

Daño en el ADN en leucocitos de equinos sometidos a esfuerzo físico

DNA damage in leukocytes of equines subjected to physical effort

Muriel M^{1*}, Seoane A², Ferreira V¹, López R¹, Boffi FM³, Picco SJ²

¹Servicio de Medicina y Cirugía de Grandes Animales, Centro de Fisiología y Fisiopatología del Equino Deportivo, Hospital Escuela;

²Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET-CONICET-UNLP).

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata; ³Profesional independiente.

*Correo electrónico del autor: marcosmuriel@yahoo.com

Resumen: En los últimos años se ha observado un creciente interés por el estudio de los efectos beneficiosos y perjudiciales asociados al ejercicio. El objetivo del presente trabajo fue establecer la existencia de daño en el ADN en leucocitos circulantes de equinos sometidos a un test de ejercicio de alta intensidad y corta duración. La determinación del daño en el ADN se realizó mediante el ensayo cometa versión alcalina. Se usaron 5 equinos. Se extrajeron muestras de sangre al comenzar el ejercicio, al alcanzar la velocidad máxima, al finalizar el ejercicio y a los 30 días post ejercicio. Simultáneamente se realizaron ergoespirometrías continuas para determinar el consumo de oxígeno durante el ejercicio. La frecuencia relativa de células con daño en el ADN fue 0,122, 0,240, 0,210 y 0,100, mientras que el índice de daño en el ADN fue 11,8, 28,4, 23 y 10,4 UA. Se observaron incrementos significativos con respecto al tiempo basal y 30 días post ejercicio cuando los animales alcanzaron la máxima velocidad y al finalizar el ejercicio ($p < 0,05$). Se observó una alta correlación entre el consumo de oxígeno y las células con daño ($r = 0,905$), así como con el índice de daño ($r = 0,935$). Estos resultados sugieren que los factores inductores de daño genotóxico se producen mayoritariamente durante el esfuerzo físico y que probablemente se deban a radicales libres del oxígeno.

Palabras clave: equinos, ejercicio, daño en el ADN

Abstract: In recent years there has been a growing interest in the study of the beneficial and harmful effects associated with exercise. The aim of this study was to establish the existence of DNA damage in circulating leukocytes of horses undergoing high intensity and short term physical activity by using the alkaline comet assay. Five horses subjected to a standardized exercise test were used. Samples were collected before starting the exercise, at the point of reaching maximal speed, at the end of the test and 30 days post exercise. Simultaneously, oxygen consumption during the exercise test was measured. The relative frequency of cells with DNA damage was 0.122, 0.240, 0.210 and 0.100, respectively. DNA damage index was 11,8, 28,4, 23 and 10,4 UA, respectively. Significant increases were observed from baseline time and 30 days after exercise when the animals reached maximum speed and at the end of the exercise ($p < 0.05$). These results suggest that genotoxic damage inducing factors occur mainly during physical fatigue, and that this is probably due to oxygen free radicals.

Key words: equine, exercise, DNA damage

Introducción

En los últimos años se ha observado un creciente interés por el estudio de los efectos beneficiosos y perjudiciales asociados al ejercicio. Evidencias obtenidas a partir de algunos estudios realizados en animales sugieren que el ejercicio regular disminuye el riesgo de daño en el ADN (Schneider *et al.* 1995; Radak *et al.* 2002). Sin embargo, evidencias recientes parecen indicar que el ejercicio intenso y de corta duración potenciaría la aparición de daño en dicha molécula (Cash *et al.* 2014). La génesis de dicho daño se vincula a la generación de radicales libres durante el ejercicio. En años recientes numerosos trabajos han reportado la aparición de daño en el ADN asociado a estrés oxidativo y ejercicio en diferentes modelos y tipos de animales (Wierzbica *et al.* 2006; Gandhi y Gunjan 2009). Las primeras evidencias que relacionan al ejercicio con el daño oxidativo datan del año 1978 (Dillard *et al.* 1978) pero es en las últimas tres décadas que se han acumulado abundantes conocimientos que vinculan estos dos hechos. En la actualidad, está claramente establecido que durante el ejercicio se produce un aumento en la producción de radicales libres (RL) del oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) y del nitrógeno (RNS, del inglés *reactive nitrogen species*) y que dicho aumento tiene su base en el incremento de ROS y RNS producidos especialmente en el propio músculo en ejercicio (Powers y Jacson 2008). La producción de RL puede alcanzar niveles alarmantes durante el ejercicio extremo, rompiendo el equilibrio oxidante/antioxidante y causando daño en moléculas orgánicas, tales como componentes de membrana, proteínas, ADN, etc.

La versión alcalina de la electroforesis en gel de células aisladas, más conocida como “*Ensayo Cometa*”, es un método sensible, confiable y rápido para detectar rupturas de simple y doble cadena en la molécula de ADN, así como sitios lábiles al álcali. Con esta técnica, la cantidad de daño en el ADN está dada por la cantidad de ADN que migra en el campo electroforético, en forma proporcional a la cantidad de daño presente (Picco *et al.* 2001).

El objetivo del presente trabajo fue establecer la existencia de daño en el ADN en leucocitos circulantes de equinos sometidos a un test de ejercicio de alta intensidad y corta duración mediante la utilización de la electroforesis en gel de células aisladas (“*Ensayo Cometa*”).

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron cinco equinos de raza Árabe (2 hembras, 2 machos castrados y un macho entero) con un peso promedio de 356,4 kg (\pm 47,22) y entre 4 y

7 años de edad, habituados a realizar entrenamiento en forma continua en cinta ergométrica. Los caballos fueron alojados en boxes del Hospital Escuela y del Laboratorio de Fisiología y Fisiopatología del Equino Deportivo de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP) durante todo el período de ensayo. Los animales se alimentaron sobre la base de un 2,5% del peso corporal de materia seca. La dieta presentó una relación 50:50 de heno (rollo de pastura) y concentrado (alimento balanceado con un 12% de proteína y 2,75 Mcal/Kg), y agua ad-libitum.

Protocolo de ejercicio

Los animales fueron sometidos a un test de ejercicio estandarizado sobre una cinta ergométrica marca Kagra modelo 2200. El test constó de las siguientes etapas: un precalentamiento de 1 min a 1,5 m/s y 4 min a 4 m/s; a continuación y con un 3% de pendiente se realizaron etapas de 1 min. de duración con intensidades crecientes (5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13 m/s etc.) hasta alcanzar el punto de fatiga. Alcanzado el mismo se realizó la fase de recuperación sin pendiente a 4 y 1,5 m/s durante 4 y 1 min, respectivamente.

Toma de muestras

Se obtuvieron muestras de sangre periférica por punción de la vena yugular derecha. Para ello se utilizaron Abbocat N° 14 y una guía de 1,20 m de longitud recubierta con papel de aluminio para evitar el contacto de la sangre con la luz. Dichos elementos permanecieron colocados y permeables durante todo el test de ejercicio. Las muestras se tomaron con el animal en reposo previo al ejercicio (T0), durante el test de ejercicio a la máxima velocidad desarrollada por cada caballo (T1), al finalizar el ejercicio (T2) y 30 días post ejercicio (T3). En cada toma de muestras se extrajeron 2,5 ml de sangre, las que fueron almacenadas en tubos eppendorf heparinizados. Las muestras se mantuvieron refrigeradas hasta el posterior análisis.

Ensayo cometa (versión alcalina)

Para la realización del ensayo cometa las muestras fueron almacenadas en ambiente oscuro y a 4 °C por no más de 30 minutos. El ensayo se desarrolló de acuerdo con el protocolo descrito por Singh *et al.* (1988) con pequeñas modificaciones. Se mezclaron 15 ml de sangre con 75 ml de agarosa de bajo punto de fusión al 0,5% (Gibco BRL, NY, USA). Dicha mezcla se colocó sobre un portaobjetos cubierto previamente con agarosa de punto de fusión normal al 0,5% (Promega, USA) previamente solidificada. Se preparon dos portaobjetos por animal. Luego, las células fueron lisadas en una solución detergente (100 mM EDTA, 2,5 M NaCl, 10 mM Tris, 1% Triton X-100 y

10 % DMSO) durante, al menos, una hora antes de la electroforesis. Para la electroforesis los portaobjetos fueron colocados en cubeta horizontal y cubiertos con una solución alcalina de electroforesis (1 mM EDTA, 300 mM NaOH, pH > 13) durante 20 minutos. La electroforesis se realizó durante 30 minutos a 25 V y 300 mA (1,25 V/cm). Luego de la electroforesis los portaobjetos fueron enjuagados 3 veces con una solución buffer de Tris (pH 7,5) durante 5 minutos y finalmente con agua destilada. Una vez secos, los portaobjetos fueron teñidos con una solución de SYBR Green I 1/1000 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) (Ward y Marples 2000). El análisis se realizó utilizando un microscopio Olympus BX 40, provisto de una lámpara de mercurio de alta presión de 100 W USHIO USH 102 D. El registro de las imágenes se realizó con una cámara Sony CCD y las imágenes se grabaron utilizando el software Image Pro Plus^a. Los leucocitos fueron clasificados primariamente en normales (núcleos sin migración del ADN) y anormales (núcleos con migración del ADN) (Figura 1). Posteriormente se realizó la clasificación por niveles de daño, siguiendo el criterio propuesto por Kobayashi *et al.* (1995). Finalmente se estableció el índice de daño en el ADN de acuerdo con los criterios y fórmula propuestos por Collins (2004), expresando los resultados en unidades arbitrarias de daño (UA).

Ergoespirometría

Los registros ergoespirométricos fueron obtenidos a través del sistema Cortex Biofísica MetaVet. El equipo se calibra con cada caballo en particular en función de las condiciones atmosféricas (temperatura ambiental, presión atmosférica, humedad relativa

ambiente, presión de oxígeno ambiental y presión de dióxido de carbono ambiental) del lugar en el que se va a realizar el test de ejercicio. Una vez calibrado el equipo, se le coloca al equino la máscara provista de sensor de flujo/volumen y luego se lo sube a la cinta ergométrica para dar inicio al ejercicio. Este equipo permite medir el consumo de oxígeno (VO₂) en ambas condiciones, "Body temperature pressure saturated" (BTPS) en la que el análisis se realiza en presencia de vapor de agua o en "Standard temperature pressure and dry" (STPD), la que corresponde a una situación de 0 °C de temperatura y 760 mmHg de presión atmosférica al nivel del mar, en condiciones de ausencia de vapor de agua (seco). La información obtenida fue procesada con el Programa MetaSoft Vet Metabolic Stress®.

Análisis de los datos

Las frecuencias relativas de células anormales (0= ausencia; 1= 100 %) en cada tiempo de muestreo fueron comparadas utilizando el test de Chi cuadrado con corrección de Yates. Los diferentes niveles de daño y el índice de daño fueron comparados utilizando el test *t* de Student's (SSPS® Versión 11). La asociación entre células con daño o índice de daño con el consumo de oxígeno se realizó a través del coeficiente de correlación y *r* ajustado. Los resultados se expresaron como la media ± DS.

Resultados

Los resultados obtenidos al realizar el ensayo cometa versión alcalina se presentan en la tabla 1. La frecuencia relativa de células con daño en el ADN fue

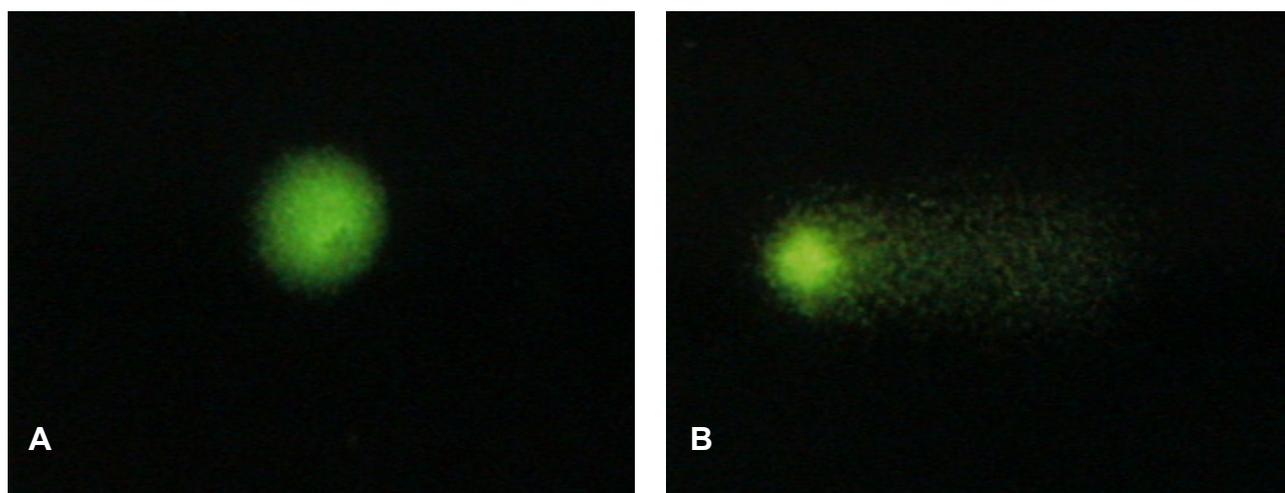


Figura 1. Imagen de un leucocito equino sin migración aparente del ADN (A) y de un leucocito con alto nivel de fragmentación del mismo (B), evidenciado por la reducción del diámetro del núcleo y la amplia cola de partículas fluorescentes que se forma hacia el polo positivo durante la electroforesis (cola del cometa). Tinción fluorescente Syber Green I (dilución 1/1000). Objetivo 40X.

Tabla 1. Resultados de la prueba de Chi cuadrado cuando se compararon las células anormales (con daño en el ADN) observados en el T0 y en los tiempos T1, T2 y T3.

Grupo comparado	Células con daño (cada 1000 células)	Valor de Chi cuadrado	Valor de p
T0	122	--	--
T1	240	46,17	< 0,001
T2	210	27,34	< 0,001
T3	100	2,23	0,135

0,122, 0,240, 0,210, y 0,100 para los tiempos T0, T1, T2 y T3, respectivamente. Se observó un aumento significativo de la frecuencia de células con daño con respecto al reposo (T0) en T1 y T2 ($X^2= 46,17$; $p < 0,005$ y $X^2= 27,34$; $p < 0,005$). También fue significativa la disminución observada entre T3 con respecto a T1 y T2, respectivamente ($X^2= 68,47$; $p < 0,005$ y $X^2= 45,36$; $p < 0,005$). No se observaron diferencias entre T0 y T3.

El índice de daño en el ADN experimentó un comportamiento similar al observado para la frecuencia de células con daño, siendo los valores obtenidos 11,8 ($\pm 3,56$), 28,4 ($\pm 9,12$), 23 ($\pm 9,66$) y 10,4 UA ($\pm 0,89$) para T0, T1, T2 y T3, respectivamente. Se observaron incrementos significativos entre T0 y T1 y entre T0 y T2 ($p= 0,0026$ y $0,020$, respectivamente) y disminuciones significativas entre T1 y T3 y entre T2 y T3 ($p= 0,001$ y $0,0099$, respectivamente). No se observaron diferencias entre T0 y T3.

La tabla 2 presenta los resultados obtenidos con el ensayo cometa, según el criterio de clasificación del daño en el ADN propuesto por Kobayashi *et al.* (1995). El nivel de células sin migración aparente del ADN (grado 0) alcanzó mínimos valores con respecto al control cuando los animales alcanzaron la velocidad máxima (T1) ($p= 0,006$) y al finalizar el test de ejercicio ($p= 0,021$). También se observaron diferencias significativas entre T1 y T3 y entre T2 y T3 ($p= 0,0021$ y $0,0084$, respectivamente). El nivel de células con daño leve (grado 1) presentó un comportamiento inverso al de las células grado 0, incrementándose

hasta alcanzar los equinos la máxima velocidad (T1) y al momento de finalizar el test de ejercicio (T2). Ambos incrementos fueron significativos con respecto al T0 ($p= 0,012$ y $0,023$, respectivamente). De la misma manera, también se observaron diferencias significativas entre T1 y T3 y entre T2 y T3 ($p= 0,003$ y $0,007$, respectivamente). Las células con daño moderado (grado 2) tuvieron un comportamiento similar al observado en los dos casos anteriores, pero no se observaron diferencias estadísticas significativas. Algo similar ocurrió con las células con daño intenso (grado 4) y con máximo nivel de daño (grado 5), en las cuales, si bien los máximos valores se observaron en T1 y T2, estos incrementos no fueron suficientes para ser estadísticamente significativos.

Los resultados obtenidos a partir de las ergoespirometrías (Tabla 3) muestran un marcado incremento en el consumo de oxígeno el cual inicialmente fue 3,367 l/min (velocidad inicial: 1,6 m/s), alcanzando su valor máximo en el momento de máxima velocidad (45,78 l/min a 12,72 m/s), cediendo al final del ejercicio, momento en el cual los valores promedio fueron de 16,259 l/min. Esto representó un incremento en el consumo de oxígeno de aproximadamente 14 veces en relación con el registrado al inicio del ejercicio. Al final del mismo el consumo de oxígeno se redujo, pero aun así se mantuvo incrementado unas 5 veces en relación con el registrado al inicio. La $VO_{2\text{máx}}$ alcanzó un valor promedio de 51 77 l/min. Puede observarse en la tabla 1 que tanto al inicio como al final del ejercicio los valores de consumo de oxígeno presentaron

Tabla 2. Resultados obtenidos con el ensayo cometa al clasificar las células de daño en los 5 grados propuestos por Kobayashi *et al.* (1995). Valores medios expresados en porcentaje (\pm DS).

Tiempo	Grado 0 %	Grado 1 %	Grado 2 %	Grado 3 %	Grado 4 %
T0	88,60 ($\pm 3,84$)	11,00 ($\pm 4,18$)	0,40 ($\pm 0,54$)	0,00 ($\pm 0,00$)	0,00 ($\pm 0,00$)
T1	76,00 ($\pm 7,84$)	21,60 ($\pm 7,43$)	1,20 ($\pm 1,09$)	0,40 ($\pm 0,89$)	0,80 ($\pm 0,83$)
T2	79,00 ($\pm 8,09$)	19,60 ($\pm 7,02$)	1,00 ($\pm 1,79$)	0,20 ($\pm 0,44$)	0,20 ($\pm 0,44$)
T3	90,00 ($\pm 1,22$)	9,6 ($\pm 1,67$)	0,40 ($\pm 0,54$)	0,00 ($\pm 0,00$)	0,00 ($\pm 0,00$)

Tabla 3. Valores individuales y medios de consumo de O₂ (l/min) y velocidad máxima alcanzada (m/s) por los equinos utilizados en el ensayo.

	Consumo de O ₂ (l/min)			VO ₂ Max ⁴ (l/min)	Velocidad máxima ⁵ (m/s)
	Inicio ¹	Velocidad máxima ²	Fase final del ejercicio ³		
Equino 1	3,62	48,968	12,78	50,688	12,2
Equino 2	1,461	52,899	17,907	65,823	12,4
Equino 3	4,044	35,439	10,715	40,737	12,4
Equino 4	1,916	53,974	24,316	59,271	14,3
Equino 5	5,796	37,621	15,579	42,332	12,3
Media	3,36	45,78	16,25	51,77	12,72
DS⁶	1,743	8,681	5,266	10,790	0,887
ES⁷	0,779	3,882	2,355	4,825	0,396
CV⁸	51,778	18,963	32,388	20,842	6,974

¹Valor medio obtenido luego de hacer caminar a los caballos a 1,6 m/s durante 60 segundos, con determinaciones cada 10 segundos. ²Valor medio obtenido luego de hacer correr a los caballos a más de 12 m/s hasta agotamiento, con determinaciones cada 10 segundos. ³Valor medio obtenido luego de hacer caminar a los caballos a 1,6 m/s durante 60 segundos, con determinaciones cada 10 segundos, inmediatamente antes de bajarlos de la cinta ergométrica. ⁴Valor máximo de consumo de O₂. ⁵Velocidad máxima desarrollada por cada caballo. ⁶DS: desvío estándar. ⁷ES: error estándar de la media. ⁸CV: coeficiente de variación.

una gran dispersión, con coeficientes de variación cercanos al 52 y 32 %, respectivamente, mientras que en el esfuerzo máximo y con el máximo consumo de oxígeno la dispersión fue menor (entre 18 y 20 %).

La correlación entre la frecuencia de células con daño en el ADN y el consumo de oxígeno durante el test de ejercicio fue de 0,905 ($R^2= 0,819$), mientras que la asociación entre índice de daño y consumo de oxígeno arrojó una correlación de 0,935 ($R^2= 0,875$).

Discusión

La producción de daño en el ADN asociado al ejercicio no es, en sí mismo, un fenómeno desconocido. Existen numerosos estudios en animales o humanos sometidos a diferentes niveles de ejercicio en los que se demostró el daño en el ADN, muchos de ellos utilizando también el ensayo cometa. Sin embargo, el denominador común de estos trabajos fue la estimación del daño posterior al ejercicio y no durante el mismo (Hartmann et al. 1995; Niess et al. 1996; 1998; Mastaloudis et al. 2004). En tal sentido, este trabajo evaluó la generación de daño en el ADN durante el desarrollo del ejercicio mismo, bajo un modelo particular de ejercicio estandarizado.

Los resultados obtenidos permiten observar que el ejercicio, bajo las condiciones planteadas en el presente ensayo, produce un incremento en el nivel de daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica, alcanzando su máxima expresión en el momento de llegar los equinos a la máxima velocidad, pero manteniéndose significativamente alto al finalizar la prueba.

La frecuencia de células con daño refleja la

cantidad de células que se ven afectadas por lesiones en sus moléculas de ADN, mientras que el índice de daño representa una medida indirecta de la magnitud de dicho daño. El hecho de que en el momento en que se produce la mayor intensidad del ejercicio se haya observado la mayor frecuencia de células con migración del ADN y el mayor índice de daño demuestra que los factores inductores de daño genotóxico se producen mayoritariamente durante el esfuerzo físico. La reducción de ambas variables entre el máximo nivel de ejercicio y el fin del ejercicio puede sugerir que en ese lapso hay una intensa reparación del daño. Estudios realizados por von Zeland (1984) en células de mamíferos demostraron que, tras inducir daño con rayos x y g, la eficacia de la reparación permite a las células recomponer el 80 % de las lesiones en la molécula de ADN entre 5 y 10 minutos post exposición, mientras que el 20% restante se repara pocas horas después. Estos hallazgos son concordantes con lo observado en el presente trabajo, ya que entre la aparición del máximo nivel de daño y la reducción del mismo transcurrieron 5 minutos.

Los mecanismos propuestos para explicar la aparición de daño en el ADN tras el ejercicio extremo incluyen la producción de ROS a partir de la cadena mitocondrial transportadora de electrones, el proceso de isquemia-reperusión, las reacciones catalizadas por la xantina oxidasa, algunos mecanismos inflamatorios y la producción de catecolaminas (Hartmann y Niess 1999). La cadena transportadora de electrones mitocondrial es posiblemente la principal responsable del pico de daño observado durante el ejercicio máximo. Esto se debe a que durante el mismo el consumo de oxígeno se

incrementa más de 10 veces, pero en la fibra muscular lo hace unas 100 veces, con el consiguiente aumento proporcional de la actividad de la cadena respiratoria y de la producción de anión superóxido (Gandhi y Gunjan 2009). Este último tiene amplia capacidad de difusión a través de las membranas plasmáticas (Picco 2004). En concordancia con esta teoría, en el presente trabajo los niveles de consumo de oxígeno alcanzaron su máxima expresión en el momento que los equinos alcanzaron la máxima velocidad, lo cual indica que en esa instancia los animales expresaron la máxima demanda de oxígeno y, por ende, el máximo consumo. Dicha variable presentó un alto nivel de correlación tanto con la frecuencia de células con daño en el ADN como con la intensidad del daño.

Tras el ejercicio, la producción de O_2^- por acción de la cadena respiratoria disminuye pero se activan otros mecanismos capaces de generar o mantener el estrés oxidativo, como la isquemia-reperusión, la cual es proporcional al esfuerzo realizado y que culmina con la reoxigenación de las áreas isquémicas y la consiguiente producción de ROS (Adams y Best 2002). Es probable que, tras el ejercicio intenso, adquieran más relevancia factores tales como mediadores inflamatorios, liberación de RL por los leucocitos y el fenómeno recién mencionado de isquemia-reperusión. Este último probablemente también genere daño en el ADN por la vía de la producción de ROS, aunque el origen de estos últimos sea diferente de los generados por un excesivo funcionamiento de la cadena respiratoria. La activación de estos mecanismos secundarios de producción de daño serían los responsables de mantener elevados los niveles de daño en el ADN al final del ejercicio, contrarrestando parcialmente el efecto de los mecanismos de reparación. Es por ello que futuros estudios serán necesarios para dilucidar la responsabilidad de cada uno de los factores generadores de daño durante el ejercicio bajo modelos experimentales como el planteado en el presente trabajo.

Conclusiones

Nuestros resultados, si bien se obtuvieron sobre una población pequeña, muestran que el ejercicio de alta intensidad y corta duración, bajo las condiciones planteadas en el presente ensayo, produjo un incremento en el nivel de daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica, alcanzando su máxima expresión al llegar los equinos a la máxima velocidad, pero manteniéndose significativamente alto hasta finalizar la prueba. Simultáneamente se observó una alta correlación entre el consumo de oxígeno, la cantidad de células con daño en el ADN y la intensidad de dicho ADN, lo cual sugiere una asociación entre la producción de radicales libres del oxígeno y la lesión de la molécula de ADN.

Conflicto de intereses

Todos los autores declaran que no existe conflicto de intereses, incluyendo las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

Bibliografía

- Adams AK, Best TM. The role of antioxidants in exercise and disease prevention. *Phys Sportsmed*. 2002; 30: 37-44.
- Cash SW, Beresford SAA, Vaughan TL, Heagerty PJ, Bernstein L, White E, Neuhauser ML. Recent physical activity in relation to DNA damage and repair using the comet assay. *J Phys Act Health*. 2014; 11(4): 770-6.
- Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*. 2004; 26: 249-61.
- Dillard CJ, Litov RE, Savin WM, Dumelin EE, Tappel AL. Effects of exercise, vitamin E, ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol*. 1978; 45: 927-32.
- Gandhi G, Gunjan. Exercise-induced genetic damage: a review. *Int J Hum Genet*. 2009; 9 (2): 69-96.
- Hartmann A, Niess AM, Grunert-Fuchs M, Poch B, Speit G. Vitamin E prevents exercise-induced DNA damage. *Mutat Res*. 1995; 346(4): 195-202.
- Hartmann A, Niess AM. Oxidative DNA damage in exercise. En: Sen C K, Packer L, Hänninen O (Eds.): *Exercise and oxygen toxicity: a handbook*. 1999. Elsevier Science: B.V. North Holland/New York, pp.195-217.
- Kobayashi H, Sugiyama C, Morikawa Y, Hayashi M, Sofuni T. A comparison between manual microscopic analysis and computerised image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun*. 1995; 3: 103-15.
- Mastaloudis A, Yu TW, O'Donnell RP, Frei B, Dashwood RH, Traber MG. Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay. *Free Radic Biol Med*. 2004; 36: 966-75.
- Niess AM, Baumann M, Roecker K, Hartmann T, Mayer F, Dickhuth HH. Effects of intensive endurance exercise on DNA damage in leukocytes. *J Sports Med Phys Fitness*. 1998; 38: 111-5.
- Niess AM, Hartmann A, Gurnert-Fuchs M, Poch B, Speit G. DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int J Sports Med*. 1996; 17: 397-403.
- Picco SJ, De Luca JC, Mattioli GA, Dulout FN. DNA damage induced by copper deficiency in cattle assessed by the comet assay. *Mutat. Res*. 2001; 498: 1-6.
- Picco SJ. Consecuencias genotóxicas y clastogénicas de la hipocuprosis bovina. Tesis Doctoral. 2004. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.
- Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*. 2008; 88 (4): 1243-76.
- Radak Z, Naito H, Kaneko T. Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. *Pflugers Arch*. 2002; (2): 273-8.

Schneider S, Willis PE, Parkhouse WS. The effects of age and physical activity on cardiac mitochondrial DNA template availability. *Age* 1995; 18(4): 151-7.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 1988; 175, 184-91.

Van Zeeland AA. DNA repair. En: *Mutations in man*. Obe, G. (ed.). Springer, Berlin, 1984: 35-57.

Ward TH, Marples B. Technical report SYBR Green I and the improved sensitivity of the single-cell electrophoresis assay. *Int J Radiat.* 2000; 76: 61-5.

Wierzba TH, Olek RA, Fedeli D, Falcioni G. Lymphocyte DNA damage in rats challenged with a single bout of strenuous exercise. *J Physiol Pharmacol.* 2006; 57 (Suppl 10): 115-31.