

Daño basal del ADN en un grupo de individuos cubanos sanos mediante ensayo Cometa alcalino*

Basal DNA damage on a group of Cuban healthy individuals by alkaline Comet assay

Dano basal no DNA em um grupo de indivíduos cubanos saudáveis através do ensaio Cometa alcalino

- Judith Beatriz Pupo Balboa¹, Reinaldo Gutiérrez Gutiérrez², Anamarys Pandolfi Blanco³, Mildrey Cásido Rodríguez⁴, Leyenis Valdés Ramos⁴, Aimara de Armas Santiesteban⁴

¹ Dra. en Ciencias Biológicas. Especialista de I grado en Bioquímica, Investigadora Agregada.

² Master en Genética Médica, Licenciado en Ciencias Farmacéutica. Investigador Auxiliar.

³ Licenciada en Tecnología de la Salud, Especialidad de Microbiología.

⁴ Técnico Medio en Química Industrial.

* Centro Nacional de Genética Médica. Laboratorio de Estrés Oxidativo. Ave. 146 No. 3102, esq. 31. Playa, La Habana, Cuba.

Resumen

El ADN de las células humanas está sujeto de forma constante a diferentes tipos de daños debido a factores ambientales y a procesos metabólicos propios de la célula, que de no ser reparados y renovada su integridad, provocan inestabilidad genómica. Consecuentemente el daño en el ADN ha sido utilizado como marcador biológico en el biomonitoreo humano. El objetivo del presente trabajo fue determinar el daño basal del ADN en linfocitos aislados de sangre periférica de individuos voluntarios sanos, sin antecedentes patológicos y/o exposición a agentes genotóxicos. Se incluyó un total de 95 sujetos residentes en La Habana, con una edad promedio de 34 ± 12 años, en los que el 71,13% correspondió a mujeres. Se empleó la variante alcalina del ensayo Cometa. Los niveles de daño fueron determinados en unidades arbitrarias. El daño basal del ADN, cuantificado en los 95 individuos, fue de $34,98 \pm 19,6$ UA (25%=20,5 UA, 75%=47,5 UA). Los valores determinados constituyen los valores de referencia del laboratorio para el daño basal del ADN, en sujetos sanos. El punto de corte de daño al ADN, correspondiente al percentil 75, presenta aplicabilidad en el estudio de pacientes e individuos expuestos a xenobióticos. El uso de este valor permite la realización de estrategias de intervención oportunas que contribuyan a reparar tempranamente el daño detectado.

Palabras clave: daño del ADN * reparación del ADN * electroforesis en gel de células individuales o ensayo Cometa

Summary

Human cell DNA is constantly subject to different types of damage due to environmental factors and metabolic processes of the same cell, which cause genomic instability if not repaired and completely renewed. Consequently, DNA damage has been used as a biomarker in human biomono-

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstracts Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (Impresa)

ISSN 1851-6114 (En línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

ring. The aim of this study was to determine basal DNA damage in lymphocytes isolated from peripheral blood of healthy volunteers with no medical history and/or exposure to genotoxic agents. A total of 95 subjects from the western region of Cuba, with an average age of 34 ± 12 years, 71.13% of whom were female were included. Alkaline Comet assay variant was used. Damage levels were determined in arbitrary units. Basal DNA damage, measured in 95 subjects, was 34.98 ± 19.6 AU (25% = 20.5 AU, 75% = 47.5 AU). The values determined are the laboratory reference values for basal DNA damage in healthy subjects. The cutoff of DNA damage, corresponding to 75 percentile, has applicability in the study of patients and subjects exposed to xenobiotics. Use of this value allows for the realization of appropriate intervention strategies that help early repair of the damage detected.

Key words: DNA damage * DNA damage repair * single cell gel electrophoresis assay or Comet assay

Resumo

O DNA das células humanas está constantemente sujeito a diferentes tipos de danos devido a fatores ambientais e a processos metabólicos próprios da célula, que se não forem reparados e a sua integridade renovada, provocam instabilidade genômica. Por conseguinte, o dano no DNA foi utilizado como um biomarcador no biomonitoramento humano. O objetivo deste estudo foi determinar o dano basal do DNA em linfócitos isolados de sangue periférico de voluntários saudáveis, sem antecedentes patológicos e/ou exposição a agentes genotóxicos. Um total de 95 indivíduos residentes em Havana foram incluídos, com uma idade em média de 34 ± 12 dos quais 71,13% eram mulheres. Foi utilizada a variante alcalina do ensaio Cometa. Os níveis de dano foram determinados em unidades arbitrárias. O dano basal do DNA, medido nos 95 pacientes, foi de $34,98 \pm 19,6$ UA (25% = 20,5 UA, 75% = 47,5 UA). Os valores determinados são os valores de referência do laboratório para o dano basal do DNA em indivíduos saudáveis. O ponto de corte de dano ao DNA, correspondente ao 75 percentil, tem aplicabilidade no estudo de pacientes e indivíduos expostos a xenobióticos. O uso deste valor permite a realização de estratégias de intervenção adequadas que ajudem a reparar precocemente o dano detectado.

Palavras-chave: dano do DNA * reparo do DNA * eletroforese em gel de células individuais ou ensaio Cometa

Introducción

El genoma humano está sujeto de forma constante a daños de diferentes tipos, a través de la combinación de causas endógenas o exógenas. Entre las endógenas se destacan las especies reactivas del oxígeno liberadas en el metabolismo celular oxidativo. Las exógenas incluyen la luz ultravioleta, las radiaciones ionizantes, los agentes quimioterapéuticos, la dieta, el humo del tabaco, entre otras. Para mantener la integridad y estabilidad del genoma, las células han desarrollado mecanismos, denominados conjuntamente, de respuesta al daño del ADN, para detectar, señalar y reparar las lesiones de diferentes tipos en el ADN. Deficiencias en estas vías pueden estar asociadas al desarrollo de enfermedades neurológicas, inflamatorias, cáncer, síndromes genéticos con diferentes fenotipos. Igualmente, la respuesta individual a las terapias anti-cáncer se relaciona con alteraciones en estos mecanismos de reparación (1) (2). Consecuentemente, el daño en el ADN constituye un marcador biológico que se ha utilizado en el biomonitoring humano tanto ambiental, ocupacional como clínico (3-6). Específicamente, se ha encontrado elevado en estudios clínicos relacionados con el cáncer de diferentes orígenes (1) (7-9).

En Cuba, el cáncer constituye un serio problema de salud, al constituir la primera causa de muerte de la población cubana (10). Sin embargo, son escasos los estudios publicados que relacionen el daño del ADN y los procesos carcinogénicos, otras enfermedades o la exposición ambiental (11) (12). No existen valores de referencia del daño basal del ADN publicados que puedan ser utilizados en la práctica clínica.

Habitualmente los estudios de biomonitoring del daño y la reparación del ADN en pacientes o individuos expuestos requieren establecer comparaciones con grupos controles (5) (13-15). Los individuos controles no presentan la condición que se estudia ni guardan relación parental con los casos o individuos a investigar. Razonablemente, resulta de gran importancia práctica y clínica disponer de valores de referencia de los niveles de daño basal del ADN en individuos sanos en el laboratorio. El análisis estadístico de estos valores permite establecer puntos de corte que pueden ser utilizados para evaluar los resultados obtenidos en los pacientes o individuos expuestos.

Diferentes técnicas se utilizan para determinar el daño en el ADN. El ensayo Cometa, en su variante alcalina, es la más utilizada internacionalmente para determinar roturas de simple y doble hebra, sitios sensibles

al álcali, rompimientos de simple hebra relacionados con la reparación por escisión incompleta, y entrecruzamientos ADN-ADN y AND-proteínas (16-20).

En este trabajo se determinaron los niveles de daño basal mediante el ensayo Cometa alcalino en un grupo de sujetos sanos. El objetivo fue establecer los valores de referencia y los puntos de corte de este marcador en población aparentemente sana en el laboratorio de Estrés Oxidativo del Centro Nacional de Genética Médica.

Materiales y Métodos

Se realizó una investigación observacional descriptiva de tipo transversal, en el periodo de 2008 a 2012, que fue aprobada por el Comité de Ética de la Investigación del Centro Nacional de Genética Médica.

POBLACIÓN

Se incluyeron 95 sujetos voluntarios, residentes en La Habana, de los cuales se obtuvo el consentimiento informado. El promedio de edad de los sujetos fue de 34 ± 12 años, con un rango de edad de 5 a 76 años. Se aplicaron los criterios de selección mediante encuesta. Fueron incluidos en el estudio aquellos individuos que no padecieran enfermedades crónicas, ni infecciones agudas, que no presentaran hábito de fumar, así como la no ingestión de medicamentos o alcohol, ni exposición a radiaciones en los últimos 30 días, previos a la toma de la muestra de sangre. A todos los individuos se les determinó el daño basal del ADN.

REACTIVOS

Los reactivos, Histopaque 1077, Trypan blue, Tris, cloruro de sodio (NaCl), ácido etilendiaminetetraacético (EDTA), DMSO, Triton X-100, NaOH, AgNO_3 (nitrato de plata), tampón salino-fosfato (PBS), agarosa regular y de bajo punto de fusión, procedieron de la compañía Sigma-Aldrich.

ASLAMIENTO DE LINFOCITOS

Se colectaron 3 mL de sangre total mediante punción venosa en condiciones de asepsia y antisepsia en tubos heparinizados a cargo de personal capacitado del laboratorio clínico. Las muestras se transportaron hacia el laboratorio, refrigeradas, protegidas de la luz y debidamente identificadas, antes de 3 horas de realizada la flebotomía. Los linfocitos de la sangre se aislaron con Histopaque 1077 por centrifugación a 2200 rpm durante 30 minutos (Centrífuga Eppendorf 5415 R). Se colectó la capa de la interfase mediante micropipeta en un tubo separado y se realizaron 3 lavados con tampón PBS frío por centrifugación. El sedimento de células se resuspendió en un volumen apropiado de tampón PBS

frío para obtener una concentración aproximada de 1×10^5 células/mL. La supervivencia celular determinada con azul Trypan fue superior al 95%.

ENSAYO COMETA ALCALINO

Se desarrolló la variante alcalina del ensayo Cometa siguiendo las condiciones descritas por Collins y colaboradores con algunas modificaciones (20). Los linfocitos aislados se mezclaron con agarosa de bajo punto de fusión al 0,5% y se aplicaron sobre duplicados de láminas portaobjetos, previamente codificadas y cubiertas con agarosa regular al 0,75%. Las láminas se cubrieron con cubreobjetos y se colocaron a 4 °C para permitir la polimerización de la agarosa. A continuación, se retiraron los cubreobjetos y las láminas se colocaron en solución de lisis (10 mM Tris-HCl, pH 10, 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 5% DMSO, 1% Triton X-100) toda la noche a 4 °C. Posteriormente se realizó el desenrollamiento del ADN en tampón de pH > 13 (300 mM NaOH/1 mM EDTA) durante 25 minutos a 4 °C. La electroforesis se desarrolló en este mismo tampón a 25 V, 300 mA durante 25 minutos a 4 °C (Fuente eléctrica Cenic, Cuba). La neutralización se realizó con tampón frío 0,4 M Tris, pH 7,5. Se utilizó la tinción con nitrato de plata para teñir los núcleos.

Una porción de las células fue tratada con H_2O_2 a una concentración de 200 μM , durante 5 minutos en hielo, que fue utilizado como control positivo. El H_2O_2 produjo un incremento de las unidades arbitrarias en un 82%.

CUANTIFICACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN

Los núcleos teñidos con nitrato de plata se observaron al microscopio óptico de campo claro con un objetivo de 40x (microscopio Wild Heerbrugg). Se visualizaron 100 núcleos por lámina, de forma que se abarcó toda la lámina, evitando los bordes y las burbujas. En total, se observaron 200 núcleos por cada individuo. El daño del ADN se cuantificó en unidades arbitrarias (UA) para lo que se establecieron 5 niveles de daño (0, 1, 2, 3 y 4) desde la no presencia de daño (nivel 0) hasta la mayor evidencia de este (nivel 4) (20).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el programa Statistica 7 para el análisis estadístico de los datos obtenidos en el estudio. Se aplicó la estadística descriptiva y se determinó la normalidad de la variable, daño basal del ADN, mediante el *Test* Kruskal-Wallis. Se determinó si hubo asociación entre la edad y el daño al ADN a través de la correlación de Pearson. Se determinó si hubo diferencias significativas entre los promedios del daño basal del ADN de ambos sexos, mediante comparación de medias con desviación estándar conocida. Se consideró un valor de $p < 0,05$.

Resultados

El daño basal del ADN se determinó en 95 sujetos controles. El valor promedio del daño basal fue de 34,98 UA. El 25% (23) de los sujetos (primer cuartil) presentó valores de daño por debajo de 20,5 UA, mientras que el 75% (72) de los sujetos (tercer cuartil) mostró niveles de daño por debajo de 47,5 UA. El valor que toma este marcador en el tercer cuartil puede ser considerado el punto de corte para este grupo de individuos para determinar valores alterados de daño del ADN. El 50% de los sujetos presentó niveles de daño al ADN entre estos dos valores, representado por la mediana (30±19,6) (Tabla I).

En la muestra estudiada se obtuvo que no existe una relación directamente proporcional entre la edad y el daño basal del ADN (Figura 1).

El daño basal del ADN en ambos sexos fue muy similar: 34,38±30 UA en los sujetos del sexo femenino (70,52%) y 37,58±34,75 UA en los masculinos (29,47%), $p=0,65$.

Discusión y Conclusiones

El presente trabajo describe los resultados de la aplicación del ensayo Cometa alcalino en linfocitos aislados de sujetos sanos para determinar los niveles de daño basal del ADN.

Tabla 1. Estadística descriptiva del daño basal del ADN de los sujetos sanos.

Parámetros	(N=95)
Media±DE	34,98±19,6
Mediana±DE	30±19,6
25% (UA)	20,5
75% (UA)	47,5

Leyenda: N: número de individuos; DE: Desviación estándar; UA: Unidades arbitrarias.

Fuente: Datos de la investigación. Centro Nacional de Genética Médica

El daño basal del ADN se refiere al daño endógeno o constitutivo, que presenta el individuo en el momento que se estudia, condicionado por la influencia del medio ambiente, la dieta y el metabolismo celular (18) (21) (22).

Otros factores como la edad, el sexo, el hábito de fumar, pueden tener impacto en el daño del ADN (23). Sin embargo, los resultados descritos en la literatura no son concluyentes. Algunos autores solo han encontrado influencia de la edad (24-27), mientras que otros plantean que no ha existido efecto de este factor sobre el daño al ADN (28-30). De hecho, existen resultados contradictorios en trabajos de un mismo autor, respecto al efecto de la edad en el daño al ADN (29) (31) (32). En

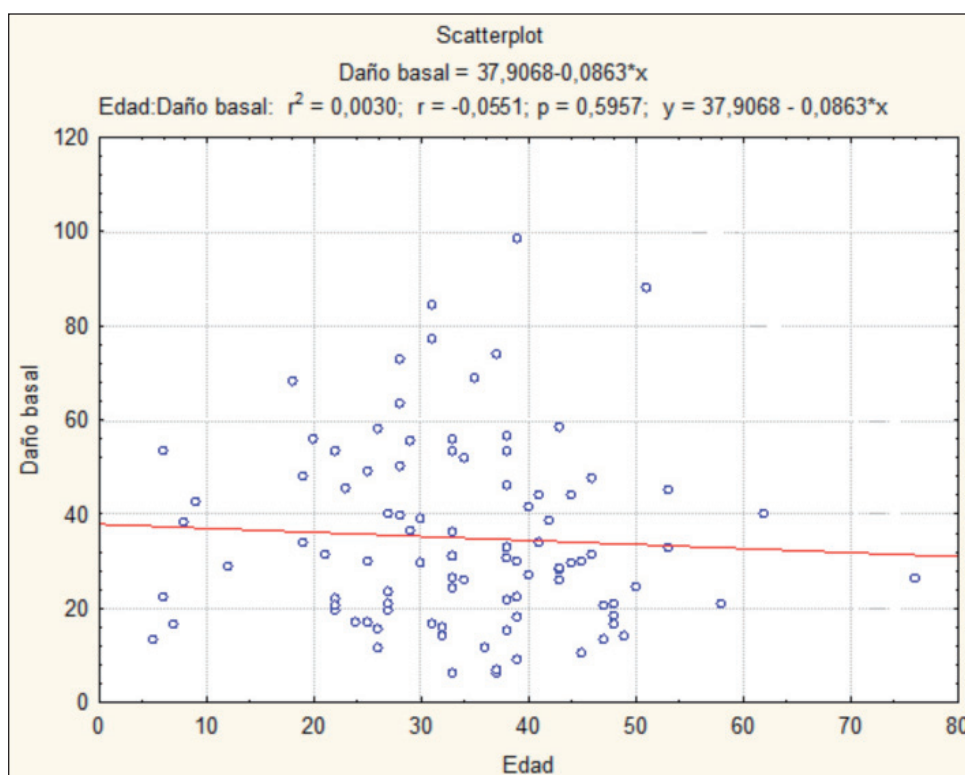


Figura 1. Análisis de correlación entre la edad y el daño basal del ADN en la muestra estudiada.

Fuente: Datos de la investigación. Centro Nacional de Genética Médica

el presente trabajo no se halló relación del daño basal del ADN con la edad, ni hubo diferencias significativas entre ambos sexos. Dushinska *et al.*, de manera similar, no encontraron diferencias en el daño basal del ADN entre hombres y mujeres (21), mientras que Bajpayee *et al.*, describieron mayor daño basal del ADN en hombres que en mujeres (33).

La genotoxicidad determinada por ensayo Cometa puede ser expresada utilizando diferentes parámetros, como el porcentaje de ADN de la cola (simbolizado como %T) y el conteo visual (dado en UA) (31). Los resultados obtenidos en este estudio, expresados en UA, son similares a los descritos por Palyvoda *et al.*, (34), al comparar la mediana del daño basal del ADN: 30 UA (cuartil 25%: 20,5 UA; cuartil 75%: 47,5 UA), *versus*, 33,3 UA (cuartil 25%: 16,1 UA; cuartil 75%: 59,6 UA), respectivamente.

La medición del daño del ADN en UA y en %T puede ser equivalente. Esto se logra recalculando las UA en una escala de 0-400 a una escala de 0-100, por lo que se divide por un factor de 4 (31). De este modo, Moller (31) después de analizar conjuntamente 125 artículos sobre daño basal de ADN en linfocitos aislados, determinó como valor de referencia que la mediana de %T/UA fue de 8,6 (cuartil 25%: 4,4 – cuartil 75%: 14,5). Al realizar la conversión de los resultados obtenidos en el presente estudio de UA a %T y compararlos con los descritos por Moller (31), se observó que son ligeramente más bajos (7,5; cuartil 25%: 5,125 – cuartil 75%: 11,875). A su vez, Blasiak *et al.*, (35) obtuvieron valores de la media de %T del daño endógeno del ADN en mujeres sanas de 48 a 76 años mucho más bajos que los obtenidos en este trabajo, incluso por debajo de los valores de referencia determinados por Moller. Por su parte, Piperakis *et al.*, (26) determinaron el daño basal del ADN en tres grupos de edades (5-10 años, 40-50 años, 70-80 años), calculando la media del %T (3,2±0,12; 10,2±0,13; 22,5±0,18, respectivamente). Estos resultados reflejan la variabilidad que puede presentar la determinación del daño basal del ADN en linfocitos aislados.

El efecto de la edad en el daño del ADN se explica sobre la base biológica que expone una de las teorías del envejecimiento. Con el aumento de la edad el daño del ADN se acumula, por errores en los mecanismos de reparación, debido a defectos en la expresión de genes implicados, lo que unido a la incidencia de los factores exógenos y endógenos provoca aumento del daño basal del ADN (36). Aunque en esta investigación no se encontró que la edad sea un factor determinante del daño en el ADN, y los datos descritos en la literatura son controversiales sobre esta relación, sería recomendable aumentar el número de individuos de diferentes edades, específicamente, menores de 15 años y mayores de 50 años. En la muestra estudiada hubo una mayor representación de las edades entre 26 y 49 años, lo que pudo haber influido en los resultados descritos. Igual-

mente, cabe señalar que resulta difícil disponer de sujetos controles adecuados, que permitan obtener una estratificación de las edades con un número óptimo de individuos, desde el punto de vista estadístico.

Otro factor que puede modificar el daño del ADN está dado por las radiaciones solares. Moller *et al.*, (29) y Smolkova *et al.*, (37) han determinado que las diferencias estacionales tienen un efecto en el daño basal de ADN, al cuantificar niveles de daño basal marcadamente aumentados en el verano respecto al invierno. La ubicación geográfica de Cuba, en una latitud muy cercana al Trópico de Cáncer (entre los 23° 17', 19° 50' latitud norte y los 74° 08', 84° 58' longitud oeste) condiciona la recepción de altos valores de radiación solar y determina el carácter cálido de su clima (tropical estacionalmente húmedo), lo que determina que escasamente haya diferencias entre las estaciones de verano e invierno (38). Razonablemente, en el presente estudio no se tuvo en cuenta la estación del año para la toma de la muestra de sangre. Las condiciones climáticas descritas provocan que la luz solar penetre las capas externas de la epidermis y dañe el ADN de las células circulantes en los vasos de la piel (29). Considerando lo anterior, podría esperarse que los resultados obtenidos en esta investigación mostraran diferencias con los publicados por Moller, en cuyo análisis, la mayoría de los estudios fueron realizados en Europa, donde bajos niveles de daño en el ADN se han relacionado con una menor exposición a los rayos solares y a la temperatura (31). No obstante, son similares a los referidos por este autor.

Varios autores declaran el uso de los cuartiles 25% y 75% como puntos importantes en el análisis de sus resultados del ensayo Cometa (13) (31) (34). Los puntos de corte determinados en este trabajo, pueden ser utilizados en el laboratorio para evaluar los resultados obtenidos en pacientes o individuos expuestos, a los que se les determine el daño basal del ADN, como biomarcador. En este sentido cobra mayor significación biológica el percentil 75%.

Es notable la gran variabilidad observada en la literatura sobre la relación del daño en el ADN y factores como la edad y el sexo. Aunque en el presente estudio no se obtuvo este tipo de relación en los individuos estudiados, es posible plantear la utilidad de la media y la mediana de daño basal del ADN y los puntos de corte determinados, como valores de referencia de individuos sanos. Específicamente, sería posible aplicarlos en estudios de biomonitorio humano, relacionados con el cáncer, los estilos de vida y la exposición ambiental, dado que se encuentran en los rangos publicados por Moller (31), considerando el gran volumen de datos que analizó. De este modo, el personal médico dispone de indicadores normales que le orientan en la evaluación de la magnitud del daño basal del ADN, de individuos con susceptibilidad al cáncer u otras enfermedades, así como el efecto de la radio y/o quimioterapia,

con respecto a sujetos controles. La utilización de estos valores de referencia puede contribuir al manejo del tratamiento y el seguimiento clínico de pacientes e individuos expuestos.

CORRESPONDENCIA

DRA. JUDITH B. PUPO BALBOA
Centro Nacional de Genética Médica
Ave. 146 No. 3102, esq. 31. Playa, La Habana, Cuba
E-mail: judith.pupo@infomed.sld.cu

Referencias bibliográficas

- Jalal S, Earley JN and Turchi JJ. DNA Repair: From genome maintenance to biomarker and therapeutic target. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 6973.
- Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 2009; 461 (7267): 1071–8.
- Bonetta S, Gianotti V, Bonetta S, Gosetti F, Oddone M, Gennaro MC, *et al.* DNA damage in A549 cells exposed to different extracts of PM(2.5) from industrial, urban and highway sites. *Chemosphere* 2009; 77 (7): 1030-4.
- Keretetse GS, Laubscher PJ, Du Plessis JL, Pretorius P J, Van Der Westhuizen FH, Van Deventer E, *et al.* DNA damage and repair detected by the comet assay in lymphocytes of african petrol attendants: A Pilot Study. *Ann Occup Hyg* 2008; 52 (7): 653–62.
- Wang Y, Cheng J Li D, Duan H, Yang H, Bin P, Dai Y, *et al.* Modulation of DNA repair capacity by ataxia telangiectasia mutated gene polymorphisms among polycyclic aromatic Hydrocarbons–Exposed Workers. *Toxicological Sciences* 2011; 124 (1): 99–108.
- Cortés-Gutiérrez EI, Hernández-Garza F, García-Pérez JO, Dávila-Rodríguez MI, Aguado-Barrera ME, Cerda-Flores RM. Evaluation of DNA single and double strand breaks in women with cervical neoplasia based on alkaline and neutral comet assay techniques. *J Biom Biotech* 2012; [Serial on the Internet]; about. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/385245>. Fecha de acceso: 24 de septiembre de 2012.
- Sigurdson AJ, Jones IM, Wei Q, Wu X, Spitz MR, Stram DA, *et al.* Prospective analysis of DNA damage and repair markers of lung cancer risk from the prostate, lung, colorectal and ovarian (PLCO) cancer screening trial. *Carcinogenesis* 2011; 32 (1): 69–73.
- Lin X, Wood CG, Shao L, Huang M, Yang H, Dinney CP, *et al.* Risk assessment of renal cell carcinoma using alkaline Comet assay. *Cancer* 2007; 110 (2): 282–8.
- Schabath MB, Spitz MR, Grossman HB, Zhang K, Dinney CP, Zheng PJ, *et al.* Genetic instability in bladder cancer assessed by the Comet assay. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95 (7): 540–7.
- Anuario Estadístico de Salud. Ministerio de Salud Pública. Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de Salud. República de Cuba. ISSN: 1561-4425. Disponible en: http://files.sld.cu/dne/files/2013/04/anuario_2012.pdf. Fecha de acceso: 30 de julio de 2013.
- Roblejo H, Cuétara E, Acosta T, Lantigua A, Gutiérrez R, Pupo J, *et al.* Descripción clínica y capacidad de reparación del ADN por escisión de nucleótidos en pacientes cubanos con Xeroderma Pigmentoso. *Rev Cubana Genet Comunit* 2009; 3 (1): 35-41.
- Anta AM, Gutiérrez R, Pupo J, Rojas IA, Pandolfi A, de Armas A, *et al.* Daño y capacidad de reparación del ADN en pacientes con Neurofibromatosis tipo 1 y Von Hippel Lindau. *Memorias Convención Internacional de Salud Pública. Cuba Salud* 2012. La Habana 3-7 de diciembre de 2012.
- Slyskova J, Naccarati A, Pardini B, Polakova V, Vodickova, Smerhovsky, *et al.* Differences in nucleotide excision repair capacity between newly diagnosed colorectal cancer patients and healthy controls. *Mutagenesis* 2012; 27 (2): 225–32.
- Orlow I, Park BJ, MujumdarU, Patel H, SLPuiki, Clas BA, Downey R, Flores R, *et al.* DNA damage and repair capacity in patients with lung cancer: Prediction of multiple primary tumors. *J Clinical Oncology* 2008; 26 (21): 3560-6.
- Collins AR. The Comet assay for DNA damage and repair principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 2004; 26: 249–60.
- Moller P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline Comet assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005; 96: 1–42.
- Moller P. The alkaline Comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006; 98 (4): 336–45.
- Piperakis SM. Comet assay: A brief history. *Cell Biol Toxicol* 2009; 25: 1–3.
- Dhawan A, Bajpayee M, Parmar D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of damage in different models of DNA. *Cell Biol Toxicol* 2009; 25: 5–32.
- Collins AR, Azqueta A, Brunborg G, Gaiva I, Giovannelli L, Kruszewski M, *et al.* The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 2008; 23 (23): 143–51.
- Dusinska M, Collins AR. The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions. *Mutagenesis* 2008; 23 (3): 191–205.
- Diem E, Ivancsits S, Rüdiger HW. Basal levels of DNA strand breaks in human leukocytes determined by comet assay. *J Toxicol Environ Health A* 2002; 65 (9): 641-8.
- Grover P, Danadevi K, Mahboob M, Rozati R, Banu BS, Rahman MF. Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production utilizing the Comet assay. *Mutagenesis* 2003; 18 (2): 201–5.
- Mutlu-Türkoglu U, Ilhan E, Oztezcan S, Kuru A, Aykaç-Toker G, Uysal M. Age-related increases in plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and lymphocyte DNA damage in elderly subjects. *Clin Biochem* 2003; 36 (5): 397–400.
- Barnett YA, King CM. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. *Mutat Res* 1995; 338: 115–28.

26. Piperakis SM, Kontogianni K, Karanastasi G, Iakovidou-Kritsi Z, MM Piperakis. The use of comet assay in measuring DNA damage and repair efficiency in child, adult, and old age populations. *Cell Biol Toxicol* 2009; 25: 65–71.
27. Humphreys V, Martin RM, Ratcliffe B, Duthie S, Wood S, Gunnell D, *et al*. Age-related increases in DNA repair and antioxidant protection: A comparison of the Boyd Orr Cohort of elderly subjects with a younger population sample. *Age Ageing* 2007; 36: 521–6.
28. Turner DR, Griffith VC, Morley AA. Ageing in vivo does not alter the kinetics of DNA strand break repair. *Mech Ageing Dev* 1982; 19: 325–31.
29. Møller P, Wallin H, Holst E and Knudsen LE. Sunlight-induced DNA damage in human mononuclear cells. *The FASEB* 2002; 16(1): 45-53.
30. Holz O, Jörres R, Kästner A, Krause T, Magnussen H. Reproducibility of basal and induced DNA single-strand breaks detected by the single-cell gel electrophoresis assay in human peripheral mononuclear leukocytes. *Int Arch Occup Environ Health* 1995; 67(5): 305-10.
31. Møller P. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutat Res* 2006; 12 (2): 84-104.
32. Møller P, Knudsen LE, Loft S, Wallin H, The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA damaging agents and effect of confounding factors, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 1005–15.
33. Bajpayee M, Dhawan A, Parmar D, Pandey AK, Mathur N, Seth PK. Gender-related differences in basal DNA damage in lymphocytes of a healthy Indian population using the alkaline Comet assay. *Mutat Res* 2002; 520: 83–91.
34. Palyvoda O, Polańska J, Wygoda A, Rzeszowska-Wolny J. DNA damage and repair in lymphocytes of normal individuals and cancer patients: studies by the comet assay and micronucleus tests. *Acta Bioquím Polónica* 2003; 50(1): 181–90.
35. Blasiak J, Arabski M, Krupa R, Wozniak K, Rykala J, Kolacinska A, *et al*. Basal, oxidative and alkylative DNA damage, DNA repair efficacy and mutagen sensitivity in breast cancer. *Mutation Research* 2004; 554: 139–48.
36. Best BP. Nuclear DNA Damage as a direct cause of aging. *Rejuvenation Res* 2009; 12 (3): 199-208.
37. Smolkova B, Dusinska M, Raslova K, McNeill G, Spustova V, Blazicek P, *et al*. Effects of seasonal variation in diet on markers of oxidative damage to lipids and DNA in defined population groups in Slovakia. *Mutat Res* 2004; 551: 135–44.
38. Situación geográfica de Cuba. Instituto Nacional de Recursos Hidráulicos. [Consultado el 24 de julio de 2013] Disponible en: <http://www.hidro.cu/sgeografica.htm>

Recibido: 8 de enero de 2014

Aceptado: 9 de junio de 2014