

DETERMINACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD DE LA IVERMECTINA A TRAVÉS DEL ENSAYO COMETA

DETERMINATION OF THE GENOTOXICITY OF THE IVERMECTINA THROUGH OF THE COMET ASSAY

MONTES, V. DONICER¹ Esp., MONTERO, P. YINA² Biól., MORENO-ROOSI, ALBERTO³ M.Sc., GONZÁLEZ, HENRY³ Esp.

¹Universidad de Sucre, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Zootecnia, Sincelejo, Colombia, Grupo Reproducción y Mejoramiento Genético Animal ² Universidad de Sucre, Grupo Investigaciones Biomédicas

³Universidad del Atlántico, Facultad de Ciencias Básicas, Grupo de Investigaciones Genética y Bioquímica.

Correspondencia:* donicer.montes@unisucre.edu.co

Recibido: 16-06-2011; Aceptado: 16-09-2011

En las últimas décadas se han desarrollado diversos antihelmínticos de gran efectividad frente a diferentes tipos de parásitos, los cuales amplían las alternativas de tratamiento, con el objeto de evitar el desarrollo de resistencia de los parásitos a la acción del fármaco. En la década del 80 y a principio de los 90, se introdujeron nuevos antihelmintos de amplio espectro que pertenecen a las familias de las Avermectinas y Milbemicinas, en éstas se incluyen compuestos naturales y semisintéticos que tienen similar estructura, un modo de acción común y semejante espectro de actividad, pero difieren en sus propiedades farmacocinéticas que determina que la actividad de las milbemicinas (moxidectina) sea más persistente y presenten una mayor eficacia sobre los artrópodos. Uno de estos compuestos es la Ivermectina (IVM), antiparasitario endectócido, utilizado ampliamente en el control de nematodos y artrópodos que afectan a los bovinos. Su prolongada permanencia en el plasma y su lipofilia aseguran la efectividad farmacológica (IGLESIAS *et al.*, 2005). La IVM es el resultado de la fermentación bacteriana del *Streptomyces avermitilis*, obtenido por primera vez en el año 1979, es un fármaco muy liposoluble y poco hidrosoluble, por lo que se puede aplicar por todas las vías, siendo las más recomendadas la subcutánea (SC), intramuscular (IM) y tópica "pour-on". Es un análogo semisintético de la abamectina, conteniendo un 80% de dihidroavermectina B1a y no más de un 20% de dihidroavermectina B1b (LIFSCHITZ *et al.*, 2002). La IVM es la Lactona Macroscíclica (LM) de mayor difusión y utilización en las diferentes especies de animales en todo el mundo; por lo tanto, es la molécula que más se ha estudiado con respecto a sus características fármaco-

dinámicas y farmacocinéticas. Las propiedades físico químicas de la IVM incluyen un alto peso molecular y una elevada lipofilicidad, las que le confieren características fármaco cinéticas de un alto volumen de distribución, con una gran afinidad por la grasa corporal y prolongada persistencia de sus concentraciones en el organismo (OMURA , 2008).

La IVM se excreta en altas concentraciones en la bilis de bovinos. Mediante el ciclo entero hepático el fármaco es reabsorbido hacia la sangre para luego pasar al intestino obteniéndose altas concentraciones del fármaco en duodeno e íleon (HENNESSY *et al.*, 2000). En la mucosa abomasal, las concentraciones de IVM encontradas posterior a la administración de una dosis subcutánea de 0,2 mg/kg son levemente menores a las encontradas en la mucosa del intestino delgado. Otros estudios realizados en ratas han demostrado que hay una excreción directa de IVM hacia el intestino eliminándose cantidades de fármaco activa en el lumen intestinal y heces (LAFFONT *et al.*, 2002). Efectos letales y subletales por acción de la droga sobre organismos coprófilos no perjudiciales para los bovinos fueron informados por WARDHAUGH *et al.* (2001). No obstante, un aspecto poco considerado en los estudios es el nivel de daño que esta droga, puede causar en las estructuras del ADN. En lo que respecta a estudios tendientes a caracterizar la citotoxicidad de la IVM, sólo ha sido reportado, hasta el presente, datos provenientes de un estudio *in vitro* realizado en células CHO, estimando la capacidad de proliferación celular en un medio de cultivo suplementado con un suero sustituto en presencia de diferentes dosis de la droga (RODRÍGUEZ y MATTEI, 1987). Sin embargo, se han realizado análisis mediante diversos ensayos *in vitro* de genotoxicidad (frecuencia de ICHs y ensayo cometa) y citotoxicidad (progresión de ciclo celular, índice mitótico, ensayos de MTT y rojo neutro), para la capacidad deletérea tanto de la IVM como una de sus formulaciones comerciales Ivomec® (IVM 1%, Merial Argentina S.A.). Los resultados han puesto en evidencia que ambos compuestos ejercen un efecto genotóxico y citotóxico en células CHO-K1 cuando las mismas son expuestas a concentraciones equimolares del principio activo de 1,0-250,0 µg/ml (MOLINARI *et al.*, 2008).

El tiempo de liberación de la IVM es de sólo siete días después del tratamiento subcutáneo en bovinos. En un estudio se encontró que la IVM al 3,15% (0,63 mg/kg pv) inoculada a bovinos permanece en concentraciones plasmáticas > 2 ng/ml a los 50 días post tratamiento (LIFSCHITZ *et al.*, 2007). Los parámetros farmacocinéticos promedios de la IVM obtenidos en plasma después de ser administrados por vía SC a razón de 0,2 mg/kg pv en bovinos se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores fármaco cinéticos obtenidos para la IVM (RODRÍGUEZ *et al.*, 2010)

Parámetros cinéticos	Ivermectina
T _{ab} (días)	39,20
C max (ng/mL)	42,80
T _{max} (días)	4,00
ABC total (ng.d/MI)	459,00
TMR(días)	7,35
Vdss/F(L/kg)	3,35
CIB/F(mL/d/kg)	457,00

T_{ab}: Tiempo medio de absorción; **C_{max}**: Máxima concentración plasmática, **T_{max}**: Tiempo en que se alcanza la C_{max}, **ABC_{total}**: área bajo la curva de concentración frente a tiempo extrapolada al infinito; **TMR**: Tiempo medio de residencia; **Vdss/F**: Volumen de distribución en el estado estacionario; **CIB/F**: Aclaramiento corporal total; **Vdss** y **CI** representan sus verdaderos valores en relación a la fracción absorbida del fármaco.

Se tiene poco conocimiento sobre el posible potencial genotóxico y/o citotóxico de la IVM, ya sea sobre el organismo vector (invertebrado), mamíferos e incluso el ser humano, en los cuales el compuesto es empleado para prevenir las variadas parasitosis (STURCHIO, 2001; RODRÍGUEZ *et al.*, 2006). Sin embargo, existe amplia información de estudios realizados *in vivo* destinados a evaluar la forma de administración, las diferentes dosis terapéuticas dependiendo del parásito en cuestión y del vertebrado hospedador (LIFSCHITZ *et al.*, 2007), la sensibilidad del invertebrado a la droga (INTAPAN *et al.*, 2006) y las posibles resistencias de estos últimos a la misma (KANE *et al.*, 2000; FIEL *et al.*, 2001).

Por lo expuesto anteriormente, las agencias internacionales reguladoras de su empleo terapéutico no han evaluado, o al menos definido, el potencial mutagénico, carcinogénico y/o teratogénico de la IVM ya sea en lo que respecta al hombre como a cualquier otra especie animal expuesta a la misma, por lo que se hace necesario la evaluación del daño genético (ADN) causado por la IVM. Teniendo en cuenta el uso masivo que los ganaderos en Colombia hacen de la IVM, en todas sus presentaciones comerciales, se realizó monitoreo de 2 vacas tratadas con IVM al 3,15%, para el control de garrapatas (Arthropoda, Acari), en la Granja experimental de La Facultad de Ciencias Agropecuaria de la Universidad de Sucre, con el objeto de evaluar el daño genético (ADN) causado por la IVM, las dosis utilizadas fueron las estipuladas por la casa comercial que distribuye el producto (1cc/50 Kg de pv-vía SC). La extracción de la muestra sanguínea fue realizada a los 14 días pos tratamiento, mediante punción venosa con aguja para vacutainer (caudal medial), se extrajeron 4 ml de sangre entera (vacutainer con EDTA como

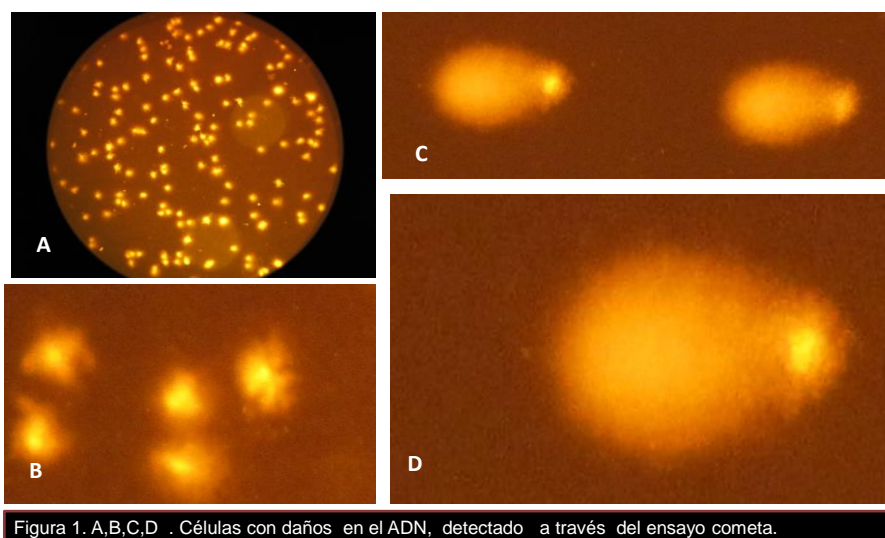
anticoagulante), las cuales fueron etiquetados y conservadas en frío de acuerdo al protocolo de traslado al laboratorio para su procesamiento.

El procesamiento de la muestra se realizó en el laboratorio de la Universidad de Sucre, a través de la técnica del ensayo cometa o electroforesis de una célula, de acuerdo a lo planteado por DHAWAN *et al.* (2005).

La visualización de las placas se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Simón Bolívar, a través de microscopio fluorescente. Para evaluar el daño al DNA se observaron 100 células por cada placa.

La Prueba cometa, permite la detección de daño simple y doble cadena de ADN, este ensayo es potencialmente sensible para evidenciar daño genotóxico inducido (MUDRY y CARBALLO, 2006), su nombre deriva de la apariencia que cobran las células tras la realización del ensayo: una cabeza intensamente brillante, y una cola cuya longitud e intensidad están relacionadas con la cantidad de roturas de cadena del ADN que contiene. En contraste, las células no dañadas presentan aspecto de núcleos intactos, sin cola. Esto es debido a la migración de los fragmentos de ADN dañado hacia el ánodo, al ser sometida la célula a una diferencia de potencial durante una electroforesis (LAFFON *et al.*, 2004).

Como se puede observar en la Fig. 1, mediante el ensayo cometa fue factible evidenciar que la concentración de IVM al 3,15%, fue capaz de inducir rupturas de cadena simple en la molécula de ADN. GONZALEZ *et al.* (2008) analizaron mediante diversos ensayos *in vitro* de genotoxicidad (frecuencia de ICHs y ensayo cometa) y citotoxicidad (progresión de ciclo celular, índice mitótico, ensayos de MTT y rojo neutro), la capacidad deletérea tanto de la IVM como una de sus formulaciones comerciales Ivomec® (IVM 1%, Merial Argentina S.A.). Los resultados evidenciaron que ambos compuestos ejercen un efecto genotóxico y citotóxico en células CHO-K1 cuando las mismas son expuestas a concentraciones equimolares del principio activo de 1,0-25,0 µg/ml (MOLINARI *et al.*, 2008). Los resultados mostraron que ambos compuestos, independientemente del ensayo empleado, manifestaron una gran capacidad citotóxica a partir de la concentración de 10,0 µg/ml incorporada al sistema de cultivo. De esta forma, la concentración de 10,0 y 25,0 µg/ml de IVM así como únicamente 25,0 µg/ml de Ivomec® indujeron un alargamiento del ciclo celular. Por lo antes expuesto, se puede aseverar que el antiparasitario IVM al 3,15% ejerce efectos deletéreos sobre el metabolismo celular y la maquinaria genética de las células tratadas.



Referencias

BURKHART, C.N. 2000. Ivermectin: an assessment of its Pharmacology, Microbiology and safety. *Vet Hum Toxicol.* 42:30-35.

DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PANDY, A.K.; PARMAR, D. 2005. Protocol For The Single Gel Electrophoresis/Comet Assay For Rapid Genotoxicity Assessment. *ITRC: The SCGE/Comet Protocol.* Disponible en: <http://www.cometassayindia.org/Protocol%20for%20Comet%20Assay.PDF> (Consultado 15-06-2011)

FIEL, C.A.; SAMUELL, C.A.; STEFFAN, P.E.; RODRIGUEZ, E.M. 2001. Resistance of cooperia to ivermectin treatments in grazing cattle of the humid pampa, Argentina. *Vet. Parasitol.* 97:211-217.

GONZALEZ, N.V.; MOLINARI, G.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M.L. 2008. Genotoxicidad y citotoxicidad de pesticidas. Evaluación de los principios activos y formulaciones comerciales usadas en Argentina. *Theoria* 17(2):27-45.

HENNESSY, D.; PAGE. S.; GOTTSCHALL, D. 2000. The behaviour of doramectina in the gastrointestinal tract, its secretion in bile and pharmacokinetic

disposition in the peripheral circulation after oral and intravenous administration to sheep. J. Vet. Pharm. Therap. 23:203-213.

IGLESIAS, L.; SAUMELL, C.; FUSÉ, L.; LIFSCHITZ, A.; RODRIGUEZ, E.; STEFFAN, P.; FIEL, C. 2005. Impacto ambiental de la Ivermectina eliminada por bovinos tratados en otoño, sobre la coprofauna y la degradación de la materia fecal en pasturas (Tandil, Argentina). Revista de Investigaciones Agropecuarias. v 34 (3): 83-103 . Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/864/86434306.pdf> (Consultado 11-06-2011)

INTAPAN ,P.M.; PRASONGDEE, T.K.; LAUMMAUNWAI, P.; SAWANYAWISUTH, K.; SINGTHONG, S.; MALEEWONG, W. 2006. Amodified filter paper culture technique for screening of Strongyloides stercoralis ivermectin sensitivity in clinical specimens. Am. J. Trop. Med. Hyg. 75:763-564

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.; CULLY, D.F. 2000. Drug- resistant Drosophila indicate glutamate-gated chloride chanelers are targets for the antiparasitics nodulosporic and ivermectin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:13949- 13954.

LAFFON, B.; PEREZ, B.; MENDEZ, J. 2004. *Influencia de determinados polimorfismos de enzimas metabólicas en la genotoxicidad del estireno*. Departamento de biología celular y molecular. Universidad de Coruña. 100.

LAFFONT, C.; TOUTAIN. P.; ALVINIERIE. M.; BOUSQUET-MELOU, A. 2002. Intestinal secretion is a major route for parent ivermectin elimination in the rat. Drug Metab. And Disp. 30:626- 630.

LIFSCHITZ, A. ; VIRKEL. G.; BALLENT, M.; SALLOVITZ, J.; IMPERIALE, F.; PIS, A.; LANUSSE, C. 2007. Ivermectin (3.15%) long-acting formulations in cattle: absorption pattern and pharmacokinetic considerations. Vet Parasitol. 147:303-310.

LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G.; IMPERIALE, F. ; PIS, A.; LANUSSE, C. 2002. Fármacos endectocidas: avermectinas y milbemicinas. Págs. 545-558. En: Botana, L.M.; Landoni, F.; Matín-Jiménez, T. (eds). *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, España.

MOLINARI, G.; SOLONESKI, S.; REIGOSAMA, A.; LARRAMENDY, M.L. 2008. In vitro genotoxic and cytotoxic effects of ivermectin and its formulation ivomec® on Chinese hamster ovary (CHOK1) cells. *J. Hazard. Mater.* (In Press):18-28.

MUDRY, M.; CARBALLO, A. 2006. *Genética Toxicológica*. 1ra. Edición, Editorial Buenos Aires: 220-230

OMURA, S. 2008. Ivermectin: 25 years and still going strong. *Int. J. Antimicrob. Agents* 31:91- 98.

RODRÍGUEZ, M.A.; MATTEI, R 1987. The influence of serum substitute Ultrosor G in toxicological evaluations in mammalian cells in vitro. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 14:269- 274.

RODRIGUEZ, M.; KATHOLI, C.R.; HASSAN, H.K.; UNNASCH, T.R. 2006. Large-scale entomologic assessment of *Onchocerca volvulus* transmission by pool screen PCR in México. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 74:1026-1033.

RODRÍGUEZ-VIVAS, R.; ARIETA-ROMÁN, R.J.; PÉREZ-COGOLLO, L.C.; ROSADO-AGUILAR, J.A.; RAMÍREZ-CRUZ, G.T.; BASTO-ESTRELLA, G. 2010. Uso de lactonas macrocíclicas para el control de la garrapata (*Rhipicephalus Boophilus*) microplus en el ganado bovino. *Arch Med Vet.* 42:115-123

STURCHIO, J.L. 2001. The case of ivermectin: lessons and implications for improving access to care and treatment in developing countries. *Comm. Eye Health* 14: 22-23

WARDHAUGH, K.G.; LONGSTAFF, B.C.; MORTON, R.A. 2001. Comparison of the development and survival of the dung beetle, *Onthophagus taurus* (Schreb.) when fed on the faeces of cattle treated with pour-on formulations of eprinomectin or moxidectin. *Veterinary Parasitology* 99(2):155-168.