

ORIGINAL

## Comet assay to determine genetic damage by the use of ivermectin in zebu cows (*Bos taurus indicus*)

### Determinación mediante prueba cometa del daño genético causado por uso de ivermectina en vacas cebú (*Bos taurus indicus*)

Donicer Montes-Vergara<sup>1,2\*</sup> Ph.D, Jaime De la Ossa V<sup>1,3</sup> Ph.D,  
Alexander Pérez- Cordero<sup>1,4</sup> Ph.D.

<sup>1</sup>Universidad de Sucre, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Sincelejo-Sucre, Colombia. <sup>2</sup>Grupo de Investigación Reproducción y Mejoramiento Genético Animal. <sup>3</sup>Grupo de Investigación Biodiversidad Tropical. <sup>4</sup>Grupo de Investigación Bioprospección Agropecuaria. \*Correspondencia: [donicer.montes@unisucra.edu.co](mailto:donicer.montes@unisucra.edu.co)

Received: August 2016; Accepted: March 2017.

#### ABSTRACT

**Objective.** The objective of the work was evaluate the damage genetic caused by the use of ivermectin (IVM) in cows zebu to concentrations of 1% and 3.15% through the test comet. **Material and methods.** 15 cows, were taken with age between 3 and 4 years old, average weight of 350 kg, body condition between 3 and 3.5. Three experimental groups with five animals per group, which were exposed to the concentration of IVM to 1% to 3.15% more group control (without application of IVM) were used. Animal blood sample was performed by venipuncture jugular or medial flow with vacutainer® needle, extracting 8 ml of blood. The blood samples it was collected at 9, 18 and 27 days post-treatment. **Results.** The display of the comets is made by using fluorescence microscope, the cells were evaluated by means of visual log and the Comet image software. Evidenced the presence of nuclei with DNA migration in all analyzed plates. The values of classification of comets indicate cells with high levels of damage (grade 3: cells with high damage). The rate of DNA damage of the treatment to 1% to 3.15% was significant, to relate to the control group. **Conclusions.** The results obtained in this study demonstrate the likely genotoxic potential of the use of IVM in cattle.

**Keywords:** Genetic damage, ADN, mammals, drug (Source: CAB).

#### RESUMEN

**Objetivo.** El objetivo del trabajo fue evaluar el daño genético causado por el uso de Ivermectina (IVM) en vacas cebú (*Bos taurus indicus*). **Materiales y Métodos.** Se tomaron quince vacas, con edad entre tres y cuatro años, peso promedio de 350 kilogramos, condición corporal entre 3 y 3,5. Se utilizaron tres grupos experimentales con cinco animales por grupo, los cuales se expusieron a la concentración de IVM al 1% y 3,15% más un grupo control (sin aplicación de IVM). La muestra sanguínea por animal fue realizada mediante punción venosa yugular o caudal medial con aguja para vacutainer®, extrayéndose 8 ml de sangre. Las muestras sanguíneas fueron recolectadas a los 9, 18 y 27 días postratamiento. **Resultados.** La visualización de los cometas se realizaron con microscopio de fluorescencia, las células fueron evaluadas por medio de registro visual y por el software Comet

Imagen. Se evidenció la presencia de núcleos con migración de ADN en todas las placas analizadas. Los valores de clasificación de los cometas, denotaron células con altos niveles de daño alto (grado 3). El índice de daño del ADN de los tratamientos al 1% y 3,15% fue significativo, al relacionarlo con el grupo control. **Conclusión.** Los resultados de este estudio evidenciaron el probable potencial genotóxico del uso de la IVM en ganado vacuno.

**Palabras Clave:** Daño genético, ADN, mamíferos, fármaco (Fuente: CAB).

## INTRODUCTION

The use of chemical products to keep cattle healthy and with high yields is based on the need to meet the growing demand for animal products worldwide. Drugs are routinely and prophylactically applied to animals for the treatment of parasitic diseases. There is little knowledge of studies on the genotoxicity (defined as DNA damage) and/or cytotoxicity of IVM in individuals (vectors, mammals and humans), which is available for parasite control (1,2). However, there is a lot of *in vivo* literature associated with the evaluation of forms of administration, therapeutic doses (3), sensitivity of invertebrates to the drug (4) and resistance (5,6).

To detect the genotoxic damage caused by various agents, different tests can be used that determine alterations caused to genetic material, in both somatic and germ cells. The Comet or Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) assay detects single and double-stranded DNA damage, allowing for the evaluation of DNA fractionation and repair levels in cell populations without the need to work with proliferating cells. The name derives from the appearance of cells after the test: an intensely bright head and a tail whose length and intensity are related to the amount of chain breaks in the DNA. In contrast, undamaged cells have intact nuclei without tails (7).

All living things are directly or indirectly exposed, not only to the active components of pesticides, but also to their commercial formulation. They include mixtures of one or more active substances with toxic activity and a theoretically biologically inert excipient. However, numerous *in vitro* and *in vivo* studies have shown that, in most cases, the potential risks to which living organisms are exposed from commercial formulations are more damaging than the active compounds. The objective of this study was to evaluate the genetic damage caused by the use of Ivermectin (IVM) in zebu cattle (*Bos taurus indicus*).

## INTRODUCCIÓN

El uso de productos de origen químicos, para mantener el ganado vacuno sano y con altos rendimientos productivos, se basa en la necesidad de satisfacer la creciente demanda mundial de productos de origen animal. Los fármacos se aplican en forma habitual y con fines profilácticos a los animales de producción, para el tratamiento de enfermedades parasitarias. Se tiene poco conocimiento de estudios realizados sobre la genotoxicidad (definida como daño en el ADN) y/o citotoxicidad de la IVM en individuos (vectores, mamíferos y humanos), para los cuales el compuesto es disponibilizado para el control parasitario (1,2). Sin embargo, existe amplia literatura *in vivo* asociada a la evaluación de las formas de administración, dosis terapéuticas (3), sensibilidad de invertebrados a la droga (4) y resistencias (5,6).

Para detectar el daño genotóxico causado por variados agentes, se pueden utilizar diferentes pruebas que determinan alteraciones causadas al material genético, tanto en células somáticas como germinales. El ensayo Cometa o *Single cell gel electrophoresis* (SCGE), permite la detección de daño simple y de doble cadena de ADN, permitiendo evaluar los niveles de fraccionamiento y reparación al ADN en poblaciones celulares, sin la necesidad de trabajar con células en proliferación. 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 (7).

Todos los seres vivos están directa o indirectamente expuestos, no solo a los principios activos de los plaguicidas, sino a su formulación comercial. 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 están sometidos por exposición a formulaciones comerciales, son más perjudiciales que el daño ocasionado por el compuesto activo. El objetivo del trabajo fue evaluar el daño genético

## MATERIALS AND METHODS

**Population study.** Fifteen Cebu Brahman cows were used, between three and four years of age, with an average weight of 350 kg, body condition of between 3.0 and 3.5 and a good health status. The livestock belonged to the cattle on the Cielo Lindo Hacienda, located in the rural area of the municipality of Corozal, in the northeast region of the Department of Sucre (Colombia). This hacienda is located at an altitude of 174 masl, with an average temperature of 30°C and precipitation of 1,300 mm. The selected animals were kept in quarantine for more than seventy days, with no supply of medication before the start of the study.

**Experiment group.** A unifactorial experiment design was used, with three experiment groups, each with five animals. The first group was exposed to 1% IVM concentrations. The second group was exposed to 3.15% IVM concentrations, and the third group was the control (without an IVM application). The IVM doses corresponded to those formulated by the commercial products and their application followed the biosecurity protocols established on the hacienda. To evaluate the possible difference between the treatments and control, a one-way variance (ANOVA) analysis and multiple comparison tests of  $n$ -treatment means were performed with a Dunnett control to compare the treatments with the control, without IVM. Statistical analyzes were performed using free access software R (8).

**Collection of samples.** The blood samples were collected at 9, 18 and 27 days post-treatment with jugular vein punctures, caudal or medial, collected in Vacutainer® tubes with EDTA (anticoagulant). 8 ml of whole blood was drawn.

The samples were processed in the microbiology laboratory of the Universidad de Sucre using the comet test technique, according to the protocol of Singh et al (7), as modified by Ramírez and Cuenca (9). The parameters validated to determine the damage assessed by the comet test included: DNA migration, DNA concentration in the tail, tail moment, and Olive moment (10). For this study, the tail length ( $\mu\text{m}$ ) was used as the measurement parameter (11,12). The criterion for determining genetic damage was the mean of the control plus a standard deviation plus one ( $X \pm SD + 1$ ) and, according to this value, the type of damage was classified into five categories: 0:  $-18 \mu\text{m}$ ; 1: cells with low damage (19-37  $\mu\text{m}$ ); 2: cells with medium damage (38-56  $\mu\text{m}$ ); 3, cells with

causado por el uso de Ivermectina (IVM) en vacas cebú (*Bos taurus indicus*).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Población en estudio.** Fueron utilizadas quince vacas de la raza Cebú Brahmán entre tres y cuatro años de edad, con peso promedio de 350 kg, condición corporal entre 3.0 y 3.5 y buen estado de salud. Los semovientes, pertenecían al grupo poblacional bovino de la hacienda Cielo Lindo, ubicada en la zona rural del municipio de Corozal, localizado en la región Noreste del Departamento de Sucre (Colombia). Esta hacienda se encuentra a una altura de 174 msnm, con temperatura promedio de 30°C y precipitación de 1 300 mm. Los animales seleccionados permanecieron por más de setenta días en cuarentena, sin suministro de medicamento antes de iniciar la investigación.

**Grupo experimental.** Se realizó un diseño experimental unifactorial, con tres grupos experimentales, cada uno con cinco animales. Un primer grupo fue expuesto a concentraciones de IVM al 1%. El segundo grupo a concentración de IVM del 3.15%, y un tercer grupo utilizado como control (sin aplicación de IVM). Las dosis de IVM utilizadas, correspondieron a las formuladas por los productos comercialmente y su aplicación fue practicada según los protocolos de bioseguridad establecidos en la Hacienda. Para evaluar la posible diferencia entre los tratamientos y el control fue realizado un análisis de varianza de un factor (ANOVA) y prueba de comparaciones múltiples de medias de  $n$  tratamiento con un control de Dunnett para comparar los tratamientos con el control sin IVM. Los análisis estadísticos se realizaron con el software de acceso libre R (8).

**Obtención de las muestras.** La muestra sanguínea fue recolectada a los 9, 18 y 27 días pos-tratamiento mediante punción venosa yugular o caudal medial, recolectada en tubos vacutainer® con EDTA (anticoagulante). Fueron extraídos 8 ml de sangre entera.

El procesamiento de la muestra se realizó en el laboratorio de microbiología de la Universidad de Sucre, a través de la técnica del test cometa, según el protocolo de Singh et al (7), modificado por Ramírez y Cuenca (9). Los parámetros validados para determinar el daño evaluado mediante el test cometa fueron: migración del ADN, concentración de ADN en la cola, momento de cola, y momento Olive (10). Para este estudio, se utilizó como parámetro de medida la longitud de cola ( $\mu\text{m}$ ) (11,12). El criterio para determinar el daño genético fue la media del control más una desviación estándar más uno ( $X \pm DE + 1$ ) y, de acuerdo con este valor se clasificó arbitrariamente el tipo de daño en cinco categorías, 0: células sin daño (0-18  $\mu\text{m}$ ); 1: células con daño bajo (19-37  $\mu\text{m}$ ); 2:

high damage (57-75  $\mu\text{m}$ ) and 4: cells with total damage (greater than 75  $\mu\text{m}$ ). (13).

The total damage count was calculated using the Damage Index (DI) technique, calculated as:  $DI = \sum PDD \times DD$ , where DD is the degree of damage (from 0 to 4) and P is the percentage of cells that show damage. For each individual, 100 cells per plate (total two plates) were analyzed. The images of the comets were photographed and analyzed with the Open Comet program (14).

**Complementary material - Comet test.** Cells were suspended in 0.5% low melting agarose (PML) in PBS and pipetted onto previously coated slides with a 1% normal melting point (NMP) agarose layer. Cell suspension slides were placed on cover-slips and brought to 4°C for ten minutes, then submerged in lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub> EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 10, 1% Triton X-100 and 10 % DMSO) for one hour at 4°C in the dark to allow lysis of the embedded cells and unwinding of the DNA. After incubation of the cells in the lysis solution, the slides were exposed to an alkaline buffer solution (1mM Na<sub>2</sub> EDTA, 300 mM NaOH buffer), pH> 13, for twenty minutes to degrade the DNA. Finally, the slides were electrophoresed for twenty minutes at 25v and 300mA in the same alkaline buffer (pH> 13), after which the slides were washed with 0.4 Tris-HCl buffer (pH 7.5) to neutralize the excess alkali and remove detergents. Finally, the plates were fixed with ethanol, stained with ethidium bromide (1ug/ml) and examined under a fluorescent microscope at a 40X magnification.

## RESULTS

Regardless of the IVM concentration, the presence of nuclei with DNA migration (Figure 1a and b) was observed at a percentage greater than 75% in all cells observed per plaque, demonstrating the ability of the IVM compound to produce simple chain breaks in the DNA molecule. The comet classification values

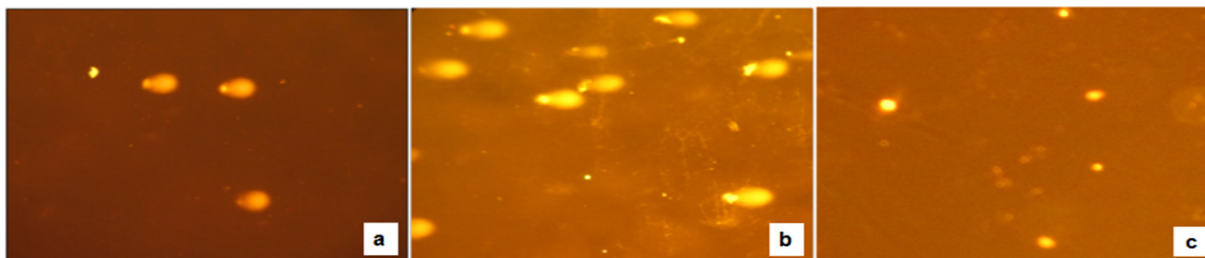
células con daño medio (38-56  $\mu\text{m}$ ): 3, células con daño alto (57-75  $\mu\text{m}$ ) y 4: células con daño total (mayor de 75  $\mu\text{m}$ ). (13).

El recuento total de daños se calculó mediante la técnica Índice de Daño (ID), calculado como:  $ID = \sum P_{GD} \times GD$ , en el cual GD es el grado de daño (desde 0 a 4) y P es el porcentaje de células que muestran ese daño. Para cada individuo se analizaron 100 células por placa (total dos placas). Las imágenes de los cometas fueron fotografiadas y analizadas con el programa Open Comet (14).

**Material complementario - Test Cometa.** Las células fueron suspendidas en 0,5% de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) en PBS y pipeteadas en portaobjetos previamente cubiertos con una capa de agarosa de punto de fusión normal (NMP) al 1%. Los portaobjetos con suspensión celular fueron colocados con cubreobjetos y llevados a 4°C por diez minutos, posteriormente fueron sumergidos en buffer de lisis, (2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 10, 1% Triton X-100 y 10% DMSO), por una hora a 4°C en oscuridad para permitir la lisis de las células embebidas y desenrollamiento del ADN. Después de la incubación de las células en la solución de lisis, los portaobjetos se expusieron a solución buffer alcalino (1mM Na<sub>2</sub>EDTA, 300 mM NaOH buffer) pH>13 por veinte minutos, para degradar al ADN. Finalmente, los portaobjetos fueron metidos a electroforesis por veinte minutos a 25 v y 300 mA en el mismo buffer alcalino (pH>13), una vez terminado este proceso, los portaobjetos, fueron lavados con buffer 0.4 Tris-HCl (pH 7.5) para neutralizar el exceso de álcali y remover los detergentes. Finalmente, las placas fueron fijadas con etanol, teñidas con bromuro de etidio (10 ug/ml) y examinadas bajo microscopio fluorescente en aumento de 40X.

## RESULTADOS

Independientemente de la concentración de IVM, se evidenció la presencia de núcleos con migración de ADN (Figura 1 a y b) en un porcentaje mayor al 75% en todas las células observadas por placa,



**Figure 1.** Optical microscopy, with 40 X magnification (a) and (b), nuclei with fragmented DNA. (c), nuclei without fragmented DNA.

a) T1= Concentración de IVM al 1%; b) T2= Concentración de IVM al 3.15%; c) T0= Sin aplicación de IVM

denoted cells with high levels of damage (Grade 3-cells with high damage).

The mean length of the tail of the 1% and 3.15% treatments was  $62.9 \pm 6.8 \mu\text{m}$  and  $69.2 \pm 4.5 \mu\text{m}$ , respectively, significant ( $p < 0.01$ ) when compared to the control group ( $10.8 \pm 3.2 \mu\text{m}$ ) (Table 1). The mean damage index seen on the sampling day (9, 18 and 27) was not significant according to the Dunnett test.

## DISCUSSION

For many years, IVM has been the best-selling antiparasitic drug in the world, but little is known about the genotoxic potential. The results of this research demonstrate the ability of IVM to induce single-strand breaks in DNA, which were evaluated using the comet assay methodology (Figure 1). The concentrations of IVM significantly increased the frequency of damaged cells, together with an increase in the amount of migrated DNA, as compared to negative control values (Table 1). *In vitro*, González et al (15) analyzed the deleterious capacity of IVM and one of its commercial formulations with a genotoxic assay. The results showed that both compounds exert a genotoxic and cytotoxic effect when exposed to equimolar concentrations of the active compound in a range of 5.0 to 50  $\mu\text{g/ml}$ , inducing single strand breaks in the DNA molecule. On the other hand, *in situ* assays, as reported by Montes et

demostrándose la capacidad que presenta el compuesto IVM para producir rupturas de cadena simple en la molécula de ADN. Los valores de clasificación de los cometas, denotaron células con altos niveles de daño (Grado 3-células con daño alto).

El promedio de longitud de la cola de los tratamiento al 1% y 3.15% fue de  $62.9 \pm 6.8 \mu\text{m}$  y  $69.2 \pm 4.5 \mu\text{m}$  respectivamente, siendo significativo ( $p < 0.01$ ), al relacionarlo con el grupo control ( $10.8 \pm 3.2 \mu\text{m}$ ) (Tabla 1). La media de índice de daño presentada por el día de muestreo (9, 18 y 27), no presentó significancia según el test de Dunnett.

## DISCUSIÓN

Durante muchos años, la IVM ha sido la droga antiparasitaria más vendida en el mundo, pero poco se conoce del posible potencial genotóxico. Los resultados de esta investigación, demuestran la capacidad de la IVM de inducir rupturas de cadena simple en el ADN, las cuales fueron evaluadas mediante el empleo de la metodología del ensayo cometa (figura 1). Las concentraciones utilizadas de IVM, incrementaron de manera significativa la frecuencia de células dañadas, junto a un incremento en la proporción de ADN migrado, respecto a los valores controles negativos (Tabla 1). De manera *in vitro*, González et al (15), analizaron mediante ensayo genotóxico la capacidad deletérea de la IVM y una de sus formulaciones comerciales, los resultados evidenciaron que ambos compuestos ejercen efecto genotóxico y citotóxico cuando

**Table 1.** Genetoxic damage caused by the IVM, evaluated with the damage index.

Treatment	Animal N°	Lamina N°	Mean (SD) of the comet cells/Field	Comet classification
*IVM at 1%	001/4	6	31.6±2.4	3±0.5
	002/4	6	30.2±3.8	3±0.6
	228/5	6	29.4, ±2.1	4±0.4
	00T/5	6	28.8±3.7	3±0.3
	005/5	6	27.5±1.9	3±0.8
	78/6	6	29.2±2.7	3±0.8
*IVM at 3.15%	004/6	6	38.7±3.9	3±0.2
	33/6	6	39.7±1.9	3±0.7
	22/5	6	29.8±3.2	4±0.5
	202/5	6	27.9±2.5	3±0.5
	127/4	6	30.5±2.4	0
<sup>b</sup> NT	3394	6	25.2±3.8	0
	559/5	6	33.8±3.6	0
	128/5	6	29.3±2.0	0
	130/5	6	38.5±2.7	0

IVM= Ivermectin. Different letters indicate significant differences according to the Dunnett test ( $p < 0.01$ ); NT= No treatment

al (16), demonstrated that concentrations IVM of 3.15% produced nuclei with DNA migration, corroborating the results of this study.

The results found in the present study constitute concrete evidence for the induction of genomic damage as exerted by IVM, using the comet assay methodology, which has been widely used to detect genomic lesions that are possibly corrected, once DNA damage is common in specific cells and tissues (17-19).

In conclusion, the results suggest that the genetic damage found in the studied livestock may be associated with the use of IVM; however, a single bioassay is insufficient as an indicator to characterize the toxicity of a studied pesticide study.

eran expuestas a concentraciones equimolares del principio activo en un rango de 5.0 a 50 µg/ml, siendo capaces de inducir rupturas de cadena simple en la molécula de ADN. Por otra parte, ensayos *in situ*, reportados por Montes et al (16), demostraron que la IVM a concentraciones de 3.15% produjeron núcleos con migración de ADN, corroborando lo resultados de esta investigación.

Los resultados hallados en el presente trabajo, constituyen una evidencia concreta respecto de la inducción de daño genómico ejercido por la IVM, mediante la metodología del ensayo cometa, el cual ha sido ampliamente utilizado para detectar lesiones genómicas que son posibles de corrección, una vez que daños en el ADN son frecuentes en células y tejidos específicos (17-19).

En conclusión los resultados obtenidos siguieren, que el daño genético encontrados en los semovientes estudiados, pueden estar asociado con el uso de la IVM, sin embargo, no podemos dejar de mencionar que un único bioensayo es insuficiente como indicador para lograr caracterizar la toxicidad de un pesticida en estudio.

## RERERENCIAS

1. Sturchio J, The case of ivermectin: lessons and implications for improving accesto care and treatment in developing countries. *Comm. Eye Health* 2001; 14(38):22-23.
2. Rodríguez M, Katholi CR, Hassan HK, Unnasch TR. Large-scale entomologic assessment of *Onchocerca volvulus* transmission by poolscreen PCR in México. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74(2):1026-1033.
3. Lifschitz A, Virkel G, Ballent M, Sallovitz J, Imperiale F, Pis A, et al. Ivermectin (3.15%) long-acting formulations in cattle: absorption pattern and pharmacokinetic considerations. *Vet Parasitol* 2007; 147(1):303-310.
4. Intapan PM, Prasongdee TK, Laummaunwai P, Sawanyawisuth K, Singthong S, Maleewong W. A modified filter paper culture technique for screening of *Strongyloides stercoralis* ivermectin sensitivity in clinical specimens. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 75:763-564.
5. Kane NS, Hirschberg B, Qian S, Hunt D, Thomas B, Brochu R, et al. Drug-resistant *Drosophila* indicate glutamate-gated chloride channels are targets for the antiparasitics nodulosporic and ivermectin. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97:13949-13954.
6. Fiel CA, Samuell CA, Steffan PE, Rodríguez EM. Resistance of cooperia to ivermectin treatments in grazing cattle of the humid pampa, Argentina. *Vet Parasitol* 2001; 97:211-217.
7. Singh NP, Mccoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of ADN damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175:184-191.
8. R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. The R Foundation for Statistical Computing; Vienna, AUT; 2015.
9. Ramírez V, Cuenca P. DNA damage in female workers exposed to pesticides in banana plantations at Limon, Costa Rica. *Rev Biol Trop* 1998; 50:507-518.

10. Ejchart A, Sadlej-Sosnowska N. Statistical evaluation and comparison of comet assay results. *Mutat Res* 2003; 534:85-92.
11. Uhl M, Helma C, Knasmüller S. Single cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (HepG2) *Mutat Res* 1999; 441:215-224.
12. Brink A, Schulz B, Kobras K, Lutz WK, Stoppe H. Time-dependent effects of sodium arsenite on DNA breakage and apoptosis observed in the comet assay. *Mutat Res* 2006; 603:121-128.
13. Ortiz IC, Pelaez CA, Orozco LY, Zuleta M. Interacciones genotóxicas de mutágenos en mezclas binarias mediante ensayo cometa alcalino en linfocitos humanos. *Biomed* 2012; 32:437-448.
14. Gyori BM, Venkatachalam G, Thiagarajan PS, Hsu D, Clement MV. Open Comet: an automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biol* 2014; 2:457-65.
15. González NV, Molinari G, Solones S, Larramendy ML. Genotoxicidad y citotoxicidad de pesticidas. Evaluación de los principios activos y formulaciones comerciales usadas en Argentina. *Theori* 2008; 17(2):27-45.
16. Montes VD, Montero Y, Roosi A, González H. Determinación de la genotoxicidad de la ivermectina a través del ensayo cometa. *Rev Colomb Cienc Anim* 2011; 3:321-327.
17. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 2004. 26:249-261.
18. Speit G, Rothfuss A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *DNA Repair Protocols*. Bjergbaek, L. editor. NY, USA; Springer-Media Business Media: 2012.
19. González TJ, Moreno RA, Quintana SM. Efecto genotóxico de las mezclas complejas de hidrocarburos en trabajadores de estaciones de servicio de gasolina. *Salud Uninorte* 2015; 31:91-100.