



**FACULTADE DE CIENCIAS**

**GRAO EN BIOQUÍMICA**

**D.<sup>a</sup> Meilí Jiménez Gancedo**

**Evaluación de los efectos de los pesticidas en dos  
líneas celulares**  
**Avaliación dos efectos dos pesticidas en dúas liñas  
celulares**  
**Evaluation of the effects of pesticides on two cell  
lines**

**Traballo Fin de Grao**

*Junio 2025*

## LICENCIA

Esta obra pertenece a Meilí Jiménez Gancedo, y está sujeta a la licencia Reconocimiento Compartir Igual 4.0 Internacional de Creative Commons. Para ver una copia de esta licencia, visite <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>



## ÍNDICE

Índice .....	3
Índice de figuras .....	5
Abreviaturas.....	6
Resumen, resumen, abstract .....	9
Resumen .....	9
Resumo .....	9
Abstract.....	10
1.    Introducción.....	12
1.1    Efectos de los pesticidas en el medio ambiente.....	14
1.1.1    Contaminación del medio acuático por pesticidas .....	14
1.1.2    Efectos perjudiciales de los pesticidas en la salud humana.....	14
1.2    Estructura química y mecanismo de acción de los pesticidas empleados .....	15
1.2.1    Metolacloro y metazacloro .....	15
1.2.2    Clorpirifós.....	16
1.3    Regulación legal de los pesticidas .....	17
2.    Objetivos.....	19
3.    Materiales y métodos.....	20
3.1 Pesticidas .....	20
3.2 Cultivos celulares .....	20
3.2.1    Línea celular derivada de neuroblastoma de ratón (Neuro-2a, N2a).....	20
3.2.2    Línea celular embrionaria de riñón humano transfectada (HEK293 Nav1.6).....	23
3.3    Determinación de la viabilidad celular .....	23
3.3.1    MTT.....	24
3.3.2    Alamar blue .....	26
3.4    Análisis estadístico .....	28

4.	Resultados.....	29
4.1	Viabilidad celular de la línea Neuro-2a.....	29
4.1.1	Ensayos realizados mediante MTT .....	29
4.1.2	Ensayos realizados mediante Alamar Blue .....	32
4.2	Viabilidad celular de la línea HEK293 Na <sub>v</sub> 1.6.....	35
4.2.1	Ensayos realizados con MTT .....	35
4.2.2	Ensayos realizados con Alamar Blue .....	37
5.	Discusión .....	41
6.	Conclusión.....	44
7.	Referencias bibliográficas .....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Uso global de pesticidas por categorías desde 1990 hasta 20022.</i> .....	12
<b>Figura 2.</b> <i>Principales vías de entrada de los pesticidas al medio acuático</i> .....	13
<b>Figura 3.</b> <i>Estructura química del metolacloro y el metazacloro</i> .....	16
<b>Figura 4.</b> <i>Estructura química del clorpirifós</i> .....	17
<b>Figura 5.</b> <i>Línea celular de neuroblastoma murino Neuro-2a</i> .....	21
<b>Figura 6.</b> <i>Estructura química de la forskolina.</i> .....	22
<b>Figura 7.</b> <i>Línea celular embrionaria humana HEK293 Na<sub>v</sub>1.6</i> .....	23
<b>Figura 8.</b> <i>Reacción de reducción del MTT a formazán</i> .....	25
<b>Figura 9.</b> <i>Ensayo de viabilidad MTT</i> .....	26
<b>Figura 10.</b> <i>Reducción de la resazurina a resorufina</i> .....	27
<b>Figura 11.</b> <i>Ensayo de viabilidad mediante Alamar Blue</i> .....	28
<b>Figura 12.</b> <i>Efecto de los pesticidas metolacloro, clorpirifós y metazacloro en la viabilidad de la línea celular Neuro-2a a las 72 horas de exposición, evaluado mediante el ensayo MTT, en células sin diferenciar y en células diferenciadas con forskolina 10 µM</i> .....	31
<b>Figura 13.</b> <i>Viabilidad de la línea de células de ratón Neuro-2a después de la exposición a metolacloro, clorpirifós y metazacloro durante 24, 48 y 72 horas, evaluada mediante el ensayo Alamar Blue en células sin diferenciar</i> .....	34
<b>Figura 14.</b> <i>Efecto de los pesticidas metolacloro, clorpirifós y metazacloro sobre la viabilidad celular de la línea de origen humano HEK293 Na<sub>v</sub>1.6 tras 72 horas de exposición, determinada mediante el ensayo MTT</i> .....	36
<b>Figura 15.</b> <i>Efecto de los pesticidas metolacloro, clorpirifós y metazacloro sobre la viabilidad de células HEK293 Nav1.6 a las 24, 48 y 72 horas de exposición a diferentes concentraciones de estos compuestos, valorada mediante el ensayo Alamar Blue</i> .....	40

## ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclasa
Ach	Acetilcolina
AchE	Acetilcolinesterasa
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de la varianza
ATCC	Colección Americana de Cultivos (American Type Culture Collection)
dbcAMP	Dibutiril adenosín monofosfato cíclico
CINEA	Agencia Ejecutiva Europea de Clima, Infraestructuras y Medio ambiente (European Climate, Infrastructure and Environment Executive Agency)
CE	Comunidad Europea
CFTR	Canal de cloro dependiente de ATP (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)
CPF	Clorpirifós
DMEM/F12	Medio de cultivo (Dulbecco's Modified Eagle Medium/ Ham's F12)
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEA	Agencia europea de medio ambiente (European Environment Agency)
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority)
EPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (Environmental Protection Agency)
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Food and Agriculture Organization)

FBS	Suero fetal bovino (Fetal bovine serum)
GLUT4	Transportador de glucosa de tipo 4 (Glucose transport type 4)
HBSS	Solución salina balanceada de Hanks (Hank's balanced salt solution)
HEK293	Línea celular derivada de células de riñón embrionario humano (Human embryonic kidney)
HEK293 Na <sub>v</sub> 1.6	Línea celular derivada de células de riñón embrionario humano modificada para sobreexpresar el canal de sodio Na <sub>v</sub> 1.6
HepG2	Línea celular derivada de carcinoma hepatocelular humano
HeLa	Línea celular derivada de cáncer de cuello uterino humano (Henrietta Lacks)
hNSC1	Células madre neuronales humanas tipo 1 (Human neural stem cell 1)
LIFE	Instrumento financiero para el medio ambiente (L'Instrument Financier pour l'Environnement)
LMR	Límite máximo de residuos
MITECO	Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico
MET	Metolacoloro
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
MTZ	Metazacloro
Neuro-2a, N2a	Línea celular de neuroblastoma de ratón
OMS	Organización mundial de la salud
PBS	Tampón fosfato salino (Phosphate buffered saline)
PKA	Proteín quinasa A
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI-1640	Medio de cultivo (Roswell Park Memorial Institute medium)

SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Error estándar de la media (Standard error of the mean)
T25	Frascos de cultivo con un área de superficie de 25 cm <sup>2</sup>
UE	Unión Europea
VLCFAs	Ácidos grasos de cadena muy larga (Very-long-chain fatty acids)
v/v	Relación volumen-volumen

## RESUMEN, RESUMO, ABSTRACT

### RESUMEN

El aumento del uso de pesticidas para maximizar el rendimiento agrícola ha generado una creciente preocupación a nivel mundial debido los efectos adversos de estos compuestos sobre el medio ambiente y la salud humana. Además de afectar a las especies diana, los pesticidas pueden perjudicar a otros organismos, generar desequilibrios ecológicos y bioacumularse en los tejidos, lo que incrementa su toxicidad a lo largo de la cadena trófica. En humanos, la exposición a estos compuestos puede provocar desde síntomas leves hasta efectos graves e incluso letales, tanto en exposiciones agudas como crónicas.

En este Trabajo de Fin de Grado se evaluaron los efectos citotóxicos de tres pesticidas ampliamente empleados (metolacloro, metazacloro y clorpirifós) en dos líneas celulares: Neuro-2a (neuroblastoma murino) y HEK293 Na<sub>v</sub>1.6 (derivada de riñón embrionario humano). Se analizaron distintas concentraciones de cada compuesto mediante los ensayos MTT (tras 72 horas de exposición) y Alamar Blue (a las 24, 48 y 72 horas de exposición).

Los resultados mostraron que ninguno de los pesticidas, a las concentraciones evaluadas, produjo una disminución significativa en la viabilidad celular. No obstante, no se pueden descartar posibles efectos citotóxicos a concentraciones más elevadas ni otros tipos de alteraciones celulares, por lo que se consideran necesarias investigaciones adicionales que permitan ampliar la evaluación del riesgo asociado a la exposición a estos compuestos.

**PALABRAS CLAVE:** pesticidas, plaguicidas, metolacloro, clorpirifós, metazacloro, citotoxicidad, viabilidad celular, Neuro-2a, HEK293 Na<sub>v</sub>1.6, MTT, Alamar Blue.

### RESUMO

O uso crecente de pesticidas para maximizar o rendemento agrícola xerou unha preocupación cada vez maior a nivel mundial debido aos efectos adversos destes compostos sobre o medio ambiente e a saúde humana. Ademais de afectar ás especies diana, os pesticidas poden prexudicar a outros organismos, xerar desequilibrios ecolóxicos e bioacumularse nos tecidos, o que incrementa a súa toxicidade ao longo da cadea trófica. En humanos, a exposición a estes compostos pode provocar dende síntomas leves ata efectos graves e mesmo letais, tanto en exposicións agudas como crónicas.

Neste traballo de fin de grao avaliáronse os efectos citotóxicos de tres pesticidas amplamente empregados (metolacloro, metazacloro e clorpirifós) en dúas liñas celulares: Neuro-2a (neuroblastoma murino) e HEK293 Na<sub>v</sub>1.6 (derivada de ril embrionario humano). Analizáronse distintas concentracións de cada composto mediante os ensaios MTT (despois de 72 horas de exposición) e Alamar Blue (ás 24, 48 e 72 horas de exposición).

Os resultados mostraron que ningún dos pesticidas, nas concentracións avaliadas, produciu unha diminución significativa na viabilidade celular. Porén, non se poden descartar posibles efectos citotóxicos a concentracións máis elevadas nin outros tipos de alteracións celulares, polo que se consideran necesarias investigacións adicionais que permitan ampliar a avaliación do risco asociado á exposición a estes compostos.

**PALABRAS CHAVE:** pesticidas, praguicidas, metolacloro, clorpirifós, metazacloro, citotoxicidade, viabilidade celular, Neuro-2a, HEK293 Na<sub>v</sub>1.6, MTT, Alamar Blue.

## ABSTRACT

The increasing use of pesticides to maximize agricultural yield has generated growing concern worldwide due to the adverse effects of these compounds on both the environment and human health. In addition to affecting target species, pesticides can harm other organisms, disrupt the ecological balance, and bioaccumulate in tissues, thereby increasing their toxicity throughout the food chain. In humans, exposure to these compounds can lead to a wide range of effects, from mild symptoms to severe and even lethal outcomes, in both acute and chronic exposures.

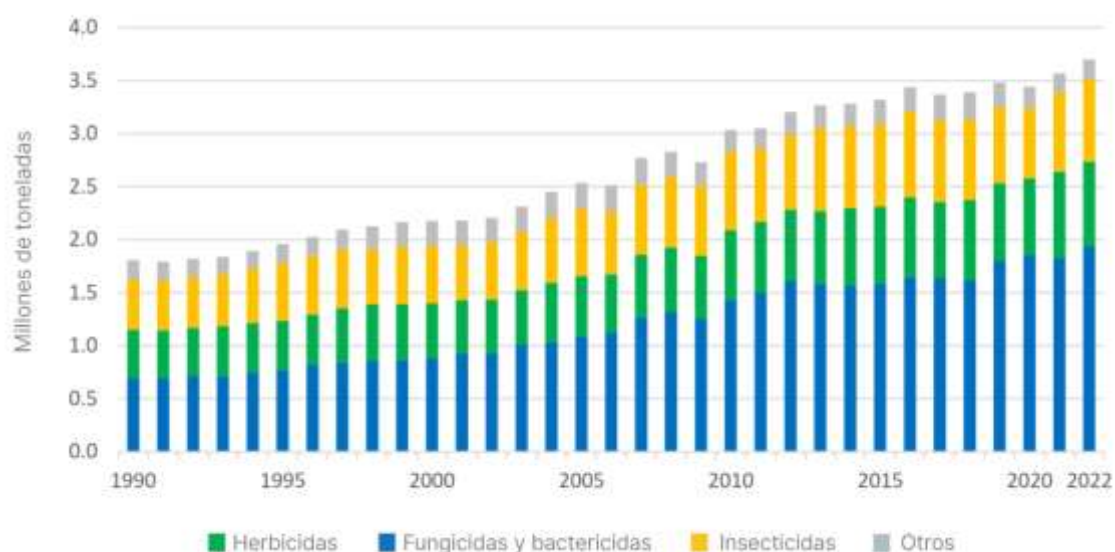
In this Final Degree Project, the cytotoxic effects of three widely used pesticides (metolachlor, metazachlor, and chlorpyrifos) were evaluated on two cell lines: Neuro-2a (murine neuroblastoma) and HEK293 Na<sub>v</sub>1.6 (derived from human embryonic kidney). Different concentrations of each compound were analysed using MTT assay (after 72 hours of exposure) and Alamar Blue assay (at 24, 48, and 72 hours of exposure).

The results showed that none of the pesticides, at the concentrations tested, caused a significant decrease in cell viability. However, potential cytotoxic effects at higher concentrations, as well as other cellular alterations, cannot be ruled out. Therefore, further research is needed to expand the risk assessment associated with exposure to these compounds.

**KEY WORDS:** pesticides, metolachlor, chlorpyrifos, metazachlor, cytotoxicity, cell viability, Neuro-2a, HEK293 Na<sub>v</sub>1.6, MTT, Alamar Blue.

## 1. INTRODUCCIÓN

El constante crecimiento de la población mundial obliga al uso de productos químicos para garantizar el suministro adecuado de alimentos y minimizar las pérdidas de la producción agrícola, ganadera e industrial a causa de las plagas, explicando así el creciente uso que han experimentado estos químicos a lo largo de las últimas décadas a nivel global (García *et al.*, 2022). En la figura 1 se puede observar el incremento anual en el uso de pesticidas desde 1990 hasta 2022.

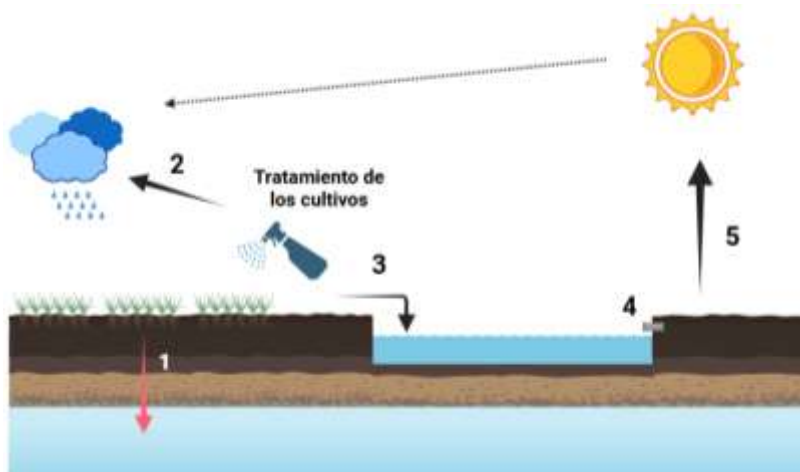


**Figura 1.** *Uso global de pesticidas por categorías desde 1990 hasta 2022. Figura extraída de (FAO, 2024)*

En consecuencia, también se ha observado un importante aumento de los residuos de estos compuestos en el medio ambiente (García *et al.*, 2022), lo que supone un potencial peligro tanto para los ecosistemas como para la salud pública, y convierte la contaminación por pesticidas en un problema de creciente preocupación para los consumidores y las autoridades reguladoras (Hassaan & El Nemr, 2020).

Según la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA), los pesticidas son sustancias que destruyen, previenen o repelen cualquier tipo de plaga, o que pueden ser usadas como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes y estabilizadores de nitrógeno (EPA, 2024).

Los residuos de pesticidas procedentes de las prácticas agrícolas, el uso urbano y la producción industrial llegan al ambiente acuático a través de diversas vías, como se puede observar en la figura 2 (AbuQamar *et al.*, 2024; Rajmohan *et al.*, 2020). Desde el agua, los pesticidas ingresan en el ciclo hídrico y son transportados a través de los ecosistemas, recorriendo largas distancias y pudiendo afectar a zonas muy separadas geográficamente (Hassaan & El Nemr, 2020).



**Figura 2.** Principales vías de entrada de los pesticidas al medio acuático. (1) Filtración hacia aguas subterráneas, (2) transporte por el aire y deposición por precipitación, (3) escorrentía hasta el medio acuático, (4) flujo de drenaje agrícola y agua residuales, (5) evaporación y deposición por precipitación. Figura elaborada con el programa Biorender (<https://BioRender.com>), adaptada de (Rajmohan *et al.*, 2020).

El aumento de los residuos de pesticidas en el medio ambiente representa una amenaza reconocida por las políticas europeas actuales. Una muestra de ello es el Programa LIFE 2025-2027 de la Unión Europea, un instrumento de financiación gestionado por la Agencia Ejecutiva Europea de Clima, Infraestructuras y Medio Ambiente (CINEA), que contribuye a la consecución del Pacto Verde Europeo y que está alineado con los objetivos del Plan de Acción para la Contaminación Cero. En concreto, el subprograma “Economía circular y calidad de vida” promueve las iniciativas orientadas a prevenir y reducir el impacto de sustancias peligrosas sobre el medio ambiente y la salud humana, entre las cuales se incluyen los productos fitosanitarios, como los pesticidas (CINEA, 2025; Commission, s.f.; MITECO, s.f.).

## 1.1 EFECTOS DE LOS PESTICIDAS EN EL MEDIO AMBIENTE

A parte de las especies diana, los pesticidas también afectan al resto de organismos expuestos indirectamente a ellos, provocando la disrupción de la cadena alimentaria, así como desequilibrios ecológicos. Una vez que los pesticidas ingresan en el ecosistema, son absorbidos por los organismos de niveles tróficos bajos, como plantas, algas y pequeños invertebrados. A medida que se asciende en la cadena trófica, las concentraciones de pesticidas en los organismos aumentan. Este suceso, conocido como biomagnificación, ocurre porque los residuos de pesticidas no son eliminados completamente del organismo, sino que se bioacumulan en los tejidos y órganos. Esta acumulación puede producirse tanto por la ingestión de presas como por el consumo de agua contaminada. En consecuencia, los depredadores de los niveles tróficos superiores, como los peces grandes, aves y mamíferos, pueden llegar a acumular niveles elevados de pesticidas, incluso si su exposición inicial fue relativamente baja (AbuQamar *et al.*, 2024; Hassaan & El Nemr, 2020).

---

### 1.1.1 CONTAMINACIÓN DEL MEDIO ACUÁTICO POR PESTICIDAS

En los ecosistemas acuáticos, los pesticidas alcanzan elevadas concentraciones, lo que puede resultar letal para las especies que habitan en ellos (García *et al.*, 2019). Estos compuestos afectan a los organismos tanto de forma directa, interfiriendo con sus mecanismos biológicos, como de forma indirecta, reduciendo sus fuentes de alimento (como las algas y el plancton), alterando sus hábitos alimenticios y deteriorando la calidad del agua (AbuQamar *et al.*, 2024; Hassaan & El Nemr, 2020).

Entre los efectos perjudiciales sobre los organismos acuáticos se incluyen daños en el ADN, disfunciones endocrinas, inmunosupresión, trastornos reproductivos, aparición de tumores, otras lesiones e incluso la muerte (Martyniuk *et al.*, 2020; Okogwu *et al.*, 2022; Saha & Dutta, 2024; Yang *et al.*, 2021).

---

### 1.1.2 EFECTOS PERJUDICIALES DE LOS PESTICIDAS EN LA SALUD HUMANA

Los humanos estamos expuestos a los pesticidas a través de múltiples vías que incluyen la ingestión de agua y alimentos contaminados, la inhalación de partículas en el aire y la

absorción a través de la piel durante la manipulación del producto. (AbuQamar *et al.*, 2024; Datta *et al.*, 2025; Hassaan & El Nemr, 2020).

Una vez en el organismo, los pesticidas van a provocar efectos letales a dosis mínimas (Rajmohan *et al.*, 2020). La exposición aguda a pesticidas puede provocar una amplia variedad de síntomas que se manifiestan durante las primeras 48 horas tras el contacto con el compuesto, y que van desde molestias leves, como escozor en los ojos o erupciones cutáneas, hasta efectos más graves, como la ceguera e incluso la muerte. Por otro lado, una exposición prolongada provoca efectos crónicos que pueden tardar semanas, meses e incluso años en desarrollarse (AbuQamar *et al.*, 2024).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año cerca de un millón de personas sufren intoxicaciones agudas por la exposición a pesticidas. Además, la tasa de mortalidad varía entre el 0,4 y el 1,9% (Hassaan & El Nemr, 2020).

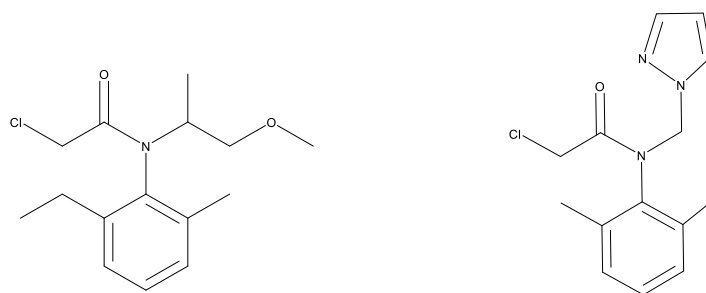
## **1.2 ESTRUCTURA QUÍMICA Y MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS PESTICIDAS EMPLEADOS**

En la siguiente sección se detallan las estructuras químicas y los principales efectos de los plaguicidas evaluados en este Trabajo Fin de Grado, en concreto, dos compuestos derivados de la cloracetamida y un compuesto organofosforado.

---

### **1.2.1 METOLACLORO Y METAZACLORO**

El metolacloro (MET, 2-cloro-N-(2-etil-6-metilfenil)-N-(1-metoxipropan-2-il)acetamida) y el metazacloro (MTZ, 2-cloro-N-(2,6-dimetilfenil)-N-(pirazol-1-ilmetil)acetamida) son herbicidas pertenecientes al grupo de las cloracetamidas (Lowry *et al.*, 2013; Wijewardene *et al.*, 2021). En la figura 3 se observa la estructura química de ambos compuestos.



**Figura 3.** Estructura química del metolachloro (izquierda) y el metazacloro (derecha).  
Figura realizada con el programa ChemDraw (Revvity Signals Software, Inc.).

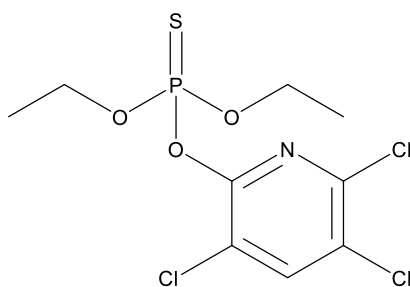
Los cloroacetamidas, también denominadas cloroacetanilidas, son herbicidas sintéticos que se caracterizan por una excelente eficacia contra las malezas anuales. Se utilizan en tratamientos preemergentes (antes de la germinación) y postemergentes tempranos en una amplia variedad de cultivos, como el algodón, el maíz, el arroz, el haba y la soja (Chen *et al.*, 2023; Kyselová *et al.*, 2022; Lamberth, 2016; Liu *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2020; Tadeo *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2011).

El efecto herbicida de las cloroacetamidas radica en su capacidad para inhibir la elongación de los ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFAs), que tienen como mínimo 18-23 átomos de carbono. Al unirse covalentemente a la elongasa, las cloroacetamidas bloquean la síntesis de este tipo de ácidos grasos a partir ácidos grasos de cadena más corta, alterando la división y la diferenciación celular y otros procesos fisiológicos como el tráfico de membrana, la adaptación de la planta a condiciones adversas, el almacenamiento de energía y la síntesis de isoprenoides, flavonoides y proteínas (Batsale *et al.*, 2021; Böger, 2003; Böger *et al.*, 2000; Deal *et al.*, 1980; Götz & Böger, 2004; Haslam & Kunst, 2013; Lamberth, 2016).

---

### 1.2.2 CLORPIRIFÓS

El clorpirifos (CPF, O,O-diethyl-O-[3,5,6-trichloro-2-pyridinol]) es uno de los insecticidas más empelados a nivel mundial debido a su bajo coste y a su amplio espectro de acción, que incluye a la mayoría de los insectos que atacan a cultivos forrajeros y plagas que habitan en el suelo (Sandoval *et al.*, 2019). Su estructura química puede observarse en la figura 4.



**Figura 4.** Estructura química del clorpirifós. Figura realizada con el programa ChemDraw (Revvity Signals Software, Inc.).

El clorpirifós pertenece a los insecticidas organofosforados, un grupo de compuestos sintéticos y de amplio espectro. La falta de selectividad de este grupo es consecuencia de su mecanismo de acción, que consiste en fosforilar a la enzima acetilcolinesterasa (AChE), inhibiéndola irreversiblemente. La AChE regula la transmisión del impulso nervioso al catalizar la hidrólisis de la acetilcolina (ACh), un neurotransmisor que actúa en diversos puntos del organismo, lo que explica el efecto sistémico que producen este tipo de insecticidas. Como resultado de esta inhibición, el neurotransmisor se acumula en la hendidura sináptica, provocando una sobreestimulación de los receptores colinérgicos y alterando el funcionamiento normal del sistema nervioso (Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2023; Colovic *et al.*, 2013; Fukuto, 1990; Gupta *et al.*, 2011; Gupta *et al.*, 2019; Rathnayake & Northrup, 2016; Tadeo *et al.*, 2019).

En este contexto, la sobreestimulación de los receptores colinérgicos por una intoxicación aguda puede dar lugar al conocido como “síndrome colinérgico”, cuyos síntomas van de entumecimiento, mareos, temblores, náuseas, calambres abdominales, sudoración, salivación, visión borrosa y depresión respiratoria, hasta la pérdida de conocimiento, convulsiones e incluso muerte por insuficiencia respiratoria o cardiovascular (Testai *et al.*, 2010).

### 1.3 REGULACIÓN LEGAL DE LOS PESTICIDAS

El marco jurídico que regula el uso de productos fitosanitarios a nivel europeo se estructura, entre otras normas, en la Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, por la que se establece el marco de actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas (P. Europeo & C. d. I. U. Europea, 2009), y en el Reglamento (CE) n.º 1107/2009, del Parlamento Europeo y del

Consejo, también de 21 de octubre de 2009, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios (P. Europeo & C. d. a. U. Europea, 2009).

A nivel nacional, la normativa principal en relación con los productos fitosanitarios se recoge en la Ley 43/2002, de 20 de noviembre, de sanidad vegetal (España, 2002), el Real Decreto 971/2014, de 21 de noviembre, que regula el procedimiento de evaluación de productos fitosanitarios (España, 2014), y en el Real Decreto 1311/2012, de 14 de septiembre, que establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de estos productos (España, 2012).

En relación con los residuos de pesticidas, las concentraciones máximas permitidas legalmente se conocen como límites máximos de residuos (LMR). El Reglamento (CE) nº 396/2005 recoge la normativa relativa a los LMR en alimentos y piensos de origen vegetal y animal (Europeo & Europea, 2005), y la Directiva (UE) 2020/2184 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2020 establece las normas de calidad para las aguas destinadas al consumo humano, incluyendo los niveles máximos de pesticidas permitidos (Europeo & Europea, 2020).

Cabe destacar que el uso del clorpirifós ha sido prohibido recientemente en la Unión Europea mediante el Reglamento de Ejecución (UE) 2020/18 de la Comisión, de 10 de enero de 2020, en el que no se renueva su aprobación como sustancia activa debido a sus efectos perjudiciales para la salud humana, especialmente por su neurotoxicidad durante el desarrollo prenatal e infantil, así como por su potencial genotoxicidad (EFSA, 2019; Europea, 2020). No obstante, su persistencia en el medio ambiente resalta la necesidad de realizar estudios adicionales (Huang *et al.*, 2020).

## 2. OBJETIVOS

La exposición a dosis bajas de metolacloro ha mostrado reducir la proliferación celular, tanto en fibroblastos humanos como en células de carcinoma hepatocelular humano HepG2. Sin embargo, existe una inconsistencia acerca de los efectos no deseados de este herbicida sobre diferentes tipos celulares (Dhanwada *et al.*, 2003; Hartnett *et al.*, 2013; Lowry *et al.*, 2013).

Por otra parte, numerosos estudios *in vitro* han reportado la citotoxicidad del clorpirifós sobre diferentes líneas celulares, entre las que se encuentran la línea clonal derivada de células madre neurales humanas hNS1, la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y, la línea embrionaria de riñón humano HEK293 y la línea derivada de carcinoma cervical humano HeLa (Hinojosa *et al.*, 2024; Li *et al.*, 2015; Sandoval *et al.*, 2019).

Teniendo en cuenta todo ello, así como la falta de estudios sobre los efectos *in vitro* del herbicida metazacloro, en este Trabajo de Fin de Grado se propone el estudio de los efectos de estos tres pesticidas en las líneas celulares Neuro-2a (derivada de neuroblastoma de ratón) y HEK293 Na<sub>v</sub>1.6, centrándose en dos objetivos principales:

- Estudiar la viabilidad celular de la línea Neuro-2a tras su tratamiento con diferentes concentraciones de metolacloro, metazacloro y clorpirifós.
- Estudiar la viabilidad celular de la línea HEK293 Na<sub>v</sub>1.6 tras su tratamiento con diferentes concentraciones de metolacloro, metazacloro y clorpirifós.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 PESTICIDAS

Para estudiar la citotoxicidad *in vitro* de los pesticidas se seleccionaron tres compuestos: metolacloro, clorpirifós y metazacloro, adquiridos a la empresa Dr. Ehrenstorfer GmbH. El metolacloro se suministró ya disuelto en acetonitrilo a una concentración de 100 µg/mL. En cambio, el clorpirifós y el metazacloro se adquirieron en forma sólida y se disolvieron para preparar soluciones stock de 3697 µM en DMSO (clorpirifós) y, 2040 µM en metanol (metazaclor).

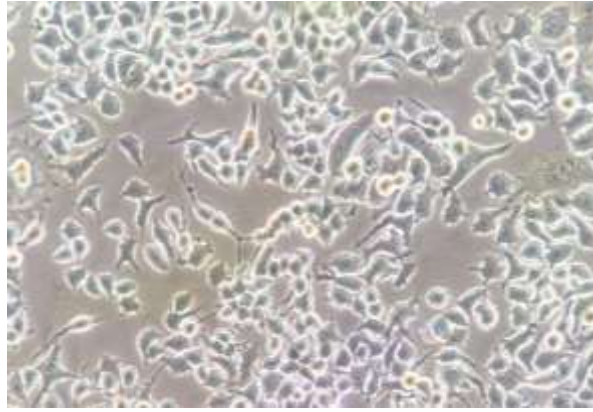
#### 3.2 CULTIVO CELULAR

Para los estudios *in vitro* se emplearon dos líneas celulares: una de origen murino y otra de origen humano, que se mantuvieron en cultivo en atmósfera estéril y se trataron con los compuestos objeto de estudio por un máximo de 72 horas. A continuación, se detallan las características de las líneas celulares empleadas.

---

##### 3.2.1 LÍNEA CELULAR DERIVADA DE NEUROBLASTOMA DE RATÓN (NEURO-2A, N2A)

Esta línea fue adquirida de American Type Culture Collection (ATCC). Se trata de células de neuroblastoma derivadas de la cresta neural de ratón (*Mus musculus*), que se caracterizan por su alta capacidad de proliferación y que pueden diferenciarse rápidamente en células similares a neuronas en respuesta a diversos estímulos, como la forskolina, el ácido retinoico y el dibutilil adenosín monofosfato cíclico (dbcAPM); lo que las ha llevado a ser ampliamente utilizadas para estudios *in vitro* en neurociencia y toxicología (Hargreaves *et al.*, 2011; Tremblay *et al.*, 2010). En la figura 5 se puede observar una imagen al microscopio invertido de la línea Neuro-2a.



**Figura 5.** *Línea celular de neuroblastoma murino Neuro-2a.*

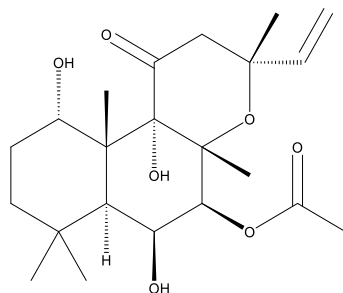
Las células N2a se mantuvieron en medio RPMI-1640 (del inglés Roswell Park Memorial Institute) (Gibco), suplementado con suero fetal bobino (FBS) al 10% (Gibco) y penicilina-streptomina al 5% (Gibco). En este caso, el medio RPMI-1640 ya contenía glutamina; de no ser así, es necesario suplementarlo con un 1% de la misma.

El cultivo de esta línea se realizó en flasks de 25 cm<sup>2</sup> (T25), sembrando las células a una densidad de 80 000 células/mL. Para los ensayos de citotoxicidad se utilizaron células con 25–36 pases, cultivadas en placas de 96 pocillos a una densidad de  $25 \times 10^3$  células/200 µL, que fueron tratadas una vez que alcanzado el 70% de la confluencia.

Cuando los cultivos alcanzan el 70-80% de la confluencia han de pasarse. Para ellos se desecha el medio viejo y se lavan las células con HBSS (Hank's Balanced Salt Solution). A continuación, se añade una solución estéril de tripsina y EDTA (Gibco), y se deja actuar durante 2-3 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se golpea suavemente el flask con la mano para ayudar a que las células se despeguen del todo, lo cual se comprueba en el microscopio invertido. Para inactivar la tripsina se añade medio al flask y la suspensión celular se centrifuga durante 5 minutos a 800 revoluciones por minuto (rpm), retirando un pequeño volumen para realizar el recuento celular en una cámara de Thoma y determinar la densidad celular de la suspensión. Una vez centrifugada la suspensión, se desecha el sobrenadante, se resuspende el pellet de células en 10 mL de medio y se siembra el volumen de suspensión celular correspondiente, según la densidad celular, en los flasks y pocillos. Finalmente, estos se mantienen a 37°C, con un 95-98% de humedad, un 5% CO<sub>2</sub> y un 95% de aire, cambiando el medio cada 2-3 días.

## Tratamiento de las células Neuro-2a con forskolina

La forskolina ( $C_{22}H_{34}O_7$ ) es un diterpenoide de tipo labdano, aislado de las raíces de la planta india *Plectranthus barbatus*, también conocida como *Coleus forskohlii* (Lamiaceae) (Alasbahi & Melzig, 2012; Wagh *et al.*, 2012), cuya estructura química se muestra en la figura 6.



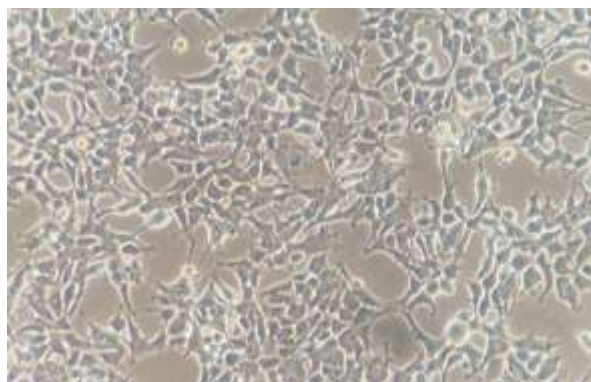
**Figura 6.** Estructura química de la forskolina. Figura realizada con el programa ChemDraw (Revvity Signals Software, Inc.).

Se trata de una molécula liposoluble capaz de penetrar en las membranas celulares y estimular la adenilato ciclasa (AC) (Wagh *et al.*, 2012), aumentando la concentración intracelular de adenosín monofosfato cíclico (AMPC), un segundo mensajero que desempeña un papel clave en la diferenciación celular (Ammer & Schulz, 1997; Bonvallet *et al.*, 1990; Deng *et al.*, 2001). Además, el AMPC va a activar la proteína kinasa A (PKA), lo que resulta en un aumento del tráfico intracelular de proteínas de membrana, como transportadores de glucosa GLUT4, los canales de cloruro CFTR, los canales de potasio  $K_v1.1$  y los canales de sodio  $Na_v1.5$  (Holman & Kasuga, 1997; Levin *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 2000)

Para estudiar la citotoxicidad de los pesticidas en células neuronales diferenciadas, las células Neuro-2a se cultivaron durante 24 horas en medio sin suero, suplementado con forskolina a una concentración de  $10 \mu\text{M}$  (Raposo-Garcia *et al.*, 2023; Tremblay *et al.*, 2010).

### 3.2.2 LÍNEA CELULAR EMBRIONARIA DE RIÑÓN HUMANO TRANSFECTADA CON LA SUBUNIDAD $\alpha$ 1.6 DE LOS CANALES DE SODIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE HEK293 $Na_v(1.6)$

Esta línea fue proporcionada mediante un acuerdo de transferencia de material entre los laboratorios GlaxoSmithKline y el Departamento de Farmacología de la Facultad de Veterinaria de Lugo. Se trata de una línea celular con morfología epitelial que deriva de la línea HEK293 (células embrionarias de riñón humano), la cual ha sido transfectada por electroporación para sobreexpresar de forma estable la subunidad  $\alpha_{1.6}$  del canal de sodio dependiente de voltaje (Burbidge *et al.*, 2002; He & Soderlund, 2014). En la figura 7 se puede observar una imagen al microscopio invertido de la línea celular HEK293  $Na_v1.6$ .



**Figura 7.** Línea celular embrionaria humana HEK293  $Na_v1.6$

Las células HEK293  $Na_v1.6$  se cultivaron en medio DMEM/F12 (del inglés “Dulbecco’s modified Eagles medium Gibco y Ham’s F12”) (Gibco) suplementado con GlutaMAX™ (2 mM; Gibco), solución de aminoácidos no esenciales MEM al 1% (Gibco), FBS (10%) y geneticina (0,4 mg/mL; G418 Gibco).

Para el mantenimiento de la línea, las células se sembraron a una densidad de 100 000 células/mL en flasks T25. En los ensayos de citotoxicidad se utilizaron células con 3–14 pases, sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de  $30 \times 10^3$  células/200  $\mu$ L, que fueron tratadas una vez alcanzaron el 70% de la confluencia.

### 3.3 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

Para los estudios de citotoxicidad *in vitro*, los cultivos celulares fueron expuestos a diferentes concentraciones de los pesticidas: 0,6  $\mu$ M, 1,2  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M

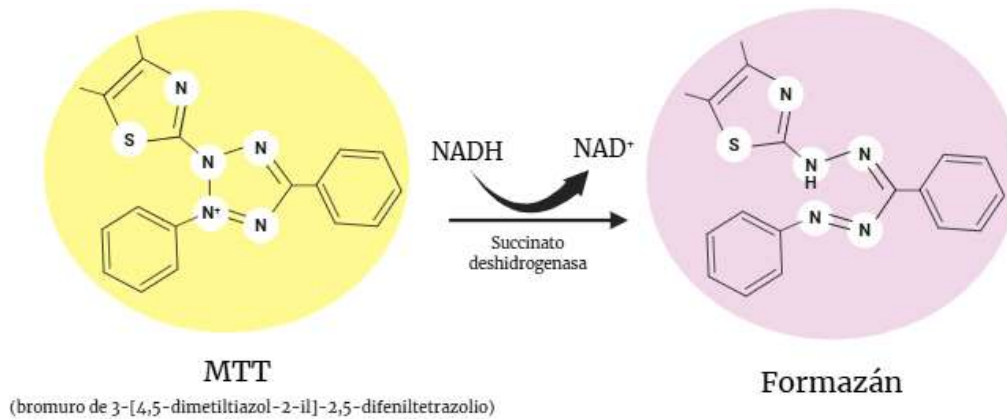
para el clorpirifós y el metazacloro; y 0,187  $\mu\text{M}$ , 0,375  $\mu\text{M}$ , 0,750  $\mu\text{M}$ , 1,5  $\mu\text{M}$  y 3  $\mu\text{M}$  para el metolacloro. Como control de vida se utilizaron pocillos sin tratamiento y como control de muerte se empleó saponina a una concentración de 20 mg/mL. Asimismo, para descartar posibles efectos citotóxicos provocados por el disolvente utilizado en las soluciones de pesticidas, se incluyó un control adicional en el que se añadió al medio de cultivo un 0,85% de acetonitrilo para el metolacloro, un 0,27% de DMSO para el clorpirifós y un 0,49% de metanol para el metazacloro.

Además, en los estudios realizados con células Neuro-2a tratadas con forskolina (10  $\mu\text{M}$ ), se incluyó un control específico con este compuesto a dicha concentración para confirmar su inocuidad en las condiciones experimentales empleadas.

---

### 3.3.1 MTT

El ensayo colorimétrico MTT es un método que permite evaluar la viabilidad y proliferación celular, siendo especialmente útil en estudios de citotoxicidad. Se basa en la determinación de la función mitocondrial de las células. En concreto, mide la actividad de la succinato deshidrogenasa, una enzima mitocondrial capaz de reducir el MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), una sal de tetrazolio amarilla y soluble en agua, a formazán, un compuesto insoluble en agua y de color púrpura que no puede atravesar la membrana plasmática y se acumula en el interior celular. Al solubilizar las células, el formazán es liberado y entonces puede ser cuantificado mediante espectrofotometría (Raposo-Garcia & Vale, 2024). Para la solubilización se pueden emplear diferentes disolventes, como dimetilsulfóxido (DMSO), dodecilsulfato sódico (SDS) y combinaciones de detergentes con solventes orgánicos (Kamiloglu *et al.*, 2020). El fundamento del ensayo se muestra en la figura 8.



**Figura 8.** *Reacción de reducción del MTT a formazán. Figura realizada con el programa Biorender (<https://BioRender.com>).*

La capacidad de las células para reducir el MTT refleja la integridad y la actividad mitocondrial, lo que, a su vez, puede interpretarse como un indicador de viabilidad celular (Raposo-Garcia & Vale, 2024). De este modo, la cantidad de formazán que se forma es directamente proporcional al número de células viables, ya que las células inviables no son metabólicamente activas y, por tanto, no pueden reducir el MTT.

Los ensayos de viabilidad celular desarrollados con esta técnica se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos transparentes de fondo plano (Tissue Culture Plate, JET BIOFIL®, Cat. No. TCP011096). Después de 72 horas de exposición a las diferentes concentraciones de pesticidas, se aspiró el tratamiento de los pocillos y se lavaron con PBS (del inglés “Phosphate Buffered Saline”; Gibco) para eliminar las células muertas. A continuación, se añadieron 100  $\mu$ L de una solución de MTT (500  $\mu$ g/mL) a cada pocillo y se dejó incubar 50 minutos a 37°C, en agitación constante y oscuridad, envolviendo las placas con papel de aluminio para evitar la degradación del MTT. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se aspiró el MTT de los pocillos y se añadió SDS para lisar las células y solubilizar el formazán. El SDS se dejó actuar durante 4 horas, protegiendo nuevamente las placas de la luz, tras lo cual se procedió a cuantificar el formazán mediante la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm, empleando un lector multimodal de microplacas Synergy 4 (Biotek). Los resultados obtenidos se analizaron empleando el software GraphPad Prism 8.

Sin embargo, durante la fase experimental se vio que, en los pasos de lavado, parte de las células se despegaban y se perdían al aspirar el pocillo, llevando a resultados erróneos.

Ante esta situación, se modificó el protocolo y se repitieron los ensayos de citotoxicidad añadiendo directamente a los pocillos el volumen de MTT necesario para alcanzar una concentración final de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En la figura 9 se puede observar el aspecto de una placa después de la realización de un ensayo MTT.

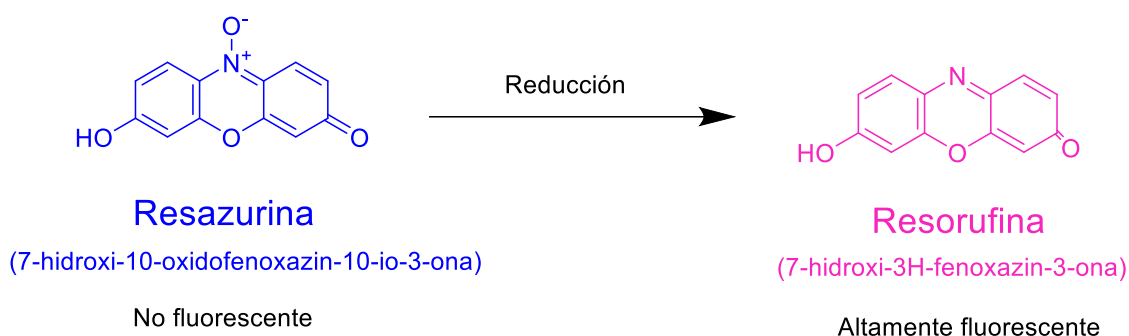


**Figura 9.** *Ensayo de viabilidad MTT en una placa de 96 pocillos. Las células viables metabolizan el MTT a formazán que, al ser solubilizado, se acumula en el pocillo y le da un color morado. La intensidad del color es proporcional al número de células viables.*

---

### 3.3.2 ALAMAR BLUE

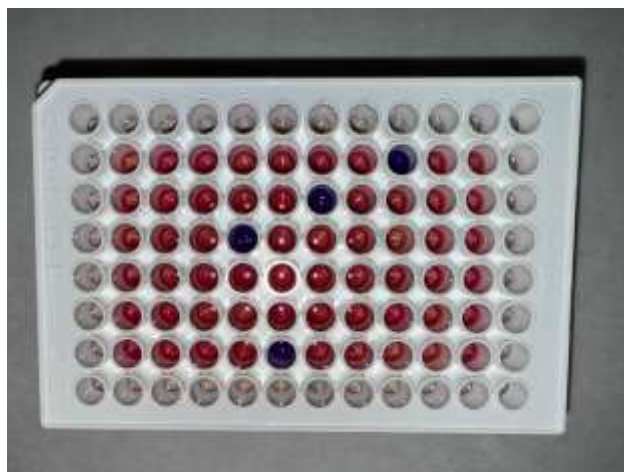
La resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido), también llamada Alamar Blue, es un tinte azul no fluorescente que es reducido por las células metabólicamente activas a resorufina, un compuesto rosado y altamente fluorescente que presenta propiedades tanto fluorimétricas como colorimétricas en respuesta a la actividad metabólica. El cambio de color inducido por esta reducción es directamente proporcional al número de células y el tiempo de incubación, cambiando de un azul no fluorescente a una forma rosada y fluorescente. De esta manera, a medida que disminuye el número de células vivas, también lo hace la intensidad de la fluorescencia (Raposo-Garcia & Vale, 2024). El fundamento del ensayo se puede observar en la figura 10.



**Figura 10.** Reducción de la resazurina a resorufina. Figura realizada con el programa ChemDraw (Revvity Signals Software, Inc.).

La resazurina es soluble en agua, estable en el medio de cultivo, no tóxica y permeable a través de la membrana celular, por lo que va a permitir una monitorización continua. Este tinte actúa como un indicador redox, comportándose como un aceptor de electrones intermediario en la cadena de transporte de electrones (sin interferir en el proceso normal) y, medida que la resazurina capta electrones, se produce el cambio de color descrito (Rampersad, 2012).

Los ensayos de viabilidad celular con esta técnica se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos de fondo transparente y paredes blancas (Corning® Costar®, Ref. 3610). Tras el tratamiento con los pesticidas, se añadió AlamarBlue™ (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) en una proporción del 10% v/v. La fluorescencia se midió a las 24, 48 y 72 horas a una longitud de onda de excitación de 530 nm y una de emisión de 590 nm, empleando un lector multimodal de microplacas Synergy 4 (Biotek). Los resultados obtenidos se analizaron empleando el software GraphPad Prism 8. En la figura 11 se puede observar el aspecto de una placa después de un ensayo de Alamar Blue.



**Figura 11.** *Ensayo de viabilidad mediante Alamar Blue en una placa de 96 pocillos. Este ensayo se basa en la capacidad de las células viables para reducir la resazurina (azul, no fluorescente) a resorufina (color rosado, fluorescente). El cambio de color observado y la intensidad de fluorescencia son proporcionales al número de células viables en cada pocillo.*

### 3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos en los ensayos de citotoxicidad con metolacloro, clorpirifós y metazacloro en las líneas celulares Neuro-2a y HEK293 Na<sub>v</sub>1.6 se expresaron como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM), calculados a partir de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Para comparar las medias entre los distintos grupos experimentales se empleó un análisis de varianza (ANOVA): de una vía para los ensayos MTT y de dos vías para los ensayos Alamar Blue. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas con un valor de  $p < 0,05$ . Tanto el análisis estadístico como la representación gráfica de los resultados se llevó a cabo con el software GraphPad Prism 8.

## 4. RESULTADOS

En esta sección se describen los resultados obtenidos en las líneas celulares Neuro-2a y HEK293 Na<sub>v</sub>1.6, correspondientes respectivamente a un modelo de neuroblastoma de ratón y a células humanas que expresan la subunidad  $\alpha$ 1.6 del canal de sodio dependiente de voltaje.

Los datos obtenidos mediante el ensayo MTT se expresan en unidades de absorbancia y los del ensayo Alamar Blue en unidades de fluorescencia.

### 4.1 VIABILIDAD CELULAR DE LA LÍNEA NEURO-2A

#### 4.1.1 ENSAYOS REALIZADOS MEDIANTE MTT

Tras 72 horas de exposición a cada pesticida, se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo MTT en células Neuro-2a en estado indiferenciado y en células pretratadas con forskolina 10  $\mu$ M durante 24 horas para inducir su diferenciación.

En los ensayos con metolacloro, la absorbancia fue de  $1,206 \pm 0,059$  en el control de vida;  $1,219 \pm 0,036$  en el control con disolvente;  $1,158 \pm 0,020$  en los pocillos tratados con MET 0,187  $\mu$ M;  $1,193 \pm 0,052$  con 0,375  $\mu$ M;  $1,121 \pm 0,075$  con 0,750  $\mu$ M;  $1,206 \pm 0,109$  con 1,5  $\mu$ M;  $1,134 \pm 0,009$  con 3  $\mu$ M; y  $0,062 \pm 0,003$  en el control de muerte.

Los resultados de absorbancia de los ensayos con clorpirifós fueron los siguientes:  $1,394 \pm 0,140$  en el control de vida;  $1,439 \pm 0,105$  en el control con disolvente;  $1,349 \pm 0,086$  con CPF a 0,625  $\mu$ M;  $1,387 \pm 0,052$  a 1,25  $\mu$ M;  $1,386 \pm 0,090$  a 2,5  $\mu$ M;  $1,386 \pm 0,067$  a 5  $\mu$ M;  $1,351 \pm 0,117$  a 10  $\mu$ M; y  $0,066 \pm 0,001$  en el control de muerte.

La señal de absorbancia obtenida para los ensayos con metazacloro fue de  $1,282 \pm 0,016$  en el control de vida;  $1,266 \pm 0,069$  en el control del disolvente;  $1,287 \pm 0,056$  en células expuestas a 0,625  $\mu$ M de MTZ;  $1,215 \pm 0,037$  a 1,25  $\mu$ M;  $1,286 \pm 0,023$  a 2,5  $\mu$ M;  $1,239 \pm 0,082$  a 5  $\mu$ M;  $1,248 \pm 0,066$  en células expuestas a 10  $\mu$ M; y  $0,054 \pm 0,005$  en el control de muerte.

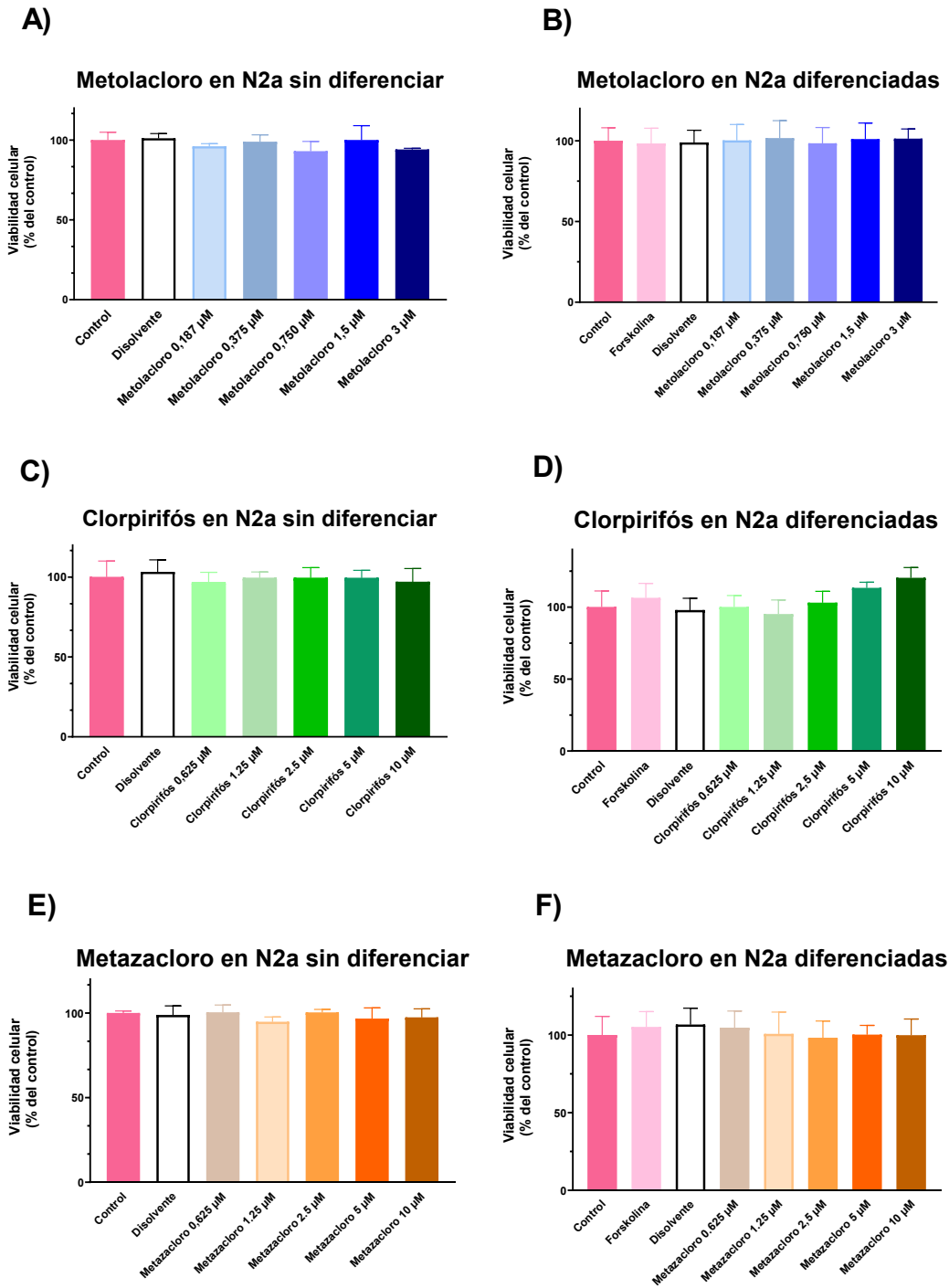
Con el objetivo de estudiar los efectos de estos pesticidas en células con fenotipo neuronal diferenciadas, la línea celular Neuro-2a fue tratada durante 24 horas con forskolina 10  $\mu$ M en medio sin suero. Posteriormente, se evaluó la viabilidad celular mediante la técnica MTT tras 72 horas de exposición a las concentraciones previamente indicadas.

En los ensayos con MET realizados en células Neuro-2a diferenciadas, la absorbancia fue de  $1,354 \pm 0,109$  en el control de vida;  $1,331 \pm 0,129$  en el control con forskolina;  $1,340 \pm 0,103$  en el control del disolvente;  $1,357 \pm 0,134$  en el tratamiento con MET  $0,187 \mu\text{M}$ ;  $1,376 \pm 0,147$  con  $0,375 \mu\text{M}$ ;  $1,332 \pm 0,133$  con  $0,750 \mu\text{M}$ ;  $1,367 \pm 0,136$  con  $1,5 \mu\text{M}$ ;  $1,371 \pm 0,082$  con  $3 \mu\text{M}$ ; y  $0,066 \pm 0,001$  en el control de muerte.

Los resultados de absorbancia de los ensayos con CPF en células Neuro-2a diferenciadas, fueron:  $1,234 \pm 0,137$  en el control de vida;  $1,313 \pm 0,124$  en el control de forskolina;  $1,207 \pm 0,102$  en el control del disolvente;  $1,235 \pm 0,098$  a una concentración de CPF  $0,625 \mu\text{M}$ ;  $1,174 \pm 0,121$  a  $1,25 \mu\text{M}$ ;  $1,271 \pm 0,097$  a  $2,5 \mu\text{M}$ ;  $1,398 \pm 0,049$  a  $5 \mu\text{M}$ ;  $1,484 \pm 0,089$  a  $10 \mu\text{M}$ ; y  $0,066 \pm 0,001$  en el control de muerte.

La señal de absorbancia obtenida en los ensayos con MTZ fue de  $1,282 \pm 0,016$  en el control de vida;  $1,266 \pm 0,069$  en el control del disolvente;  $1,287 \pm 0,056$  en células expuestas a  $0,625 \mu\text{M}$  de MTZ;  $1,215 \pm 0,037$  a  $1,25 \mu\text{M}$ ;  $1,286 \pm 0,023$  a  $2,5 \mu\text{M}$ ;  $1,239 \pm 0,082$  a  $5 \mu\text{M}$ ;  $1,248 \pm 0,066$  a  $10 \mu\text{M}$ ; y  $0,066 \pm 0,001$  en el control de muerte.

En la figura 12 se observa que, la exposición durante 72 horas a concentraciones inferiores a  $3 \mu\text{M}$  de MET, y menores a  $10 \mu\text{M}$  de CPF y MTZ, no afecta de manera significativa a la viabilidad de las células Neuro-2a, tanto sin diferenciar como diferenciadas con forskolina  $10 \mu\text{M}$ .



**Figura 12.** Viabilidad celular de la línea Neuro-2a tras 72 horas de exposición a MET 0,178  $\mu$ M, 0,375  $\mu$ M, 0,750  $\mu$ M, 1,5  $\mu$ M y 3  $\mu$ M y a CPF y MTZ 0,625  $\mu$ M, 1,25  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M. La viabilidad se evaluó mediante el ensayo MTT en células sin diferenciar (A, C y E) y en células diferenciadas con forskolina 10  $\mu$ M (B, D y F). Los resultados se expresan como porcentaje con respecto al control de vida y corresponden a la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado.

---

#### 4.1.2 ENSAYOS REALIZADOS MEDIANTE ALAMAR BLUE

En los ensayos de viabilidad celular con Alamar Blue se registró la fluorescencia a las 24, 48 y 72 horas de exposición a los pesticidas.

En los ensayos con MET, a las 24 horas de incubación, la fluorescencia emitida fue de  $1460,6 \pm 19,1$  en el control de vida;  $14792,1 \pm 12,8$  en el control del disolvente;  $1486,4 \pm 37,8$  en las células tratadas con MET  $0,187 \mu\text{M}$ ;  $1484,8 \pm 38,2$  con  $0,375 \mu\text{M}$ ;  $1442,0 \pm 29,9$  con  $0,750 \mu\text{M}$ ;  $1456,9 \pm 21,0$  con  $1,5 \mu\text{M}$ ;  $1463,1 \pm 16,7$  con  $3 \mu\text{M}$ ; y  $30,7 \pm 1,453$  en el control de muerte.

Tras 48 horas de tratamiento, la fluorescencia registrada fue de  $1689,6 \pm 33,3$  en el control de vida;  $1702,7 \pm 38,7$  en el control del disolvente;  $1664,8 \pm 20,031$  con  $0,187 \mu\text{M}$  de MET;  $1666,7 \pm 51,5$  con  $0,375 \mu\text{M}$ ;  $1608,8 \pm 28,9$  con  $0,750 \mu\text{M}$ ;  $1672,9 \pm 32,4$  con  $1,5 \mu\text{M}$ ;  $1715,6 \pm 46,4$  con  $3 \mu\text{M}$ ; y  $33,0 \pm 3,5$  en el control de muerte.

A las 72 horas de exposición, la fluorescencia fue de  $1429,3 \pm 41,9$  en el control de vida;  $1428,0 \pm 44,4$  en el control del disolvente;  $1447,3 \pm 71,4$  en los tratamientos con MET  $0,187 \mu\text{M}$ ;  $1499,1 \pm 75,4$  con  $0,375 \mu\text{M}$ ;  $1445,8 \pm 61,1$  con  $0,750 \mu\text{M}$ ;  $1441,0 \pm 42,9$  con  $1,5 \mu\text{M}$ ;  $1465,4 \pm 55,3$  con  $3 \mu\text{M}$  y  $39,0 \pm 3,2$  en el control de muerte.

No se observaron variaciones significativas en la señal de fluorescencia entre los tratamientos con MET y el control de vida a lo largo de los diferentes tiempos de exposición. No obstante, la intensidad de la fluorescencia experimentó una oscilación a lo largo del tiempo, aumentando a las 48 horas y volviendo a disminuir a las 72 horas.

En el caso del CPF, la intensidad de fluorescencia medida a las 24 horas de tratamiento fue de  $1686,1 \pm 14,7$  en el control de vida;  $1715,0 \pm 15,0$  en el control del disolvente;  $1581,6 \pm 134,0$  a una concentración de CPF  $0,625 \mu\text{M}$ ;  $1713,9 \pm 41,3$  a  $1,25 \mu\text{M}$ ;  $1698,4 \pm 25,3$  a  $2,5 \mu\text{M}$ ;  $1629,2 \pm 35,1$  a  $5 \mu\text{M}$ ;  $1697,7 \pm 60,4$  a  $10 \mu\text{M}$ ; y  $31,3 \pm 2,9$  en el control de muerte.

Transcurridas 48 horas de exposición, estos valores cambiaron a  $1688,7 \pm 143,9$  en el control de vida;  $1685,0 \pm 166,2$  en el control del disolvente;  $1685,1 \pm 189,4$  en las células tratadas con CPF  $0,625 \mu\text{M}$ ;  $1681,1 \pm 188,6$  con  $1,25 \mu\text{M}$ ;  $1659,3 \pm 169,2$  con  $2,5 \mu\text{M}$ ;  $1603,2 \pm 165,5$  con  $5 \mu\text{M}$ ;  $1687,2 \pm 188,3$  con  $10 \mu\text{M}$ ; y  $35,3 \pm 1,2$  en el control de muerte.

A las 72 horas con CPF fueron de  $1774,9 \pm 19,3$  en el control de vida;  $1749,8 \pm 67,1$  en el control del disolvente;  $1767,1 \pm 30,4$  en las células tratadas con CPF  $0,625 \mu\text{M}$ ;  $1770,9 \pm 23,5$  con  $1,25 \mu\text{M}$ ;  $1764,8 \pm 40,6$  con  $2,5 \mu\text{M}$ ;  $1723,8 \pm 62,3$  con  $5 \mu\text{M}$ ;  $1751,8 \pm 19,6$  con  $10 \mu\text{M}$ ; y  $52,3 \pm 2,4$  en el control de muerte.

En los ensayos con CPF los valores de la fluorescencia no mostraron una diferencia significativa respecto al control de vida y la señal se mantuvo constante durante las primeras 48 horas, aumentando ligeramente a las 72 horas.

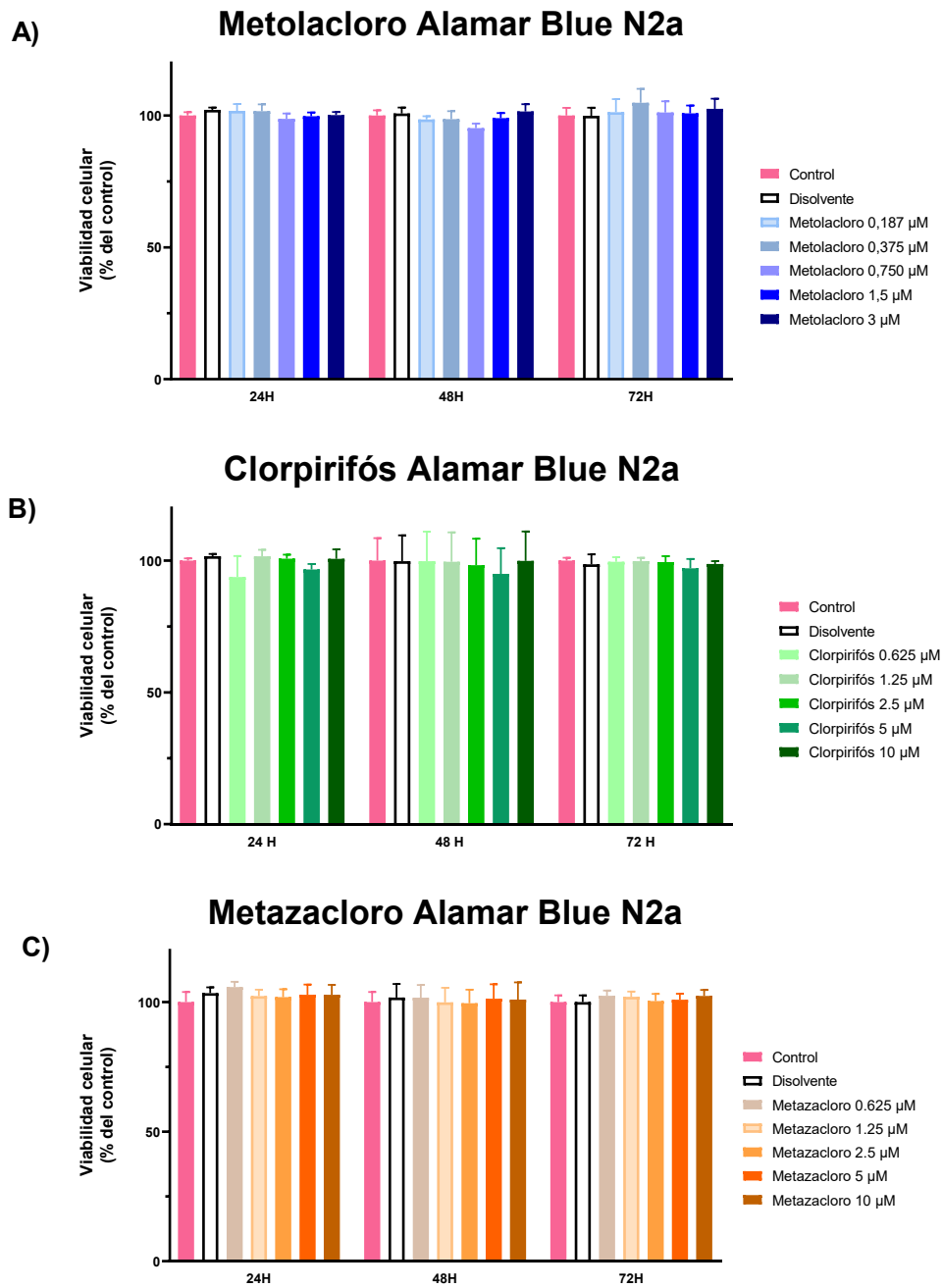
En los ensayos realizados con MTZ, a las 24 horas de exposición, se registró una fluorescencia de  $1480,6 \pm 100,1$  en el control de vida;  $1531,3 \pm 58,3$  en el control del disolvente;  $1566,4 \pm 51,1$  en los cultivos expuestos a MTZ  $0,625 \mu\text{M}$ ;  $1515,1 \pm 62,6$  a  $1,25 \mu\text{M}$ ;  $1508,6 \pm 78,6$  a  $2,5 \mu\text{M}$ ;  $1522,6 \pm 99,7$  a  $5 \mu\text{M}$ ;  $1522,6 \pm 97,3$  a  $10 \mu\text{M}$ ; y  $31,3 \pm 2,9$  en el control de muerte.

Después de 48 horas de tratamiento, la fluorescencia fue de  $1432,4 \pm 96,0$  en el control de vida;  $1457,6 \pm 129,1$  en el control del disolvente;  $1456,2 \pm 121,6$  en las células con MTZ a  $0,625 \mu\text{M}$ ;  $1430,9 \pm 139,0$  a  $1,25 \mu\text{M}$ ;  $1425,0 \pm 129,6$  a  $2,5 \mu\text{M}$ ;  $1415,0 \pm 137,6$  a  $5 \mu\text{M}$ ;  $1446,2 \pm 164,4$  a  $10 \mu\text{M}$ ; y  $35,3 \pm 1,2$  en el control de muerte.

Al finalizar las 72 horas de exposición a MTZ, la intensidad de la fluorescencia fue de  $1713,7 \pm 76,9$  en el control de vida;  $1755,6 \pm 60,2$  en el control del disolvente;  $1748,3 \pm 60,6$  en los pocillos con MTZ  $0,625\text{M}$ ;  $1720,8 \pm 81,6$  con  $1,25 \mu\text{M}$ ;  $1729,6 \pm 67,9$  con  $2,5 \mu\text{M}$ ;  $1754,2 \pm 68,9$  con  $5 \mu\text{M}$ ;  $1748,6 \pm 87,5$  con  $10 \mu\text{M}$ ; y  $52,3 \pm 2,4$  en el control de muerte.

La fluorescencia en los ensayos con MTZ no mostró diferencias significativas entre los pocillos tratados y el control de vida. La señal se mantuvo constante durante las primeras 48 horas de tratamiento y aumentó a las 72 horas.

En la figura 13 se muestra que la viabilidad celular de la línea Neuro-2a sin diferenciar no varía significativamente en el transcurso de las primeras 72 horas de exposición a MET a concentraciones entre  $0,178 \mu\text{M}$  y  $3 \mu\text{M}$  ni a CPF y MTZ a concentraciones entre  $0,625 \mu\text{M}$  y  $10 \mu\text{M}$ .



**Figura 13.** Viabilidad celular de la línea Neuro-2a tras 24, 48 y 72 horas de exposición a (A) MET 0,178  $\mu\text{M}$ , 0,375  $\mu\text{M}$ , 0,750  $\mu\text{M}$ , 1,5  $\mu\text{M}$  y 3  $\mu\text{M}$ , (B) a CPF 0,625  $\mu\text{M}$ , 1,25  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  y (C) a MTZ 0,625  $\mu\text{M}$ , 1,25  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ . La viabilidad se evaluó mediante el ensayo Alamar Blue en células sin diferenciar. Los resultados se expresan como porcentaje con respecto al control de vida y corresponden a la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado.

## 4.2 VIABILIDAD CELULAR DE LA LÍNEA HEK293 Na<sub>v</sub>1.6

### 4.2.1 ENSAYOS REALIZADOS CON MTT

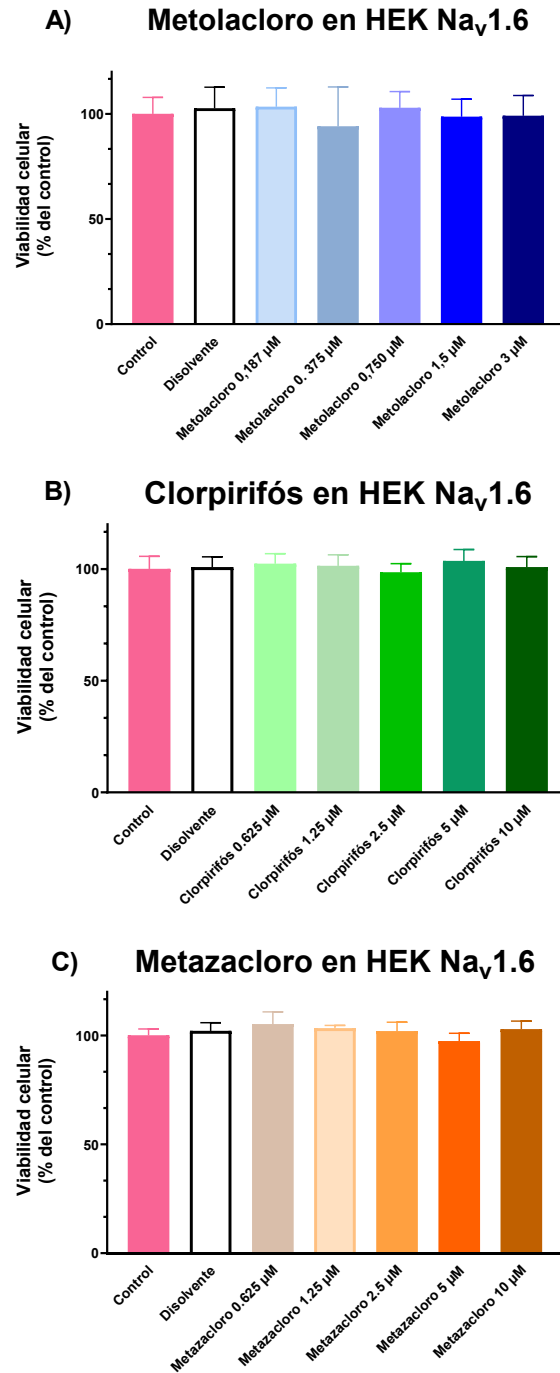
Se expusieron las células embrionarias humanas HEK293 Na<sub>v</sub>1.6 a MET, CPF y MTZ a las concentraciones ya presentadas y se estudió la viabilidad tras 72 horas de exposición mediante el ensayo MTT.

En los experimentos con MET, la lectura de la absorbancia (en unidades de absorbancia) fue  $1,076 \pm 0,085$  en el control de vida;  $1,104 \pm 0,108$  en el control del disolvente;  $1,113 \pm 0,096$  en las células expuestas a MET  $0,187 \mu\text{M}$ ;  $1,012 \pm 0,202$  a  $0,375 \mu\text{M}$ ;  $1,107 \pm 0,083$  a  $0,750 \mu\text{M}$ ;  $1,061 \pm 0,090$  a  $1,5 \mu\text{M}$ ;  $1,066 \pm 0,104$  a  $3 \mu\text{M}$ ; y  $0,062 \pm 0,04$  en el control de muerte.

En los ensayos con CPF la absorbancia fue de  $1,149 \pm 0,065$  en el control de vida;  $1,159 \pm 0,053$  en el control del disolvente;  $1,176 \pm 0,052$  en las células tratadas con  $0,625 \mu\text{M}$  de CPF;  $1,165 \pm 0,057$  con  $1,25 \mu\text{M}$ ;  $1,132 \pm 0,044$  con  $2,5 \mu\text{M}$ ;  $1,190 \pm 0,059$  con  $5 \mu\text{M}$ ;  $1,158 \pm 0,055$  con  $10 \mu\text{M}$ ; y  $0,055 \pm 0,004$  en el control de muerte.

Los resultados obtenidos para el MTZ fueron de  $1,131 \pm 0,033$  en el control de vida;  $1,154 \pm 0,043$  en el control del disolvente;  $1,190 \pm 0,064$  en tratamientos con MTZ  $0,625 \mu\text{M}$ ;  $1,169 \pm 0,014$  con  $1,25 \mu\text{M}$ ;  $1,153 \pm 0,046$  con  $2,5 \mu\text{M}$ ;  $1,101 \pm 0,041$  con  $5 \mu\text{M}$ ;  $1,163 \pm 0,042$  con  $10 \mu\text{M}$ ; y  $0,055 \pm 0,004$  en el control de muerte.

La viabilidad celular de la línea HEK293 Na<sub>v</sub>1.6 no se vio afectada de manera significativa por la exposición durante 72 horas a MET, CPF y MTZ a las concentraciones descritas, tal y cómo se observa en la figura 14.



**Figura 14.** Viabilidad celular de la línea HEK293 Na<sub>v</sub>1.6 tras 72 horas de exposición a (A) MET 0,178 µM, 0,375 µM, 0,750 µM, 1,5 µM y 3 µM, (B) CPF 0,625 µM, 1,25 µM, 2,5 µM, 5 µM y 10 µM y (C) MTZ 0,625 µM, 1,25 µM, 2,5 µM, 5 µM y 10 µM. La viabilidad se evaluó mediante el ensayo MTT y se expresa como porcentaje con respecto al control de vida. En los resultados se representa la media ± SEM de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

---

#### 4.2.2 ENSAYOS REALIZADOS CON ALAMAR BLUE

Igual que se hizo con la línea celular Neuro-2a, se estudió la viabilidad celular de la línea HEK293 Nav1.6 a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento con los pesticidas, empleando la técnica Alamar Blue.

A las 24 horas, los resultados (en unidades de fluorescencia) de los tratamientos con MET fueron de  $1613,1 \pm 89,8$  en el control de vida;  $1684,4 \pm 56,6$  en el control del disolvente;  $1659,7 \pm 21,5$  en las células con MET  $0,187 \mu\text{M}$ ;  $1662,6 \pm 17,1$  con  $0,375 \mu\text{M}$ ;  $167,83 \pm 12,1$  con  $0,750 \mu\text{M}$ ;  $1730,1 \pm 32,3$  con  $1,5 \mu\text{M}$ ;  $1687,7 \pm 14,9$  con  $3 \mu\text{M}$ ; y  $24,3 \pm 4,1$  en el control de muerte.

Después de 48 horas, las intensidades de fluorescencia registradas fueron:  $1552,6 \pm 24,0$  en el control de vida;  $1611,3 \pm 54,3$  en el control de disolvente;  $1606,1 \pm 64,5$  en los pocillos tratados con  $0,187 \mu\text{M}$  de MET;  $1595,6 \pm 69,1$  con  $0,375 \mu\text{M}$ ;  $1618,8 \pm 70,5$  con  $0,750 \mu\text{M}$ ;  $1612,4 \pm 112,6$  con  $1,5 \mu\text{M}$ ;  $1600,3 \pm 101,5$  con  $3 \mu\text{M}$ ; y  $26,0 \pm 5,5$  en el control de muerte.

Al cabo de 72 horas, los resultados obtenidos fueron:  $1348,7 \pm 25,7$  en el control de vida;  $1419,2 \pm 71,7$  en el control del disolvente;  $1416,3 \pm 74,8$  en ensayos con MET  $0,187 \mu\text{M}$ ;  $1381,7 \pm 93,5$  con  $0,375 \mu\text{M}$ ;  $1418,6 \pm 87,0$  con  $0,750 \mu\text{M}$ ;  $1395,7 \pm 132,2$  con  $1,5 \mu\text{M}$ ;  $1395,1 \pm 1014,8$  con  $3 \mu\text{M}$ ; y  $26,7 \pm 6,2$  en el control de muerte.

La fluorescencia detectada en los tratamientos con diferentes concentraciones de MET no mostró una variación significativa con respecto al control de vida a ninguno de los tiempos medidos. Sin embargo, la intensidad de la fluorescencia mostró una disminución progresiva con el paso del tiempo, habiéndose registrado los valores más altos a las 24 horas de tratamiento.

En los ensayos con CPF, la fluorescencia registrada a las 24 horas de exposición fue de  $1654,9 \pm 25,1$  en el control de vida;  $1610,2 \pm 36,7$  en el control del disolvente;  $1651,6 \pm 51,0$  en pocillos tratados con CPF  $0,625 \mu\text{M}$ ;  $1650,8 \pm 54,3$  con  $1,25 \mu\text{M}$ ;  $1689,8 \pm 64,2$  con  $2,5 \mu\text{M}$ ;  $1696,9 \pm 68,2$  con  $5 \mu\text{M}$ ;  $1691,9 \pm 73,9$  con  $10 \mu\text{M}$ ; y  $13,7 \pm 1,9$  en el control de muerte.

Trascurridas 48 horas, los valores fueron:  $1603,4 \pm 59,3$  en el control de vida;  $1587,0 \pm 29,9$  en el control del disolvente;  $1603,0 \pm 76,4$  a una concentración  $0,180 \mu\text{M}$  de CPF;

1622,9 ± 44,6 a 1,25 µM; 1635,9 ± 84,661 a 2,5 µM; 1682,3 ± 67,6 a 5 µM; 1700,7 ± 82,6 a 10 µM; y 24,3 ± 1,3 en el control de muerte.

Después de 72 horas de exposición a CPF, la fluorescencia medida en el control de vida fue de 1357,0 ± 73,5; en el control del disolvente de 1392,9 ± 97,0; en las células tratadas con CPF 0,625 µM de 1393,6 ± 152,2; con 1,25 µM de 1425,8 ± 144,0; con 2,5 µM de 1457,4 ± 159,8; con 5 µM de 1498,7 ± 142,4; con 10 µM de 15633,4 ± 164,6; y en el control de muerte de 36,0 ± 1,7.

En los tratamientos con CPF, de manera similar a como ocurrió con el MET, no se observó una variación significativa en la fluorescencia de los pocillos con tratamiento respecto al control. Por otro lado, en este caso, no se observó una disminución progresiva de la señal a lo largo del tiempo, sino que los valores se mantuvieron relativamente constantes.

La fluorescencia medida a las 24 horas en los experimentos con MTZ fue de 1567,7 ± 68,2 en el control de vida; 1633,1 ± 49,1 en el control del disolvente; 1617,7 ± 30,0 en los tratamientos con MTZ 0,625 µM; 1631,6 ± 34,8 con 1,25 µM; 16841,6 ± 53,9 con 2,5 µM; 1657,4 ± 53,2 con 5 µM; 1687,8 ± 63,7 con 10 µM; y 24,3 ± 4,1 en el control de muerte.

A las 48 horas de exposición al MTZ, las intensidades de fluorescencia detectadas fueron: 1616,6 ± 55,7 en el control de vida; 1692,8 ± 57,3 en el control del disolvente; 1685,2 ± 66,1 en las células en contacto con 0,625 µM de MTZ; 1661,1 ± 25,4 con 1,25 µM; 1682,8 con 2,5 µM; 1699,1 ± 64,9 con 5 µM; 1735,6 ± 49,4 con 10 µM; y 24,3 ± 1,3 en el control de muerte.

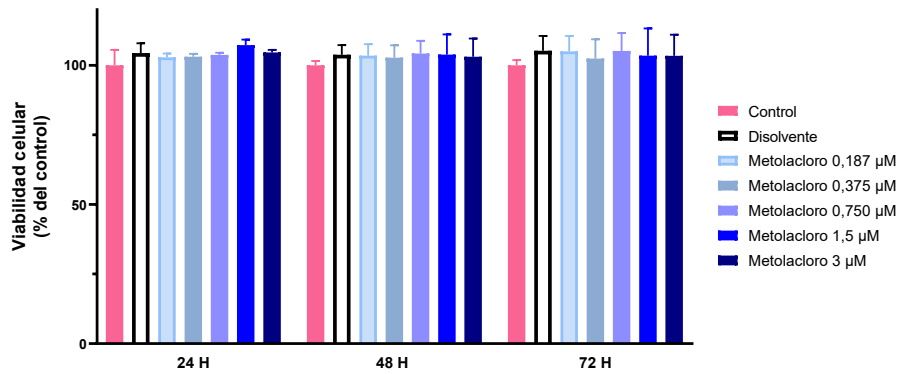
Finalizadas las 72 horas de tratamiento con MTZ, se registró una fluorescencia de: 1443,8 ± 15,4 en el control de vida; 1566,1 ± 36,1 en el control del disolvente; 1533,4 ± 38,8 en las células tratadas con MTZ 0,625 µM; 1502,0 ± 2,9 con 1,25 µM; 1523,1 ± 66,7 con 2,5 µM; 1563,8 ± 40,9 con 5 µM; 1573,3 ± 28,3 con 10 µM; y 36,0 ± 1,7 en el control de muerte.

En el caso del MTZ, no se observaron diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia entre los pocillos tratados y el control de vida a las 24 y 48 horas de exposición. Esta tendencia se mantuvo a las 72 horas, salvo en los cultivos tratados con 10 µM de MTZ, donde se registró un aumento significativo de la fluorescencia.

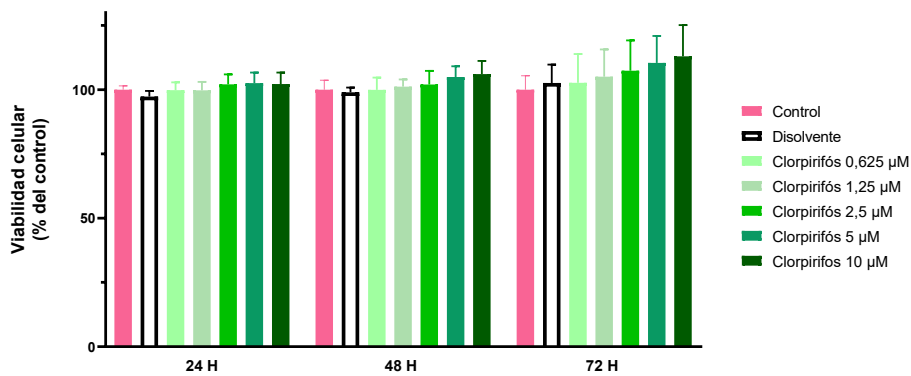
Asimismo, la intensidad de fluorescencia se mantuvo estable durante las primeras 48 horas de tratamiento, pero disminuyó a las 72 horas.

La variación de la viabilidad de la línea celular HEK293 Nav1.6 durante las primeras 72 horas de exposición a MET (0,178  $\mu$ M-3  $\mu$ M) y a CPF y MTZ (0,625  $\mu$ M-10  $\mu$ M) se presenta en la figura 15. Se observa que la viabilidad celular no muestra variaciones estadísticamente significativas a ninguno de los tiempos medidos.

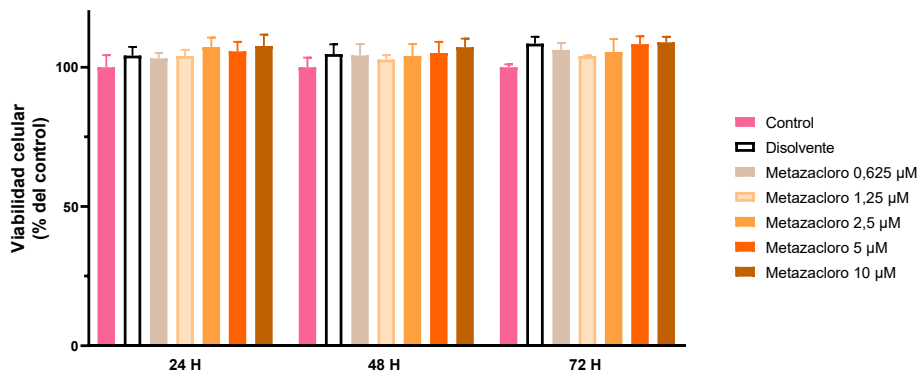
**A) Metolaclo Alamar Blue HEK293 Na<sub>v</sub>1.6**



**B) Clorpirifos Alamar Blue HEK Na<sub>v</sub>1.6**



**C) Metazacloro Alamar Blue HEK293 Na<sub>v</sub>1.6**



**Figura 15.** Viabilidad celular de la línea HEK293 Na<sub>v</sub>1.6 tras 24, 48 y 72 horas de exposición de exposición a (A) MET 0,178  $\mu$ M, 0,375  $\mu$ M, 0,750  $\mu$ M, 1,5  $\mu$ M y 3  $\mu$ M, (B) a CPF 0,625  $\mu$ M, 1,25  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M y (C) a MTZ 0,625  $\mu$ M, 1,25  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M. La viabilidad se evaluó mediante el ensayo Alamar Blue y los resultados se expresan como porcentaje con respecto al control de vida. Los datos se corresponden con la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado.

## 5. DISCUSIÓN

Debido a sus efectos perjudiciales tanto en organismos no diana como en el medio ambiente, el aumento de la contaminación por residuos de pesticidas se ha convertido en un problema de creciente preocupación a nivel mundial (Hassaan & El Nemr, 2020).

Aunque el uso del clorpirifós fue prohibido en la Unión Europea en el año 2020 (Europea, 2020), se sigue empleando en varios países a nivel mundial, lo que ha dado lugar a la presencia de residuos en alimentos importados y comercializados en Europa, como es el caso de semillas de comino y arroz de la India, frijoles secos de Madagascar, uvas de Irán, pomelos de Turquía y naranjas de Egipto (EFSA, 2024). Por otro lado, la Agencia Europea de Medio Ambiente (EEA) ha reportado que el metolacloro fue uno de los pesticidas que superaron los LMR en aguas superficiales en el período comprendido entre 2013 y 2022 (EEA, 2024).

Hasta el momento no se han realizados estudios sobre los efectos *in vitro* del metolacloro en las líneas Neuro-2a y HEK293 Na<sub>v</sub>1.6, pero se ha observado que este herbicida reduce significativamente la proliferación de las células HepG2 a una concentración de 0,176  $\mu\text{M}$  (50 ppb), tras 72 horas de exposición (Hartnett *et al.*, 2013). En el mismo estudio, fue necesario emplear concentraciones más elevadas para observar un efecto significativo tras 24 horas de exposición, observándose citotoxicidad a partir de 0,352  $\mu\text{M}$  (100 ppb). Por otro lado, la línea de fibroblastos humanos Det 551 mostró una sensibilidad mayor a este pesticida, detectándose una disminución significativa de la proliferación tras 72 horas de exposición a una concentración de 0,0056  $\mu\text{M}$  (1,6 ppb) (Dhanwada *et al.*, 2003).

En el caso del clorpirifós, sí que existen estudios *in vitro* en las líneas celulares utilizadas en este Trabajo de Fin de grado. Se han llevado a cabo numerosos estudios en la línea Neuro-2a que han reportado la capacidad de este insecticida de inhibir el crecimiento y producir la retracción de los axones en células en proceso de diferenciación y diferenciadas respectivamente, así como de provocar la disrupción de la red de neurofilamentos. Estos efectos han sido estudiados exponiendo las células diferenciadas o en proceso de diferenciación a concentraciones de CPF entre 0-10  $\mu\text{M}$  durante un máximo de 8 horas, y se han asociado principalmente a alteraciones en la cadena pesada de los neurofilamentos. Los ensayos de viabilidad celular realizados indicaron que el CPF no presentaba citotoxicidad para las células tratadas en esas condiciones experimentales (Flaskos *et al.*, 2011; Sachana *et al.*, 2001; Sindi *et al.*, 2016). Por otro lado, los ensayos

*in vitro* realizados con CPF en la línea HEK293 Na<sub>v</sub>1.6 señalaron efectos citotóxicos a concentraciones comprendidas entre 28,52 μM (10 μg/mL) y 370 μM (Li *et al.*, 2015; Van Emon *et al.*, 2018).

A pesar de la falta de estudios *in vitro* sobre los efectos del metazacloro, se ha reportado que este herbicida no presenta toxicidad en hepatocitos de rata Wistar tras tratamientos de 4 días a concentraciones entre 0,5 y 50 μM. Sin embargo, en hepatocitos humanos, algunos tratamientos con 0,5-25 μM durante el mismo periodo sí mostraron toxicidad (Wiemann *et al.*, 2019).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, se eligieron las líneas celulares Neuro-2a y HEK293 Na<sub>v</sub>1.6 para evaluar los posibles efectos tóxicos en líneas celulares de ratón y en células humanas de los tres pesticidas mencionados.

Los resultados de los ensayos de viabilidad celular realizados en la línea Neuro-2a, tanto mediante la técnica MTT como Alamar Blue, indicaron que tanto el MET (0,187–3 μM), como el CPF y el MTZ (0,625-10 μM), no ejercen efectos citotóxicos en estas células, tanto diferenciadas como sin diferenciar, durante las primeras 72 horas de exposición. Los resultados de la línea HEK293 Na<sub>v</sub>1.6 fueron similares a los obtenidos en la línea Neuro-2a por ambas técnicas.

En el caso del MET, la ausencia de toxicidad observada en ambas líneas celulares difiere de los resultados de investigaciones previas en células HepG2, realizados en condiciones experimentales similares. Sin embargo, esta diferencia no resulta sorprendente, ya que la respuesta a los pesticidas depende no solo de la dosis y el tiempo de exposición, sino también del tipo celular.

Esta misma consideración se aplica al MTZ, cuyos resultados tanto para las células Neuro-2a como para las HEK293 Na<sub>v</sub>1.6, coinciden con los obtenidos en hepatocitos de rata Wistar, pero difieren de los observados en hepatocitos humanos, en los que sí se ha presenciado toxicidad.

Por otro lado, el CPF a concentraciones 0,625-10 μM no resultó ser tóxico para la línea HEK293 Na<sub>v</sub>1.6, lo que concuerda con los estudios previos realizados en esta misma línea. Esto puede deberse a que las concentraciones empleadas fueron insuficientes para inducir toxicidad en estas células. En cuanto a la línea Neuro-2a, los estudios previos respaldan la ausencia de toxicidad observada en este trabajo, aunque el tiempo de

tratamiento en este trabajo fue muy superior (72 horas frente a 8 horas). No obstante, se ha observado que la exposición de células Neuro-2a diferenciadas durante 24 horas a clorpirifós-oxon (un metabolito activo del CPF), tampoco resulta tóxica (Sindi *et al.*, 2016), lo que respalda los resultados obtenidos.

Cabe destacar que, con el objetivo de corregir las variaciones en la fluorescencia observadas en los ensayos de Alamar Blue, atribuibles a diferencias de densidad celular entre los distintos pocillos, se intentó cuantificar la cantidad de proteína total mediante el ensayo de Bradford. Para que el Alamar Blue no interfiriese con la lectura del ensayo Bradford, fueron necesarios dos pasos de lavado, en los que se observó que las células Neuro-2a se desprendían al aspirar el pocillo. Este fenómeno podría estar relacionado con la disrupción del citoesqueleto de neurofilamentos, descrita en las investigaciones con CPF en células Neuro-2a.

En esta misma línea, sería necesario realizar estudios adicionales en las líneas Neuro-2a y HEK293 Na<sub>v</sub>1.6 utilizando concentraciones más elevadas, con el fin de profundizar en los posibles efectos tóxicos del MET, CPF y MTZ en estas células. Asimismo, se requieren investigaciones complementarias, tanto a las concentraciones estudiadas como a concentraciones superiores, que permitan evaluar los efectos de estos pesticidas sobre la integridad del citoesqueleto, así como otros posibles efectos sobre las células.

## 6. CONCLUSIÓN

En este Trabajo de Fin de Grado se ha evaluado la citotoxicidad del metolacloro, del clorpirifós y del metazacloro en las líneas celulares Neuro-2a y HEK293 Nav1.6 empleando dos ensayos de viabilidad celular. Aunque son necesarios estudios adicionales que permitan completar la caracterización de los efectos de estos pesticidas en ambas líneas celulares, los resultados obtenidos han permitido concluir que:

1. El metolacloro a concentraciones menores a  $3\mu\text{M}$ , así como el clorpirifós y el metazaclor a concentraciones menores a  $10\mu\text{M}$ , no mostraron efectos tóxicos en las células Neuro-2a, tanto diferenciadas como no diferenciadas, tras 72 horas de exposición.
2. Tras 72 horas de tratamiento, no se detectaron efectos citotóxicos del metolacloro a concentraciones inferiores a  $3\mu\text{M}$ , ni del clorpirifós y metazacloro a concentraciones inferiores a  $10\mu\text{M}$ , en la línea celular HEK293 Nav1.6.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AbuQamar, S. F., El-Saadony, M. T., Alkafaas, S. S., Elsalahaty, M. I., Elkafas, S. S., Mathew, B. T., . . . Abd El-Mageed, T. A. (2024). Ecological impacts and management strategies of pesticide pollution on aquatic life and human beings. *Marine Pollution Bulletin*, 206, 116613. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2024.116613>
- Alasbahi, R., & Melzig, M. (2012). Forskolin and derivatives as tools for studying the role of cAMP. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67(1), 5-13. <https://doi.org/10.1691/ph.2012.1642>
- Ammer, H., & Schulz, R. (1997). Regulation of stimulatory adenylyl cyclase signaling during forskolin-induced differentiation of mouse neuroblastoma<sup>x</sup> rat glioma (NG108–15) cells. *Neuroscience letters*, 230(3), 143-146. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(97\)00495-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(97)00495-3)
- Aroniadou-Anderjaska, V., Figueiredo, T. H., de Araujo Furtado, M., Pidoplichko, V. I., & Braga, M. F. (2023). Mechanisms of organophosphate toxicity and the role of acetylcholinesterase inhibition. *Toxics*, 11(10), 866. <https://doi.org/10.3390/toxics11100866>
- Batsale, M., Bahammou, D., Fouillen, L., Mongrand, S., Joubès, J., & Domergue, F. (2021). Biosynthesis and functions of very-long-chain fatty acids in the responses of plants to abiotic and biotic stresses. *Cells*, 10(6), 1284. <https://doi.org/10.3390/cells10061284>
- Böger, P. (2003). Mode of action for chloroacetamides and functionally related compounds. *Journal of Pesticide Science*, 28(3), 324-329. <https://doi.org/10.1584/jpestics.28.324>
- Böger, P., Matthes, B., & Schmalfuß, J. (2000). Towards the primary target of chloroacetamides—new findings pave the way. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 56(6), 497-508. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1526-4998\(200006\)56:6%3C497::AID-PS169%3E3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1526-4998(200006)56:6%3C497::AID-PS169%3E3.0.CO;2-W)
- Bonvallet, R., Lemtiri-Chlieh, F., & Rougier, O. (1990). Forskolin but not isoprenaline increases sodium current from frog cardiac myocytes. *Experimental Physiology: Translation and Integration*, 75(6), 843-846. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1990.sp003466>

- Burbidge, S. A., Dale, T. J., Powell, A. J., Whitaker, W. R., Xie, X. M., Romanos, M. A., & Clare, J. J. (2002). Molecular cloning, distribution and functional analysis of the NAV1. 6. Voltage-gated sodium channel from human brain. *Molecular Brain Research*, 103(1-2), 80-90. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(02\)00188-2](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(02)00188-2)
- Chen, S.-F., Chen, W.-J., Huang, Y., Wei, M., & Chang, C. (2023). Insights into the metabolic pathways and biodegradation mechanisms of chloroacetamide herbicides. *Environmental Research*, 229, 115918. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115918>
- CINEA. (2025). *Programme for Environment and Climate Action (LIFE): Call for proposals — Circular economy and quality of life – Standard action projects (SAP)*, LIFE-2025-SAP-ENV. [https://ec.europa.eu/info/funding-tenders/opportunities/docs/2021-2027/life/wp-call/2025/call-fiche\\_life-2025-sap-env\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/info/funding-tenders/opportunities/docs/2021-2027/life/wp-call/2025/call-fiche_life-2025-sap-env_en.pdf)
- Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M., & Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current neuropharmacology*, 11(3), 315-335. <https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006>
- Commission, E. (s.f.). *Zero Pollution Action Plan: Towards zero pollution for air, water and soil*. European Commission – Environment. Retrieved 19 June 2025 from [https://environment.ec.europa.eu/strategy/zero-pollution-action-plan\\_en](https://environment.ec.europa.eu/strategy/zero-pollution-action-plan_en)
- Datta, D., Biswas, B., Lodh, A., Parida, V. K., & Goel, S. (2025). A critical review of pesticides in aquatic environment: Current trends, environmental impacts, and advances in analytical extraction techniques. *Talanta*, 128094. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2025.128094>
- Deal, L. M., Reeves, J., Larkins, B., & Hess, F. (1980). Use of an in vitro protein synthesizing system to test the mode of action of chloracetamides. *Weed Science*, 28(3), 334-340. <https://doi.org/10.1017/S0043174500055417>
- Deng, W., Obrocka, M., Fischer, I., & Prockop, D. J. (2001). In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochemical and biophysical research communications*, 282(1), 148-152. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4570>

- Dhanwada, K. R., Deng, Y., & Clayton, M. E. (2003). Effects of the pesticides atrazine, metoachlor and diazinon and binary mixtures on proliferation of human fibroblasts. *International Journal of Global Health*, 2(2), 21-36. <https://scholarworks.uni.edu/ijgh/vol2/iss2/3>
- EEA. (2024). *Pesticides in rivers, lakes and groundwater in Europe*. Retrieved 21 June 2025 from <https://www.eea.europa.eu/en/analysis/indicators/pesticides-in-rivers-lakes-and>
- EFSA. (2019). Statement on the available outcomes of the human health assessment in the context of the pesticides peer review of the active substance chlorpyrifos. *EFSA Journal*, 17(8). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5809>
- EFSA. (2024). The 2022 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal*, 22(4), e8753. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.8753>
- EPA. (2024). *Basic Information about Pesticides Ingredients*. Retrieved 18 April 2025 from <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/basic-information-about-pesticide-ingredients>
- España, G. d. (2002). *Ley 43/2002, de 20 de noviembre, de sanidad vegetal* [Boletín Oficial del Estado, núm. 279, pp. 40968–41000]. Retrieved 17 June 2025 from <https://www.boe.es/eli/es/l/2002/11/20/43>
- España, G. d. (2012). *Real Decreto 1311/2012, de 14 de septiembre, por el que se establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios* [Boletín Oficial del Estado, núm. 223, pp. 64820–64919]. Retrieved 17 June 2025 from <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2012-11605>
- España, G. d. (2014). *Real Decreto 971/2014, de 21 de noviembre, por el que se regula el procedimiento de evaluación de productos fitosanitarios* [Boletín Oficial del Estado, núm. 284, pp. 93150–93177]. Retrieved 17 June 2025 from <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2014-12561>
- Europea, C. (2020). *Reglamento de Ejecución (UE) 2020/18 de la Comisión de 10 de enero de 2020 por el que no se renueva la aprobación de la sustancia activa clorpirifos con arreglo al Reglamento (CE) 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, y se modifica el anexo del Reglamento de Ejecución (UE) 540/2011*

- de la Comisión [Diario Oficial de la Unión Europea, L 7, pp. 14–16]. Retrieved 17 June 2025 from <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2020-80023>
- Europeo, P., & Europea, C. d. a. U. (2009). *Reglamento (CE) n° 1107/2009 relativo a la comercialización de productos fitosanitarios y por el que se derogan las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE del Consejo* [Diario Oficial de la Unión Europea L 309, pp. 1–50]. Retrieved 17 June 2025 from <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2009-82202>
- Europeo, P., & Europea, C. d. l. U. (2005). *Reglamento (CE) n.º 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de febrero de 2005, relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en los alimentos y piensos de origen vegetal y animal y por el que se modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo* [Diario Oficial de la Unión Europea, L 70, pp. 1–16]. Retrieved 17 June 2025 from <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2005-80504>
- Europeo, P., & Europea, C. d. l. U. (2009). *Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas* [Diario Oficial de la Unión Europea L 309, pp. 71–86]. Retrieved 17 June 2025 from <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2009-82204>
- Europeo, P., & Europea, C. d. l. U. (2020). *Directiva (UE) 2020/2184 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2020, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano (versión refundida)* [Diario Oficial de la Unión Europea, L 435, pp. 1–62]. Retrieved 17 June 2025 from <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2020-81947>
- FAO. (2024). *Pesticides use and trade – 1990–2022*. Rome, Italy Retrieved from <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/cd1486en>
- Flaskos, J., Nikolaidis, E., Harris, W., Sachana, M., & Hargreaves, A. (2011). Effects of sub-lethal neurite outgrowth inhibitory concentrations of chlorpyrifos oxon on cytoskeletal proteins and acetylcholinesterase in differentiating N2a cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 256(3), 330-336. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.06.002>

- Fukuto, T. R. (1990). Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental health perspectives*, 87, 245-254. <https://doi.org/10.1289/ehp.9087245>
- García, M. G., Fernández-López, C., Polesel, F., & Trapp, S. (2019). Predicting the uptake of emerging organic contaminants in vegetables irrigated with treated wastewater—implications for food safety assessment. *Environmental Research*, 172, 175-181. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.02.011>
- García, M. G., Sánchez, J. I. L., Bravo, K. A. S., Cabal, M. D. C., & Pérez-Santín, E. (2022). Review: Presence, distribution and current pesticides used in Spanish agricultural practices. *Sci Total Environ*, 845, 157291. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157291>
- Götz, T., & Böger, P. (2004). The very-long-chain fatty acid synthase is inhibited by chloroacetamides. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59(7-8), 549-553. <https://doi.org/10.1515/znc-2004-7-818>
- Gupta, R. C., Malik, J. K., & Milatovic, D. (2011). Organophosphate and carbamate pesticides. In *Reproductive and developmental toxicology* (pp. 471-486). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382032-7.10037-2>
- Gupta, R. C., Mukherjee, I. R. M., Malik, J. K., Doss, R. B., Dettbarn, W.-D., & Milatovic, D. (2019). Insecticides. In *Biomarkers in toxicology* (pp. 455-475). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814655-2.00026-8>
- Hargreaves, A. J., Sachana, M., & Flaskos, J. (2011). The use of differentiating N2a and C6 cell lines for studies of organophosphate toxicity. *Cell Culture Techniques*, 269-291. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-077-5\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-077-5_13)
- Hartnett, S., Musah, S., & Dhanwada, K. R. (2013). Cellular effects of metolachlor exposure on human liver (HepG2) cells. *Chemosphere*, 90(3), 1258-1266. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.077>
- Haslam, T. M., & Kunst, L. (2013). Extending the story of very-long-chain fatty acid elongation. *Plant science*, 210, 93-107. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.05.008>

- Hassaan, M. A., & El Nemr, A. (2020). Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 46(3), 207-220. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2020.08.007>
- He, B., & Soderlund, D. M. (2014). Functional expression of rat Nav1. 6 voltage-gated sodium channels in HEK293 cells: modulation by the auxiliary  $\beta 1$  subunit. *PLoS One*, 9(1), e85188. <https://doi.org/doi.org/10.1371/journal.pone.0085188>
- Hinojosa, M. G., Johansson, Y., Jos, A., Cameán, A., & Forsby, A. (2024). Effects of cylindrospermopsin, chlorpyrifos and their combination in a SH-SY5Y cell model concerning developmental neurotoxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 269, 115804. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115804>
- Holman, G., & Kasuga, M. (1997). From receptor to transporter: insulin signalling to glucose transport. *Diabetologia*, 40, 991-1003. <https://doi.org/10.1007/s001250050780>
- Huang, X., Cui, H., & Duan, W. (2020). Ecotoxicity of chlorpyrifos to aquatic organisms: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 200, 110731. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110731>
- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., & Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food frontiers*, 1(3), 332-349. <https://doi.org/doi.org/10.1002/fft2.44>
- Kyselová, L., Vítová, M., & Řezanka, T. (2022). Very long chain fatty acids. *Progress in lipid research*, 87, 101180. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2022.101180>
- Lamberth, C. (2016). Chloroacetamide herbicides. *Bioactive Carboxylic Compound Classes: Pharmaceuticals and Agrochemicals*, 293-302. <https://doi.org/10.1002/9783527693931.ch21>
- Levin, G., Keren, T., Peretz, T., Chikvashvili, D., Thornhill, W. B., & Lotan, I. (1995). Regulation of RCK1 Currents with a cAMP Analog via Enhanced Protein Synthesis and Direct Channel Phosphorylation\*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(24), 14611-14618. <https://doi.org/doi.org/10.1074/jbc.270.24.14611>
- Li, D., Huang, Q., Lu, M., Zhang, L., Yang, Z., Zong, M., & Tao, L. (2015). The organophosphate insecticide chlorpyrifos confers its genotoxic effects by inducing DNA damage and cell apoptosis. *Chemosphere*, 135, 387-393. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.05.024>

- Liu, J., Bao, Y., Zhang, X., Zhao, S., Qiu, J., Li, N., & He, J. (2022). Anaerobic biodegradation and detoxification of chloroacetamide herbicides by a novel *Proteiniclasticum sediminis* BAD-10T. *Environmental Research*, 209, 112859. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.112859>
- Liu, J., Zhang, X., Xu, J., Qiu, J., Zhu, J., Cao, H., & He, J. (2020). Anaerobic biodegradation of acetochlor by acclimated sludge and its anaerobic catabolic pathway. *Science of the Total Environment*, 748, 141122. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141122>
- Lowry, D. M., Greiner, D., Fretheim, M., Ubben, M., & Dhanwada, K. R. (2013). Mechanism of metolachlor action due to alterations in cell cycle progression. *Cell biology and toxicology*, 29, 283-291. <https://doi.org/10.1007/s10565-013-9256-z>
- Martyniuk, C. J., Mehinto, A. C., & Denslow, N. D. (2020). Organochlorine pesticides: Agrochemicals with potent endocrine-disrupting properties in fish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 507, 110764. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110764>
- MITECO. (s.f.). *Programa LIFE*. Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico – Gobierno de España- Retrieved 19 June 2025 from <https://www.miteco.gob.es/es/ministerio/servicios/ayudas-subvenciones/programa-life.html>
- Okogwu, O. I., Elebe, F. A., & Nwonumara, G. N. (2022). Combinations of cypermethrin and dimethoate alter behavior, hematology and histology of African Catfish, *Clarias gariepinus*. *Environmental Analysis, Health and Toxicology*, 37(4), e2022028. <https://doi.org/10.5620/eaht.2022028>
- Rajmohan, K., Chandrasekaran, R., & Varjani, S. (2020). A review on occurrence of pesticides in environment and current technologies for their remediation and management. *Indian journal of microbiology*, 60(2), 125-138. <https://doi.org/10.1007/s12088-019-00841-x>
- Rampersad, S. N. (2012). Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors*, 12(9), 12347-12360. <https://doi.org/10.3390/s120912347>
- Raposo-Garcia, S., Cao, A., Costas, C., Louzao, M. C., Vilariño, N., Vale, C., & Botana, L. M. (2023). Mouse N2a neuroblastoma assay: Uncertainties and comparison

- with alternative cell-based assays for ciguatoxin detection. *Marine Drugs*, 21(11), 590. <https://doi.org/10.3390/md21110590>
- Raposo-Garcia, S., & Vale, C. (2024). Toxicological studies with cells. In L. M. Botana (Ed.), *Environmental Toxicology: Non-bacterial Toxins* (pp. 135-170). Walter de Gruyter GmbH & Co KG. <https://doi.org/10.1515/9783111014449>
- Rathnayake, L. K., & Northrup, S. H. (2016). Structure and mode of action of organophosphate pesticides: A computational study. *Computational and Theoretical Chemistry*, 1088, 9-23. <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2016.04.024>
- Sachana, M., Flaskos, J., Alexaki, E., Glynn, P., & Hargreaves, A. (2001). The toxicity of chlorpyrifos towards differentiating mouse N2a neuroblastoma cells. *Toxicology in vitro*, 15(4-5), 369-372. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(01\)00038-8](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(01)00038-8)
- Saha, R., & Dutta, S. M. (2024). Pesticides' mode of action on aquatic life. *Toxicology Reports*, 101780. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.toxrep.2024.101780>
- Sandoval, L., Rosca, A., Oniga, A., Zambrano, A., Ramos, J. J., González, M. C., . . . Motas, M. (2019). Effects of chlorpyrifos on cell death and cellular phenotypic specification of human neural stem cells. *Science of the Total Environment*, 683, 445-454. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.270>
- Sindi, R. A., Harris, W., Arnott, G., Flaskos, J., Mills, C. L., & Hargreaves, A. J. (2016). Chlorpyrifos-and chlorpyrifos oxon-induced neurite retraction in pre-differentiated N2a cells is associated with transient hyperphosphorylation of neurofilament heavy chain and ERK 1/2. *Toxicology and applied pharmacology*, 308, 20-31. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.08.008>
- Tadeo, J. L., Albero, B., & Pérez, R. A. (2019). Pesticides: classification and properties. In *Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples, Second Edition* (pp. 1-40). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351047081>
- Testai, E., Buratti, F. M., & Di Consiglio, E. (2010). Chlorpyrifos. In *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (pp. 1505-1526). Elsevier.
- Tremblay, R. G., Sikorska, M., Sandhu, J. K., Lanthier, P., Ribocco-Lutkiewicz, M., & Bani-Yaghoub, M. (2010). Differentiation of mouse Neuro 2A cells into

- dopamine neurons. *Journal of neuroscience methods*, 186(1), 60-67.  
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.11.004>
- Van Emon, J. M., Pan, P., & van Breukelen, F. (2018). Effects of chlorpyrifos and trichloropyridinol on HEK 293 human embryonic kidney cells. *Chemosphere*, 191, 537-547. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.039>
- Wagh, V., Patil, P., Surana, S., & Wagh, K. (2012). Forskolin: upcoming antiglaucoma molecule. *Journal of postgraduate medicine*, 58(3), 199-202.  
<https://doi.org/10.4103/0022-3859.101396>
- Wiemann, C., Goettel, M., Vardy, A., Elcombe, B. M., Elcombe, C. R., Chatham, L. R., . . . Honarvar, N. (2019). Metazachlor: Mode of action analysis for rat liver tumour formation and human relevance. *Toxicology*, 426, 152282.  
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.152282>
- Wijewardene, L., Wu, N., Hörmann, G., Messyas, B., Riis, T., Hölzel, C., . . . Fohrer, N. (2021). Effects of the herbicides metazachlor and flufenacet on phytoplankton communities—A microcosm assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 228, 113036. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.113036>
- Yang, C., Lim, W., & Song, G. (2021). Immunotoxicological effects of insecticides in exposed fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 247, 109064. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109064>
- Zhang, J., Zheng, J.-W., Liang, B., Wang, C.-H., Cai, S., Ni, Y.-Y., . . . Li, S.-P. (2011). Biodegradation of chloroacetamide herbicides by *Paracoccus* sp. FLY-8 in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(9), 4614-4621.  
<https://doi.org/10.1021/jf104695g>
- Zhou, J., Yi, J., Hu, N., George Jr, A. L., & Murray, K. T. (2000). Activation of protein kinase A modulates trafficking of the human cardiac sodium channel in *Xenopus* oocytes. *Circulation research*, 87(1), 33-38.  
<https://doi.org/10.1161/01.RES.87.1.33>