



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS CITOTÓXICOS DE LOS  
AGROQUÍMICOS NEONICOTINOIDES EN CÉLULAS DE  
NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y

AUTORA

Adriana Cecibel Gallegos Ordóñez

AÑO

2020



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS CITOTÓXICOS DE LOS AGROQUÍMICOS  
NEONICOTINOIDES EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO  
SH-SY5Y

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

Ph.D. Miguel Ángel García Bereguain

Autora

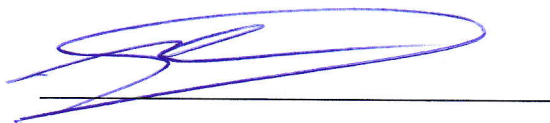
Adriana Cecibel Gallegos Ordóñez

Año

2020

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

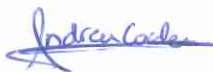
“Declaro haber dirigido el trabajo, Evaluación de los efectos citotóxicos de los agroquímicos neonicotinoides en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, a través de reuniones periódicas con la estudiante Adriana Cecibel Gallegos Ordóñez, en el semestre 2020-10, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.



Miguel Ángel García Bereguain  
Doctor en Biología Celular y Molecular  
CC: 1756975841

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Evaluación de los efectos citotóxicos de los agroquímicos neonicotinoides en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, de Adriana Cecibel Gallegos Ordóñez, en el semestre 2020-10, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

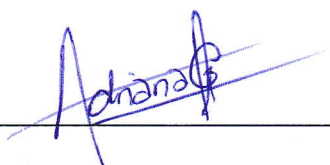


---

Andrea Paola Cordero Arroyo  
Máster en Células Madre y Medicina Regenerativa  
CC: 1714669825

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.



Adriana Cecibel Gallegos Ordóñez

CC: 1105938094

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Ph.D Miguel Ángel García Bereguain,  
por su invaluable guía en el desarrollo del  
presente trabajo, por depositar su  
confianza en mí y haberme dado la  
oportunidad de participar en su proyecto

## **DEDICATORIA**

A Fabián y Lupita, mis padres; a Sofy y Paulita, mis hermanitas y mi familia entera, gracias desde el fondo del corazón por haberme acompañado con paciencia y amor en este proceso de búsqueda y curiosidad incesante por la belleza de la ciencia

## RESUMEN

Los neonicotinoides son insecticidas sintéticos de amplio uso en la agricultura que han demostrado ser capaces de generar efectos letales y subletales en organismos *off-target*, debido al mecanismo responsable de su acción insecticida, en el cual interaccionan con los receptores nicotínicos de la acetilcolina. Este estudio presenta una evaluación *in vitro* de la citotoxicidad y de los posibles efectos sinérgicos de los neonicotinoides acetamiprid, imidacloprid y thiamethoxam en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Los resultados mostraron que existe una relación dosis dependiente entre la toxicidad de los compuestos y la afectación de las células, donde las concentraciones de 2 y 4mM fueron las que generaron una mayor disminución en el número de células. Además, se pudo determinar el comportamiento sinérgico de los compuestos tanto a 1 mM como 2 mM. La citotoxicidad de los compuestos podría estar relacionada con una afectación en los procesos iniciales del neurodesarrollo.



## ABSTRACT

Neonicotinoids are synthetic insecticides widely used in agriculture that can cause lethal and sublethal effects in *off-target* organisms, due to their mechanism of insecticidal action, which involves the interaction with the acetylcholine nicotinic receptors. This investigation presents an *in vitro* evaluation of the cytotoxicity and synergistic effects of the neonicotinoids: acetamiprid, imidacloprid and thiamethoxam in the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. The results showed that there is a dose-dependent relationship between the toxicity of the compounds and the mortality of the cells. Concentrations of 2 mM and 4 mM were those that generated a greater decrease in the number of cells. Besides, we confirmed the synergistic behavior of the compounds at both 1 mM and 2 mM. The cytotoxicity of the compounds could be related to the neurotoxicity development.

## ÍNDICE

1	CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1	Antecedentes .....	1
1.2	Planteamiento del problema .....	3
1.3	Objetivo general .....	4
1.4	Objetivos específicos.....	4
1.5	Justificación del trabajo .....	5
2	CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO .....	6
2.1	Neonicotinoides.....	6
2.1.1	Características generales .....	6
2.1.2	Mecanismo de acción .....	7
2.1.3	Clases de neonicotinoides.....	8
2.1.4	Ecotoxicología .....	9
2.1.5	Efectos en mamíferos.....	10
2.2	Células SH-SY5Y .....	11
2.2.1	Características generales .....	11
2.2.2	Usos <i>in vitro</i> .....	12
2.3	Receptores nicotínicos de la acetilcolina .....	12
2.3.1	Insectos .....	12
2.3.2	Mamíferos.....	13
3	CAPÍTULO III. PROCEDIMIENTOS .....	14

3.1	Cultivo celular.....	14
3.1.1	Cultivo de SH-SY5Y .....	14
3.1.2	Subcultivos .....	14
3.2	Ensayo de citotoxicidad.....	14
3.2.1	Tratamientos celulares con neonicotinoides.....	14
3.2.2	Ensayo MTT .....	15
3.2.3	Ensayo LDH.....	15
3.3	Análisis estadístico.....	16
4	CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
4.1	Caracterización cinética y dosis respuesta del efecto tóxico de los neonicotinoides.....	16
4.1.1	Ensayo MTT .....	17
4.1.2	Ensayo LDH.....	25
4.2	Estudio de los posibles efectos tóxicos sinérgicos entre los neonicotinoides .....	30
4.2.1	Ensayo MTT .....	30
4.2.1.1	Acetamiprid-Imidacloprid.....	30
4.2.1.2	Thiamethoxam-Acetamiprid .....	31
4.2.1.3	Imidacloprid-Thiamethoxam .....	32
4.2.2	Ensayo LDH.....	36
4.2.2.1	Acetamiprid-imidacloprid.....	36
4.2.2.2	Thiamethoxam-acetamiprid.....	37
4.2.2.3	Imidacloprid-thiamethoxam .....	38

5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	45
5.1	Conclusiones.....	45
5.2	Recomendaciones.....	45
6	REFERENCIAS .....	46

# 1 CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Antecedentes

Los neonicotinoides son insecticidas sintéticos de amplio uso en la agricultura, preferidos por su acción contra una gran variedad de insectos como pulgones, moscas blancas, micro lepidópteros e incluso coleópteros. Tienen registro en más de 120 países, especialmente los productores de maíz, canola, soya y banano, como Ecuador y Costa Rica (Jeschke et al., 2011).

Existen varios tipos de neonicotinoides, cuya composición química difiere con respecto al grupo heterocíclico de su estructura central (Nauen et al., 2011). La mayor actividad insecticida ha sido observada en los que tienen grupos nitroenamina, nitroguanidina o cianoamidina, siendo este último el que le confiere estabilidad y también toxicidad hacia diferentes especies animales y vegetales.

Una de las características principales relacionadas con la forma de acción de los neonicotinoides es su actividad agonista en la activación de los receptores nicotínicos de la acetilcolina. Esta constituye la base de la investigación sobre los efectos tóxicos que podrían causar en los seres humanos, ya que podrían interferir con el desarrollo y/o funcionamiento del sistema nervioso central (Júlvez et al., 2016; Kagawa & Nagao, 2018).

Existe en la literatura pruebas de los efectos fisiológicos de los neonicotinoides. El imidacloprid, por ejemplo, es uno de los neonicotinoides más usados. Tiene la capacidad de producir un cambio despolarizante en el potencial de membrana y un aumento en el potencial de acción de las células estrelladas del núcleo coclear de ratones, cambiando su función (Bal et al., 2010). El acetamiprid, otra variante de los neonicotinoides, es capaz de inducir especies reactivas del oxígeno, la peroxidación lipídica, reducir el potencial de membrana mitocondrial y agregarse en los ácidos nucleicos (Annabi, Ben Salem, & Abid-Essefi, 2019). Thiamethoxam

ha demostrado efectos inmunosupresores en aves (Gul et al., 2018) y una disminución de las capacidades cognitivas en abejas (Papach et al., 2017).

Los estudios *in vitro* realizados con el fin de entender y determinar el riesgo que conlleva el uso de estos agroquímicos, han incluido evaluaciones en diversas líneas celulares. Sin embargo, aquellos que se han realizado abarcando la citotoxicidad de los neonicotinoides en células del sistema nervioso central son limitados. El término citotoxicidad se usa en referencia al potencial de un compuesto de inducir muerte celular o un decremento en la supervivencia de las células. (Aykul & Martinez-Hackert, 2016).

La influencia de los neonicotinoides ha sido demostrada en linfocitos periféricos humanos (Demsia et al., 2007; Kocaman & Topaktaş, 2015). La exposición de estas células a distintas concentraciones provoca una pérdida en su viabilidad del 50%. Los efectos tóxicos son visibles incluso en tiempos cortos de incubación (Calderón-Segura et al., 2012)

La disminución en la supervivencia celular también ha sido observado en pruebas con células de pulmón humano, donde se ha establecido una significativa afectación en la viabilidad debido a la toxicidad de los compuestos (Çavaş et al., 2014). Otros estudios indican toxicidad dosis dependiente en células embrionarias (Yun et al., 2017).

Se ha encontrado evidencia de citotoxicidad cuando los neonicotinoides han sido estudiados en líneas celulares de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Şenyildiz, Kilinc, & Ozden, 2018). Los neonicotinoides generan una disminución significativa de la viabilidad de las células, de una forma dosis dependiente.

El estudio de la posible toxicidad de los neonicotinoides es aún una tarea pendiente dado que existen muy pocos estudios al respecto y cobra mayor importancia conforme se extienden ciertas prácticas de erradicación de plagas en los cultivos (Mann, 2018).

## 1.2 Planteamiento del problema

La demanda de insecticidas neonicotinoides por parte de Asia y Sudamérica representa el 75 % de las ventas globales (Bass et al., 2015). Existen algunas de sus variedades de neonicotinoides que se manejan en Ecuador. Los insecticidas imidacloprid y tiametoxam, por ejemplo, son adquiridos a nivel veterinario como antiparasitarios externos de uso tópico. En lo referente a insumos agrícolas, el más usado es el imidacloprid, que abarca distintas formas de uso. El insecticida en la versión de suspensión concentrada es útil en el tratamiento de insectos que atacan al arroz y la papa. Al usarlo como polvo para disolución, se aplica en rosas, arroz, tomate riñón, maíz, tabaco, tomate de árbol, brócoli, fréjol, sandía, banano y una lista extensa de otros cultivos (Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario, 2017).

A pesar de que se consideró a los neonicotinoides como seguros por un largo tiempo, existen nuevas evidencias que cuestionan su inocuidad para los humanos (Kagawa & Nagao, 2018).

Los receptores nicotinérgicos en mamíferos están constituidos por múltiples subunidades localizados en el cerebro, los músculos esqueléticos, los ganglios y la médula espinal, cuya afinidad por los neonicotinoides no es conocida, (Çavaş et al., 2012). La persistencia de los neonicotinoides (vida media de 1 a 2 años) en los tejidos de la planta y la facilidad que tienen de atravesar la barrera hematoencefálica, sugieren que estos compuestos son potencialmente riesgosos para la salud humana (Jeschke et al., 2011) (Ford & Casida, 2006).

El riesgo que implica el uso de estos insecticidas es inherente a las altas tasas de aplicación que se manejan en algunos lugares (Miranda et al., 2011). En la mayoría de los ambientes los químicos están presentes como mezclas. Hay estudios que demuestran que las mezclas de pesticidas son sinérgicas, es decir, la toxicidad inducida por la mezcla es al menos el doble del nivel previsto (Cedergreen, 2014).

La sinergia de los insecticidas es muy probable que ocurra ya sea como resultado de las prácticas agronómicas convencionales o la presencia de residuos debido a la aplicación persistente en zonas agrícolas (Brodeur et al., 2014). Las concentraciones a nivel de campo dependen de las características del suelo, la contaminación cruzada a través del suelo y el modo de aplicación de los neonicotinoides.

Todos estos procesos conducen a una contaminación general que expone a los seres humanos a una toxicidad química que en la mayoría de casos es desconocida (Mörtl et al., 2017). En Ecuador aún hay incertidumbre en cuanto a sus efectos tóxicos y no se conocen los efectos sinérgicos de los neonicotinoides.

En países como Ecuador, la utilización combinada de diferentes neonicotinoides en la agricultura genera una exposición ambiental mixta donde el potencial efecto sinérgico neurotóxico de estos compuestos es desconocido.

### **1.3 Objetivo general**

Evaluar la toxicidad de los insecticidas neonicotinoides en la línea celular de neuroblastoma SH- SY5Y

### **1.4 Objetivos específicos**

- Establecer el tiempo de exposición y la concentración a la cual los neonicotinoides presentan mayor toxicidad
- Determinar si existen efectos sinérgicos de los neonicotinoides sobre la línea celular SH-SY5Y



## 1.5 Justificación del trabajo

Dentro de algunos marcos legislativos, existen normas orientadas hacia la protección del hombre y del medio ambiente, que imponen retos en los estudios toxicológicos, dado el volumen de químicos que se deben registrar, evaluar y autorizar. Estos retos cobran especial importancia en el área de las pruebas de neurotoxicidad que permiten verificar los efectos neuropatológicos y neuroconductuales. Los estudios *in vivo* se tornan poco viables debido a sus cuestionamientos éticos, el costo tanto en relación al mantenimiento de los animalarios requeridos para tal efecto como en relación al tiempo en que se llevan a cabo. En este sentido, los estudios *in vitro* se presentan como alternativas en las pruebas de toxicidad para el modelamiento de la exposición a los químicos y las prácticas de evaluación de riesgos (Westerink, 2013).

Los estudios *in vitro* han resultado aptos para la revelación de la afectación negativa de los neonicotinoides en el cerebro en desarrollo. La exposición *in vitro* de células estrelladas de ratones a imidacloprid ha servido para registrar el daño a las propiedades membranales (Bal et al., 2010), así como también la citotoxicidad en neuronas cerebelares de ratas neonatas y la interferencia con la actividad fisiológica neural (Kimura-kuroda et al., 2012).

Para estudios neurotóxicos hay la disponibilidad de numerosas líneas celulares, sin embargo, una de las de mayor relevancia es la línea celular SH-SY5Y, esta es fácilmente cultivable y ha sido usada en el estudio de algunas enfermedades neurodegenerativas, y en estudios de diferenciación y desarrollo neuronal, convirtiéndolas en poderosas herramientas de investigación *in vitro*.

El presente estudio pretende establecer una línea base de determinación de la toxicidad *in vitro* de los neonicotinoides imidacloprid, acetamiprid y tiametoxam en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

El conocimiento de la toxicidad de los pesticidas del tipo neonicotinoides se torna decisivo en la reducción de la contaminación ambiental, de la resistencia por parte de plagas y de la toxicidad para los seres vivos (Begum, Alam, & Jalal Uddin, 2017).

## **2 CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Neonicotinoides**

#### **2.1.1 Características generales**

Los neonicotinoides son insecticidas nitroguanidínicos de amplio espectro, cuyo objetivo son los insectos chupadores y masticadores. Los usos que se les da abarcan algunos campos, desde la protección de plantas y cultivos de insectos mediante la aplicación a nivel de suelo, hojas y semillas, el control de pestes como cucarachas, termitas, moscas, etc., hasta aplicaciones a nivel veterinario, contra pulgas, garrapatas, entre otros (Barbee & Stout, 2009). Al tener naturaleza sistémica, se aplican en las semillas, a partir de la cual migran través de la savia a todas las partes de las plantas, lo que les confiere protección contra las pestes que se alimentan de ellas (Simon-Delso et al., 2015).

Su uso se incrementó enormemente en los años 90 como alternativa a los organofosforados y carbamatos debido a que presentaban tanto menor toxicidad hacia mamíferos como menor desarrollo de resistencia en comparación con otros pesticidas (Harbison, Bourgeois, Johnson, Lee, & Stedeford, 2015). En el año 2008, una cuarta parte del mercado de insecticidas giraba en torno a los neonicotinoides, los cuales llegaron a ocupar el primer y segundo lugar de los insecticidas y pesticidas más vendidos, respectivamente, con usos registrados para más de 140 cultivos en 120 países (Jeschke et al., 2011).

Según cifras de la FAO, el uso de pesticidas en Ecuador tiene un promedio de 4,98 kg/ha desde el año 1990 hasta 2016, siendo de los más altos de la región, después de Colombia, con una cifra de 14,57 kg/ha (Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2019). Los neonicotinoides que se encuentran disponibles actualmente en el país son: imidacloprid, acetamiprid, thiamethoxam, clotianidina y dinotefuram, los cuales abarcan categorías toxicológicas que van desde ligeramente hasta moderadamente peligrosas y cuyo uso está aprobado para cultivos como: rosas, maíz, arroz, papa, caña de azúcar, banano, tomate, brócoli, entre otros (MAGAP y AGROCALIDAD, 2018).

### **2.1.2 Mecanismo de acción**

Los receptores nicotínicos de la acetilcolina son estructuras que están involucradas en los procesos de neurotransmisión tanto en el sistema nervioso de insectos como de mamíferos (Levin & Simon, 1998). Estos receptores se localizan en los ganglios autónomos y en las placas terminales del músculo esquelético (Hodgson & Roe, 2014). La acetilcolina es el agonista endógeno y el neurotransmisor del sistema nervioso colinérgico. La neurotransmisión mediante sinapsis nicotínica colinérgica se realiza en dos etapas: una, donde se libera la acetilcolina de la membrana presináptica mediante exocitosis y existe una interacción con el sitio de unión localizado en el dominio extracelular del receptor y otra, donde se produce un cambio conformacional del receptor que deriva en la apertura del canal iónico, promoviendo el flujo de  $Na^+$  extra e intracelular con el fin de cambiar el equilibrio del potencial de membrana. En insectos, el sitio de unión de los neonicotinoides es el mismo que el de la acetilcolina, es por ello su actividad agonista (Tomizawa & Casida, 2003).

Los neonicotinoides funcionan mediante su interacción con los receptores nicotínicos de la acetilcolina en el sistema nervioso de los insectos, ocasionando una activación excesiva de estos (Abou-Donia, M. 2015). Estos compuestos

contienen un grupo farmacóforo del tipo ciano o nitro electronegativo, el cual le confiere propiedades como potencia y selectividad, probablemente debido a que le permite unirse a un único sitio catiónico en el receptor del insecto (Tomizawa & Casida, 2004a). Las diferencias estructurales entre los receptores de insectos y mamíferos son las que podrían marcar la selectividad de estos compuestos. Mientras que la nicotina ionizada se une a un subsitio aniónico en los receptores de mamíferos, los neonicotinoides interactúan con un subsitio catiónico en los receptores de los insectos (Tomizawa & Casida, 2003).

La unión de los neonicotinoides a los receptores deriva en una excitación continua de las membranas neuronales, produciendo descargas que terminan en el agotamiento de la energía celular y en parálisis. El potencial de unión está dado por la conformación molecular única de los receptores, sin embargo, varía dependiendo de los constituyentes químicos y de la especie (Tomizawa & Casida, 2011) (Honda, Tomizawa, & Casida, 2006). A pesar de que se ha reiterado que tienen una alta especificidad, estudios muestran que la exposición de los mamíferos a los neonicotinoides representa un riesgo potencial tanto para animales como humanos (Han, Tian, & Shen, 2018a).

### **2.1.3 Clases de neonicotinoides**

Los neonicotinoides comprenden tres subclases de acuerdo con su estructura química ( Abou-Donia, M. 2015):

Primera generación o compuestos cloropiridinílicos, que incluyen el imidacloprid, nitenpiram, tiacloprid y acetamiprid.

Segunda generación o compuestos clorotiazoles, donde se encuentra la clotianidina y el tiametoxam.

Tercera generación o compuestos tetrahidrofuriles, como el dinotefuran.

Estas estructuras difieren solamente en su grupo heterocíclico. Los requerimientos para estas estructuras consisten en un grupo heterocíclico, una cadena de puente y un grupo funcional que forma parte del farmacóforo (Nauen et al., 2011). La influencia de estos componentes en la actividad insecticida de los neonicotinoides es ineludible; por ejemplo, la eficacia biológica del imidacloprid contra el saltamontes del arroz puede ser mejorada hasta 125 veces más cuando se le incorpora una fracción 6-cloro-3-piridilmetilo, que es un elemento estructural heterocíclico esencial (Kagabu et al., 1992).

La mejor actividad insecticida se ha observado en compuestos que tienen los farmacóforos nitroenamina, nitroguanidina o cianoamidina. Además de influir en su actividad biológica, estos grupos le confieren al insecticida propiedades específicas como estabilidad fotolítica, degradabilidad en el suelo, metabolismo en las plantas y toxicidad hacia diferentes especies animales (Nauen et al., 2011).

#### **2.1.4 Ecotoxicología**

Uno de los pesticidas más conocidos y usados a nivel mundial es el tiametoxam, el cual es colocado a nivel de cultivos para la protección de plagas. Este compuesto es uno de los neonicotinoides más abundantes encontrados en la naturaleza, por lo tanto distintas especies están expuestas a sus efectos. Por ejemplo, las abejas, en su proceso de alimentación se exponen al tiametoxam, y según distintos estudios este puede llegar a estar presente en un 65 % de muestras analizadas de néctar y un 37 % de las de polen (Pohorecka et al., 2012). Al examinar los efectos *in vitro* de la exposición crónica del tiametoxam en larvas de abejas mieleras, se observó que hay un deterioro en el aprendizaje y la memoria de las abejas adultas que fueron expuestas al compuesto durante su fase larvaria (Papach et al., 2017). De las distintas clases de neonicotinoides, aquellos que presentan el radical nitro en su estructura son los más nocivos para las abejas. El imidacloprid, puede generar una disminución de las actividades

locomotoras de las abejas sin aguijón *T. angustula*, mientras que el tiametoxam les causa hiperactividad. Esto se traduce en una afectación directa sobre su capacidad polinizadora y el mantenimiento viable de su población (Jacob, Zanardi, Malaquias, Souza Silva, & Yamamoto, 2019).

También se ha visto afectación en otras especies, como el caso de la langosta *L. migratoria*, cuya exposición crónica a imidacloprid reduce su detección de movimiento visual, disminuye su capacidad de vuelo y la velocidad de conducción del potencial de acción a nivel del axón (Parkinson & Gray, 2019).

Por otro lado, el uso extensivo y la fácil movilidad de los neonicotinoides en los cuerpos de agua torna susceptibles también a los animales acuáticos. El imidacloprid tiene la capacidad de causar daño a nivel del ADN en diferentes tejidos y anomalías nucleares en los eritrocitos del teleosteo de agua dulce *P. lineatus*. En este pez, las branquias son las que poseen mayor nivel de sensibilidad debido a que su superficie está en contacto directo con los insecticidas, en comparación con el cerebro, el cual puede reparar de mejor forma los daños probablemente debido a la presencia de la barrera hematoencefálica (Alvim & Martinez, 2019).

### **2.1.5 Efectos en mamíferos**

Los neonicotinoides pueden tener efecto en los receptores nicotínicos de la acetilcolina de mamíferos, causando alteraciones conductuales en ratas (Abou-Donia, M. 2015; Kimura-Kuroda et al., 2012). Otros estudios en ratones sugieren que la exposición prenatal y lactacional de los machos a determinadas dosis de acetamiprid, interfiere con el desarrollo de los circuitos neuronales requeridos para llevar a cabo su comportamiento socio-sexual, generando incluso cuadros de ansiedad (Sano et al., 2016). Se ha visto también que este compuesto está involucrado en la hipoplasia del plato cortical y la disminución de la neurogénesis de ratones, así como en una distribución anormal de neuronas en el neocórtex (Kagawa & Nagao, 2018). La fase del desarrollo que comprende desde la

gestación hasta la lactancia en ratones ha sido determinante ya que se ha encontrado que los neonicotinoides están asociados con una disminución del peso corporal, maduración sexual retrasada, disminución en el peso del cerebro, además de la presencia de neuropatologías y deterioro cognitivo (Sheets et al., 2016). De igual forma se ha visto en ratones que la exposición crónica a acetamiprid se relaciona con la supresión de la respuesta inmune y de la capacidad de los linfocitos de formar anticuerpos ( Abou-Donia et al., 2008).

## **2.2 Células SH-SY5Y**

### **2.2.1 Características generales**

SH-SY5Y es una línea celular derivada del subclón SH-SY de la línea parental SK-N-SH de neuroblastoma humano. La línea parental se estableció en 1970 a partir de células metastásicas encontradas en un tumor de hueso. Sirven como modelo de desórdenes neurodegenerativos debido a que pueden convertirse en varios tipos de neuronas funcionales mediante la adición de compuestos específicos. También pueden ser usadas en el análisis de diferenciación neuronal, metabolismo y funcionamiento en relación con procesos neurotóxicos y de neuroprotección (Ross, Spengler, & Biedler, 1983).

Las ventajas de trabajar con esta línea celular incluyen la capacidad de multiplicarse a gran escala con facilidad, la omisión de problemas éticos asociados con los cultivos primarios neuronales y la expresión de formas específicas e isoformas proteicas que no estarían presentes si se usaran cultivos primarios de roedores (Encinas et al., 2000).

### **2.2.2 Usos *in vitro***

El uso de esta línea celular en estudios *in vitro* ha permitido vencer la limitación de que las células no podían ser propagadas si se usaba un cultivo neuronal primario derivado del sistema nervioso central embrionario (Kovalevich & Langford, 2013).

SH-SY5Y posee ciertas características que las hace ideales para estudios *in vitro*. Por ejemplo, tanto las células adherentes como las flotantes son viables en los experimentos. Por otro lado, han sido muy utilizadas como modelo en estudios neurodegenerativos, así como en la investigación de diferenciación neuronal y desarrollo, incluyendo el crecimiento de neuronas (Westerink, 2013). Además, como se derivan del ser humano, expresan proteínas específicas e isoformas que no estarían presentes en un cultivo de células de roedor (Kovalevich & Langford, 2013).

Solo hay dos estudios en la literatura sobre la toxicidad *in vitro* de los neonicotinoides en la línea celular SH-SY5Y. En uno de ellos se demuestra que el acetamiprid, clotianidina, imidacloprid, thiamethoxam y thiacloprid son citotóxicos e inducen al daño de ADN en los cultivos celulares (Şenyildiz et al., 2018). Un segundo estudio demuestra que la clotianidina es capaz de generar efectos funcionales en las células de neuroblastoma, incrementando el crecimiento celular mediado por los receptores nicotínicos de la acetilcolina. Además, puede causar una interrupción en la señalización intracelular que tiene impacto en la afluencia de calcio intracelular y en la expresión génica global (Hirano et al., 2019).

## **2.3 Receptores nicotínicos de la acetilcolina**

### **2.3.1 Insectos**

Los receptores nicotínicos de la acetilcolina son canales iónicos regulados por un agonista en el sistema nervioso central de los insectos. Son los responsables de muchos procesos de neurotransmisión y neuromodulación. También constituyen el



blanco primordial para la acción insecticida, que consiste en la apertura del canal, inducida por la unión del receptor a su agonista. El receptor es un complejo pentamérico transmembranal que contiene secuencias para cada subunidad de la que se compone, con dominios hidrofílicos que contienen un sitio de unión para ligandos colinérgicos y cuatro segmentos hidrofóbicos. Los neonicotinoides se unen a los receptores nicotínicos en el mismo sitio de unión de la nicotina y los agonistas, lo cual denota su similitud estructural. En los receptores de insectos, la región de carga negativa interactúa con los residuos de aminoácidos catiónicos como la lisina, arginina o histidina en la región de unión al neonicotinoide. El farmacóforo presente en los neonicotinoides, ya sea del tipo N-nitroamina, N-cianoamina o 2-nitrometileno es el que juega un rol crucial en la afinidad por los receptores nicotínicos mencionados (Tomizawa & Casida, 2003).

### **2.3.2 Mamíferos**

En los mamíferos, los receptores nicotínicos de la acetilcolina juegan un rol importante en la transmisión sináptica en el sistema nervioso central y comprenden 2 tipos: las subunidades musculares, y las neuronales (Simon-Delso et al., 2015). Las diferencias estructurales entre las moléculas de los receptores de insectos y mamíferos son las que establecen cierta selectividad de los neonicotinoides hacia ellos, así como la composición de estos químicos. Por ejemplo, los insecticidas neonicotinoides con un sustituyente nitrometileno tienen una afinidad más alta por los receptores de mamíferos que los que no poseen ese grupo (Tomizawa & Casida, 2003).

### **3 CAPÍTULO III. PROCEDIMIENTOS**

#### **3.1 Cultivo celular**

##### **3.1.1 Cultivo de SH-SY5Y**

La línea celular SH-SY5Y fue mantenida en Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino y 1 % penicilina-estreptomicina en un incubador a 37 °C (Şenyildiz et al., 2018).

##### **3.1.2 Subcultivos**

Los subcultivos fueron realizados cuando las células alcanzaron una densidad del 90 % aproximadamente cada 3 días. Se realizó el retiro del medio y la adición de 2 mL de buffer fosfato salino PBS ph 7.4 (1X). A continuación, se colocó 1 mL de tripsina TryPLE Express para despegar las células del frasco e individualizarlas. La tripsina es una enzima que proteoliza las proteínas responsables de la adherencia de las células tanto con el sustrato como entre sí (Caballero Bermejo, 2015).

Una vez despegadas las células se detuvo el efecto de la tripsina añadiendo 5 mL de medio completo. Posterior a ello se centrifugó durante 5 minutos a 3000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó y se resuspendió el pellet en 1 mL de medio completo.

#### **3.2 Ensayo de citotoxicidad**

##### **3.2.1 Tratamientos celulares con neonicotinoides**

Se realizó un cambio de medio de las células a DMEM suplementado con suero fetal bovino al 1 %, en un período de 24 horas antes de la exposición a los

tratamientos con neonicotinoides. Esto con el fin de evitar la interferencia de los péptidos del suero sobre las células (Caballero Bermejo, 2015).

Se realizaron diluciones seriadas de 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2 y 4 mM de imidacloprid, acetamiprid y thiamethoxam en DMSO. A cada pocillo de células se adicionó 1  $\mu$ L de cada concentración de los neonicotinoides y se controló tiempos de exposición de 6, 12, 24 y 48 horas. Se colocó 1  $\mu$ L de DMSO como control negativo y 10  $\mu$ L de DMSO como control positivo. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

### **3.2.2 Ensayo MTT**

El ensayo MTT es un indicador sensible y confiable de la actividad metabólica celular que consiste en la reducción del compuesto 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, un colorante amarillo soluble en agua, por la enzima deshidrogenasa de las mitocondrias, a cristales de formazán de color púrpura (Patravale, Dandekar, & Jain, 2012). Mide la viabilidad celular en términos de la actividad reductora, debido a que la conversión enzimática del mtt en cristales de formazán se producen en las mitocondrias de las células vivas, a pesar de que también estén implicados otros agentes reductores y enzimas celulares (Kuate, Karaosmanoğlu, & Sivas, 2017).

Se preparó una solución de MTT a una concentración de 5 M. Se retiró el medio de los pocillos mediante aspiración y se procedió a colocar la solución de MTT por 60 minutos. Pasado este tiempo se retiró el MTT, se colocó 10  $\mu$ L de DMSO para diluir el formazán y se realizó una lectura de la placa a una absorbancia de 360 nm.

### **3.2.3 Ensayo LDH**

Lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citoplasmática que está presente en todas las células. Esta enzima se libera con facilidad cuando la membrana ha

sudrido alguna alteración, muy común en las diversas formas de daño celular. La actividad enzimática de lactato deshidrogenasa se puede medir mediante la reducción por NADH de una sal amarilla de tetrazolio, INT, en un colorante rojo, formazán. La cantidad de formazán es directamente proporcional a la cantidad de LDH en el cultivo y éste a su vez, directamente proporcional al número de células muertas (Kumar, Nagarajan, & Uchil, 2018).

Se preparó el kit para el ensayo de LDH siguiendo las instrucciones del fabricante. A volúmenes iguales, se mezclaron las soluciones del sustrato (L2402), el colorante (L2277) y el cofactor. Esto se llevó a cabo al momento de usarlas, debido a la sensibilidad de los componentes del kit (Sigma-Aldrich, n.d.).

Se procedió a centrifugar las placas de 96 pocillos a 250 g por 4 minutos. Se transfirió una alícuota de 50  $\mu$ L de cada pocillo a una nueva placa, a las cuales se les añadió 100  $\mu$ L de la solución preparada para el ensayo. Luego de transcurridos 20 minutos, se detuvo la reacción con 15  $\mu$ L de HCl 1 M y se leyó las placas a una absorbancia de 490 y 690 nm.

### **3.3 Análisis estadístico**

Las muestras de estudio fueron analizadas por triplicado y los resultados fueron expresados como media  $\pm$  desviación estándar. Para el análisis estadístico se utilizó una variante de R, el paquete Estadístico Jamovi 1.1.8.0. Los datos entre los diferentes grupos se analizaron usando ANOVA y la prueba post hoc Tukey. El nivel de confianza que se utilizó en todos los análisis fue del 95 %. Se consideraron los valores  $p < 0,05$  como significativos.

## **4 CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1 Caracterización cinética y dosis respuesta del efecto tóxico de los neonicotinoides**

#### 4.1.1 Ensayo MTT

Los neonicotinoides fueron diseñados para actuar preferentemente en insectos, sin embargo, han demostrado ser capaces de generar efectos letales y subletales en organismos off-target. El mecanismo responsable de la acción insecticida de estos compuestos interacciona con los receptores nicotínicos de la acetilcolina (Tomizawa & Casida, 2004). Las similitudes entre el sistema nervioso central de los insectos y el de los humanos ha sentado las bases de investigaciones que acumulan evidencia del daño a nivel de neurodesarrollo durante los períodos críticos de la infancia, el mismo que puede desencadenar posteriormente efectos adversos (Abreu-Villaça & Levin, 2018).

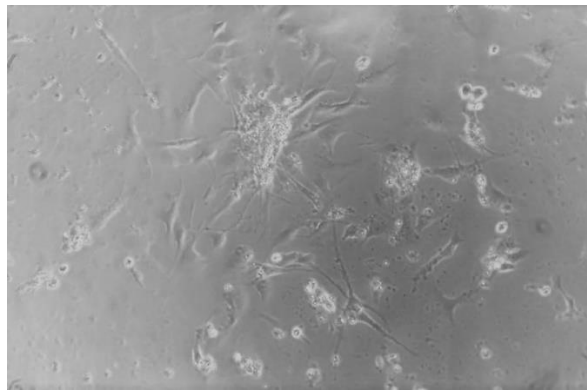
Los ensayos *in vitro* se han posicionado en los últimos años como la mejor opción para el estudio de modelos neuronales, debido a que pueden recrear una serie de procesos del neurodesarrollo que inician con la proliferación celular hasta las etapas posteriores de diferenciación y maduración. La evaluación *in vitro* de la afectación de alguno de estos procesos por compuestos químicos puede ser medido cuantitativamente y dar lugar a un modelamiento de la toxicidad en el neurodesarrollo (Bal-Price et al., 2018).

El presente estudio de citotoxicidad *in vitro* se llevó a cabo con la línea celular neuronal SH-SY5Y, que, al ser derivada de humano, expresa proteínas específicas e isoformas que no estarían presentes en cultivos celulares primarios de roedor. Esta línea celular se caracteriza morfológicamente por presentar cuerpos celulares no polarizados que tienden a formar grupos dispuestos en una región central de masa celular (Ver fig.1). Además, las células tienen la capacidad de proliferar continuamente, expresan marcadores neuronales inmaduros y carecen de marcadores neuronales maduros (Kovalevich & Langford, 2013).

Al tratar las células SH-SY5Y con los neonicotinoides se constató que la variación en la concentración tuvo efectos significativos en la supervivencia de las células a

las 6, 24 y 48 horas de tratamiento ( $p < 0,001$ ). A las 24 horas, la concentración solamente fue relevante en su interacción con el tipo de compuesto (ver tabla 1).

Se determinó además que, en los distintos intervalos de tiempo considerados, las concentraciones bajas de los tres neonicotinoides (0,025; 0,05; 0,1; 0,025 y 0,5m mM) no tuvieron efectos significativos sobre la viabilidad celular en comparación con las más altas (1, 2 y 4 mM) definiendo de esta manera que la toxicidad tuvo un comportamiento dosis dependiente (ver tabla 2).



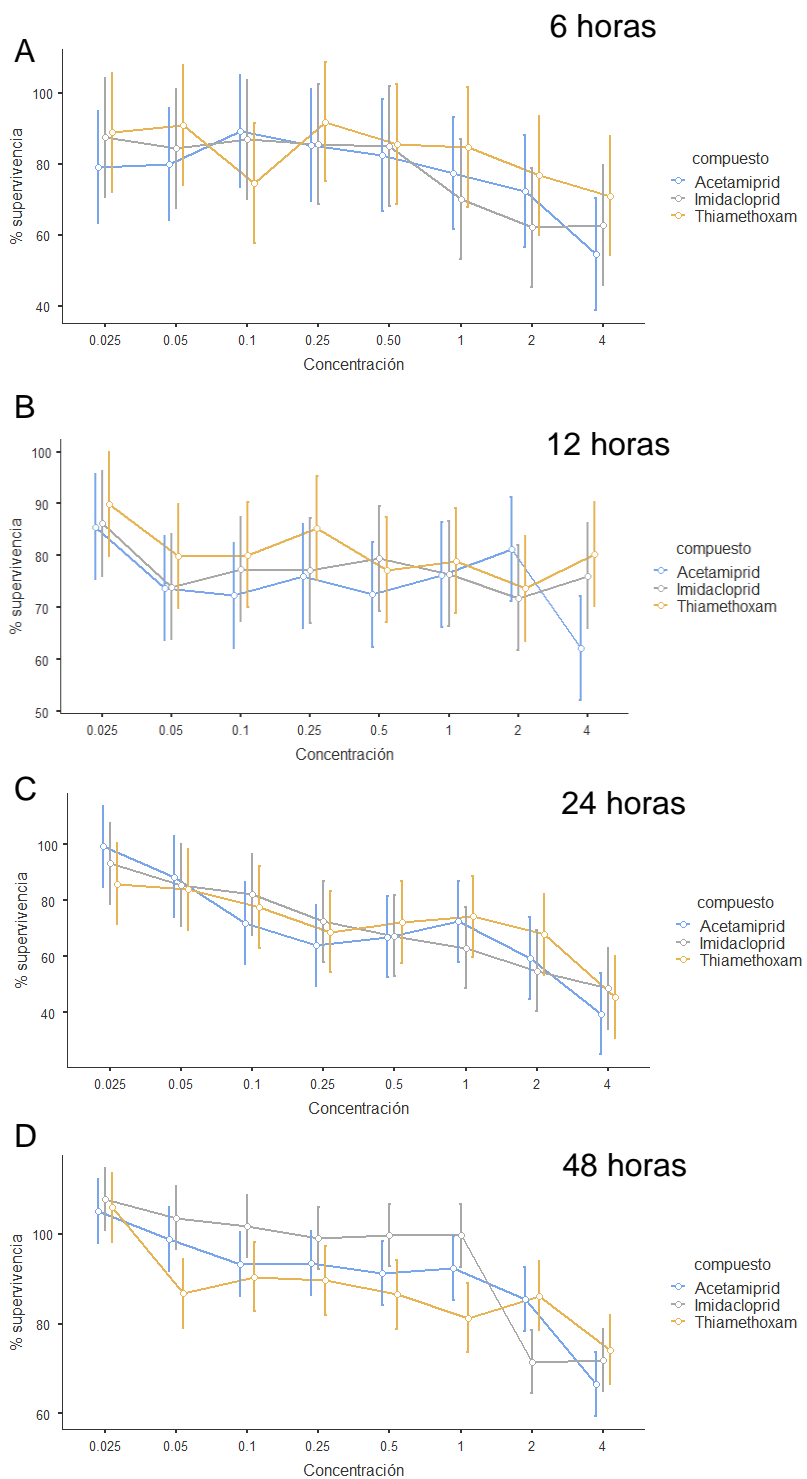
*Figura 1* Células SH-SY5Y

A las 6 horas, la concentración de los tres neonicotinoides a 4mM fue la que tuvo una incidencia significativa en la viabilidad de las células (Ver tabla 3). A esa concentración, el valor más alto de muerte celular fue de  $61.2 \pm 14.4$  %, ocasionado por el compuesto acetamiprid. Este comportamiento se repitió también a las 24 horas, donde el mismo compuesto provocó una disminución del  $40 \pm 16.5$  de la viabilidad celular, resultado similar al del estudio de Şenyildiz et al., (2018), en el cual el acetamiprid produjo un 50% de muerte en las células SHSY-5Y en un lapso de 24 horas a una concentración de 2.16 y 3.09 mM, que fueron de las más altas utilizadas. Otra investigación que reportó una afectación en la viabilidad tras la aplicación de dosis altas fue la de Kocaman & Topaktaş, (2015), en la que tras administrar un tratamiento de acetamiprid a concentraciones de 3.5 y 4 mM en células sanguíneas en un período de 24 y 48 horas, se produjo una disminución de la proliferación celular.

A las 48 horas se dio el mayor porcentaje de muerte (ver fig.2). El compuesto acetamiprid disminuyó un  $75 \pm 19.1$  % la viabilidad celular, thiamethoxam un  $69 \pm 20.1$  % e imidacloprid un  $66 \pm 18.9$  %. Los neonicotinoides siguieron un patrón dosis dependiente. Existen estudios donde al poner a prueba los compuestos acetamiprid e imidacloprid a concentraciones de 1 y 2 mM, se produjo una disminución en la viabilidad de las células HEK293 hasta llegar a un 70 % menos que el control (Yun et al., 2017).

La toxicidad de las concentraciones altas también se ha observado en otros estudios *in vitro*, como el de Bal et al., (2012), en el cual se llegó a demostrar que la exposición a imidacloprid en concentraciones mayores a 10 mM durante 1 min. es capaz comprometer la integridad de la membrana de las neuronas de ratones. Pero la toxicidad no siempre está sujeta a concentraciones altas, esto lo demostraron Kimura-kuroda, et al., (2012) en el primer estudio que evidenció que el imidacloprid y acetamiprid a concentraciones de 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$  son citotóxicos para las neuronas cerebelares de ratas neonatas, debido a que tienen efectos excitatorios sobre los receptores nicotínicos de estos mamíferos. Por el contrario, Christen et. al., (2017) demostraron que a concentraciones bajas de 10 y 100  $\mu\text{M}$  los neonicotinoides no son tóxicos para el crecimiento de neuritas en la línea celular PC-12.

En el presente estudio, fue notable que los neonicotinoides tuvieron una toxicidad dosis dependiente y que los períodos de exposición de 24 y 48 horas fueron los de mayor significancia en los efectos (ver tabla 4). No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes neonicotinoides en cuanto a su toxicidad (ver tabla 5).



**Figura 2** Caracterización cinética y dosis respuesta del efecto tóxico de los neonicotinoides A: % supervivencia a las 6 horas. B: % supervivencia a las 12



horas C: % supervivencia a las 24 horas D: % supervivencia a las 48 horas. Todas las gráficas se han elaborado respecto al control

*Tabla 1.*

Anova de los efectos de la concentración, el compuesto y la interacción entre concentración y compuesto dentro de cada intervalo de tiempo y entre intervalos de tiempo

	Concentración		Compuesto		Concentración*compuesto	
	F value	p value	F value	p value	F value	p value
6 horas	3.868	< .001	0.521	0.604	0.581	0.875
12 horas	3.11	0.003	0.775	0.466	1	0.451
24 horas	29.07	< .001	3.38	0.043	3.12	< .001
48 horas	19.171	< .001	0.0342	0.966	0.815	0.653

*Tabla 2*

Prueba Tukey Post Hoc respecto a la relevancia de la concentración en cada intervalo de tiempo para cada compuesto. Se visualizan los p-values estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ )

Test Post-Hoc					
Compuesto	Tiempo	Concentración	Concentración	Mean difference	Ptukey
Acetamiprid	6 horas	0.1	4	38.6	< .001
		0.25	4	32.2	< .001
		0.5	4	32	< .001
	12 horas	0.025	4	23.1	0.004
		2	4	18	0.042
	24 horas	0.025	0.5	14.34	0.041
			2	17.53	0.005
		0.05	4	38.6	< .001
			4	32.9	< .001
		0.1	4	25.8	< .001
			4	26.4	< .001
		0.5	4	24.3	< .001
			4	26.2	< .001
	48 horas	0.025	2	32.38	0.006
			4	55.7	< .001
		0.05	4	41.1	< .001
0.1		4	35.5	< .001	
0.25		4	32.1	0.001	

		0.5	4	34.4	< .001		
		1	4	32.3	0.001		
<hr/>							
Imidacloprid	24 horas	0.025	2	36.1	< .001		
			4	33.61	< .001		
		0.05	2	32.2	< .001		
			4	29.69	< .001		
		0.1	2	30.2	< .001		
			4	27.72	< .001		
		0.25	2	27	< .001		
			4	24.53	< .001		
		0.5	2	28.4	< .001		
			4	25.96	< .001		
		1	2	28.3	< .001		
			4	25.83	< .001		
		<hr/>					
			48 horas	0.025	2	29.44	0.006
					4	42.7	< .001
	0.05	4		33.1	< .001		
	0.1	4		33.6	< .001		
	0.25	4		28.6	0.002		
	0.5	4		24.7	0.012		
<hr/>							
Thiamethoxam	24 horas	0.025	4	31.7	< .001		
			4	20.6	0.004		
	48 horas	0.025	4	45.9	< .001		
			4	41.4	0.001		
		0.1	4	40.6	< .001		
			4	35.4	0.004		
		0.5	4	37.1	0.002		
			4	38.3	0.001		
		2	4	33.7	0.007		
			4				
<hr/>							

Tabla 3

Prueba Tukey Post Hoc respecto a la influencia de la concentración en la supervivencia en cada intervalo de tiempo. Se visualizan los p-values estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ )

Comparación PostHoc						
Tiempo	Concentración (mM)	Concentración (mM)	Diferencia principal	P Tukey	PBonferroni	
6 horas	0.025	4	22.37	0.013	0.016	
	0.25	4	24.8313	0.003	0.004	
	0.5	4	21.5562	0.019	0.024	
12 horas	0.025	0.05	11.34	0.023	0.029	
		2	11.62	0.018	0.022	
		4	14.34	< .001	0.001	
24 horas	0.1	2	14.09	< .001	< .001	
		4	24.31	< .001	< .001	
	0.25	2	13	< .001	< .001	
		4	23.22	< .001	< .001	
	0.5	2	11.46	0.001	0.001	
		4	21.68	< .001	< .001	
	1	2	10.06	0.009	0.01	
		4	20.28	< .001	< .001	
2	4	10.22	0.007	0.008		
48 horas	0.025	0.1	15.584	0.03	0.04	
		0.25	24.453	< .001	< .001	
		0.5	23.977	< .001	< .001	
		1	22.859	< .001	< .001	
		2	32.146	< .001	< .001	
		4	48.322	< .001	< .001	
	0.05	0.25	17.556	0.008	0.01	
		0.5	17.079	0.011	0.014	
		2	25.248	< .001	< .001	
		4	41.424	< .001	< .001	
	0.1	2	16.562	0.016	0.02	
		4	32.738	< .001	< .001	
	0.25	4	23.868	< .001	< .001	
		4	24.345	< .001	< .001	
1	4	25.462	< .001	< .001		
	4	16.176	0.021	0.026		

**Tabla 4**

Prueba Tukey Post Hoc respecto a la relevancia del tiempo de exposición para cada compuesto. Se visualizan los p-values estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ )

## Comparación Post Hoc - Tiempo

Comparación						
Compuesto	Tiempo (horas)	Tiempo (horas)	Diferencia principal	ptukey	pbonferroni	
Acetamiprid	12	24	-12.13	< .001	< .001	
	24	48	18.21	< .001	< .001	
Imidacloprid	6	24	-16.63	< .001	< .001	
	24	48	24.64	< .001	< .001	
Thiamethoxam	12	48	12.985	0.003	0.003	
	24	48	12.591	0.005	0.005	

**Tabla 5**

Comparación Tukey Post Hoc entre compuestos. No existen diferencias significativas en cada intervalo de tiempo

## Comparación PostHoc

Tiempo	Compuesto	Compuesto	Diferencia principal	P Tukey	Pbonferroni
6 horas	Acetamiprid	Imidacloprid	-0.442	0.997	1
		Thiamethoxam	-5.445	0.625	1
	Imidacloprid	Thiamethoxam	-5.004	0.69	1
12 horas	Acetamiprid	Imidacloprid	-2.35	0.867	1
		Thiamethoxam	-5.71	0.436	0.664
	Imidacloprid	Thiamethoxam	-3.36	0.748	1
24 horas	Acetamiprid	Imidacloprid	-3.62	0.323	0.459
		Thiamethoxam	3.17	0.465	0.72
	Imidacloprid	Thiamethoxam	6.79	0.034	0.039
48 horas	Acetamiprid	Imidacloprid	-0.659	0.995	1
		Thiamethoxam	-1.765	0.964	1
	Imidacloprid	Thiamethoxam	-1.106	0.986	1

#### 4.1.2 Ensayo LDH

Debido a los resultados obtenidos en el ensayo de MTT en la primera parte del estudio, el ensayo de LDH se restringió a los intervalos de 24 y 48 horas, que resultaron estadísticamente relevantes. En la tabla 6 se puede visualizar que los efectos de la concentración y el compuesto jugaron un papel significativo a las 24 horas en la proliferación celular, confirmando lo obtenido con MTT. Pero, por otro lado, no se registró significancia estadística en ambos factores a las 48 horas en la supervivencia celular, lo cual pudo deberse a un error experimental, y será comprobado con nuevas repeticiones experimentales.

Solamente el acetamiprid y thiamethoxam presentaron diferencias significativas entre concentraciones a las 24 horas, lo cual sugiere que la toxicidad siguió el comportamiento dosis dependiente ya observado en el ensayo MTT (ver tabla 9). A partir de la concentración 2 mM ya se pudo observar efectos significativos en la muerte de las células ( $p < 0.001$ ) (ver tablas 7 y 8). El porcentaje de muerte generado partió de aproximadamente un  $42.7 \pm 21.8$  % en el caso del thiamethoxam y de un  $51.8 \pm 27.3$  % en el de acetamiprid.

En la concentración más alta, de 4 mM, el acetamiprid produjo el  $113.2 \pm 35.3$  % de muerte de las células en el lapso de 24 horas. En el mismo escenario, el thiamethoxam tuvo la capacidad de generar la muerte de la mitad de las células ( $52.8 \pm 27$  %), mientras que el imidacloprid solamente de un  $38.3 \pm 28.6$  %.

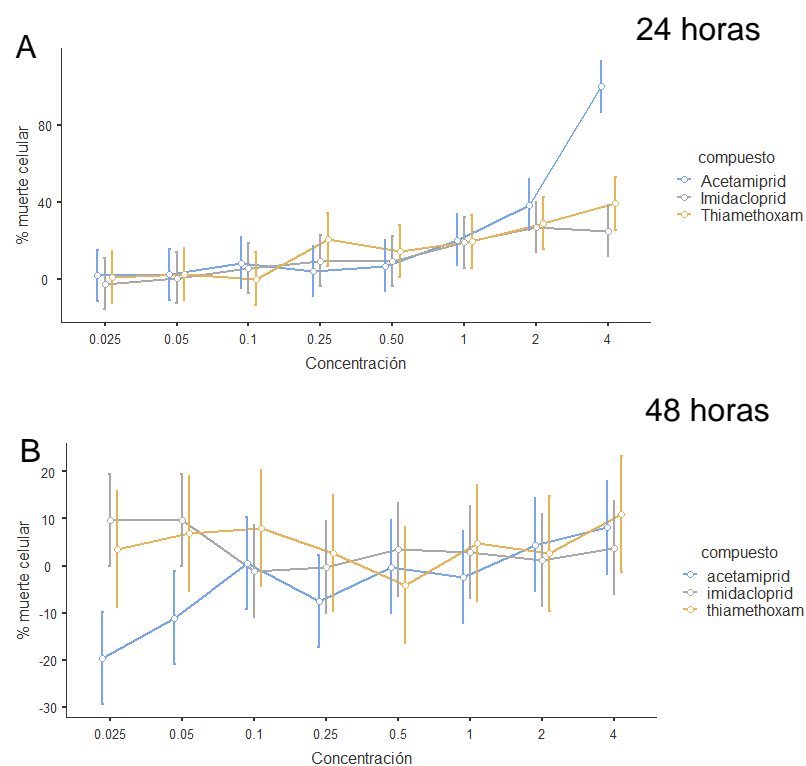
Se confirmó con el ensayo que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre la muerte celular producida por los tres compuestos, de manera que no se pudo establecer el compuesto de mayor toxicidad (ver tabla 10).

Los resultados del ensayo MTT y LDH también presentaron discrepancias. En el caso del ensayo LDH se determinó que la mortalidad es más baja (ver fig.3), lo cual pudo deberse a que existen diferencias entre los mecanismos de muerte celular. El ensayo MTT se basa en la conversión del compuesto del mismo

nombre en formazán púrpura dentro de la mitocondria. Este producto es impermeable en las membranas celulares de células sanas y determina una muerte apoptótica. El ensayo LDH, por otro lado, se basa en la medición de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa liberada en el medio extracelular por células que han perdido la integridad de su membrana, de manera que determina una muerte del tipo necrótica (Fotakis & Timbrell, 2006).

La razón de la discrepancia entre los resultados entre ambos ensayos puede radicar en que probablemente se trató en mayor medida de una muerte apoptótica que necrótica, es decir, que se produjo en mayor medida un daño en las mitocondrias que una afectación en la integridad membranal de las células. El daño a la función mitocondrial pudo ser suficiente para causar la muerte de una mayor parte de las células, como se evidenció en el ensayo MTT.

Sin embargo, se debe también considerar que dependiendo del daño que genera la apoptosis celular en la alteración de las funciones mitocondriales, puede darse a la par un despliegue de estrategias antiapoptóticas de las células y que no en todos los casos la pérdida de la capacidad de reducción del MTT se traduce en pérdida de la integridad mitocondrial (Lobner, 2000). El estrés oxidativo es otro de los mecanismos de muerte generada por los neonicotinoides. Esto incluye procesos de oxidación o reducción, así como mecanismos de activación y desintoxicación. Además, el flujo de  $Ca^{2+}$  y algunas otras vías de señalización también desempeñan papeles fundamentales en los procesos de apoptosis (Wang et al., 2018).



**Figura 3** Ensayo LDH: Análisis por tiempo. A: % muerte a las 24 horas. B: % muerte a las 48 horas. Gráfica respecto al control.

**Tabla 6**

Anova de los efectos de la concentración, el compuesto y la interacción entre concentración y compuesto dentro de cada intervalo de tiempo y entre intervalos de tiempo

	Concentración		Compuesto		Concentración*compuesto	
	F value	p value	F value	p value	F value	p value
24 horas	32.85	< .001	1.78	0.185	6.92	< .001
48 horas	1.05	0.4	3.69	0.041	1.86	0.035

Tabla 7

Prueba Tukey Post Hoc respecto a la influencia de la concentración en la supervivencia en cada intervalo de tiempo. Se visualizan los p-values estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ )

Post Hoc Comparisons 24 horas					
Concentración (mM)	Concentración (mM)	Diferencia principal	Ptukey	Pbonferroni	
0.025		1	-19.51	< .001	< .001
		2	-31.46	< .001	< .001
		4	-54.72	< .001	< .001
0.05		1	-17.76	0.003	0.004
		2	-29.7	< .001	< .001
		4	-52.96	< .001	< .001
0.1		2	-20.17	< .001	< .001
		4	-43.44	< .001	< .001
0.5		2	-21.31	< .001	< .001
		4	-44.57	< .001	< .001
1		4	-35.21	< .001	< .001
		2	-23.26	< .001	< .001

Tabla 8

ANOVA de los compuestos respecto a la relevancia de la concentración en la muerte de las células. El imidacloprid no presentó diferencias significativas a las 24 horas

Compuesto	Tiempo (horas)	Welche's	Fisher's
Acetamiprid	24	< .001	< .001
Imidacloprid	24	0.022	0.019
Thiamethoxam	24	0.002	< .001



*Tabla 9*

Tukey Post Hoc respecto a la relevancia de la concentración de los compuestos en cada intervalo de tiempo. A concentraciones altas existe una mayor generación de muerte celular. Se presentan los p-values estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ )

Tukey Post Hoc Test

Compuesto	Tiempo (horas)	Concentración (mM)	Concentración (mM)	Diferencia principal	P Tukey
Acetamiprid	24	0.025	2	-34.8	0.014
			4	-91.6	< .001
		0.05	2	-33.4	0.018
			4	-90.2	< .001
		0.1	4	-84.6	< .001
			0.25	2	-31.9
		4		-88.6	< .001
		4	-86	< .001	
Thiamethoxam	24	0.025	4	-32.48	0.01
			4	-35.22	0.003
		0.1	4		
			4		

*Tabla 10*

Comparación Tukey Post Hoc entre compuestos. No existen diferencias significativas en cada intervalo de tiempo

Post Hoc - compuesto

Comparación		Diferencia principal	SE	df	t	ptukey	pbonferroni
compuesto	compuesto						
Acetamiprid	- Imidacloprid	11.13	5.96	32.0	1.866	0.165	0.213
	- Thiamethoxam	7.01	6.10	32.0	1.149	0.492	0.777
Imidacloprid	- Thiamethoxam	-4.12	6.10	32.0	0.676	0.779	1.000

## **4.2 Estudio de los posibles efectos tóxicos sinérgicos entre los neonicotinoides**

Aproximadamente la mitad de la población de EE.UU. mayor de 3 años se ha visto expuesta recientemente a los neonicotinoides (Ospina et al., 2019). En 2011, por lo menos el 79 % de cultivos de maíz en ese país fueron tratados con estos pesticidas (Douglas & Tooker, 2015). Los neonicotinoides son fácilmente detectables en el ecosistema, donde el rango de vida media puede variar de días a años dependiendo del compuesto, y tienen la capacidad de acumularse en el suelo y de solubilizarse fácilmente en agua (Abdel-Ghany et al., 2016). Debido a su naturaleza sistémica, estos compuestos mantienen su reminiscencia en las plantas, y, dado que son la base de la dieta de los humanos, constituyen una ruta potencial de exposición (Han et. al., 2018). Las interacciones de los compuestos químicos en la naturaleza ocasionan una respuesta que puede ser antagónica (cuando la toxicidad combinada es inferior a la suma de la toxicidad de los componentes por separado) o sinérgica (cuando la toxicidad de la mezcla es mayor que la suma de la toxicidad de los componentes por separado) (Drakvik et al., 2020).

### **4.2.1 Ensayo MTT**

La influencia de los factores tiempo, concentración y su interacción tuvieron significancia en la disminución de la viabilidad celular (ver tabla 11).

#### **4.2.1.1 Acetamiprid-Imidacloprid**

Existieron diferencias en la respuesta de viabilidad de las células a las 24 y 48 horas de exposición a los neonicotinoides (ver tabla 13).

A las 24 horas, la toxicidad del compuesto imidacloprid a 2 mM llegó a ser mayor que la de la mezcla entre acetamiprid e imidacloprid en proporción 1: 1 mM

( $p < 0.05$ ), cuyos valores de afectación en la viabilidad alcanzaron el  $38.5 \pm 18.2$  % y  $6.9 \pm 16.5$  % respectivamente (ver fig. 4). Por otro lado, no se observó significancia entre la disminución de viabilidad provocada por la mezcla, que como se mencionó fue de  $6.9 \pm 16.5$  %, y el compuesto acetamiprid por sí solo a 4mM, que registró un  $21.8 \pm 18.5$  %.

En el mismo intervalo de tiempo se determinó la sinergia entre acetamiprid e imidacloprid en concentración 2:2 ( $p < 0.001$ ), la cual causó el  $78.3 \pm 16.9$  % de muerte de las células, en comparación con acetamiprid por separado 4mM, que disminuyó la viabilidad en  $39.7 \pm 18.5$  % y con imidacloprid por separado a la misma concentración, que disminuyó un  $34.3 \pm 15.3$  % de las células.

A las 48 horas no se registraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de afectación de la viabilidad celular de las combinaciones y los compuestos por separado (ver tabla 12). La mezcla de acetamiprid e imidacloprid en concentración 1mM llegó a disminuir la viabilidad en un  $22 \pm 13.2$  %, el acetamiprid en solitario a 2 mM un  $48.3 \pm 24.9$ % y el imidacloprid a la misma concentración un  $42.1 \pm 24.4$ %.

En el caso de la combinación de los compuestos a concentración 2 mM causó una disminución de la población celular en  $55.3 \pm 15.8$  %, sin embargo, fue similar a la de los compuestos acetamiprid e imidacloprid a 4 mM por separado, que alcanzaron un  $62.2 \pm 21.2$  % y  $55.2 \pm 20.2$  % respectivamente.

#### **4.2.1.2 Thiamethoxam-Acetamiprid**

La toxicidad de la mezcla de thiamethoxam y acetamiprid en proporción 1:1 mM tuvo baja repercusión en la supervivencia celular a las 24 horas, ya que disminuyó en un  $9.4 \pm 12.7$  %, cifra que no fue significativa al compararla con los compuestos por separado a 2 mM, los cuales disminuyeron un  $16 \pm 28.4$  % la viabilidad en el caso de thiamethoxam y  $21.5 \pm 16.6$  % en el de acetamiprid.

En el mismo intervalo de tiempo, el efecto tóxico de acetamiprid y thiamethoxam por separado a concentración 4 mM, fue mayor que el de su mezcla a 2:2 mM. A pesar de que el thiamethoxam disminuyó la viabilidad en un  $39.76 \pm 21.1$  %, no fue significativo en comparación con el  $17.02 \pm 12.7$  % de afectación que generó la mezcla, cifra que, a su vez, fue significativa ante la disminución del  $38.69 \pm 18.5$  % de viabilidad generada por el acetamiprid.

A las 48 horas, se demostró que la combinación de thiamethoxam y acetamiprid en proporción 1:1 mM disminuyó la viabilidad de las células en un  $99.7 \pm 10.6$  % lo cual determinó un efecto tóxico sinérgico al compararlo con los compuestos por separado en concentración 2 mM ( $p < 0.001$ ), en donde el thiamethoxam alcanzó una disminución significativa de las células en  $31.04 \pm 31.6$  % y el acetamiprid un  $48.36 \pm 24.9$  %.

La disminución de la viabilidad generada por la mezcla a 2 mM a las 48 horas, fue de un  $66.05 \pm 7.21$  %, sin embargo, no fue un valor significativo ante el  $59.12 \pm 29.4$  % del thiamethoxam o el  $62.23 \pm 21.2$  % del acetamiprid por separado en concentración 4 mM.

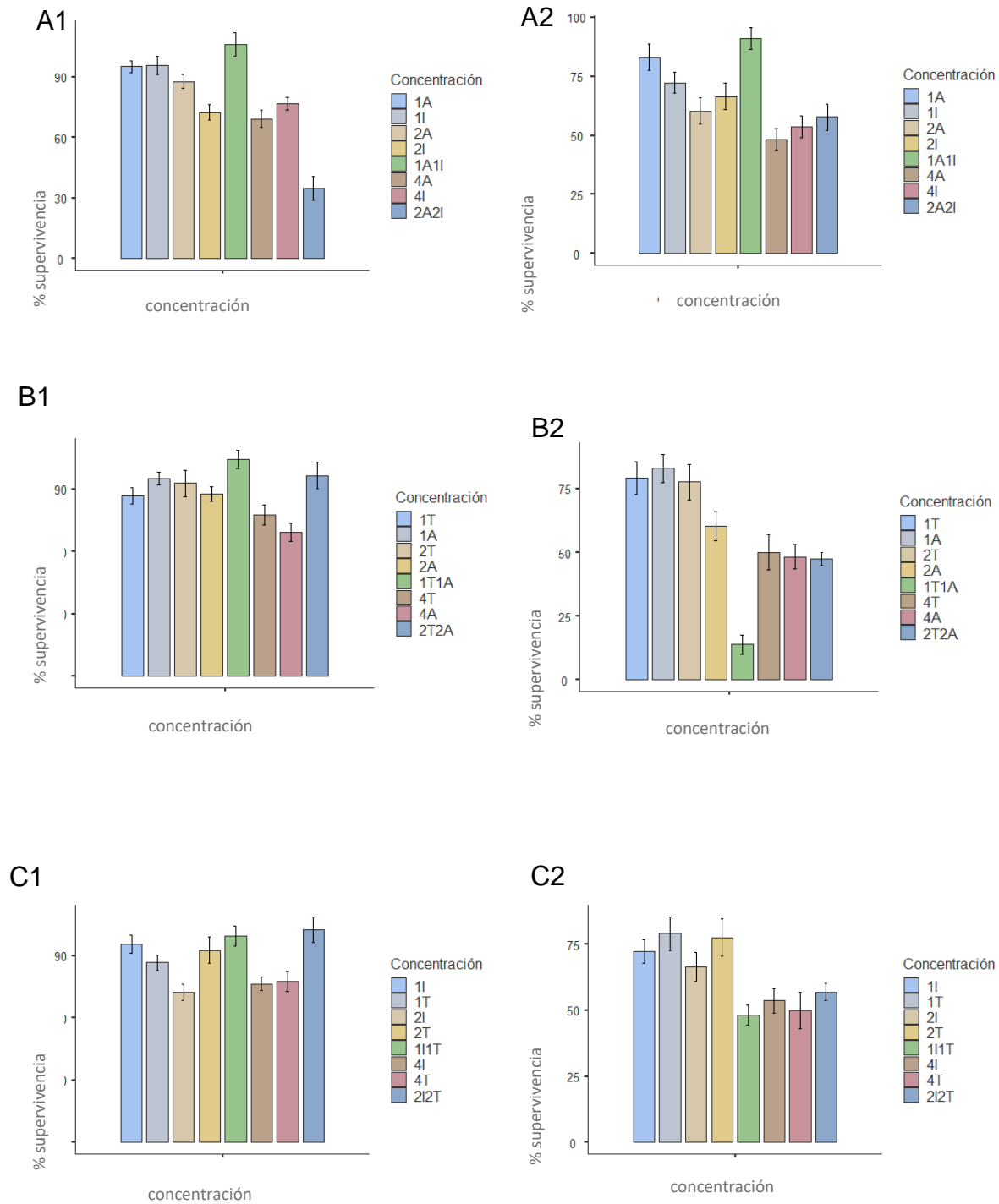
#### **4.2.1.3 Imidacloprid-Thiamethoxam**

A las 24 horas, se encontró que el imidacloprid en solitario a concentración 2 mM tuvo una mayor toxicidad sobre las células que en su combinación con thiamethoxam a 1 mM ( $p < 0.05$ ), puesto que redujo la viabilidad celular en un  $40.1 \pm 18.2$  %, en comparación con el  $15.5 \pm 13.8$  % de la mezcla. La diferencia entre la reducción de viabilidad ocasionada por la mezcla de compuestos y la del thiamethoxam en solitario a 2 mM no fue significativa, ya que alcanzó un  $17.5 \pm 28.4$  %.

Situación similar se evidenció en el mismo intervalo con el imidacloprid a 4 mM, ya que disminuyó un  $35.9 \pm 15.3$  % de las células, lo cual es significativamente mayor

que la cifra alcanzada con la mezcla del compuesto con thiamethoxam a 2 mM ( $p < 0.05$ ), que redujo la población celular en un  $12.4 \pm 28.4$  %. Este último valor de afectación dada por la mezcla no fue significativo en comparación con el thiamethoxam en solitario a 4 mM, que, de forma similar, alcanzó un  $32.9 \pm 21.1$  %.

A las 48 horas, no se registró diferencias significativas entre las mezclas tanto en proporción 1:1 mM como 2:2 mM y los compuestos por separado (ver tabla 13), esto a pesar de que fue alta la disminución de células que causaron las mezclas. En conjunto imidacloprid y thiamethoxam a 1 mM tuvo una afectación del  $66.9 \pm 10.7$  % de la viabilidad, imidacloprid por su lado a 2 mM una afectación de  $43.6 \pm 24.4$  % y thiamethoxam una de  $32.5 \pm 31.6$  %.



**Figura 4** Interacción de los compuestos: *Ensayo MTT*. A1: Acetamiprid-Imidacloprid % muerte a las 24 horas. A2: Acetamiprid-Imidacloprid % muerte 48 horas. B1: Thiamethoxam-Acetamiprid % muerte a las 24 horas. B2:

Thiamethoxam-Acetamiprid % muerte a las 48 horas. C1: Imidacloprid-Thiamethoxam % muerte a las 24 horas. C2: Imidacloprid-Thiamethoxam % muerte a las 48 horas. (1=1mM, 2=2mM, 4=4mM)

*Tabla 11*

ANOVA de la significancia de los factores tiempo, concentración y la interacción de estos sobre la viabilidad celular en cada mezcla de compuestos

Compuestos	Tiempo		Concentración		Tiempo*concentración	
	F value	p value	F value	p value	F value	p value
Acetamiprid-Imidacloprid	27.68	< .001	15.8	< .001	4.23	< .001
Thiamethoxam-Acetamiprid	160.1	< .001	7.09	< .001	10.9	< .001
Imidacloprid-Thiamethoxam	76.72	< .001	4.81	< .001	4.28	< .001

*Tabla 12*

Prueba Tukey Post Hoc respecto a la significancia de los efectos del tiempo sobre la viabilidad celular a las 24 y 48 horas

Post Hoc Comparisons - Tiempo

Compuesto	Comparison		Diferencia principal	ptukey	pbonferroni
	Tiempo	Tiempo			
Acetamiprid	24 horas	48 horas	12.6	< .001	< .001
Imidacloprid	24 horas	48 horas	35.2	< .001	< .001
Thiamethoxam	24 horas	48 horas	23.8	< .001	< .001

*Tabla 13*

Prueba Tukey Post Hoc respecto a la influencia de la concentración de las mezclas de compuestos en la supervivencia celular en los intervalos de 24 y 48 horas

Post Hoc comparisons

Compuesto	Tiempo	Concentración (mM)	Concentración (mM)	Diferencia principal	ptukey
Acetamiprid-Imidacloprid	24 horas	2A	1A1I	-18.4	0.174
		2I		-33.7	< .001
		4A	2A2I	34.4	< .001
		4I		41.8	< .001

	48 horas	2A		-30.72	0.023
		2I	1A1I	-24.5	0.14
		4A		-9.43	0.969
		4I	2A2I	-4.06	1
Thiamethoxam-Acetamiprid	24 horas	2T		-11.49	0.846
		2A	1T1A	-16.49	0.434
		4T		-19.05	0.28
		4A	2T2A	-27.43	0.022
	48 horas	2T		63.8	< .001
		2A	1T1A	46.4	< .001
		4T		2.47	1
		4A	2T2A	0.742	1
Imidacloprid-Thiamethoxam	24 horas	2I		-27.25	0.026
		2T	1I1T	-6.96	0.991
		4I		-26.21	0.038
		4T	2I2T	-25.25	0.065
	48 horas	2I		18.3	0.632
		2T	1I1T	29.4	0.089
		4I		-3.29	1
		4T	2I2T	-6.93	0.998

#### 4.2.2 Ensayo LDH

Se confirmó que los factores tiempo, concentración y su interacción tuvieron una influencia significativa en la muerte de las células (ver tabla 14). Existieron diferencias significativas entre los dos tiempos de exposición empleados en el estudio, sin embargo, las diferencias entre los efectos de las diferentes concentraciones se restringieron a las 24 horas en los 3 casos (tabla 15 y 16).

##### 4.2.2.1 Acetamiprid-imidacloprid

A las 24 horas, no pudo confirmarse la sinergia existente entre acetamiprid e imidacloprid a una concentración de 2:2 mM dada en el ensayo de MTT (ver fig. 4).



La muerte celular que se generó por la mezcla de los compuestos en proporción 1:1 mM fue de  $82.1 \pm 32.1$  %, cifra significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) al compuesto imidacloprid en solitario en concentración 2 mM, el cual alcanzó un  $34.6 \pm 28.4$  % de muerte, pero no presentó diferencias significativas con el porcentaje de muerte ocasionado por el compuesto acetamiprid a 2 mM por separado, el cual alcanzó el  $31.6 \pm 27.2$  % de muerte.

La combinación de los compuestos a 2 mM llegó a producir el  $106 \pm 19.9$  % de muerte de las células, suceso significativo ( $p < 0.001$ ) frente a los efectos del imidacloprid en solitario a una concentración de 4 mM, que consiguió un  $36.2 \pm 27.9$  % de muerte, pero no significativo frente al  $96.9 \pm 38.9$  % de muerte que alcanzó el acetamiprid por sí solo en la misma concentración.

A las 48 horas, no se obtuvo resultados estadísticamente significativos respecto a las mezclas en comparación con los compuestos por separado, comprobando de esta manera lo registrado en el ensayo MTT (ver tabla 16). La combinación de acetamiprid e imidacloprid a 1 mM, por ejemplo, causó un  $43.5 \pm 7.54$  %, mientras que por separado acetamiprid a 2 mM llegó a un  $26.6 \pm 15.8$  % y thiamethoxam a  $22.5 \pm 18.4$  %. A concentración 2 mM la mezcla provocó un  $52.2 \pm 13.5$  % de muerte, pero por separado acetamiprid e imidacloprid a 4 mM llegaron a  $39.3 \pm 32.8$  % y  $29 \pm 18.5$  % respectivamente.

#### **4.2.2.2 Thiamethoxam-acetamiprid**

En el caso de la combinación de compuestos thiamethoxam y acetamiprid, en proporción 2:2 mM produjeron el  $112.4 \pm 13.3$  % de muerte de la población celular a las 24 horas de exposición, valor que fue, a su vez, significativamente superior al  $35.3 \pm 32$  % de muerte por parte del compuesto thiamethoxam en concentración 4 mM ( $p < 0.001$ ) pero no significativo al  $97.3 \pm 38.9$  % del acetamiprid a 4 mM.

Por otro lado, la combinación de los compuestos en proporción 1: 1 mM no tuvo resultados significativos en ambos períodos de exposición de las células, y de la

misma forma la combinación de estos en proporción 2:2 a las 48 horas (ver tabla 16). El ensayo mostró que, a las 24 horas, a concentración 1 mM los compuestos juntos llegaron a provocar el  $82.3 \pm 26.9$  %, y los compuestos thiamethoxam y acetamiprid por separado a concentración 2 mM ocasionaron un  $41.5 \pm 30.4$  % y  $49 \pm 27.2$  %, respectivamente. La afectación generada a más de la mitad de la población de las células también se dio con los compuestos combinados a 2 mM, los cuales provocaron la muerte del  $53.8 \pm 10.1$  % de las células, y los compuestos por separado a 4mM, un  $34 \pm 17.7$  % en el caso del thiamethoxam y el  $39.7 \pm 32.8$  % con acetamiprid.

A las 48 horas la mezcla a 1 mM causó un porcentaje menor de muerte, el cual fue de  $34.1 \pm 1.93$  %, no significativo frente al  $24.6 \pm 17.1$  % del thiamethoxam y el  $27 \pm 15.8$  % del acetamiprid en solitario a concentración 2 mM.

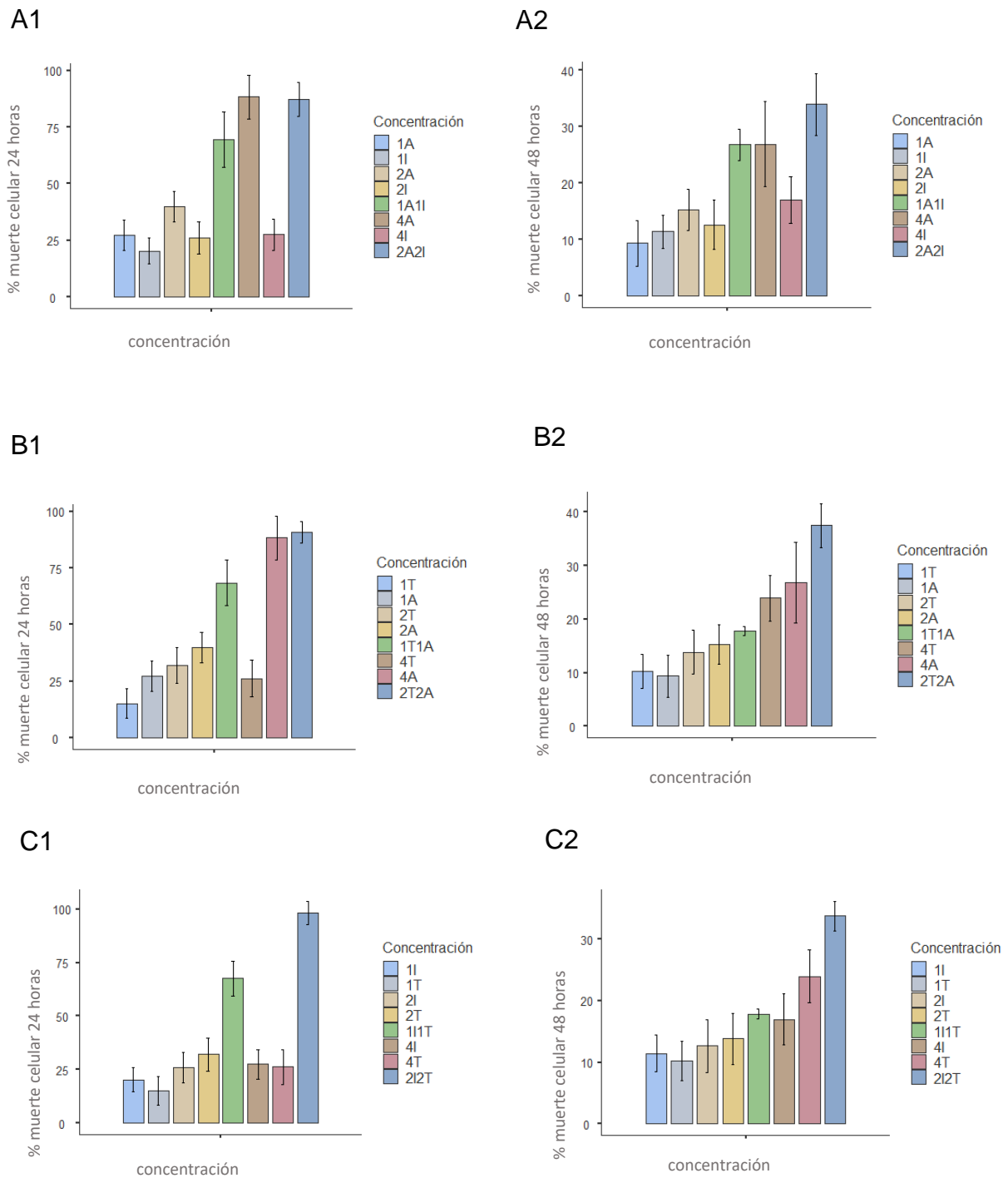
#### **4.2.2.3 Imidacloprid-thiamethoxam**

A las 24 horas, la mezcla de los compuestos imidacloprid y thiamethoxam en concentración 1:1 mM, provocó un  $84.1 \pm 21.5$  % de muerte celular, con significancia en comparación con la acción del compuesto imidacloprid en solitario en concentración 2 mM, cuyo porcentaje de muerte llegó al  $32.2 \pm 28.4$  % e irrelevante en comparación con thiamethoxam (2 mM) que alcanzó un  $38.6 \pm 30.4$  %.

En el mismo intervalo de tiempo, los compuestos juntos mostraron un comportamiento sinérgico en proporción 2: 2 mM, dado que provocaron la muerte del  $114.6 \pm 14.7$  % de células, hecho que es significativo en comparación con los efectos de los dos compuestos en solitario a 4 mM, que registraron un  $33.7 \pm 27.9$  % de muerte en el caso del imidacloprid, y un  $32.4 \pm 32$  % de muerte en el caso del thiamethoxam.

A las 48 horas, no hubo diferencias significativas entre las mezclas y los compuestos por separado. En este contexto, el ensayo evidenció que la mezcla de los compuestos a 1 mM alcanzó el  $30.3 \pm 1.97$  %, valor que no fue significativo frente a la acción de los compuestos por separado, que llegaron a generar un  $20.2 \pm 18.4$  % de muerte en el caso del imidacloprid y el  $21.7 \pm 17.1$  % en el del thiamethoxam. En el mismo intervalo la mezcla alcanzó un  $46.3 \pm 5.82$  % de muerte en proporción 2:2 mM, mientras que el acetamiprid y thiamethoxam un  $26.5 \pm 18.5$  % y  $31.1 \pm 17.7$  % respectivamente.

Existieron discrepancias en cuanto a los resultados de los efectos sinérgicos que habían sido registrados con el ensayo MTT. Este hecho, que ya había sido evidenciado con anterioridad en el estudio, puede deberse a los mecanismos de muerte ocasionados en cada caso. Mientras MTT constituye una prueba indirecta, que mide el bloqueo de la actividad mitocondrial, LDH es una del tipo directa que mide la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa.



**Figura 4** Interacción de los compuestos: *Ensayo LDH*. A1: Acetamidiprid-Imidacloprid % muerte a las 24 horas. A2: Acetamidiprid-Imidacloprid % muerte 48 horas. B1: Thiamethoxam-Acetamidiprid % muerte a las 24 horas. B2: Thiamethoxam-Acetamidiprid % muerte a las 48 horas. C1: Imidacloprid-

Thiamethoxam % muerte a las 24 horas. C2: Imidacloprid-Thiamethoxam % muerte a las 48 horas. (1=1mM, 2=2mM, 4=4mM)

**Tabla 14:**

ANOVA de la influencia de los factores: tiempo, concentración y la interacción de ambos sobre la muerte celular

Compuestos	Tiempo		Concentración		Tiempo*concentración	
	F value	p value	F value	p value	F value	p value
Acetamiprid-Imidacloprid	42.57	< .001	14.6	< .001	3.54	0.002
Thiamethoxam-Acetamiprid	44.69	< .001	18	< .001	4.07	< .001
Imidacloprid-Thiamethoxam	35.3	< .001	11.8	< .001	4.08	< .001

**Tabla 15**

Prueba Tukey Post Hoc respecto a la influencia de la variación del tiempo de exposición sobre la respuesta de muerte celular

Post Hoc Comparisons - Tiempo

Compuesto	Comparison		Mean Difference	ptukey	pbonferroni
	Tiempo	Tiempo			
Acetamiprid-Imidacloprid	24 horas	48 horas	26.7	< .001	< .001
Thiamethoxam-Acetamiprid	24 horas	48 horas	28.1	< .001	< .001
Imidacloprid-Thiamethoxam	24 horas	48 horas	21.3	< .001	< .001

**Tabla 16**

Prueba Tukey Post Hoc respecto a la influencia de la concentración de las combinaciones sobre la muerte celular en los intervalos de 24 y 48 horas

Comparación Post Hoc

Compuesto	Tiempo	Concentración	Concentración	Diferencia principal	ptukey
Acetamiprid-Imidacloprid	24 horas	2A	1A1I	-29.5	0.324
		2I		-43.5	0.025
		4A	2A2I	0.983	1
		4I		-59.74	< .001
	48 horas	2A	1A1I	-11.5	0.886
		2I		-14.2	0.737
		4A	2A2I	-7.04	0.995
		4I		-16.99	0.582
Thiamethoxam-Acetamiprid	24 horas	2T	1T1A	-36.4	0.133

		2A		-28.6	0.394
		4T		-64.54	< .001
		4A	2T2A	-2.54	1
	48 horas	2T		-3.99	1
		2A	1T1A	-2.54	1
		4T		-13.6	0.821
		4A	2T2A	-10.6	0.94
Imidacloprid-Thiamethoxam	24 horas	2I		-41.6	0.022
		2T	1I1T	-35.5	0.092
		4I		-70.7	< .001
		4T	2I2T	-71.9	< .001
	48 horas	2I		-5.2	0.997
		2T	1I1T	-4.01	0.999
		4I		-16.81	0.31
		4T	2I2T	-9.85	0.892

No es posible contrastar los resultados de la exploración de los efectos sinérgicos obtenidos con estudios paralelos debido a que no existe evidencia similar de la citotoxicidad de las mezclas *in vitro*. En lo que respecta a estudios *in vivo*, se omiten pruebas relacionadas con la afectación en procesos del neurodesarrollo y se restringen a la demostración de la toxicidad en polinizadores. Tal es caso de la investigación de Zhu et al., (2017), donde se recreó la exposición real de las abejas (*Aphis mellifera*) frente a los neonicotinoides, mediante la alimentación de las mismas con imidacloprid solo o en mezcla junto a otros 6 pesticidas de distintas clases. Se evidenció que el pesticida solo, a una concentración de 4.3 mg/L indujo a una mortalidad del 36% después de 2 semanas de alimentación. Sin embargo, no se detectó una toxicidad sinérgica a partir de las mezclas binarias del pesticida con los otros que se pusieron a prueba a dosis subletales (Zhu et al., 2017).

La investigación de la exposición humana a los neonicotinoides toma relevancia debido a la susceptibilidad que presenta el sistema nervioso en desarrollo ante la exposición a químicos, sobre todo en etapas tempranas. Esto está relacionado

con procesos complejos y específicos tales como la proliferación inicial, migración, diferenciación de células gliales y neuronales, la sinaptogénesis, mielinización y la maduración funcional tanto neuronal como glial (Stiles & Jernigan, 2010). En los infantes, los receptores nicotínicos de la acetilcolina, que son los blancos de los insecticidas, son importantes para el desarrollo normal del cerebro (Role & Berg, 1996).

La exploración *in vivo* de la afectación que causan los neonicotinoides de manera individual a nivel de neurodesarrollo, ha demostrado que, en ratas por ejemplo, la exposición aguda en la etapa de gestación produce deterioro del desarrollo sensorial y motor, aumento de la actividad cerebral de la acetilcolinesterasa y también expresión de proteínas ácidas gliales en la descendencia adolescente (Abou-Donia et al., 2008). En lo que se refiere a la exposición postnatal, se ha verificado una afectación en la consolidación de la memoria de ratas adultas (Özdemir et al., 2014). Otros estudios realizados en etapas embrionales han evidenciado una disminución de las capacidades nadadoras de larvas de peces cebrá, así como también un aumento de las respuestas sensoriales y motoras (Crosby, Bailey, Oliveri, & Levin, 2015).

El uso de los ensayos *in vitro* pueden considerarse herramientas que constituyen una valiosa evidencia paralela a las pruebas con animales y que pueden ayudar a entender los mecanismos celulares y moleculares que están involucrados en la toxicidad del neurodesarrollo (EFSA PPR Panel, 2013).

La evaluación de la toxicidad de los químicos en el neurodesarrollo depende no solo del tiempo de exposición y la dosis aplicada de las sustancias, sino también de la etapa de desarrollo del cerebro que se está exponiendo (Rice & Barone, 2000). El estudio de la vulnerabilidad del sistema nervioso en formación, por ejemplo, debe considerar la inmadurez de la barrera hematoencefálica, la cual no está formada completamente al menos hasta los 6 meses después del nacimiento, y que facilita la entrada de químicos en el cerebro fetal o neonatal (Adinolfi, 1985).

En la relación existente entre el crecimiento de neuronas durante el desarrollo y su deterioro, incluso las más sutiles alteraciones en el proceso pueden tener repercusiones en el proceso y desencadenar disfunción en el sistema nervioso central (Ramakers, 2002; Webb, Monk, & Nelson, 2001), Del presente estudio se puede sugerir que la afectación de los insecticidas neonicotinoides en la disminución de la viabilidad de las células SH-SY5Y podría estar relacionada con una afectación en los procesos iniciales del neurodesarrollo, lo cual muy probablemente tenga impacto en los escenarios posteriores de desarrollo del sistema nervioso central.



## **5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **5.1 Conclusiones**

La toxicidad de los compuestos acetamiprid, imidacloprid y thiamethoxam tuvo un comportamiento dosis dependiente. Los períodos de exposición de 24 y 48 horas, así como las concentraciones de 2 y 4 mM fueron los que generaron una afectación significativa en la viabilidad de las células.

El compuesto imidacloprid mostró un comportamiento sinérgico en combinación tanto con acetamiprid como thiamethoxam en concentración 2 mM, en el período de 24 horas de exposición de las células SH-SY5Y. El acetamiprid, además, evidenció una combinación de tipo sinérgica con thiamethoxam a las 48 horas de exposición de las células a una concentración 1 mM.

### **5.2 Recomendaciones**

Estudios posteriores deben enfocarse en el análisis de los mecanismos moleculares del daño producido por los neonicotinoides, así como el daño a nivel de ADN.

## REFERENCIAS

- Abdel-Ghany, M. F., Hussein, L. A., El Azab, N. F., El-Khatib, A. H., & Linscheid, M. W. (2016). Simultaneous determination of eight neonicotinoid insecticide residues and two primary metabolites in cucumbers and soil by liquid chromatography–tandem mass spectrometry coupled with QuEChERS. *Journal of Chromatography B*, *1031*, 15–28. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2016.06.020>
- Abou-Donia, M. (2015). *Mammalian Toxicology*. New York, UNITED KINGDOM: John Wiley & Sons, Incorporated. Retrieved from <http://ebookcentral.proquest.com/lib/udlap/detail.action?docID=1943361>
- Abou-Donia, M. B., Goldstein, L. B., Bullman, S., Tu, T., Khan, W. A., Dechkovskaia, A. M., & Abdel-Rahman, A. A. (2008). Imidacloprid induces neurobehavioral deficits and increases expression of glial fibrillary acidic protein in the motor cortex and hippocampus in offspring rats following in utero exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, *71*(2), 119–130. <https://doi.org/10.1080/15287390701613140>
- Abreu-Villaça, Y., & Levin, E. D. (2018). *Developmental Neurobehavioral Neurotoxicity of Insecticides. Handbook of Developmental Neurotoxicology* (Second Edi). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809405-1.00040-7>
- Adinolfi, M. (1985). THE DEVELOPMENT OF THE HUMAN BLOOD-CSF-BRAIN BARRIER. *Developmental Medicine & Child Neurology*, *27*(4), 532–537. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.1985.tb04581.x>
- Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario. (2017). *Reporte de productos de insumos agrícolas (Mayo 2017)*. Retrieved from <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2013/11/plaguicidas-registrados-19-05-2017.pdf>

- Alvim, T. T., & Martinez, C. B. dos R. (2019). Genotoxic and oxidative damage in the freshwater teleost *Prochilodus lineatus* exposed to the insecticides lambda-cyhalothrin and imidacloprid alone and in combination. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 842(June), 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.11.011>
- Annabi, E., Ben Salem, I., & Abid-Essefi, S. (2019). Acetamiprid, a neonicotinoid insecticide, induced cytotoxicity and genotoxicity in PC12 cells. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 1–24. <https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1624907>
- Aykul, S., & Martinez-Hackert, E. (2016). Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Analytical Biochemistry*, 508, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.06.025>
- Bal-Price, A., Pistollato, F., Sachana, M., Bopp, S. K., Munn, S., & Worth, A. (2018). Strategies to improve the regulatory assessment of developmental neurotoxicity (DNT) using in vitro methods. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 354(December 2017), 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.02.008>
- Bal, R., Erdogan, S., Theophilidis, G., Baydas, G., & Naziroglu, M. (2010). Assessing the effects of the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the cholinergic synapses of the stellate cells of the mouse cochlear nucleus using whole-cell patch-clamp recording. *NeuroToxicology*, 31, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2009.10.004>
- Bal, R., Türk, G., Tuzcu, M., Yilmaz, O., Kuloglu, T., Gundogdu, R., ... Etem, E. (2012). Assessment of imidacloprid toxicity on reproductive organ system of adult male rats. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 47(5), 434–444. <https://doi.org/10.1080/03601234.2012.663311>

- Barbee, G. C., & Stout, M. J. (2009). Comparative acute toxicity of neonicotinoid and pyrethroid insecticides to non-target crayfish (*Procambarus clarkii*) associated with rice-crayfish crop rotations. *Pest Management Science*, 65(11), 1250–1256. <https://doi.org/10.1002/ps.1817>
- Bass, C., Denholm, I., Williamson, M. S., & Nauen, R. (2015). The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.04.004>
- Begum, A., Alam, S. N., & Jalal Uddin, M. (2017). Management of Pesticides: Purposes, Uses, and Concerns BT - Pesticide Residue in Foods: Sources, Management, and Control. In M. S. Khan & M. S. Rahman (Eds.) (pp. 53–86). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-52683-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-52683-6_4)
- Brodeur, J. C., Poliserpi, M. B., D'Andrea, M. F., & Sánchez, M. (2014). Synergy between glyphosate- and cypermethrin-based pesticides during acute exposures in tadpoles of the common South American Toad *Rhinella arenarum*. *Chemosphere*, 112, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.065>
- Caballero Bermejo, M. (2015). *Estrés osmótico, inflamación y degeneración neuronal en la enfermedad de Alzheimer: implicación de la proteína asociada a microtúbulos Tau*. Universidad de Extremadura. Universidad de Extremadura.
- Calderón-Segura, M. E., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Martínez-Valenzuela, C., Carbajal-López, Y., Calderón-Ezquerro, M. del C., ... Bañuelos-Ruíz, E. (2012). Evaluation of Genotoxic and Cytotoxic Effects in Human Peripheral Blood Lymphocytes Exposed In Vitro to Neonicotinoid Insecticides News . *Journal of Toxicology*, 2012, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/612647>

- Çavaş, T., Çinkiliç, N., Vatan, O., & Yilmaz, D. (2014). Effects of fullerene nanoparticles on acetamiprid induced cytotoxicity and genotoxicity in cultured human lung fibroblasts. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *114*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.07.008>
- Çavaş, T., Çinkiliç, N., Vatan, Ö., Yilmaz, D., & Coşkun, M. (2012). In vitro genotoxicity evaluation of acetamiprid in CaCo-2 cells using the micronucleus, comet and  $\gamma$ H2AX foci assays. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *104*(3), 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.08.004>
- Cedergreen, N. (2014). Quantifying Synergy: A Systematic Review of Mixture Toxicity Studies within Environmental Toxicology. *PLOS ONE*, *9*(5), e96580. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096580>
- Christen, V., Rusconi, M., Crettaz, P., & Fent, K. (2017). Developmental neurotoxicity of different pesticides in PC-12 cells in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *325*, 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.03.027>
- Crosby, E. B., Bailey, J. M., Oliveri, A. N., & Levin, E. D. (2015). Neurobehavioral impairments caused by developmental imidacloprid exposure in zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology*, *49*, 81–90. <https://doi.org/10.1016/J.NTT.2015.04.006>
- Demsia, G., Vlastos, D., Goumenou, M., & Matthopoulos, D. P. (2007). Assessment of the genotoxicity of imidacloprid and metalaxyl in cultured human lymphocytes and rat bone-marrow. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *634*(1–2), 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.05.018>
- Douglas, M. R., & Tooker, J. F. (2015). Large-scale deployment of seed treatments has driven rapid increase in use of neonicotinoid insecticides and preemptive pest management in U.S. Field crops. *Environmental Science and*

*Technology*, 49(8), 5088–5097. <https://doi.org/10.1021/es506141g>

Drakvik, E., Altenburger, R., Aoki, Y., Backhaus, T., Bahadori, T., Barouki, R., ... Bergman, Å. (2020). Statement on advancing the assessment of chemical mixtures and their risks for human health and the environment. *Environment International*, 134, 105267. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2019.105267>

EFSA PPR Panel, E. P. on P. P. P. and their R. (2013). Scientific Opinion on the developmental neurotoxicity potential of acetamiprid and imidacloprid. *EFSA Journal*, 11(12), 3471. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3471>

Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Cena, V., ... Comella, J. X. (2000). Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *Journal of Neurochemistry*, 75(3), 991–1003. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750991.x>

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2019). Pesticides. Retrieved November 8, 2019, from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/EP/visualize>

Ford, K. A., & Casida, J. E. (2006). Chloropyridinyl neonicotinoid insecticides: diverse molecular substituents contribute to facile metabolism in mice. *Chemical Research in Toxicology*, 19(7), 944–951. <https://doi.org/10.1021/tx0600696>

Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160(2), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.07.001>

Gul, S. T., Khan, A., Ahmad, M., Ahmad, H., Saleemi, M. K., Naseem, M. N., & Bilal, M. (2018). Immuno-toxicological effects of different sub-lethal doses of

- thiamethoxam (TMX) in broiler birds. *Toxin Reviews*, 1–6.  
<https://doi.org/10.1080/15569543.2018.1435554>
- Han, W., Tian, Y., & Shen, X. (2018a). Human exposure to neonicotinoid insecticides and the evaluation of their potential toxicity: An overview. *Chemosphere*, 192, 59–65.  
<https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2017.10.149>
- Han, W., Tian, Y., & Shen, X. (2018b). Human exposure to neonicotinoid insecticides and the evaluation of their potential toxicity: An overview. *Chemosphere*, 192, 59–65.  
<https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2017.10.149>
- Harbison, R. D., Bourgeois, M. M., Johnson, G. T., Lee, R. V, & Stedeford, T. (2015). *Hamilton and Hardy's Industrial Toxicology*. Somerset, UNITED STATES: John Wiley & Sons, Incorporated. Retrieved from <http://ebookcentral.proquest.com/lib/udlap/detail.action?docID=1895641>
- Hirano, T., Minagawa, S., Furusawa, Y., Yunoki, T., Ikenaka, Y., Yokoyama, T., ... Tabuchi, Y. (2019). Growth and neurite stimulating effects of the neonicotinoid pesticide clothianidin on human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 383(August), 114777.  
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114777>
- Hodgson, E., & Roe, M. (2014). *Dictionary of Toxicology*. San Diego, UNITED STATES: Elsevier Science & Technology. Retrieved from <http://ebookcentral.proquest.com/lib/udlap/detail.action?docID=1813083>
- Honda, H., Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2006). Insect nicotinic acetylcholine receptors: neonicotinoid binding site specificity is usually but not always conserved with varied substituents and species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(9), 3365–3371. <https://doi.org/10.1021/jf0601517>

- Jacob, C. R. de O., Zanardi, O. Z., Malaquias, J. B., Souza Silva, C. A., & Yamamoto, P. T. (2019). The impact of four widely used neonicotinoid insecticides on *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae). *Chemosphere*, 224, 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.105>
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., & Elbert, A. (2011). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1–2), 2897–2908. <https://doi.org/10.1021/jf101303g>
- Júlvez, J., Paus, T., Bellinger, D., Eskenazi, B., Tiemeier, H., Pearce, N., ... Sunyer, J. (2016). Environment and brain development: Challenges in the global context. *Neuroepidemiology*, 46(2), 79–82. <https://doi.org/10.1159/000442256>
- Kagabu, S., Moriya, K., Shibuya, K., Hattori, Y., Tsuboi, S., & Kozo, S. (1992). 1-(6-Halonicotinyl)-2-nitromethylene-imidazolidines as Potential New Insecticides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56(2), 362–363. <https://doi.org/10.1271/bbb.56.362>
- Kagawa, N., & Nagao, T. (2018). Neurodevelopmental toxicity in the mouse neocortex following prenatal exposure to acetamiprid. *Journal of Applied Toxicology*, 38(12), 1521–1528. <https://doi.org/10.1002/jat.3692>
- Kimura-kuroda, J., Komuta, Y., Kuroda, Y., Hayashi, M., & Kawano, H. (2012). Nicotine-Like Effects of the Neonicotinoid Insecticides Acetamiprid and Imidacloprid on Cerebellar Neurons from Neonatal Rats. *PLoS ONE*, 7(2), e32432. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032432>
- Kimura-Kuroda, J., Komuta, Y., Kuroda, Y., Hayashi, M., & Kawano, H. (2012). Nicotine-Like Effects of the Neonicotinoid Insecticides Acetamiprid and Imidacloprid on Cerebellar Neurons from Neonatal Rats. *PLOS ONE*, 7(2),



e32432. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032432>

- Kocaman, A. Y., & Topaktaş, M. (2015). In vitro evaluation of the genotoxicity of acetamiprid in human peripheral blood lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 148(April 2014), 483–490. <https://doi.org/10.1002/em>
- Kovalevich, J., & Langford, D. (2013). SH-SY5Y Cell Culture. In A. Shohreh & M. White (Eds.), *Neuronal Cell Culture: Methods and Protocols* (Vol. 1078, pp. 9–21). New York: Springer Science. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-640-5>
- Kuete, V., Karaosmanoğlu, O., & Sivas, H. (2017). Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. In V. B. T.-M. S. and V. from A. Kuete (Ed.), *Medicinal Spices and Vegetables from Africa* (pp. 271–297). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00010-8>
- Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095497>
- Levin, E. D., & Simon, B. B. (1998). Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology*, 138(3–4), 217–230. <https://doi.org/10.1007/s002130050667>
- Lobner, D. (2000). Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: Validity for neuronal apoptosis? *Journal of Neuroscience Methods*, 96(2), 147–152. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(99\)00193-4](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(99)00193-4)
- MAGAP y AGROCALIDAD. (2018). *Reporte de productos insumos agrícolas*.
- Mann, S. (2018). *Socioeconomics of Agriculture* (1st ed.). Switzerland: Springer Open. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/978-3-319-74141-3>
- Miranda, G. R. B., Raetano, C. G., Silva, E., Daam, M. A., & Cerejeira, M. J. (2011). Environmental fate article: Environmental fate of neonicotinoids and

- classification of their potential risks to hypogean, epygean, and surface water ecosystems in Brazil. *Human and Ecological Risk Assessment*, 17(4), 981–995. <https://doi.org/10.1080/10807039.2011.588159>
- Mörtl, M., Darvas, B., Vehovszky, Á., Győri, J., & Székács, A. (2017). Occurrence of neonicotinoids in guttation liquid of maize—soil mobility and cross-contamination. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 97(9), 868–884. <https://doi.org/10.1080/03067319.2017.1370090>
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., Elbert, A., Jeschke, P., & Tietjen, K. (2011). Acetylcholine Receptors as Sites for Developing Neonicotinoid Insecticides. *Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance*, 77–105. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-59549-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-59549-3_4)
- Ospina, M., Wong, L. Y., Baker, S. E., Serafim, A. B., Morales-Agudelo, P., & Calafat, A. M. (2019). Exposure to neonicotinoid insecticides in the U.S. general population: Data from the 2015–2016 national health and nutrition examination survey. *Environmental Research*, 176(June), 108555. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108555>
- Özdemir, H. H., Kara, M., Yumrutas, O., Uckardes, F., Eraslan, E., Demir, C. F., & Bal, R. (2014). Determination of the effects on learning and memory performance and related gene expressions of clothianidin in rat models. *Cognitive Neurodynamics*, 8(5), 411–416. <https://doi.org/10.1007/s11571-014-9293-1>
- Papach, A., Fortini, D., Grateau, S., Aupinel, P., & Richard, F.-J. (2017). Larval exposure to thiamethoxam and American foulbrood: effects on mortality and cognition in the honey bee *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 56(4), 475–486. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1332541>
- Parkinson, R. H., & Gray, J. R. (2019). Neural conduction, visual motion detection,

and insect flight behaviour are disrupted by low doses of imidacloprid and its metabolites. *NeuroToxicology*, 72(September 2018), 107–113.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.02.012>

Patravale, V., Dandekar, P., & Jain, R. (2012). Nanotoxicology: evaluating toxicity potential of drug-nanoparticles. In V. Patravale, P. Dandekar, & R. B. T.-N. D. D. Jain (Eds.), *Woodhead Publishing Series in Biomedicine* (pp. 123–155). Woodhead Publishing.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9781908818195.123>

Pohorecka, K., Skubida, P., Miszczak, A., Semkiw, P., Sikorski, P., Zagibajło, K., ... Bober, A. (2012). Residues of Neonicotinoid Insecticides in Bee Collected Plant Materials from Oilseed Rape Crops and their Effect on Bee Colonies. *Journal of Apicultural Science*, 56(2), 115–134.  
<https://doi.org/10.2478/v10289-012-0029-3>

Ramakers, G. J. A. (2002). Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends in Neurosciences*, 25(4), 191–199.  
[https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(00\)02118-4](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(00)02118-4)

Rice, D., & Barone, S. (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environmental Health Perspectives*, 108(suppl 3), 511–533.  
<https://doi.org/10.1289/ehp.00108s3511>

Role, L. W., & Berg, D. K. (1996). Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron*, 16(6), 1077–1085.  
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80134-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80134-8)

Ross, R. A., Spengler, B. A., & Biedler, J. L. (1983). Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 71(4), 741–747.

- Sano, K., Isobe, T., Yang, J., Win-Shwe, T. T., Yoshikane, M., Nakayama, S. F., ... Maekawa, F. (2016). In utero and lactational exposure to acetamiprid induces abnormalities in socio-sexual and anxiety-related behaviors of male mice. *Frontiers in Neuroscience*, *10*(JUN), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00228>
- Şenyıldız, M., Kilinc, A., & Ozden, S. (2018). Investigation of the genotoxic and cytotoxic effects of widely used neonicotinoid insecticides in HepG2 and SH-SY5Y cells. *Toxicology and Industrial Health*, *34*(6), 375–383. <https://doi.org/10.1177/0748233718762609>
- Sheets, L. P., Li, A. A., Minnema, D. J., Collier, R. H., Creek, M. R., & Pepper, R. C. (2016). A critical review of neonicotinoid insecticides for developmental neurotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, *46*(2), 153–190. <https://doi.org/10.3109/10408444.2015.1090948>
- Sigma-Aldrich. (n.d.). In Vitro Toxicology Assay Kit, Lactic Dehydrogenase based.
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Chagnon, M., Downs, C., ... Wiemers, M. (2015). Systemic insecticides (Neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(1), 5–34. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3470-y>
- Stiles, J., & Jernigan, T. L. (2010). The Basics of Brain Development. *Neuropsychology Review*, *20*(4), 327–348. <https://doi.org/10.1007/s11065-010-9148-4>
- Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2003). Selective Toxicity of Neonicotinoids attributable To Specificity of Insect and Mammalian Nicotinic Receptors. *Annual Review of Entomology*, *48*(1), 339–364. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.48.091801.112731>

- Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2004a). NEONICOTINOID INSECTICIDE TOXICOLOGY: Mechanisms of Selective Action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45(1), 247–268. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930>
- Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2004b). NEONICOTINOID INSECTICIDE TOXICOLOGY: Mechanisms of Selective Action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45(1), 247–268. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930>
- Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2011, April). Neonicotinoid insecticides: highlights of a symposium on strategic molecular designs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. United States. <https://doi.org/10.1021/jf103856c>
- Wang, X., Anadon, A., Wu, Q., Qiao, F., Ares, I., Martinez-Larranaga, M.-R., ... Martinez, M.-A. (2018). Mechanism of Neonicotinoid Toxicity: Impact on Oxidative Stress and Metabolism. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 58, 471–507. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010617-052429>
- Webb, S. J., Monk, C. S., & Nelson, C. A. (2001). Mechanisms of postnatal neurobiological development: implications for human development. *Developmental Neuropsychology*, 19(2), 147–171. [https://doi.org/10.1207/S15326942DN1902\\_2](https://doi.org/10.1207/S15326942DN1902_2)
- Westerink, R. H. S. (2013). Do we really want to REACH out to in vitro? *NeuroToxicology*, 39(October 2013), 169–172. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2013.10.001>
- Yun, X., Huang, Q., Rao, W., Xiao, C., Zhang, T., Mao, Z., & Wan, Z. (2017). A comparative assessment of cytotoxicity of commonly used agricultural insecticides to human and insect cells. *Ecotoxicology and Environmental*

*Safety*, 137(October 2016), 179–185.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.12.002>

Zhu, Y. C., Yao, J., Adamczyk, J., & Luttrell, R. (2017). Feeding toxicity and impact of imidacloprid formulation and mixtures with six representative pesticides at residue concentrations on honey bee physiology (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*, 12(6), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178421>



