

Principios y relevancia del ensayo cometa

Principles and relevance of the comet assay

Alexis Rodríguez-Rey,^I Elena Noris-García,^{II} María Teresa Fundora Torres^I

^I Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. La Habana, Cuba.

^{II} Instituto Nacional de Nefrología. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Desde hace varias décadas el ensayo Cometa, o electroforesis alcalina de células individuales, se ha convertido en un método establecido para el estudio del daño de ácido desoxirribonucleico, con múltiples aplicaciones en ensayos de genotoxicidad, estudios de biomonitorio en humanos, epidemiología molecular y ecotoxicología; así como una herramienta fundamental para investigaciones sobre daño y reparación del ácido desoxirribonucleico. Este ensayo se distinguió por su simplicidad, sensibilidad, versatilidad, rapidez y economía. Es una poderosa técnica que se basa en la visualización microscópica de las imágenes del ácido desoxirribonucleico después que las células son embebidas en agarosa, lisadas y sometidas a una electroforesis alcalina. Esta metodología básica ha sido ampliada, y permite ahora, detectar con alta sensibilidad una gran variedad de daños del ácido desoxirribonucleico en cualquier tipo de células. La inclusión en este ensayo, de enzimas capaces de producir lesiones específicas en la hebra de ácido desoxirribonucleico, ha incrementado su rango de detección y sensibilidad. Pero es importante tener claro que su especificidad no es absoluta. El propósito es destacar algunos aspectos útiles de este método y sus ventajas; describir la experiencia en algunos aspectos técnicos del proceder, normalizado según las condiciones del laboratorio en el instituto para ampliar su utilización en el país.

Palabras clave: ensayo cometa; ácido desoxirribonucleico; agarosa; electroforesis alcalina.

ABSTRACT

For several decades now the comet assay (single cell gel electrophoresis assay) has been the method used for the study of deoxyribonucleic acid damage, with multiple applications in genotoxicity assays, biomonitoring studies in humans, molecular epidemiology and ecotoxicology, and a fundamental tool for research into deoxyribonucleic acid damage and repair. The comet assay has stood out for its simplicity, sensitivity, versatility, rapidity and economy. It is a powerful technique based on microscopic visualization of deoxyribonucleic acid images after the cells have been embedded in agarose, lysed and subjected to alkaline electrophoresis. This basic methodology has been broadened, and may now detect with great sensitivity a large variety of deoxyribonucleic acid damage in any type of cell. Inclusion in the assay of enzymes capable of producing specific lesions on the deoxyribonucleic strand has broadened its detection range and sensitivity. However, it is important to bear in mind that its specificity is not absolute. The purpose of the present study is to point out some useful aspects and advantages of the method, and describe the experience with some technical aspects of the procedure, standardized in keeping with the conditions in the laboratory at the institute to extend its use in the country.

Key words: comet assay; deoxyribonucleic acid; agarose; alkaline electrophoresis.

INTRODUCCIÓN

El bioensayo cometa, también conocido como electroforesis alcalina de células individuales (del inglés: *Single Cell Gel Electrophoresis Assay*), es una prueba que evalúa el daño del material genético causado por diferentes agentes químicos y físicos.¹

El primer acercamiento a esta técnica ocurrió en 1970 cuando *Piter Cook* y colaboradores desarrollaron una técnica para investigar la estructura nuclear basado en la lisis de las células con detergente no iónicos y cloruro de sodio a alta molaridad.² *Rydberg* y *Johanson* introdujeron el uso de la electroforesis, utilizando células de hámster embebidas en agarosas, las cuales después de ser lisadas en un medio alcalino, las cadenas de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) eran visualizadas con naranja de acridina.³ Este método fue modificado por *Östling* y *Johanson* en 1984, quienes fueron los primeros en desarrollar una técnica de electroforesis en microgeles para detectar el daño al ADN a nivel de células individuales.⁴ En esta técnica las células son embebidas en agarosa y son añadidas en láminas de microscopía para ser sometidas a una electroforesis neutral, tras la lisis en presencia de sales y detergentes. Las células con una elevada frecuencia de rupturas de doble cadena (RDC) mostraron una significativa migración del ADN hacia el ánodo. Ellos observaron que la cantidad de ADN que migraba hacia el ánodo incrementaba en las células irradiadas en una forma dosis dependiente. De esta forma *Ostling* y *Johanson* fueron capaces de cuantificar la relación dosis/respuesta midiéndose la intensidad de la fluorescencia desde la cabeza del cometa hacia varias posiciones de la cola.⁵

Las condiciones neutrales limitaron la utilidad del ensayo, es por esto que en 1988, *Singh* y col., introdujeron una técnica en microgeles que involucra la electroforesis en condición alcalina, para detectar el daño al ADN en células individuales.⁶ En

estas condiciones de pH la migración del ADN es asociada con elevados niveles de rupturas de simples cadenas (RSC) asociadas con sitios de reparación por escisión incompletos y sitios lábiles álcalis (SLA).

Dos años más tarde *Olive* en el año 1990, introdujo otra versión alcalina de este ensayo, con esta variante se detectan SLA convertidos en RSC.⁷ Por lo tanto, en la actualidad existen dos versiones del ensayo Cometa: una, introducida por *Sing* y *colaboradores*, y otra, desarrollada por *Olive* y *colaboradores*. Las dos versiones son similares en principio, pero la mayor diferencia está dada en los valores de pH de la electroforesis. El método de *Sing*, conocida como electroforesis alcalina porque emplea pH > 13, mientras que el método de *Olive*, emplea electroforesis con pH de 8,3 y se conoce como electroforesis neutra. Ambos métodos son capaces de detectar ruptura de las simple y doble cadenas de ADN, pero el método alcalino detecta además, sitios alcalinos lábiles. Por esta razón el ensayo en condiciones alcalinas es el más usado.⁸

El propósito de este artículo es destacar algunos conceptos acerca del Ensayo cometa, considerándolo como una técnica útil en las ciencias e investigaciones actuales y describir la experiencia en algunos aspectos técnicos del proceder normalizado según las condiciones del laboratorio en el Instituto, explotándose todas sus potencialidades a través de la divulgación y comprensión de todas sus ventajas.

MÉTODOS

Los pasos básicos en el ensayo alcalino son:

- Obtención de una suspensión de células, preparación de las láminas de microscopio.
- Lisis de las células con tratamiento enzimático (opcional).
- Electroforesis alcalina, neutralización y tinción del ADN para la visualización del cometa.

El ensayo Cometa puede realizarse tanto a partir de la sangre total como de sus componentes de forma aislada:⁹ eritrocitos, los linfocitos¹⁰ o neutrófilos.¹¹

En las preparaciones a partir de cultivo, la inducción del daño del ADN puede lograrse por la acción enzimática de la tripsina o por el raspado de las células, maceración o homogenización. Todos los procedimientos deben ser comparados con controles.¹²

Una vez que se obtiene la suspensión celular esta es embebida en metilagarosa al 1 % y montada en una lámina. En el pasado estas láminas eran preparada en placas precubiertas con agarosa y entonces se aplicaba otra capa de agarosa como un sándwich de células entre el agar. En la actualidad se utilizan las láminas especializadas para el cometa con barreras hidrofóbicas que contiene agarosa dentro de pozos. La suspensión células/agarosa es añadida de forma directa al pozo, lo que reduce el tiempo de preparación. La agarosa entonces enfriada y solidificada es sometida a una solución que contiene alta concentración de sales y detergente a pH 10. El objetivo de esta solución de lisis es dañar las membranas

celulares y nucleares para exponer el núcleo a altas concentraciones de sal lo cual solubiliza la histonas que estabiliza la doble hélice del ADN.¹³

Cuando la lisis es completada las láminas son colocadas en solución alcalina a $\text{pH} > 13$; el objetivo de este paso es permitir que la solución de lisis difunda fuera de la agarosa. Lo más importante es que la alta alcalinidad rompe los puentes de hidrógenos entre los pares de bases de la doble hélice de la molécula de ADN. Esto produce un desenrollamiento de la hebra de ADN y la generación de fragmentos.

Después del desenrollamiento alcalino las células son sometidas a una electroforesis en condiciones alcalina, esto permite la expresión de sitios de ADN de doble cadenas de simple cadenas y sitios lábiles. Los fragmentos de ADN con carga negativa son atraídos hacia el ánodo dando al núcleo la característica de cola de un cometa.

La capacidad de los fragmentos de ADN de migrar a través de la agarosa depende de la densidad de la agarosa, el número de roturas, el tamaño de los fragmentos y las condiciones de la electroforesis.¹⁴

El próximo paso es neutralizar las placas sumergiéndola en una solución acuosa de tris-tampón. Las placas son teñidas con solución fluorescente que une al ADN como son la naranja de acridina, bromuro de etidio e iodo propidion.¹⁵

El bromuro de etidio es más usado que el naranja de acridina porque puede distinguir doble cadenas (las cuales fluorescen verdes) de las simples cadenas de ADN o de ARN (las cuales fluorifican rojas).

La interpretación del cometa varía en la literatura. La puntuación visual se obtiene por categorización del cometa en cinco clases (0-4), casi todos los ADN con cola y reportado en unidades arbitrarias. Esto también puede ser interpretado reportándose la proporción de células con daño (cola del cometa), midiéndose la extensión de la migración del ADN como radio longitud / ancho con las células que no exhiben migración como grado 1. En los últimos años se han diseñado software para el análisis de las imágenes los cuales producen varios tipos de puntos de medición.¹⁶

Uno de estos puntos más populares han sido desarrollado por *Olive y colaboradores*.¹⁴ El momento del cometa es definido como el producto del porcentaje del ADN en el cometa (intensidad) y la media de la distancia entre la cabeza y la posición de la cola. Este parámetro toma en cuenta el tamaño de los fragmentos (longitud de la cola) y el número de fragmentos (intensidad de la cola).

La detección de la migración del ADN alterado depende de varios parámetros, tales como: la concentración de la matriz de agarosa, el pH, la temperatura y duración del desenrollamiento de la hebra de ADN, voltaje, amperaje y duración de la electroforesis.¹⁷

El principio básico del ensayo alcalino, es la migración del ADN en una matriz de agarosa bajo condiciones de electroforesis bajo voltaje (30 Volts/cm) luego, al ser observada la célula al microscopio (por fluorescencia o por tinción con plata del material nuclear), presenta la apariencia de un cometa, con una cabeza (región nuclear) y cola (formada por fragmentos nucleares que han migrado en dirección del ánodo) por lo que este ensayo es también conocido como ensayo Cometa, debido al patrón de migración del ADN que se produce en las células dañadas.

El protocolo de este ensayo ha quedado bien establecido para detectar el daño al ADN, sobre todo por las rupturas de cadena, la formación de sitios lábiles al álcali, los entrecruzamientos ADN-ADN y ADN-proteínas. La aplicación más reciente se ha centrado en la evaluación de los mecanismos de reparación de daño oxidativo en el ADN en células eucariotas obtenidas tanto de estudios *in vivo* como *in vitro*.¹⁸

En el laboratorio de toxicología del Instituto Nacional de Higiene y Epidemiología de la Habana, se ha estandarizado el protocolo original de *James McNamee* y *Pascale Bellier*, para el estudio del daño de ADN en linfocitos aislados.

Este se realiza a partir de la extracción de sangre total en tubos *Vacutainer* con anticoagulante EDTA (etilendiaminotetracético), cumpliéndose los requisitos de aseguramiento de calidad y de bioseguridad establecidos por el Instituto de Salud Pública de Quebec,¹⁹ (Protocolo de muestras de sangre para la determinación de metales, 2004).

En la fase analítica la suspensión de células aisladas y congeladas en su medio, se fijan por duplicados en unas pequeñas cámaras que tienen dos pozos sin fondos. Luego estas células son embebidas en agarosa de bajo punto de fusión para la formación de un microgel. En cada corrida se utiliza como control negativo una muestra de sangre total que no haya recibido daño y como control positivo una muestra de sangre que se la ha inducido el daño con peróxido de hidrógeno como agente genotóxico. A continuación se produce la lisis celular en medio alcalino y alta concentración de sales, para provocar daño en las membranas celulares y nucleares, removiéndose las proteínas por toda la noche a 4° C en la oscuridad.

Las muestras son sometidas a electroforesis alcalina en un ambiente de oscuridad, luego se pasa a la neutralización por un tiempo de 30 minutos a temperatura ambiente con una solución de neutralización. Los microgeles, se fijan en alcohol absoluto alrededor de 2 h, sin oscuridad. Las preparaciones son sometidas a tinción de plata y se realiza el conteo visual por el método de observación directa con ayuda del microscopio. El conteo se realiza en el centro de cada microgel, montados por duplicado; se cuenta 100 cometas que de acuerdo a la morfología de los núcleos de las células, se clasificaron en diferentes grados (desde 0-4). Expresándolo en unidades arbitrarias (UA) según la fórmula:

$$UA = \# \text{ grado } 0 \times 0 + \# \text{ grado } 1 \times 1 + \# \text{ grado } 2 \times 2 + \# \text{ grado } 3 \times 3 + \# \text{ grado } 4 \times 4$$

En la fase post analítica para la confirmación de los resultados, no existen valores guías, pero se realiza bajo condiciones de aseguramiento de calidad. En cada ensayo, se emplea un control negativo y otro positivo, lo que permite analizar la variabilidad de diferentes grados (desde 0-4).

VARIANTES DE ENSAYOS COMETAS MÁS COMUNES

El uso de determinadas enzimas o anticuerpos permiten usar el ensayo Cometa en la determinación de mecanismos específicos de acción genotóxica, dentro de ello se encuentra el uso de las enzimas endonucleasa III para la detección del daño oxidativo en las bases pirimidínicas o la enzima formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG, sus siglas en inglés) para las bases purínicas,²⁰ así como el uso de anticuerpos específicos de lesión para detectar el daño inducido por la radiación UV (ultravioleta).²¹

La versión acelular o subcelular del ensayo Cometa resulta de gran interés en los estudios de toxicología genética. En esta variante del ensayo el tratamiento se realiza sobre el ADN desnudo, por tanto una alteración en la migración del ADN bajo estas condiciones indica que la sustancia de prueba es capaz de inducir daño al material genético independiente a la citotoxicidad y al efecto que puedan ejercer las barreras biológicas.²²

Casi desde sus inicios el ensayo se empleó en el estudio de los procesos de reparación lo cual solo implicaba incubar un tiempo sin el agente inductor del daño, sin embargo, se han desarrollado otras variante novedosa para medir la reparación.²³

Si bien desde 1993 se publicaron estudios empleándose este ensayo para la detección de apoptosis, cuantificándose las células dañadas (más del 85 % del ADN migrado). Este tipo de daño se observaba con cinco minutos de tratamiento con peróxido de hidrogeno en frío y en el tiempo después de irradiar a altas dosis.²¹ En los años posteriores se publicaron dos métodos que eliminándose el paso de electroforesis e incrementándose el porcentaje de la agarosa, han logrado obtener mejor correlación con otros ensayos específicos de detección de apoptosis.²⁴

En el ensayo Cometa, una incrementada migración del ADN (cometas categoría 4) puede además, estar asociada con la fragmentación del ADN que tiene lugar durante los procesos de necrosis o apoptosis.²⁵ En estos casos se deben realizar ensayos de reparación para determinar si el daño es reversible o no, además de otros ensayos específicos para discernir si en el daño genotóxico del proceso de apoptosis está involucrado.

Roser y colaboradores en el año 2001, demostraron que el radio apoptosis/cometa puede variar en función del tipo celular, la preparación celular, tipo de compuesto y la concentración estudiada.²⁶

El ensayo Cometa se distingue por sus múltiples ventajas entre las que se destacan:

- La demostrada sensibilidad para detectar bajos niveles de daño al ADN.
- Rápida realización (resultados en pocos días).
- Análisis de los datos a nivel de células individuales.
- Requiere un pequeño tamaño de muestra (pocas células).
- Flexibilidad y bajo costo.
- Aplicable a cualquier población de células eucariotas.^{23,26}

Este grupo de ventajas justifica su amplio uso en metales así como, en el biomonitoreo ambiental y humano así como ensayos clínicos. Esta prueba es empleada por múltiples disciplinas científicas como la toxicología genética, el biomonitoreo ambiental, la investigación clínica y la epidemiología molecular.²⁴

El ensayo Cometa se ha utilizado en ensayos de genotoxicidad para una gran variedad de metales pesticidas fármacos como drogas antineoplásicas químicos industriales, agroquímicos.²⁷⁻²⁹

Esta técnica es aplicada para determinar el grado de toxicidad de determinadas sustancias que causan daño al ADN ya que brinda información del mecanismo de daño, para lo cual se utilizan endonucleasas específicas que reconocen varios tipos de bases dañadas. También puede ser útil para probar si una sustancia tiene un efecto directo en la carcinogénesis por la adición de enzimas capaces de metabolizar el carcinógeno de forma indirecta hacia su forma activa. Por el

contrario el Cometa también puede utilizarse para determinar el carácter protector de una sustancia, por ejemplo su capacidad antioxidante de reducir el efecto oxidativo generado por sustancia como el peróxido de hidrógeno.

Este bioensayo también es útil para biomonitoriar el ambiente; se han realizados estudios en células de peces de lagos contaminados y tejidos de roedores que viven en los desperdicios.³⁰ Así mismo también ha sido empleado en biomonitorio en humano, por ejemplo en individuo con sospecha de exposición ocupacional a agentes que dañan el ADN, o a las células nasales epiteliales en individuos que viven ciudades con contaminación ambiental.³¹

La aplicación del ensayo Cometa también se ha extendido a la clínica. Muchos estudios se han reportados en fumadores y no fumadores, para el análisis de determinados hábitos dietéticos, la actividad física, el envejecimiento³²⁻³⁴ y en diferentes enfermedades como el Lupus Eritematosus Sistémico,^{35,36} Artritis Reumatoide,³⁷ Diabetes Mellitus³⁸ y para estimar la susceptibilidad al cáncer.

A pesar de sus múltiples aplicaciones, se debe tener en cuenta que este bioensayo es una técnica inespecífica, pues solo detecta el daño del ADN y no el agente tóxico, responsable de este efecto. Sin embargo, se puede obtener más información si se correlacionan sus resultados con las técnicas de micronúcleo, porque permite conocer si el daño del ADN es reversible o no.

En Cuba el primer reporte de utilización de esta técnica fue realizado por investigadores del Centro de Investigaciones Biomédicas, quienes reportaron la normalización de este ensayo utilizándose linfocitos de sangre periférica y queratinocitos humanos.³⁹

Recién el Instituto Nacional de Higiene reportó la utilización de esta técnica para el estudio del daño de ADN en niños portadores de trastornos del espectro autista, en los que se encontró un nivel de daño en correspondencia con la gravedad del trastorno cognitivo de estos pacientes.⁴⁰

CONSIDERACIONES FINALES

Aunque el ensayo Cometa es considerado como una técnica útil en las ciencias biomédicas, se considera que no están explotándose al máximo todas sus potencialidades, en las investigaciones actuales. Esto es motivado por la poca divulgación y comprensión de todas sus ventajas. Esta técnica promete dar respuesta a aspectos muy importante como son los niveles basales de daño de ADN en las células normales, las variaciones en la capacidad de los humanos de reparar su ADN y regular su reparación a nivel molecular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kassie F, Parzefall W, Knasmuller S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat Res. PubMed.* 2000 Jul; 463(1): 13-31.

2. Cook PR, Brazell IA, Jost E. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *Journal of Cell Science*. PubMed. 1976 Nov 1;22(2):303-24.
3. Rydberg B, Johanson KJ. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: Hanawalt EC, Friedberg EC, Fox CF (eds). *DNA Repair Mechanisms*. New York: Academic Press; 1978. p. 465-8.
4. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1984;123(1):291-8.
5. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Expl Cell Res*. PubMed. 1988 Mar;175(1):184-91.
6. Olive PL, Banáth JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat. Res*. PubMed. 1990 Apr;122(1):86-94.
7. Rojas E, López MC, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography Biomedical Sciences and Applications*. 1999 Feb [cited 2011 Dec 10]; 22(1-2):5. Available from: http://hinari-gw.who.int/whalecompdn.sciencedirect.com/whalecom0/science?_ob=MiamiImageURL&_cid=271410&_user=2778716&_pii=S0378434798003132&_check=y&_origin=browse&_zone=rslt_list_item&_coverDate=1999-02-05&wchp=dGLzVIS-zSkWA&md5=e53a2ab93d733a229dfd16626e9d7ad9/1-s2.0-S0378434798003132-main.pdf
8. Singh NP, Tice RR, Stephens RE, Schneider EL. A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. *Mutat Res*. PubMed. 1991 Jun;252(3):289-96.
9. Chuang CH, Hu ML. Use of whole blood directly for single-cell gel electrophoresis (comet) assay in vivo and white blood cells for in vitro assay. *Mutat Res*. PubMed. 2004 Nov 14;564(1):75-82.
10. Duthie SJ, Pirie L, Jenkinson AM, Narayanan S. Cryopreserved versus freshly isolated lymphocytes in human biomonitoring: endogenous and induced DNA damage, antioxidant status and repair capability. *Mutagenesis*. PubMed. 2002 May;17(3):211-4.
11. Giovannelli L, Pitozzi V, Riolo S, Dolara P. Measurement of DNA breaks and oxidative damage in polymorphonuclear and mononuclear white blood cells: a novel approach using the comet assay. *Mutat Res*. PubMed. 2003 Jul 8;538(1-2):71-80.
12. Olive PL, Durand RE. Heterogeneity in DNA Damage using the Comet Assay. *Cytometry Part A*. 2005 May 27;66A(1):1-8.
13. Collins AR, Gaivao I. DNA base excision repair as a biomarker in molecular epidemiology. *Molecular aspects of medicine*. 2007 May 18;28:307-22.

14. Mc Kelvey-Martin VJ, Green MHL, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Meo MP, Collins A, et al. The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review. *Mutat Res. PubMed.* 1993 Jul;288(1): 47-63.
15. Collins AR. The Comet Assay for DNA Damage and Repair, Principles, Applications, and Limitations. *Molecular Biotechnology.* 2004 March [cited 2011 Sept 10];26(3):3. Available from: <http://hinari-gw.who.int/whalecomwww.springerlink.com/whalecom0/content/e62l3p154h35ttn8/fulltext.pdf>
16. Tice RR, Agurell E, Andreson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/Comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 2000 Jun 6 [cited 2013 Mar 11];35(3):5. Available from: [http://hinari-gw.who.int/whalecomonlinelibrary.wiley.com/whalecom0/doi/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3%3C206::AID-EM8%3E3.0.CO;2-J/pdf](http://hinari-gw.who.int/whalecomonlinelibrary.wiley.com/whalecom0/doi/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3%3C206::AID-EM8%3E3.0.CO;2-J/pdf).
17. Collins AR. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutation Research. PubMed.* 2009 Jan-Feb;681(1): 24–32.
18. Lagroye I, Hook GJ, Wettring BA, Baty JD, Moros EG, Straube WL, et al. Measurements of alkali-labile DNA damage and protein-DNA crosslinks after 2450 MHz microwave and low-dose gamma irradiation in vitro. *Radiation Research. PubMed.* 2004 Feb;161(2):201-14.
19. Wozniak K, Blasiak J. Nickel impairs the repair of UV-and MNNG-damaged DNA. *Cellular and Molecular Biology Letters. PubMed.* 2004;9(1):83-94.
20. Hartmann A, Schumacher M, Plappert-Helbig U, Lowe P, Suter W, Mueller L, et al. Use of the alkaline in vivo comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagenesis. PubMed.* 2004 Jan;19(1):51-9.
21. Collins AR, Dusinská M, Horváthová E, Munro E, Savio M, Stetina R, et al. Inter-individual differences in repair of DNA base oxidation, measured in vitro with the comet assay. *Mutagenesis. PubMed.* 2001 Jul;16(4):297-301.
22. Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivao I, Giovannelli L, Kruszewski M, et al. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis. PubMed.* 2008 May;23(3):143–51.
23. Hartmann A, Plappert U, Poetter F, Suter W. Comparative study with the alkaline comet assay and the chromosome aberration test. *Mutation Research. PubMed.* 2003 Apr 20;536(1-2):27-38.
24. Roser S, Pool BL, Rechkemmer G. Contribution of apoptosis to responses in the comet assay. *Mutation Research. PubMed.* 2001 Oct 18;497(1-2):169-75.
25. Gadano A, Gurni A, Carballo MA. Screening genotóxico de hierbas medicinales utilizadas en la medicina tradicional argentina. *Acta Toxicol. Argent.* 2004 [cited 2013 Mar 11];12 (1):10. Available from: http://www.ataonline.org.ar/bibliotecavirtual/acta_toxicologica/ata12_1.pdf

26. Vindas R, Ortiz F, Ramírez V, Cuenca P. Genotoxicidad de tres plaguicidas utilizados en la actividad bananera de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*. Sept 2004 [citada 11 Dic 2011];52(3):5. Available from: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0034-77442004000300022&script=sci_arttext.
27. Cárdenas O, Varona M, Patiño RI, Groot H, Sicard D, Tórres MM, et al. Exposición a solventes orgánicos y efectos genotóxicos en trabajadores de fábricas de pinturas en Bogotá. *Rev Salud Pública*. 2007 May 10;9(2):275-88.
28. Salagovic J, Gilles J, Verschaeve L, Kalina I. The comet assay for the detection of genotoxic damage in the earthworms: a promising tool for assessing the biological hazards of polluted sites. *Folia Biologica*. PubMed. 1996;42(1-2):17-21.
29. McKenna DJ, Doherty BA, Downes CS, McKeown SR, McKelvey-Martin VJ. Use of the Comet-FISH Assay to Compare DNA Damage and Repair in p53 and hTERT Genes following Ionizing radiation. *PLoS One*. 2012 Oct 9;7(11):e49364.
30. Lazcano E, Sánchez LM, Benowitz N, Barbosa L, Hernández M. Elevada concentración de metabolitos de cotinina en hijos de padres fumadores. *Salud Pública de México*. 2007;49(sup 2):213-223.
31. Garaj V, Gajski G, Vlatka B. Alkaline comet assay as a biomarker of DNA-damage encountered in workers engaged in cigarette manufacturing. *Periodicum biologorum*. 2009 Mar 31;111(1):85-90.
32. Moktar A, Ravoori S, Vadhanm MV, Pan J, Rai SN, Jenson AB, et al. Vaginal cells of smokers are more resistant to human papillomavirus infection than that of non-smokers. *Exp Mol Pathol*. PubMed. 2012 Dec;93(3):422-7.
33. Piperakis SM, Kontogianni K, Karanastasi G, Iakovidou-Kritsi Z, Piperakis MM. The use of comet assay in measuring DNA damage and repair efficiency in child, adult, and old age populations. *Cell Biol Toxicol*. PubMed. 2009 Feb;25(1):65-71.
34. Davies RC, Pettijohn K, Fike F, Wang J, Nahas SA, Tunuguntla R, et al. Defective DNA double-strand break repair in pediatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. PubMed. 2012 Feb;64(2):568-78.
35. Zhanataev AK, Lisitsyna TA, Durnev AD, Nasonov EL, Seredenin SB. Effect of afobazole on DNA damage in patients with systemic lupus erythematosus. *Bull Exp Biol Med*. PubMed. 2009 Oct;148(4):602-5.
36. Karaman A, Binici DN, Melikoglu MA. Comet assay and analysis of micronucleus formation in patients with rheumatoid arthritis. *Mutat Res*. PubMed. 2011 Mar 18;721(1):1-5.
37. Kasznicki J, Kosmalski M, Sliwiska A, Mrowicka M, Stanczyk M, Majsterek I, et al. Evaluation of oxidative stress markers in pathogenesis of diabetic neuropathy. *Mol Biol Rep*. PubMed. 2012 Sep;39(9):8669-78.

38. Prieto EA, Llópiz ND. Normalización de la electroforesis de células individuales (Ensayo Cometa). Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 1999 [citada 11 Dic 2011];18(1):1. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v18n1/ibi13199.pdf>

39. García EN, Rey AR, Santisteban MW, Hernandez LR, Robinson MA, Cabrera AP, et al. Niveles de plomo y daño en el ADN en niños con trastornos del espectro autista. Revista cubana de higiene y epidemiología; 2013.

Recibido: 10 de enero de 2016.

Aprobado: 11 de febrero de 2016.

Alexis Rodríguez-Rey. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología.
La Habana, Cuba.
Correo electrónico: alexisrodriguez@infomed.sld.cu