



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO

*“IVERMECTINAS: EVALUACIÓN DE SU EFECTO DELETÉREO
MEDIANTE ENSAYOS DE GENOTOXICIDAD”*

Trabajo para optar al título de
Doctor en Ciencias Naturales

Lic. Gabriela B. Molinari

Director: Dr. Marcelo Luis Larramendy

Co-Directora: Dra. Sonia Soloneski

2010

A Gustavo

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
RESUMEN	8
SUMMARY	10
LISTA ORIGINAL DE PUBLICACIONES CIENTÍFICAS	12
ABREVIATURAS	14
1. INTRODUCCIÓN	16
1.1. Generalidades y relevancia de los antiparasitarios	16
1.2. Familias de antiparasitarios antihelmínticos	21
1.3. Ivermectina y formulaciones comerciales afines	28
2. OBJETIVOS	46
2.1. Objetivo General	46
2.2. Objetivos Específicos	46
3. MATERIALES Y MÉTODOS	48
3.1. Materiales utilizados	48
3.1.1. Compuestos químicos	48
3.1.2. Obtención de muestras	48
3.1.2.1. Líneas celulares establecidas	48
3.1.2.2. Muestras de sangre	49
3.2. Metodologías empleadas	49
3.2.1. Cultivos de líneas celulares establecidas	49
3.2.1.1. Cultivos de células CHO-K1	49
3.2.1.2. Cultivos de células CCL-126	51
3.2.2. Cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica <i>in vitro</i>	52
3.2.3. Tratamiento de los cultivos celulares con ivermectina e Ivomec®	53
3.2.4. Estudio de los efectos deletéreos ejercidos por ivermectina e Ivomec®	54
3.2.4.1. Estudio de la viabilidad celular	54

3.2.4.2. Estudio de la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICHs): Publicaciones II y IV; Anexo II (A, B y C)	55
3.2.4.3. Estudio de la progresión del ciclo celular (PCC) e índice mitótico (IM): Publicaciones II y IV; Anexo II (A, B y C)	56
3.2.4.4. Estudios del daño y reparación del ADN mediante el ensayo cometa (EC): Publicaciones II y IV; Anexo II (D y E)	57
3.2.4.5. Estudio de la actividad lisosomal mediante el ensayo de rojo neutro (RN): Publicaciones II y IV	58
3.2.4.6. Estudio de la actividad mitocondrial mediante el ensayo de MTT: Publicaciones II y IV	59
3.2.4.7. Estudio de la frecuencia de micronúcleos (MN): Anexo II (F)	60
3.2.4.8. Análisis estadístico	61
4. RESULTADOS	63
4.1. Evaluación de la frecuencia de ICHs: Publicaciones II y IV; Anexo II (A, B y C)	63
4.2. Evaluación de la progresión del ciclo celular (PCC) e índice mitótico (IM): Publicaciones II y IV; Anexo II (A, B y C)	65
4.3. Evaluación del daño inducido en el ADN de líneas celulares establecidas mediante el empleo del ensayo cometa (EC): Publicaciones II y IV	69
4.4. Evaluación de la cinética de reparación del daño inducido en el ADN cuantificado mediante el ensayo cometa (EC): Anexo II (D y E)	71
4.5. Evaluación de la actividad lisosomal mediante el empleo del ensayo de rojo neutro (RN): Publicaciones II y IV	73
4.6. Evaluación de la actividad mitocondrial mediante el empleo del ensayo de MTT: Publicaciones II y IV	74
4.7. Evaluación de la frecuencia de micronúcleos (MN): Anexo II (F)	76

5. DISCUSIÓN	77
CONSIDERACIONES FINALES	97
BIBLIOGRAFÍA	101

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas y cada una de las entidades y personas que permitieron el desarrollo de esta Tesis Doctoral:

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Beca de Postgrado Tipo I (2006-2009).

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Beca de Postgrado Tipo II (2009-2011).

Facultad de Ciencias Naturales y Museo –UNLP – Subsidio Tesistas (2009).

Universidad Nacional de La Plata, Subsidio Viajes y Estadías (2009).

Universidad Nacional de La Plata, Subsidio Jóvenes Investigadores (2010).

Al Doctor Marcelo L. Larramendy, por haberme aceptado como estudiante de doctorado y darme la oportunidad de llevar a cabo el presente trabajo de Tesis Doctoral en la Cátedra de Citología de esta Casa de Altos Estudios. Por su apoyo incondicional, su constancia, su paciencia y su amistad.

A la Doctora Sonia Soloneski, por ser mi guía y haberme transmitido parte de sus experiencias y conocimientos, por su buena predisposición y su más sincera amistad a lo largo de todos estos años de trabajo.

Al Doctor Miguel A. Reigosa, por su ayuda en la ejecución de diferentes metodologías relacionadas con los cultivos celulares. Por sus sabios consejos y por sus palabras de aliento en los momentos adversos. Por su incondicionalidad y su amistad paternal.

A mis compañeros de laboratorio, con quienes he compartido gratos momentos generando un apropiado ambiente laboral.

A mi familia, por su apoyo, contención y cariño y por brindarme la posibilidad de superarme día a día.

A mis amigos, por apoyarme y animarme diariamente a lo largo de todos estos años.

A todos, MUCHAS GRACIAS por haberme acompañado en esta etapa de crecimiento profesional.

RESUMEN

El propósito que animó a la realización del presente trabajo de Tesis Doctoral fue analizar el efecto deletéreo ejercido por el antiparasitario antihelmíntico ivermectina así como también una de sus formulaciones comerciales más utilizadas en nuestro país, Ivomec® (1% ivermectina, Merial S.A., Buenos Aires, Argentina). Dicho efecto fue evaluado *in vitro* en cultivos celulares de células mamíferos (CHO-K1) e insectos (CCL-126) así como en cultivos linfocitarios humanos mediante diferentes estimadores de genotoxicidad y citotoxicidad. Los resultados mostraron que ninguno de los compuestos analizados indujo un incremento significativo en la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas en células de las líneas celulares empleadas ni en los cultivos linfocitarios humanos. De manera similar, ni la ivermectina ni el Ivomec® resultaron ser inductores de micronúcleos en células CHO-K1 y no modificaron el índice de división nuclear. Sin embargo, tanto ivermectina como Ivomec® promovieron la formación de rupturas de cadena simple en el ADN de células CHO-K1 y CCL-126. Dichas células resultaron ser eficientes en la reparación del daño previamente inducido por estos compuestos evidenciado mediante la metodología del ensayo cometa. Por otro lado, ambos compuestos, indujeron marcadas alteraciones en la cinética de proliferación celular e índice mitótico tanto en células correspondientes a líneas celulares establecidas como en linfocitos humanos. Finalmente, una marcada citotoxicidad fue puesta en evidencia por ensayos colorimétricos específicos mostrando variaciones que dependieron tanto del tipo celular como de los sistemas de cultivo empleados. En líneas generales, los resultados obtenidos pondrían en evidencia que la ivermectina presenta un patrón de daño similar al ejercido por Ivomec® a igual

concentración. Nuestros resultados permiten inferir que el efecto deletéreo producido por Ivomec® estaría producido por el principio activo presente en su formulación pudiéndose descartar la posibilidad de la presencia de algún otro agente(s) inductor(es) de daño en la composición de la misma. Asimismo, estos resultados demuestran que la ivermectina presenta la capacidad de inducir daño en la molécula de ADN, al menos de células CHO-K1 y CCL-126, y además, manifestar un efecto altamente citotóxico. De este modo, su uso masivo pondría en serio peligro a los organismos que habitualmente son tratados con ivermectina entre los cuales se encuentran, sin lugar a dudas, los seres humanos. Por lo expuesto, se hace evidente la necesidad de evaluación en un futuro cercano en lo referente a la peligrosidad de la ivermectina por parte de la Agencia para la Protección del Medioambiente en los Estados Unidos de Norteamérica (EPA), institución encargada de brindar los lineamientos acerca de la regulación sobre su uso con el fin de minimizar el riesgo para todos los organismos expuestos directa o indirectamente a este tipo de agente terapéutico.

SUMMARY

The aim of this PhD study was to analyze the deleterious effect exerted by the antiparasitic anthelmintic ivermectin as well as one of its most commonly commercial formulations used in our country, Ivomec[®] (1% ivermectin, Merial SA, Buenos Aires, Argentina). This effect was evaluated in *in vitro* cell cultures of insect (CCL-126) and mammalian (CHO-K1) cell lines as well as in human lymphocyte cultures using several end-points for estimating both genotoxicity and cytotoxicity. The results showed that none of the tested compounds induced a significant increase in the frequency of sister chromatid exchanges (SCEs) on both cells lines and human lymphocytes. Similarly, neither proved to be inducers of micronuclei in CHO-K1 cells and did not change the nuclear division index. However, when the comet assay was employed, both ivermectin and Ivomec[®] were able to induce DNA single-strand breaks in CHO-K1 and CCL-126 cells. Furthermore, these cells were efficient in repairing the DNA damage inflicted by these compounds previously revealed by the comet assay methodology. Moreover, both compounds induced marked alterations in the cell-cycle kinetics and in the mitotic index of both established cell lines and human lymphocytes cultured *in vitro*. Finally, a marked cytotoxicity was highlighted by specific colorimetric assays such as MTT and Neutral Red, showing cytotoxicity depending upon the cell type and the different culture systems we employed. Overall, the results evidence that ivermectin present a similar pattern of cytotoxic and genotoxic damage than that induced by Ivomec[®]. Our results allow us to infer that the deleterious effects exerted by Ivomec[®] would be caused by the active ingredient present in its formulation, being able to rule out the presence of some other inductor(s) agent(s) of cell damage within its

formulation. Furthermore, our results demonstrate that ivermectin has the ability to induce damage in the DNA molecule, at least in CHO-K1 and CCL-126 cells, but also highlight a highly cytotoxic capacity as the major deleterious effect of this antibiotic. Thus, its widespread use would seriously jeopardize the organisms that are usually treated with ivermectin including human beings. For these reasons, it becomes evident the need of its evaluation in the near future regarding the human and environmental risk of ivermectin by international organizations, e.g., the Agency for Environmental Protection in the United States of America (EPA), institution responsible for providing guidelines on the regulation on its use in order to minimize the risk for all target and not target organisms directly or indirectly exposed to this type of therapeutic agent.

LISTADO ORIGINAL DE PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

La presente Tesis Doctoral dio lugar a los siguientes trabajos publicados, los cuales son referidos a lo largo de texto empleando sus correspondientes números romanos y se encuentran contenidas en el Anexo I- Los resultados experimentales no publicados hasta el presente fueron incluidos en Figuras y Tablas del Anexo II.

- I. Norma González*, Gabriela Molinari*, Sonia Soloneski y Marcelo L. Larramendy. Genotoxicidad y citotoxicidad de pesticidas. Evaluación de los principios activos y formulaciones comerciales usadas en Argentina. Review.

*, Igual contribución

Theoria, 17 (2): 27-45. 2008.

- II. Gabriela Molinari, Sonia Soloneski, Miguel A. Reigosa and Marcelo L. Larramendy. *In vitro* genotoxic and cytotoxic effects of ivermectin- and the ivermectin-containing formulation ivomec® on Chinese Hamster Ovary (CHOK1) cells.

Journal of Hazardous Materials, 165 (1-3):1074-1082. 2009.

- III. Gabriela Molinari, Sonia Soloneski and Marcelo L. Larramendy. New ventures in the genotoxic and cytotoxic effects of macrocyclic lactones. Abamectin and Ivermectin. Review.

Cytogenetics and Genome Research, 128 (1-3): 37-45. 2010.

- IV. Gabriela Molinari, Sonia Soloneski, Miguel A. Reigosa and Marcelo L. Larramendy. Genotoxic and cytotoxic *in vitro* evaluation of ivermectin and its formulation ivomec[®] on *Aedes albopictus* larvae (CCL-126) cells.

Toxicological and Environmental Chemistry, 92 (8): 1577-1593. 2010.

ABREVIATURAS

A lo largo del texto del presente trabajo de Tesis Doctoral, aquellas abreviaturas correspondientes a Instituciones internacionales han sido adoptadas en su idioma original y no por su traducción al español

ADN: ácido desoxirribonucleico

APFB: agarosa de punto de fusión bajo

APFN: agarosa de punto de fusión normal

BLM: bleomicina

BrdU: 5-bromo-2'-deoxiuridina

CO₂: dióxido de carbono

CHO-K1: Chinese hamster ovary (células de ovario de hámster chino)

CL₅₀: concentración letal al 50%

DAPI: 4'-diamidino-2-fenilindol

DDT: dicloro-difenil-tricloroetano

DL₅₀: dosis letal al 50%

DMSO: dimetilsulfóxido

EC: ensayo cometa

ECHA: European Chemicals Agency (Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos)

EEUU: Estados Unidos de América

EPA: Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental)

ERO: especies reactivas de oxígeno

ES: error estándar

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)

GABA: ácido gamma amino butírico

IARC: International Agency on Cancer Research (Agencia Internacional de

Investigación contra el Cáncer)

ICHs: intercambios de cromátidas hermanas

IDN: índice de división nuclear

IM: índice mitótico

IPC: índice de replicación celular

MPTL-1: receptor presente en helmintos sobre el que actúa el monepantel

MSD: Merck Sharp & Dohme Laboratories

MN: micronúcleos

MTT: [3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]

PCC: progresión del ciclo celular

Pgp: glicoproteína P

RN: rojo neutro

rpm: revoluciones por minuto

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (Argentina)

WHO: World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)

χ^2 : chi cuadrado

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades y relevancia de los antiparasitarios

En las últimas cuatro décadas la explotación agropecuaria experimentó una revolución tecnológica en la que los plaguicidas (agroquímicos y medicamentos veterinarios, entre otros) han tenido un papel preponderante. A principios de los años '70 y hacia mediados de la década del '90, los avances en la producción ganadera han permitido cierta reestructuración de la agricultura como respuesta a una fuerte demanda de alimentos de origen animal por parte de los países tanto emergentes como desarrollados. La alimentación, el manejo del ganado, los tratamientos veterinarios, las instalaciones, e incluso la genética animal fueron algunos de los factores a modificar a fin de lograr mejoras en la producción animal y en su adaptabilidad al medio. Los especialistas han llamado a esta tendencia "Revolución Ganadera". La causa de la misma ha sido el aumento de la clase media urbana que cada vez suplementa más su dieta con productos cárnicos reemplazando, en buena medida, al consumo de cereales (http://www.inforesources.ch/pdf/focus07_1_e.pdf).

Con el advenimiento de la Revolución Ganadera, surgieron una serie de inconvenientes y enfermedades asociadas a la creciente producción animal y a la concentración de los mismos en un espacio limitado. La principal problemática se debe a la utilización masiva de las llamadas razas mejoradas y a la tendencia hacia la obtención de razas únicas, práctica que según la FAO, conlleva a que al menos el

30% de las razas de animales domésticos se encuentren en grave riesgo de extinción (<http://www.fao.org/WAIRDOCS/LEAD/X6115E/x6115e03.htm>).

Las formas industriales e intensivas de producción animal pueden resultar asimismo, un medio propicio para nuevas enfermedades emergentes con consecuencias desconocidas. Es así que, la transmisión de enfermedades portadas por animales adquirió una importancia sustancial en la salud pública (Atkins, P., 2008). La influenza aviar, el síndrome respiratorio agudo severo, la encefalopatía espongiiforme bovina y la infección con el virus Nippah, son un claro ejemplo del número creciente de enfermedades que el hombre es capaz de contraer a partir de contacto con los animales. Estas enfermedades pueden ocasionar grandes pérdidas económicas sumadas a una gran mortalidad y morbilidad, más aún si existe un contacto cercano y continuo entre animales y humanos, observable especialmente en zonas rurales altamente vulnerables a brotes de infecciones zoonóticas (Bhatia, R. y Narain, J.P., 2010). Mientras que las infecciones con protozoarios son importantes en algunos sectores de la industria ganadera, la mayor parte de las pérdidas económicas se deben a gusanos parásitos, especialmente nematodos, y a artrópodos, responsables de un gran número de enfermedades cuyo control a nivel mundial, demanda miles de millones de dólares anuales (Campbell, W.C. *y col.*, 1983; Pereira, J.R., 2009). Las parasitosis son uno de los mayores problemas sanitarios que no sólo conciernen a la medicina veterinaria sino que también son motivo de gran preocupación en la salud humana por sus efectos negativos a nivel nutricional, inmunológico y por su elevada incidencia poblacional. A modo de ejemplo, datos de la WHO estiman que aproximadamente cerca de 2 billones de personas se

encuentran afectadas por infecciones parasitarias causadas exclusivamente por helmintos (<http://www.who.int/wormcontrol/statistics/>).

El desarrollo de fármacos con capacidad antihelmíntica es, desafortunadamente, uno de los mecanismos más limitados de la industria farmacéutica. En líneas generales, la razón principal de esta falencia se debe a una limitante económica que padecen las naciones que más sufren de estas enfermedades. Este aspecto se ve magnificado por una nueva preocupación, el desarrollo de la denominada “resistencia antihelmíntica”, que en los últimos tiempos se viene reportando a nivel mundial, particularmente en animales de producción (Anziani, O.S. *y col.*, 2004; Anziani, O.S. y Guglielmono, A.A., 2005). Más aún, este fenómeno, en solo cuestión de tiempo, se verá reflejado en las parasitosis que afectan específicamente a los seres humanos.

Si bien la primera condición que se le exige a un fármaco para ser introducido en el mercado es su eficacia terapéutica, en los últimos años se han incrementado las investigaciones para conocer no sólo su eficacia sino también su metabolismo, bioquímica, toxicología y persistencia a fin de asegurar la inocuidad del mismo. Numerosas sustancias pueden dejar residuos y prácticamente no existen animales que no hubieran recibido algún tipo de tratamiento quimioterápico en alguna de las etapas de su crianza. En particular, el caso de los antiparasitarios adquiere importancia por su uso masivo en animales productores de carne y leche (Pérez, L. *y col.*, 2006). Los plaguicidas, y muchas de las drogas utilizadas en medicina humana y veterinaria, pueden presentar efectos secundarios en organismos a quienes no están destinados. El aumento en el uso y en el desarrollo de estos productos por parte del mercado ha generado un incremento significativo en los accidentes y

patologías asociados a ellos (Tiemann, U., 2008). Asimismo, no debe restarse importancia a las formulaciones comerciales de estos productos, dado que las mismas corresponden a mezclas de uno o más principios activos altamente riesgosos desde el punto de vista de la salud, y de excipientes teóricamente inertes desde el punto de vista biológico. Sin embargo, numerosos estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado que, en la mayoría de los casos, los riesgos potenciales a los que los seres vivos se ven sometidos por exposición a formulaciones comerciales resulta ser más perjudicial que el daño ocasionado por el principio activo (IARC, 1987; 1991; Mangan, R.L. y Moreno, D.S., 2001; Mann, R.M. y Bidwell, J.R., 2001; Soloneski, S. *y col.*, 2001; Soloneski, S. *y col.*, 2002; Soloneski, S. *y col.*, 2002; Mann, R.M. *y col.*, 2003; Soloneski, S. *y col.*, 2003; Zeljezic, D. *y col.*, 2006; González, N.V. *y col.*, 2007; Soloneski, S. *y col.*, 2007; Soloneski, S. *y col.*, 2008). A lo largo del siglo XX la industria farmacéutica ha lanzado al mercado diferentes alternativas de compuestos antiparasitarios con actividad ectoparasiticida, es decir, eficaces contra los parásitos externos. Muchos de ellos presentan un amplio espectro de acción siendo efectivos contra diferentes especies de parásitos al mismo tiempo (ej. moscas, piojos, ácaros, garrapatas, entre otros.), utilizándose tanto en animales de producción como en animales domésticos, o incluso, como plaguicidas en la agricultura. Asimismo, otros antiparasitarios presentan un espectro de acción limitado a una especie en particular e incluso existen algunos compuestos cuya acción es efectiva tanto contra ectoparásitos como contra endoparásitos; esta acción ambivalente le confiere a estos compuestos la denominación de endectocidas (http://parasitosdelganado.net/index.php?option=com_content&view=article&id=125&Itemid=199).

Es importante remarcar que la mayoría de los compuestos antiparasitarios, y en mayor grado los ectoparasiticidas ampliamente utilizados en la salud animal, se utilizan o han sido utilizados en la agricultura y en la sanidad ambiental para combatir diferentes tipos de plagas domésticas y/o urbanas. Es más, en su gran mayoría, estos compuestos se descubrieron y aplicaron primero en la agricultura y después en la ganadería y en la salud humana (http://parasitosdelganado.net/index.php?option=com_content&view=article&id=125&Itemid=199).

Si bien el conocimiento acerca de la fisiología del parásito permite el desarrollo y el empleo de los diversos agentes antiparasitarios, la mayoría de estos fármacos es obtenida a partir de moléculas genéricas tales como: metronidazol, albendazol, cipermetrina, moxidectina, entre otros (Aparicio, P. y *col.*, 2003). Ciertos procesos metabólicos del parásito son útiles como dianas de acción del agente antiparasitario a saber: en la síntesis de cofactores, de ácidos nucleicos, de proteínas, y de membranas, en la función microtubular, en el metabolismo energético así como en la función neuromuscular para el caso de los helmintos y artrópodos. El mecanismo de acción por el cual un antiparasitario ejerce su efecto es variado. Según el organismo contra el cual el compuesto tiene injerencia, los agentes antiparasitarios se clasifican en antiprotozoarios y antihelmínticos. El mecanismo de acción más común de los antiprotozoarios es la inhibición del metabolismo biosintético, como el caso de los antipalúdicos, mientras que los acaricidas y antihelmínticos afectan el metabolismo energético vía el metabolismo de los hidratos de carbono, alterando la asimilación de glucosa y la síntesis de proteínas. En particular, el segundo modo de acción, como antihelmíntico, es ejercido provocando parálisis en el parásito y

reduciendo la capacidad para mantenerlo adherido al hospedador siendo eliminado por los movimientos corporales propios de éste último (Aparicio, P. y col., 2003).

1.2. Familias de antiparasitarios antihelmínticos

En el mercado actual existe una gran disponibilidad de marcas registradas de antiparasitarios, pero en realidad las drogas existentes no son tantas y menos aún, lo son las familias de donde éstas provienen. Según lo manifiesta el Dr. Errecalde en *“El futuro de los endectocidas: perspectivas tecnológicas”* las drogas con potencial antiparasitario tienen su origen en una de cinco fuentes, a saber: vegetales, animales, sintéticas, fermentativas y finalmente, drogas obtenidas por modificación directa de otras precedentes (Errecalde, J.O., 2006). El primer antiparasitario antihelmíntico moderno para bovinos, ovinos y equinos, la fenotiazina, fue descubierto en 1938 por el “United States Bureau of Animal Industry” (http://parasitosdelganado.net/index.php?option=com_content&view=article&id=125&Itemid=199). En los años sucesivos los investigadores fueron descubriendo nuevas sustancias activas con propiedades antihelmínticas mejoradas para el ganado: mayor eficacia, espectro de actividad más amplio, menor toxicidad, menores residuos, etc. (http://parasitosdelganado.net/index.php?option=com_content&view=article&id=125&Itemid=199).

Los antihelmínticos se clasifican según el tipo de helmintos contra el que son principalmente activos y según la clase química a la que pertenecen. La mayoría de los antihelmínticos son eficaces generalmente contra las tres clases de helmintos

parásitos del ganado: los nematodos, los trematodos y los cestodos. Se suele hablar, por lo tanto de nematicidas, fasciolicidas o trematodicidas y cestodicidas.

Teniendo en cuenta los principios activos se pueden mencionar:

PIPERAZINA. La eficacia antihelmíntica de la piperazina fue descubierta en los años '50. Desde entonces se utiliza en el ganado y en otros animales domésticos principalmente en forma de sales, y sigue siendo el componente activo de varios medicamentos recetados para las parasitosis en niños. Las sales de piperazina son muy eficaces contra nematodos pertenecientes a la familia de los ascáridos (*Ascaris suum*, *Toxocara* spp., etc.) y de los estrombóidos (*Oesophagostomum* spp.), pero no contra otros nematodos. Asimismo, no son eficaces contra endoparásitos trematodos y cestodos. En general, los estadios parasíticos inmaduros, especialmente los que se encuentran en los tejidos o en proceso de muda, son menos susceptibles a la piperazina que las formas adultas. La piperazina y sus sales se emplean actualmente con menor frecuencia sobre el ganado, dado su escasa eficacia contra los estrombóidos. Actúa como un débil GABA-mimético provocando una parálisis flácida y reversible de los músculos de la pared corporal. Como consecuencia, los parásitos no pueden mantener su posición dentro del intestino y los mismos movimientos peristálticos del hospedador acaban expulsándolos. (http://parasitosdelganado.net/index.php?option=com_content&view=article&id=125&Itemid=199; Holden-Dye, L. y Walker, R.J., 2007).

BENZIMIDAZOLES. El primero de esta clase, el tiabendazol, fue descubierto en 1961 y posteriormente una serie de benzimidazoles se introdujeron como nuevos antihelmínticos de amplio espectro tales como el albendazol, el fenbendazol y el oxfendazol. Todos ellos actúan impidiendo el funcionamiento normal de los

microtúbulos al interactuar con las β -tubulinas. El deterioro en la locomoción, la reproducción y un efecto perjudicial en los ovocitos, son alteraciones consistentes con la interrupción de procesos que requieren la integración de los microtúbulos (http://parasitosdelganado.net/index.php?option=com_content&view=article&id=125&Itemid=199, ; Holden-Dye, L. y Walker, R.J., 2007).

IMIDAZOTIAZOLES. Son antiparasitarios internos y exclusivamente nematicidas. El representante más importante de los imidazotiazoles es el levamisol. Se trata del isómero L del dl-tetramisol, el cual se introdujo a mediados de los años '60. Ambos compuestos, el levamisol y el tetramisol se emplean en el ganado, siendo el levamisol el más eficaz y cuyo uso está mucho más difundido. Ambos son eficaces contra larvas y adultos de la mayoría de los nematodos gastrointestinales y respiratorios. No son eficaces contra helmintos trematodos o cestodos. El levamisol actúa como un estimulante de los ganglios nerviosos y provoca contracciones musculares persistentes. De esta forma, los gusanos afectados quedan paralizados y mueren o son expulsados del organismo hospedador (http://parasitosdelganado.net/index.php?option=com_content&view=article&id=125&Itemid=199, ; Holden-Dye, L. y Walker, R.J., 2007).

TETRAHIDROPIRIMIDINAS. A este grupo pertenece el tartrato de pirantel y el morantel, antiparasitarios nematicidas empleados habitualmente en forma de sales. Son eficaces contra una serie de nematodos gastrointestinales pero no contra nematodos respiratorios ni otros helmintos trematodos o cestodos. Las tetrahidropirimidinas son agentes agonistas de los receptores nicotínicos de la acetilcolina, promoviendo parálisis muscular espástica en los músculos de la pared del cuerpo debido a la activación prolongada de los receptores nicotínicos

excitatorios. Consecuentemente, el helminto muere o es expulsado por el hospedador ya que es incapaz de fijarse a la pared gastrointestinal (http://parasitosdelganado.net/index.php?option=com_content&view=article&id=125&Itemid=199) (Holden-Dye, L. y Walker, R.J., 2007).

MONEPANTEL. Último antiparasitario antihelmíntico veterinario introducido en el mercado, eficaz contra gusanos gastrointestinales resistentes a los benzimidazoles y al levamisol. El monepantel interfiere con el receptor MPTL-1 del sistema nervioso de los helmintos, necesarios para coordinar sus movimientos. Se trata de un mecanismo de acción descubierto recientemente, diferente al de los demás antihelmínticos, lo que explica que este compuesto no presenta resistencia cruzada con ellos. El receptor MPTL-1 sobre el que actúa el monepantel es específico de los nematodos y está ausente en mamíferos, lo que explica su favorable perfil toxicológico. Los gusanos afectados sufren una hipercontracción de la musculatura de la pared corporal seguida de parálisis y muerte (http://parasitosdelganado.net/index.php?option=com_content&view=article&id=125&Itemid=199)

AVERMECTINAS. Desde su descubrimiento hace más de 20 años, las avermectinas han demostrado ser el medicamento terapéutico de mayor éxito en medicina veterinaria, así como la base de uno de los programas de salud pública humana de mayor repercusión del siglo pasado. La droga fue el resultado de una colaboración internacional única entre el sector público y el privado (Omura, S. y Crump, A., 2004; Omura, S., 2008). Las avermectinas son un grupo complejo de 16 miembros de compuestos relacionados químicamente, las lactonas macrocíclicas, las

cuales exhiben una actividad antihelmíntica extraordinariamente potente (Burg, R.W. *y col.*, 1979; Ikeda, H. *y col.*, 1987). Presentan un disacárido sobre el C-13 del macrociclo y fueron aisladas como productos de la fermentación natural del actinomiceto *Streptomyces avermitilis* MA4680^T (NRRL 8165) (Miller, T.W. *y col.*, 1979; Ikeda, H. *y col.*, 1987; Omura, S. y Crump, A., 2004; Yoon, Y.j. *y col.*, 2004). Poseen un amplio espectro de actividad endectocida (Omura, S. y Crump, A., 2004). Su eficacia antihelmíntica es exclusivamente nematicida, sobre todo contra nematodos gastrointestinales (*Haemonchus* sp., *Ostertagia* sp., *Trichostrongylus* sp., etc.) y pulmonares (*Dictyocaulus* sp., etc.), con relativamente baja toxicidad para los animales y el hombre (Wei, L. *y col.*, 2005) (http://parasitosdelganado.net/index.php?option=com_content&view=article&id=125&Itemid=199). Las ivermectinas y sus análogos, son los agentes antiparasitarios mayormente comercializados en el campo de la salud animal, la agricultura y en relación con las enfermedades infecciosas que atacan al hombre (Yoon, Y.j. *y col.*, 2004; Zhang, X. *y col.*, 2006). Estas lactonas macrocíclicas tienen su origen en el año 1973, cuando investigadores del Instituto Kitasato de Japón y Laboratorios MSD de los EEUU establecieron una sociedad y realizaron estudios *in vitro* a partir de muestras de suelo colectadas en las cercanías del golfo que bordea al océano cerca de la ciudad de Ito, región de la Prefectura de Shizuoka en Japón (Omura, S. y Crump, A., 2004; Yoon, Y.j. *y col.*, 2004). Emplearon para ello ratones infectados con el nematodo *Nematospiroides dubius*, donde pudieron determinar que la muestra ensayada presentaba una potente actividad contra dicho helminto y sin evidenciar un notable efecto tóxico para el hospedador (Burg, R.W. *y col.*, 1979). La cepa que presentaba dicha actividad antihelmíntica, MA-4680, fue aislada, perfeccionada y

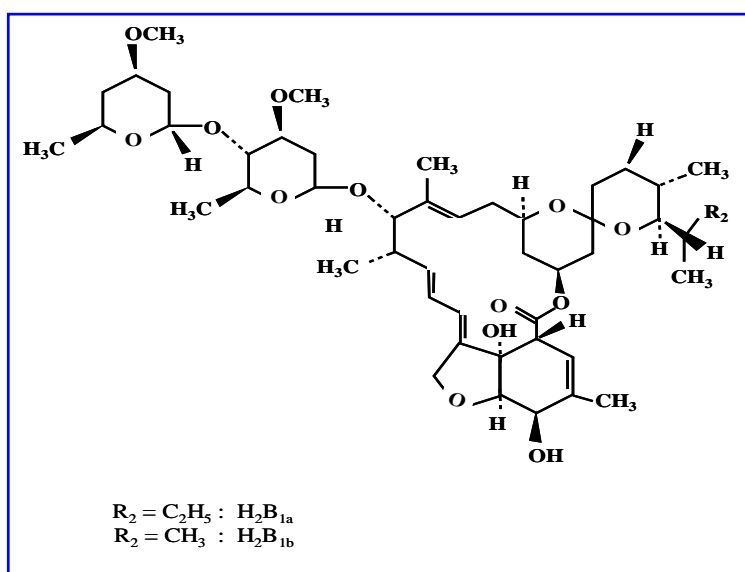
renombrada sobre caracteres morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y filogenéticos como una nueva especie de actinomiceto *S. avermectinius* (Takahashi, Y. *y col.*, 2002; Omura, S. y Crump, A., 2004; Kita, K. *y col.*, 2007). El compuesto activo con propiedades antihelmínticas, fue aislado en 1975 y denominado “ivermectina” (Omura, S., 2008) la cual es efectiva contra una amplia variedad de nematodos, insectos y arácnidos parásitos; no presentado actividad contra platelmintos, protozoos, bacterias ni hongos (Omura, S., 2008; Pitterna, T. *y col.*, 2009). Cabe destacar además, que presentan relativamente baja toxicidad para el organismo hospedador, sea éste animal o humano (Wei, L. *y col.*, 2005; Omura, S., 2008).

El producto de fermentación obtenido a partir del actinomiceto produce una mezcla de ocho ivermectinas diferentes, A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a y B2b (Zhang, X. *y col.*, 2006). El complejo contiene cuatro componentes mayores ampliamente relacionados A1a, A2a, B1a y B2a en proporciones variables y cuatro componentes menores A1b, A2b, B1b y B2b cada uno de los cuales corresponde a un homólogo menor del correspondiente componente mayor (Miller, T.W. *y col.*, 1979). Los compuestos de la serie B, conteniendo un grupo 5-hidroxy, son marcadamente más activos que los de la serie A los cuales poseen en su estructura química un grupo 5-metoxi. Entre estos compuestos, la fracción B1 (una mezcla que comprende más del 80% de B1a y menos del 20% de B1b) presenta la actividad antiparasitaria más eficaz, llegando a ser la forma comercialmente más adecuada de las ivermectinas (Zhang, X. *y col.*, 2006). Recientemente fue analizada por completo la ruta biosintética de las ivermectinas (Ikeda, H. *y col.*, 2003; Zhang, X. *y col.*, 2006; Omura, S., 2008) y el grupo de genes para la síntesis de las mismas fue clonado y

caracterizado en detalle (Ikeda, H. *y col.*, 2003). En el año 1999, el Instituto Kitasato reportó diecisiete genes responsables de la biosíntesis de las avermectinas que han sido identificados en *S. avermectinius* y sus funciones analizadas por clonación. Cuatro genes, *aveA1-aveA4*, están comprometidos en la biosíntesis del esqueleto básico de la lactona aglicón a través de una vía que consta de 12 ciclos y 53 pasos. Los doce genes restantes actúan sobre la vía de regulación específica del anillo de la lactona, la biosíntesis de la oleandrosa y su glicosilación (Ikeda, H. *y col.*, 1987; Ikeda, H. *y col.*, 2003; Omura, S., 2008). La secuencia completa del cromosoma lineal del genoma de *S. avermectinius* (9.025.608 bases) fue secuenciado en el Instituto Kitasato en el año 2003, sugiriéndose que la información obtenida a partir de dicho proceso promueve un gran impulso al descubrimiento de metabolitos secundarios a partir de microorganismos industriales (Omura, S., 2008). El grupo de trabajo interdisciplinario entre investigadores del Instituto Kitasato y MSD refinó posteriormente las formas activas de las avermectinas. La reducción sobre el doble enlace de los C22-23 de los componentes B1a y B1b brindó a ambos un amplio espectro de actividad y seguridad resultando en una toxicidad muy baja para los mamíferos. El complejo B1 resultante 22,23 dihidro (una mezcla del 80% B1a y 20% B1b) fue comercializado como una droga veterinaria bajo el nombre genérico de ivermectina (Chabala, J.C. *y col.*, 1980; Omura, S. y Crump, A., 2004; Zhang, X. *y col.*, 2006).

1.3. Ivermectina y formulaciones comerciales afines

La ivermectina es el agente endectocida sistémico más exitoso y ha sido introducido en el mercado para su uso en la industria pecuaria en la década del '80 (Chabala, J.C. *y col.*, 1980; Campbell, W.C. *y col.*, 1983; Holden-Dye, L. y Walker, R.J., 2007; Kita, K. *y col.*, 2007). Presenta una fórmula empírica correspondiente a un 80% del componente B1a [$C_{48}H_{74}O_{14}$ (H2B1a)] y a un 20 % del componente B1b [$C_{47}H_{72}O_{14}$ (H2B1b)] y una fórmula molecular (5-O-dimetil-22,23-dihidroavermectina B1a) (5-O-demetil-25-de(1-metil-propil)-22,23-dihidro-25-(1-metil-etil) avermectina B1b) según a la siguiente estructura:



La ivermectina se presenta bajo diversas formas de administración y está acompañada de sustancias inertes que favorecen su vehiculización y promueven su

mecanismo de acción. Dentro de las formas de administración disponibles podemos mencionar: solución inyectable subcutánea, solución tópica de aplicación pour-on, solución oral, pasta oral, tabletas, comprimidos y bolo rumial (<http://www.rr-americas.oie.int/es/proyectos/Camevet/fichas/farmacos/IVERMECTINA.htm>).

En el mercado mundial el antiparasitario se encuentra disponible bajo una gran diversidad de marcas comerciales, formas de presentación y diferentes concentraciones de ivermectina (Tabla 1). (http://parasitosdelganado.net/index.php?option=com_content&view=article&id=125&Itemid=199).

En nuestro país, la mayoría de los productos comerciales que son fabricados y eventualmente lanzados al mercado con el principio activo ivermectina presentan una finalidad netamente pecuaria. Sin embargo, a pesar de su exitosa actividad endectocida, pocos laboratorios han producido formulaciones aptas para su empleo en humanos siendo la mayoría de uso pecuario (Tabla 2) (http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=6435110&loc=ec_rcs).

Asimismo, la ivermectina se presenta en el mercado combinada con otros compuestos, tales como clorsulon y closantel, bajo una gran diversidad de nombres comerciales y formas de administración (<http://www.rr-americas.oie.int/es/proyectos/Camevet/fichas/farmacos/IVERMECTINA.htm>).

En la Tabla 3 se detallan algunos ejemplos de dichos formulados.

Como se puede apreciar, el gran número de formulaciones comerciales

<i>Nombre Comercial</i>	<i>% Ivermectina</i>	<i>Presentación</i>	<i>Laboratorio</i>
Noromectin®	1,87%	Pasta Oral caballos	Norbrook NZ Ltd / VetUK Ltd (EEUU)
Biomectin®	1,87%	Pasta	Bimeda, Inc. (Canadá)
Eqwell™	1,87%	Pasta	Bimeda, Inc. (Canadá)
Equimax™	1,87%	Pasta	Bimeda MTC Animal Health, Inc. (Canadá)
Equimectrin®	1,87%	Pasta	Merial Limitado (US)
Eqvalan®	1,87%	Pasta	Merial Limitado (US)
Ivermax Titanio	3,15%	Solución	Vete Agro Import, S.A. (Panamá)
Endo-mectin®	1%	Solución estéril	Aspen Veterinaria (USA)
Ivermax®	1%	Solución estéril	RXV (Wisconsin, EEUU)
Noromectin®	1%	Solución Inyectable	Laboratorios Limitados Norbrook (EEUU)
Pigmectin®	1%	Solución Inyectable	Laboratorios Zotal (España)
Vetnimec™	1%	Solución Inyectable	MWI/VetOne (EEUU)
Mectizan®	1%	Administración Oral	MSD (EEUU)
Eqvalan®	1%	Administración Oral	Merial Limitado (US)
Ivermectina Calox _{1,4,5,6,7}	6mg	Tabletas	Calox Internacional (Venezuela)
Stromectol®	3mg	Tabletas	Merck & Co., Inc (EEUU))
Vetnimec™	5mg/ml	Pour-on	MWI/VetOne (EEUU)
Ivermax®	5mg/ml	Pour-on	RXV (EEUU)
Noromectin®	5mg/ml	Pour-on	Laboratorios Limitados Norbrook (EEUU)
Biomectin®	1%	Pour-on	Bimeda, Inc. (Canadá)

Tabla 1. Formulaciones comerciales utilizadas a nivel mundial conteniendo diferentes concentraciones de ivermectina

disponibles con ivermectina, como principio activo, supuso un avance enorme y una revolución en el control de ectoparásitos y endoparásitos de importancia médica tanto veterinaria como humana. Asimismo, recientemente la EPA ha incluido a la ivermectina dentro del grupo de drogas con nuevas aplicaciones para el tratamiento de parasitosis en animales, como por ejemplo el uso de comprimidos masticables en caballos (<http://www.epa.gov/EPA-IMPACT/i22182.htm>, 2004).

Durante muchos años la ivermectina fue y sigue siendo la droga antiparasitaria más vendida en el mundo. Puede decirse que esta sustancia activa supuso un avance enorme y una revolución destinados al control de los parásitos tanto en la sanidad animal como para su uso en la salud humana (http://parasitosdelganado.net/index.php?option=com_content&view=article&id=125&Itemid=199). La ivermectina demostró ser altamente eficaz contra varios artópodos parásitos causantes de enfermedades como pediculosis, escabiosis - incluyendo la forma eritrodérmica-, miasis, larva migrans cutánea, dermodicidosis, tungiasis, toxocariasis, gnatostomiasis y cisticercosis (Victoria, J., 2003; Osorio, J. y col., 2006; Omura, S., 2008). Sus indicaciones en endoparásitos incluyen: ascaridiasis, estrongiloidiasis, tricuriasis y enterobiasis de importancia económica que afectan el tracto gastrointestinal, pulmón y riñón del ganado, en adición a otros nematodos como son los géneros *Thelazia* y *Parafilaria* (Campbell, W.C. y col., 1983; Kita, K. y col., 2007). Su amplio espectro de actividad, potencia y persistencia en sus efectos, promovió el entusiasmo de otras empresas para desarrollar análogos de la ivermectina tales como moxidectina, doramectina, selamectina, abamectina y eprinomectina (Holden-Dye, L. y Walker, R.J., 2007; Ardelli, B.F. y col., 2009).

<i>Nombre Comercial</i>	<i>% Ivermectina</i>	<i>Presentación</i>	<i>Laboratorio</i>
Bagomectina®	1%	Solución Inyectable	Biogénesis-Bagó S.A.
Bagomectina® AD3E Forte	1%	Solución Inyectable	Biogénesis-Bagó S.A.
Bagomectina® LA AD3E	3,15%	Solución Inyectable	Biogénesis-Bagó S.A.
Bovifort®	1%	Solución Inyectable	Biogénesis-Bagó S.A.
Ivomec®	1%	Solución Inyectable	Merial, S.A.
Ivomec Gold®	3,15%	Solución Inyectable	Merial, S.A.
Ivomec®	5mg/ml	Pour-on	Merial, S.A.
Ivermectina Equina	1%	Solución Oral	Laboratorios Burnet S.A.
Securo®	6mg	Tabletas	ICN, Argentina

Tabla 2. Formulaciones comerciales de ivermectina, disponibles en el mercado de Argentina

<i>Nombre Comercial</i>	<i>% Ivermectina-combinada</i>	<i>Presentación</i>	<i>Laboratorio</i>
Bovimec®	1% IVM -10% Clorsulón	Solución Inyectable	Agrovet Market S.A. (Canadá)
Ivermic f®	1% IVM -12,5% Closantel	Solución Inyectable	Laboratorios Microsules Uruguay S.A.
Closamectin®	0,5% IVM - 12,5% Closantel	Solución Inyectable	Laboratorios Karizoo (España)
Cloxantel® Plus	0,8% IVM - 10% Closantel	Solución Inyectable	Agrovet Market S.A. (Canadá)
Ivermax® Plus	1% IVM -10% Clorsulón	Solución Inyectable	RXV (EEUU)

Tabla 3. Formulaciones comerciales que presentan ivermectina y un segundo compuesto como principio activo

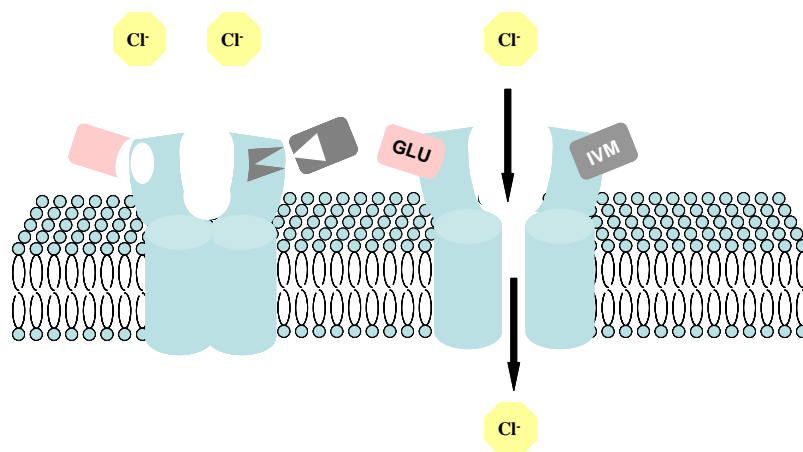
Paralelamente a la aplicación de la ivermectina como endectocida en animales, en el año 1987 los Laboratorios MSD lanzaron al mercado la primera formulación comercial destinada a la salud humana para el tratamiento de la oncocercosis (Sturchio, J.L., 2001). Según los registros médicos se estiman que 123 millones de personas están expuestas a diversos tipos de parasitosis y que otros 18 millones de personas se encuentran en riesgo de enfermar o morir por esta causa (Faso, B., 1999). La alta incidencia de casos reportados como consecuencia de dichas enfermedades en Latinoamérica y países del continente africano, llevó al desarrollo de programas de control y erradicación de enfermedades parasitarias. Los mismos consistieron en una asociación única entre los gobiernos, la industria y las organizaciones no gubernamentales (Programa Especial de Investigación y Formación en Enfermedades Tropicales de las Naciones Unidas, Organización Panamericana de la Salud, Instituto Kitasato, Banco Mundial y WHO -en calidad de agente ejecutivo-), quienes desarrollaron en 1992 el “Programa de Eliminación de la Oncocercosis en las Américas”, y en 1995 el “Programa para el Control de la Oncocercosis Africana”, ambos basados en la distribución masiva y el tratamiento con ivermectina como droga antiparasitaria por excelencia (González Canga, A. y *col.*, 2008). A dichos programas se incorpora el primer y mas grande programa de donación de medicamentos del mundo “Programa de Donación de Mectizan”, creado por MSD y con sede en el Centro Carter en Atlanta, EEUU (Omura, S. y Crump, A., 2004). Esto conlleva a que en 1998 la WHO iniciara un “Programa Global para la Eliminación de la Filariasis Linfática”, basado en la administración regular de albendazol en combinación con ivermectina o dietilcarbamazina, confirmando no sólo la seguridad de la ivermectina, sino también la eficacia de ésta

en la terapia multidrogas (Omura, S. y Crump, A., 2004; González Canga, A. y col., 2008). Actualmente, la ivermectina está aprobada para su uso en humanos en varios países (Australia, Francia, Japón, Noruega, EEUU, entre otros), para el tratamiento de la oncocercosis, la filariasis linfática, la estrogiloidiasis y/o la escabiosis (González Canga, A. y col., 2008). En Argentina en particular, su uso ha sido aprobado por el SENASA mediante las resoluciones 979/97 y 896/99, quedando establecido el mismo de acuerdo a las indicaciones técnicas de cada producto enunciadas por las empresas productoras de los mismos.

La ivermectina no sólo demostró una actividad antiparasitaria de amplio espectro, sino que también se caracteriza por poseer un único modo de acción, no presentando resistencia cruzada con otras drogas existentes. El mecanismo de acción de la ivermectina y sus análogos ha sido investigado de manera detallada con el estudio de varios tipos de receptores de superficie celular como es el caso de los canales iónicos dependientes de ligando. Estudios en genética molecular sobre *Caenorabditis elegans* han demostrado que las lactonas macrocíclicas actúan como agonistas de una familia de receptores de canal de cloruro, específicos de invertebrados, que se activan por el ácido glutámico (GluClR) y que están filogenéticamente relacionados con los receptores de canal de cloruro unidos al GABA tipo A (GABAA Rs) de los vertebrados (Shan, Q. y col., 2001; Geoffrey, E., 2003). Los GluClR y GABAA Rs pertenecen a la superfamilia de canales iónicos dependientes de ligando, que presentan numerosas homologías estructurales y funcionales con otros miembros, tales como los receptores de glicina, acetilcolina y serotonina (Shan, Q. y col., 2001). Si bien la ivermectina se une a los GABAA Rs y a

los canales dependientes de glicina en mamíferos, la afinidad por los mismos en insectos es aproximadamente 100 veces mayor que la presente en mamíferos (Kita, K. *y col.*, 2007). La ivermectina activa irreversiblemente al GluClR en células nerviosas y musculares inhibiendo la neurotransmisión al impedir el cierre de los mismos (Shan, Q. *y col.*, 2001; Omura, S. y Crump, A., 2004). Consecuentemente, la membrana sináptica incrementa su permeabilidad a los iones Cl⁻, los cuales hiperpolarizan la membrana neuronal y disminuyen o impiden la transmisión nerviosa (Omura, S. y Crump, A., 2004) que conlleva a parálisis en la musculatura somática, particularmente la faríngea, conduciendo finalmente a la muerte del parásito (Esquema 1) (Geoffrey, E., 2003; Omura, S. y Crump, A., 2004; Pérez, L. *y col.*, 2006). Los canales de Cl⁻, relacionados con el GABA, los cuales sólo están presentes en nematodos, insectos y garrapatas, son inhibidos únicamente a elevadas concentraciones de ivermectina (Geoffrey, E., 2003; Omura, S. y Crump, A., 2004). Mc Cavera y colaboradores (McCavera, S. *y col.*, 2007) han propuesto que los canales de Cl⁻ dependientes de ligando, incluyendo los GluClR y los del GABA, serían los blancos de las lactonas macrocíclicas; pudiendo, más aún, generar resistencia a dichos antihelmínticos si existieran modificaciones en las secuencias y expresión de estos canales en modelos de laboratorio como *C. elegans* y *Drosophila melanogaster* (McCavera, S. *y col.*, 2007). En mamíferos, los receptores del GABA se encuentran localizados en las neuronas del sistema nervioso central, mientras que en los artrópodos y nemátodos ellos están localizados en el sistema nervioso periférico (Omura, S. y Crump, A., 2004). Aquí debe destacarse la importancia de la glicoproteína P (Pgp) en el mantenimiento de la barrera hematoencefálica (Geoffrey, 2003) y placentaria (Sun, Y.J. *y col.*, 2010) de mamíferos. La Pgp está asociada con el

eflujo del transporte de ivermectina y otras drogas a través de dichas barreras, y juega un rol crucial en atenuar la neurotoxicidad y el desarrollo de efectos tóxicos por la acción de estas drogas. La presencia de esta glicoproteína y la baja afinidad de la ivermectina por los receptores GABAA Rs de mamíferos, permite la ingesta de la droga en dosis relativamente bajas con un alto grado de seguridad (Geoffrey, E., 2003; Omura, S. y Crump, A., 2004; Kita, K. y col., 2007).



Esquema 1. Modo de acción de la ivermectina sobre los canales de Cl⁻ dependientes de glutamato en células de invertebrados. Modificado de: Omura, S. (2008). Journal of Antimicrobial Agents; 31: 91-98

Las propiedades físico-químicas de la ivermectina incluyen un alto peso molecular y una elevada lipofilidad, las que le confieren características farmacocinéticas particulares, como un alto volumen de distribución, una gran afinidad por la grasa corporal y una prolongada persistencia de sus concentraciones en el organismo (Pérez, L. y col., 2006).

Por otra parte, la ivermectina es escasamente metabolizada y la mayor parte de la dosis es excretada sin modificaciones (González Canga, A. y col., 2009). Los estudios metabólicos han sido desarrollados en ratas, ovejas, cabras, cerdos y ganado

vacuno. Los principales metabolitos aislados *in vivo* fueron el 24-OH-H2B1a y el 24-OH-H2B1b en ratas, ovejas y ganado vacuno. Sin embargo, los principales metabolitos aislados en cerdos fueron los derivados de la O-dimetilación (3"-O-desmetil-H2B1a y 3"-O-desmetil-H2B1b), el primero de los cuales también fue encontrado en cabras (González Canga, A. *y col.*, 2009). Los estudios relacionados al metabolismo de la ivermectina en seres humanos son escasos. Esta droga es ampliamente metabolizada por el complejo citocromo P-450 de los microsomas del hígado. La isoforma predominante y responsable de la biotransformación del compuesto en el hombre es el citocromo P-4503A4, generando al menos diez metabolitos, la mayoría de los cuales son derivados hidroxilados y dimetilados (González Canga, A. *y col.*, 2008). En relación con las vías de excreción, la ivermectina y sus metabolitos se excretan principalmente con las heces y sólo 1% con la orina (González Canga, A. *y col.*, 2008). Asimismo, tanto en humanos como en el ganado vacuno en período de lactancia una fracción significativa del antiparasitario se excreta por la leche (5% de la dosis) en donde tiene una vida media prolongada (Chicoine, A.L. *y col.*, 2007). Por este motivo, no son aconsejables las terapias con ivermectina durante dichos períodos, estando incluso prohibidas en animales cuyo producto sea destinado al consumo humano, recomendándose que su utilización en ganado gestante se realice al menos con una anticipación de 28 días previos al parto (Pérez, L. *y col.*, 2006). Estudios realizados en ganado productor de leche tratados con 0,2 mg/kg de ivermectina por vía subcutánea, demostraron que la misma es detectada en la leche a las 12 h post-administración con una concentración máxima de 28,5 ng/ml, permaneciendo durante un período de 17,8 días después del tratamiento. De igual modo, otros estudios determinaron que la concentración

plasmática en corderos lactantes, cuyas madres recibieron tratamiento con ivermectina, fue equivalente al 4% de la dosis de 0,2 mg/kg administrada por vía oral a las ovejas (Pérez, L. *y col.*, 2006).

Otros estudios han puesto de manifiesto que la ivermectina puede ocasionar disturbios impredecibles sobre la fauna coprófila, la degradación del estiércol y el reciclaje de los elementos del suelo, e influir negativamente en la biodiversidad y en la sustentabilidad de los ecosistemas agrícolas y acuáticos (Suárez, V.H., 2002; Suárez, V.H. *y col.*, 2006; Garric, J. *y col.*, 2007).

La información toxicológica de la ivermectina es sumamente escasa, no contándose con datos precisos sobre los riesgos potenciales que la misma puede causar en las terapias utilizadas. Existen varias organizaciones encargadas de evaluar y clasificar los productos químicos por su toxicidad aguda y el riesgo de carcinogenicidad que ellos presentan. Entre ellas, podemos mencionar a la EPA, la WHO, el Programa de Toxicología Nacional de los EEUU (NTP), la ECHA y la IARC (http://www.pesticideinfo.org/Docs/ref_toxicity2.html, 2007). Hasta el momento, ninguna de estas instituciones ha evaluado de forma exhaustiva los posibles efectos adversos de la ivermectina sobre especies animales, incluyendo al ser humano. Sin embargo, una de las principales compañías comercializadoras de la ivermectina, MSD, ha realizado diversos estudios toxicológicos en varias clases de organismos. Así, la toxicidad aguda fue evaluada en ratones y ratas adultas de ambos sexos y en ratas infantas mediante el suministro oral de ivermectina en dosis de 5 – 160 y 2,5 – 96 mg/kg de peso corporal, respectivamente (Merck & Co., I., 1978a; Merck & Co., I., 1979d). La droga resultó ser significativamente más tóxica en los ratones machos que en las hembras, aunque los efectos adversos que éstos

mostraron fueron similares en ambos sexos evidenciándose entre los 30 a 90 min luego del tratamiento. La DL_{50} osciló entre los 11,6 mg/kg de peso corporal en los machos y 40 mg/kg de peso corporal en las hembras. Para el caso de las ratas, la toxicidad no mostró ser dependiente del sexo, manifestándose síntomas de toxicidad luego de dos días de haber recibido el tratamiento. La DL_{50} establecida para las ratas machos y hembras fue de 42,8 y 52,8 mg/kg de peso corporal, respectivamente (Dadarkar, S.S. *y col.*, 2007). Algunos síntomas de toxicidad (ataxia, temblores, bradipnea, pérdida del conocimiento, entre otros), evidenciados en ratones y ratas adultas, no fueron observados en infantes. Sin embargo, la muerte de los infantes ocurrió al cabo de una noche de exposición. La DL_{50} para las ratas juveniles se estimó en 2,3 mg/kg de peso corporal (Merck & Co., I., 1978a; Merck & Co., I., 1979d). La toxicidad aguda, también fue evaluada en nonatos de ratas tratados con una única dosis de una solución de ivermectina al 0,8% administrada mediante intubación gástrica antes, durante y posterior al alumbramiento. La mayoría de las muertes ocurrieron posteriores al cuarto día, no siendo las mismas significativamente elevadas como para establecer la DL_{50} (Merck & Co., I., 1979c). Por otra parte, signos de toxicidad sistémica (bradipnea, temblores, anorexia) fueron observados en conejos luego de la administración percutánea de ivermectina en dosis de 165 – 660 mg/kg de peso corporal (Merck & Co. 1979d). La DL_{50} percutánea fue establecida en 406 mg/kg de peso corporal (Merck & Co., I., 1979d) no pudiéndose comprobar efectos tóxicos por inhalación de ivermectina salvo irritación de las mucosas (Merck & Co., I., 1979e). Cuando se utilizaron perros para los ensayos de toxicidad, los resultados fueron variables dependiendo del tipo de raza así como dentro de una misma raza. En perros de la raza Beagle tratados con

dosis de 5 – 20 mg/kg de ivermectina de peso corporal y superiores, los signos de toxicidad incluyeron emesis, midriasis, salivación y muerte precedente de un estado semejante al coma (Merck & Co., I., 1981a). Asimismo, se evaluó la toxicidad aguda percutánea en ejemplares de la misma raza que fueron tratados por un lado con dosis de 4,7 – 75 mg/kg de peso corporal de ivermectina inyectable y por el otro únicamente con el compuesto vehiculizante. Los resultados evidenciaron que los animales que recibieron dosis superiores a 9 mg/kg de peso corporal de ivermectina murieron, mientras que los que fueron tratados sólo con el vehiculizante no sufrieron alteraciones apreciables a lo largo del tratamiento luego de 15 días de observación. La DL₅₀ se estimó en 8,4 mg/kg de peso corporal en los machos y 10,5 mg/kg de peso corporal en las hembras (Merck & Co., I., 1981b). Perros de la raza Collie tratados con dosis de 0,05; 0,2 y 0,6 mg/kg de peso corporal, mostraron signos clínicos graves que culminaban en parálisis y posterior muerte del animal (Pulliam, J.D. *y col.*, 1985). Los estudios realizados en animales domésticos como cerdos, ovejas, vacas y caballos tratados con diferentes dosis de ivermectina suministrada de varias formas (oral, inyección intramuscular e inyección subcutánea) manifestaron una disminución de la ingesta de alimentos y agua, letargia, ataxia, midriasis, temblor, dificultad para respirar y hasta rigidez en los miembros y muerte cuando los animales fueron expuestos a las máximas dosis de tratamiento (Merck & Co., I., 1979g; 1981c; 1981d; 1982d; Egerton, J.R. *y col.*, 1984).

En cuanto al potencial carcinogénico de la ivermectina, el mismo no ha sido evaluado hasta el presente. Sólo pueden ser mencionados algunos estudios de carcinogenicidad realizados en ratas tratadas con abamectina, un análogo de la

ivermectina, donde la misma no manifestó alteraciones de esta índole (Merck & Co., I., 1982e).

En lo que respecta a los efectos teratogénicos causados por ivermectina, se han desarrollado ensayos en ratones, ratas, conejos y perros. Los resultados mostraron alteraciones durante el desarrollo fetal como la presencia de paladar hendido en ratones, ratas y conejos y la presencia de las patas delanteras golpeadas sin alteraciones esqueléticas en conejos, cuando sus madres fueron expuestas a dosis similares a las que causan graves efectos tóxicos en las hembras preñadas. El nivel donde no se observaron efectos teratogénicos en las especies más sensibles fue de 0,2 mg/kg de peso corporal/día, mientras que para la toxicidad materna fue de 0,1 mg/kg peso corporal/día (Merck & Co., I., 1980e; 1981e). La ivermectina no tuvo ningún efecto sobre el apareamiento, estado reproductivo, la duración del promedio gestacional o la tasa de supervivencia post implantación (Merck & Co., I., 1978a; Merck & Co., I., 1979b).

En cuanto a los efectos genotóxicos de la ivermectina, los datos son aún más escasos. Se llevaron a cabo ensayos *in vitro* sobre células procariotas mediante el ensayo de Ames (*Escherichia coli* cepas TA1535, TA1537, TA98 y TA100) en presencia o en ausencia de un sistema de activación metabólica microsomal y los resultados no evidenciaron aumento notable de las revertantes de histidina (Merck & Co., I., 1978b). Se evaluó también la capacidad de la ivermectina para producir mutaciones directas en el locus de la timidina kinasa (TK ^{+/+} para Tk ^{-/-}) de las células del linfoma de ratón L5178Y Fischer, en presencia y ausencia de la fracción microsomal S9, evidenciándose resultados negativos para este tipo de ensayo. (Merck & Co., I., 1980h). Asimismo, se evaluó la capacidad de la ivermectina de

promover la síntesis no programada del ADN en fibroblastos normales de pulmón de embrión humano (línea celular IMR-90) en presencia y ausencia de un sistema de activación metabólica microsomal de hígado de rata. Los resultados establecieron que la droga no indujo ningún incremento significativo en la incorporación de timidina (Merck & Co., I., 1980i). En cultivos *in vitro* usando linfocitos humanos de sangre periférica, ivermectina indujo la formación de ICHs luego del tratamiento con concentraciones de 0,3 µg/ml y superiores (Aleksić, N. y Barjaktarović, N., 1993). Sin embargo, los mismos autores, 3 años más tarde reportaron resultados negativos empleando el mismo ensayo y las mismas condiciones de trabajo (Aleksić, N. y col., 1996). Recientemente, el-Ashmawy y colaboradores (el-Ashmawy, I.M. y col., 2011) evaluaron los efectos citogénéticos y teratogénicos de la ivermectina y de la combinación de ésta con verapamil, un potente inhibidor de la Pgp, en fetos y ratas gestantes (el-Ashmawy, I.M. y col., 2011). Los resultados revelaron que la administración de ivermectina durante los días 6-15 de gestación no alteró el desarrollo fetal. Sin embargo, se observó una reducción en el índice mitótico y un incremento de estructuras cromosómicas aberrantes en células de la médula ósea materna. Asimismo, los resultados evidenciaron un aumento en la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos provenientes del sangrado de cordón umbilical y una reducción en el índice mitótico de hepatocitos fetales. Estudios previos llevados a cabo por estos autores revelaron leves alteraciones sobre la fertilidad en ratas machos luego de la administración de ivermectina, evidenciada por alteraciones en las espermatogonias dentro de los túbulos seminíferos, reducción en la concentración de espermatozoides en el interior del epidídimo, disminución en la motilidad y en la actividad mitótica de células espermáticas (el-Nahas, A.F. y el-Ashmawy, I.M.,

2008). De la misma manera, recientemente ha sido demostrado un incremento en la frecuencia de micronúcleos inducidos por ivermectina en linfocitos circulantes de búfalo de río (El-makawy, A.I. y Mahrous, K.F., 2008). Por otra parte, Atakishi *et al.* (Atakishi, E. *y col.*, 2009) evidenciaron un aumento en los niveles plasmáticos del radical óxido nítrico en conejos neozelandeses a los cuales les fueron suministradas de manera subcutánea dosis terapéuticas de ivermectina (0,5 y 1 mg/kg). Además, éstos investigadores comprobaron una disminución en la capacidad antioxidante luego de 2 h posteriores al tratamiento con ivermectina (Atakishi, E. *y col.*, 2009).

En cuanto a los ensayos de citotoxicidad, la ivermectina fue evaluada sobre una línea celular de riñón de cerdo IB-RS-2 tratada *in vitro* con concentraciones crecientes. Los resultados del estudio evidenciaron una disminución en el recuento celular, utilización de la glucosa y síntesis proteica, promoviendo la muerte celular a una concentración de 40 µg/ml. Sin embargo, la síntesis de ADN y ARN no fue modificada luego del tratamiento con ivermectina (La R. Rodrigues, M.A. y Mattei, R., 2006).

En lo que respecta a los efectos de la ivermectina sobre los seres humanos, su utilidad en niños, ya sea en forma oral a dosis de 200 µg/Kg, como en administración tópica en loción a dosis de 400 µg/Kg, constituye una terapia eficaz, segura, económica y de fácil administración (Victoria, J., 2003). La información disponible se centra en estudios de tolerancia al fármaco realizados en pacientes con oncocercosis que recibieron una única dosis oral (0,15 – 0,2 mg/Kg de peso corporal) de Mectizan® cada 12 meses. Los efectos secundarios observados en algunos pacientes, en su mayoría leves y transitorios, pueden ser atribuidos a reacciones de hipersensibilidad como resultado de la muerte de las microfilarias

(reacción de Mazzotti), presentando síntomas de hipotensión postural inmediata, cefalea, prurito, artralgia, mareos, dolores musculares, fiebre, edema, linfadenitis, náusea, vómitos, diarrea, taquicardia, debilidad, erupción cutánea y dolor de cabeza (Merck & Co., I., 1988b). Asimismo, personas expuestas accidentalmente a la formulación comercial Ivomec® presentaron cólicos, náuseas, midriasis y vómitos, seguidos de taquicardia, somnolencia y urticaria. En todos los casos estos síntomas desaparecieron al cabo de 12 h a 3 días (Merck & Co., I., 1988a). Ocasionalmente, se han descrito irritaciones oculares leves y cambios electrocardiográficos menores, pudiéndose presentar alteraciones hepáticas y múltiples efectos neurológicos severos, sobre todo en personas de edad avanzada (Aparicio, P. *y col.*, 2003; Orion, E. *y col.*, 2005; Sparsa, A. *y col.*, 2006). Un único caso de hepatitis severa fue registrado en un joven de 20 años en Camerún, quien recibió una única dosis de ivermectina tras ser infectado con el nematodo parásito loa loa. El análisis de la biopsia hepática reveló inflamación intralobular, necrosis y apoptosis, compatible con la enfermedad hepática inducida por el antibiótico (Viet, O. *y col.*, 2006).

En Argentina, el antiparasitario endectocida ivermectina es ampliamente comercializado en el ámbito de la salud humana y la medicina veterinaria para combatir enfermedades infecciosas causadas por parásitos, las cuales conllevan al deterioro de la salud y al desarrollo de grandes pérdidas económicas. Asimismo, y dado su amplio espectro de actividad es de gran utilidad para control de plagas en la industria agrícola.

Por lo expuesto, resulta evidente que la ausencia de resultados concluyentes que permitan determinar claramente el perfil toxicológico de la ivermectina es un área de urgente exploración. Debido a ello, y a la escasa

información existente respecto a su potencial toxicológico y a la falta de análisis por parte de las organizaciones internacionales encargadas de llevar a cabo su estudio y clasificación, resulta ser un compuesto sumamente atractivo para ser estudiado y evaluado desde el punto de vista genotóxico y citotóxico en diferentes sistemas celulares en condiciones *in vitro*. Los resultados de las investigaciones desarrolladas en este trabajo de Tesis Doctoral permitirán ampliar los conocimientos sobre los posibles efectos deletéreos o adversos que pueda ejercer el antiparasitario en la salud de los organismos huéspedes a quienes no está destinado. Por último estas investigaciones podrán contribuir a la generación de medidas preventivas para la adecuada protección de la salud humana y ambiental tanto a nivel mundial como en nuestro territorio argentino.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Sobre la base de la situación planteada, el objetivo general del presente trabajo de Tesis Doctoral fue determinar si el principio activo ivermectina, con propiedad antihelmíntica, insecticida y acaricida, así como una de sus formulaciones comerciales más utilizadas en Argentina, Ivomec[®] (1% ivermectina) poseen capacidad genotóxica y citotóxica en sistemas celulares *in vitro*.

2.2. Objetivos Específicos

En relación al objetivo general, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar el potencial genotóxico y citotóxico inducido por el antiparasitario ivermectina y su formulación comercial Ivomec[®] (1% ivermectina) en células de mamíferos e insectos mediante los ensayos de intercambios de cromátidas hermanas, progresión del ciclo celular, índice mitótico y viabilidad celular.

- Evaluar el potencial genotóxico y citotóxico inducido por el antiparasitario ivermectina y su formulación comercial Ivomec[®] (1%

ivermectina) en células de líneas celulares establecidas mediante el análisis de la frecuencia de micronúcleos.

- Evaluar el daño y reparación de las lesiones introducidas en el ADN de células de mamíferos e insectos por el antiparasitario ivermectina y su formulación comercial Ivomec[®] mediante el ensayo cometa y análisis de la viabilidad celular.

- Evaluar el potencial citotóxico de la ivermectina e Ivomec[®] sobre el metabolismo energético tanto a nivel mitocondrial como lisosomal en células de mamíferos e insectos mediante ensayos colorimétricos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales utilizados

3.1.1. Compuestos químicos

Con el fin de llevar adelante la labor experimental del presente trabajo de Tesis Doctoral se utilizó como principio activo la ivermectina (22,23-dihidroavermectina B1, CAS 70288-86-7), adquirido en Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, EEUU). El formulado comercial Ivomec[®], el cual contiene un 1% de ivermectina y un 99% de excipientes de naturaleza no conocida, provisto por la empresa Merial Argentina S.A. (Buenos Aires, Argentina). La BLM (Blocamicina[®]), fue suministrada por Laboratorios Gador S.A. (Buenos Aires, Argentina), y utilizada como control positivo para los bioensayos de genotoxicidad y citotoxicidad. El DMSO (CAS 67-68-5) fue adquirido por la empresa Merck KgaA (Darmstadt, Alemania) y empleado como solvente del principio activo. Los alcaloides colchicina (CAS 64-86-8) y citocalasina B (CAS 14930-96-2) fueron adquiridos por la empresa Sigma Chemical Co.

3.1.2. Obtención de muestras

3.1.2.1. Líneas celulares establecidas

Se utilizaron dos líneas celulares establecidas: una línea celular proveniente de ovario de hámster chino *Cricetulus griseus* (CHO-K1; ATCC CCL-61TM) y una línea

celular proveniente de larvas del mosquito *Aedes albopictus* (ATCC CCL-126TM), ambas suministradas por la American Type Culture Collection (ATCC[®], Rockville, MD, EEUU).

3.1.2.2. Muestras de sangre

Las muestras sanguíneas fueron obtenidas a partir de tres (3) donantes voluntarios sanos de sexo masculino de entre 20 a 30 años de edad (no fumadores, no bebedores de alcohol y en ausencia de tratamientos con fármacos y/o ingesta de suplementos dietarios), seleccionados de acuerdo a recomendaciones previamente descritas por Bianchi *et al.* (Bianchi, N.O. y *col.*, 1979). Cada donante fue interrogado en relación a su estilo de vida, condiciones de trabajo y posibles exposiciones a agentes de dudosa o desconocida peligrosidad. Los donantes dieron su consentimiento con conocimiento de causa. Se extrajeron de cada individuo 20 ml de sangre por punción venosa la cual fue inmediatamente procesada para llevar a cabo los cultivos celulares (Anexo II A).

3.2. Metodologías empleadas

3.2.1. Cultivo de líneas celulares establecidas

3.2.1.1. Cultivo de células CHO-K1 (Publicación II; Anexo II B, D y F)

Las células CHO-K1 fueron mantenidas en medio de cultivo Ham F10 suplementado con un 10% de suero fetal bovino, 100 unidades/ml de penicilina (Gibco, Grand Island, NY, EEUU) y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomicina (Gibco) y cultivadas a 37 °C en atmósfera al 5% de CO_2 . Un total de $3,5 \times 10^4$ células/ml fueron sembradas en frascos de cultivo de poliestireno de 25 cm^2 o en cápsulas de Petri de 35 mm de diámetro conteniendo cubreobjetos estériles de 18 x 18 mm para determinar la viabilidad celular (Publicación II; Anexo II D). Asimismo, 4×10^3 células/ml fueron sembradas sobre cubreobjetos estériles de 22 x 22 mm en cápsulas de Petri de 35 mm de diámetro en un volumen final de 3 ml para la determinación de la frecuencia de micronúcleos (MN; Anexo II F). Para llevar a cabo los ensayos de MTT y RN, las células fueron sembradas en microcápsulas de 96 pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/pocillo (Publicación II). Todos los ensayos fueron realizados utilizando células en su fase de crecimiento exponencial. Luego de 24 h de la siembra, las células fueron tratadas con ambos compuestos en presencia de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de BrdU (Publicación II) o de 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de citocalasina B (Anexo II F). Para desarrollar el ensayo cometa (EC), las células fueron tratadas inmediatamente al momento de la siembra. En todos los casos, las células fueron cultivadas en presencia de ivermectina o Ivomec[®] por diversos períodos de tiempo en función del modelo experimental a utilizar: 80 min (Publicación II; Anexo II D), 12 h (Anexo II B) o 24 h (Publicación II). Durante las últimas 3 h de cultivo, fueron adicionados 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de colchicina (Publicación II). En el caso del EC luego del tiempo de tratamiento con ambos compuestos, las células fueron lavadas 2 veces con solución salina balanceada de Hank, resuspendidas en 2 ml de medio de cultivo completo y cultivadas por períodos de 0,5; 1; 1,5; 3; 6, 12, 18 y 24 h hasta su posterior procesamiento (Anexo II

D). En todos los casos, los cultivos fueron establecidos por duplicado para cada punto experimental realizando al menos tres ensayos independientes. Los cultivos, incluyendo los controles negativos (no tratados y tratados con el solvente del principio activo) y positivos (BLM, 1 µg/ml o 10 µg/ml), así como los tratados fueron procesados simultáneamente. Asimismo, los mismos lotes de medio de cultivo, suero y reactivos fueron utilizados a lo largo de todo el ensayo.

3.2.1.2. Cultivos de células CCL-126 (Publicación IV; Anexo II C y E)

Células CCL-126 en fase de crecimiento exponencial fueron cultivadas en medio de cultivo específico Mitsuhashi y Maramorosch suplementado con 0,12 g/L de bicarbonato de sodio y 20% de suero fetal bovino (28 °C, 5% CO₂, 24 h). Una concentración de 2 x 10⁶ células/ml fue sembrada en frascos de cultivo de poliestireno de 25 cm² (Publicación IV). La misma concentración de células fue sembrada en cápsulas de Petri de 35 mm de diámetro en un volumen final de 3 ml conteniendo cubreobjetos de 18 x 18 mm para evaluar la viabilidad celular (Publicación IV; Anexo II E), y 2,5 x 10⁴ células/pocillo fueron sembradas en microcápsulas de 96 pocillos con la finalidad de reproducir los ensayos de MTT y RN (Publicación IV). Luego del tiempo de cultivo establecido, las células fueron tratadas con ambos compuestos conjuntamente con 10 µg/ml de BrdU (Publicación IV). Para el EC los tratamientos fueron realizados al comienzo de la siembra (Publicación IV; Anexo II E). Posteriormente, las células fueron cultivadas por diversos lapsos en función del ensayo a realizar: 80 min (Publicación IV y Anexo II E), 12 h (Anexo II E) y 24 h (Publicación IV). Durante las últimas 5 h de cultivo, se adicionaron 0,1

$\mu\text{g/ml}$ de colchicina (Publicación IV). Durante el desarrollo del EC luego del tiempo de tratamiento, las células fueron lavadas 2 veces con solución salina balanceada de Hank, resuspendidas en 2 ml de medio de cultivo completo y nuevamente cultivadas por períodos de 0,5; 1; 1,5; 3; 6, 12, 18 y 24 h hasta su posterior procesamiento (Anexo II E). Para todos los análisis los cultivos fueron establecidos por duplicado para cada punto experimental durante al menos tres ensayos independientes. Los cultivos, incluyendo los controles negativos (no tratados y tratados con el solvente del antibiótico) y positivos (BLM, 1 $\mu\text{g/ml}$ o 10 $\mu\text{g/ml}$), así como los tratados fueron procesados simultáneamente. Los mismos lotes de medio de cultivo, suero y reactivos fueron utilizados a lo largo del ensayo.

3.2.2. Cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica *in vitro* (Anexo II A)

Una vez obtenida la sangre heparinizada a partir de los donantes se procedió a la realización de los cultivos sembrando 1 ml de la muestra en frascos de vidrio de 15 ml conteniendo 9 ml de medio de cultivo RPMI (Sigma Chemical Co.) con un 10% de SFB junto a los antibióticos correspondientes (100 unidades/ml de penicilina y 10 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin). Inmediatamente, se llevaron a cabo los tratamientos con ivermectina o Ivomec[®]. Todos los cultivos, incluyendo los controles negativos (no tratados y tratados con el solvente del antiparasitario) y positivos (BLM, 15 $\mu\text{g/ml}$), fueron realizados por duplicado por cada punto experimental y procesados en forma conjunta. Inmediatamente después del tratamiento, se procedió a la estimulación linfocitaria con 30 $\mu\text{l/ml}$ de fitohemaglutinina M (Gibco). Luego del tratamiento y estimulación se adicionó 10

$\mu\text{g/ml}$ de BrdU y las células fueron posteriormente cultivadas ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , 72 h). Durante las últimas 3 h de cultivo, las células fueron tratadas con $0,1\text{ }\mu\text{g/ml}$ de colchicina. Todos los experimentos fueron realizados utilizando los mismos lotes de medio de cultivo, suero fetal bovino y reactivos a lo largo de los ensayos.

3.2.3. Tratamiento de los cultivos celulares con ivermectina e Ivomec[®]

La ivermectina previamente a ser empleada fue disuelta en DMSO cuya concentración final en el medio de cultivo no superó el 1% para todos los tratamientos. En lo referente al Ivomec[®], éste se presenta en el mercado como una solución acuosa de ivermectina al 1% , por lo que no fue necesario realizar una disolución previa a su uso. Ambas soluciones fueron diluidas en medio de cultivo hasta obtener las concentraciones necesarias para llevar a cabo los ensayos. Los cultivos de líneas celulares establecidas (CHO-K1 y CCL-126) fueron tratados con ambos compuestos 24 h posteriores a la siembra, mientras que los cultivos correspondientes a linfocitos humanos fueron tratados al inicio del período de cultivo. Las concentraciones finales de ivermectina e Ivomec[®] empleadas fueron $1; 5; 10; 25; 50; 100$ y $250\text{ }\mu\text{g/ml}$ (Publicaciones II y IV; Anexo II A, B y C). Para los ensayos de MTT y RN los cultivos de células CHO-K1 y CCL-126 fueron tratadas utilizando concentraciones de $0,25; 0,5; 1; 5; 10; 25; 50; 100$ y $250\text{ }\mu\text{g/ml}$ de ivermectina e Ivomec[®], respectivamente. En el caso del EC y el ensayo de MN fueron utilizadas concentraciones de $5, 25$ y $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ (Publicaciones II y IV; Anexo II F). Finalmente, para analizar la cinética de reparación del daño del ADN, cultivos celulares de células CHO-K1 y CCL-126 fueron tratados con $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ de ambos

compuestos durante un pulso de 80 min, procesados a intervalos crecientes de tiempo y analizados mediante el EC, respectivamente (Anexo II D y E). Ninguno de los tratamientos mostró cambios significativos en el pH del medio de cultivo.

3.2.4. Estudio de los efectos deletéreos ejercidos por ivermectina e Ivomec®

3.2.4.1. Estudio de la viabilidad celular: Publicaciones II y IV; Anexo II (D y E)

Al finalizar el período de cultivo se llevó a cabo la determinación de la viabilidad celular para cada punto experimental mediante el método descrito por McGahon *et al.* (McGahon, A.J. *y col.*, 1995) (Publicaciones II y IV; Anexo II D y E). Los cubreobjetos donde fueron cultivadas las células fueron removidos de las cápsulas de Petri e incubados con 5 µl de una mezcla de fluorocromos preparada a partir de 100 µg/ml de bromuro de etidio y 100 µg/ml de naranja de acridina en una solución de fosfatos (Leite, M. *y col.*, 1999; Kosmider, B. *y col.*, 2004). El análisis se realizó en un fotomicroscopio de fluorescencia (Olympus BX50) conteniendo una combinación de filtros adecuada para el mismo. Para determinar la viabilidad celular se contabilizaron un total de 1000 células por punto experimental. Las células viables se identificaron por el color verde brillante del núcleo y las no viables mostraron el núcleo de color naranja intenso. Los resultados fueron expresados como porcentajes de células vivas sobre el total de células contabilizadas.

3.2.4.2. Estudio de la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICHs): Publicaciones II y IV; Anexo II (A, B y C)

Luego de 12 y 24 h de cultivo de las células CHO-K1 (Publicación II; Anexo II B) y de las células CCL-126 (Publicación IV; Anexo II C) y 72 h de cultivo de los linfocitos humanos (Anexo II A), las células fueron cosechadas por centrifugación, sometidas a un tratamiento hipotónico utilizando una solución 3:1 de agua destilada y medio de cultivo (20 minutos a T° ambiente) para células CHO-K1 y CCL-126 o una solución de KCl 0,075 M (17 min, 37 °C) para linfocitos humanos. Posteriormente, las células fueron fijadas en una solución 3:1 de metanol-ácido acético. Los extendidos cromosómicos fueron obtenidos utilizando la técnica de secado al aire. Para lograr la tinción diferencial de los cromosomas, los extendidos fueron procesados empleando un método clásico de coloración de fluorocromo-Giemsa (Korenberg, J.R. y Freedlender, E.F., 1974; Perry, P. y Wolff, S., 1974). Las preparaciones fueron inmersas en una solución buffer de fosfatos (0,1M, pH 6,8) conteniendo 1 µg/ml de Hoechst 33258 durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las preparaciones fueron sometidas a un campo de luz fluorescente durante 1 h en presencia de la misma solución buffer. Pasado el tiempo establecido, los extendidos fueron retirados de la luz, lavados con agua destilada y secados a temperatura ambiente. Seguidamente, las preparaciones fueron colocadas en una solución 1M de Na₂HPO₄ (pH 8,2, 86 °C, 5-7 min), luego lavadas con agua destilada y finalmente teñidas con Giemsa (Merck KgaA) al 5%. Por cada punto experimental se obtuvo la frecuencia de ICHs a partir del análisis de 50 células en segunda división. Los resultados fueron expresados como valores medios de ICHs ± ES por célula.

3.2.4.3. Estudio de la progresión del ciclo celular (PCC) e índice mitótico (IM): Publicaciones II y IV; Anexo II (A, B y C)

Para llevar a cabo el análisis de la PCC se analizaron un total de 200 células en metafase por punto experimental y se determinó el porcentaje de células que se encontraban en primera (M_1), segunda (M_2) y tercera (M_3) división mitótica. La estimación de la duración del ciclo celular en células CHO-K1 fue analizada según el método oportunamente propuesto por Larramendy *et al.* (Larramendy, M.L. y *col.*, 1989). De esta forma, 10 $\mu\text{g/ml}$ de BrdU fue incorporado al inicio de los cultivos y mantenidos hasta la cosecha de los mismos. El análisis de la PCC se cumplimentó al determinar el índice de proliferación celular (IPC) según la fórmula $\text{IPC} = (\%M_1) + 2(\%M_2) + 3(\%M_3)/100$, el cual indica la cantidad de ciclos celulares realizados por las células en el cultivo desde el momento en que fue incorporada la BrdU hasta su procesamiento (Lamberti, L. y *col.*, 1983). El IM fue evaluado mediante el análisis de un total de 2000 células por punto experimental y expresado como la frecuencia de mitosis observadas por cada 1000 células analizadas. La relación existente entre el IM de los tratamientos respecto al control fue establecida mediante el factor f de la siguiente manera: $f = \text{IM}_t/\text{IM}_c$, donde IM_t corresponde al IM de los cultivos tratados con el antiparasitario y el IM_c corresponde al IM obtenido de los cultivos controles (Miller, B.M. y Adler, I.D., 1989).

3.2.4.4. Estudio del daño y reparación del ADN mediante el ensayo cometa (EC): Publicaciones II y IV; Anexo II (D y E)

Para llevar adelante este análisis se utilizó la metodología de electroforesis en gel de células únicas o ensayo cometa (EC) en su variante alcalina descrita por Singh y colaboradores (Singh, N. *y col.*, 1988). De esta manera, una vez concluidos los 80 min de tratamiento, se procedió a cosechar y procesar las células. Dos soluciones al 5% de agarosa bajo punto de fusión (ABPF) y agarosa punto de fusión normal (APFN), fueron preparadas en una solución de fosfatos libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} . Posteriormente, 75 μl de APFN fueron extendidos sobre portaobjetos y colocados en estufa (37 °C, 20 min) hasta su solidificación. Seguidamente, 75 μl de ABPF fueron mezclados con 25 μl de la suspensión celular y dicha mezcla fue esparcida homogéneamente sobre la capa de APFN, cubierta con un cubreobjetos y luego incubados a 4 °C durante 15 min. Posteriormente, se adicionó una tercera capa de APFN (75 μl) y las preparaciones fueron nuevamente incubadas (4 °C, 15 min). Seguidamente, las preparaciones fueron inmersas en una solución de lisis (4 °C, 2 h, 1% sarcocinato de Na, 2,5 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA , 10 mM Tris pH 10, 1% Triton X-100, 10% DMSO). Luego de la incubación, las preparaciones fueron incluidas en una cuba de electroforesis horizontal conteniendo un buffer de electroforesis (4 °C, 20 min, 1 mM Na_2EDTA , 300 mM NaOH) para permitir el desenrollamiento del ADN. Inmediatamente, las células fueron sometidas a un campo eléctrico (30 min, 25 V, 250 mA u 0,8 V/cm). Finalizada la electroforesis, los extendidos fueron retirados de la cuba y lavados tres veces con un buffer de neutralización (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) y enjuagados con agua destilada. Por último,

las preparaciones fueron teñidas con DAPI (Laboratorios Vector Inc., Burlingame, CA, USA) y analizadas utilizando un fotomicroscopio de fluorescencia (Olympus BX50) equipado con un objetivo 100X y una combinación de filtros adecuada. Un total de 50 núcleos celulares por punto experimental fueron fotografiados al azar e inmediatamente medidos su ancho y largo teniendo en cuenta en éste último parámetro la migración del ADN fuera del límite nuclear. Las imágenes fueron clasificadas en cuatro categorías dependiendo del nivel de daño en el ADN: células no dañadas, levemente dañadas, dañadas y altamente dañadas según los criterios de clasificación propuestos por Lebailly y colaboradores (Lebailly, P. *y col.*, 1997).

3.2.4.5. Estudio de la actividad lisosomal mediante el ensayo de rojo neutro (RN): Publicaciones II y IV

El ensayo de RN se desarrolló en base al protocolo inicialmente descrito por Borenfreund y Puerner (Borenfreund, E. y Puerner, J.A., 1985). Luego de finalizado el período de exposición a ivermectina e Ivomec® fue removido el medio de cultivo por inversión de la placa de cultivo y las células posteriormente lavadas por adición de 100 µl de PBS a cada pocillo. El colorante RN fue disuelto en medio de cultivo libre de suero y fue adicionado a cada pocillo en una concentración final de 0,33% (3 h, 28 °C o 37 °C, dependiendo de la línea celular utilizada). Finalizada la incubación, se realizó un segundo lavado con PBS y posteriormente se adicionó 100 µl de solución de extracción (1% ácido acético glacial, 50% etanol y 49% agua destilada, 15 min). Por último, se procedió a realizar la lectura a 540 nm utilizando un lector de microplacas para la medición de la absorbancia (Sunrise-Basic Tecan,

Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria). Los resultados fueron expresados como porcentajes medios de inhibición celular a partir de al menos tres experimentos independientes.

3.2.4.6. Estudio de la actividad mitocondrial mediante el ensayo de MTT: Publicaciones II y IV

La metodología de MTT fue desarrollada siguiendo la técnica descrita en detalle por Kosmider y colaboradores (Kosmider, B. *y col.*, 2004). Luego de finalizado el período de exposición a ivermectina e Ivomec[®] fue removido el medio de cultivo por inversión y los cultivos posteriormente lavados por adición de 100 μ l de PBS a cada pocillo. Seguidamente, una solución de 100 μ l de MTT (2 mg/ml) fue adicionada a cada pocillo y la placa fue mantenida a 37 °C o 28 °C, según el tipo celular utilizado, durante un período adicional de 3 h. Finalizada la incubación con MTT, fue realizado un lavado con PBS y seguidamente fue adicionado 100 μ l de DMSO (solvente de extracción) durante un período de 15 min en agitación constante. Por último, se procedió a realizar la lectura a 550 nm utilizando un lector de microplacas para la medición de la absorbancia (Sunrise-Basic Tecan, Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria). Los resultados fueron expresados como porcentajes medios de inhibición celular a partir de al menos tres experimentos independientes.

3.2.4.7. Estudio de la frecuencia de micronúcleos (MN): Anexo II (F)

El ensayo de MN fue desarrollado siguiendo la técnica descrita por Fenech (Fenech, M., 2000). Para analizar la frecuencia de MN en células CHO-K1, una vez finalizado el período de exposición a los compuestos en presencia de citocalasina B, las células fueron prefijadas en una solución fresca de metanol-ácido acético glacial 6:1 (15 min, 4 °C). Seguidamente, las células se fijaron en 2 ml de metanol-ácido acético glacial 6:1 (15 min), se descartó el sobrenadante, se levantaron los cubreobjetos donde se encontraban adheridas las mismas y se los dejó secar bajo campana para finalmente ser teñidos con colorante Giemsa al 3% y montados sobre portaobjetos con medio de montaje sintético (PermOUNT™, Fisher Scientific, EEUU). Las preparaciones fueron analizadas utilizando un microscopio de campo claro (Olympus BX50/CX35) equipado con un objetivo 100X y siguiendo los criterios propuestos por Fenech (Fenech, M., 2000) para la selección de células binucleadas, a saber: una célula binucleada debe presentar intacta la membrana celular y ser fácilmente distinguible de otras células, los dos núcleos de una célula binucleada deben presentar intacta la membrana nuclear y ubicarse centralmente en el citoplasma celular, deben exhibir el mismo patrón e intensidad de tinción así como también un tamaño equivalente y no deben solaparse entre sí. Para la identificación de los micronúcleos, las preparaciones fueron examinadas adoptando los criterios propuestos por Countryman y Heddle (Countryman, P. y Heddle, J.A., 1976), Heddle *et al.* (Heddle, J.A. y col., 1978) y Fenech (Fenech, M., 2000; Fenech, M., 2007). De acuerdo a estos autores, los micronúcleos deben presentar una serie de condiciones para ser considerados como tales, a saber: diámetro menor a 1/3

respecto al núcleo principal, no ser refringentes, exhibir una coloración igual o más pálida que el núcleo principal, no estar en contacto con el núcleo principal y no existir más de cuatro micronúcleos asociados con un núcleo principal. La frecuencia de células con micronúcleos se determinó por análisis de por lo menos 1000 células binucleadas por punto experimental. El análisis se cumplimentó al determinar el índice de división nuclear (IDN) según lo establecido por Fenech (Fenech, M., 2000), el cual representa el número de ciclos celulares realizados por las células desde el momento en que fue incorporada la citocalasina B en el cultivo hasta su procesamiento. El IDN fue evaluado mediante el análisis de un total de 500 células viables por punto experimental y expresado según la fórmula $IDN = (M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4))/N$, donde M1-M4 representa la frecuencia de células con 1, 2, 3 y 4 núcleos y N corresponde al número total de células viables analizadas (Fenech, M., 2000).

3.2.4.8. Análisis Estadístico

Para las comparaciones estadísticas fue utilizada la prueba de “t” de Student en el estudio de la frecuencia de ICHs, ensayos de RN y MTT, frecuencia de MN y EC, con la finalidad de analizar los resultados obtenidos en los tratamientos respecto a los valores controles para cada análisis (Publicaciones II y IV; Anexo II A-F). La distribución χ^2 fue utilizada para las comparaciones estadísticas de la PCC e IM, así como para el análisis de la frecuencia media del daño celular (Publicaciones II y IV; Anexo II A, B y C), valores medios de la frecuencia de MN (Anexo II F) y viabilidad celular (Publicaciones II y IV; Anexo II D y E).

Los ensayos- no-paramétricos Kruskal–Wallis y Tukey fueron utilizados para evaluar el efecto de ivermectina e Ivomec® en relación a las células control en el EC, mientras que las comparaciones individuales entre pares de datos fueron desarrolladas utilizando el ensayo de Mann–Whitney. Un análisis de regresión lineal fue utilizado para evaluar la posible relación existente entre el incremento de daño en el ADN y las concentraciones de ivermectina e Ivomec® empleados (Publicaciones II y IV; Anexo II D y E).

4. RESULTADOS

4.1. Evaluación de la frecuencia de ICHs: Publicaciones II y IV; Anexo II (A, B y C)

La frecuencia de ICHs inducida por ivermectina y su formulación comercial Ivomec[®], fue analizada luego de 12 y 24 h de tratamiento continuo en dos líneas celulares establecidas (CHO-K1 y CCL-126) y 72 h de tratamiento en linfocitos humanos de sangre periférica con concentraciones crecientes de 1-250 µg/ml de ambos compuestos. Para los controles positivos de genotoxicidad se empleó 1 µg/ml (CHO-K1 y CCL-126) y 15 µg/ml (cultivos de linfocitos) de BLM.

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que tanto el principio activo como su formulado comercial no indujeron cambios significativos en la frecuencia basal de ICHs con ninguno de los tipos celulares estudiados ni bajo los distintos tiempos experimentales ensayados, respecto a la observada en los controles negativos ($P > 0,05$). Contrariamente, diferencias significativas fueron observadas entre los valores controles y aquellos obtenidos en células tratadas con BLM ($P < 0,001$).

En ambas líneas celulares tratadas durante 12 h con concentraciones de 1-250 µg/ml de ivermectina e Ivomec[®], la frecuencia de ICHs no se vio alterada ($P > 0,05$) cuando fueron ensayadas concentraciones bajas de ambos compuestos (1-10 µg/ml). Sin embargo, en las células CHO-K1 tratadas con 25 µg/ml de ivermectina e Ivomec[®] así como en las células CCL-126 expuestas a la misma concentración de ivermectina, se observó una reducción en la frecuencia de M_2 que impidió determinar los valores de dicho parámetro. Concentraciones superiores (50-250 µg/ml)

resultaron ser altamente tóxicas revelando una acentuada disminución de ambas poblaciones celulares luego de 12 h de tratamiento continuo (Anexo II B y C, Figura 1).

Cuando las células CHO-K1 fueron tratadas durante 24 h con concentraciones de 1-10 $\mu\text{g/ml}$ de ambos compuestos no se observaron cambios significativos en la frecuencia de ICHs respecto a los valores controles ($P>0,05$). En los tratamientos con 25 $\mu\text{g/ml}$ de ivermectina se observó una disminución significativa en la frecuencia de células M_2 que no permitió determinar los valores del parámetro en cuestión. Sin embargo, concentraciones de 50-250 $\mu\text{g/ml}$ de ivermectina e Ivomec[®] resultaron ser altamente tóxicas, dada la elevada citotoxicidad y muerte de la población celular al cabo de 24 h de tratamiento (Publicación II, Figura 1). Resultados similares fueron observados en las células CCL-126 luego de 24 h de tratamiento con concentraciones crecientes de ivermectina e Ivomec[®]. Concentraciones de 1-10 $\mu\text{g/ml}$ de ambos compuestos no revelaron cambios significativos en la frecuencia de ICHs respecto a los valores controles ($P>0,05$). Asimismo, 25 $\mu\text{g/ml}$ de ivermectina e Ivomec[®] promovieron una reducción de la frecuencia de células M_2 que imposibilitó el análisis de dicho parámetro, mientras que concentraciones superiores de ambos compuestos resultaron tóxicas debido a una elevada mortalidad celular presente en los cultivos (Publicación IV, Figura 1).

En lo referente a las células linfocitarias humanas, la frecuencia de ICHs tampoco se vio incrementada respecto a los valores controles ($P>0,05$) cuando concentraciones de 1-50 $\mu\text{g/ml}$ y 1-25 $\mu\text{g/ml}$ de ivermectina e Ivomec[®] fueron ensayadas, respectivamente. Concentraciones de 50 $\mu\text{g/ml}$ de Ivomec[®] indujeron una reducción en la frecuencia de M_2 no permitiendo determinar la frecuencia de ICHs y

concentraciones superiores a ésta pusieron de manifiesto una elevada acción citotóxica de ambos compuestos evidenciada por un alto porcentaje de mortalidad de la población celular al cabo de 72 h de tratamiento (Anexo II A, Figura 1).

4.2. Evaluación de la progresión del ciclo celular (PCC) e índice mitótico (IM): Publicaciones II y IV; Anexo II (A, B y C)

El efecto deletéreo ejercido por ivermectina y su formulado comercial Ivomec® fue estudiado sobre líneas celulares establecidas (CHO-K1 y CCL-126) mediante el análisis de la PCC e IM luego de 12 y 24 h de tratamiento continuo empleando concentraciones de 1-250 µg/ml de ambos compuestos. Asimismo, dichos parámetros fueron analizados en linfocitos humanos de sangre periférica luego de 72 h de exposición continua a las mismas concentraciones de ivermectina e Ivomec®. En todos los casos, se utilizó 1 µg/ml (CHO-K1 y CCL-126) y 15 µg/ml (cultivos de linfocitos) de BLM como control positivo.

Los resultados observados sobre líneas celulares establecidas luego de 12 h de exposición, mostraron que las células CHO-K1 y CCL-126 evidenciaron cambios significativos en la PCC a concentraciones de 10 (P<0,05) y 25 µg/ml (P<0,001) de ivermectina y a concentraciones de 5 (P<0,001), 10 (P<0,01) y 25 µg/ml (P<0,001) de Ivomec® (Anexo II B y C, Figura 2). Un análisis de correlación puso de manifiesto que la reducción de este parámetro fue dependiente de las concentraciones (P<0,001), conjuntamente con una disminución significativa en la frecuencia de células en M₂ (r= 0,99) y el concomitante aumento de células en M₁ (r= 0,99). Asimismo, el valor del índice de proliferación celular (IPC) de ambas líneas celulares

disminuyó significativamente cuando se emplearon 25 µg/ml de ivermectina e Ivomec® (P<0,001) (Anexo II B y C, Tabla 1).

El análisis del IM mostró que la frecuencia de células en mitosis disminuyó de manera significativa a partir de concentraciones de 10 µg/ml para células CHO-K1 (P< 0,001) y de 5 µg/ml para células CCL-126 (P<0,01) respecto a los valores controles para los tratamientos durante 12 h tanto con ivermectina como con Ivomec® (Anexo II B y C, Tabla 1). Asimismo, la mayor inhibición en la actividad mitótica fue observada luego del tratamiento con 25 µg/ml de ivermectina e Ivomec® estimándose una disminución del 87% y 98% para los cultivos de células CHO-K1 y de un 94% y 80% en los cultivos de células CCL-126 (P<0,001), respectivamente (Anexo II B y C, Tabla 1). Ivermectina e Ivomec® ejercieron un marcado efecto citotóxico cuando ambas líneas celulares fueron expuestas a un rango de concentraciones de 50-250 µg/ml durante 12 h (Anexo II B y C).

Los resultados observados sobre líneas celulares establecidas luego de 24 h de exposición a ivermectina e Ivomec® mostraron que cuando 25 µg/ml y 10 µg/ml de ivermectina o Ivomec® fueron ensayados sobre células CHO-K1 y CCL-126, respectivamente, se observó una disminución significativa de la PCC (P<0,001) (Publicación II, Figura 2; Publicación IV, Figura 3, respectivamente). Concomitantemente, 25 µg/ml de ambos compuestos y sólo 10 µg/ml de ivermectina, promovieron una marcada reducción del IPC en células CHO-K1 (P<0,001) y CCL-126 (P<0,01), respectivamente, revelado por un alargamiento en el ciclo celular (Publicación II, Tabla 1; Publicación IV, Tabla 2). Ivermectina e Ivomec® ejercieron un marcado efecto citotóxico cuando ambas líneas celulares

fueron expuestas a un rango de concentraciones de 50-250 µg/ml durante 24 h (Publicación II, Figura 2; Publicación IV, Figura 3).

En lo referente al IM, cuando las células CHO-K1 y CCL-126 fueron expuestas durante 24 h a ivermectina e Ivomec[®], se observó una clara disminución de la actividad mitótica comparada con los respectivos valores controles (Publicación II, Tabla 1; Publicación IV, Tabla 2). Las células CHO-K1 tratadas con 1-10 y 1-5 µg/ml de ivermectina e Ivomec[®], respectivamente, evidenciaron un incremento en dicha actividad pero la misma no alcanzó valores significativos ($P < 0,05$). Un análisis de regresión reveló que dicho aumento resultó ser dependiente de las concentraciones de ivermectina ($r = 0,99$; $P < 0,001$) e Ivomec[®] ($r = 0,98$; $P < 0,001$) empleadas en los tratamientos (Publicación II, Tabla 1). Sin embargo, la concentración de 10 µg/ml de la formulación comercial indujo un incremento significativo del IM sobre valores controles ($P < 0,01$). Una marcada reducción de aproximadamente el 89% y 62% de la actividad mitótica fue observada en células CHO-K1 expuestas a 25 µg/ml de ivermectina e Ivomec[®], respectivamente ($P < 0,001$) (Publicación II, Tabla 1), mientras que una reducción del 98% y 94% de dicha actividad fue observada en células CCL-126 expuestas a la misma concentración de ambos compuestos ($P < 0,001$). Asimismo, la actividad mitótica de los cultivos de células CHO-K1 tratados con 25 µg/ml de ivermectina e Ivomec[®] disminuyó por debajo de los valores controles ($f = 1,00$) por una media de $f = 0,19 \pm 0,09$ y una media de $f = 0,57 \pm 0,54$, respectivamente ($P < 0,001$) (Publicación II, Tabla 1), mientras que los valores del IM para las células CCL-126 expuestas a la misma concentración de ivermectina e Ivomec[®], se vieron reducidos respecto al control ($f = 1,00$) por una media de $f = 0,03 \pm 0,01$ y una media de $f = 0,06 \pm 0,02$, respectivamente ($P < 0,001$) (Publicación IV, Tabla 2).

El efecto deletéreo ejercido por ivermectina e Ivomec® fue también cuantificado en linfocitos humanos de sangre periférica mediante el estudio de la PCC e IM (Anexo II A). Los cultivos celulares fueron tratados con concentraciones crecientes de 1-250 µg/ml de ambos compuestos durante 72 h. Los resultados pusieron de manifiesto que la PCC se vio significativamente alterada cuando concentraciones de 10-50 µg/ml de ambos compuestos fueron empleadas. Un aumento de la frecuencia de células en M₁ y una disminución de la frecuencia de células en M₂ y M₃ se observó cuando concentraciones de 10 (P<0,05), 25 (P<0,01) y 50 µg/ml (P<0,001) de ambos compuestos fueron empleadas, observándose a su vez, un alargamiento del ciclo celular claramente notorio con concentraciones de 50 µg/ml de Ivomec® (P<0,001) (Anexo II A, Figura 2). Asimismo, la PCC disminuyó de forma dependiente de la concentración, luego del tratamiento con ivermectina (r=0,88, P<0,001) e Ivomec® (r= 0,81, P<0,001), respectivamente (Anexo II A, Tabla 1). Concentraciones de 50-250 µg/ml de ambos compuestos exhibieron una elevada citotoxicidad evidenciada por la mortalidad de la población celular (Anexo II A, Figura 2). Por otra parte, el análisis del IM reveló una disminución significativa en dicho parámetro únicamente luego del tratamiento con 25 µg/ml de ivermectina (P<0,05). Una marcada reducción del 94% y 96% en el IM fue evidenciada cuando las células fueron expuestas a 50 µg/ml de ivermectina e Ivomec® durante 72 h (Anexo II A, Tabla 1). Asimismo, a dicha concentración los valores del IM disminuyeron por debajo de los valores controles ($f=1,00$) por una media de $f= 0,06 \pm 0,04$ y $f= 0,04 \pm 0,04$ cuando ivermectina e Ivomec®, fueron respectivamente ensayados (P<0,001) (Anexo II A, Tabla 1).

4.3. Evaluación del daño inducido en el ADN de líneas celulares establecidas mediante el empleo del ensayo cometa (EC): Publicaciones II y IV

El efecto deletéreo ejercido por ivermectina e Ivomec® sobre el ADN de líneas celulares establecidas (CHO-K1 y CCL-126) fue también cuantificado mediante el empleo del EC. Para ello, las células fueron expuestas a un rango de concentraciones de 5-50 µg/ml de ambos compuestos durante un pulso de 80 min.

Se evidenció un marcado efecto deletéreo en el ADN de células CHO-K1 manifestado por un aumento significativo en la proporción de células levemente dañadas cuando fueron utilizadas concentraciones de 5-50 µg/ml de ivermectina e Ivomec® ($P < 0,001$). Un incremento en la frecuencia de células dañadas, aunque no estadísticamente significativo, ($P > 0,05$) se observó cuando las células fueron expuestas a todas las concentraciones de ivermectina; sin embargo, sólo con 50 µg/ml de Ivomec® dicho incremento resultó ser estadísticamente significativo ($P < 0,05$). Ninguno de los compuestos empleados en los tratamientos indujo la aparición de células altamente dañadas. Un análisis de correlación reveló que la frecuencia de células dañadas se incrementó en función de la concentración de Ivomec® incorporada a los cultivos celulares ($r = 1$; $P < 0,05$), no existiendo correlación significativa para las células levemente dañadas ($r = 0,68$; $P > 0,05$) así como para las categorías de daño en función de las concentraciones de ivermectina empleadas ($P > 0,05$) (Publicación II, Tabla 2).

El daño en el ADN de las células CCL-126 tratadas con ivermectina e Ivomec® fue evidenciado por un incremento significativo en la proporción de células levemente dañadas ($P < 0,001$) cuando los cultivos fueron expuestos a 25-50 µg/ml de

ivermectina y a todas las concentraciones de Ivomec®. La frecuencia de células dañadas aumentó significativamente cuando 25-50 µg/ml ($P < 0,05$ y $P < 0,001$, respectivamente) de ivermectina y únicamente 50 µg/ml ($P < 0,01$) de Ivomec®, estuvieron presentes en los cultivos (Publicación IV, Tabla 1). Asimismo, un análisis de correlación mostró que la frecuencia de células levemente dañadas ($r = 0,97$) y dañadas ($r = 0,94$) se incrementó de manera dependiente de la concentración de ivermectina adicionada a los cultivos (Publicación IV, Tabla 1). Por otro lado, sólo la proporción de células dañadas se incrementó en función de la concentración de Ivomec® presente en los cultivos celulares ($r = 0,90$) (Publicación IV, Tabla 1). Ninguno de los compuestos empleados en los tratamientos indujo la aparición de células altamente dañadas.

Asimismo, se realizó un análisis de la migración del ADN mediante la medición del largo y el ancho de las imágenes observadas (Publicación II, Figura 5; Publicación IV, Figura 2). Todas las concentraciones de ambos compuestos ensayadas sobre células CHO-K1 y CCL-126 incrementaron de manera significativa los niveles de daño en el ADN ($P < 0,05$; $P < 0,001$, respectivamente) respecto a los valores controles. Además, se observó una correlación estadísticamente significativa entre el largo y el ancho de las imágenes observadas tanto en células CHO-K1 como CCL-126 para cada concentración ensayada (5-50 µg/ml, $P < 0,01$; $P < 0,001$, respectivamente) de ivermectina e Ivomec® (Publicación II, Figura 5; Publicación IV, Figura 2). Finalmente, en ambas líneas celulares, la viabilidad celular permaneció inalterada con todos los tratamientos ($P > 0,05$) (Publicación II, Tabla 2; Publicación IV, Tabla 1). Un análisis comparativo entre el nivel de daño introducido dentro de la población celular de las células CHO-K1 y CCL-126 permitió demostrar que las

células de mosquito fueron 2,3 veces más sensibles que las de hámster al efecto de ambos compuestos.

4.4. Evaluación de la cinética de reparación del daño inducido en el ADN cuantificado mediante el ensayo cometa (EC): Anexo II (D y E)

La capacidad de inducir y reparar lesiones introducidas en el ADN fue analizada en células CHO-K1 y CCL-126 previamente expuestas a 50 µg/ml de ivermectina e Ivomec® durante un pulso de tratamiento de 80 min. Dicha concentración fue seleccionada por su capacidad de inducir daño genómico en ambos tipos celulares, según lo observado en los análisis previos (Ver punto 4.3 del presente trabajo de Tesis Doctoral; Publicaciones II y IV). Luego del tratamiento con ambos compuestos, las células fueron lavadas y reincubadas en medio de cultivo en ausencia de ambos compuestos por períodos crecientes de 0 a 24 h hasta su procesamiento. El análisis mediante EC y viabilidad celular fue realizado inmediatamente después del tratamiento y con posterioridad al finalizar cada período de reincubación. Inmediatamente luego del tratamiento, tanto con ivermectina como con Ivomec® (0 h), se observó un incremento significativo de ADN dañado en un alto porcentaje de la población celular en ambas líneas celulares. Los resultados fueron concordantes con los previamente observados y detallados en el punto 4.3 de la presente Tesis Doctoral. En los tratamientos con ivermectina dicho daño fue evidenciado en células CHO-K1 por la presencia dentro de la población celular del 32% de células levemente dañadas ($P < 0,001$) mientras que para las células CCL-126 la proporción de daño incluyó un 50,6% y 32,6% de células levemente dañadas y dañadas,

respectivamente ($P < 0,001$). El tratamiento con Ivomec[®] indujo un 30% y un 62% de células levemente dañadas ($P < 0,001$) en cultivos de células CHO-K1 y CCL-126, respectivamente y un 10,6% de células dañadas sólo en células CCL-126 ($P < 0,001$). El aumento en la frecuencia de células dañadas presentó su máxima expresión al cabo de 1 h ($P < 0,001$) y 3 h ($P < 0,001$) de re-incubación en cultivos de células CCL-126 y CHO-K1, respectivamente. En ninguno de los tratamientos se observaron células altamente dañadas (Anexo II D y E, Figuras 1 y 2). A partir de dichos períodos de re-incubación y hasta las 24 h se evidenció un incremento significativo en la proporción de células no dañadas de manera tiempo dependiente tanto en los cultivos de células CHO-K1 ($P < 0,05$) como en los de células CCL-126 ($P < 0,001$) (Anexo II D y E, Figuras 1 y 2). Al cabo de 24 h del tratamiento inicial sobre células CCL-126, la frecuencia de células no dañadas, levemente dañadas y dañadas no difirió de manera significativa con respecto a los controles negativos ($P > 0,05$) (Anexo II E, Figuras 1 y 2). Sin embargo en lo referente a las células CHO-K1, la frecuencia de células no dañadas y levemente dañadas difirió de manera significativa con respecto a los controles negativos alcanzando valores medios de 70% y 30%, respectivamente ($P < 0,001$) (Anexo II D, Figuras 1 y 2).

El análisis morfológico de las figuras observadas en células de las líneas CHO-K1 y CCL-126, cuantificado como largo y ancho del ADN migrado en los cometas inducidos por ivermectina e Ivomec[®], indicó un incremento significativo del ancho y del largo de los cometas de las células tratadas durante 80 min con respecto a los valores controles negativos ($P < 0,001$). Luego del período de reparación, la cantidad de ADN migrado, medido como largo y ancho, no presentó variaciones significativas

con respecto a los valores controles negativos al cabo de 24 h de re-incubación en ambas líneas celulares ($P > 0,05$) (Anexo II D y E, Figuras 4 y 5).

El análisis de la viabilidad celular fue realizado al inicio del tratamiento y al finalizar cada período de re-incubación. Al tiempo 0 h no se evidenciaron diferencias significativas en la proporción de células vivas/muertas luego del tratamiento por 80 min con ivermectina e Ivomec® respecto a los valores controles negativos ($P > 0,05$) (Anexo II D y E, Figura 3). A partir de las 18 h de re-incubación en células CCL-126, se observó una leve disminución en la proporción de células viables ($P < 0,05$) (Anexo II E, Figura 3) tratadas sólo con ivermectina alcanzando valores de aproximadamente 80%. En células CHO-K1 se observó una disminución de la proporción de células viables (75%) a partir de las 6 h del tratamiento inicial ($P < 0,05$) con ivermectina e Ivomec® (Anexo II D, Figura 3). Los resultados evidenciaron que la viabilidad de los cultivos, tanto de células CHO-K1 como de células CCL-126, a partir del momento de menor viabilidad inducida por ambos compuestos, se mostró constante hasta las 24 h posteriores al tratamiento inicial.

4.5. Evaluación de la actividad lisosomal mediante el empleo del ensayo de rojo neutro (RN): Publicaciones II y IV

Las alteraciones en la integridad de la membrana celular de los lisosomas inducidas por ivermectina y su formulación comercial Ivomec®, fueron evaluadas sobre las líneas celulares establecidas CHO-K1 y CCL-126, mediante el ensayo de captación de RN luego de 24 h de tratamiento continuo, empleando concentraciones de 0,25-250 $\mu\text{g/ml}$ de ambos compuestos. DMSO (1%) y etanol (0,5%), fueron

empleados como control negativo y positivo, respectivamente. El tratamiento con 0,5% de etanol indujo una disminución significativa en la actividad lisosomal respecto a los valores controles en ambas líneas celulares ($P < 0,001$). Una pérdida en la actividad lisosomal fue evidenciada por una reducción significativa en la incorporación del RN cuando las células CHO-K1 y CCL-126 fueron expuestas a concentraciones de 0,25-250 $\mu\text{g/ml}$ y 1-250 $\mu\text{g/ml}$ del antihelmíntico, respectivamente ($P < 0,001$) (Publicación II, Figura 3 y Publicación IV, Figura 4). La disminución en la actividad lisosomal de las células CHO-K1 fue más notoria cuando los cultivos fueron expuestos a concentraciones de 25-250 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0,001$) respecto a concentraciones de 0,25-10 $\mu\text{g/ml}$ de ivermectina e Ivomec[®]. Un análisis de correlación evidenció que la caída de la actividad lisosomal de las células CCL-126 fue estadísticamente dependiente de las concentraciones de ivermectina ($r = 0,75$, $P < 0,01$) o su equivalente concentración de Ivomec[®] ($r = 0,57$, $P < 0,001$) incorporadas a los cultivos (Publicación IV, Figura 4). El mismo análisis estadístico realizado para células CHO-K1 reveló que la actividad celular disminuyó como una función de las concentraciones del antiparasitario únicamente en aquellos cultivos tratados con ivermectina ($r = 0,5$, $P < 0,05$) (Publicación II, Figura 3).

4.6. Evaluación de la actividad mitocondrial mediante el empleo del ensayo de MTT: Publicaciones II y IV

Las alteraciones en el metabolismo celular energético inducidas por ivermectina e Ivomec[®] fueron evaluadas mediante la estimación de la actividad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa empleando el ensayo de MTT. El

mismo fue realizado sobre células CHO-K1 y CCL-126 expuestas a concentraciones de 0,25-250 µg/ml de ivermectina y su formulación comercial Ivomec® durante 24 h de tratamiento continuo. DMSO (1%) y etanol (0,5%) fueron empleados como control negativo y positivo, respectivamente. Los resultados manifestaron una inhibición de la actividad enzimática evidenciada por una notable disminución en la capacidad de reducir el colorante MTT a derivado insoluble, el formazán, cuando las células de ambas líneas celulares fueron expuestas a 0,5% de etanol ($P < 0,001$). Iguales resultados fueron observados cuando las CHO-K1 fueron tratadas con todas las concentraciones tanto de ivermectina como de Ivomec® ($P < 0,001$) (Publicación II, Figura 4). Contrariamente, las células CCL-126 expresaron dicha reducción de la actividad enzimática cuando 10-250 y 1-250 µg/ml de ivermectina e Ivomec®, respectivamente, fueron adicionadas a los cultivos ($P < 0,001$) (Publicación IV, Figura 5). Un análisis de correlación puso de manifiesto que la reducción del metabolismo celular fue significativamente dependiente de las concentraciones de ivermectina e Ivomec® ensayadas sobre células CHO-K1 ($r = 0,65$, $P < 0,01$; $r = 0,62$, $P < 0,01$) y CCL-126 ($r = 0,63$, $P < 0,01$; $r = 0,53$, $P < 0,05$), respectivamente (Publicaciones II y IV, Figuras 4 y 5, respectivamente).

4.7. Evaluación de la frecuencia de micronúcleos (MN): Anexo II (F)

La Tabla 1 del Anexo II F muestra los resultados obtenidos a partir del análisis de la frecuencia de MN inducidos por el antiparasitario ivermectina y su equivalente formulado comercial Ivomec® en células CHO-K1 en presencia de citocalasina B y expuestas a concentraciones de 5-50 µg/ml durante 24 h de tratamiento continuo. La BLM (1 µg/ml) fue utilizada como control positivo para el presente ensayo. Los resultados observados revelaron que ni el principio activo ni su formulado comercial incrementaron significativamente la frecuencia de MN respecto a los valores controles ($P > 0,05$). Finalmente, no se evidenciaron modificaciones significativas en el índice de división nuclear (IDN) de las células CHO-K1 expuestas a ivermectina e Ivomec® (Anexo II F, Tabla 1).

5. DISCUSIÓN

Las investigaciones comprendidas en el presente trabajo de Tesis Doctoral proporcionan información acerca del efecto deletéreo ejercido por el antihelmíntico ivermectina y una de sus formulaciones comerciales conocida Ivomec[®], la cual es empleada de manera regular en medicina veterinaria en nuestro país. El posible efecto perjudicial de estos compuestos fue evaluado utilizando diferentes bioensayos de genotoxicidad y de citotoxicidad en sistemas de cultivo *in vitro* empleando líneas celulares establecidas y cultivos linfocitarios humanos. Asimismo, se analizó la capacidad de daño y reparación de lesiones inducidas por ambos compuestos en el ADN de células de mamíferos e insectos.

Los estudios concernientes a evaluar la capacidad de inducir daño genotóxico por la ivermectina y el Ivomec[®], fueron evaluados a nivel de la molécula de ADN y a nivel cromosómico en condiciones *in vitro* sobre las líneas celulares establecidas CHO-K1 y CCL-126 y en cultivos de linfocitos humanos. Para tal fin, los estudios de genotoxicidad comprendieron biomarcadores de efecto como el análisis de la frecuencia de ICHs y de MN y la detección de rupturas de cadena simple en el ADN mediante la variante alcalina del EC. Los resultados obtenidos revelaron que tanto la ivermectina como el Ivomec[®] no fueron capaces de incrementar la frecuencia de ICHs en ninguno de los sistemas celulares estudiados cuando los mismos fueron tratados con concentraciones de 1-250 µg/ml respecto a los valores controles (Publicaciones II y IV, Anexo II A, B y C). De manera similar, se observaron resultados negativos luego de evaluar la frecuencia de MN en células de la línea CHO-K1 (Anexo II F). Por el contrario, la capacidad deletérea ejercida por ambos

compuestos se vio reflejada en la inducción de rupturas de cadena simple en el ADN de células provenientes de las líneas celulares utilizadas como modelos de estudio. Asimismo, estudios posteriores demostraron que dichas lesiones de cadena simple inducidas en el ADN pueden ser reparadas luego de un período de recuperación de 24 h post-exposición a ivermectina o a Ivomec[®], al menos en los sistemas celulares empleados en el presente trabajo de tesis (Anexo II D y E).

En cuanto al análisis de la citotoxicidad se observó un marcado efecto tóxico ejercido tanto por ivermectina como por Ivomec[®]. En ambas líneas celulares establecidas así como en los cultivos de linfocitos humanos se observaron cambios significativos en la cinética de proliferación celular y en el índice mitótico (Publicaciones II y IV, Anexo II A, B y C). Asimismo, se evidenciaron diferentes tipos de alteraciones celulares, tanto en la integridad metabólica como en la estructural, manifestadas por una disminución significativa en la actividad mitocondrial y lisosomal, respectivamente. Del mismo modo, una disminución en la proporción de células viables confirmó el marcado efecto citotóxico inducido por ivermectina e Ivomec[®] en células CHO-K1 y CCL-126 (Publicaciones II y IV).

Es ampliamente conocido que la inducción de ICHs constituye uno de los biomarcadores de efecto más empleados para predecir el potencial genotóxico de un xenobiótico ya sea físico, químico o biológico (Carballo, M.A. *y col.*, 2006). Los ICHs constituyen la manifestación citológica de rupturas de la doble hélice del ADN y la posterior reorganización entre sitios homólogos de las dos cromátidas de un cromosoma. Dicho parámetro ha sido ampliamente utilizado para evaluar el potencial genotóxico de numerosos agentes con capacidad mutagénica, teratogénica y/o carcinogénica (Carrano, A.V. *y col.*, 1978; Carrano, A.V. *y col.*, 1979; Tucker, J.D.

y col., 1993; Wilson, D.M.R. y Thompson, L.H., 2007). Se ha postulado que a nivel molecular, la formación de ICHs estaría estrechamente vinculada con la formación de lesiones en la molécula de ADN así como con la manifestación de errores durante la replicación del material hereditario (Tucker, J.D. y col., 1993; Wilson, D.M.R. y Thompson, L.H., 2007). Estos autores, postularon que los ICHs ocurrirían por mecanismos de recombinación homóloga asociados a la replicación del ADN, donde dos cromátidas hermanas se rompen y se reúnen entre sí, intercambiando regiones físicas entre las hebras parentales en los cromosomas duplicados, fenómeno que involucra el colapso de la horquilla de replicación tras la lesión acontecida en el ADN de cadena simple (Tucker, J.D. y col., 1993; Valko, M. y col., 2006; Wilson, D.M.R. y Thompson, L.H., 2007).

Si bien el análisis de la frecuencia de ICHs representa un estimador válido para determinar la genotoxicidad de un compuesto, nuestras observaciones revelaron que la ivermectina y su formulado comercial Ivomec® fueron incapaces de incrementar la frecuencia de los mismos en todos los sistemas celulares estudiados (Publicaciones II y IV, Anexo II A). Estos resultados coinciden con los observados previamente por otros autores para el mismo principio activo en linfocitos humanos cultivados *in vitro*, indicando discrepancias entre la inducción-no inducción de ICHs (Aleksić, N. y Barjaktarović, N., 1993; Aleksić, N. y col., 1996).

Nuestros resultados fueron obtenidos luego de realizar un tratamiento continuo de 24 y 72 h en presencia de ivermectina o Ivomec® donde dicho lapso es el requerido para que las células CHO-K1 y CCL-126 y las células linfocitarias realicen dos ciclos celulares, respectivamente. Este supuesto no sólo fue evidenciado por la proporción de células en segunda división contabilizadas al momento de la

cosecha, sino también por las observaciones reportadas previamente en la bibliografía, al menos para células CHO-K1 (González Cid, M. y Larripa, I., 1994; Bolzán, A.D. *y col.*, 2000; Soloneski, S. *y col.*, 2002; Soloneski, S. *y col.*, 2003; Carballo, M.A. *y col.*, 2006; González, N.V. *y col.*, 2007; Soloneski, S. *y col.*, 2008) y linfocitos humanos de sangre periférica (González Cid, M. y Larripa, I., 1994; Soloneski, S. *y col.*, 2001; Carballo, M.A. *y col.*, 2006; Soloneski, S. *y col.*, 2007). Sin embargo, otros investigadores observaron que en células CCL-126 la mayor frecuencia de células en segunda división acontece luego de un período de cultivo de 48 h posterior a la incorporación del análogo de base BrdU (Mukherjee, A.B. *y col.*, 1986; Bianchi, N.O. *y col.*, 1988; Wei, L.Y. *y col.*, 1993; Bolzán, A.D. *y col.*, 2000). Es posible que las discrepancias observadas entre nuestros resultados y las reportadas por otros autores pudieran ser debidas a diferencias relacionadas con las líneas celulares en estudio, a variaciones en los medios de cultivo empleados, y/o a condiciones de de cultivo y laboratorio heterogéneas, entre otras causales.

Para explicar la no inducción de ICHs luego del tratamiento con ivermectina o Ivomec® en todos los tipos celulares por nosotros estudiados, podrían sugerirse algunas posibles explicaciones que básicamente estarían relacionadas con las condiciones de cultivo celular empleadas en estos estudios. Entre ellas pueden incluirse, a) la pérdida celular selectiva por muerte de aquellas células más dañadas durante el primer ciclo celular, donde únicamente las células no dañadas fueron capaces de duplicarse durante dos o más ciclos celulares consecutivos en presencia del análogo de base BrdU; b) la incapacidad de las células dañadas de proliferar y realizar un segundo ciclo de duplicación en presencia del análogo de base BrdU; y/o c) una dilución exponencial del daño debido a la división celular si tenemos en

cuenta que el efecto deletéreo inducido por ambos compuestos aconteciera solamente durante el primer ciclo celular pero no durante el segundo ciclo. Además, no se podría descartar la posibilidad de que tanto las células de mamífero como las de insecto pudieran ser capaces de reparar totalmente el daño inducido por ivermectina e Ivomec® durante el segundo ciclo celular.

En función de lo previamente expuesto, y para evitar subestimar la acción del principio activo ivermectina y su formulado Ivomec®, se llevaron a cabo estudios que consistieron en la incorporación de BrdU al inicio de los cultivos y la exposición con ivermectina e Ivomec® durante el último ciclo celular permitiendo a cada tipo celular realizar sólo un ciclo celular en presencia de los compuestos en estudio. Sin embargo, llamativamente, tanto las células CHO-K1 como las CCL-126 no incrementaron la frecuencia de ICHs en relación a los valores controles luego de ser expuestas a ambos compuestos durante el último de los dos ciclos celulares de cultivo (Anexo II B y C, Figura 1).

Nuestros resultados claramente revelaron que cuando las células CHO-K1 fueron expuestas durante 12 h a 25 µg/ml de ivermectina e Ivomec® no fue posible analizar dicho parámetro dada la marcada disminución de células en segunda división (Anexo II B, Figura 1). Sin embargo, cuando las células fueron tratadas con la misma concentración de ambos compuestos durante 24 h, únicamente la ivermectina disminuyó la proporción de células en segunda división (Publicación II, Figura 1). Contrariamente, cuando 25 µg/ml de ivermectina e Ivomec® fueron adicionados a las células CCL-126 durante 12 y 24 h se observaron resultados exactamente opuestos a los hallados en células CHO-K1. Una reducción de células en M₂ inducida sólo por ivermectina (Anexo II C, Figura 1) y el mismo efecto

causado por ambos compuestos (Publicación IV, Figura 1), imposibilitó el análisis de ICHs luego de que los cultivos sean expuestos a 12 y 24 h del antiparasitario, respectivamente. Por este motivo, las premisas postuladas previamente (a, b y c) como posibles explicaciones de la ausencia de inducción de ICHs por parte de ivermectina o Ivomec® podrían ser descartadas. Hasta el presente, si bien se desconocen los efectos causales de nuestras observaciones, sólo es factible concluir que el antiparasitario debería ser considerado como un agente no inductor de ICHs. Estos resultados concuerdan con los observados para otros compuestos, como es el caso del antibiótico amoxicilina, que no incrementa la frecuencia de ICHs en linfocitos humanos cultivados *in vitro* en presencia o ausencia de un sistema de activación metabólica (Istifli, E.S. y Topaktaş, M., 2010), así como el insecticida propargite en células vegetales *in vivo* luego del tratamiento con los fungicidas fenarimol e iprodiona (Gadeva, P. y Dimitrov, B., 2008).

Por otra parte, nuestras investigaciones revelaron que el nivel basal de ICHs en las células CCL-126 fue de aproximadamente 0,33 veces menor que el de células CHO-K1 (Mukherjee, A.B. *y col.*, 1986; Bianchi, N.O. *y col.*, 1988; Bolzán, A.D. *y col.*, 2000). Este fenómeno ha sido tratado de ser explicado sobre la base de las diferencias en la cantidad de ADN celular entre ambas líneas celulares, considerando que el nivel basal de ICHs de un tipo celular determinado es proporcional al número de pares de bases del ADN del genoma diploide de la especie en estudio de la cual provienen las células (Kato, H., 1977). Estas observaciones podrían ser explicadas asimismo desde otros ámbitos. Es conocido que la frecuencia de ICHs es directamente proporcional a la concentración de BrdU incorporado en el genoma durante el primer ciclo de replicación de una célula en su presencia, y a que los

mismos se originan antes que ocurra el segundo período S como consecuencia de la replicación de la hebra de ADN sustituida con BrdU. Por otro lado, es conocido también el hecho que la BrdU es *per se* un inductor de ICHs (Kato, H., 1974; Perry, P. y Wolff, S., 1974; Kato, H., 1977; Gatti, M. *y col.*, 1979; Wilson, D.M.R. y Thompson, L.H., 2007). De esta manera, podría pensarse que las células CCL-126 son más resistentes que las células CHO-K1 a la incorporación de BrdU y por ende, presentarían una frecuencia basal de ICHs menor que las células CHO-K1.

Una explicación alternativa a las diferencias halladas entre las frecuencias basales de ICHs observadas entre ambos tipos celulares (CHO-K1 y CCL-126) podría deberse a la elevada concentración del tripéptido glutatión en su forma reducida (GSH). El GSH es el principal antioxidante no enzimático multifuncional que se encuentra en elevadas concentraciones intracelulares (Kato, H., 1977), y es uno de los mecanismos de resistencia más importantes y versátiles en la protección de macromoléculas celulares, como el ADN, contra diferentes tipos de xenobióticos (Watson, W.P. *y col.*, 2004; García-Rubio, L. *y col.*, 2005). El GSH actúa como co-factor de varias enzimas detoxificantes, entre ellas la glutatión transferasa y la glutatión peroxidasa, capaces de detoxificar el H₂O₂ y los lipoperóxidos mediante el barrido de radicales OH· y oxígeno singlete (O₂^{·-}) (Valko, M. *y col.*, 2006). Asimismo, el GSH puede detoxificar radicales libres por vía no enzimática participando en la detoxificación de drogas con grupos funcionales que reducen parcialmente al oxígeno molecular (Valko, M. *y col.*, 2006). El glutatión oxidado resultante es acumulado en el interior celular otorgando una medida del estrés oxidativo de un organismo (Valko, M. *y col.*, 2006). Wei y colaboradores (Wei, L.Y. *y col.*, 1993) demostraron que el tratamiento con BrdU incrementa las concentraciones de GSH

en células CCL-126, pero disminuye su estado de equilibrio en las células CHO-K1. Por otra parte, se ha sugerido que un alto contenido celular de GSH sería responsable de que la cromatina sustituida con BrdU de las células CCL-126 presente una mayor resistencia a la degradación del ADN por xenobióticos que aquella presente en las células CHO-K1 (Bianchi, N.O. y López-Larrazza, D.M., 1991). En la actualidad, no hay datos experimentales precisos que nos permitan determinar cuál de las posibilidades previamente mencionadas puedan ser las responsables del presente fenómeno. Sin embargo, nuestras observaciones inherentes a la mayor resistencia que muestran las células de mosquito ante el tratamiento tanto con ivermectina como con Ivomec[®], evaluado mediante estimación de la viabilidad celular, avalarían este último postulado.

Por otra parte, nuestras investigaciones revelaron la capacidad de ivermectina e Ivomec[®] de inducir rupturas de cadena simple en el ADN celular de las dos líneas celulares establecidas empleadas en nuestros estudios, las cuales fueron evaluadas mediante el empleo de la metodología del ensayo cometa. Ambos compuestos fueron eficaces en la inducción de lesiones en el ADN de células CHO-K1 y CCL-126 evidenciadas a través de la presencia de células dañadas junto a un incremento en la proporción de ADN migrado (Publicación II, Tabla 2 y Figura 5; Publicación IV, Tabla 1 y Figura 2, respectivamente). Luego de un pulso de 80 min con ambos compuestos, todas las concentraciones (5-50 µg/ml) incrementaron de manera significativa la frecuencia de células CHO-K1 levemente dañadas y solo 50 µg/ml de Ivomec[®], indujo un aumento en la frecuencia de células dañadas respecto a los valores controles negativos (Publicación II, tabla 2). Resultados similares fueron también observados en células CCL-126 luego de 80 min de exposición a ambos

compuestos (Publicación IV, Tabla 1 y Figura 2), donde solamente las concentraciones superiores de ivermectina (25-50 $\mu\text{g/ml}$) e Ivomec[®] (50 $\mu\text{g/ml}$) indujeron un incremento significativo de células dañadas respecto a los valores controles negativos (Publicación IV, tabla 1). Por otro lado, luego de que las células CHO-K1 y CCL-126 fueran expuestas a un pulso de 80 min con 50 $\mu\text{g/ml}$ de ambos compuestos y posteriormente re-incubadas en ausencia de los mismos durante un período de 24 h, se observó que las lesiones introducidas en el ADN fueron reparadas en una gran proporción de células en ambas líneas celulares utilizadas (Anexo II D y E, Figuras 1 y 2). Estos resultados confirman lo previamente descrito por nosotros (Molinari, G. *y col.*, 2009; 2010), demostrando que tanto ivermectina como Ivomec[®] inducen un incremento en la frecuencia de células levemente dañadas y dañadas dado por un aumento significativo en los patrones de migración del ADN (Anexo II D y E, Figuras 1-2, 4-5).

Estos hallazgos constituyen la primera evidencia experimental concreta respecto de la inducción de daño genómico ejercido por lactonas macrocíclicas en células de líneas celulares establecidas evaluado mediante la metodología del ensayo cometa. Hasta el presente, sólo pueden ser mencionados los estudios previos realizados por Gordon *et al.* (1982) en hepatocitos de ratas expuestas al compuesto abamectina, forma activa de la ivermectina (avermectina B1a), en condiciones *in vitro* mediante la metodología de elución alcalina (Gordon, L.R. *y col.*, 1982).

En lo referente al análisis de la viabilidad celular luego de 80 min de tratamiento con ivermectina o Ivomec[®], los resultados indicaron la ausencia de muerte celular en ambas líneas celulares empleadas (Publicaciones II y IV, Tabla 2 y Tabla 1, respectivamente). La ausencia de células muertas se correlaciona

directamente con la ausencia de células altamente dañadas siguiendo los criterios de la clasificación morfológica propuesta por Lebailly y colaboradores para los diferentes tipos de cometas observados (Lebailly, P. y col., 1997) (Publicaciones II y IV, Tabla 2 y Tabla 1, respectivamente). Los resultados de la viabilidad celular ponen de manifiesto que aún las concentraciones superiores empleadas (50 µg/ml) no indujeron citotoxicidad inmediata al cabo de un pulso breve de tratamiento. Contrariamente, cuando las células fueron cultivadas en presencia de las mismas concentraciones pero durante un lapso de 24 h el efecto citotóxico fue evidentemente mayor (Publicaciones II y IV, Figura 1). Estos resultados serían concordantes con hallazgos previos demostrando el efecto citotóxico generado por el antiparasitario tanto *in vivo* en médula ósea de rata (el-Nahas, A.F. y el-Ashmawy, I.M., 2008) como *in vitro* en línea celular de riñón de cerdo IB-RS-2 en ausencia de un sistema de activación metabólica (La R. Rodrigues, M.A. y Mattei, R., 2006).

Hasta el presente, el/los mecanismo/s mediante el/los cuales la ivermectina induce daño en el ADN no ha/n sido aún esclarecido/s. Según lo reportado por algunos investigadores, las lesiones inducidas por especies reactivas de oxígeno (ERO) en el ADN de células de mamíferos cultivadas *in vitro* y analizadas mediante el ensayo cometa serían reparadas en un corto período de tiempo que no superaría los 30 min post-exposición (Olive, P.L. y col., 1990; Fortini, P. y col., 1996). En función de ello, la posibilidad de que las lesiones introducidas en el ADN por ivermectina o Ivomec® se deban a la formación de ERO podría ser en parte descartada, ya que nuestros resultados demostraron que aproximadamente el 50% de las células CCL-126 y CHO-K1 al cabo de 3 y 12 h post-exposición, respectivamente, fueron capaces de comenzar a reparar su ADN dañado. Más aún,

nuestras observaciones demostrarían que las células de insecto necesitaron de por lo menos 12 h para reparar las lesiones introducidas en su ADN. Por el contrario, este lapso fue insuficiente para permitir que las células de hámster alcancen dicho estado de reparación.

Teniendo en cuenta la cinética de daño y reparación observada en ambas líneas celulares luego del tratamiento con ivermectina e Ivomec[®], otra posible hipótesis para la explicación del daño inducido por ivermectina podría ser mediante un mecanismo de alquilación de bases como por ejemplo, metilaciones en la molécula de ADN. Estudios previos reportados por Fortini y colaboradores (Fortini, P. *y col.*, 1996) han señalado que células provenientes de la línea celular CHO tratadas con diferentes agentes alquilantes fueron capaces de reparar las lesiones de cadena simple en el ADN luego de un período de 24 h post-exposición. Nuestros resultados concuerdan en parte con este tipo de cinética de daño y reparación debido a que al cabo de dicho periodo de incubación las células CHO-K1 por nosotros empleadas no fueron capaces de reparar totalmente el daño inducido en su ADN por ambos compuestos.

Nuestros resultados pusieron en evidencia mediante la metodología del ensayo cometa que la población de células dañadas por ivermectina e Ivomec[®], independientemente del tipo celular, no recuperaron totalmente la morfología nuclear respecto de las células controles luego de transcurridas 24 h de un pulso breve. Aún al finalizar el período post-exposición de 24 h, el diámetro de los núcleos celulares se mantuvo ligeramente mayor al observado en las células controles. Este fenómeno ha sido previamente observado por Fortini y colaboradores (Fortini, P. *y col.*, 1996) analizando la morfología de células CHO

luego de reparar el daño inducido en el ADN por rayos X y agentes alquilantes. Estos autores sugirieron que estas discrepancias morfológicas en lo referente al diámetro nuclear podrían deberse a diferencias en el empaquetamiento del ADN en células sometidas a un proceso de reparación de su material genético (Fortini, P. *y col.*, 1996). Asimismo, observaciones similares han sido reportadas previamente por nuestro grupo de investigación en estudios empleando células CHO-K1 después de reparar el daño introducido en el ADN por el herbicida 2,4-D (González, M. *y col.*, 2005). En síntesis y por todo lo expuesto, la metodología del ensayo cometa fue un estimador sensible en la detección de daño inducido por ambos compuestos, así como también fue eficaz para evaluar la capacidad de reparación de dichas lesiones, independientemente del tipo celular empleado. Observaciones previas de otros grupos de investigación avalan este enunciado, demostrando el uso de este bioensayo como una herramienta válida y altamente sensible para poner en evidencia diferentes tipos de agentes capaces de introducir lesiones de cadena sencilla en el ADN celular eucariota (Collins, A.R., 2004; Neri, M. *y col.*, 2006; Keretsetse, G.S. *y col.*, 2008; Valverde, M. y Rojas, E., 2009; Hovhannisyan, G.G., 2010).

Hasta el presente, ha sido bien documentado que una de las respuestas celulares más importantes en condiciones tanto *in vitro* como *in vivo* después de la exposición a sustancias químicas (Galloway, S.M. *y col.*, 1987; McCollum, G. *y col.*, 2005), radiaciones ionizantes (Chatterjee, A. y Raman, M.J., 1993; Maity, A. *y col.*, 1994; Bristow, R.G. *y col.*, 1996) y/o diferentes tipos de agentes clastogénicos (Galloway, S.M. *y col.*, 1987; Olivera, P.A. *y col.*, 2007) es la inhibición o retardo en la progresión del ciclo celular. Nuestras observaciones revelaron que tanto la

ivermectina como el Ivomec® prolongaron de manera significativa el tiempo medio de duración del ciclo celular en células CHO-K1 y CCL-126 cuando éstas fueron expuestas a ambos compuestos durante 12 y 24 h (Anexo II B y C; Publicaciones II y IV, respectivamente). Los cultivos celulares expuestos tanto al principio activo como a su formulado comercial exhibieron una significativa disminución en el IM y el IPC cuando concentraciones de 25 y 10 µg/ml fueron ensayadas en células CHO-K1 y CCL-126, respectivamente (Publicaciones II y IV). Similarmente, cuando ambas líneas celulares fueron expuestas durante 12 h a dichos compuestos, una disminución de dichos parámetros celulares pudo ser evidenciada a concentraciones aún menores (10 y 5 µg/ml para células CHO-K1 y CCL-126, respectivamente) respecto a lo observado previamente en las publicaciones II y IV (Anexo II B y C). Es importante remarcar que tanto el IM como el IPC son también considerados como otros dos biomarcadores informativos y confiables relacionados con la evaluación de la cinética de proliferación y citotoxicidad celular (Herrera, L.A. *y col.*, 1991; Carballo, M.A. *y col.*, 2006). Avalando nuestros resultados, el-Ashmawy y colaboradores (el-Ashmawy, I.M. *y col.*, 2011) demostraron que la ivermectina induce una disminución del IM en células de la médula ósea de ratas adultas expuestas.

Nuestros resultados ponen de manifiesto que tanto ivermectina como su formulado comercial inducirían efectos citotóxicos a menores concentraciones cuanto más breve es el tiempo de exposición a los mismos. Es posible que la acción diferencial ejercida por ivermectina e Ivomec® en relación al tiempo de exposición en los cultivos celulares pueda ser explicada mediante tres de los posibles supuestos sugeridos previamente para los estudios de las frecuencias de ICHs, a saber: a) pérdida celular selectiva por muerte de células dañadas durante el primer ciclo

celular, donde sólo las células no dañadas fueron capaces de alcanzar el estado de M_2 y b) la incapacidad de las células severamente dañadas de proliferar y realizar un segundo ciclo; ambos supuestos nos permitirían explicar por qué cuando las células CHO-K1 y CCL-126 son expuestas a ivermectina e Ivomec[®] durante 24 h (aproximadamente el tiempo necesario para que las mismas realicen dos ciclos celulares), observemos una disminución significativa en el IM y el IPC a concentraciones superiores que las evidenciadas cuando dichas líneas celulares son expuestas durante 12 h (aproximadamente el lapso requerido para permitir que las mismas realicen un ciclo celular). Asimismo, podría inferirse que la alteración significativa de dichos parámetros en función del tiempo de exposición a ivermectina e Ivomec[®] (12 o 24 h), estaría ampliamente sustentado por el tercero de los supuestos, donde se sugiere el efecto de una dilución exponencial del daño debido a la división celular sólo si el efecto deletéreo inducido por ambos compuestos tiene lugar durante el primero, pero no durante el segundo ciclo celular. Este último supuesto avalaría nuestras observaciones evidenciadas en los estudios de citotoxicidad independientemente de la línea celular empleada (Publicaciones II y IV; Anexo II B y C).

Los resultados también demostraron la capacidad de la ivermectina y el Ivomec[®] de inhibir el crecimiento celular cuantitativamente analizado mediante los ensayos colorimétricos de RN y MTT en ambas líneas celulares. Según estos estudios podría sugerirse que el/los efecto/s nocivo/s de la ivermectina o sus metabolitos (si los mismos fueran reactivos) parecería/n estar implicado/s en la alteración de la cinética de proliferación celular (Publicaciones II y IV).

Un hecho que merece ser destacado es el comportamiento peculiar observado en la actividad mitótica de las células CHO-K1 luego del tratamiento con ambos compuestos (Publicación II). A pesar de la tendencia a la disminución del IM observada en los cultivos celulares en función de las concentraciones crecientes de ivermectina o Ivomec[®] pudimos observar que, cuando las células eran tratadas con bajas concentraciones de ambos compuestos (1-5 µg/ml), la actividad mitótica fue mayor que la observada en los cultivos controles. Más aún, cabe destacar que 10 µg/ml de ambos compuestos promovieron una actividad mitótica ligeramente superior a los respectivos controles negativos. Por otra parte, a partir del tratamiento con 25 µg/ml de ivermectina e Ivomec[®] se observó una marcada reducción en el IM. A concentraciones superiores dicho parámetro no pudo ser cuantificado debido a la elevada citotoxicidad presente en el sistema de cultivo. Es de destacar, como hemos mencionado anteriormente, que efectos citotóxicos similares se observaron cuando se analizaron aspectos generales del metabolismo celular mediante el estudio de la actividad lisosomal y el metabolismo energético a nivel mitocondrial luego del tratamiento *in vitro* con ivermectina e Ivomec[®] (Publicación II).

Varios investigadores han reportado que los agentes xenobióticos sean tanto físicos, químicos o biológicos - entre ellos antibióticos y plaguicidas - pueden presentar propiedades y modos de acción muy diferentes a lo esperable cuando éstos son empleados a bajas concentraciones en relación a concentraciones superiores (Calabrese, E. y Baldwin, L.A., 2002; Calabrese, E. y Baldwin, L.A., 2003; Calabrese, E.J. y Baldwin, L.A., 2003; Calabrese, E.J. y Baldwin, L.A., 2003; Davies, J. *y col.*, 2006; Calabrese, E.J., 2008). Este fenómeno de respuesta diferencial a diferentes concentraciones de un xenobiótico es conocido con el término de

hormesis (Calabrese, E.J. y Baldwin, L.A., 2003). El mismo se caracteriza por manifestarse con un efecto estimulante a bajas concentraciones e inhibitorio a altas concentraciones. Dicho mecanismo representa un fenómeno de relación entre la dosis y la respuesta y ha sido frecuentemente observado en estudios previamente diseñados, resultando independiente de los agentes fisicoquímicos, el modelo biológico y el objetivo de evaluación propuesto (Calabrese, E.J. y Baldwin, L.A., 2003). Este concepto se suele representar gráficamente como una curva dosis-respuesta en forma de “J” o “U invertida” (Calabrese, E.J. y Baldwin, L.A., 2003; Calabrese, E.J., 2008). Por lo antes expuesto, y en función de nuestras observaciones en células CHO-K1 luego de los distintos tratamientos con ivermectina e Ivomec[®], no podría descartarse que un fenómeno hormético aconteciera. Nuestros resultados inherentes a las variaciones observadas básicamente en el IM, la actividad lisosomal y la mitocondrial puestas de manifiesto en células CHO-K1 luego de 24 h de exposición al antihelmíntico evidenciaron una curva de concentración-respuesta semejante al modelo antes mencionado (Publicación II).

Asimismo, nuestros resultados ponen de manifiesto que la ivermectina en su estado puro sería más activa que su formulación comercial Ivomec[®], en la inducción de citotoxicidad en células de mamíferos e insectos, al menos para las células CHO-K1 y CCL-126. En todas nuestras observaciones fue factible encontrar un mayor efecto citotóxico luego del tratamiento con ivermectina respecto a la equivalente concentración de Ivomec[®] (Publicaciones II y IV; Anexo II A, B y C). Por lo tanto, existiría la posibilidad que la concentración de ivermectina presente en la formulación comercial pueda ser inferior al 1% como lo fuera indicado por el productor, y de esta forma poder explicarse nuestros hallazgos. Sin embargo, la

posibilidad que en la composición del excipiente de la formulación comercial se incluyera algún compuesto que minimice el efecto deletéreo del principio activo no debe ser desestimada. Lamentablemente, la identidad de los componentes del formulado Ivomec® no fue puesta a nuestra disposición por la empresa fabricante del mismo.

Hasta el presente, los conocimientos acerca del posible potencial genotóxico y/o citotóxico de la ivermectina son escasos y fragmentarios. Pocos son los datos que se conocen sobre sus efectos, ya sean sobre el organismo vector (generalmente un invertebrado) como sobre los humanos, en los cuales el compuesto es empleado para prevenir innumerables tipos de parasitosis (Soboslay, P.T. *y col.*, 1992; Amazigo, U., 1999; Sturchio, J.L., 2001; Rodríguez Pérez, M. *y col.*, 2006). Sin embargo, existe una amplia gama de estudios realizados *in vivo* destinados a evaluar la forma de administración (Vieira, J.C. *y col.*, 2007; González Canga, A. *y col.*, 2008), las diferentes dosis terapéuticas dependiendo del parásito en cuestión y del vertebrado hospedador (Zaha, O. *y col.*, 2002; Enk, C.D., 2006; Lifschitz, A. *y col.*, 2007; Borgsteede, F.H.M. *y col.*, 2008), la sensibilidad del invertebrado a la droga (Intapan, P.M. *y col.*, 2006) y las posibles resistencias de estos últimos a la misma (Kane, N.S. *y col.*, 2000; Fiel, C.A. *y col.*, 2001; Anziani, O.S. y Guglielmone, A.A., 2005; Entrocasso, C. *y col.*, 2008). En lo que respecta a la salud humana, ha sido evaluada la actividad de la ivermectina como un potente inhibidor de la propagación de células tumorales (Korystov, Y.N. *y col.*, 2004) y su potencial de acción cuando es administrada conjuntamente con otras drogas terapéuticas (Amsden, G.W. *y col.*, 2007). Cabe señalar, que recientemente, fue identificado un tipo de citocromo como la enzima responsable del metabolismo de la ivermectina por parte de microsomas

hepáticos (González Canga, A. *y col.*, 2009). Por otra parte, en estudios *in vitro* empleando células provenientes de riñones de cerdo (línea celular IB-RS-2) y células CHO expuestas a diferentes concentraciones de ivermectina y mantenidas en un medio de cultivo suplementado con un suero sustituto, se observó una clara inhibición en el crecimiento celular dependiente de la concentración del antiparasitario. Asimismo, dicha inhibición se vio incrementada en presencia del suero sustituto respecto al utilizado regularmente (La R. Rodrigues, L.A. y Mattei, R., 1987). Posteriormente, el mismo grupo de investigación reportó una disminución en la síntesis de proteínas y en la utilización de glucosa (La R. Rodrigues, M.A. y Mattei, R., 2006), así como también una disminución en la actividad enzimática de la lactato deshidrogenasa en células IB-RS-2 expuestas a ivermectina (La R. Rodrigues, M.A. y Mattei, R., 2006). Se conoce que la actividad de la lactato deshidrogenasa es inhibida por diferentes tipos de xenobióticos como el agente quelante de Ca^{+2} EDTA, el plaguicida disulfiram y su principal metabolito el dietilditiocarbamato (Gupta, R.C. *y col.*, 1991).

Hasta el presente, el mecanismo mediante el cual la ivermectina ejerce su acción citotóxica, no ha podido ser dilucidado. Estudios recientes llevados a cabo por Sharmeen (Sharmeen, S., 2010) mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* pusieron de manifiesto y confirmaron lo previamente expuesto por Korystov y colaboradores (Korystov, Y.N. *y col.*, 2004), resaltando la efectividad del empleo de ivermectina como droga para la terapia contra el cáncer, específicamente contra la leucemia mieloide aguda. Estos resultados manifestaron una elevada citotoxicidad por parte de la ivermectina evidenciada por un incremento en la mortalidad de la población de células leucémicas en los pacientes tratados (Sharmeen, S., 2010). En dicho trabajo

se puso de manifiesto un incremento en los niveles de ERO en las células tumorales tratadas con ivermectina en relación a los niveles basales presentados por las células no tratadas y se postuló que la ivermectina estaría induciendo un efecto citotóxico en las células cancerígenas mediante el ingreso del ión cloruro a la célula, causando hiperpolarización de la membrana y en consecuencia un aumento de los niveles intracelulares de ERO (Sharmeen, S., 2010).

Finalmente, nuestros resultados demostraron la inefectividad de la ivermectina en inducir MN en células CHO-K1. Sin embargo, resultados positivos empleando el mismo biomarcador de efecto fueron recientemente encontrados cuando linfocitos de búfalo de río fueron expuestos al antiparasitario (El-makawy, A.I. y Mahrous, K.F., 2008) o en eritrocitos de cordón umbilical de fetos de ratas expuestas *in vivo* (el-Ashmawy, I.M. y col., 2011). Nuestros resultados son evidentemente contradictorios con los observados por los últimos autores. Pueden postularse varias y posibles causas para explicar estas discrepancias. Entre las mismas podrían incluirse diferentes geno/citosensibilidades entre las células empleadas como modelo de estudio, variaciones en las condiciones de cultivo incluyendo la presencia de un sistema de activación metabólica, entre otras, factores ampliamente reconocidos como moduladores de la frecuencia de daño ejercido por un mismo xenobiótico.

Si bien hasta el presente, la EPA no ha realizado las evaluaciones pertinentes para definir el perfil toxicológico de la ivermectina a fin de expedirse sobre su categorización, existen antecedentes previos que indican que este grupo de antibióticos semisintéticos debería formar parte de los compuestos a ser categorizados por la mencionada Institución en un futuro próximo. Avalando este

hecho, cabe mencionarse que un único miembro de las avermectinas, la abamectina, ha sido clasificada como un plaguicida clase II con moderados efectos tóxicos para las especies vivientes (<http://www.epa.gov/EPA-IMPACT/i22182.htm>, 2004). Por todo lo expuesto, la necesidad de una recategorización de la ivermectina como un compuesto de leve actividad genotóxica pero altamente citotóxica es un hecho que debe ser considerado de manera imperiosa.

Como hemos mencionado antes, hasta el momento las Agencias de regulación internacional así como el SENASA a nivel nacional, no han evaluado, o al menos no han definido, el potencial mutagénico, carcinogénico y/o teratogénico de la ivermectina y por ende, el riesgo de su empleo masivo.

CONSIDERACIONES FINALES

Teniendo en cuenta los objetivos planteados y los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral podemos llegar a las siguientes consideraciones finales:

- El antiparasitario de amplio espectro ivermectina y una de sus formulaciones comerciales empleadas en el sistema pecuario argentino, Ivomec[®], son capaces de introducir rupturas de cadena simple en el ADN de células de mamíferos (CHO-K1) e insectos (CCL-126) evaluadas y cuantificadas mediante el ensayo cometa (Publicación II y IV).

- Ambas líneas celulares utilizadas son capaces de reparar las lesiones de cadena simple introducidas en el ADN por ivermectina e Ivomec[®]. Sin embargo, las células de insecto resultan ser más eficaces en reparar el daño inducido en su material genético respecto de las células de hámster, según lo observado mediante la variante alcalina del ensayo cometa (Anexo II D y E).

- El principio activo, ivermectina, al igual que su formulado comercial, Ivomec[®], no son agentes inductores de intercambios de cromátidas hermanas. Independientemente del tiempo de exposición a ambos compuestos, los mismos no modificaron significativamente dicho parámetro tanto en líneas celulares establecidas como en linfocitos

humanos de sangre periférica cultivados *in vitro* (Publicaciones II y IV; Anexo II A, B y C).

- Tanto el principio activo ivermectina como su formulado Ivomec® son compuestos no inductores de micronúcleos, al menos en células CHO-K1 (Anexo II E).

- Ambos compuestos, ivermectina e Ivomec®, produjeron alteraciones en la cinética de proliferación celular evidenciada por un alargamiento del ciclo celular y una disminución en la actividad mitótica tanto en líneas celulares establecidas (CHO-K1 y CCL-126) como en linfocitos humanos cultivados *in vitro*, independientemente del tiempo de exposición ensayado (Publicaciones II y IV; Anexo II A, B y C).

- Las líneas celulares CHO-K1 y CCL-126 muestran una sensibilidad diferencial al efecto deletéreo inducido por ivermectina e Ivomec® en lo referente a la cinética de proliferación celular. Dicha capacidad resultó ser diferencial de acuerdo al tipo celular y a los sistemas de cultivo empleados. Los cultivos de ambas líneas celulares establecidas manifestaron una mayor sensibilidad a ambos compuestos que los cultivos de linfocitos humanos. A su vez, las células CHO-K1 reflejaron ser más sensibles los mismos que las células de insecto CCL-126 (Publicaciones II y IV; Anexo II A, B y C).

- Ivermectina e Ivomec® indujeron una reducción significativa de la actividad celular evidenciada por alteraciones en la actividad lisosomal y en el metabolismo energético en células de mamíferos (CHO-K1) al igual que en células de insectos (CCL-126) (Publicaciones II y IV).
- En líneas generales e independientemente del bioensayo empleado ivermectina e Ivomec® inducen un patrón de daño genotóxico y citotóxico semejante. De este modo, se podría sugerir que el efecto deletéreo producido por Ivomec® estaría producido solamente por el principio activo ivermectina presente en la formulación comercial. De esta forma, podría descartarse la posibilidad de la presencia de algún otro agente/s inductor/es de daño incluidos en los excipientes de la formulación comercial.

Las investigaciones llevadas a cabo durante el desarrollo del presente trabajo de Tesis Doctoral han revelado, mediante los diferentes estudios realizados, que la ivermectina presenta la capacidad de inducir daño no sólo a nivel del ADN de los diferentes tipos celulares empleados sino que, además, produce diversos efectos deletéreos celulares.

Por todo lo expuesto, podríamos concluir que la ivermectina podría ser considerada como un agente con cierto potencial genotóxico y con una marcada capacidad citotóxica, siendo ésta última la característica más sobresaliente de este compuesto antiparasitario.

Finalmente, su empleo masivo como antiparasitario por excelencia podría estar comprometiendo la salud de los organismos, entre los cuales se encuentran sin lugar a dudas los seres humanos, tratados habitualmente con formulaciones comerciales conteniendo el principio activo ivermectina.

BIBLIOGRAFÍA

- Aleksić, N. y Barjaktarović, N. (1993). Investigation on sister chromatid exchange (SCE) by ivermectin. *Genetika* 25: 219-225.
- Aleksić, N., Milutinović, M. y Bakrač, T. (1996). Investigation of the genotoxic effects of ivermectin on human lymphocytes. *Acta Veterinaria* 46: 51-56.
- Amazigo, U. (1999). Community selection of ivermectin distributors. *Community Eye Health* 12: 39-40.
- Amsden, G.W., Gregory, T.B., Michalak, C.A., Glue, P. y Knirsch, C.A. (2007). Pharmacokinetics of azithromycin and the combination of ivermectin and albendazole when administered alone and concurrently in healthy volunteers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76: 1153-1157.
- Anziani, O.S. y Guglielmone, A.A. (2005). Resistencia a los antiparasitarios utilizados para el control de nematodos gastrointestinales y garrapatas: situación en el centro-norte de la Argentina. *Revista CREA* 36: 1-3.
- Anziani, O.S., Suarez, V., Guglielmone, A.A., Wanker, O., Grande, H. y Coles, G. (2004). Resistance to benzimidazole and avermectin anthelmintics in cattle nematodes in Argentina. *Veterinary Parasitology* 122: 303-306.
- Aparicio, P., Rodríguez, E., Gárate, T., Molina, R., Sotoa, A. y Alvara, J. (2003). Terapéutica antiparasitaria. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 21: 579-594.
- Ardelli, B.F., Stitt, L.E., Tompkins, J.B. y Prichard, R.K. (2009). A comparison of the effects of ivermectin and moxidectin on the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Veterinary Parasitology* 165: 96-108.
- Atakisi, E., Atakisi, O., Topcu, B. y Uzun, M. (2009). Effects of therapeutic dose of ivermectin on plasma nitric oxide and total antioxidant capacity in rabbits. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 13: 425-429.
- Atkins, P. (2008). Fear of animal foods: A century of zoonotics. *Appetite* 51: 18-21.
- Bhatia, R. y Narain, J.P. (2010). The challenge of emerging zoonoses in Asia Pacific. *Asia-Pacific Journal of Public Health* 22: 388-394.

- Bianchi, N.O., Bianchi, M.S. y Larramendy, M.L. (1979). Kinetics of human lymphocyte division and chromosomal radiosensitivity. *Mutation Research* 63: 317-324.
- Bianchi, N.O., Larramendy, M.L. y Bianchi, M.S. (1988). The asymmetric methylation of CG palindromic dinucleotides increases sister-chromatid exchanges. *Mutation Research* 197: 151-156.
- Bianchi, N.O. y López-Larraza, D.M. (1991). DNA damage and repair induced by bleomycin in mammalian and insect cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 17: 63-68.
- Bolzán, A.D., González, M.D. y Bianchi, M.S. (2000). The effect of 1,10-phenanthroline on the chromosome damage and sister-chromatid exchanges induced by streptozotocin in mammalian and insect cells. *Mutation Research* 447: 221-226.
- Borenfreund, E. y Puerner, J.A. (1985). Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters* 24: 119-124.
- Borgsteede, F.H.M., Taylor, S.M., Gaasenbeek, C.P.H., Couper, A. y Cromie, L. (2008). The efficacy of an ivermectin/closantel injection against experimentally induced infections and field infections with gastrointestinal nematodes and liver fluke in cattle. *Veterinary Parasitology* 155: 235-241.
- Bristow, R.G., Benchimol, S. y Hill, R.P. (1996). The p53 gene as a modifier of intrinsic radiosensitivity: implications for radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology* 40: 197-223.
- Burg, R.W., Miller, B.M., Baker, E.E., Birnbaum, J., Currie, S.A., Hartman, R., Kong, Y.L., Monaghan, R.L., Olson, G., Putter, I., Tunac, J.B., Wallick, H., Stapley, E.O., Oiwa, R. y Omura, S. (1979). Avermectins, new family of potent antihelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 15: 361-367.
- Calabrese, E. y Baldwin, L.A. (2002). Defining hormesis. *Human & Experimental Toxicology* 21: 91-97.
- Calabrese, E. y Baldwin, L.A. (2003). Chemotherapeutics and hormesis. *Critical Reviews in Toxicology* 33: 305-353.

- Calabrese, E.J. (2008). Converging concepts: adaptive response, preconditioning, and the Yerkes–Dodson Law are manifestations of hormesis. *Ageing Research Reviews* 7: 8-20.
- Calabrese, E.J. y Baldwin, L.A. (2003). Hormesis: the dose-response revolution. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 43: 175-197.
- Calabrese, E.J. y Baldwin, L.A. (2003). Inorganics and hormesis. *Critical Reviews in Toxicology* 33: 215-304.
- Campbell, W.C., Fisher, M.H., Stapley, E.O., Albers-Schonberg, G. y Jacob, T.A. (1983). Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Sciences* 221: 823-828.
- Carballo, M.A., Hick, A.S., Soloneski, S., Larramendy, M.L. y Mudry, M.D. (2006). Genotoxic and aneugenic properties of an imidazole derivative. *Journal of Applied Toxicology* 26: 293-300.
- Carrano, A.V., Thompson, L.H., Lindl, P.A. y Minkler, J.L. (1978). Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis. *Nature* 271: 551-553.
- Carrano, A.V., Thompson, L.H., Stetka, D.G., Minkler, J.L., Mazrimas, J.A. y Fong, S. (1979). DNA crosslinking, sister-chromatid exchange and specific-locus mutations. *Mutation Research* 63: 175-188.
- Collins, A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. Principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology* 26: 249-261.
- Countryman, P. y Heddle, J.A. (1976). The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated of human lymphocytes. *Mutation Research* 41: 321-332.
- Chabala, J.C., Mrozik, H., Tolman, R.L., Eskola, P., Lusi, A., Peterson, L.H., Woods, M.F., Fisher, M.H., Campbell, W.C., Egerton, J.R. y Ostlind, D.A. (1980). Ivermectin, a new broad-spectrum antiparasitic agent. *Journal of Medicinal Chemistry* 23: 1134-1136.
- Chatterjee, A. y Raman, M.J. (1993). Protective effect of cysteine against X-ray- and bleomycin-induced chromosomal aberrations and cell cycle delay. *Mutation Research* 290: 231-238.
- Chicoine, A.L., Durden, D.A., MacNaughton, G. y Dowling, P.M. (2007). Ivermectin use and resulting milk residues on 4 canadian dairy herds. *Canadian Veterinary Journal* 48: 836-838.

- Dadarkar, S.S., Deore, M.D. y Gatne, M.M. (2007). Comparative evaluation of acute toxicity of ivermectin by two methods after single subcutaneous administration in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 47: 257-260.
- Davies, J., Spiegelman, G.B. y Yim, G. (2006). The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Current Opinion in Microbiology* 9: 445-453.
- Egerton, J.R., Seward, R.L. y Robin, B. (1984). L'ivermectine: un agent antiparasitaire pour les chevaux. *Recueil de Médecine Vétérinaire* 6: 595-599.
- el-Ashmawy, I.M., el-Nahas, A.F. y Bayad, A.E. (2011). Teratogenic and cytogenetic effects of ivermectin and its interaction with P-glycoprotein inhibitor. *Research in Veterinary Science* 90 116-123.
- El-makawy, A.I. y Mahrous, K.F. (2008). Antimutagenic activity of some natural supplements on ivermectin genotoxicity in lymphocytes of buffalo. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine* 30: 115-125.
- el-Nahas, A.F. y el-Ashmawy, I.M. (2008). Effect of ivermectin on male fertility and its interaction with P-glycoprotein inhibitor (verapamil) in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 26: 206-211.
- Enk, C.D. (2006). Onchocerciasis—river blindness. *Clinics in Dermatology* 24: 176-180.
- Entrocasso, C., Alvarez, L., Manazza, J., Lifschitz, A., Borda, B., Virkel, G., Mottier, L. y Lanusse, C. (2008). Clinical efficacy assessment of the albendazole–ivermectin combination in lambs parasitized with resistant nematodes. *Veterinary Parasitology* 155: 249-256.
- Errecalde, J.O. (2006). El futuro de los endectocidas: perspectivas tecnológicas, INTA
- Faso, B. (1999). Community selection of ivermectin distributors. *Community Eye Health* 12: 39-40.
- Fenech, M. (2000). The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation research* 455: 81-95.
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 2: 1084-1104.

- Fiel, C.A., Samuell, C.A., Steffan, P.E. y Rodriguez, E.M. (2001). Resistance of cooperia to ivermectin treatments in grazing cattle of the humid pampa, Argentina. *Veterinary Parasitology* 97: 211-217.
- Fortini, P., Raspaglio, G., Falchi, M. y Dogliotti, E. (1996). Analysis of DNA alkylation damage and repair in mammalian cells by the comet assay. *Mutagenesis* 11: 169-175.
- Gadeva, P. y Dimitrov, B. (2008). Genotoxic effects of the pesticides Rubigan, Omite and Rovral in root-meristem cells of *Crepis capillaris* L. *Mutation Research* 652: 191-197.
- Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, B.H., Resnick, M.A., Anderson, B. y Zeiger, E. (1987). Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluations of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 10: 1-35.
- García-Rubio, L., Matas, P. y Míguez, M.P. (2005). Protective effect of melatonin on paraquat-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Human and Experimental Toxicology* 24: 475-780.
- Garric, J., Vollat, V., Duis, K., Péry, A., Junker, T., Ramil, M., Fink, G. y Ternes, T.A. (2007). Effects of the parasiticide ivermectin on the cladoceran *Daphnia magna* and the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Chemosphere* 69: 903-910.
- Gatti, M., Santini, G., Pimpinelli, S. y Olivieri, G. (1979). Lack of spontaneous sister chromatid exchanges in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 91: 255-274.
- Geoffrey, E. (2003). Ivermectin: does P-glycoprotein play a role in neurotoxicity? *Filaria Journal* 2: 1-6.
- González Canga, A., Sahagún Prieto, A.M., Díez Liébana, M.J., Fernández Martínez, N., Sierra Vega, M. y García Vieitez, J.J. (2008). The pharmacokinetics and interactions of ivermectin in humans-a mini-review. *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal* 10: 42-46.

- González Canga, A., Sahagún Prieto, A.M., José Diez Liébana, M., Martínez, N.F., Vega, M.S. y Vieitez, J.J. (2009). The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. *The Veterinary Journal* 179: 25-37.
- González Cid, M. y Larripa, I. (1994). Genotoxic activity of azidothymidine (AZT) in *in vitro* systems. *Mutation Research* 321: 113-118.
- González, M., Soloneski, S., Reigosa, M.A. y Larramendy, M.L. (2005). Effect of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and its derivative 2,4-D dichlorophenoxyacetic acid dimethylamine salt (2,4-D DMA). I. Genotoxic evaluation on Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicology In Vitro* 19: 289-297.
- González, N.V., Soloneski, S. y Larramendy, M.L. (2007). The chlorophenoxy herbicide dicamba and its commercial formulation banvel induce genotoxicity in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research* 634: 60-68.
- Gordon, L.R., Bradley, M.O., Patterson, S.K., Taylor, V.E. y Dysart, G.R. (1982). *In vitro* alkaline elution/rat hepatocyte assay with abamectin (MK 0936). Study No. TT 82-8520, 82-8523, 82-8525, 82-8526. Unpublished report prepared by Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, West Point, Pennsylvania, USA. Submitted to WHO by MSDRL, Three Bridges, NJ, USA.
- Gupta, R.C., Goad, J.T. y Kadel, W.L. (1991). *In vivo* alterations in lactate dehydrogenase (LDH) and LDH isoenzymes patterns by acute carbofuran intoxication. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 21: 263-269.
- Heddle, J.A., Benz, R.D. y Countryman, P.I. (1978). Measurement of chromosomal breakage in cultured cells by the micronucleus technique. *Mutagen-induced Chromosome Damage in Man*. Evans y Lloyd. Edinburgh, Edinburgh University Press: 191-199.
- Herrera, L.A., Tittelbach, H., Gebhart, E. y Ostrosky-Wegman, P. (1991). Changes in the proliferation of human lymphocytes induced by several cytostatics and revealed by the premature chromosome condensation technique. *Mutation Research* 263: 101-106.
- Holden-Dye, L. y Walker, R.J. (2007). The *C. elegans* research community. *Anthelmintic Drugs*. WormBook.

- Hovhannisyan, G.G. (2010). Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. *Molecular Cytogenetics* 3: 17-28.
- http://parasitosdelganado.net/index.php?option=com_content&view=article&id=125&Itemid=199.
- http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=6435110&loc=ec_rcs.
- <http://www.epa.gov/EPA-IMPACT/i22182.htm>. (2004).
- <http://www.fao.org/WAIRDOCS/LEAD/X6115E/x6115e03.htm>.
- http://www.inforesources.ch/pdf/focus07_1_e.pdf.
- http://www.pesticideinfo.org/Docs/ref_toxicity2.html. (2007).
- <http://www.rr-americas.oie.int/es/proyectos/Camevet/fichas/farmacos/IVERMECTINA.htm>.
- <http://www.who.int/wormcontrol/statistics/>.
- IARC (1987). Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of IARC monographs. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Cancer. 1-42.
- IARC (1991). Occupational exposures in insecticide application, and some pesticides. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Cancer.: 612 p.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. y Omura, S. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology* 21: 526-531.
- Ikeda, H., Kotaki, H. y Omura, S. (1987). Genetic studies of avermectin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. *Journal of Bacteriology* 169: 5615-5621.
- Intapan, P.M., Prasongdee, T.K., Laummaunwai, P., Sawanyawisuth, K., Singthong, S. y Maleewong, W. (2006). A modified filter paper culture technique for screening of *Strongyloides stercoralis* ivermectin sensitivity in clinical specimens. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 75: 563-564.
- Istifli, E.S. y Topaktaş, M. (2010). Cytogenetic genotoxicity of amoxicillin. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 51: 222-228.

- Kane, N.S., Hirschberg, B., Qian, S., Hunt, D., Thomas, B., Brochu, R., Ludmerer, S.W., Zheng, Y., Smith, M., Arena, J.P., Cohen, C.J., Schmatz, D., Warmke, J. y Cully, D.F. (2000). Drugresistant *Drosophila* indicate glutamate-gated chloride channels are targets for the antiparasitics nodulosporic and ivermectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 13949-13954.
- Kato, H. (1974). Spontaneous sister Chromatid exchanges detected by a BUdR-labelling method. *Nature* 251: 70-72.
- Kato, H. (1977). Spontaneous and induced sister chromatid exchanges as revealed by the BUdR-labeling method. *International Review of Cytology* 45: 55-97.
- Keretetse, G.S., Laubscher, P.J., Du Plessis, J.L., Pretorius, P.J., Van Der Westhuizen, F.H., Van Deventer, E., Van Dyk, E., Eloff, F.C., Van Aarde, M.N. y Du Plessis, L.H. (2008). DNA damage and repair detected by the comet Assay in Lymphocytes of African Petrol Attendants: A Pilot Study. *The Annals of Occupational Hygiene* 53: 653-662.
- Kita, K., Shiomi, K. y Omura, S. (2007). Advances in drug discovery and biochemical studies. *Trends in Parasitology* 23: 223-229.
- Korenberg, J.R. y Freedlender, E.F. (1974). Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges. *Chromosoma* 48: 355-360.
- Korystov, Y.N., Ermakova, N.V., Kublik, L.N., Levitman, M.K., Shaposhnikova, V.V., Mosin, V.A., Drinyaev, V.A., Kruglyak, E.B., Novik, T.S. y Sterlina, T.S. (2004). Avermectins inhibit multidrug resistance of tumor cells. *European Journal of Pharmacology* 493: 57-64.
- Kosmider, B., Zyner, E., Osiecka, R. y Ochocki, J. (2004). Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the cis-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP. *Mutation Research* 563: 61-70.
- La R. Rodrigues, L.A. y Mattei, R. (1987). The influence of serum substitute ultroser G in toxicological evaluations in mammalian cells *in vitro*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 14: 269-274.
- La R. Rodrigues, M.A. y Mattei, R. (2006). Toxicity assessment of the antiparasitic ivermectin. *Toxicity Assessment* 3: 379-384.

- Lamberti, L., Bigatti-Ponzetto, P. y Ardito, G. (1983). Cell kinetics and sister chromatid exchange frequency in human lymphocytes. *Mutation Research* 120: 193-199.
- Larramendy, M.L., Bianchi, M.S. y Padrón, J. (1989). Correlation between the anti-oxidant enzyme activities of blood fractions and the yield of bleomycin-induced chromosome damage. *Mutation Research* 214: 129-136.
- Lebailly, P., Vigreux, C., Godard, T., Sichel, F., Bar, E., LeTalaër, J.Y., Henry-Amar, M. y Gauduchon, P. (1997). Assessment of DNA damage induced in vitro by etoposide and two fungicides (carbendazim and chlorothalonil) in human lymphocytes with the comet assay. *Mutation Research* 375: 205-217.
- Leite, M., Quinta-Costa, M., Leite, P.S. y Guimarães, J.E. (1999). Critical evaluation of techniques to detect and measure cell death--study in a model of UV radiation of the leukaemic cell line HL60. *Analytical Cellular Pathology* 19: 139-151.
- Lifschitz, A., Virkel, G., Ballent, M., Sallovitz, J., Imperiale, F., Pis, A. y Lanusse, C. (2007). Ivermectin (3.15%) long-acting formulations in cattle: absorption pattern and pharmacokinetic considerations. *Veterinary Parasitology* 147: 303-310.
- Maity, A., McKenna, W.G. y Muschel, R.J. (1994). The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: a review. *Radiotherapy and Oncology* 31: 1-13.
- Mangan, R.L. y Moreno, D.S. (2001). Photoactive dye insecticide formulations: adjuvants increase toxicity to Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) *Journal of Economic Entomology* 94: 150-156.
- Mann, R.M. y Bidwell, J.R. (2001). The acute toxicity of agricultural surfactants to the tadpoles of four Australian and two exotic frogs *Environmental Pollution* 114 195-205.
- Mann, R.M., Bidwell, J.R. y Tyler, M.J. (2003). Toxicity of herbicide formulations to frogs and the implications for product registration: A case study from Western Australia. *Applied Herpetology* 1: 13-22.
- McCavera, S., T. K. Walsh, T.K. y Wolstenholme, A.J. (2007). Nematode ligand-gated chloride channels: an appraisal of their involvement in macrocyclic

- lactone resistance and prospects for developing molecular markers. *Parasitology* 134.
- McCollum, G., Keng, P.C., States, J.C. y McCabe Jr, M.J. (2005). Arsenite Delays Progression through Each Cell Cycle Phase and Induces Apoptosis following G2/M Arrest in U937 Myeloid Leukemia Cells *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 313: 877-887.
- McGahon, A.J., Martín, S.J., Bissonnette, R.P., Mahboubi, A., Shi, Y., Mogil, R.J., Nishioka, W.K. y Green, D.K. (1995). The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis *in vitro*. *Methods in Cell Biology* 46: 153-185.
- Merck & Co., I. (1978a). Fourteen week oral toxicity study in dogs. TT #78-038-00. . Unpublished study; submitted to WHO by Merck & Co., Inc.
- Merck & Co., I. (1978b). MK-0933: microbial mutagen test with and without rat liver enzyme activation. TT #77-8068. Unpublished study; submitted to WHO by Merck & Co., Inc.
- Merck & Co., I. (1979b). MK-933: Summary of toxicity studies. . Summary of unpublished studies; submitted to WHO by Merck & Co., Inc.
- Merck & Co., I. (1979c). Acute oral toxicity study in rats. TT #78-3087 Unpublished study; submitted to WHO by Merck & Co., Inc.
- Merck & Co., I. (1979d). MK-933: Acute dermal toxicity studies in rabbits and rats. Acute ocular toxicity studies in rabbits. Acute oral toxicity in dogs. . Unpublished studies; submitted to WHO by Merck & Co., Inc.
- Merck & Co., I. (1979e). Acute inhalation toxicity study in rats. Unpublished study; submitted to WHO by Merck & Co., Inc.
- Merck & Co., I. (1979g). MK-933/cattle/safety/ toxicity/clinical pathology/N.O.T. 4480. Unpublished study; submitted to WHO by Merck & Co., Inc.
- Merck & Co., I. (1980e). MK-933: Multigeneration studies in rats. Unpublished studies; submitted to WHO by Merck & Co., Inc.
- Merck & Co., I. (1980h). MK-0933: Mouse lymphoma cytotoxicity study. TT #79-8034. Unpublished study; submitted to WHO by Merck & Co., Inc.
- Merck & Co., I. (1980i). MK 933: Unscheduled DNA synthesis in human IMR90-fibroblasts. TT #80-8205 Unpublished study; submitted to WHO by Merck & Co., Inc.

- Merck & Co., I. (1981a). MK-933 (L-640,471-OOW72): Acute oral toxicity in dogs. TT #81-2500. Unpublished study; submitted to WHO by Merck & Co., Inc.
- Merck & Co., I. (1981b). MK-933 Ivermectin injectable micelle solution: acute subcutaneous toxicity study in young dogs. TT#81-025-0. Unpublished study; submitted to WHO by Merck & Co., Inc.
- Merck & Co., I. (1981c). MK-933: Acute toxicity in the ovine. N.O.T. 7000. Unpublished study; submitted to WHO by Merck & Co., Inc.
- Merck & Co., I. (1981d). MK-933/horses/safety/toxicity/clinical pathology/N.O.T. 8292, protocol 554 Unpublished study; submitted to WHO by Merck & Co., Inc.
- Merck & Co., I. (1981e). MK-933: Multigeneration study in rats. Unpublished study; submitted to WHO by Merck & Co., Inc.
- Merck & Co., I. (1982d). MK-0933 / Swine / Safety / Toxicity clinical pathology / Anatomic pathology. N.O.T. 9739 Unpublished study; submitted to WHO by Merck & Co., Inc.
- Merck & Co., I. (1982e). MK-936: One-hundred-five week dietary carcinogenicity and toxicity study in rats with a fifty-three week interim necropsy. Final report. TT #82-099-0. Unpublished study; submitted to WHO by Merck & Co., Inc.
- Merck & Co., I. (1988a). MK-932: metabolism study in the rat. TT # 79-711-0 Unpublished study; submitted to WHO by Merck & Co., Inc. .
- Merck & Co., I. (1988b). Mectizantim (ivermectin, MSD). Product Monograph 7-89 MCT 88-R-1152M. Submitted to WHO by Merck & Co., Inc.
- Miller, B.M. y Adler, I.D. (1989). Suspect spindle poisons: analysis of c-mitotic effects in mouse bone marrow cells. *Mutagenesis* 4: 208-215.
- Miller, T.W., Chaiet, L., Cole, D.J., Cole, L.J., Flor, J.E., Goegelman, R.T., Gullo, V.P., Joshua, H., Kempf, A.J., Krellwitz, W.R., Monaghan, R.L., Ormond, R.E., Wilson, K.E., Albers-Schönberg, G. y Putter, I. (1979). Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: isolation and chromatographic properties
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 15: 368-371.

- Molinari, G., Soloneski, S., Reigosa, M.A. y Larramendy, M.L. (2009). *In vitro* genotoxic and citotoxic effects of ivermectin and its formulation ivomec® on Chinese hamster ovary (CHO_{K1}) cells. *Journal of Hazardous Materials* 165: 1074-1082.
- Molinari, G., Soloneski, S., Reigosa, M.A. y Larramendy, M.L. (2010). Genotoxic and cytotoxic *in vitro* evaluation of ivermectin and its formulation ivomec® on *Aedes albopictus* larvae (CLL-126™) cells. *Toxicological and Environmental Chemistry* 92: 1577-1593.
- Mukherjee, A.B., Herrera, R.J. y Luckett, D.C. (1986). Spontaneous and induced sister-chromatid exchanges in cultured mosquito cells. *Cytobios* 46: 181-187.
- Neri, M., Ugolini, D., Bonassi, S., Fucic, A., Holland, N., Knudsen, L.E., Srám, R.J., Ceppi, M., Bocchini, V. y Merlo, D.F. (2006). Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage. II. Results of a comprehensive literature search and meta-analysis. *Mutation Research* 612: 14-39.
- Olive, P.L., Banáth, J.P. y Durand, R.E. (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay. *Mutation Research* 222: 86-94.
- Olivera, P.A., Colaço, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., De-La-Cruz, L.F. y Lopes, C. (2007). Chemical Carcinogenesis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 79: 593-616.
- Omura, S. (2008). Ivermectin: 25 years and still going strong. *Journal of antimicrobial agents* 31: 91-98.
- Omura, S. y Crump, A. (2004). The life and times of ivermectin -A success story. *Nature. Review Microbiology* 2: 984-989.
- Orion, E., Matz, H. y Wolf, R. (2005). The life-threatening complications of dermatologic therapies. *Clinics in Dermatology* 23: 182-192.
- Osorio, J., Moncada, L., Molano, A., Valderrama, S., Gualterco, S. y Franco-Paredes, C. (2006). Role of ivermectin in the treatment of severe orbital myiasis due to *Cochliomyia hominivorax*. *Clinical Infectious Diseases* 43: 57-59.

- Pereira, J.R. (2009). The efficiency of avermectins (abamectin, doramectin and ivermectin) in the control of *Boophilus micropulus*, in artificially infested bovines kept in field conditions. *Veterinary Parasitology* 162: 116-119.
- Pérez, L., Palma, C., Villegas, R., Vega, M. y Pérez, R. (2006). Metodología analítica y detección de residuos de ivermectina en muestras de leche de rebaños de la provincia de Ñube, Chile. *Archivos de medicina veterinaria* 38: 143-150.
- Perry, P. y Wolff, S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251: 156-158.
- Pitterna, T., Cassayre, J., Hüter, O.F., Jung, P.M., Maienfisch, P., Kessabi, F.M., Quaranta, L. y Tobler, H. (2009). New ventures in the chemistry of avermectins. *Bioorganic & medicinal chemistry* 17: 4085-4095.
- Pulliam, J.D., Seward, R.L., Henry, R.T. y Steinberg, S.A. (1985). Investigation of ivermectin toxicity in collies. *Veterinary Medicine* 6.
- Rodriguez Pérez, M., Katholi, C.R., Hassan, H.K. y Unnasch, T.R. (2006). Large-scale entomologic assessment of *Onchocerca volvulus* transmission by poolscreen PCR in Mexico *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 74: 1026-1033.
- Shan, Q., Haddrill, J.L. y Lynch, J.W. (2001). Ivermectin, an unconventional agonist of the glycine receptor chloride channel. *The journal of biological chemistry* 276: 12556-12564.
- Sharmeen, S. (2010). Activation of chloride channels with the anti-parasitic agent ivermectin induces membrane hyperpolarization and cell death in leukemia cells. Department of Medical Biophysics. Toronto, University of Toronto.
- Singh, N., McCoy, M.T., Tice, R.R. y Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantifications of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175: 184-191.
- Soboslay, P.T., Dreweck, C.M., Hoffmann, W.H., Luder, C.G.K., Heuschkel, C., Gorgen, H., Banla, M. y Schulz-Key, H. (1992). Ivermectin facilitated immunity in onchocerciasis. Reversal of lymphocytopenia, cellular anergy and deficient cytokine production after single treatment. *Clinical & Experimental Immunology* 89: 407-413.

- Soloneski, S., González, M., Piaggio, E., Apezteguía, M., Reigosa, M.A. y Larramendy, M.L. (2001). Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation azzurro. I. Genotoxic evaluation on cultured human lymphocytes exposed *in vitro*. *Mutagenesis* 16: 487-493.
- Soloneski, S., González, M., Piaggio, E., Reigosa, M.A. y Larramendy, M.L. (2002). Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation azzurro. III. Genotoxic evaluation on Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mutation Research* 514: 201-212.
- Soloneski, S., González, N.V., Reigosa, M.A. y Larramendy, M.L. (2007). Herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-induced cytogenetic damage in human lymphocytes *in vitro* in presence of erythrocytes. *Cell Biology International* 31: 1316-1322.
- Soloneski, S., Reigosa, M.A. y Larramendy, M.L. (2002). Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation azzurro. II. Clastogenesis on immunophenotyped human lymphocytes assessed by the micronucleus test. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 40: 57-62.
- Soloneski, S., Reigosa, M.A. y Larramendy, M.L. (2003). Vitamin E prevents ethylene bis(dithiocarbamate) pesticide zineb-induced sister chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells. *Mutagenesis* 18: 505-510.
- Soloneski, S., Reigosa, M.A., Molinari, G., González, N.V. y Larramendy, M.L. (2008). Genotoxic and cytotoxic effects of carbofuran and furadan on Chinese hamster ovary (CHOK1) cells. *Mutation Research* 656: 68-73.
- Sparsa, A., Bonnetblanc, J.M., Peyrot, I., Loustaud-Ratti, V., Vidal, E. y Bédane, C. (2006). Systemic adverse reactions with ivermectin treatment of scabies. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* 133: 784-787.
- Sturchio, J.L. (2001). The case of ivermectin: lessons and iplications for improving acces to xare and treatment in development countries. *Community Eye Health* 14: 22-23.
- Suárez, V.H. (2002). Helminthic control on grazing ruminants and environmental risks in South America. *Veterinary Research* 33: 563-573.

- Suárez, V.H., Corro Molas, B., Ves Losada, J.C. y Bonetti, C. (2006). Influencia negativa de los endectocidas sobre la fauna coprófila. 88, B.d.D.T.N., EEA INTA, Anguil: 108-112.
- Sun, Y.J., Long, D.X., Li, W., Hou, W.Y., Wu, Y.J. y Shen, J.Z. (2010). Effects of avermectins on neurite outgrowth in differentiating mouse neuroblastoma N2a cells. *Toxicology Letters* 192: 206-211.
- Takahashi, Y., Matsumoto, A., Seino, A., Ueno, J., Iwai, Y. y Omura, S. (2002). *Streptomyces avermectinius* sp. nov., an avermectin-producing strain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 2163-2168.
- Tiemann, U. (2008). *In vivo* and *in vitro* effects of the organochlorine pesticides DDT, TCPM, metoxychlor, and lindane on the female reproductive tract of mammals: A review. *Reproductive Toxicology* 25: 316-326.
- Tucker, J.D., Auletta, A., Cimino, M.C., Jacobson-Kram, D.K.L.D., Tice, R.R. y Carrano, A.V. (1993). Sister-chromatid exchange: second report of the Gene-Tox Program. *Mutation Research* 297: 101-180.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncola, J., Izakovic, M. y Mazura, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160: 1-40.
- Valverde, M. y Rojas, E. (2009). Environmental and occupational biomonitoring using the comet assay. *Mutation Research* 681: 93-109.
- Victoria, J. (2003). Uso de ivermectina en niños. *Dermatología Pediátrica Latinoamericana* 1: 61-65.
- Vieira, J.C., Cooper, P.J., Lovato, R., Mancero, T., Rivera, J., Proaño, R., López, A.A., Guderian, R.H. y J, R.G. (2007). Impact of long-term treatment of onchocerciasis with ivermectin in Ecuador: potential for elimination of infection. *BMC Medicine* 5: 1-10.
- Viet, O., Beck, B., Steuerwald, M. y Hatz, C. (2006). First case of ivermectin-induced severe hepatitis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100: 795-797.

- Watson, W.P., Munter, T. y Golding, B.T. (2004). A new role for glutathione: protection of vitamin B12 from depletion by xenobiotics. *Chemical Research in Toxicology* 17: 1562-1567.
- Wei, L., Wei, G., Zhang, H., Wang, P.G. y DU, Y. (2005). Synthesis of new, potent avermectin-like insecticidal agents. *Carbohydrate Research* 340: 1583-1590.
- Wei, L.Y., Hou, R.F., Jan, K.Y. y Wang, T.C. (1993). Factors affecting zero background frequency of sister-chromatid exchange in mosquito cells. *Mutagenesis* 8: 179-182.
- Wilson, D.M.R. y Thompson, L.H. (2007). Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutation Research* 616: 11-23.
- Yoon, Y.j., Kim, E.-S., Hwang, Y.-S. y Choi, C.-Y. (2004). Avermectin: biochemical and molecular basis of its biosynthesis and regulation. *Applied of Microbiology and Biotechnology* 63: 626-634.
- Zaha, O., Hirata, T., Kinjo, F., Saito, A. y Fukuhara, H. (2002). Efficacy of ivermectin for chronic strongyloidiasis: two single doses given 2 weeks apart. *Journal of Infection and Chemotherapy* 8: 94-98.
- Zeljezic, D., Garaj-Vrhovac, V. y Perkovic, P. (2006). Evaluation of DNA damage induced by atrazine and atrazine-based herbicide in human lymphocytes in vitro using a comet and DNA diffusion assay. *Toxicology in Vitro* 20: 923-935.
- Zhang, X., Chen, Z., Li, M., Wen, Y., Song, Y. y Li, J. (2006). Construction of ivermectin producer by domain swaps of avermectin polyketide synthase in *Streptomyces avermitilis*. *Applied of Microbiology and Biotechnology* 72: 986-994.