Dermacentor reticulatus ticks to dogs treated with an imidacloprid/flumethrin collar. Vet Parasitol 192: 273–278.
74. Franciolini F, Petris A. 1990. Chloride channels of biological membranes. Biochimica et Biophysica Acta 1031: 247–259.
75. Flannigan SA, Tucker SB. 1985. Variation in cutaneous sensation between synthetic pyrethroid insecticides. Contact Derm. 13: 140–147.
76. Frey U, Huang YY, Kandel ER. 1993. Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. Science 260 (5114): 1661–1664.

77. Fujitani I. 1909. Beiträge zur Chemie und Pharmakologie des Insektenpulvers. Arch. Exptl. Pathol. Pharmakol. 61: 47–75.
78. Fujimori K, Fukuhara A, Inui T, Allhorn M. 2011. Prevention of paraquat-induced apoptosis in human neuronal SH-SY5Y cells by lipocalin-type prostaglandin D synthase. Journal of Neurochemistry, 120(2): 279–291.
79. Fujimoto K, Itaya N, Okuno Y, Kadota T, Yamaguchi T. 1973. A new insecticidal pyrethroid ester. Agric. Biol. Chem. 37, 2681–2682.
80. Fujimoto T, Okuno Y, Matsuo H, Itaya N, Mizutani T, Kitamura S. 1974. (Sumitomo Chemical Co., Ltd.): Jpn. Tokkyo Kokoku Koho JP 49027331.
81. Gammon DW, Brown MA, Cadida JE. 1981. Two classes of pyrethroid action in the cockroach. Pesticide Biochemistry and Physiology, 15: 181-191.
82. Gammon DW, Lawrence LJ, Casida JE. 1982. Pyrethroid toxicology: Protective effects of diazepam and phenobarbital in the mouse and cockroach. Toxicol. Appl. Pharmacol. 66: 290–296
83. Ghiasuddin SM, Soderlund DM. 1985. Pyrethroid insecticides: potent, stereospecific enhancers of mouse brain sodium channel activation. Pestic. Biochem Physiol 24: 200–206.
84. Gimenez-Cassina A, Lim F, Diaz-Nido J. 2006. Differentiation of a human neuroblastoma into neuron-like cells increases their susceptibility to transduction by herpesviral vectors. Journal of Neuroscience Research 84(4): 755-767.
85. Godin PJ, Sleeman RJ, Snarey M, Thain EM. 1966. The jasmolins, new insecticidally active constituents of Chrysanthemum cinerariaefolium VIS. Journal of the Chemical Society C: Organic 332.
86. Godin SJ, Scollon EJ, Hughes MF, Potter PM, DeVito MJ, Ross MK. 2006. Species differences in the *in vitro* metabolism of deltamethrin and esfenvalerate: differential oxidative and hydrolytic metabolism by humans and rats. Drug Metab Dispos 34: 1764–1771.
87. Godin SJ, Crow JA, Scollon EJ, Hughes MF, DeVito MJ, Ross MK. 2007. Identification of Rat and Human Cytochrome P450 Isoforms and a Rat Serum Esterase That Metabolize the Pyrethroid Insecticides Deltamethrin and Esfenvalerate. Drug Metabolism and Disposition, 35(9): 1664–1671.
88. Goldin AL, Barchi RL, Caldwell, JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen, RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB. 2000. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. Neuron 28: 365–368.

89. Goldin AL. 2001. Resurgence of sodium channel research. Annu Rev Physiol 63: 871–894.
90. Goldin AL. 2003. Mechanisms of sodium channel inactivation. Curr. Opin. Neurobiol, 13: 284–290.
91. Gotoh Y, Kawakami M, Matsumoto, N, Okada, Y. 1998. Permethrin Emulsion Ingestion. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 36 (1-2): 57–61.
92. Gould J, Reeve HL, Vaughan PF, Peers C. 1992. Nicotinic acetylcholine receptors in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. Neurosci Lett 145 (2): 201–204.
93. Guarnieri S, Pilla R, Morabito C, Sacchetti S, Mancinelli R, Fano G, Mariggio MA. 2009. Extracellular guanosine and GTP promote expression of differentiation markers and induce S-phase cell-cycle arrest in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. Int J Dev Neurosci 27 (2):135–147.
94. He F, Wang S, Liu L, Chen S, Zhang Z, Sun J. 1989. Clinical manifestations and diagnosis of acute pyrethroid poisoning. Arch Toxicol 63(1): 54-8.
95. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. 1995. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. Cell 81, 495–504.
96. Huckle KR, Hutson DH, Millburn P. 1981. Species differences in the metabolism of 3-phenoxybenzoic acid. Drug Metab Dispos 9: 352–359
97. Hudson PM, Tilson HA, Chen PH, Hong JS. 1986. Neurobehavioral effects of permethrin are associated with alterations in regional levels of biogenic amine metabolites and amino acid neurotransmitters. NeuroToxicology 7: 143–154.
98. Husain R, Husain R, Vaqar M. 1996. Behavioral, neurochemical, and neuromorphological effects of deltamethrin in adult rats. J. ToxicoL Environ Health 48: 515–526.
99. Inouye Y, Takeshita Y, Ohno M. 1955. Studies on synthetic pyrethroids. Part V. Synthesis of geometrical isomers of chrysanthemum dicarboxylic acid. Botyu-Kagaku 20, 102–107.
100. Itano Y, Ito A, Uehara T, Nomura Y. 1996. Regulation of Bcl-2 protein expression in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: positive and negative effects of protein kinases C and A, respectively. J Neurochem 67 (1): 131–137.
101. Izumi T, Kaneko H, Matsuo M, Miyamoto J. 1984. Comparative metabolism of the six stereoisomers of phenothrin in rats and mice. J Pestic Sci 9:259–267.

102. Jeanmart, S. 2003. Trends in chrysanthemic acid chemistry: A survey of recent Pyrethrum syntheses. Aust J Chem. 56: 559–566.

103. Joy RM, Lister T, Ray DE, Seville MP. 1990. Characteristics of the prolonged inhibition produced by a range of pyrethroids in the rat hippocampus. Toxicol Appl Pharmacol 103: 528 –538.

104. Joy RM. 1994. Pyrethrins and pyrethroid insecticides. Ecobichon DJ, Joy RM, editors. Pesticides and Neurological Diseases. Fla USA. 291–312.

105. Kara-Ertekin S, Yazar S, Erkan M. 2021. In vitro toxicological assessment of flumethrin's effects on MCF-7 breast cancer cells. Human & Experimental Toxicology, 40(12):2165-2177

106. Kanat ÖN, Selmanoğlu G. 2019. Neurotoxic Effect of Fipronil in Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Line. Neurotoxicity Research, 37(1): 30–40.

107. Kaneko H, Izumi T, Ueda Y, Matsuo M, Miyamoto J. 1984. Metabolism and placental transfer of stereoisomers of tetramethrin isomers in pregnant rats. J Pestic Sci 9: 249–258.

108. Kaneko H. 2010. Pyrethroid Chemistry and Metabolism. Archives of Toxicology 45: 325-329

109. Kaneko H. 2011. Pyrethroids: Mammalian Metabolism and Toxicity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59(7): 2786–2791.

110. Katsuda, Y., Chikamoto, T., & Inouye, Y. (1958). The Absolute Configuration of Naturally Derived Pyrethrolone and Cinerolone. Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan 22(6): 427–428.

111. Kerr, J. F. (2002). History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. Toxicology 181–182, 471–4

112. Kovalevich J, Langford D. 2013. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. Methods in Molecular Biology 1078: 9-21.

113. Kume T, Kawato Y, Osakada F, Izumi Y, Katsuki H, Nakagawa T, Kaneko S, Niidome T, TakadaTakatori Y, Akaike A. 2008. Dibutyryl cyclic AMP induces differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells into a noradrenergic phenotype. Neurosci Lett 443 (3): 199–203.

114. LaForge FB, Barthel WF. 1945. Constituents of Pyrethrum Flowers. XIX. The Structure of Cinerolone, J. Org. Chem 10: 222–227.

115. La Monica N, Racaniello VR. 1989. Differences in replication of attenuated and neurovirulent polioviruses in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. Journal of Virology. 63 (5): 2357-2360.

116. Lappin MR, Davis WL, Hawley JR, Brewer M, Morris A, Stanneck D. 2013. A flea and tick collar containing 10% imidacloprid and 4.5% flumethrin prevents flea transmission of Bartonella henselae in cats. Parasit Vectors 6: 26.

117. Laskowski DA. 2002. Physical and Chemical Properties of Pyrethroids. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 49–170.

118. Lawrence LJ, Casida JE. 1982. Pyrethroid toxicology: mouse intracerebral structure-toxicity relationships. Pesticide Biochemistry and Physiology, 18, 9-14.

119. Lee JE, Kang JS, Ki YW, Lee SH, Lee SJ, Lee KS, Koh HC. 2011. Akt/GSK3β signaling is involved in fipronil-induced apoptotic cell death of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Toxicol Lett. 202(2):133-41.

120. Lee JE, Park JH, Jang SJ, Koh HC. 2014. Rosiglitazone inhibits chlorpyrifos-induced apoptosis via modulation of the oxidative stress and inflammatory response in SH-SY5Y cells. Toxicol Appl Pharmacol. 278(2):159-71.

121. Lee JE, Lim MS, Park JH., Park CH, Koh, HC. 2014. Nuclear NF-kappaB contributes to chlorpyrifos-induced apoptosis through p53 signaling in human neural precursor cells. Neurotoxicology. 42: 58-70.

122. Leli U, Shea TB, Cataldo A, Hauser G, Grynspan F, Beermann ML, Liepkalns VA, Nixon RA, Parker PJ. 1993. Differential expression and subcellular localization of protein kinase C alpha, beta, gamma, delta, and epsilon isoforms in SH-SY5Y neuroblastoma cells: modifi cations during differentiation. J Neurochem 60 (1): 289–298.

123. Leng G, K€uhn KH, Idel H. 1997. Biological monitoring of pyrethroids in blood and pyrethroid metabolites in urine: application and limitation. Sci Total Environ 199: 173–181 39.

124. Leng G, Leng A, K€uhn KH, Lewalter J, Pauluhn J. 1997. Human dose-excretion studies with the pyrethroids insecticide cyfluthrin: urinary metabolite profile following inhalation. Xenobiotica 27: 1273–1283.

125. Leng G, K€uhn KH, Wieseler B, Idel H. 1999. Metabolism of (S)-bioallethrin and related compounds in humans. Toxicol Lett 107: 109–12.

126. 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.

127. Li B, Sedlacek M, Manoharan I, Boopathy R, Duysen EG, Masson P, Lockridge O. 2005. Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but no carboxylesterase, are present in human plasma. Biochem Pharmacol 70: 1673–1684.

128. Lin S, Lin Y, Neryd JR, Urichd MA, Breschie A, Davisg CA, Dobing A, Zaleskig C, Beerh MA, Chapmanc WC, Gingerasg TR, Eckerd JR, Snydera MP. 2014. Comparison of the transcriptional landscapes between human and mouse tissues. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 111 (48): 17224-17229.

129. Lock EA, Berry PN. 1981. Biochemical changes in the rat cerebellum following cypermethrin administration. Toxicol Appl Pharmacol 59: 508–514.

130. Lodesani M. 2004. Control strategies against Varroa mites. Parassitologia 46: 277–279.

131. Lopez-Carballo G, Moreno L, Masia S, Perez P, Barettino D. 2002. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. J Biol Chem 277 (28): 25297– 25304.

132. Lopes FM, Schroder R, da Frota ML Jr, Zanotto-Filho A, Muller CB, Pires AS, Meurer RT, Colpo GD, Gelain DP, Kapczinski F, Moreira JC, Fernandes Mda C, Klamt F. 2010. Comparison between proliferative and neuronlike SH-SY5Y cells as an *in vitro* model for Parkinson disease studies. Brain Res 1337: 85–94.

133. Lotan R. 1996. Retinoids in cancer chemoprevention. FASEB J 10 (9): 1031–1039.

134. Lukas RJ, Norman SA, Lucero L. 1993. Characterization of nicotinic acetylcholine receptors expressed by cells of the SH-SY5Y human neuroblastoma clonal line. Mol Cell Neurosci 4 (1): 1–12.

135. Lund AE, Narashashi T. 1982. Dose-dependent interaction of the pyrethroid isomers with sodium channels of squid axon membranes. Neurotoxicology 3: 11–24.

136. Lund AE, Narahashi T. 1983. Kinetics of sodium channel modification as the basis for the variation in the nerve membrane effects of pyrethroids and DDT analogs. Pesticide Biochemistry and Physiology 20(2): 203–216.

137. Luo MH, Fortunato EA. 2007. Long-term infection and shedding of human cytomegalovirus in T98G glioblastoma cells. Journal of Virology 81(19): 10424-10436.

138. 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. Environ. Res.177: 108579.

139. Martínez MA, Lopez-Torres B, Rodríguez JL, Martínez M, Maximiliano, JE, Martínez-Larrañaga, MR, Ares, I. 2020. Toxicologic evidence of developmental neurotoxicity of Type II pyrethroids cyfluthrin and alpha-cypermethrin in SH-SY5Y cells. Food and Chemical Toxicology 137: 111173.

140. Marsden VS, Strasser A. 2003. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. Annu Rev Immunol 21: 71-105.

141. Matsuo N. 2019. Discovery and development of pyrethroid insecticides. Proceedings of the Japan Academy Series B 95(7): 378–400.

142. Maund SJ, Campbell PJ, Giddings JM, Hamer MJ, Henry K, Pilling ED, Warinton JS, Wheeler JR. 2012. Ecotoxicology of synthetic pyrethroids. En: Pyrethroids SpringerVerlag, Berlin, Heidelberg, pp 137–166.

143. Mehlhorn H, Schumacher B, Jatzlau A, Abdel-Ghaffar F, Al-Rasheid KAS, Bhushan C. 2011. The effects of flumethrin (Bayticol® pour-on) on European ticks exposed to treated hairs of cattle and sheep. Parasitol Res 110: 2181–2186.

144. Melino G, Thiele CJ, Knight RA, Piacentini M. 1997. Retinoids and the control of growth/ death decisions in human neuroblastoma cell lines. J Neurooncol 31 (1–2): 65–83.

145. Mikata K, Isobe N, Kaneko H. 2012. Biotransformation and enzymatic reactions of synthetic pyrethroids in mammals. En: Pyrethroids Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg pp 113–136.

146. Miyamoto J. 1976. Degradation, metabolism and toxicity of synthetic pyrethroids. Environmental Health Perspectives 14: 15–28.

147. Miyamoto J, Kaneko H, Takamatsu Y. 1986. Stereoselective formation of a cholesterol ester conjugate from fenvalerate by mouse microsomal carboxyesterase(s). J. Biochem Toxicol 1: 79–94.

148. Mohammadi H, Ghassemi-Barghi N, Malakshah O, Ashari S. 2019. Pyrethroid exposure and neurotoxicity: a mechanistic approach. Arh Hig Rada Toksikol 70(2):74-89.

149. Murphy NP, Ball SG, Vaughan PF. 1991. Potassium- and carbachol-evoked release of [3H] noradrenaline from human neuroblastoma cells, SH-SY5Y. J Neurochem 56 (5): 1810–1815.

150. Narahashi T. 1986. Toxins That Modulate the Sodium Channel Gating Mechanism. Annals of the New York Academy of Sciences 479 (1 Tetrodotoxin): 133–151.

151. Narahashi T. 1987. Nerve membrane ionic channels as the primary target of pyrethroids. Environmental Health Perspectives 71: 25–29.

152. Narahashi T. 1996. Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. Pharmacology & Toxicology 79: 1-14.

153. Narahashi T, Ginsburg KS, Nagata K, Song JH, Tatebayashi H. 1998. Ion channels as targets for insecticides. Neurotoxicology 19: 581-590.

154. Ohno N, Fujimoto K, Okuno Y, Mizutani T, Hirano M, Itaya N. 1974. A new class of pyrethroid insecticides; α-Substituted phenylacetic esters. Agric. Biol. Chem. 38, 881–883.

155. Ohno N, Fujimoto K, Okuno Y, Mizutani M, Hirano Y, Itaya N, Honda T, Yoshioka H. 1976. 2-Arylalkanoates, a New Group of Synthetic Pyrethroid Esters not Containing Cyclopropanecarboxylates. Pestic. Sci. 7: 241–246.

156. 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.

157. Park JH, Lee JE, Lee SJ, Park SJ, Park KH, Jeong M, Koh HC. (2013). Potential autophagy enhancers protect against fipronil-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. Toxicology Letters 223(1): 25–34.

158. Påhlman S, Odelstad L, Larsson E, Grotte G, Nilsson K. 1981. Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. Int J Cancer 28 (5): 583–589.

159. Påhlman S, Ruusala AI, Abrahamsson L, Mattsson ME, Esscher T. 1984. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbolester-induced differentiation. Cell Differentiation 14(2): 135–144.

160. Påhlman S, Hoehner JC, Nånberg E, Hedborg F, Fagerström S, Gestblom C, Söderholm, H. 1995. Differentiation and survival influences of growth factors in human neuroblastoma. European Journal of Cancer, 31(4): 453–458.

161. Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR, Nucleic Acids Res. 029(9): e45.

162. Poulos L, Athanaselis S, Coutselinis A. 1982. Acute intoxication with cypermethrin (NRDC 149). J Toxicol Clin Toxicol 19: 519–520.

163. Presgraves SP, Ahmed T, Borwege S, Joyce JN. 2004. Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. Neurotox Res 5 (8): 579–598.

164. Ramírez ML, Salvesen GS. 2018. A primer on caspase mechanisms. Seminars in Cell & Developmental Biology Vol 82: 79-85

165. Raszewski G, Lemieszek MK, Łukawski K, Juszczak M, Rzeski W.2014. Chlorpyrifos and Cypermethrin Induce Apoptosis in Human Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 116(2): 158–167.

166. Ray DE, Ray D, Forshaw PJ. 2000. Pyrethroid Insecticides: Poisoning Syndromes, Synergies, and Therapy. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 38(2): 95–101.

167. Ray DE. 2001. Pyrethroid insecticides: Mechanisms of toxicity, systemic poisoning syndromes, parasthesia, and therapy. En: Handbook of Pesticide Toxicology. Londres: Academic Press. pp 1289 –1303.

168. Ramakers C, Ruijtera MJ, Depreza RHL, Moorman AFM. 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neuroscience Letters 339:62–66.

169. Rodríguez JL, Ares I, Castellano V, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, Anadón A, Martínez MA. 2016. Effects of exposure to pyrethroid cyfluthrin on serotonin and dopamine levels in brain regions of male rats. Environ Res 146: 388-394.

170. Rodríguez JL, Ares I, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, Anadón A, Martínez MA. 2018. Bioavailability and nervous tissue distribution of pyrethroid issecticide cyfluthrin in rats. Food and Chemical Toxicology 118: 220-226.

171. Rhodes C, Jones BK, Croucher A, Hutson DH, Logan CJ, Hopkins R, Hall BE, Vickers JA. 1984. The bioaccumulation and biotransformation of cis, trans-cypermethrin in the rat. Pest. Sci. 25: 471-480.

172. Romero A, Ares I, Ramos E, Castellano V, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, Martínez MA. 2015. Evidence for dose-additive effects of a type II pyrethroid mixture. *In vitro* assessment. Res ambiental, 138: 58–66.

173. Romero A, Ramos E, Ares I, Castellano V, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, Anadón A, Martínez MA. 2016. Oxidative stress and gene expression profiling of cell death pathways in alpha-cypermethrin-treated SH-SY5Y cells. Arch Toxicol 91 (5): 2151-2164

174. Ross MK, Crow JA. 2007. Human carboxylesterases and their role in xenobiotic and endobiotic metabolism. J Biochem Mol Toxicol 21: 187–1967.

175. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. Oncogene 23, 2861–74.

176. Sanchez S, Jimenez C, Carrera AC, Diaz-Nido J, Avila J, Wandosell F. 2004. A cAMP activated pathway, including PKA and PI3K, regulates neuronal differentiation. Neurochem Int 44 (4): 231–242.

177. Satoh T, Hosokawa M. 2006. Structure, function and regulation of carboxylesterases. Chem Biol Interact 162: 195–211.

178. Schechter MS, Green N, Laforge FB. 1949. Constituents of pyrethrum flowers. XXIII. Cinerolone and the synthesis of related cyclopentenolones. J. Am Chem Soc 71: 3165-3173.

179. Scollon EJ, Starr JM, Godin SJ, DeVito MJ, Hughers MF. 2009. *In vitro* metabolism of pyrethroid pesticides by rats and human hepatic microsomes and cytochrome p450 isoforms. Drug Metab Dispos 37: 221–228.

180. Scott IG, Akerman KE, Heikkila JE, Kaila K, Andersson LC. 1986. Development of a neural phenotype in differentiating ganglion cell- derived human neuroblastoma cells. J Cell Physiol 128 (2): 285–292.

181. 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.

182. Shafer TJ, Meyer DA, Crofton KM. 2005. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. Environ Health Perspect 113: 123–136.

183. Sheets LP. 1994. Age-dependent differences in the susceptibility of rats to deltamethrin. Toxicol. Appl. Pharmacol. 126: 186–190

184. Shipley MM, Mangold CA, Szpara, ML. 2016. Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. Journal of Visualized Experiments 108.

185. Singh P, Lata P, Patel S, Pandey AK, Jain SK, Shanker R, Dhawan A .2011. Expression profiling of toxicity pathway genes by real-time PCR array in cypermethrin-exposed mouse brain. Toxicol Mech Method 21: 193–199.

186. Song JH, Nagata K, Tatebayashi H, Narahashi T. 1996. Interactions of tetramethrin, fenvalerate and DDT at the sodium channel in rat dorsal root ganglion neurons. Brain Res 708: 29–37.

187. Soderlund DM, Casida JE, 1977. Effects of pyrethroid structure on rates of hydrolysis and oxidation by mouse liver microsomal enzymes. Pesticide Biochemistry and Physiology 7: 391–401.

188. Soderlund DM, Bloomquist JR. 1989. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. Annu Rev Entomol 34: 77–96.

189. 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: 3–59.

190. Soderlund DM. 2010. Toxicology and Mode of Action of Pyrethroid Insecticides. Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology 1665–1686.

191. Soderlund DM. 2012. Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. Arch Toxicol 6:165–181.

192. Staudinger H, Ruzicka L. 1924. Insektentötende Stoffe, Part 1–5. Helv. Chim. Acta 7: 177– 259.

193. Stein EA, Washburn M, Walczak C, Bloom AS. 1987. Effects of pyrethroid insecticides on operant responding maintained by food. Neurotoxicology and Teratology 9(1): 27–31.

194. Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A. 2018. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. Acta Histochemica 120(3): 159–167

195. Strasser A. 2005. The role of BH3-only proteins in the immune system. Nat Rev Immunol 5: 189-200.

196. Sule RO, Condon L, Gomes AV. 2022. A Common Feature of Pesticides: Oxidative Stress-The Role of Oxidative Stress in Pesticide-Induced Toxicity. Oxid Med Cell Longev 2022: 5563759.

197. Sun Z, Yang H, Shi Y, Wei M, Xian J, Hu W. 2020. Establishment of a cell model system of herpes simplex virus type II latent infection and reactivation in SH-SY5Y cells. Wei Sheng Wu Xue Bao = Acta Microbiologica Sinica 50(1): 98-106.

198. Takaku T, Mikata K, Matsui M, Nishioka K, Isobe N, Kaneko H. 2011. *In vitro* metabolism of trans-permethrin and its major metabolites PBalc and PBacid, in humans. J Agric Food Chem 59: 5001–5005

199. Tan J, Soderlund DM. 2009a. Actions of S-bioallethrin, tefluthrin and deltamethrin on rat Nav1.6 sodium channels expressed in Xenopus oocytes. Toxicol. Appl. Pharmacol. (en preparación).

200. Tan, J, Soderlund, DM. 2009b. Human and rat Nav1.3 voltagegated sodium channels differ in inactivation properties and sensitivity to the pyrethroid insecticide tefluthrin. Neurotoxicology 30: 81–89.

201. Toshio N. 1992. Nerve membrane Na+ channels as target of insecticides. Trends Pharmacol 13(6): 236-41.

202. Ujihara K. 2019. The history of extensive structural modifications of pyrethroids. Journal of Pesticide Science 44(4): 215–224.

203. Verschoyle R, Aldridge W.1980. Structure-activity relationships of some pyrethroids in rats. Arch Toxicol 45: 325–329.

204. Vijverberg HPM, van der Zalm JM, van den Bercken J. 1982. Similar mode of action of pyrethroids and DDT on sodium channel gating in myelinated nerves. Nature 295: 601–603.

205. Vijverberg HP, Vanden Bercken J. 1990. Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. Crit Rev Toxicol 21: 105–126.

206. Vollrath R, Nuerrenbach A, Adolphi H. 1972. Badische Anilin- & Soda-Fabrik A.-G.): U. S. Pat. US 3673215.

207. Wan F, Yu T, Hu J, Yin S, Li Y, Kou L, Chi X, Wu J, Sun Y, Zhou Q, Zou W, Zhang Z, Wang T. 2022. The pyrethroids metabolite 3-phenoxybenzoic acid induces dopaminergic degeneration. Sci Total Environ 838(2): 156027.

208. Wang F, Franco R, Skotak M, Hu G, Chandra N. 2014. Mechanical stretch exacerbates the cell death in SH-SY5Y cells exposed to paraquat: mitochondrial dysfunction and oxidative stress. NeuroToxicology 41: 54–63.

209. Wolansky MJ, Gennings C, Crofton KM. 2005. Relative potencies for acute effects of pyrethroids on motor function in rats. Toxicol.Sci 89: 271–277.

210. Wolansky MJ, Harrill JA. 2008. Neurobehavioral toxicology of pyrethroid insecticides in adult animals: a critical review. Neurotoxicol Teratol 30: 55–78.

211. Woollen BH, Marsh JR, Laird WJD, Lesser JE. 1992. The metabolism of cypermethrin in man: differences in urinary metabolite profiles following oral and dermal administration. Xenobiotica 22: 983–991.

212. Wright CDP, Forshaw PJ, Ray DE. 1988. Classification of the actions of ten pyrethroid insecticides in the rat, using the trigeminal reflex and skeletal muscle as test systems. Pestic. Biochem. Physiol. 30: 79 – 86.

213. Wu SN, Wu, YH, Chen BS, Lo YC, Liu, YC. 2009. Underlying mechanism of actions of tefluthrin, a pyrethroid insecticide, on voltage-gated ion currents and on action currents in pituitary tumor (GH3) cells and GnRH-secreting (GT1-7) neurons. Toxicology 258(1): 70–77.

214. Xie H, Hu L, Li G. 2010. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: *in vitro* cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. Chinese Medical Journal 123(8): 1086–1092.

215. Xu LJ, Jiang T, Zhang FJ, Han JF, Liu J, Zhao H, Li XF, Liu RL, Deng YQ, Wu XY, Zhu SY, Qin ED, Qin CF. 2013. Global Transcriptomic Analysis of Human Neuroblastoma Cells in Response to Enterovirus Type 71 Infection. PLoS ONE. 8(7): e6594-8.

216. Yabu H, Yoshimo M, Someya T, Totsuka M. 1989. Two types of Ca channels in smooth muscle cellisolated from guinea-pig taenia coli. Adv Exp Med Biol 255: 129 -134.

217. Yamamoto R. 1923. On the insecticidal principle of Chrysanthemum cinerariaefolium. J Chem Soc Jpn 44, 311–330.

218. Yang Q, Sun L, Zhang D, Qian J, Sun Y, Ma L, Sun J, Hu X, Tan W, Wang W, Zhu C. 2008. Partial characterization of deltamethrin metabolism catalyzed by chymotrypsin. Toxicol *In Vitro* 22: 1528–1533.

219. Yoshii M., Tsunoo A, Narahashi T. 1985. Effects of pyrethroids and veratridine on two types of calcium channels in neuroblastoma cells. Society for Neuroscience 11: 158.

220. Youle RJ. 2007. Cell biology. Cellular demolition and the rules of engagement. Science 315: 776–777.

221. Youle RJ, Strasser A. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nat Rev Mol Cell Biol 9:47-59.

222. Yu FH, Catterall WA. 2003. Overview of the voltage-gated sodium channel family. Genome Biol 4: 207.

223. Yue F, Cheng Y, Breschi A, Vierstra J, Wu W, Ryba T, Sandstrom R, Ma Z, Davis C, D Pope B, Shen Y, D Pervouchine D, Djebali S, Thurman RE, Kaul R, Rynes E, Kirilusha A, Marinov GK, Williams BA, Trout D, Amrhein H, Fisher-Aylor K, Antoshechkin I, DeSalvo G, See LH, Fastuca M, Drenkow J, Zaleski C, Dobin A, Prieto P, Lagarde J, Bussotti G, Tanzer A, Denas O, Li K, Bender MA, Zhang M, Byron R, Groudine MT, McCleary D, Pham L, Ye Z, Kuan S, Edsall L, Wu YC, Rasmussen MD, Bansal MS, Kellis M, Keller CA, Morrissey CS, Mishra T, Jain D, Dogan N, Harris RS, Cayting P, Kawli T, Boyle AP, Euskirchen G, Kundaje A, Lin S, Lin Y, Jansen C, Malladi VS, Cline M, Erickson DT, Kirkup VM, Learned K, Sloan C, Rosenbloom KR, de Sousa BL, Beal K, Pignatelli M, Flicek P, Lian J, Kahveci T, Lee D, Kent WJ, Santos MR, Herrero J, Notredame C, Johnson A, Vong S, Lee K, Bates D, Neri F, Diegel M, Canfield T, Sabo PJ, Wilken MS, Reh TA, Giste E, Shafer A, Kutyavin T, Haugen E, Dunn D, Reynolds A, Neph S, Humbert R, Hansen RS, De Bruijn M, Selleri L, Rudensky A, Josefowicz S, Samstein R, Eichler EE, Orkin SH, Levasseur D, Papayannopoulou T, Chang KH, Skoultchi A, Gosh S, Disteche C, Treuting P, Wang Y, Weiss MJ, Blobel GA, Cao X, Zhong S, Wang T, Good PJ, Lowdon RF, Adams LB, Zhou XQ, Pazin MJ, Feingold EA, Wold B, Taylor J, Mortazavi A, Weissman SM, Stamatoyannopoulos J, Snyder MP, Guigo R, Gingeras TR,

Gilbert DM, Hardison RC, Beer MA, Ren B. 2014. A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. Nature. 515 (7527): 355-364.

224. Yun SI, Song BH, Kim JK, Yun GN, Lee EY, Li L, Lee YM. 2014. A molecularly cloned, live-attenuated japanese encephalitis vaccine SA14-14-2 virus: a conserved single amino acid in the ij Hairpin of the Viral E glycoprotein determines neurovirulence in mice. PLoS pathogens. 10 (7): e1004290.