BAG | Journal of Basic & Applied Genetics

Vol XXXVII (1); 11-18; Jan-July 2026

Journal of the Argentine Society of Genetics

IMPACTO DEL AMITRAZ SOBRE LA INTEGRIDAD GENÉTICA Y LA VIABILIDAD CELULAR EN LINFOCITOS BOVINOS

IMPACT OF AMITRAZ ON GENETIC INTEGRITY AND CELL VIABILITY IN BOVINE LYMPHOCYTES

Pardiñas C.[1,2], Manso Gonzalez S.T.[1,2], Heredia M.F.[1,2], Padula G.[1,3,4], Seoane A.[1,4]

[1] IGEVET, (Instituto de Genética Veterinaria), UNLP-CONICET, La Plata, Argentina.

[2] CIC-PBA (Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia. de Buenos Aires), La Plata, Argentina.

[3] Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

[4] CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), La Plata, Argentina.

Corresponding author:
Analía Seoane
analiaseoane@hotmail.com
aseoane@fcv.unlp.edu.ar

ORCID 0000-0001-9908-538X

Cite this article as:

Pardiñas C., Manso Gonzalez S.T., Heredia M.F., Padula G., Seoane A. 2026. IMPACTO DEL AMITRAZ SOBRE LA INTEGRIDAD GENÉTICA Y LA VIABILIDAD CELULAR EN LINFOCITOS BOVINOS. BAG. Journal of Basic and Applied Genetics XXXVII (1): 11-18.

Received: 04/20/2026

Revised version received: 07/07/2026

Accepted: 07/13/2026

General Editor:
Guillermo Giovambattista

DOI: 10.35407/bag.2026.37.01.01

ISSN online version: 1852-6233

RESUMEN

El amitraz es uno de los insecticidas de elección para el tratamiento de ectoparásitos en diversas especies domésticas, tanto en agricultura como en medicina veterinaria. Dado que posee una elevada liposolubilidad, este compuesto puede absorberse rápidamente a través de la piel y las mucosas, lo que implica una exposición potencialmente relevante para animales y seres humanos. Considerando que los efectos tóxicos del amitraz y sus metabolitos, así como sus mecanismos de acción, aún no han sido completamente dilucidados, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de este insecticida sobre biomarcadores de viabilidad, genotoxicidad y daño oxidativo en linfocitos de sangre periférica bovina cultivados *in vitro*. Se llevaron a cabo cultivos de sangre entera que se trataron con dosis de 1,25 a 3,75 µg/ml de amitraz durante 24 h. Se evaluó la inducción de genotoxicidad (ensayos cometa y micronúcleos), viabilidad celular (ensayo MTT) y peroxidación lipídica (ensayo TBARS). En conjunto, los biomarcadores analizados evidenciaron el potencial del amitraz para inducir daño genético y citotoxicidad en linfocitos bovinos, mientras que no fue posible corroborar la ocurrencia de daño oxidativo. Será necesario profundizar los estudios a fin de determinar si estos efectos se encuentran mediados por su capacidad para inducir estrés oxidativo, como ha sido previamente sugerido.

Palabras clave: Amitraz, Genotoxicidad, Bovinos, *In vitro*

ABSTRACT

Amitraz is one of the insecticides of choice for the treatment of ectoparasites in various domestic species, both in agriculture and veterinary medicine. Due to its high lipophilicity, this compound can be rapidly absorbed through the skin and mucous membranes, representing a potentially relevant exposure route for both animals and humans. Considering that the toxic effects of amitraz and its metabolites, as well as their mechanisms of action, have not yet been fully elucidated, the aim of the present study was to evaluate the effects of this insecticide on biomarkers of viability, genotoxicity, and oxidative damage in *in vitro* cultured bovine peripheral blood lymphocytes. Whole-blood cultures were established and treated with amitraz at concentrations ranging from 1.25 to 3.75 µg/mL for 24 h. Genotoxicity (comet assay and micronucleus test), cell viability (MTT assay), and lipid peroxidation (TBARS assay) were evaluated. Overall, the analyzed biomarkers revealed the potential of amitraz to induce genetic damage and cytotoxicity in bovine lymphocytes, whereas no evidence of oxidative damage was observed. Further studies are required to determine whether these effects are mediated by its ability to induce oxidative stress, as previously suggested.

Key words: Amitraz, Genotoxicity, Bovine, *In vitro*

Available online at
www.sag.org.ar/jbag

INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son ectoparásitos que representan una importante carga económica para los sistemas de producción bovina a nivel mundial, asociada sobre todo a los costes de tratamiento (Tibebu y Assefa, 2023). Para el control de dicha plaga, y de los patógenos que puede transmitir al ganado, se utilizan acaricidas químicos. En términos generales, los plaguicidas se definen como sustancias destinadas a prevenir o destruir plagas, y su uso extendido ha generado preocupación por sus posibles efectos adversos sobre la salud, ya que se ha demostrado que pueden actuar como mutágenos químicos potenciales, lo que ha impulsado la investigación sobre sus posibles efectos genotóxicos y carcinogénicos, particularmente en países en desarrollo donde la exposición suele ser mayor (Bolognesi, 2003; Parry, 2005). Entre los acaricidas más comunes se utiliza el amitraz {N,N-[(metilimino)dimetilidino] di-2,4-xilidina}, perteneciente a la familia de las formamidinas. Se trata de uno de los insecticidas de elección para el tratamiento de ectoparásitos en diversas especies domésticas, tanto en agricultura como en medicina veterinaria.

El amitraz se aplica generalmente mediante baños de inmersión o aspersión, siendo 12,5% la dosis recomendada para baños en bovinos en Argentina (Sitio Argentino de Producción Animal, 2017). Dado que posee una elevada liposolubilidad, este compuesto puede absorberse rápidamente a través de la piel y las mucosas, lo que implica una exposición potencialmente relevante para animales y seres humanos (Dhooria y Agarwal, 2016). En este sentido, si bien no se ha demostrado un aumento de riesgo carcinogénico para el amitraz, en una revisión reciente se ha sugerido que su efecto genotóxico podría estar subestimado (Del Pino *et al.*, 2015).

Los estudios de genotoxicidad disponibles en la bibliografía han sido realizados mayoritariamente en células humanas. En este sentido, Radakovic y colaboradores (2013) observaron daño en el ADN de linfocitos humanos tratados con concentraciones de 0,035 a 35 µg/ml de amitraz, así como evidencia de daño oxidativo con la dosis más elevada. Resultados similares han sido reportados por otros autores a concentraciones superiores, Giorgini y colaboradores (2023a) evidenciaron un aumento de la peroxidación lipídica y de la producción de especies reactivas de oxígeno en células hepáticas humanas (HepG2), mientras que Franco Campos y colaboradores (2024) describieron la inducción de apoptosis en cultivos tridimensionales de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y).

En nuestro laboratorio se ha demostrado que el amitraz es capaz de inducir una disminución de la viabilidad celular y daño en el ADN en células de hámster chino (CHO) a concentraciones de 1,25 a 3,7 µg/ml (Padula *et al.*, 2012; Pardiñas *et al.*, 2025). Por otra parte, los únicos resultados disponibles hasta la fecha en bovinos corresponden a estudios realizados en células del sistema reproductivo. En este sentido, Nikoloff y colaboradores (2021) observaron que el amitraz indujo citotoxicidad, aunque sin evidenciar daño en el ADN ni estrés oxidativo, en células del *cúmulus* del folículo ovárico tratadas con concentraciones de 10 a 25 µg/ml. Asimismo, Carranza-Martín y colaboradores (2023) reportaron una disminución de la viabilidad y de la tasa de desarrollo embrionario en espermatozoides bovinos expuestos a 25 µg/ml de amitraz.

Los cultivos celulares *in vitro* constituyen herramientas valiosas para la evaluación de la toxicidad de xenobióticos, ya que proporcionan un sistema biológico controlado (Ekwall, 1983; Bradlaw, 1986). En particular, los linfocitos de sangre periférica pueden obtenerse mediante procedimientos mínimamente invasivos, y el modelo de cultivo de sangre entera permite preservar la interacción natural entre las células y los factores solubles presentes en la sangre (Darroudi y Natarajan, 1983; Bolognesi, 2003; Türkez y Geyikoğlu, 2007). Considerando que los efectos tóxicos del amitraz y sus metabolitos, así como sus mecanismos de acción, aún no han sido completamente dilucidados (Giorgini *et al.*, 2023b), el presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de este insecticida sobre biomarcadores de viabilidad, genotoxicidad y daño oxidativo en linfocitos de sangre periférica bovina cultivados *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Células

Luego de la firma del consentimiento informado por parte de los propietarios (Protocolo CICUAL N°102-3-19P, Fac. Cs. Veterinarias, UNLP), se obtuvieron muestras de sangre periférica de tres bovinos adultos clínicamente sanos (2 machos y 1 hembra). Cada muestra se recogió por punción venosa con jeringa heparinizada y se cultivó en frascos Falcon T-25 (*Nunc, Denmark*) utilizando como medio base RPMI 1640 (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*), con 10% de suero fetal bovino y antibióticos (60 UI de Penicilina y 50 µg/ml de Estreptomicina) (Bagó Laboratorio, Buenos Aires, Argentina). La estimulación de los linfocitos se logró con 200 µg/ml de Fitohemaglutinina (GibcoThermo Fisher Scientific, Buenos Aires, Argentina). Las muestras se cultivaron a 37° C en 5% de CO_2, durante 72 h.

Diseño experimental

El insecticida amitraz se diluyó en agua destilada para obtener concentraciones finales de 1,25; 2,5 y 3,75 µg/ml en el medio de cultivo (A1, A2 y A3). La mayor dosis utilizada fue la que permitió la sobrevida de un número suficiente de células para llevar adelante el análisis.

Los tratamientos se realizaron durante las últimas 24 h de cultivo. Se incluyeron un control negativo de células sin tratar (CN) y un control positivo (CP) en el cual las células se trataron con diferentes compuestos según el biomarcador: para los ensayos cometa y de micronúcleos se utilizó bleomicina (2 µg/ml), un agente de reconocido efecto genotóxico; y para el ensayo MTT se empleó etanol 10%.

Se realizaron tres experimentos independientes, cada uno se realizó con sangre proveniente de un único animal: a partir de cada muestra se establecieron los cultivos celulares sobre los que se aplicaron los distintos tratamientos para la evaluación en todos los biomarcadores analizados. El número de células analizadas se especifica en la descripción de cada una de las técnicas. El análisis microscópico fue llevado a cabo a ciegas por un solo observador.

Ensayo de electroforesis de células aisladas

Se realizó el ensayo de electroforesis de células aisladas conocido también como ensayo cometa, el mismo constituye uno de los principales métodos para estimar el daño en el ADN, tanto en biomonitoreo poblacional y en pruebas de genotoxicidad, como en investigaciones relacionadas con daño y reparación en el ADN (Collins, 2004). El ensayo se implementó de acuerdo al método de Singh y colaboradores (1988), con algunas modificaciones. Se tomaron 30 µl de solución celular y se suspendieron en 170 µl de agarosa de bajo punto de fusión. Luego se sembraron 2 portaobjetos, previamente tratados con 100 µl de agarosa de punto de fusión normal. Las muestras se cubrieron con un cubreobjetos y se mantuvieron a 4° C durante 10 minutos. Posteriormente, se retiraron los cubreobjetos y se conservaron los preparados en solución de lisis durante 2 h a 4° C. A continuación, los portaobjetos se transfirieron a la cuba de electroforesis horizontal cubiertos con solución buffer pH>13 durante 20 minutos a 4° C. Una vez completada la corrida electroforética (20 voltios, 200 mA, 20 minutos a 4° C), se neutralizó el pH de las muestras por medio de tres lavados con Tris-Cl a temperatura ambiente. Para la visualización de las muestras los portaobjetos se tiñeron con 20 µl de colorante Syber Green.

El análisis se realizó en microscopio de fluorescencia (Olympus BX40) con un objetivo 40x y filtro de excitación 515-560 nm con filtro barrera 590 nm. Se contabilizaron 400 células por tratamiento a las que se les asignaron niveles o grados de daño según la extensión que adquiriera la cola del cometa. Las células fueron clasificadas en 5 categorías: grado 0 (G0) células sin daño en el ADN, cola no visible; grado 1 (G1) células con daño leve en el ADN, pocos fragmentos en la cola; grado 2 (G2) células con daño intermedio, varios fragmentos en la cola del cometa; grado 3 (G3) células con daño severo, muchos fragmentos en la cola del cometa; grado 4 (G4) células con daño grave, casi la totalidad del ADN se encuentra formando su cola (Olive, 1999; Collins, 2004). A partir de esta clasificación se estableció para cada uno de los preparados un índice de daño genético (ID), según la siguiente fórmula (Collins, 2004):

$$ID = \frac{1xG1 + 2xG2 + 3xG3 + 4xG4}{\text{Total de células}}$$

De este modo, el puntaje total obtenido para cada preparado podría oscilar entre 0 unidades arbitrarias, cuando todas las células analizadas se encuentran sin daño (G0); y 400 unidades arbitrarias, cuando todas las células analizadas tienen el mayor de los daños (G4). La puntuación visual (en unidades arbitrarias) es rápida y sencilla, y existe una concordancia muy estrecha entre este método y el análisis de imágenes por ordenador (porcentaje de ADN en la cola) (Heaton *et al.*, 2002).

Ensayo MTT

Se llevó a cabo el Ensayo MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), un ensayo colorimétrico para evaluar la viabilidad celular en el cual, bajo determinadas condiciones, la enzima NAD (P) H refleja la cantidad de células viables presente ya que es capaz de reducir al compuesto *thiazolyl blue tetrazoliumbromide* modificando su color. Luego del cultivo se retiraron los glóbulos rojos con un buffer de lisis ACK (*Ammonia Chloride Potassium*). Se realizaron dos lavados con PBS (*Phosphate Buffer Saline*) y se dejó 1 ml de suspensión celular. Posteriormente se agregó solución de MTT y se incubó por 3 h a 37°C en oscuridad, se centrifugó y se retiró cuidadosamente el sobrenadante, luego se sembró en placa de 96 pocillos y se adicionó el solvente de extracción (DMSO, dimetilsulfóxido). Finalmente se realizó la lectura a 550 nm en un espectrofotómetro con lector de placas (MultiskanTM GO) y los resultados fueron expresados en nM MDA/ml (MDA = malondialdehído).

Ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis

A través de esta metodología se analiza la presencia de micronúcleos y otras alteraciones nucleares en células binucleadas (BN). Para ello, se emplea citocalasina B, una sustancia que se extrae del hongo *Helminthosporium dematioideum* y que, en pequeñas concentraciones, inhibe la citocinesis y la movilidad celular dando como resultado células que han separado sus núcleos, pero no sus citoplasmas. Las alteraciones que se analizan con este ensayo son principalmente los micronúcleos, que provienen de un fragmento cromosómico o un cromo-

soma entero que quedó relegado en anafase durante la división celular (MN) (Fenech, 2010). También se pueden cuantificar los brotes nucleares, que son estructuras similares a vesículas unidas a alguno de los dos núcleos principales, y los puentes nucleoplásmicos, identificados por la unión de los dos núcleos de una célula binucleada mediante un fino filamento de cromatina, que son indicadores de rearreglos cromosómicos (Fenech, 2003; Umegaki y Fenech, 2000).

Para poder llevar a cabo este ensayo se debe asegurar que la mayoría de las células contadas deriven de la primera o de la primera y segunda división luego del tratamiento (Fenech, 2002; 2007; 2010). Para esto debe calcularse la proliferación celular por medio del Índice de división nuclear (IDN).

$$IDN = \frac{\begin{array}{c}1 \text{ x n° de cél. mononucleadas} + 2 \text{ x n° de cél. binucleadas} \\ + 3 \text{ x n° de cél. tri y tetranucleadas}\end{array}}{\text{Total de células}}$$

Para llevar a cabo el ensayo de MN, 44 h antes de finalizar el cultivo de linfocitos de sangre periférica se adicionó citocalasina B (3 µg/ml) (Sigma, St. Louis, MO, USA). Una vez finalizado el mismo, las células fueron centrifugadas por 10 minutos a 1200 rpm, luego se retiró el sobrenadante y se agregó solución hipotónica fría (ClK 0,075 M). Inmediatamente después se centrifugaron nuevamente por 6 minutos a 1200 rpm y se procedió a retirar el sobrenadante y agregar un primer fijador (cloruro de sodio-metanol-ácido acético 6:5:1). Posteriormente, se realizaron dos cambios más con un segundo fijador (metanol-ácido acético 5:1) por 10 minutos a 1200 rpm. Luego de 24 h de reposo en heladera, se procedió al goteo del material en portaobjetos. Los preparados se tiñeron con colorante Giemsa durante 10 minutos, preparado con agua destilada y Giemsa al 5% según se especifica en el protocolo. Por último, se procedió al análisis de 1000 células por punto experimental de acuerdo a los criterios de Fenech (Fenech, 2007).

TBARS

Este ensayo se basa en la cuantificación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), ampliamente utilizadas como indicador de peroxidación lipídica y, por ende, de estrés oxidativo celular. El MDA, un producto secundario de la peroxidación lipídica presente en la muestra, reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) formando un aducto (MDA-TBA) detectable mediante espectrofotometría colorimétrica. El protocolo se inició con la obtención de un homogenado celular, seguido de la lisis de eritrocitos mediante solución tampón ACK. Posteriormente, los linfocitos fueron sometidos a tres ciclos de congelación para inducir su ruptura mecánica. A continuación, se preparó la mezcla de reacción en tubos Eppendorf, combinando 50 µL de muestra, 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) y 50 µL de TBA; las muestras se agitaron en vórtex y se incubaron en baño termostatizado durante 20 minutos a 95°C. Finalizada la incubación, se centrifugaron durante 10 minutos a 4000 rpm y el sobrenadante obtenido, que contiene el aducto MDA-TBA formado en medio ácido y a alta temperatura, se analizó espectrofotométricamente a 535 nm. La cuantificación se realizó mediante comparación con una curva de calibración construida con concentraciones conocidas, expresando los resultados como nM de MDA/ml. Dado que la técnica se basa en una determinación cuantitativa relativa a dicha curva, no se incluyó un control positivo.

Análisis estadístico

Los datos de los experimentos se presentan como media ± desviación estándar. Se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA Simple) y, posteriormente, un contraste de múltiples rangos a través del método LSD de Fisher, para comparar las diferencias entre los grupos. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia es igual a 0. La evaluación se llevó a cabo a través del programa estadístico Statgraphics® 5.1 software (Manugistics Inc., Rockville, MD).®

RESULTADOS

En conjunto, los biomarcadores analizados evidenciaron el potencial del amitraz para inducir efectos adversos a nivel celular.

Los resultados obtenidos con el ensayo de viabilidad se muestran en la Tabla 1 y la Figura 1. Se puede observar que todos los tratamientos con amitraz disminuyeron la viabilidad en los linfocitos bovinos. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos mediante análisis de varianza ($F=181.17$; $p<0.001$) y se identificaron 4 grupos homogéneos: CN, A1-A2, A3 y CP, lo cual evidencia que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos A1 y A2. A pesar de la disminución de la viabilidad tras el tratamiento, se obtuvo un número suficiente de células para desarrollar las técnicas de análisis.

Los resultados obtenidos mediante el ensayo cometa se resumen en la Tabla 1, Figura 2. Todos los tratamientos con amitraz aumentaron el índice de daño con respecto al control negativo, el análisis estadístico mostró que las diferencias entre los grupos fueron significativas ($F=317,38$; $p<0,001$). El procedimiento de comparación múltiple permitió identificar 4 grupos homogéneos: CN, A1, A2-A3 y CP; indicando que no existen

Tabla 1. Biomarcadores analizados en linfocitos de sangre periférica bovina tratados con amitraz. Índice de daño, MN (Micronúcleos) ‰, IDN (Índice de División Nuclear), Viabilidad %, nM MDA (Malondialdehído)/ml. Resultados expresados como media ± desviación estándar. Los grupos homogéneos se indican con los superíndices [a,b,c,d].

Tratamiento	Índice de daño	Viabilidad %	MN ‰	IDN	nM MDA/ml
Control negativo	2,99 ± 0,48[a]	99,19 ± 0,35[a]	7 ± 0,96[a]	1,43 ± 0,01[a]	13,05 ± 0,56
Control positivo	118,47 ± 3,68[d]	49,43 ± 0,87[b]	48 ± 1,88[b]	1,29 ± 0,02[a]	--
Amitraz 1	13,76 ± 0,03[b]	94,26 ± 1,22[c]	11 ± 1,46[a]	1,47 ± 0,01[a]	15,76 ± 0,61
Amitraz 2	23,78 ± 0,87[c]	91,28 ± 1,09[c]	16 ± 1,58[a]	1,53 ± 0,01[a]	16,81 ± 0,65
Amitraz 3	27,31 ± 0,97[c]	65,88 ± 3,01[d]	28 ± 0,96[c]	1,52 ± 0,01[a]	14,49 ± 0,21

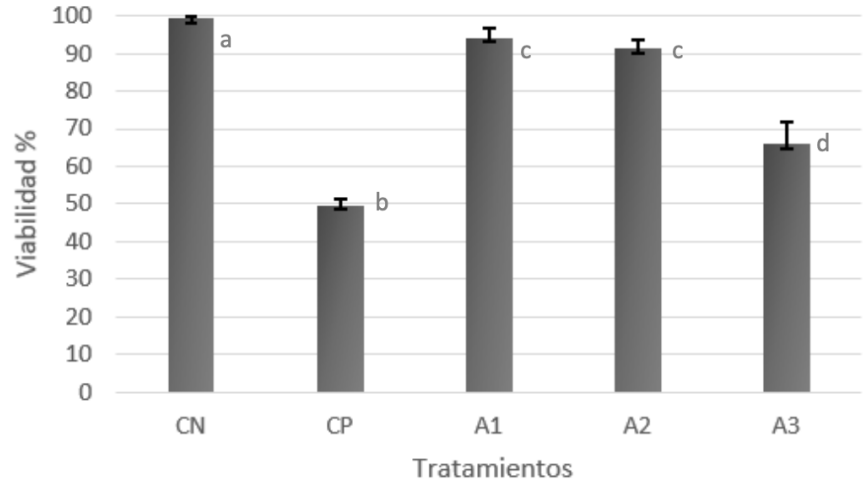


Figura 1. Porcentaje de viabilidad en linfocitos bovinos. Los tratamientos se expresan como: CN (control negativo), CP (control positivo) y A1, A2 y A3 (tratamientos con 1,25; 2,5 y 3,75 µg/ml de amitraz durante 24 h). Los grupos homogéneos se indican con los superíndices [a,b,c,d].

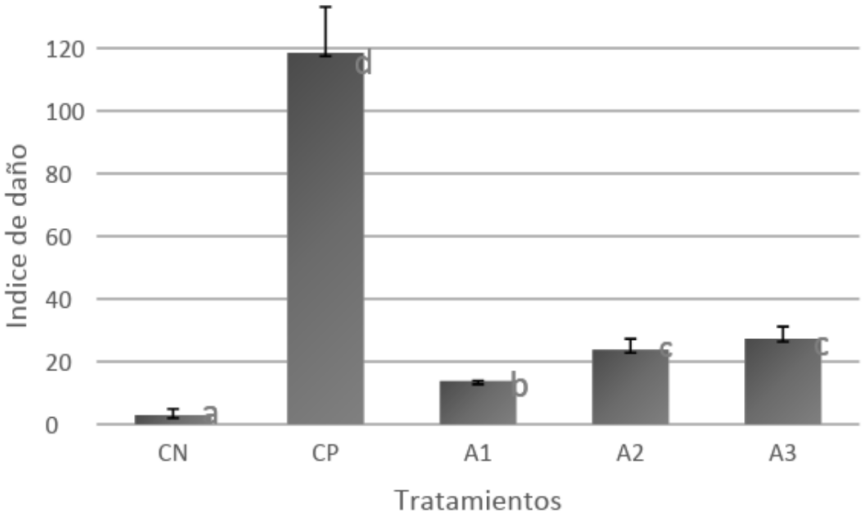


Figura 2. Índice de daño en linfocitos bovinos. Los tratamientos se expresan como: CN (control negativo), CP (control positivo) y A1, A2 y A3 (tratamientos con 1,25; 2,5 y 3,75 µg/ml de amitraz durante 24 h). Los grupos homogéneos se indican con los superíndices [a,b,c,d].

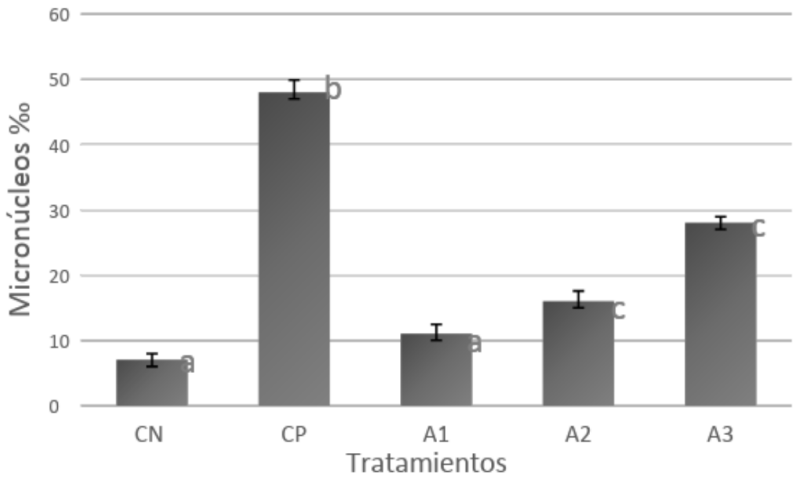


Figura 3. Micronúcleos en células binucleadas en linfocitos bovinos. Los tratamientos se expresan como: CN (control negativo), CP (control positivo) y A1, A2 y A3 (tratamientos con 1,25; 2,5 y 3,75 µg/ml de amitraz durante 24 h). Los grupos homogéneos se indican con los superíndices ^{a,b,c,d}.

diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos A2 y A3, que fueron los que causaron mayor daño.

En la Tabla 1, Figura 3 se resume el resultado del ensayo de conteo de micronúcleos en células binucleadas, el mismo arrojó resultados similares a los hallados con el ensayo cometa. Los tratamientos con amitraz presentaron una frecuencia de micronúcleos mayor que el control negativo y menor que el control positivo, encontrándose diferencias significativas al comparar todos los grupos ($F=33,28$; $p<0,001$). El procedimiento de comparación múltiple permitió identificar 3 grupos homogéneos: CN, A1 y A2 constituyen uno de ellos, y A3 y CP los otros dos; de este modo observamos que solo la dosis más elevada de amitraz indujo un aumento significativo de la frecuencia de micronúcleos.

Los resultados del Índice de proliferación nuclear (Tabla 1) muestran diferencias significativas entre los grupos ($F=14,64$; $p<0,001$) pero dichas diferencias se deben a que el mismo disminuye significativamente en las células tratadas con el control positivo, mientras que no hay diferencias significativas entre el CN y los tratamientos con amitraz, que constituyen un solo grupo homogéneo según la prueba de Fisher.

Asimismo, se realizó un análisis de regresión lineal para comparar los resultados obtenidos con el ensayo cometa y el análisis de micronúcleos. La comparación mostró una relación significativa entre ambos parámetros ($R^2=89,97$; $p<0,05$).

Los resultados del ensayo de peroxidación lipídica se resumen en la Tabla 1. Si bien los tres tratamientos con amitraz presentaron valores de peroxidación lipídica superiores a los del control negativo, las diferencias entre los grupos no fueron estadísticamente significativas ($F = 1,52$; $p > 0,05$).

DISCUSIÓN

Además de las evaluaciones previamente publicadas por la USEPA (1998) y la JMPR (1996), en los últimos años se han generado nuevos datos sobre la toxicidad del amitraz, que sugieren que el riesgo asociado a este compuesto podría estar subestimado (del Pino *et al.*, 2015). No obstante, aún persisten vacíos de conocimiento en relación con la farmacocinética en distintas especies, la relación dosis-respuesta de algunos efectos tóxicos y los mecanismos de acción involucrados.

El amitraz y otras formamidinas presentan un perfil toxicológico particular, ya que su acción se dirige principalmente al sistema monoaminérgico. En especies blanco, la activación de receptores de octopamina produce alteraciones funcionales y comportamentales, mientras que en mamíferos sus principales blancos son los receptores α2-adrenérgicos, localizados a nivel pre y postsináptico en el sistema nervioso central y periférico. En este sentido, se ha propuesto que su acción agonista sobre estos receptores podría inducir una disminución de los niveles de glutatión, debilitando los mecanismos antioxidantes celulares y favoreciendo la generación de estrés oxidativo (Costa *et al.*, 1991; 2020).

Por otra parte, el amitraz es un xenobiótico lipofílico que puede ser metabolizado por enzimas del sistema citocromo P450 (CYP450) en células de mamífero. Este proceso de biotransformación oxidativa genera metabolitos como 2,4-dimetilformanilida y N′-(2,4-

dimetilfenil)-N-metilformamidina y puede dar lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como subproductos del metabolismo (Guengerich, 2008; Chou *et al.*, 2008)

La producción de ROS puede desencadenar una serie de efectos celulares adversos, incluyendo daño en el ADN, muerte celular, carcinogénesis y toxicidad del desarrollo. En este contexto, diversos estudios han demostrado que el amitraz es capaz de inducir genotoxicidad, estrés oxidativo y apoptosis en diferentes modelos celulares humanos *in vitro*, generalmente en concentraciones superiores a las empleadas en el presente trabajo (Radakovic *et al.*, 2013; Giorgini *et al.*, 2023; Franco Campos *et al.*, 2024). Asimismo, en modelos bovinos se ha reportado citotoxicidad en células del cúmulus del folículo ovárico y en espermatozoides, en ambos casos expuestos a 25 µg/mL de amitraz (Nikoloff *et al.*, 2021; Carranza-Martín *et al.*, 2023).

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden parcialmente con los antecedentes mencionados, ya que se observó un aumento del daño en el ADN y una disminución de la viabilidad celular utilizando concentraciones de amitraz inferiores a las reportadas previamente. Cabe destacar que las dosis empleadas en este trabajo son dos órdenes de magnitud menores que las recomendadas para su uso en bovinos (0,025%, equivalente a 250 µg/mL), lo que resalta la relevancia biológica de los efectos observados.

El análisis de regresión lineal realizado entre los resultados obtenidos mediante el ensayo cometa y el ensayo de micronúcleos evidenció una relación significativa entre ambos parámetros (R^2=0,8997; $p<0,05$), lo que indica una alta concordancia entre las dos metodologías empleadas para la detección de daño genético. Este hallazgo sugiere que ambos biomarcadores reflejan de manera consistente los efectos genotóxicos inducidos por el amitraz, a pesar de evaluar distintos tipos de daño, ya sea a nivel de rupturas de cadena simples o dobles en el ADN (ensayo cometa) o de alteraciones cromosómicas y aneugénicas (micronúcleos). En este sentido, la correlación observada refuerza la validez de los resultados presentados y destaca la utilidad del uso combinado de ambos ensayos para una evaluación integral de la genotoxicidad.

Sin embargo, los resultados correspondientes a la peroxidación lipídica no mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Esta ausencia de efecto podría explicarse, al menos en parte, por la marcada disminución de la viabilidad celular observada a la mayor concentración de amitraz. En este contexto, la reducción en el número de células viables podría limitar la cantidad de lípidos susceptibles a peroxidación y, en consecuencia, la formación de malondialdehído (MDA), principal producto cuantificado en el ensayo de TBARS (Halliwell y Whiteman, 2004). Por otro lado, debe considerarse que el ensayo de TBARS presenta limitaciones en términos de sensibilidad y especificidad, por lo que no puede descartarse la presencia de estrés oxidativo en condiciones en las que este método no resulta suficientemente sensible. En este sentido, la participación de este mecanismo permanece como una hipótesis que deberá ser evaluada en futuras investigaciones mediante otros biomarcadores tales como: medición directa de ROS intracelulares, evaluación de daño oxidativo en proteínas o ADN (a través del ensayo cometa modificado con FPG o Endo III o determinación de 8-oxo-dG), o medición de la respuesta antioxidante celular, para caracterizar con mayor precisión estos mecanismos.

Los resultados obtenidos indican que el garrapaticida amitraz es capaz de inducir daño genético y citotoxicidad en linfocitos bovinos. No obstante, será necesario profundizar los estudios a fin de determinar si estos efectos se encuentran mediados por su capacidad para inducir estrés oxidativo, como ha sido previamente sugerido. En este sentido, los posibles efectos adversos de los plaguicidas, muchos de los cuales han sido descritos como agentes mutagénicos y/o carcinogénicos en organismos no objetivo, deben ser evaluados en profundidad para garantizar su seguridad, tanto en los animales tratados como en los consumidores, particularmente en el caso de especies destinadas a la producción.

BIBLIOGRAFÍA

Bolognesi, C. 2003. "Genotoxicity of pesticides: A review of human biomonitoring studies." *Mutation Research* 543: 251–272.

Bradlaw, J. A. 1986. "Evaluation of drug and chemical toxicity with cell culture systems." *Fundamental and Applied Toxicology* 6 (4): 598–606.

Carranza-Martin, A., M. Fabra, N. Luna, N. Farnetano, J. P. Anchordoquy, J. M. Anchordoquy, S. Picco, C. Furnus, and N. Nikoloff. 2023. "In vitro adverse effects of amitraz on semen quality: Consequences in bovine embryo development." *Theriogenology* 199: 106–113.

Chou, C. P., S. Y. Lu, and T. H. Ueng. 2008. "Modulation of serum concentrations and hepatic metabolism of 17β-estradiol and testosterone by amitraz in rats." *Archives of Toxicology* 82: 729–737.

Collins, A. R. 2004. "The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations." *Molecular Biotechnology* 26: 249–261.

Costa, L. G. 2020. "Neurotoxicity of amitraz, a formamidine pesticide." In *Advances in Neurotoxicology*. Elsevier.

Costa, L. G., J. Gastel, and S. D. Murphy. 1991. "The formamidine pesticides chlordimeform and amitraz decrease hepatic glutathione in mice through an interaction with alpha 2-adrenoceptors." *Journal of Toxicology and Environmental Health* 33: 349–358.

Darroudi, F., and A. T. Natarajan. 1983. "Cytogenetic analysis of human peripheral blood lymphocytes (in vitro) treated with resorcinol." *Mutation Research* 124: 179–189.

del Pino, J., P. V. Moyano-Cires, M. J. Anadón, M. J. Díaz, M. Lobo, M. A. Capó, and M. T. Frejo. 2015. "Molecular mechanisms of amitraz mammalian toxicity: A comprehensive review of existing data." *Chemical Research in Toxicology* 28 (6): 1073–1094.

Dhooria, S., and R. Agarwal. 2016. "Amitraz, an underrecognized poison: A systematic review." *Indian Journal of Medical Research* 144: 348–358.

Ekwall, B. 1983. "Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures." *Annals of the New York Academy of Sciences* 407: 64–77.

Fenech, M. 2002. "Micronutrients and genomic stability: A new paradigm for recommended dietary allowances (RDAs)." *Food and Chemical Toxicology* 40 (8): 1113–1117.

Fenech, M. 2010. "The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry." *Health Physics* 98 (2): 234–243.

Fenech, M., W. P. Chang, M. Kirsch-Volders, N. Holland, S. Bonassi, and E. Zeiger. 2003. "HUMN project: Detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures." *Mutation Research* 534: 65–75.

Fenech, M. 2007. "Cytokinesis-block micronucleus cytome assay." *Nature Protocols* 2: 1084–1104.

Franco-Campos, F., et al. 2024. "Amitraz mechanisms of cytotoxicity in a characterized SH-SY5Y cells spheroid model." *Toxicology*.

Giorgini, M., et al. 2023. "Amitraz and its metabolites: Oxidative stress-mediated cytotoxicity in HepG2 cells." *Antioxidants*.

Giorgini, M., M. Taroncher, M. J. Ruiz, Y. Rodríguez-Carrasco, and J. Tolosa. 2023. "In vitro and predictive computational toxicology methods for the neurotoxic pesticide amitraz and its metabolites." *Brain Sciences* 13: 252.

Guengerich, F. P. 2008. "Cytochrome P450 and chemical toxicology." *Chemical Research in Toxicology* 21: 70–83.

Halliwell, B., and M. Whiteman. 2004. "Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean?" *British Journal of Pharmacology* 142: 231–255.

Heaton, P. R., R. Ransley, C. J. Charlton, S. J. Mann, J. Stevenson, B. H. Smith, J. M. Rawlings, and E. J. Harper. 2002. "Application of single-cell gel electrophoresis (comet) assay for assessing levels of DNA damage in canine and feline leukocytes." *Journal of Nutrition* 132 (6): 1598–1603.

JMPR. 1998. *Pesticide Residues in Food—1998. Evaluations Part II: Toxicological.* WHO/PCS/99.18.

Nikoloff, N., A. Carranza Martin, C. Fabra, and C. Furnus. 2021. "Amitraz induced cytotoxic effect on bovine cumulus cells and impaired oocyte maturation." *Environmental Science and Pollution Research* 28: 29188–29199.

Olive, P. 1999. "DNA damage and repair in individual cells: Applications of the comet assay in radiobiology." *International Journal of Radiation Biology* 75: 395–405.

Padula, G., M. V. Ponzinibbio, S. Picco, and A. Seoane. 2012. "Assessment of the adverse effects of the acaricide amitraz: In vitro evaluation of genotoxicity." *Toxicology Mechanisms and Methods* 22: 657–666.

Pardiñas, C., F. Pellegrino, G. Padula, and A. Seoane. 2025. "Genotoxicity of pesticides: The role of non-active ingredients." *Revista Veterinaria.*

Parry, J. M. 2005. "Assessing the potential mutagenicity of pesticides." *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health* 31 (Suppl. 1): 123–128.

Radakovic, M., et al. 2013. "Evaluation of the DNA damaging effects of amitraz on human lymphocytes using the comet assay." *Journal of Biosciences*.

Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice, and E. L. Schneider. 1988. "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells." *Experimental Cell Research* 175: 184–191.

Sitio Argentino de Producción Animal. *Foro Rural Boletín Nº 64.*

Tibebu, A., and A. Assefa. 2023. "Acaricidal efficacy evaluation of amitraz and diazinon against Amblyomma variegatum tick species in Waghimra zone, northern Ethiopia." *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 42: 100885.

Türkez, H., and F. Geyikoğlu. 2007. "An in vitro blood culture for evaluating the genotoxicity of titanium dioxide: The responses of antioxidant enzymes." *Toxicology and Industrial Health* 23: 19–23.

Umegaki, K., and M. Fenech. 2000. "Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: A sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils." *Mutagenesis* 15 (3): 261–269.

USEPA. 1996. *Amitraz Reregistration Eligibility Decision (RED), Case 0234.* Washington, DC: United States Environmental Protection Agency.

FUENTES DE FINANCIACIÓN

Este trabajo fue financiado a través del proyecto V284 de la UNLP (Universidad Nacional de La Plata), Argentina.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al técnico José Meroni por su colaboración en la extracción de las muestras.