

Revisión / Revision

GENOTOXICIDAD Y CITOTOXICIDAD DE PESTICIDAS. EVALUACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS Y FORMULACIONES COMERCIALES USADAS EN ARGENTINA

GENOTOXICITY AND CYTOTOXICITY OF PESTICIDES. EVALUATION
OF THE ACTIVE INGREDIENTS AND COMMERCIAL FORMULATIONS
USED IN ARGENTINA

NORMA VIVIANA GONZÁLEZ*, GABRIELA MOLINARI*, SONIA SOLONESKI,
MARCELO L. LARRAMENDY

* Igual contribución

Cátedra de Citología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo de La Plata,
Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina

Autor para correspondencia: Dr. Marcelo L. Larramendy, Cátedra de Citología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo
de La Plata, Calle 64 Nro. 3, 1900 La Plata, Argentina, fax (+54) 221 425 8252, email: m_larramendy@hotmail.com

RESUMEN

En el presente trabajo de revisión hemos descrito en forma general los antecedentes históricos de los pesticidas y el uso mundial de los mismos. Además, evaluamos comparativamente los efectos genotóxicos y citotóxicos de principios activos y formulaciones comerciales de pesticidas masivamente utilizados en Argentina en células de mamíferos *in vitro*. Entre los mismos, hemos seleccionado al herbicida Dicamba y su formulación comercial Banvel® (52% Dicamba) y al endectócido Ivermectina y su formulación Ivomec® (1% Ivermectina). La genotoxicidad y citotoxicidad de los compuestos fue cuantificada mediante el empleo de diversos bioensayos tales como frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas, ensayo cometa, análisis de la progresión del ciclo celular, índice de replicación proliferativa y ensayos de rojo neutro y MTT en linfocitos humanos y líneas celulares establecidas de roedores. Los resultados obtenidos pusieron en evidencia que el daño inducido por el Banvel® fue marcadamente superior que el ocasionado por Dicamba, demostrando la existencia de xenobióticos presentes en el excipiente con una capacidad tóxica aditiva sobre el principio activo. Opuestamente, dicho efecto no fue observado en la formulación comercial de la Ivermectina, Ivomec®. Estos resultados ponen de manifiesto que: 1) Resulta insuficiente en estudios de biomonitorio conocer solamente los efectos tóxicos de los principios activos de un pesticida; 2) Los efectos tóxicos del los pesticidas deben ser evaluados y determinados en sus formulaciones comerciales disponibles en el mercado; 3) Los efectos deletéreos del/los excipiente/s presente/s en la/s formulaciones comerciales no deben ser descartados ni subestimados; 4) Un único ensayo de genotoxicidad/citotoxicidad es insuficiente para caracterizar la toxicidad de un pesticida en estudio.

Palabras clave: Pesticidas, formulaciones comerciales, dicamba, ivermectina, citotoxicidad, genotoxicidad.

ABSTRACT

In this review we summarized a general background of the history and the use of the pesticides worldwide. Furthermore, we evaluated comparatively the genotoxic and cytotoxic effects exerted in mammalian cells *in vitro* by several pure pesticides and their technical formulations commonly used in Argentina. Among them, the herbicide Dicamba and Banvel® (52% Dicamba) and the endectocide Ivermectin and Ivomec® (1% Ivermectin) are included. The sister chromatid exchange frequency, comet assay, cell-cycle progression analysis, proliferative replication index, MTT and neutral red assays were used as end-points for measuring genotoxicity and cytotoxicity in several cell systems including human lymphocytes and rodent cell lines. The

results clearly demonstrated that the damage induced by the commercial formulation Banvel® are in general greater than those produced by the pure pesticide Dicamba, demonstrating the presence of deleterious components in the excipients with a toxic additive effect over the pure chemicals. Finally, no such an effect was detected for the excipients present in the formulation of the Ivermectin. Accordingly, these observations highlight that: 1) A complete knowledge of the toxic effect/s of the active ingredient is not enough in biomonitoring studies; 2) Pesticide/s toxic effect/s should be evaluated according to the commercial formulation available in market; 3) The deleterious effect/s of the excipient/s present within the commercial formulation should not be either discarded nor underestimated, and 4) A single bioassay is not enough to characterize the toxicity of a pesticide under study.

Keywords: Pesticides, commercial formulations, dicamba, ivermectin, cytotoxicity, genotoxicity.

Recibido: 03.06.08. Revisado: 23.07.08. Aceptado: 16.12.08.

ANTECEDENTES GENERALES

Un factor decisivo de la Revolución Verde ha sido el desarrollo y aplicación de plaguicidas para combatir una gran variedad de organismos perjudiciales para los cultivos que, de lo contrario, disminuirían el volumen y calidad de la producción alimentaria. En lugares donde se practica el monocultivo intensivo, los plaguicidas constituyen el método habitual de lucha contra las plagas. Por desgracia, los beneficios aportados por la química han ido acompañados de una serie de perjuicios, algunos de ellos tan graves que ahora representan una amenaza para la supervivencia a largo plazo de importantes ecosistemas. Además, los plaguicidas pueden tener importantes consecuencias para los organismos a quienes no están destinados ya que, simultáneamente con el aumento de su uso, crecieron muy significativamente los accidentes y enfermedades asociadas a éstos. Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que anualmente se intoxican dos millones de personas por exposición directa o indirecta a plaguicidas (<http://www.who.int/en/>). De ese total, las 3/4 partes de los afectados pertenecen a los países subdesarrollados, donde se utiliza el 25% de la producción mundial de los mismos (<http://www.who.int/en/>). Consecuentemente, los países desarrollados han prohi-

bido muchos de los plaguicidas antiguos debido a sus impactos negativos sobre los ecosistemas y/o efectos tóxicos potenciales sobre la salud humana, ya que se ha comprobado de manera fehaciente propiedades tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas en muchos de los más utilizados (IARC, 1976, 1986, 1987, 1991).

Cabe destacar que durante las últimas décadas, tanto los conceptos de plaguicidas como de los compuestos incluidos en esta categoría de sustancias han ido evolucionando para lograr una definición más precisa de los mismos al igual que el concepto de organismo plaga. Otro aspecto a destacar es que todos los seres vivos, sean éstos organismos plaga así como aquellos organismos no blanco de los plaguicidas —ya sea por exposición accidental, laboral o por consumo—, están directa o indirectamente expuestos no sólo a los principios activos de los plaguicidas sino a sus formulaciones comerciales. Estas formulaciones comerciales son mezclas de un principio activo con actividad tóxica y un excipiente teóricamente inerte 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 es, en muchos casos, más perjudicial que el

daño ocasionado por el compuesto activo (IARC, 1987, 1991).

En la presente revisión brindaremos algunos ejemplos prácticos y comparativos sobre el efecto deletéreo inducido por formulaciones comerciales en relación a su principio activo de algunos plaguicidas empleados masivamente en el sector agropecuario de la República Argentina. Se prestará especial atención al herbicida fenoxiacético pre y postemergente Dicamba (DC) utilizado en forma selectiva para combatir malezas de hoja ancha en cultivos de interés agroecológico y a un antibiótico macrocíclico, la Ivermectina (IVM), lactona de amplio espectro utilizada mundialmente para combatir las parasitosis del ganado, animales domésticos y del ser humano. Para ello realizaremos un recorrido previo en torno a las conceptualizaciones de los plaguicidas, un breve relato sobre su historia acompañado de su incidencia en la salud humana y medio ambiental. Finalizaremos esta revisión presentando los resultados sobre el potencial genotóxico y citotóxico de ambos compuestos y algunas de sus formulaciones comerciales obtenidos en nuestro laboratorio mediante ensayos *in vitro*.

PLAGUICIDA Y PESTICIDA

Alcances y limitaciones de su definición

La palabra plaguicida, según la Real Academia Española (<http://www.rae.es>), es sinónimo de pesticida y hace referencia a los agentes que se emplean para combatir plagas. Los plaguicidas pueden ser definidos desde ámbitos más específicos. La Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. (EPA, por su sigla en inglés), uno de los referentes mundiales en materia de plaguicidas, regula el empleo de los mismos bajo la autoridad de la Ley Federal Sobre Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas (FIFRA, por su sigla

en inglés). La misma establece que son considerados plaguicidas: 1) “cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinados para prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier plaga”; 2) “cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinados a ser empleadas como reguladoras de plantas, defoliantes o disecantes” y, 3) “cualquier estabilizante del nitrógeno” (<http://www.epa.gov/aboutpesticides>). El alcance de esta definición puede ser mejor comprendido si se considera el concepto de plaga de acuerdo a la misma ley. En ella se establece que una plaga es: 1) “cualquier insecto, roedor, nematodo, hongo, maleza,” o 2) “cualquier otra forma de vida animal o vegetal terrestre o acuática, o virus, bacteria u otro microorganismo que se declare como plaga” (<http://www.epa.gov/pesticides/about/>).

Los ejemplos más familiares de plaguicidas incluyen aquellos empleados para eliminar malezas e insectos que pueden reducir el rendimiento y dañar la calidad de las cosechas agrícolas, plantas ornamentales, bosques, estructuras de madera y también pasturas. Esta amplia definición también incluye a otros productos cuyos usos como plaguicidas son menos reconocidos. Por ejemplo, las sustancias empleadas para controlar mohos, royas, algas y otros organismos perjudiciales que crecen sobre maquinarias, en la superficie del agua o en granos almacenados, son también plaguicidas. El término también se aplica a los desinfectantes y agentes para esterilización, repelentes para insectos, venenos para combatir roedores, entre otros. Una discusión pormenorizada sobre qué es y qué no es un plaguicida, en el contexto de la ley FIFRA, puede consultarse en Fishel (2006).

Un segundo ámbito específico para definir a los plaguicidas es la brindada por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por su sigla en inglés). Esta entidad contempla como plaguicida a: “cualquier sustancia o

mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, maderas y sus productos o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos” (<http://www.fao.org>).

De las definiciones anteriores surge que el término plaguicida engloba una enorme cantidad de compuestos activos, sustancias inertes de acompañamiento y disolventes que hacen difícil su acotamiento como una familia o tipo de compuestos. La EPA tiene registradas 1.500 sustancias activas en 50.000 plaguicidas comerciales diferentes (Domenech, 2004). A raíz de ello es preciso hacer una primera puntualización en cuanto a las denominaciones y definiciones usadas erróneamente en referencia a términos como compuestos fitosanitarios, plaguicidas, fertilizantes y agroquímicos.

Los productos fitosanitarios engloban al arsenal químico utilizado para el control de plagas, sea cual sea su origen (animal o vegetal). Así, bajo esta denominación están los herbicidas, acaricidas, nematocidas, fungicidas e insecticidas. Estos compuestos suelen encuadrarse bajo el vocablo genérico de plaguicidas o pesticidas. Cabe destacar que bajo el término de fitosanitarios se incluyen también sustancias reguladoras del crecimiento (fitoestimulantes o fitohormonas). Los fertilizantes son compuestos añadidos para mejorar el rendimiento de la planta en cuanto a su crecimiento y productividad, su potencial tóxico es mucho menos acentuado que los anteriores; y en lo que a los agroquímicos respecta, éstos engloban a todos aquellos insumos de síntesis aplicados al campo, es decir fertilizantes y plaguicidas (Domenech, 2004).

Breve historia

Fuera de los contextos institucionales antes desarrollados todas las personas poseen una noción intuitiva acerca de las plagas y de los plaguicidas, nociones totalmente orientadas hacia el beneficio propio. El hombre lucha contra organismos que afectan sus intereses de alguna forma, ya fuera por interferir en la producción de alimentos como por diseminar enfermedades o sencillamente constituir molestias por su mera presencia (Aspelin, 2003). El primer uso intencional de un plaguicida se remonta a 2.500 años a.C. cuando los sumerios cubrían sus cuerpos con compuestos azufrados para repeler insectos y ácaros (Taylor *et al.*, 2006). Los griegos y los romanos usaron diferentes sustancias químicas para controlar plagas de insectos, principalmente compuestos azufrados y extractos vegetales (Aspelin, 2003; Ware, 2004). Hacia el año 1000 a.C., Homero refirió la utilidad del sulfuro como un agente antiplaguicida (Ware, 2004).

Durante varios siglos la lucha contra las plagas se basó en el uso de algunas sustancias químicas que fueron identificadas como útiles para combatir insectos, ratas y ratones. Sin embargo, la lucha no fue exitosa en la medida que los organismos plaga no eran bien conocidos y que las medidas implementadas incluían no sólo conocimientos empíricos, sino también prácticas religiosas y mágicas (Aspelin, 2003). El progreso en el conocimiento y uso de sustancias plaguicidas se vio estancado hasta el Renacimiento, cuando se emplearon prácticas de control sobre la base de observaciones más precisas, entre ellas el uso de extractos de hojas de tabaco (Taylor *et al.*, 2006).

Nuevas estrategias se inician de manera más rigurosa y sistemática recién en el siglo XIX mediante la aplicación de elementos naturales como el azufre, cobre, arsénico y fósforo de los cuales se descubrió su acción plaguicida (Aspelin, 2003; Stephenson y

Solomon, 1993). Se destacan productos de empleo masivo como el verde de París y la mezcla de Bordeaux la cual actualmente continúa siendo un fungicida empleado en diversos cultivos (Aspelin, 2003; Taylor *et al.*, 2006). También en este siglo comienza el uso de los primeros plaguicidas orgánicos como los nitrofenoles, clorofenoles, creosota, naftaleno y aceites derivados del petróleo (Taylor *et al.*, 2006).

La génesis de la era moderna de los plaguicidas se inicia en 1939 con el descubrimiento de las propiedades insecticidas del DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) y su primer uso durante la Segunda Guerra Mundial (IARC, 1991; Ware, 2004). Su facilidad de obtención y aplicación, la rapidez de sus resultados y su costo reducido extendieron rápidamente su uso indiscriminado, sin sospechar los efectos negativos sobre los seres vivos y el ambiente (<http://iibce.edu.uy/posdata/drit.html>). Se convirtió en el arma preferida en la lucha contra la malaria y el tifus pero su uso agrícola fue prohibido en casi todos los países a partir de los '70, tras la comprobación de ciertos peligros para la salud humana y el medio ambiente (<http://npic.orst.edu/npicfact.html>).

Es después de la segunda gran guerra cuando el uso de los plaguicidas se extiende por todo el mundo desarrollado. Desde entonces se han producido importantes avances en la producción y uso de plaguicidas (Aspelin, 2003), estrechamente vinculados con los cambios introducidos en los modelos de producción y cultivo que duplicaron la productividad de la agricultura respecto al resto de la economía (<http://iibce.edu.uy/posdata/drit.html>). Una intensa actividad en el campo de la investigación devino en el empleo de numerosos plaguicidas organosintéticos, inicialmente los organoclorados, seguidos luego por otros plaguicidas más "suaves" como los organofosforados y los carbamatos (Mondragón Aguilar, 2002). En

conjunto, estos plaguicidas organosintéticos poseen un amplio espectro de propiedades insecticidas, fungicidas o herbicidas.

La aplicación de enormes cantidades de plaguicidas se tornó una práctica habitual para combatir organismos perjudiciales (Mondragón Aguilar, 2002). Sin embargo, un problema inesperado fue el desarrollo de resistencia por parte de ciertas plagas, particularmente de los insectos frente a la constante presión ejercida por los pesticidas. Este problema continúa hasta nuestros días; se calcula que unas 500 especies de insectos presentan algún nivel de resistencia al menos a un tipo de insecticida (Taylor *et al.*, 2006). Tras años de empleo masivo, los residuos de pesticidas empezaron a aparecer en diversos organismos y la bioacumulación resultó manifiesta en los niveles más altos de las cadenas tróficas (Mondragón Aguilar, 2002). Así, en la década de 1960 surge la preocupación por estas consecuencias indeseables, preocupación que se origina entre los investigadores y llega a la población general a través del libro "Primavera silenciosa" (Carson, 1962) proporcionando unidad y fuerza a lo que hasta entonces era una conciencia incipiente. Entre los '60-'80 se incorporan al mercado nuevas familias de químicos, entre ellas las triazinas (1969), los piretroides sintéticos (1979) y las sulfonilureas (1985). La introducción de nuevos plaguicidas hasta llegar a la actualidad ha continuado a un ritmo menor a lo acaecido tras la Segunda Guerra Mundial por satisfacer los estándares de seguridad, salud y ambiente requeridos por las entidades responsables de la regulación de su empleo (Aspelin, 2003). Por último, cabe considerar a los biopesticidas, introducidos en el mercado como alternativas más seguras que no producen bioacumulación ni persisten en el ambiente (Ware, 2004). Se trata de ciertos tipos de pesticidas derivados de materiales naturales obtenidos de animales, plantas, bacterias y

algunos minerales (<http://www.epa.gov>). A fines de 2001, EE.UU. contaba con 200 ingredientes activos de biopesticidas registrados y 800 productos comerciales (Ware, 2004).

Medioambiente y salud humana y animal

El uso continuo e indiscriminado de los plaguicidas no sólo ha causado enfermedades y muertes por envenenamiento a corto y largo plazo (Waterhouse *et al.*, 1996), sino también ha afectado al medio ambiente, acumulándose por bioconcentración en los distintos eslabones de la cadena alimenticia, en el suelo y en el agua (Freemark y Boutin, 1995). Los plaguicidas son responsables además de la resistencia a insecticidas y herbicidas (Bourguet *et al.*, 2000), sin por ello restar importancia a la destrucción de parásitos, predadores naturales y polinizadores, entre otros tantos integrantes del ecosistema, los que han visto alterado su ciclo de vida a causa de estos productos (Freemark y Boutin, 1995).

Simultáneamente con el aumento del uso y abuso de plaguicidas, los accidentes y enfermedades asociadas crecieron muy significativamente (<http://iibce.edu.uy/posdata/drit.html>). Estudios *in vitro* e *in vivo* han puesto de manifiesto que la exposición prolongada a compuestos organoclorados, tales como el DDT y sus metabolitos, el MXC (metoxicloro [1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-metoxifenil)etano]), el TCPM (tris-(4clorofenil)metanol) y el lindano, entre otros, está asociada con anormalidades reproductivas en varias especies animales y son capaces de influenciar el desarrollo de los ovocitos y la preimplantación embrionaria (Walker *et al.*, 2000). Los pesticidas organoclorados poseen propiedades estrogénicas resultando en efectos adversos sobre el sistema reproductivo en hembras de varias especies animales (Kupfer, 1975). Estos compuestos pueden ser capaces de interactuar

directa o indirectamente con la estructura, función y patrón hormonal o alterar el número de receptores hormonales y su afinidad por moléculas específicas (Tiemann, 2008). Actúan, además, alterando el desarrollo ovárico y su función así como también la actividad del endometrio desencadenando alteraciones durante la implantación (Rosselli *et al.*, 2000; Tiemann, 2008).

Evidencias epidemiológicas sugieren que la exposición accidental a plaguicidas y a otros compuestos medioambientales, puede tener un papel en la etiología de ciertas enfermedades, tales como la enfermedad idiopática de Parkinson (Dhillon *et al.*, 2008). Estudios en modelos animales y celulares sugieren que los pesticidas causarían un proceso neurodegenerativo que conllevaría al desarrollo de esta patología (Costello *et al.*, 2009). Sin embargo, los datos epidemiológicos sobre personas expuestas con riesgo de contraer la enfermedad resultarían insuficientes y escasos para avalar dichas sugerencias. Se realizaron estudios de caso-control para evaluar el posible riesgo de contraer dicha patología ante la exposición a diversos pesticidas como rotenona, paraquat y maneb (Costello *et al.*, 2009; Dhillon *et al.*, 2008). Los resultados evidenciaron que las exposiciones a maneb y paraquat, o a una combinación de ambos, incrementaron significativamente el riesgo de contraer la enfermedad, particularmente en sujetos jóvenes o cuando la exposición ocurre a temprana edad (Costello *et al.*, 2009). De forma semejante, ha sido demostrado un aumento entre el riesgo de contraer el mal de Parkinson con la exposición a rotenona y otros pesticidas (Dhillon *et al.*, 2008).

Aunque los pesticidas han sido diseñados para ofrecer una alta especificidad de acción, su uso genera innumerables efectos indeseados como la generación de organismos resistentes, la persistencia ambiental de residuos tóxicos y la contaminación de recursos hídricos con degradación de la flora

y fauna. La adquisición de resistencia en la especie a combatir requiere de un incremento de las cantidades necesarias de pesticida usado y/o su sustitución por agentes más tóxicos para lograr controles aún más efectivos. (<http://iibce.edu.uy/posdata/drit.html>).

Los efectos adversos producidos por los pesticidas dependen del compuesto, la dosis, la vía y el tiempo de exposición ocasionando efectos agudos, que pueden conducir al deceso del individuo, asociados generalmente a accidentes donde una única dosis alta es suficiente para provocar tempranamente dichos efectos. Opuestamente, los efectos pueden ser crónicos debido a exposiciones repetidas cuyos síntomas y signos aparecen luego de un lapso prolongado de contacto con el pesticida (<http://iibce.edu.uy/posdata/drit.html>).

En lo particular, en la República Argentina, datos publicados durante el “Taller Regional sobre Intoxicaciones por Plaguicidas y Armonización en la Recolección de la Información” (Ministerio de Salud, Secretaría de Programas Sanitarios, Subsecretaría de Programas de Prevención y Promoción, Argentina, 2003) ponen de manifiesto la relevancia de las exposiciones e intoxicaciones causadas por plaguicidas. Las estadísticas demuestran que el 92% de las mismas se deben a uso domiciliario (Tabla I). De la misma fuente es factible identificar a los herbicidas y los insecticidas fosforados como los causales de mayor incidencia de exposiciones-intoxicaciones a plaguicidas de uso agrícola y en menor escala a los insecticidas carbamatos y piretroides y a fungicidas (Fig. 1).

Tabla I. Exposiciones-intoxicaciones por plaguicidas según tipo de plaguicida.

Tipo de plaguicida	Nº	%
Plaguicida de uso doméstico	3.561	91,75
Plaguicida de uso agrícola	287	7,4
Agroquímico no plaguicida	33	0,85
Total	3.881	100

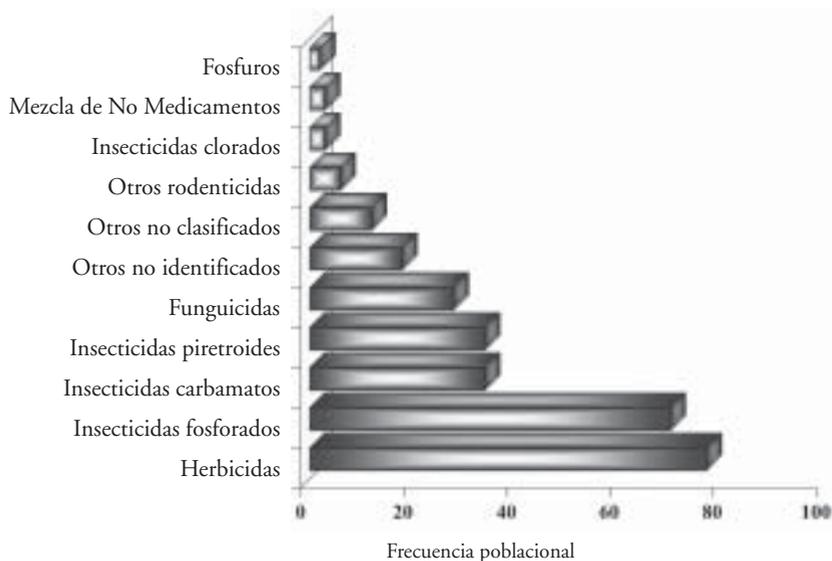


Figura 1. Incidencia de exposiciones-intoxicaciones a plaguicidas de uso agrícola en Argentina.

ENSAYOS DE GENOTOXICIDAD Y CITOTOXICIDAD DE PLAGUICIDAS DE USO MASIVO EN ARGENTINA

Análisis del herbicida fenoxiacético Dicamba y su formulación comercial Banvel®

El DC (ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico o 2-metoxi 3,6 diclorobenzoico) se caracteriza por ser un compuesto de fórmula empírica $C_8H_6Cl_2O_3$. Este compuesto pertenece a la familia del ácido benzoico. Es soluble en agua (6,5 g/l a 25°C), tiene una baja volatilidad (9,24 x10-6 mm Hg a 25°C) y es estable a la oxidación e hidrólisis en condiciones ambientales (EPA, 1983).

El modo de acción del DC se vincula con su agonismo respecto de las auxinas. Causa el crecimiento descontrolado y rápido de los tallos, pecíolos y hojas en las plantas sensibles. La división celular excesiva, a su vez, resulta en la destrucción de los tejidos vasculares que conducen a la muerte del vegetal. El control de las malezas se logra en 5 a 7 días (EPA, 1983, 2006). Se registró por primera vez en los EE.UU. en 1967 para ser empleado como herbicida selectivo para el control pre- y post-emergente de malezas de hoja ancha, aunque fue descrito y patentado en 1961 por Velsicol Chemical Corp. (EPA, 1983). Los usos registrados incluyen su aplicación en cultivos de avena, cebada, centeno, trigo, maíz, sorgo, soja y caña de azúcar como también en campos de golf, parques y jardines urbanos (EPA, 1983). Las formulaciones comerciales de DC frecuentemente contienen otros principios activos, entre otros 2,4-D y mecoprop, que proveen un espectro más amplio en el control de malezas (EPA, 1983).

En 2006, el DC fue evaluado por la EPA, como parte de un programa que incluye la revisión de los pesticidas registrados antes de noviembre de 1984. El objetivo de la misma fue reevaluar los riesgos potenciales

de su uso, teniendo en cuenta la salud humana y los efectos ecológicos del herbicida. La información que se consigna a continuación proviene del documento de la mencionada revisión ("Reregistration Eligibility Decision for Dicamba and Associated Salts") publicado por la EPA (2006).

La información toxicológica sobre el DC en ensayos de toxicidad aguda indica que en ratas la DL_{50} es 2740 y 2000 mg/kg para la toxicidad oral y dérmica, respectivamente, mientras que una CL_{50} de 5,3 mg/l fue determinada para la toxicidad por inhalación. Por estos hallazgos, ha sido categorizado como compuesto clase III y IV por la EPA (<http://www.epa.gov>). Los ensayos de toxicidad crónica realizados mediante un estudio reproductivo multigeneracional en ratas permitieron establecer valores de NOAEL y LOAEL de 45 y 136 mg/kg/día, respectivamente. Se encontró una reducción en el peso de las crías a partir de un valor de LOAEL de 136 mg/kg/día (<http://www.epa.gov>).

El DC es ampliamente utilizado por su capacidad herbicida en todo el mundo. Así, por ejemplo en EE.UU. se encuentra entre los 15 herbicidas más empleados en el sector agrícola durante el período 1987-2001. Su consumo como principio activo se estima en el rango de 2.268 - 3.175 toneladas en el año 2001. En el mismo país, fuera del sector agrícola, el DC ocupa el sexto lugar entre los 10 principios activos herbicidas más empleados en hogares, jardines, industrias y comercios. Los montos de su consumo, expresados en toneladas, se calculan en el rango de 907 - 1.814 en el año 2001 (Kiely *et al.*, 2004). En Argentina es uno de los herbicidas auxínicos de mayor uso, utilizado a través de sus múltiples derivados comerciales, en el tratamiento de cultivos agrícolas. Según datos del informe Benbrook (2005) en la cosecha 2003/2004 se aplicaron 41.300 toneladas de otros herbicidas distintos del glifosato en las plantaciones de soja. El uso

del herbicida 2,4-D aumentó en un 10% desde el año 2001 y el del DC en un 157% (Benbrook, 2005). Según el CASAFE, durante el año 2007, en Argentina, 24 empresas de agroquímicos comercializaron 35 productos formulados que contienen DC (<http://www.casafe.org>).

Las investigaciones sobre los riesgos ambientales del DC revelan que este compuesto es muy soluble y móvil en estudios de suelo realizados en laboratorio (EPA, 2006). El metabolismo aeróbico en los suelos es el principal proceso de degradación de este ácido benzoico. Su vida media es de 6 días con la formación de DCSA (3,6-diclorosalicílico), un metabolito que se degrada en la misma proporción que el principio activo (EPA, 2006). Bajo condiciones anaeróbicas, el DC tiene una vida media de 141 días y su principal metabolito es también el DCSA (EPA, 2006). Hasta el presente, no se dispone de datos relacionados con el metabolismo aeróbico de este herbicida en cuerpos de agua. Los datos disponibles sobre la toxicidad aguda en especies acuáticas indican que el DC es levemente tóxico para los peces y los invertebrados, con una CL_{50} de 28 mg/l (EPA, 2006). En el caso de la vegetación acuática, el DC no resulta tóxico para plantas vasculares pero de acuerdo a los estándares gubernamentales establecidos sería potencialmente riesgoso para plantas no vasculares en las cuales afectaría el crecimiento y el desarrollo (EPA, 2006). En particular, las dicotiledóneas son mucho más sensibles al DC que las monocotiledóneas (EPA, 2006). Las sales de DC se han clasificado como prácticamente no tóxicas para especies aviares (EPA, 2006); la forma ácida del DC recibe la misma categoría en el caso de pequeños mamíferos sometidos a una exposición oral aguda (EPA, 2006). Sin embargo, de acuerdo a estudios en los cuales se estima el riesgo por el consumo crónico de vegetales y otros alimentos que contienen residuos de DC, los mamíferos estarían en

riesgo potencial por efectos adversos ocasionados sobre la reproducción y el desarrollo o bien por efecto directo derivado de la ingesta de materia vegetal (EPA, 2006).

Los estudios sobre la genotoxicidad y citotoxicidad del DC y sus formulaciones comerciales han abordado sus efectos en distintos organismos –bacterias, vegetales, insectos, roedores, seres humanos– y diversos tipos celulares. En sistemas bacterianos el DC induce mutaciones inversas en diferentes cepas de *Salmonella typhimurium* (Plewa *et al.*, 1984) y daño en el ADN de *Bacillus subtilis* rec A y *Escherichia coli* pol A (Leifer *et al.*, 1981; Waters *et al.*, 1981). *Arabidopsis thaliana* y *Tradescantia sp.* tratadas con DC y/o una de sus formulaciones comerciales evidenciaron un efecto significativo en la frecuencia de recombinación homóloga A → G (Filkowski *et al.*, 2003) y un aumento dosis-dependiente en la frecuencia de micronúcleos (Mohammed y Ma, 1999), respectivamente. En sistemas animales se conoce que el DC induce la proliferación de peroxisomas (Espandiar *et al.*, 1995), la pérdida de la actividad fosforilativa en mitocondrias (Peixoto *et al.*, 2003a, b) y tiene actividad promotora en un modelo de estudio de carcinogénesis en ratas (Espandiar *et al.*, 1999).

También se cuenta con estudios del daño inducido por el DC en el ADN en sistemas animales. Las investigaciones de Hrelia (1994) demostraron que el herbicida no induce aberraciones cromosómicas en las células de la médula ósea de ratas expuestas *in vivo*. Waters (1981) encontró que el DC no induce mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en *Drosophila melanogaster*. A diferencia de los resultados anteriores, el potencial genotóxico del DC ha sido demostrado en diversos sistemas *in vitro*; entre ellos se cuentan los ensayos realizados en linfocitos humanos (Perocco *et al.*, 1990) y en líneas celulares establecidas (Sorensen *et al.*, 2004, 2005). Estudios realizados en cultivos de linfocitos humanos tratados con DC muestra-

ron un incremento significativo de la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICHs) tanto en ausencia como en presencia de la fracción metabólica S-9 (Perocco *et al.*, 1990). En ensayos en los cuales se emplearon células de ovario de hámster chino (CHO), la interacción del DC con esmectitas indujo mayor daño en el ADN que el compuesto puro, valorado mediante el ensayo cometa (Sorensen *et al.*, 2004, 2005).

En nuestro laboratorio hemos evaluado el daño genotóxico y citotóxico ejercido por el DC y su formulación comercial Banvel® mediante ensayos *in vitro* de genotoxicidad y citotoxicidad en un rango de concentraciones de 10,0-500,0 µg/ml y de 1,0-500,0 µg/ml en linfocitos humanos (González *et al.*, 2006) y células CHO-K1 (González *et al.*, 2007, 2009), respectivamente. En linfocitos humanos, concentraciones de 200,0 µg/ml de DC y 500,0 µg/ml de Banvel® ejercieron un aumento significativo de la frecuencia de ICHs que no resultaron ser concentración-dependiente. La progresión del ciclo celular de los linfocitos mostró variaciones debidas a un alargamiento del ciclo celular y por consiguiente a una reducción en el índice de replicación celular luego del empleo de concentraciones de 100,0-200,0 µg/ml y 200,0-500 µg/ml de DC y Banvel®, respectivamente (González *et al.*, 2006). En el caso de las células CHO-K1, los tratamientos con DC o Banvel® dieron como resultado un aumento de la frecuencia de ICHs para la totalidad de las concentraciones ensayadas. De manera similar a lo encontrado en los cultivos de linfocitos humanos, el incremento en la frecuencia de ICHs para las células CHO-K1 fue concentración-independiente. Asimismo, y al igual que lo observado en linfocitos humanos, el DC y el Banvel®, indujeron un retraso en la progresión del ciclo celular y, en consecuencia, una reducción en el índice de replicación celular, luego del empleo de concen-

traciones de 200,0-500,0 µg/ml y 500 µg/ml de DC y Banvel®, respectivamente (González *et al.*, 2007). El ensayo cometa mostró que ambos compuestos inducen rupturas de cadena simple en la molécula de ADN, evidenciado por un aumento en la proporción de células dañadas y una reducción en la proporción de células no dañadas luego del empleo de 50,0-500,0 µg/ml y 100,0-500,0 µg/ml de DC y Banvel®, respectivamente (González *et al.*, 2007).

Otro aspecto de estos compuestos que hemos investigado es la determinación del posible mecanismo/s por el cual los mismos ejercen daño sobre el ADN (González *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos hasta el momento nos permitirían inferir que la genotoxicidad y la citotoxicidad del DC sería ejercida mediante la liberación de especies reactivas de oxígeno en tanto que los xenobióticos presentes en el excipiente de su formulación comercial Banvel® actuarían por un mecanismo de daño distinto (González *et al.*, 2009). Esta hipótesis surge de ensayos realizados en células CHO-K1 empleando el compuesto puro o su formulación comercial en presencia y ausencia de vitamina E. La vitamina E es un poderoso agente antioxidante de comprobada acción en varios tipos celulares de mamíferos (Abid-Essefi *et al.*, 2003; Patel *et al.*, 1998; Siviková *et al.*, 2001; Soloneski *et al.*, 2003; Weitberg *et al.*, 1985). Su incorporación a los cultivos inhibió el daño ejercido por el DC, reflejado en la prevención de la muerte celular, el acortamiento del ciclo celular y en la disminución de la frecuencia de ICHs. Con respecto a los cultivos expuestos a Banvel®, la adición de vitamina E no fue capaz de inhibir totalmente los efectos genotóxicos y citotóxicos. Por este motivo ha sido posible postular que el excipiente presente en la formulación comercial ejercería su efecto deletéreo por un mecanismo no mediado por liberación de especies reactivas de oxígeno. Banvel® contiene un 42,29% de excipientes

cuya identidad no nos es conocida. Otras investigaciones han demostrado que las formulaciones comerciales de ciertos pesticidas poseen capacidad de inducir daño en el ADN, independientemente del principio activo contenido en las mismas (Brand y Mueller, 2002; Kaya *et al.*, 1999; Soloneski *et al.*, 2002, 2008; Zeljezic *et al.*, 2006). Nuestros resultados avalarían estas observaciones y corroborarían que el efecto deletéreo inducido por el Banvel® se debería a la presencia de xenobióticos con capacidad genotóxica y citotóxica los cuales estarían actuando por un mecanismo distinto al propuesto para el compuesto puro (González *et al.*, 2009).

ANÁLISIS DEL ANTIHELMÍNTICO IVERMECTINA Y SU FORMULA- CIÓN COMERCIAL IVOMEC®

La IVM, un endectócido semisintético que actúa contra un rango diverso de nemátodos, insectos y arácnidos, tiene sus orígenes en el Instituto Kitasato de Japón (Burg *et al.*, 1979; Kita *et al.*, 2007). Forma parte de la familia de las avermectinas, lactonas macrocíclicas que presentan un disacárido sobre el C₁₃ del macrociclo (Wei *et al.*, 2005) y de la cual también forman parte un complejo de 16 miembros relacionados químicamente que exhiben un extraordinario potencial antihelmíntico (Burg *et al.*, 1979; Yoon *et al.*, 2004). Las avermectinas son un producto natural derivado de un proceso de fermentación de una especie de actinomiceto, NRRL 8165, denominado en un principio *Streptomyces avermitilis* (Burg *et al.*, 1979; Ikeda *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 1979).

Hacia 1973, se estableció una sociedad entre investigadores del Instituto Kitasato y Laboratorios Merck, Sharpe y Dohme (MSD) de los EE.UU. (Omura, 2008; Omura y Crump, 2004). Ambos grupos de trabajo realizaron estudios *in vitro* a partir de mues-

tras de suelo colectadas en las cercanías del golfo que bordea al océano cerca de la ciudad de Ito, región de Shizuoka, Prefectura de Japón (Yoon *et al.*, 2004) y utilizaron para ello ratones infectados con el nematode *Nematospiroides dubius*. El caldo ensayado resultó ser activo contra el parásito sin evidenciar un notable efecto tóxico para el ratón (Egerton *et al.*, 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 *Streptomyces avermectinius* (Kita *et al.*, 2007; Omura y Crump, 2004; Takahashi *et al.*, 2002).

Ocho compuestos activos fueron aislados a partir de aquella muestra y denominados avermectinas A1a-B2b. Los compuestos de la serie B, que presentan un grupo 5-hidroxi, son marcadamente más activos que los de la serie A, caracterizados por presentar en su estructura química un grupo 5-metoxi. La reducción sobre el doble enlace de los C₂₂ y C₂₃ de los componentes B1a y B1b brindó a éstos un amplio espectro de actividad biocida con una muy baja toxicidad para los mamíferos. El complejo B1 resultante 22,23 dihidro (una mezcla del 80% B1a y 20% B1b) fue comercializado en 1981 como una droga de uso veterinario bajo el nombre genérico de IVM (Chabala *et al.*, 1980; Omura y Crump, 2004; Zhang *et al.*, 2006).

La IVM resultó ser altamente eficaz contra varios artrópodos parásitos, incluyendo garrapatas, pulgas, piojos, ácaros y estadios larvarios de algunos dípteros (Omura, 2008), así como también para controlar nemátodos de importancia económica que afectan el tracto gastrointestinal, pulmón y riñón del ganado, en adición a otros nemátodos como lo son *Thelazia spp.* y *Parafilaria spp.* (Campbell y Benz, 1984; Campbell *et al.*, 1983; Kita *et al.*, 2007).

La IVM no sólo es utilizada en medicina veterinaria. Es una medicación con más de

20 años de demostrada utilidad en la salud humana, siendo considerada la droga por excelencia para la filariasis linfática y la oncocercosis. Asimismo, es empleada como droga de elección en la mayoría de las infestaciones cutáneas que afectan a poblaciones de América Latina y África, entre otras (Shan *et al.*, 2001; Victoria, 2003).

Su utilidad en niños, ya sea en forma oral, a dosis de 200 mg/Kg, como en administración tópica, a dosis de 400 mg/Kg, constituye una terapia eficaz, segura, barata y de fácil administración. Sus indicaciones en endoparásitos incluyen: ascariasis, estrongiloidiasis, tricuriasis y enterobiasis. En lo que respecta a ectoparásitos es útil en pediculosis, escabiosis incluyendo la forma eritrodérmica, miasis, larva migrans cutánea, dermodicidosis, tungiasis, toxocariasis, gnatostomiasis y cisticercosis (Osorio *et al.*, 2006; Prayaga y Mannepli, 2006; Victoria, 2003). El blanco de esta actividad antiparasítica se cree corresponde a la sensibilidad a la IVM por parte del receptor de los canales de Cl⁻ dependientes de glutamato (GluClR), distribuidos en un gran número de phyla de invertebrados. Es conocido que la IVM actúa, también, como un agente anticonvulsivante en vertebrados. Teniendo en cuenta que no ha sido demostrado que existan en vertebrados los GluClRs, la acción anticonvulsivante de la IVM está asociada a receptores del ácido γ -amino butírico (GABA) tipo A (GABA_A Rs), efecto demostrado, al menos, en ratón. Los GluClR y GABA_A Rs pertenecen a la superfamilia de canales iónicos dependientes de ligando, los que presentan numerosas homologías estructurales y funcionales con otros miembros, tales como los receptores de glicina, de acetilcolina y de serotonina (Krause *et al.*, 1998; Shan *et al.*, 2001).

El mecanismo de acción de la IVM y sus análogos ha sido investigado en varios miembros de la superfamilia de canales iónicos dependientes de ligando. Haciendo total

hincapié en la acción de la IVM, droga que nos ocupa en esta revisión, se conoce que la misma activa irreversiblemente al GluClR en células nerviosas y musculares, inhibiendo la neurotransmisión al impedir el cierre de los mismos (Shan *et al.*, 2001). Consecuentemente, la membrana sináptica aumenta altamente su permeabilidad a los iones Cl⁻, los cuales hiperpolarizan la membrana neuronal y disminuyen o impiden la transmisión nerviosa. Esto conlleva a la parálisis de la musculatura somática, particularmente la faríngea, conduciendo a la muerte del parásito. Los canales de Cl⁻, relacionados con el GABA, los cuales sólo están presentes en nemátodos, insectos y garrapatas, son inhibidos únicamente a elevadas concentraciones de IVM (Omura y Crump, 2004).

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. Si bien la IVM se une a los GABA_A Rs y a los canales dependientes de glicina en mamíferos, la afinidad por los mismos en insectos es aproximadamente 100 veces mayor que la presentada en mamíferos. Debe destacarse también el importante desempeño que juega la glicoproteína P en el mantenimiento de la barrera hematoencefálica (Geoffrey, 2003), lo cual, sumado a la baja afinidad de la IVM por los receptores GABA_A Rs de mamíferos, permite la ingesta de la droga en dosis relativamente bajas con un alto grado de seguridad (Omura y Crump, 2004; Kita *et al.*, 2007).

Hasta el presente no hemos tenido conocimiento de estudios realizados sobre el posible potencial genotóxico y/o citotóxico de la IVM, ya sea sobre el organismo vector (generalmente un invertebrado) o incluso el ser humano, en los cuales el compuesto es empleado para prevenir las variadas parasitosis (Soboslay *et al.*, 1992; Amazigo, 1999; Sturchio, 2001; Rodríguez Pérez *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).

En lo que respecta a la salud humana, ha sido evaluada la actividad de la IVM como un potente inhibidor de la propagación de células tumorales (Korystov *et al.*, 2004) y su potencial de acción cuando es administrada conjuntamente con otras drogas (Amsden *et al.*, 2007). Cabe señalar que fue identificado un citocromo como la enzima responsable del metabolismo de la IVM por parte de microsomas hepáticos (Zeng *et al.*, 1998).

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. La EPA no ha arribado a ninguna conclusión acerca de la real clasificación de este compuesto. Asimismo un único miembro de las avermectinas, la abamectina, ha sido clasificado como un pesticida clase II con moderados efectos tóxicos para las especies vivientes (<http://www.epa.gov>), mientras que la IARC no ha incluido a éste antibiótico como carcinógeno (<http://www.iarc.fr>).

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 único 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 (Rodrigues y Mattei, 1987). En el mismo se observó que las células retardaban

su crecimiento en dichas condiciones de cultivo y, a su vez, que dicho efecto se potenciaba marcadamente con la adición de IVM (Rodrigues y Mattei, 1987).

Sin embargo, nuestro grupo de trabajo analizó, 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 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).

Nuestros 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. Concentraciones de 50,0-250,0 µg/ml de ambos antibióticos indujeron un notable efecto citotóxico evidenciado por una franca inhibición del crecimiento celular debido a que la actividad de las mismas disminuyó en aproximadamente un 95% respecto a los valores controles. Cabe mencionar que a bajas concentraciones (1,0-10,0 µg/ml) ambos compuestos mostraron una respuesta hormética para los ensayos de citotoxicidad empleados (Molinari *et al.*, 2008).

Mediante el uso de los diferentes ensayos de genotoxicidad, nuestros resultados demostraron que ninguno de los compuestos indujo un incremento significativo de ICHs. Por el contrario, mediante el ensayo cometa fue factible evidenciar que concentraciones tanto de IVM como de Ivomec® dentro del

rango de 5,0-50,0 µg/ml fueron capaces de inducir rupturas de cadena simple en la molécula de ADN. Estos resultados pondrían en evidencia que, si bien el antibiótico es capaz de generar lesiones en la molécula de ADN, las mismas no serían responsables de la inducción de ICHs, al menos en el sistema celular empleado (Molinari *et al.*, 2008).

Por lo antes expuesto, podemos aseverar que el antiparasitario IVM ejerce efectos deletéreos sobre el metabolismo celular y la maquinaria genética de células de mamíferos, al menos en células de la línea CHO-K1. Asimismo, las comparaciones de los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos realizados demostraron que de los dos compuestos evaluados, la IVM resultó poseer una mayor genotoxicidad y citotoxicidad respecto a concentraciones equimolares del principio activo presentes en Ivomec®. Esto último claramente pone de manifiesto, además, que el excipiente presente en la formulación comercial sería verdaderamente inerte al momento de interactuar con el sistema celular y originar en consecuencia algún tipo de daño en la misma (Molinari *et al.*, 2008).

CONSIDERACIONES FINALES

Finalmente, no podemos dejar de enfatizar el hecho que todos los seres vivos estamos directa o indirectamente expuestos, no sólo a los principios activos de los plaguicidas, sino a sus formulaciones comerciales. Las mismas siempre son mezclas de uno o varios principios activos con actividad tóxica y un excipiente teóricamente inerte 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

son, en muchos casos, más perjudiciales que el daño ocasionado por el compuesto activo. Nuestros resultados obtenidos *in vitro* no sólo son un ejemplo de este último concepto sino que ponen de manifiesto que en estudios de biomonitorio ambiental no es suficiente conocer el impacto genotóxico y citotóxico de un principio activo sino el evidenciado por el complejo principio activo-excipientes de la formulación comercial disponible en el mercado. Del mismo modo, resulta evidente que los efectos deletéreos de los excipientes presentes en las formulaciones comerciales no deben ser descartados o subestimados. Finalmente, no podemos dejar de mencionar que un único bioensayo es insuficiente como indicador para lograr caracterizar la toxicidad de un pesticida en estudio.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado a través de los proyectos subsidiados por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, PIP 6386), la Universidad Nacional de La Plata (11/N493 y 11/N564) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (BID 1728/OC-AR- PICT 2004 Nro. 26116) de Argentina.

REFERENCIAS

- ABID-ESSEFI S, BAUDRIMONT I, HASSEN W, OUANES Z, MOBIO TA, ANANE R, CREPPY EE and BACHA H (2003) DNA fragmentation, apoptosis and cell cycle arrest induced by zearalenone in cultured DOK, Vero and Caco-2 cells: prevention by Vitamin E. *Toxicology* 192, 237-248.
- AMAZIGO U (1999) Community selection of ivermectin distributors. *Community Eye Health* 12, 39-40.
- AMSDEN GW, GREGORY TB, MICHALAK

- CA, GLUE P and KNIRSCH CA (2007) Pharmacokinetics of azithromycin and the combination of ivermectin and albendazole when administered alone and concurrently in healthy volunteers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 1153-1157.
- ASPELIN AL (2003) Pesticide usage in the United States: Trends During the 20th Century. NSF CIPM Technical Bulletin 105. NSF Center for Integrated Pest Management. Disponible en URL: http://www.pestmanagement.info/pesticide_history/full_doc.pdf
- BOURGUET D, GENISSEL A and RAYMOND M (2000) Insecticide resistance and dominance levels. *J. Econ. Entomol.* 93, 1588-1595.
- BRAND RM and MUELLER C (2002) Transdermal penetration of atrazine, alachlor, and trifluralin: effect of formulation. *Toxicol. Sci.* 68, 18-23.
- BURG RW, MILLER BM, BAKER EE, BIRNBAUM J, CURRIE SA, HARTMAN R, KONG YL, MONAGHAN RL, OLSON G, PUTTER I, TUNAC JB, WALLICK H, STAPLEY EO, OIWA R and OMURA S (1979) Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15, 361-367.
- CAMPBELL WC and BENZ GW (1984) Ivermectin: a review of efficacy and safety. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 7, 1-16.
- CAMPBELL WC, FISHER MH, STAPLEY EO, ALBERS-SCHÖNBERG G and JACOB TA (1983) Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science* 221, 823-828.
- CARSON R (1962) *Silent Spring* New York: Houghton Mifflin.
- COSTELLO S, COCKBURN M, BRONSTEIN J, ZHANG X and RITZ B (2009) Parkinson's disease and residential exposure to Maneb and Paraquat from agricultural applications in the Central Valley of California. *Am. J. Epidemiol.* In Press.
- CHABALA JC, MROZIK H, TOLMAN RL, ESKOLA P, LUSI A, PETERSON LH, WOODS MF, FISHER MH, CAMPBELL WCE, J R and OSTLIND DA (1980) Ivermectin, a new broad-spectrum antiparasitic agent. *J. Med. Chem.* 23, 1134-1136.
- DHILLON AS, TARBUTTON GL, LEVIN JL, PLOTKIN GM, LOWRY LK, NALBONE JT and SHEPHERD S (2008) Pesticide/environmental exposures and Parkinson's disease in East Texas. *J. Agromedicine* 13, 37-48.
- EGERTON JR, OSTLIND DA, BLAIR LS, EARY CH, SUHAYDA D, CIFELLI S, RIEK RF and C CW (1979) Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: efficacy of the B1a component. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15, 372-378.
- ESPANDIARI P, GLAUERT HP, LEE EY and ROBERTSON LW (1999) Promoting activity of the herbicide dicamba (2-methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid) in two stage hepatocarcinogenesis. *Int. J. Oncol.* 14, 79-84.
- ESPANDIARI P, THOMAS VA, GLAUERT HP, O'BRIEN M, NOONAN D and ROBERTSON LW (1995) The herbicide dicamba (2-methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid) is a peroxisome proliferator in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 26, 85-90.
- FIEL CA, SAMUEL CA, STEFFAN PE and RODRIGUEZ EM (2001) Resistance of cooperia to ivermectin treatments in grazing cattle of the humid pampa, Argentina. *Vet. Parasitol.* 97, 211-217.
- FILKOWSKI J, BESPLUG J, BURKE P, KOVALCHUK I and KOVALCHUK O (2003) Genotoxicity of 2,4-D and dicamba revealed by transgenic Arabidopsis thaliana plants harboring recombination and point mutation markers. *Mutat. Res.* 542, 23-32.
- FISHEL FM (2006) What Is and Isn't a Pesticide? . PI-96 Pesticide Information Office. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Disponible en URL: <http://edis.ifas.ufl.edu/PI133>
- FREEMARK K and BOUTIN C (1995) Impacts of agricultural herbicide use on terrestrial wildlife in temperate landscapes: A review with special reference to North America. *Agric. Ecosyst. Environ.* 52, 67-91.
- GEOFFREY E (2003) Ivermectin: does P-glycoprotein play a role in neurotoxicity? *Filaria J.* 1-6.

- GONZÁLEZ NV, SOLONESKI S and LARRAMENDY ML (2009) Dicamba-induced genotoxicity of Chinese hamster ovary (CHO) cells is prevented by vitamin E. *J. Hazard. Mater.* 163, 337-343.
- GONZÁLEZ NV, SOLONESKI S and LARRAMENDY ML (2007) The chlorophenoxy herbicide dicamba and its commercial formulation banvel induce genotoxicity in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* 634, 60-68.
- GONZÁLEZ NV, SOLONESKI S and LARRAMENDY ML (2006) Genotoxicity analysis of the phenoxy herbicide dicamba in mammalian cells in vitro. *Toxicol. In Vitro* 20, 1481-1487.
- HRELIA P, VIGAGNI F, MAFFEI F, MOROTTI M, COLACCI A, PEROCCO P, GRILLI S and CANTELLI-FORTI G (1994) Genetic safety evaluation of pesticides in different short-term tests. *Mutat. Res.* 321, 219-228.
- IARC (1976) Some carbamates, thiocarbamates and carbazides, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, Lyon: International Agency for Research on Cancer, p. 282.
- IARC (1986) Some halogenated hydrocarbons and pesticide exposures, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, Lyon: International Agency for Research on Cancer, p. 434.
- IARC (1987) Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of IARC monographs Volumes 1 to 42, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon: International Agency for Research on Cancer, p. 440.
- IARC (1991) Occupational exposures in insecticide application, and some pesticides, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, Lyon: International Agency for Research on Cancer, p. 612.
- IKEDA H, KOTAKI H and ÖMURA S (1987) Genetics studies of avermectin biosynthesis in *Streptomyces avermectilis*. *J. Bacteriol.* 169, 5615-5621.
- INTAPAN PM, PRASONGDEE TK, LAUMMAUNWAI P, SAWANYAWISUTH K, SINGTHONG S and MALEEWONG W (2006) A modified filter paper culture technique for screening of *Strongyloides stercoralis* ivermectin sensitivity in clinical specimens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 763-564.
- KANE NS, HIRSCHBERG B, QIAN S, HUNT D, THOMAS B, BROCHU R, LUDMERER SW, ZHENG Y, SMITH M, ARENA JP, COHEN CJ, SCHMATZ D, WARMKE J and CULLY DF (2000) Drug-resistant *Drosophila* indicate glutamate-gated chloride channels are targets for the antiparasitics nodulosporin and ivermectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 13949-13954.
- KAYA B, YANIKOGLU A and MARCOS R (1999) Genotoxicity studies on the phenoxyacetates 2,4-D and 4-CPA in the *Drosophila* wing spot test. *Teratog., Carcinog. Mutagen.* 19, 305-312.
- KIELY T, DONALDSON D and GRUBE A (2004) Pesticides Industry Sales and Usage 2000 and 2001 Market Estimates. EPA. http://www.epa.gov/oppbead1/pestsales/01pestsales/market_estimates2001.pdf
- KITA K, SHIOMI K and OMURA S (2007) Advances in drug discovery and biochemical studies. *Trends Parasitol.* 23, 223-229.
- KORYSTOVYN, ERMAKOVA NV, KUBLIK LN, LEVITMAN MK, SHAPOSHNIKOVA VV, MOSIN VA, DRINYAEV VA, KRUGLYAK EB, NOVIK TS and STERLINA TS (2004) Avermectins inhibit multidrug resistance of tumor cells. *Eur. J. Pharmacol.* 493, 57-64.
- KRAUSE RM, BUISSON B, BERTRAND S, CORRINGER PJ, GALZI JL, CHANGEUX JP and BERTRAND D (1998) Ivermectin: a positive allosteric effector of the $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Mol. Pharmacol.* 53, 283-294.
- KUPFER D (1975) Effects of pesticides and related compounds on steroid metabolism and function. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 4, 83-124.
- LEIFER Z, KADA T, MANDEL M, ZEIGER E, STAFFORD R and ROSENKRANZ HS (1981) An evaluation of tests using DNA

- repair-deficient bacteria for predicting genotoxicity and carcinogenicity. A report of the U.S. EPA's Gene-Tox Program. *Mutat Res.* 87, 211-297.
- LIFSCHITZ A, VIRKEL G, BALLENT M, SALLOVITZ J, IMPERIALE F, PIS A and LANUSSE C (2007) Ivermectin (3.15%) long-acting formulations in cattle: absorption pattern and pharmacokinetic considerations. *Veterinary Parasitology* 147, 303-310.
- MILLER TW, CHAIET L, COLE DJ, COLE LJ, FLORJE, GOEGELMAN RT, GULLO V, JOSHUA H, KEMPF AJ, KRELLWITZ WR, MONAGHAN RL, ORMOND RE, WILSON KE, ALBERS-SCHÖNBERG G and PUTTER I (1979) Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: isolation and chromatographic properties. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15, 368-371.
- MOHAMMED KB and MA TH (1999) Tradescantia-micronucleus and -stamen hair mutation assays on genotoxicity of the gaseous and liquid forms of pesticides. *Mutat. Res.* 426, 193-199.
- MOLINARI G, SOLONESKI S, REIGOSA MA and LARRAMENDY ML (2008) In vitro genotoxic and citotoxic effects of ivermectin and its formulation ivomec® on Chinese hamster ovary (CHOK1) cells. *J. Hazard. Mater. In Press.*
- MONDRAGÓN AGUILAR J (2002) http://www.csr.servicios.es/LABORATORIO/DESCARGAS/LOS_INSECTICIDAS_LECTURA_AVANZADA.pdf<http://npic.orst.edu/npicfact.htm>National Pesticide Information Center (1999) DDT Technical fact sheet
- OMURA S (2008) Ivermectin: 25 years and still going strong. *Int. J. Antimicrob. Agents* 31, 91-98.
- OMURA S and CRUMP A (2004) The life and times of ivermectin -A success story. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 984-989.
- OSORIO J, MONCADA L, MOLANO A, VALDERRAMA S, GUALTERO S and FRANCO-PAREDES C (2006) Role of ivermectin in the treatment of severe orbital myiasis due to *Cochliomyia hominivorax*. *Clin. Infect. Dis.* 43, 57-59.
- PATEL RK, TRIVEDI AH, ROY SK, BHATAVDEKAR JM, SHAH PM and PATEL DD (1998) Influence of alpha-tocopherol and ascorbic acid on pan masala induced genomic damage. An in vitro experiment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 17, 419-424.
- PEIXOTO F, VICENTE JA and MADEIRA VM (2003a) Comparative effects of herbicide dicamba and related compound on plant mitochondrial bioenergetics. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 17, 185-192.
- PEIXOTO F, VICENTE JA and MADEIRA VM (2003b) The herbicide dicamba (2-methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid) interacts with mitochondrial bioenergetic functions. *Arch. Toxicol.* 77, 403-409.
- PEROCCO P, ANCORA G, RANI P, VALENTI AM, MAZZULLO M, COLACCI A and GRILLI S (1990) Evaluation of genotoxic effects of the herbicide dicamba using in vivo and in vitro test systems. *Environ. Mol. Mutagen.* 15, 131-135.
- PLEWAMJ, WAGNER ED, GENTILE GJ and GENTILE JM (1984) An evaluation of the genotoxic properties of herbicides following plant and animal activation. *Mutat. Res.* 136, 233-245.
- PRAYAGA S and MANNEPULI GB (2006) A tropical souvenir not worth picking up. *Cleve. Clin. J. Med.* 73, 458-459.
- RODRIGUES MA and MATTEI R (1987) The influence of serum substitute Ultrosor G in toxicological evaluations in mammalian cells in vitro. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 14, 269-274.
- RODRÍGUEZ PÉREZ M, KATHOLI CR, HASSAN HK and UNNASCH TR (2006) Large-scale entomologic assessment of *Onchocerca volvulus* transmission by poolscreen PCR in Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 74, 1026-1033.
- ROSSELLI M, REINHART K, IMTHURN B, KELLER PJ and DUBEY RK (2000) Cellular and biochemical mechanisms by which environmental oestrogens influence reproductive function. *Hum. Reprod. Update* 6, 332-350.
- SHAN Q, HADDRILL JL and LYNCH JW (2001) Ivermectin, an unconventional ago-

- nist of the glycine receptor chloride channel. *J. Biol. Chem.* 276, 12556-12564.
- SIVIKOVÁ K, PIESOVÁ E and DIANOVSKĀ J (2001) The protection of Vitamin E and selenium against carbon tetrachloride-induced genotoxicity in ovine peripheral blood lymphocytes. *Mutat. Res.* 494, 135-142.
- SOBOSLAY PT, DREWECK CM, HOFFMANN WH, LUDER CGK, HEUSCHKEL C, GORGEN H, BANLA M and SCHULZ-KEY H (1992) Ivermectin-facilitated immunity in onchocerciasis. Reversal of lymphocytopenia, cellular anergy and deficient cytokine production after single treatment. *Clin. Exp. Immunol.* 89, 407-413.
- SOLONESKI S, GONZÁLEZ M, PIAGGIO E, REIGOSA MA and LARRAMENDY ML (2002) Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation azzurro. III. Genotoxic evaluation on Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mutat. Res.* 514, 201-212.
- SOLONESKI S, REIGOSA MA and LARRAMENDY ML (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 MA, MOLINARI G, GONZÁLEZ NV and LARRAMENDY ML (2008) Genotoxic and cytotoxic effects of carbofuran and furadan® on Chinese hamster ovary (CHOK1) cells. *Mutat. Res.* 656, 68-73.
- SORENSEN KC, STUCKI JW, WARNER RE and PLEWA MJ (2004) Alteration of mammalian-cell toxicity of pesticides by structural iron(II) in ferruginous smectite. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4383-4389.
- SORENSEN KC, STUCKI JW, WARNER RE, WAGNER ED and PLEWA MJ (2005) Modulation of the genotoxicity of pesticides reacted with redox-modified smectite clay. *Environ. Mol. Mutagen.* 46, 174-181.
- STEPHENSON GA and SOLOMON KR (1993) *Pesticides and the Environment*, Guelph, Ontario: University of Guelph.
- STURCHIO JL (2001) The case of ivermectin: lessons and implications for improving access to care and treatment in developing countries. *Comm. Eye Health* 14, 22-23.
- TAKAHASHI Y, MATSUMOTO A, SEINO A, UENO J, IWAI Y and OMURA S (2002) *Streptomyces avermectinius* sp. nov., an avermectin-producing strain. *Int. J. Antimicrob. Agents* 52, 2163-2168.
- TAYLOR E, GORDON HOLLEY A and KIRK M (2006) *Pesticide Development a Brief Look at the History*. www.extensionforestry.tamu.edu.
- TIEMANN U (2008) In vivo and in vitro effects of the organochlorine pesticides DDT, TCPM, methoxychlor, and lindane on the female reproductive tract of mammals: a review. *Reprod. Toxicol.* 25, 316-326.
- VICTORIA J (2003) Uso de ivermectina en niños. *Dermatol. Pediatric. Lat.* 1, 61-65.
- WALKER SK, HARTWICH KM and ROBINSON JS (2000) Long-term effects on offspring of exposure of oocytes and embryos to chemical and physical agents. *Hum. Reprod. Update* 6, 564-577.
- WARE GW (2004) *The Pesticide Book*, Willoughby, Ohio: Meister Pro Information, p. 426.
- WATERHOUSE D, CARMAN WJ, SCHOTTENFELD D, GRIDLEY G and MCLEAN S (1996) Cancer incidence in the rural community of Tecumseh, Michigan: a pattern of increased lymphopoietic neoplasms. *Cancer* 77, 763-770.
- WATERS MD, NESNOW S, SIMMON VE, MITCHELL AD, JORGENSEN TA and VALENCIA R (1981) *Pesticide Chemist and Modern Toxicology*, Washington, D.C.: American Chemical Society, p. 89-113.
- WEI L, WEI G, ZHANG H, WANG PG and DU Y (2005) Synthesis of new, potent avermectin-like insecticidal agents. *Carbohydr. Res.* 340, 1583-1590.
- WEITBERG AB, WEITZMAN A, CLARK EP and STOSSEL TP (1985) Effects of antioxidants on oxidant-induced sister chromatid exchange formation. *J. Clin. Invest.* 75, 1835-1841.
- YOON YJ, KIM ES, HWANG YS and CHOI CY (2004) Avermectin: biochemical and molecular basis of its biosynthesis and regu-

- lation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 626-634.
- ZELJEZIC D, GARAJ-VRHOVAC V and 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. *Toxicol. In Vitro* 20, 923-935.
- ZENG Z, ANDREW NW, ARISON BH, LUFFER-ATLAS D and WANG W (1998) Identification of cytochrome P4503A4 as the major enzyme responsible for the metabolism of ivermectin by human liver microsomes. *Xenobiotica* 28, 313-321.
- ZHANG X, CHEN Z, LI M, WEN Y, SONG Y and LI J (2006) Construction of ivermectin producer by domain swaps of avermectin polyketide synthase in *Streptomyces avermitilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 986-994.