



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Maestría en Toxicología Industrial y Ambiental

“Evaluación del efecto toxicológico del cigarrillo a través de biomarcadores, en fumadores activos universitarios de la Facultad de Agronomía, Silvicultura, Pesca y Veterinaria, de la Universidad Católica de Cuenca”

**Tesis previa a la obtención del
título de Magister en Toxicología
Industrial y Ambiental**

Autora:

BQF. María Elizabeth Campoverde Ortiz

C.I.: 0103888764

Directora:

Dra. Ruth Eugenia Rosas Castro, Mgt.

C.I.: 0101598753

2019



Resumen

El consumo de cigarrillo es un problema de Salud Pública, por acción de los tóxicos presentes promueve un estado de estrés oxidativo en los fumadores activos ocasionando problemas cardiovasculares, respiratorios y metabólicos. En esta investigación se analizaron concentraciones séricas de los biomarcadores para monóxido de carbono y estrés oxidativo, Carboxihemoglobina (COHb) y Malondialdehído (MDA) en individuos fumadores respectivamente, así como triglicéridos, colesterol LDL y colesterol HDL que podrían afectarse consecuencia del estrés oxidativo. La población estuvo conformada por 58 estudiantes universitarios de la Facultad de Agronomía, Silvicultura, Pesca y Veterinaria, de la Universidad Católica de Cuenca.

Para la determinación del % COHb se utilizó el método de pulsimetría mediante CO-oxímetro de pulso RAD-57TM SET, para Malondialdehído se utilizó el kit comercial OxiSelectTM TBARS Assay kit con técnica espectrofotométrica. Para las determinaciones de triglicéridos, colesterol LDL y colesterol HDL se utilizó el kit comercial HUMAN con técnica espectrofotométrica.

Los resultados obtenidos del grupo de estudio de %COHb inicial (5.56 ± 1.35) y %COHb final (7.28 ± 1.83) presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) frente al grupo control que tienen un valor de %COHb inicial (2.17 ± 0.95) y %COHb final (2.45 ± 1.11). Referente a los valores de MDA (umol/L) hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$), teniendo el grupo de estudio (11.03 ± 3.42) a diferencia del grupo control (3.64 ± 0.93). Mientras que los resultados de triglicéridos, colesterol LDL y colesterol HDL no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,001$) entre el grupo de estudio y el grupo control.

Palabras clave: Malondialdehído, Estrés Oxidativo, Carboxihemoglobina, Fumadores activos.



Abstract

Cigarette smoking is a Public Health problem, for the action of the toxic substances, it promotes a state of oxidative stress in active smokers, causing cardiovascular, respiratory and metabolic problems. In this research, serum concentration of biomarkers for carbon monoxide and oxidative stress, Carboxyhemoglobin (COHb) and Malondialdehyde (MDA) were analyzed in smokers respectively, as well as triglycerides, LDL cholesterol and HDL cholesterol that could be affected as a result of oxidative stress. Population was conformed by 58 university students of the Faculty of Agronomy, Forestry, Fishing and Veterinary, of the Catholic University of Cuenca.

Determination of % COHb, the pulsometry method was used by CO-pulse oximeter RAD-57TM SET, for Malondialdehyde the commercial kit OxiSelectTMTBARS Assay kit was used with spectrophotometric technique. Determinations of triglycerides, LDL cholesterol and HDL cholesterol the commercial kit HUMAN with spectrophotometric technique was used.

Results obtained from the study group of initial % COHb (5.56 ± 1.35) and final % COHb (7.28 ± 1.83) showed statistically significant differences ($p < 0.001$) compared the control group that have an initial % COHb value (2.17 ± 0.95) and final % COHb (2.45 ± 1.11). Concerning the values of MDA ($\mu\text{mol} / \text{L}$) there were statistically significant differences ($p < 0.001$), having the study group (11.03 ± 3.42) unlike the control group (3.64 ± 0.93), while the results of triglycerides, LDL cholesterol and HDL cholesterol did not show statistically significant differences ($p > 0.001$) between the study group and the control group.

Key words: Malondialdehyde, Oxidative Stress, Carboxyhemoglobin, Active smokers.



Índice de contenido

Resumen	2
Abstract	3
Agradecimientos	13
Dedicatoria	14
Capítulo I	15
1.1. Introducción	15
1.2. Antecedentes	17
1.3. Revisión bibliográfica	21
1.3.1. Tabaquismo.	21
1.3.2. Contaminantes en el humo del cigarrillo.	23
1.3.3. Monóxido de carbono.	24
1.3.4. Manifestaciones clínicas.	30
1.4. Carboxihemoglobina	31
1.4.1. Niveles de carboxihemoglobina.	32
1.4.2. Diagnóstico de carboxihemoglobina.	32
1.4.3. Tratamiento.	34
1.5. Estrés oxidativo	34
1.6. Radicales libres	35
1.6.1. Génesis de los Radicales Libres.	36
1.6.2. Fuentes de radicales libres.	38
1.6.3. Efectos Nocivos de los radicales libres.	40
1.7. Estrés oxidativo por consumo de cigarrillo.....	41
1.7.1. Humo de cigarrillo y radicales libres.	42
1.7.2. Daño celular ocasionado por el humo de cigarrillo.	43
1.7.3. Peroxidación lipídica inducida por los contaminantes del humo del cigarrillo. 44	
1.8. Enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo	46
1.8.1. Aterosclerosis.	46
1.9. Sistemas de defensa antioxidante.....	49



UNIVERSIDAD DE CUENCA

1.10. Métodos para medir el daño oxidativo	51
1.10.1. Métodos directos.	51
1.10.2. Métodos indirectos.	51
1.10.3. Determinación de malondialdehído (MDA).	53
Capítulo II	55
Materiales y métodos	55
2.1. Metodología	55
2.2. Variables.....	55
2.2.1. Identificación de variables.	55
2.3. Población y muestreo	55
2.4. Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de datos	56
2.4.1. Consentimiento informado.	56
2.4.2. Encuesta.	56
2.4.3. Instrumental/Laboratorio.	56
2.4.4. Técnicas.	57
2.4.5. Análisis de datos.	61
Capítulo III	63
Resultados	63
3.1. Comportamiento de las variables demográficas en el grupo control	63
3.2. Comportamiento de las variables demográficas en el grupo de estudio	63
3.3. Consumo de cigarrillos al día por el grupo de estudio.....	64
3.4. Problemas de salud relacionados por el consumo de tabaco en el grupo estudio	65
3.5. Concentración promedio de MDA por grupo de edad y sexo en el grupo de estudio	66
3.6. Concentración promedio de MDA por grupo de edad y sexo en estudiantes del grupo	67
de control.....	67
3.7. Comparación del % COHb inicial vs el % COHb final, por grupo de edad y sexo entre..	68
grupo de estudio y grupo control.....	68
3.8. Valores promedio de las variables de estudio MDA y %COHb en grupo de estudio vs. ..	70
grupo control.	70
3.9. Correlación entre la concentración MDA y %COHb en grupo de estudio vs. grupo	71
control.....	71



UNIVERSIDAD DE CUENCA

3.10. Comparación entre las concentraciones séricas de MDA y el nivel de consumo de 72 cigarrillos por día	72
3.11. Comparación entre las mediciones del %COHb inicial y el nivel de consumo de 73 cigarrillos por día	73
3.12. Comparación entre las mediciones del %COHb final y el nivel de consumo de..... 74 cigarrillos por día	74
3.13. Comparación entre las concentraciones séricas de triglicéridos y el nivel de consumo .. 76 de cigarrillos por día.....	76
3.14. Comparación entre las concentraciones séricas de colesterol HDL y el nivel de consumo	77
de cigarrillos por día.....	77
3.15. Comparación entre las concentraciones séricas de colesterol LDL y el nivel de consumo	78
de cigarrillos por día.....	78
Discusión	79
Conclusiones	87
Recomendaciones	89
Referencias bibliográficas	90
Anexos	105



Lista de Tablas

Tabla 1. Signos y síntomas según la concentración de carboxihemoglobina.....	31
Tabla 2. Niveles de carboxihemoglobina.....	32
Tabla 3. Clasificación y abreviatura de los radicales libres.....	38
Tabla 4. Información del kit de ensayo.....	58
Tabla 5. Concentración promedio de malondiadehído por grupo de edad y sexo en el grupo de estudio.....	67
Tabla 6. Concentración promedio de malondiadehído por grupo de edad y sexo en estudiantes del grupo control.....	68
Tabla 7. Comparación del % COHb inicial vs la % COHb final, por grupo de edad y sexo entre grupo de estudio y grupo control.....	69
Tabla 8. Correlación entre la concentración MDA y %COHb en grupo de estudio vs. grupo control.....	72



Lista de Figuras

Figura 1. Mecanismos patogénicos de los componentes del humo del tabaco.....	24
Figura 2. Esquema de la fisiopatología de la intoxicación por monóxido de carbono.....	26
Figura 3. Alteración de la cadena respiratoria por la acción del monóxido de carbono.....	29
Figura 4. Reacciones de formación de radicales libres.....	36
Figura 5. Fuentes de radicales libres.....	40
Figura 6. Esquema de las principales reacciones en el proceso de peroxidación lipídica.....	46
Figura 7. Componentes del Sistema Antioxidante.....	50
Figura 8. Curva estándar de malondialdehído.....	59
Figura 9. Características demográficas del grupo control.....	63
Figura 10. Características demográficas del grupo de estudio.....	65
Figura 11. Consumo de cigarrillos al día por el grupo de estudio.....	65
Figura 12. Problemas de salud relacionados por el consumo de tabaco en el grupo de estudio..	66
Figura 13. Valores promedio de las variables de estudio MDA y %COHb en grupo de estudio vs. grupo control.....	70
Figura 14. Comparación entre las medias de las concentraciones séricas de malondialdehído \pm 1 EEM y el nivel de consumo de cigarrillos por día.....	73



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Figura 15. Comparación entre las medias de las mediciones del %COHb inicial ± 1 EEM y el nivel de consumo de cigarrillos por día.....74

Figura 16. Comparación entre las mediciones del %COHb final ± 1 EEM y el nivel de consumo de cigarrillos por día.....75

Figura 17. Comparación entre las medias de las concentraciones séricas de triglicéridos ± 1 EEM y el nivel de consumo de cigarrillos por día.....76

Figura 18. Comparación entre las medias de las concentraciones séricas de colesterol HDL ± 1 EEM y el nivel de consumo de cigarrillos por día.....77

Figura 19. Comparación entre las medias de las concentraciones séricas de colesterol LDL ± 1 EEM y el nivel de consumo de cigarrillos por día.....78



Lista de Anexos

Anexo 1. Características demográficas, epidemiológicas y concentraciones de los parámetros analizados en el grupo control.....	105
Anexo 2. Características demográficas, epidemiológicas y concentraciones de los parámetros analizados en el grupo de estudio.....	106
Anexo 3. Consentimiento Informado.....	107
Anexo 4. Encuesta.....	108
Anexo 5. Inserto del Kit de MDA.....	110
Anexo 6. Certificado de mantenimiento lector de microplacas para absorbancia ELx808.....	117
Anexo 7. Inserto del Kit de Triglicéridos.....	118
Anexo 8. Inserto del Kit de colesterol HDL.....	120
Anexo 9. Certificado de mantenimiento lector de Elisa STAT FAX 1904.....	122
Anexo 10. Documento Masimo RAD-57 autocalibrable.....	123
Anexo 11. Certificado de uso de laboratorio del INSPI-CZ6.....	124
Anexo 12. Registro Fotográfico.....	125



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

María Elizabeth Campoverde Ortiz en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación del efecto toxicológico del cigarrillo a través de biomarcadores, en fumadores activos universitarios de la Facultad de Agronomía, Silvicultura, Pesca y Veterinaria, de la Universidad Católica de Cuenca", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 21 de febrero de 2019

María Elizabeth Campoverde Ortiz

C.I: 0103888764



Cláusula de Propiedad Intelectual

María Elizabeth Campoverde Ortiz autora del trabajo de titulación “Evaluación del efecto toxicológico del cigarrillo a través de biomarcadores, en fumadores activos universitarios de la Facultad de Agronomía, Silvicultura, Pesca y Veterinaria, de la Universidad Católica de Cuenca”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 21 de febrero de 2019

María Elizabeth Campoverde Ortiz

C.I: 010388764



Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a Dios por regalarme la vida y por guiarme en cada paso que doy ayudándome a alcanzar mis metas personales y profesionales.

Un agradecimiento a mi tutora la Dra. Ruth Eugenia Rosas Castro, Mgt, por guiarme durante todo el proceso de desarrollo de la tesis hasta su culminación.

Gracias a todas las personas que de una u otra manera me brindaron su apoyo para poder llevar a cabo este proyecto, en especial quiero agradecer a la Mgs. Cristina Narváez y Mgs. María Cristina Pacurucu, quienes me ayudaron desde el inicio hasta el final, siendo una guía y un apoyo muy importante para que haya sido posible culminar con éxito, infinitas gracias.

A todo el personal de la Facultad de Agronomía, Silvicultura, Pesca y Veterinaria, de la Universidad Católica de Cuenca, por la apertura y apoyo en todo momento, permitiéndome realizar mi proyecto de tesis.

A mi familia quienes son el pilar fundamental en el cual me he apoyado siempre, gracias a ustedes todo es posible.

Elizabeth Campoverde.



Dedicatoria

A mi Padre Dios porque es mi guía, mi camino y es quién me ha dado fortaleza y sabiduría cuando más lo necesito.

A mi amada familia porque cada uno de ustedes ha estado pendiente de mí, a mis tíos y mi abuelita, que sin importar la distancia han estado presentes y han sido mi apoyo en todo momento. A mis papitos Jorge y Marina, porque ustedes son los ángeles que Dios me puso en este mundo que han sabido apoyarme y guiar cada paso que doy con el mejor ejemplo, ustedes son el más grande tesoro que tengo y a quienes les debo todo lo que soy, los amo. A mi hermano Marco, mi mejor amigo, mi ejemplo a seguir, quién me apoya incondicionalmente y siempre me brinda los mejores consejos, te quiero mucho.

A mi esposo Paúl que me ha apoyado y motivado a seguir adelante a pesar de las adversidades, que me comprende y apoya siempre, ayudándome a ser mejor cada día, te amo. Y a quién es mi impulso para seguir adelante y superarme cada día, quién con su carita tierna, sus travesuras, su sonrisa pícaro y sus churos revueltos alegra mis días por muy largos y cansados que sean y me motiva a dar lo mejor, mi ángel hermoso que con solo un abrazo me llena de amor, mi hijo Leonel, te amo chiquito hermoso, esta meta la alcancé gracias a ti.

Elizabeth Campoverde.



Capítulo I

1.1. Introducción

El tabaquismo es un hábito social que se ha convertido en problema de Salud Pública, ha sido declarado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una epidemia devastadora ya que constituye la principal causa de enfermedades no transmisibles y de muertes prevenibles, con una estimación de más de cinco millones de muertes anuales en todo el mundo (Fernandez Hidalgo, 2014).

El consumo de tabaco es una dependencia que se incrementa constantemente de manera especial a edades tempranas, según varios estudios realizados el período en el cual se registra una mayor prevalencia es durante el paso por la universidad esto puede estar vinculado a cambios físicos y emocionales que atraviesan los estudiantes, las consecuencias se evidencian porque se da un importante deterioro en la calidad de vida y el riesgo de muertes prematuras aumenta, este hábito está relacionado con múltiples afecciones en la salud por acción de los tóxicos presentes, promueve en los fumadores activos un estado de estrés oxidativo lo que ocasiona principalmente problemas cardiovasculares, respiratorios y metabólicos (Zuzulich, 2008; Lando, et.al, 2010).

La acción tóxica de los componentes del humo del cigarrillo (HC) y su presencia en el organismo puede ser medida a través de marcadores biológicos como la carboxihemoglobina (COHb) que es un compuesto que resulta de la unión del monóxido de Carbono (CO) presente en el HC con la hemoglobina (Hb) sanguínea; el CO desplaza al oxígeno de la Hb, originando hipoxia tisular y promueve la aparición de enfermedades crónicas degenerativas; por otro lado favorece a la sobreproducción de radicales libres que induce en los fumadores activos un estado de estrés oxidativo (desequilibrio homeostático entre prooxidantes/antioxidantes) lo cual da como resultado



UNIVERSIDAD DE CUENCA

alteraciones en las moléculas a nivel funcional y estructural (Buchelli Ramírez, et.al, 2014; Bolaños Morera & Chacón Araya,2017).

El estrés oxidativo ocasionado por el cigarrillo afecta morfológica y funcionalmente a todas las biomoléculas, en el caso particular de los lípidos debido a la acción de radicales libres (se encuentra en el HC y resultan de acción oxidativa de ciertos compuestos) se genera un proceso conocido como peroxidación lipídica, de manera especial en los lípidos que contienen ácidos grasos poli-insaturados que se encuentran formando parte de la membrana plasmática. El biomarcador de elección para determinar la peroxidación lipídica es el Malondialdehído (MDA). Estos procesos oxidativos están relacionados con problemas cardiovasculares, respiratorios y metabólicos (Gutiérrez Salinas, et.al, 2009).

La importancia de la determinación de estos biomarcadores de exposición carboxihemoglobina y malondialdehído en los fumadores activos de manera especial en los jóvenes, radica en evidenciar el impacto negativo de los tóxicos del cigarrillo en su salud y ayudarlos a generar conciencia sobre los graves riesgos que conlleva este hábito para evitar la aparición prematura de enfermedades que afecten su calidad de vida e incluso puedan ocasionar muertes prematuras. Por otro lado se pretende aportar información como línea base para posteriores investigaciones.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

1.2. Antecedentes

Múltiples investigaciones se han realizado a lo largo del tiempo sobre los efectos tóxicos que los componentes del humo del cigarrillo provocan en el organismo tanto de los fumadores activos así como en fumadores pasivos, el tema ha cobrado mayor importancia en las últimas décadas debido al incremento de consumidores y que cada vez el inicio de este hábito social se da a edades tempranas, a nivel mundial se han generado estrategias para regular el consumo de tabaco, por ejemplo se ha generado el convenio Marco para el control del tabaco y la estrategia MPOWER, propuestas por la OMS (Diaz Valencia, 2010).

El hábito de fumar cigarrillos promueve un estado de estrés oxidativo en el organismo y deterioro del mismo, por cada bocanada de humo aproximadamente se inhala una carga de 1,015 radicales libres responsables del estrés oxidativo, dicho estado desencadena varios problemas de salud debido a que se produce disfunción endotelial, favoreciendo la aparición de enfermedades cardiovasculares y metabólicas, como son la hipertensión arterial, la obesidad y la diabetes mellitus; además de problemas a nivel respiratorio y en casos graves cáncer (Pérez Cruz, Pérez Cruz , & Fernandez Manchón, 2015).

Alrededor de 4,700 compuestos químicos se encuentran formando parte del humo del cigarrillo, sin embargo los compuestos mayormente estudiados son la nicotina y el monóxido de carbono, los cuales ocasionan complicaciones cardiovasculares, metabólicas y respiratorias, ya que favorecen una sobreproducción interna de los radicales libres y otros oxidantes, además se suman los radicales libres que son inhalados directamente a través del humo del humo del cigarrillo, al presentarse en altas concentraciones ocasionan daños morfológicos y funcionales a nivel celular (Jiménez Ruiz, et.al, 2003; Sandoya, 2011; Muñoz Guerrero, 2014).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

El monóxido de carbono presente en el humo del cigarrillo atraviesa la barrera alveocapilar y reemplaza al oxígeno de la hemoglobina en la sangre dando lugar a la formación de la carboxihemoglobina (biomarcador), de esta manera produce daño vascular a los fumadores debido al bloqueo de oxígeno hacia los tejidos, generando lesiones a nivel endotelial, alteraciones de la actividad mitocondrial y de la fosforilación oxidativa, incrementa la formación de radicales libres en la fase de re-oxigenación (Lekuona Goya, Salcedo Arruti, Morillas Bueno, & Umaran Sánchez, 2009; Muñoz Guerrero, 2014; Salazar Lugo et.al, 2015), lo que desencadena un desbalance entre pro-oxidantes y anti-oxidantes (desbalance homeostático), resultando un potente ciclo de óxido-reducción, promoviendo a que las lipoproteínas de baja densidad (LDL) sean más susceptibles a la oxidación sobre todo ante la presencia de ácidos grasos poliinsaturados y finalmente se produce daño endotelial, el biomarcador de este proceso de lipoperoxidación es el Malondialdehído. Estos desbalances homeostáticos están relacionados con enfermedades crónico degenerativas como aterosclerosis, cáncer, diabetes y diversas patologías cardiovasculares (cardiopatías) (Maldonado Saavedra, et.al, 2010).

En varias investigaciones se analiza la problemática del tabaquismo, su impacto en la mortalidad por enfermedades que pueden ser prevenibles, resaltando el tema del estrés oxidativo que se relaciona directamente con la aparición de enfermedades cardiovasculares, pulmonares, así como cáncer bucal y de pulmón en los fumadores activos, afectando gravemente a la sociedad desde finales del siglo XX y son las principales causas de muerte del siglo XXI (Ramírez & Rodríguez, 2012; Guerrero López, Muños Hernández, Sáenz de Miera, & Reynales Shigematsu, 2013; Muñoz Guerrero, 2014; Yilmaz, Demirli Caylan, & Demir Karacan, 2015).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Según Almeida da Silva, Cruz Robazzi, & Terra (2013), en su estudio observaron que los niveles de COHb evaluados entre los trabajadores moto-taxistas mostraron la predominancia de niveles no aceptables entre los fumadores, con significancia estadística ($p < 0,001$). Así, los fumadores tienen niveles de COHb más elevados, con doble exposición de estos sujetos al CO, tanto por el humo del cigarrillo, como por la contaminación del aire. El nivel medio de carboxihemoglobina entre los no fumadores fue 2,3% y entre los fumadores 5,7%.

Buchelli Ramírez et.al, (2014), mediante un diseño transversal y descriptivo, analizaron consecutivamente gasometrías arteriales midieron el porcentaje de concentración de carboxihemoglobina en sangre entre personas fumadoras activas y no fumadoras y concluyeron que un 16% de individuos fumadores seleccionados presentaron valores considerados elevados, la media de COHb fue de 4,0%. Cuarenta pacientes (78%) eran no fumadores con niveles de COHb de 3,2% y 11 fumadores con niveles de COHb de 6,7%.

Cadavid Mora, Coral Carrillo, & Castillejo Pons (2016), en la ciudad de Quito evaluaron la afección humana por monóxido de carbono (contaminante), mediante la determinación del biomarcador carboxihemoglobina. Cuantificaron la presencia de carboxihemoglobina y su relación con la contaminación por Monóxido de carbono, usando una técnica espectrofotométrica, basada en la reducción con ditionito de sodio, metodología que fue validada para el posterior uso en las muestras de 3 poblaciones vulnerables de la ciudad de Quito. En esta validación se obtuvo un límite de detección de 0,79% COHb, límite de cuantificación 1,94% COHb y un coeficiente de variación $< 10\%$ en todos los niveles, valores aceptables para la cuantificación de carboxihemoglobina.

Espinoza Barzallo & Flores Orellana (2016), llevaron a cabo un estudio en la ciudad de Cuenca para la determinación de Malondialdehído (MDA) como biomarcador de estrés oxidativo en



UNIVERSIDAD DE CUENCA

estudiantes fumadores activos, mediante método colorimétrico y obtuvieron niveles de MDA ($\mu\text{mol/L}$) incrementados en estudiantes fumadores activos ($10,74 \pm 3,17$) con respecto a los no fumadores ($3,52 \pm 1,11$). Además realizaron un análisis de la variación de la concentración de MDA con respecto al número de cigarrillos/día y el tiempo del hábito de fumar donde mostró una correlación lineal significativa y elevada ($r=0,875$ y $r=0,848$, respectivamente); con relación al tiempo de acceso al primer cigarrillo al día mostró una tendencia lineal positiva ($r=0,476$). Concluyeron que la concentración en suero de MDA se correlaciona significativamente con el nivel de estrés oxidativo a que se someten los estudiantes fumadores (Espinoza Barzallo & Flores Orellana, 2016).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

1.3. Revisión bibliográfica

1.3.1. Tabaquismo.

El término tabaquismo hace referencia a la adicción a la nicotina presente en cualquier forma de productos del tabaco. El consumo de dichos productos genera efectos toxicológicos graves debido a que poseen además de la nicotina una extensa gama de componentes entre los que se encuentran cancerígenos, mutágenos, irritantes entre otros que afectan de manera importante a la salud de las personas (Organización Mundial de la Salud, OMS, 2015; Gutiérrez Abejón et.al, 2015; Chacón Cuberos et.al, 2016).

Según la OMS define y clasifica a las personas de acuerdo a la exposición al cigarrillo de la siguiente manera:

Fumador activo: Cualquier persona que fume cualquier número de cigarrillo diario en el último mes, incluso uno.

Fumador pasivo: Son aquellas personas que no son fumadoras, sin embargo están expuestas al humo del cigarrillo.

Ex – fumador: Aquellas personas que han dejado de fumar por lo menos en los últimos 12 meses.

No fumador: Todas las personas que jamás han fumado, ni han estado expuestas al humo del cigarrillo.

La problemática de la adicción al cigarrillo se debe a que los fumadores activos desarrollan tolerancia, por lo que incrementan constantemente su consumo, generando dependencia física y psíquica (Ruiz Jiménez, 2003; OMS, 2015).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

1.3.1.1. Consumo del cigarrillo en población joven.

El tabaquismo es hábito social que se ha convertido en problema de Salud Pública debido al incremento significativo de fumadores sobre todo a edades tempranas, ha sido declarado por la OMS como una epidemia devastadora ya que constituye la principal causa de enfermedades no transmisibles y de muertes prevenibles, con una estimación de más de cinco millones de muertes anuales en todo el mundo (Fernández Guerrero 2010; Fernandez Hidalgo, 2014).

Según datos emitidos por la Subsecretaría Nacional de Promoción de la Salud e Igualdad del Ministerio de Salud Pública del Ecuador en la Encuesta Nacional de Salud en el año 2016 el inicio de consumo de tabaco en mujeres es 17 años y en varones su inicio es a los 16 años y que el mayor porcentaje de fumadores corresponde a la población masculina, en el Ecuador el 28% de población es fumadora y las muertes relacionadas a las complicaciones ocasionadas por el consumo de cigarrillos supera la cifra de diez mil personas al año (Ministerio de Salud Pública, MSP,2016).

Debido a las edades de inicio al hábito tabáquico la mayor concentración de fumadores se encuentra en la etapa universitaria donde se registra un índice elevado de consumo de cigarrillos en los estudiantes de los ciclos superiores (Espinoza Barzallo & Flores Orellana, 2016).

Según los datos recopilados por la OMS para el 2030 estima que la cifra de jóvenes adultos que empiezen a fumar se habrá incrementado y de la misma forma la cifra de muertes aumentará alrededor de once millones de decesos anuales, de las cuales el 70% ocurrirían en los países en vías de desarrollo, debido a que actualmente los jóvenes fuman más que las generaciones anteriores.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

1.3.2. Contaminantes en el humo del cigarrillo.

Alrededor de 4,700 compuestos químicos se encuentra formando parte del humo del cigarrillo, la mayoría presentan características citotóxicas, mutagénicas y carcinogénicas, la nicotina y el monóxido de carbono son los compuestos mayormente estudiados, ya que junto con los radicales libres y otros oxidantes que se encuentran en altas concentraciones provocan un desequilibrio celular homeostático y son los responsables de los daños morfológicos y funcionales como se puede observar en la figura 1. En definitiva los efectos más peligrosos del tabaco a nivel sistémico se deben a la exposición y absorción en los pulmones (Martín Ruiz, Rodríguez Gómez, Rubio, & Hardisson, 2004; De Vito & Rojas, 2005; Sandoya, 2011; Ferreira Panaino, Baldini Soares, & Sivalli Campos, 2014).

El consumo frecuente de cigarrillo favorece la aparición de cáncer en las personas fumadoras, dentro de las sustancias tóxicas que se encuentran formando parte del humo del tabaco 250 son cancerígenas y no se ha descrito los valores seguros de exposición a dichos tóxicos lo que generan mayor susceptibilidad de ocasionar daños al organismo a cualquier grado de exposición (Barrientos-Gutiérrez, Valdés-Salgado, Reynales-Shigematsu, Navas-Aclen, & Lazcano-Ponce, 2007).

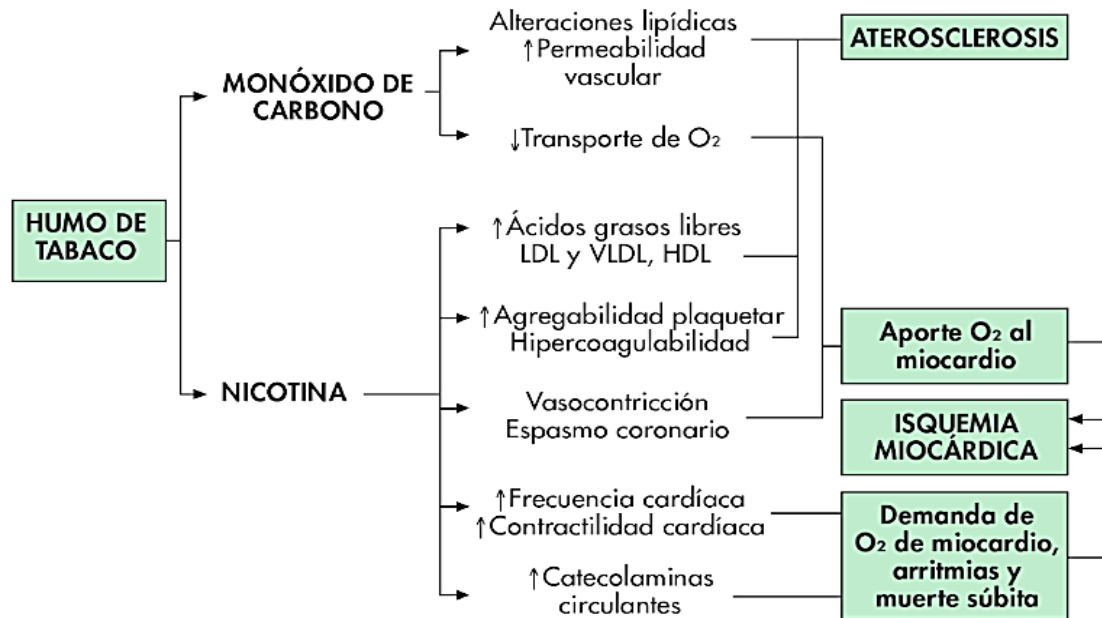


Figura 1. Mecanismos patogénicos de los componentes del humo del tabaco.

Fuente: (Ruiz Jiménez, 2003)

El tabaquismo constituye un factor de riesgo mayor para varias enfermedades como la pulmonar obstructiva crónica, cardiovasculares, cáncer bucal y pulmonar, entre otras. Debido al alto grado exposición de los fumadores a sustancias oxidantes presentes en el humo del tabaco como el monóxido de carbono se incrementa la producción de radicales libres y otras especies reactivas del oxígeno que intervienen directamente en la fisiopatología de las enfermedades antes mencionadas (Gutiérrez Maydata, 2003; Bello et.al, 2005; Ballén, Jagua Gualdrón, Álvarez, & Rincón ,2006).

1.3.3. Monóxido de carbono.

El CO es un gas inodoro, incoloro y no irritante; se encuentra en el ambiente un 40% de forma natural y el 60% de CO está presente como consecuencia de la combustión de biomasa, combustibles fósiles, tabaco entre otras fuentes. El monóxido de carbono puede permanecer hasta 2 meses en la atmósfera una vez que ha sido liberado, sin embargo puede combinarse con otros



UNIVERSIDAD DE CUENCA

gases y transformarse en dióxido de carbono/ anhídrido carbónico (Buchelli Ramírez et.al, 2014; Bolaños Morera & Chacón Araya, 2017).

El CO representa entre el 1,9% y 6,3% del humo del cigarrillo, mientras que en el humo de puro está entre el 9,7% y el 12,7% (García Pacheco, 2014).

La vía de entrada al organismo es a través de la inhalación, todas las personas se encuentran expuestas al CO a diferentes niveles, el cual al ingresar al organismo se une a la hemoglobina y desplaza al oxígeno, dando lugar a la formación de carboxihemoglobina (COHb), por este motivo puede ocasionar muertes si se inhala CO en cantidades elevadas pero el mayor problema se debe a que generalmente es imperceptible por lo que se le conoce como asesino silencioso (Nuñez Naranjo, 2015; Bolaños Morera & Chacón Araya, 2017).

Por procesos propios del organismo se genera una producción endógena de CO y los valores de saturación carboxihemoglobina (COHb) en personas sanos varía de 0,4-0,7%, inclusive los no fumadores pueden tener hasta 3% de COHb como máximo en ambientes libres de CO, en personas fumadoras la saturación por la exposición continua al CO puede llegar hasta 9 -15% sin embargo no presentan síntomas debido a que desarrollan tolerancia hasta esos valores (García Pacheco, 2014; Bolaños Morera & Chacón Araya, 2017).

1.3.3.1. Fisiopatología y toxicidad.

El CO es absorbido instantáneamente a través del endotelio pulmonar, pasa a la sangre y se une fuertemente a la hemoglobina (Hb) formando COHb; tan solo el 1% del CO tiene metabolismo hepático a CO₂, su eliminación está en función del grado de oxigenación (Vomero et.al, 2009; Orobio Quiñónes & Claire Berrouet, 2016).

UNIVERSIDAD DE CUENCA

En la figura 2 se puede observar la fisiopatología de la intoxicación por monóxido de carbono, su toxicidad se debe a la gran afinidad hacia los grupos hemo de las proteínas como la hemoglobina y la mioglobina. Así mismo presenta afinidad por citocromos de las enzimas respiratorias mitocondriales (CYP - 450 y A3) y la NADPH reductasa, lo que ocasiona hipoxemia y disfunción endotelial, de esta manera favorece el aumento de la concentración y depósito de moléculas de colesterol LDL, que en su proceso de oxidación producen daño endotelial, esto se debe a la liberación de radicales libres que originan un estado de estrés oxidativo.

También ocasiona interrupción del transporte de oxígeno y precipita la cascada inflamatoria. Por otra parte promueve la peroxidación de lípidos cerebrales, lo que conduce a pérdida de consciencia (McRobbie & Thornley, 2008; Lanas & Serón, 2012; Bolaños Morera & Chacón Araya, 2017).

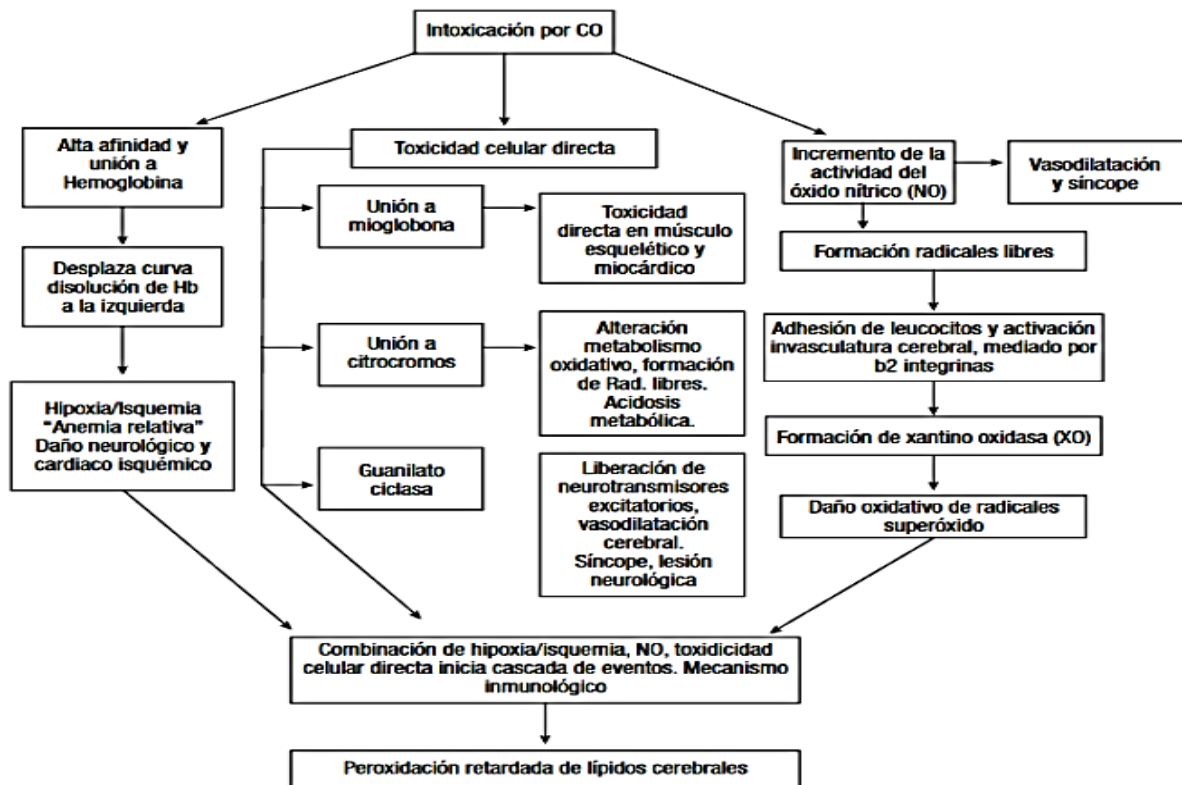


Figura2. Esquema de la fisiopatología de la intoxicación por monóxido de carbono.

Fuente: (Vargas, 2014)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

1.3.3.2. Afinidad por la hemoglobina.

El CO frente a la hemoglobina de la sangre posee 250 veces más afinidad que el oxígeno, y forma la carboxihemoglobina, la cual desplaza al oxígeno provocando una reducción del oxígeno transportado ocasionando hipoxia tisular por dos mecanismos: la hemoglobina presenta dificultad de transportar oxígeno y deficiente capacidad para entregarlo en la periferia (Vargas, 2014; Bolaños Morera & Chacón Araya, 2017).

El CO y el oxígeno compiten por las zonas de combinación a la hemoglobina, el transporte normal de oxígeno se altera y ser llevado desde el pulmón hacia los tejidos, debido a la alta afinidad que presenta el CO con la hemoglobina que da lugar a la formación de un carbonilo de hierro mediante el cual da origen a la carboxihemoglobina, esto provoca un desplazamiento hacia la izquierda de la curva de disociación de la oxihemoglobina lo cual afecta la capacidad de transferir el oxígeno a las células. EL CO extramuscular provoca daños en los mecanismos de fosforilación oxidativa y la actividad de las mitocondrias (Orobio Quiñones & Claire Berrouet, 2016; Bolaños Morera & Chacón Araya, 2017).

1.3.3.3. Unión a la mioglobina.

Debido a la afinidad que presenta por los grupo hemo, otra proteína similar a la que se une el CO es la mioglobina la misma es incolora y es una proteína de tipo muscular, es responsable del transporte de oxígeno hacia el músculo, la unión de CO a la mioglobina da lugar a la formación de carboximioglobina, los efectos tóxicos que se producen son trastornos cardíacos en los que hay alteración de ritmo e isquemia de miocardio incluso se puede evidenciar dichas afecciones con niveles de 6% de COHb en la víctima (López Tricas, 2011; Bravo Medina & Mora Ortega, 2016)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

1.3.3.4. Efectos del monóxido de carbono en la cadena respiratoria mitocondrial.

El CO presenta la capacidad de unión hacia hemoproteínas como las siguientes: citocromo P450, citocromo oxidasa, hidroxidasa y mioglobina; lo que obstaculiza el normal mecanismo de la cadena respiratoria. La citocromo oxidasa es inhibida por el CO de esta manera bloquea la transferencia de electrones, ocasionando una disminución en la capacidad de la célula para generar energía y da lugar a la formación de radicales libres que causan daño a lípidos, ácidos nucleicos y proteínas provocando citotoxicidad directa. La elevada afinidad que posee el CO por los radicales metálicos de los citocromos hace que se una de manera primordial al citocromo a3 del complejo IV o citocromo c-oxidasa de la cadena mitocondrial. La energía de la cadena mitocondrial proviene de las moléculas de NAD (dinucleótido de nicotinamida-adenina) y FADH₂ (dinucleótido de flavina-adenina, forma reducida) donde capta un electrón el cual mediante varias reacciones químicas es transportado a través de la cadena mitocondrial. La unión del CO a la citocromo c-oxidada produce un bloqueo en el último paso de la respiración mitocondrial, reduciendo la cantidad de ATP lo que ocasiona que los electrones generados se desvíen, dando lugar a la formación de radicales libres, todo este proceso se puede observar en la figura 3 (Murray, Granner, & Rodwell, 2007; Ramírez, & Rodríguez, 2012).

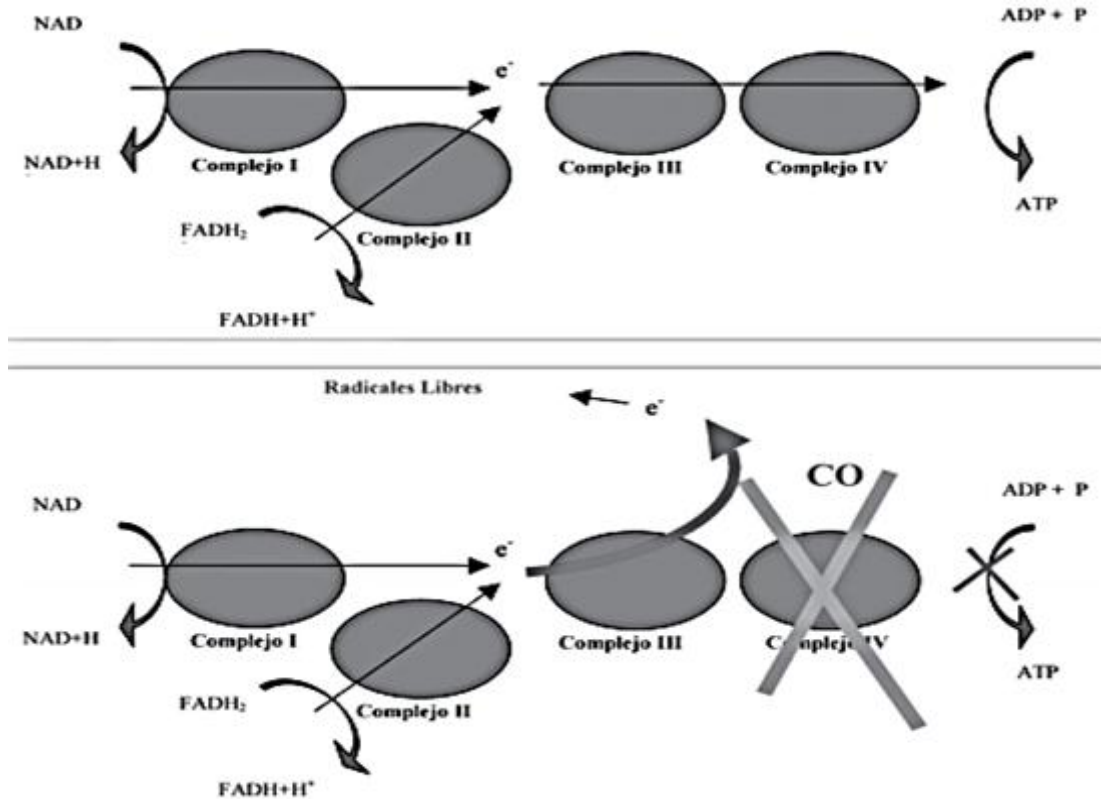


Figura3. Alteración de la cadena respiratoria por la acción del monóxido de carbono.

Fuente: (Morán Chorro et.al, 2011)

1.3.3.5. Incremento del Óxido Nítrico libre intracelular.

El óxido nítrico (NO^-) desempeña un papel importante en diferentes vías metabólicas, se encuentra ligado a proteínas y su función es asegurar que exista un adecuado nivel celular. El CO se acopla con los ligando del NO^- de esta manera incrementa el NO^- libre intracelular el cual junto con los radicales superóxido producen peroxinitritos que presentan elevada capacidad oxidante y nitrogenante, estos productos ocasionan daño a las macromoléculas desplegando una serie de fenómenos inflamatorios que incrementan las lesiones a nivel del Sistema Nervioso Central (Calle Vela, & Melgarejo Pomar, 2005; Morán Chorro, et.al, 2011).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

1.3.4. Manifestaciones clínicas.

Las manifestaciones clínicas dependen del tiempo de exposición y de la concentración de CO en el aire inspirado es importante tener presente que generalmente no existe correlación entre los niveles de carboxihemoglobina y la gravedad de la intoxicación (Rosas, 2014).

El cuadro clínico varía de forma proporcional al grado de intoxicación, pudiendo ir desde simples síntomas inespecíficos hasta llegar a la muerte de la víctima por daño grave del sistema cardiovascular y/o sistema nervioso central. Generalmente frente a exposiciones leves se presentan síntomas como cefaleas, náuseas, vómitos e impresión de mareo. En exposición moderada además se produce taquicardia, debilidad, taquipnea y ataxia. Los casos más graves de intoxicación muestran hipotensión, síncope, convulsiones, coma y muerte. Las alteraciones ocasionadas en intoxicaciones crónicas pueden manifestarse entre los tres y doscientos cuarenta días posteriores a la exposición, entre las más leves están: problemas de memoria, dificultad en el aprendizaje, apraxia, astenia, mialgia, sordera transitoria, enlentecimiento de movimientos voluntarios; mientras que las alteraciones más severas incluyen los síntomas presentes en la enfermedad de Parkinson, convulsiones, cambios de personalidad e incluso demencia, en la tabla 1 se detallan los signos y síntomas según la concentración de carboxihemoglobina (Rosas, 2014; Bravo Medina & Mora Ortega, 2016).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Tabla 1. Signos y síntomas según la concentración de carboxihemoglobina.

Concentración de COHb (en no fumadores)	Signos y síntomas
<2%	Inocuo.
2,5%	Deterioro de la orientación temporal.
5%	Deterioro de las facultades psicomotrices.
>5%	Alteraciones cardiovasculares.
10-20%	Cefalea, vasodilatación. Alteraciones visuales, vértigo, dolor abdominal y náuseas.
20-30%	Cefalea, disnea, angina de pecho
30-40%	Disnea, arritmia, cefalea intensa, alteraciones visuales, síncope, confusión mental, debilidad en miembros inferiores y vómitos. Estos síntomas pueden impedir a la víctima escapar del área contaminada.
40-50%	Síncope, taquicardia, taquipnea. >40% puede ser mortal por asfixia.
>45%	Coma, acidosis metabólica de origen láctico por glucólisis anaeróbica, hipokalemia, hipotensión, convulsiones, depresión respiratoria, edema pulmonar, alteraciones EKG.
50-60%	Coma, convulsiones, respiración irregular.
>60%	Convulsiones, coma, paro cardiorrespiratorio, muerte.
70-80%	Muerte.

Fuente: (Bolaños Morera & Chacón Araya, 2017).

1.4. Carboxihemoglobina

La unión de CO con la hemoglobina tiene como resultado la carboxihemoglobina. Es considerado como biomarcador de exposición y de efecto precoz, en el primer caso debido a la elevada especificidad permite estimar la dosis interna de CO que se encuentra en sangre; en el segundo



UNIVERSIDAD DE CUENCA

caso permite evidenciar las alteraciones bioquímicas y/o fisiológicas que afectan a la estructura de la hemoglobina así como al proceso fisiológico de oxigenación celular y tisular (Téllez, Rodríguez, & Farardo, 2006).

1.4.1. Niveles de carboxihemoglobina.

Según datos de la OMS (2007) y INSHT (2013) existen diferentes niveles de carboxihemoglobina como se observan en la tabla 2:

Tabla 2. Niveles de carboxihemoglobina

Casos	Niveles COHb
No fumadores - vecinos rurales	0,5 -2,5%
Fumadores pasivos	2-4%
Fumadores	5-9 %
Intoxicación leve o moderada	12-20%
Intoxicación aguda	20-30%
Coma	50-70%
Muerte Rápida	>70%
Valor límite biológico (VLB)	3,5% de COHb al final de jornada laboral

Fuente:(OMS,2007; INSHT,2013).

1.4.2. Diagnóstico de carboxihemoglobina.

Para realizar el monitoreo de la exposición a CO se puede realizar la medición del biomarcador carboxihemoglobina.

Gasometría arterial. Este examen mide la presión parcial de oxígeno disuelto en el plasma (PO₂) y sin tomar en cuenta al unido a la hemoglobina, la muestra de sangre debe ser tomada en jeringa con heparina. Nos ayuda a determinar si hay acidosis metabólica como consecuencia del acumulo de ácido láctico por hipoxemia (Ríos Díaz, 2011).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Carboxihemoglobina en sangre. La carboxihemoglobina es un biomarcador de exposición al CO de alta especificidad además se considera un biomarcador de efecto precoz. Para su medición se pueden utilizar los siguientes métodos:

Cooxímetro: Consiste en sistemas que al hacer pasar una muestra de sangre total a través de una luz miden diferentes longitudes de onda de cada derivado de la hemoglobina, ya que estos tienen espectros de absorción específicos. Por lo general están programados para medir entre 4 y 128 longitudes de onda para las especies hemoglobínicas de mayor importancia (oxy, carboxy, deoxy y metahemoglobina) (Ríos Díaz, 2011).

Cromatografía de gases: Esta técnica se basa en la lisis de los eritrocitos para liberar al CO que se encuentre unido a la hemoglobina, mediante la mezcla de sangre con soluciones de lisis. Dependiendo de la cantidad encontrada se realiza una relación con la hemoglobina de la muestra y de esta manera se puede estimar el porcentaje de saturación de carboxihemoglobina. Se considera como el método de referencia sin embargo su costo y la alta tecnología son las principales desventajas que limitan la aplicación de este método (Ríos Díaz, 2011).

Espectrofotometría: Se basa en la comparación de espectros de absorción de la oxihemoglobina con la carboxihemoglobina a una determinada longitud de onda, las técnicas usadas son las siguientes:

Reducción con ditionito de sodio: se adiciona el ditionito de sodio como agente reductor, tiene la capacidad de reducir a la metahemoglobina y la oxihemoglobina sin afectar a la carboxihemoglobina debido a que esta última posee elevada afinidad por la hemoglobina, se puede observar diferencia máxima en los espectrofotómetros a una longitud de onda de 540nm (Ríos Díaz, 2011; Suzaño Vargas, 2014).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Determinación por microdifusión: Se fundamenta en la acción reductora del CO que al reaccionar con una solución de cloruro de paladio (PdCl_2), lo transforma en paladio metálico. Para llevar a cabo este procedimiento se utiliza la cámara de Conway que posee dos compartimentos un externo donde se coloca la muestra de sangre con ácido sulfúrico al 10% (agente liberador), y un interno en el que adiciona el PdCl_2 (agente atrapante). Luego de un tiempo y a temperatura específica, se toma una alícuota del centro de la cámara donde se forma una película platinada (precipitado) que resulta por la formación de paladio metálico ante la presencia de CO en la muestra. A la alícuota obtenida se le adiciona yoduro de potasio (IK) originándose complejos de tetrayodo de paladio los cuales se determinan frente a un blanco de agua. Este método es muy útil cuando existen valores elevados de COHb (Ridolfi, A. & Álvarez G., 2014).

1.4.3. Tratamiento.

La víctima de intoxicación por CO debe ser tratada inmediatamente, el tratamiento en casos de urgencia se basa en la administración de oxígeno, se debe contar con control médico para evitar que se presenten complicaciones.

1.5. Estrés oxidativo

Se puede definir al estrés oxidativo como el desequilibrio de la homeostasis oxido-reducción intracelular, dicho desequilibrio entre los pro-oxidantes y los antioxidantes, puede ocasionar una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y al mismo tiempo provocar una disminución de mecanismos antioxidantes lo cual da como resultado una alteración celular (Alves, Castro Esteves, & Trelles, 2013; Espinoza Barzallo & Flores Orellana, 2016).

Ante la presencia de cantidades excesivas de radicales libres se produce una ruptura en el equilibrio oxido-reducción dando origen al estrés oxidativo. Los radicales libres resultan de las reacciones



UNIVERSIDAD DE CUENCA

metabólicas, cuando las células del organismo convierten los alimentos a energía, primordialmente en condiciones de hiperoxia, isquemia, ejercicio intenso además por exposición a ciertos agentes externos como contaminación ambiental, radiaciones ionizantes o luz ultravioleta, contaminantes del humo del tabaco, entre otras fuentes (Delgado Olivares, Betanzos Cabrera, & Sumaya Martínez, 2010).

1.6. Radicales libres

Los radicales libres son moléculas que poseen un orbital desapareado el cual se encuentra en la parte más externa, lo que les confiere una elevada reactividad hacia las moléculas que se encuentran en su entorno, generando una serie de reacciones para eliminar el electrón desapareado y conseguir estabilidad. Proviene como subproducto del metabolismo principalmente de compuestos de oxígeno o de nitrógeno, sin embargo también pueden ingresar cierta carga de radicales libres o formarse por factores externos como medicamentos, humo de cigarrillo y xenobióticos. Poseen un alto potencial para ocasionar daño al oxidar a estructuras proteicas, lipídicas y al ácido desoxiribonucleico, lo que puede iniciar procesos patológicos graves o complicarlos; a esto se conoce como estrés oxidativo (Maldonado Saavedra et.al, 2010; Lagos Grisales, Cediell Collazos, & Villegas Rojas, 2012; Ramírez Prieto, García Río, & Villamor, 2006). La reactividad que presentan los radicales libres es muy elevada en comparación con moléculas que poseen átomos ligados a otros por covalencia (enlace por compartición de electrones). Cuando el radical libre logra sustraer un electrón (reducción), la molécula estable que pierde dicho electrón (oxidación) se transforma en un nuevo radical libre por tener un electrón desapareado, lo cual genera una reacción en cadena pudiendo llegar a afectar a 1 millón de moléculas durante este proceso. Al no poseer receptores específicos los radicales libres desarrollan una capacidad de

1.6.1. Génesis de los Radicales Libres.

La formación de radicales libres se lleva a cabo principalmente en la célula mediante reacciones de transferencia de electrones, estas reacciones están mediadas por iones metálicos de transición como el radical $\cdot\text{OH}$ que provienen del H_2O_2 cuando se pone en contacto con iones hierro (Fe^{+2}) o iones cobre (Cu^{+2}); tanto el H_2O_2 como los complejos metálicos se encuentran presentes en seres humanos, para dar lugar a estas reacciones puede o no haber intervención enzimática, tal como se observa en la figura 4 (Vasudevan, Sreekumari & Vaidyanathan, 2011).

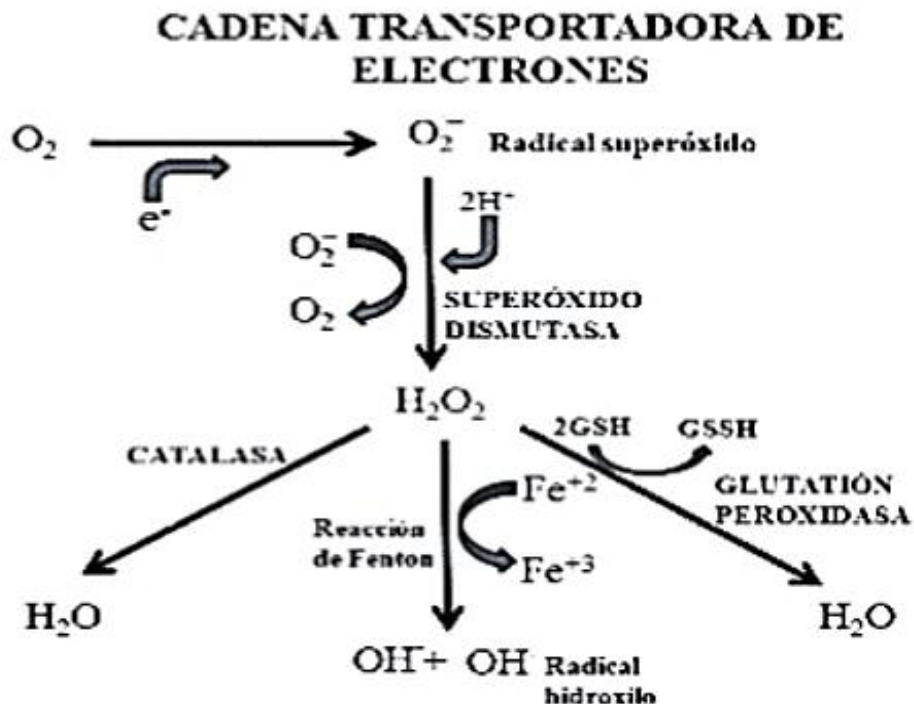


Figura 4. Reacciones de formación de radicales libres.

Fuente: (Maldonado Saavedra et.al, 2010)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Los mecanismos de formación de radicales libres son los siguientes:

1. Pérdida de un protón de una molécula
2. Transferencia electrónica, donde se cede un electrón a una molécula.
3. Ruptura homolítica de un enlace covalente de una molécula de tal forma que todos los fragmentos producidos conservan uno de los electrones apareados del enlace (Maldonado Saavedra et.al, 2010; Vasudevan, Sreekumari & Vaidyanathan 2011).

Al formarse un radical libre al inicio de la reacción posee la capacidad de ceder su electrón a cualquier compuesto, generando nuevos radicales lo que ocasiona que la reacción de propagación en cadena se expanda pudiendo causar daño a tejidos corporales, esta sobreproducción de radicales libres en el cuerpo se suma a la activación de los macrófagos donde el empleo de oxígeno por la célula se eleva indiscriminadamente a lo que se le conoce como estallido respiratorio (Maldonado Saaverda et.al, 2010; Espinoza Barzallo & Flores Orella, 2016).

Los radicales libres presentan una vida media biológica de microsegundos, a pesar de esto al estar activos pueden reaccionar con todo lo que se pongan en contacto lo que ocasiona daños severos a moléculas, membranas y tejidos (Vasudevan, Sreekumari & Vaidyanathan, 2011). En la tabla 3 se describe las clasificación de los radicales libres y sus abreviaturas.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Tabla 3: Clasificación y abreviatura de los radicales libres

Clasificación	Radical libre	Abreviatura
Especies reactivas de oxígeno	Oxígeno singulete	$^1\text{O}_2$
	Ión superóxido	$\text{O}_2^{\cdot-}$
	Radical Hidroxilo	OH^{\cdot}
	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
	Radicales alcoxi y peroxi	RO^{\cdot} y ROO^{\cdot}
	Radical hidroperoxilo	ROOH^{\cdot}
Especies reactivas de nitrógeno	Óxido nítrico	NO^{\cdot}
	Dióxido nítrico	$\text{NO}_2^{\cdot-}$
	Peroxinitrito	$\text{ONOO}^{\cdot-}$
Especies reactivas del azufre	Radical tiilo	RS^{\cdot}
Especies reactivas del cloro	Ácido hipocloroso	HOCl

Fuente: (Fernandez, Da Silva-Gregoletto, & Túnez-Fiñana, 2009)

1.6.2. Fuentes de radicales libres.

1.6.2.1. Fuentes Endógenas.

El organismo produce radicales libres como parte de su normal funcionamiento en los procesos de: respiración mitocondrial, metabolismo del ácido araquidónico, durante la activación de polimorfonucleares, reacciones enzimáticas, entre otros. Dentro de los radicales libres producidos de manera endógena están los radicales hidroxilo (OH^{\cdot}) y el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Los radicales de oxígeno específicamente los hidroxilos son altamente reactivos, poseen una vida media muy corta y tienen la capacidad de reaccionar con moléculas de ácidos nucleicos o proteínas que se encuentren en su camino, la formación de estos radicales proviene del metabolismo aeróbico de nuestro organismo (Maldonado Saavedra et.al, 2010; Espinoza Barzallo & Flores Orellana, 2016).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

1.6.2.2. Fuentes Exógenas.

La formación de radicales libres se debe a la acción distintos factores externos entre los que pueden estar: sedentarismo, contaminación ambiental, estrés prolongado, obesidad, mala nutrición, hábitos tóxicos, exposición prolongada al sol, secundario a diferentes enfermedades como artritis, cáncer, diabetes, SIDA, hepatitis, insuficiencia renal crónica, asma y enfermedades cardiovasculares. Por otro lado la exposición de los seres humanos a diferentes tipos de radiaciones ocasiona la transferencia de radicales libres a través de su energía hacia los elementos celulares como el agua, incluso la luz visible de longitud de onda apropiada es capaz de producir fotólisis en los enlaces químicos y de esta manera originar radicales libres, dicho proceso se lleva a cabo en presencia de fotosensibilizadores. Varios compuestos como anestésicos, antimicrobianos, anticancerígenos, pesticidas, contaminantes atmosféricos, humo del tabaco (en el proceso de la combustión del tabaco se originan cantidades considerables de radicales libres de oxígeno, como el NO), entre otros; al ser metabolizados por el organismo en su proceso originan radicales libres como productos intermedios (Corrales & Muñoz Ariza, 2012; Espinoza Barzallo & Flores Orellana, 2016). En la figura 5 se pueden observar las fuentes de radicales libres.



Figura5. Fuentes de radicales libres.

Fuente: (Laboratorio de Metabolopatías, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, 2016)

1.6.3. Efectos Nocivos de los radicales libres.

La vida de los radicales libres dura apenas microsegundos pero su elevada capacidad de reaccionar con lo que esté a su alrededor ocasiona daños considerables a biomoléculas, como los ácidos nucleicos, las proteínas, polisacáridos y lípidos y en membranas celulares.

El oxígeno posee la capacidad de complementarse a bases nitrogenadas o pentosas que forman parte de la estructura del ADN, de esta manera se forma el radical peroxilo, provocando daños estructurales así como diferentes mutaciones, por este motivo los aminoácidos que forman parte de la estructura de las proteínas tienen residuos que se vuelven susceptibles al ataque de las especies reactivas de oxígeno principalmente los radicales hidroxilo. Los aminoácidos que presentan mayor susceptibilidad a sufrir procesos de oxidación son tirosina, triptófano, fenilalanina, metionina, cisteína e histidina, la oxidación generada puede ocasionar cambios



UNIVERSIDAD DE CUENCA

estructurales en la proteína y como resultado la modificación o pérdida de su función biológica.

Generalmente el daño oxidativo ocasionado es irreversible lo cual conducirá a la desnaturalización de la proteína afectada (Maldonado Saavedra et.al, 2010).

Otras moléculas que presentan elevada susceptibilidad a la acción oxidante de los radicales libres son los lípidos de manera especial los que contienen ácidos grasos poli-insaturados que se encuentran formando parte de la membrana plasmática, ocasionando la pérdida de su flexibilidad, de las funciones secretoras y la pérdida de los gradientes iónicos de intercambio en ambos lados de la membrana. En el proceso de peroxidación lipídica al ser degradados se originan productos como malondialdehído (-CHO-CH₂-CHO-) que van a estar presentes en líquidos biológicos. En general todas las macromoléculas son atacadas y dañadas por los radicales libres como es el caso de las enzimas que pierden su capacidad catalizadora y los polisacáridos pierden su función estructural provocando su despolimerización que desencadenan procesos degenerativos (Maldonado Saavedra et.al, 2010; Espinoza Barzallo & Flores Orellana, 2016).

1.7. Estrés oxidativo por consumo de cigarrillo

En el humo del cigarrillo existe una peligrosa mezcla de aproximadamente 4700 compuestos químicos de entre los cuales los más estudiados por sus efectos nocivos son la nicotina y el monóxido de carbono, los mismos son potentes oxidantes que al ingresar al organismo promueven la formación de radicales libres fundamentalmente radicales hidroxilo y superóxido que podrían ser los responsables de la mayor parte de daños morfológicos y funcionales que ocasiona el hábito de fumar, estas alteraciones se producen debido a un desbalance entre la cantidad de radicales libres y los antioxidantes que son los encargados de contrarrestar los efectos nocivos de los



UNIVERSIDAD DE CUENCA

anteriores, a este desbalance se le conoce con el nombre de estrés oxidativo (Gutiérrez Maydata, 2003; Córdova Izquierdo et.al 2010).

1.7.1. Humo de cigarrillo y radicales libres.

El humo del cigarrillo (HC) está formado por una serie de compuestos tóxicos, en el proceso de combustión del cigarrillo se originan una cantidad considerable de radicales libres sobre todo especies reactivas de oxígeno (EROs) como el NO. Al momento de entrar en contacto el humo del tabaco con los alveolos pulmonares se produce la activación de los macrófagos alveolares, dando lugar a la formación de más EROs que contribuyen a la inflamación (Gutiérrez Maydata, 2003; Sanz Parras, 2016).

Se pueden encontrar dos fases en el humo del cigarrillo:

Fase sólida: se encuentran las partículas sólidas principalmente el alquitrán. En esta fase se encuentran alrededor de 1,017 radicales libres/g

Fase gaseosa: es aquella que atraviesa el filtro del cigarrillo, en esta fase se encuentra contenidos aproximadamente 1,015 radicales libres/bocanada.

La vida de los radicales libres depende de la fase a la que se encuentren asociados, así los que están en la fase de alquitrán tienen larga duración (horas-meses) y los que están en la fase gaseosa tienen una corta duración de apenas segundos (Gutiérrez Maydata, 2003; Espinoza Barzallo & Flores Orellana, 2016).

Se han podido identificar las siguientes especies reactivas en la fase gaseosa del humo del cigarrillo: radicales hidroxilo, superóxido, peróxido, peróxido de hidrógeno, oxígeno singulete, óxido nítrico, dióxido de nitrógeno y peroxinitrito. A pesar de que la fase gaseosa posea gran cantidad de especies reactivas, la principal fuente de radicales superóxido y peróxido de hidrógeno



UNIVERSIDAD DE CUENCA

se encuentra en la fase sólida del HC por la presencia de polifenoles y varios compuestos orgánicos, entre estos los de mayor importancia son las quinonas que resultan del equilibrio entre hidroquinonas, quinonas y semiquinonas que están muy relacionadas con la toxicidad producida por el hábito de fumar ya que originan cantidades considerables de EROs (Gutiérrez Maydata 2003).

Los radicales superóxidos originados por la autooxidación de compuestos polifenólicos presentes en la fase sólida, reaccionan con el óxido nítrico(NO) procedente de los pulmones por acción de la enzima sintetasa de NO y de la fase gaseosa de humo del cigarrillo, originando peroxinitrito (ONOO-), un potente nitrante y oxidante que se suma a las especies reactivas de nitrógeno y oxígeno llegando a tener un rol importante en las enfermedades ocasionadas por el cigarrillo, como la aterosclerosis y el cáncer (Sanz Parras, 2016).

1.7.2. Daño celular ocasionado por el humo de cigarrillo.

El tabaquismo es considerado uno de los factores de riesgo de mayor importancia para la aparición y desarrollos de múltiples enfermedades consecuencia de una exposición excesiva por tiempo prolongado a EROs, provocando estrés patológico en células y tejidos, a lo que se denomina estrés oxidativo (EO), en este estado se genera daño a proteínas esenciales, ruptura de las cadenas en el ADN, alteración de sus bases, peroxidación lipídica, incremento anormal de Ca^{+2} libre a nivel intracelular y en algunos casos puede provocar necrosis o apoptosis (Lanas & Serón, 2012; López, Mongilardi, & Checkley, 2014).

En los fumadores por cada bocana de humo ingresa al organismo una excesiva carga de radicales libres los cuales desencadenan un proceso de estrés oxidativo que puede ser evidenciado por el incremento de indicadores o biomarcadores como el malondialdehído que puede ser medido en



UNIVERSIDAD DE CUENCA

suero, así también mediante los dienos conjugados del ácido linoleico y en los niveles de F2-isoprostanos. Estos indicadores de peroxidación lipídica demuestran el daño a nivel funcional y estructural de las células en los fumadores (Gutierrez Maydata, 2003; Ruibal Brunet, 2012).

1.7.3. Peroxidación lipídica inducida por los contaminantes del humo del cigarrillo.

La peroxidación lipídica define el daño oxidativo hacia los lípidos, especialmente a los ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran formando parte de la bicapa lipídica de las membranas biológicas, ocasionado por especies reactivas de oxígeno o radicales libres provenientes del humo de cigarrillo y los originados por los contaminantes oxidantes del cigarrillo al interior del organismo. Constituye un importante mecanismo de daño tisular vinculado al envejecimiento y a ciertas enfermedades (Avello & Suwalsky, 2006; Céspedes Miranda & Castillo Herrera, 2008; Sánchez, Torres, Moreno & Rodríguez, 2011).

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) pueden sufrir diversas modificaciones como resultado de la oxidación generada por los radicales libres principalmente en presencia de ácidos grasos poliinsaturados. Al oxidarse los ácidos grasos poliinsaturados de estas lipoproteínas se ven alteradas estructuralmente de tal forma que pueden ser captadas por los macrófagos de la íntima arterial e inicia el proceso aterosclerótico en ciertos casos. Mediante estudios in vitro se ha podido demostrar el daño ocasionado por el humo del cigarrillo en las lipoproteínas ya que inhibe la enzima paroxanasa que las protege de la peroxidación (Qui-Zapata et.al, 2010; Espinoza Barzallo & Flores Orellana, 2016).

El proceso de peroxidación lipídica se trata de una reacción en cadena donde intervienen los EROs, las reacciones se caracterizan por 3 diferentes pasos que son: iniciación, propagación y terminación, como se puede observar en la figura 6.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Se inicia cuando un radical libre asalta a un carbono de la cadena alifática de ácido graso y captura un átomo de hidrógeno, y se forma un radical alquilo, dicha reacción se lleva a cabo en los ácidos grasos poliinsaturados que poseen carbonos contiguos a dobles enlaces, debido a que los radicales originados son estabilizados por resonancia con el doble enlace, el cual reacciona con el oxígeno molecular para originar un radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$). El radical peroxilo tiene la capacidad de captar un átomo de hidrógeno de otra molécula lipídica transformándose en un hidroperoxilo (ROOH) y de esta manera crear un nuevo radical libre lipídico. Este nuevo radical formado es capaz de reaccionar con otra molécula de oxígeno estableciendo una cadena de propagación del daño oxidativo (Gutiérrez, 2015; Espinoza Barzallo & Flores Orellana, 2016).

La cadena de propagación del daño oxidativo puede extenderse en dependencia de diferentes factores como: la concentración de oxígeno y la presencia de antioxidante. Los productos primarios de peroxidación son los hidroperóxidos y son muy estables sin embargo su degradación puede ser inducida por elevadas temperaturas o por metales en transición (iones cobre y hierro), al descomponerse estas moléculas se produce una mezcla compleja de productos secundarios de la peroxidación lipídica. La etapa de terminación de la peroxidación lipídica puede llevarse a cabo mediante la combinación de especies reactivas que formen productos no radicales o por la acción de moléculas antioxidantes sobre los radicales libres (Fagali, 2011).

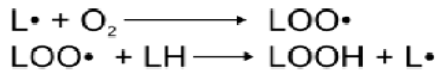


UNIVERSIDAD DE CUENCA

INICIACIÓN



PROPAGACIÓN



RAMIFICACIÓN



TERMINACIÓN

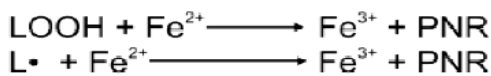
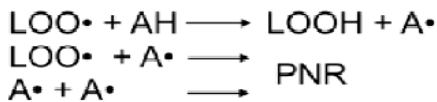
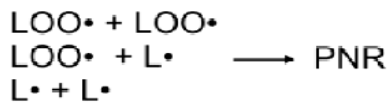


Figura 6. Esquema de las principales reacciones en el proceso de peroxidación lipídica LH: lípido; X•: radical libre iniciador; L•, LO•, LOO•: radicales libres producidos a partir de LH; LOOH: hidroperóxido lipídico; AH: antioxidante; A•: radical libre del antioxidante; PNR: productos no radicales.

Fuente: (Fagali, 2011)

1.8. Enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo

Un tema de gran importancia es la conexión del estrés oxidativo con varias enfermedades cardiovasculares, coronarias, metabólicas entre otras; por el ataque de los radicales libres al organismo. A pesar de existir numerosas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo a continuación se describe únicamente las relacionadas con el perfil lipídico:

1.8.1. Aterosclerosis.

Inicia con un exceso de radicales libres, originados por la captura de un electrón de la grasa poliinsaturada del colesterol LDL. Al presentarse condiciones adecuadas para llevarse a cabo el



UNIVERSIDAD DE CUENCA

proceso oxidativo las lipoproteínas son fragmentadas y se alteran ciertos residuos de aminoácidos de la apolipoproteína de la LDL. El poder aterogénico de las LDL oxidadas se incrementa debido a que son captadas más ávidamente por los macrófagos resultando citotóxicas para el endotelio y favorecen a formación de factores vasoactivos, trombóticos, de adhesión y de proliferación de células musculares lisas de la vasculatura, desencadenando la lesión aterosclerótica. Diversos estudios demuestran la relación íntima que existe entre las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y los radicales libres, producto de esta relación se produce un aumento en los niveles de LDL y modifica a estas moléculas haciéndolas más pequeñas y densas favoreciendo la aparición de la aterosclerosis. Existen varios factores de riesgo de aterosclerosis como la hipercolesterolemia, hipertensión y tabaquismo que inducen a un desequilibrio entre prooxidantes y antioxidantes (Elejalde Guerra, 2001; Fernández Guerrero et.al, 2010).

El hábito del consumo de cigarrillo expone al fumador a la acción de los principios activos presentes en el humo, los compuestos tóxicos afectan al sistema cardiovascular mediante dos mecanismos: alterando el balance entre la demanda y el suministro de oxígeno y favoreciendo la progresión acelerada de aterosclerosis (Chávez Domínguez, 2010; Sandoya, 2011).

1.8.1.1. Alteraciones en el perfil lipídico.

Entre las enfermedades cardiovasculares relacionadas con el consumo de tabaco sobresale la aterosclerosis que ocasiona una disminución en la luz arterial a causa de la proliferación celular en las paredes arteriales y el aumento de lípidos que finalmente dan lugar a la formación de placas ateromatosas. El tabaco ejerce un efecto tóxico en el endotelio pero también ocasiona trastornos en el metabolismo lipídico. Probablemente la nicotina, el monóxido de carbono y los radicales libres atacan al endotelio e inducen a un estado de estrés oxidativo dando como resultado



UNIVERSIDAD DE CUENCA

moléculas de LDL oxidadas, las mismas estimulan una respuesta inflamatoria por parte de los macrófagos. Con estos antecedentes resulta de vital importancia la revisión del perfil lipídico que ayudará a detectar precozmente patologías como dislipidemias, síndrome metabólico, entre otras, que permitan al médico iniciar acciones preventivas en etapas tempranas (Gorbachev et.al, 2006; Lahoz & Mostaza, 2007).

Ha sido demostrado que existe un relación causal entre el hábito tabáquico y las enfermedades cardiovasculares con un riesgo relativo de 1,5 a 3 veces. Se estima que alrededor del 33% de las muertes relacionadas con el consumo del tabaco se deben a enfermedades cardiovasculares (La Pontificia Universidad Javeriana, 2009).

Los efectos a nivel del perfil lipídico son los siguientes:

Colesteol LDL: Debido a que las moléculas de cLDL se vuelven susceptibles a la oxidación por radicales libres, los niveles de estas incrementan a nivel plasmático ya que son fácilmente captadas por los macrófagos los cuales las depositan en la arterias originando placas ateroscleróticas, además mediante estudios se ha encontrado una relación que ante la presencia de LDL oxidadas se genera una disminución o la pérdida total de la actividad enzimática de la paraoxonasa que en condiciones normales protege de la oxidación al LDL (Muñoz Tebar, 2010).

Colesterol HDL: Numerosos estudios demuestran que debido a los procesos oxidativos que se generan en los fumadores los valores de cHDL también resulta alterados observándose una disminución considerable, lo que provoca la acumulación de cLDL en las arterias favoreciendo a la progresión de la aterosclerosis. Un factor de gran importancia que puede predecir el riesgo cardiovascular es el cociente LDL/HDL, mientras más alto resulte mayor es el riesgo aterogénico (Lanas & Serón, 2012).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Triglicéridos: Conjuntamente con el cLDL, los niveles de triglicéridos incrementan considerablemente por alteraciones en su metabolismos, lo cual puede ocasionar a más de la aterosclerosis el desarrollo de dislipidemias (Muñoz Tebar, 2010; Lanás & Serón, 2012).

A pesar que por acción de los radicales libres pueden alterarse los valores del perfil lipídico predisponiendo a la aterosclerosis y a dislipidemias, resulta importante y necesario evaluar el estilo de vida de los adultos jóvenes que también ya que intervienen en el incremento o disminución de dichos valores y puedan aplicarse medidas de prevención de manera oportuna (Freire de Freitas et.al, 2013).

1.9.Sistemas de defensa antioxidante

Se considera un sistema de defensa antioxidante al conjunto de sustancias que al estar en bajas concentraciones en relación a un sustrato oxidable, tienen la capacidad de prevenir o retardar en este su oxidación. Dentro de los sustratos oxidables están moléculas inorgánicas y orgánicas que forma parte de las células, entre estas tenemos carbohidratos, lípidos, proteínas y moléculas de ácidos nucleicos. El papel de los antioxidantes se basa en evitar asociaciones de otras moléculas con el oxígeno, para lo cual ante la presencia de EROs, se unen de forma más rápida a estos en comparación con otras moléculas que puedan estar presentes en cualquiera de las estructuras celulares o en el líquido extracelular (Venereo Gutiérrez, 2002; Mañón Rossi, Garrido, & Núñez Sellés, 2016).

La acción protectora de los antioxidantes frente a los radicales libres de oxígeno se da sacrificando su propia integridad molecular y de esta manera evitar modificaciones en otras biomoléculas, al mismo tiempo transforman a los EROS en productos mínimamente tóxicos o no tóxicos, además ayudan a prevenir la formación de los radicales libres, evitan su propagación y se encargan de

UNIVERSIDAD DE CUENCA

reparar las lesiones ocasionadas por estos (González Torres, Betancourt Rule, & Ortiz Muñiz, 2000).

Los componentes del sistema de defensa antioxidante pueden ser de naturaleza enzimática o no enzimática y ejercen su función protectora de la célula de manera simultánea. Según la figura 7 hay 3 tipos de sistemas antioxidantes, los componentes enzimáticos son la defensa primaria que impide la sobreproducción y acumulación de EROs interviniendo con su acción catalizadora en la transferencia de electrones de un sustrato hacia los radicales libres. Los componentes de tipo no enzimático son moléculas hidrofílicas e hidrófobas cuya función se basa en la captura de los radicales libres a los que les adiciona un electrón, para que de esta manera pueda estabilizarse dando lugar a la formación de moléculas mínimamente nocivas para la célula (Venereo Gutiérrez, 2002).

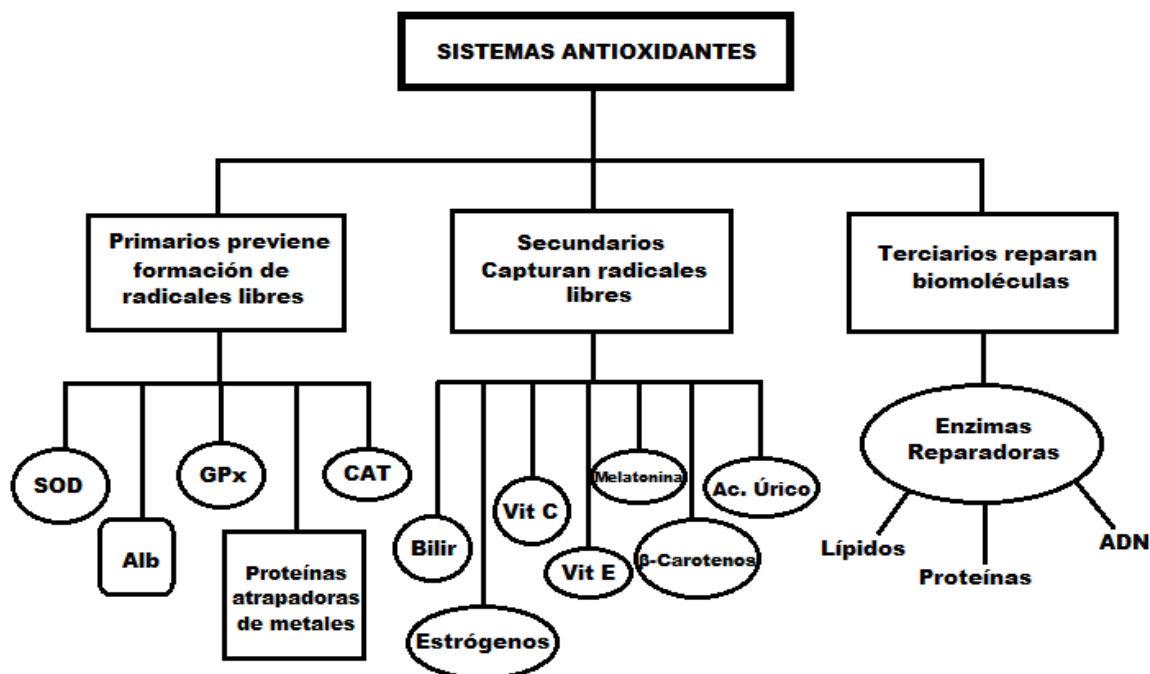


Figura 7. Componentes del Sistema Antioxidante. *SOD: superóxido dismutasa, *GPx:glutación peroxidasa, * CAT: catalasa, *Alb: albúmina, * Bilir: bilirrubina.

Fuente: (UNAM , 2006)



1.10. Métodos para medir el daño oxidativo

1.10.1. Métodos directos.

Se basan en la medición directa de la concentración de agentes oxidantes. Realizar este tipo de medición resulta difícil en la mayoría de los casos debido al tiempo de vida muy corto que presentan. En ciertas investigaciones la única técnica que permite medir directamente a los EROs es la espectrometría de la resonancia de la rotación (espín) de electrones sin embargo aún no se puede aplicar esta técnica en humanos además sus costos son muy elevados (Pérez Gastell & Pérez de Alejo, 2000).

1.10.2. Métodos indirectos.

1.10.2.1. Medición de la concentración de antioxidantes.

Muchos estudios han demostrado que los niveles de antioxidantes pueden variar a causa de diferentes enfermedades, por este motivo pueden ser considerados marcadores de enfermedades y su seguimiento terapéutico. La medición de los antioxidantes se realiza mediante HPLC, las muestras a analizarse pueden ser orina, plasma o tejido. En general los antioxidantes que se determinan son las vitaminas C, B, E, coenzima Q (ubiquinol) y glutatión (Franco Ruiz & Moure Varela, 2010; Espinoza Barzallo & Flores Orellana, 2016).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

1.10.2.2. Determinación de productos terminales de la acción oxidante.

Miden la concentración de productos finales resultantes del proceso oxidativo sobre ADN, lípidos y proteínas. En el caso de la peroxidación lipídica se ven afectados los ácidos grasos poliinsaturados constituyentes de los fosfolípidos en las membranas celulares ocasionando daño celular, por lo que es muy importante realizar mediciones de los productos finales de este proceso para lo cual existen diferentes métodos:

Medición de otros aldehídos procedentes también de la lipoperoxidación: Se basa en la medición del 4 hidroxinonal, puede ser medido mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detección ultravioleta (Pérez Gastell & Pérez de Alejo, 2000).

Medición de hidrocarburos volátiles en el aire expirado: Mediante esta técnica sobre todo se puede medir al etano y pentano que se derivan de los hidroperóxidos de ácidos grasos omega-3 y omega-6 respectivamente. A pesar de no ser un método invasivo no es aceptado por los pacientes por la incomodidad durante el proceso (Pérez Gastell & Pérez de Alejo, 2000).

Medición de compuestos fluorescentes de la lipoperoxidación: Permite la medición de un producto final de la destrucción oxidativa de lípidos como es la lipofuscina, este método es útil únicamente en etapas tardías de lipoperoxidación (Pérez Gastell & Pérez de Alejo, 2000).

Medición de compuestos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico: Se fundamenta en la reacción entre en ácido tiobarbitúrico(TBA) con el malondialdehído (MDA), este último resulta de la peroxidación lipídica de ácidos grasos insaturados y se considera un marcador de la degradación oxidativa de la membrana celular, al darse la reacción entre estos compuestos se genera una coloración que puede ser medible mediante procedimientos fluorométricos, colorimétricos o cromatográficos. Es considerado como el método de elección por la rapidez, facilidad y alta sensibilidad de la prueba (Franco Ruiz & Moure Varela, 2010).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

1.10.3. Determinación de malondialdehído (MDA).

El MDA es el biomarcador de elección para determinar la peroxidación lipídica ya que forma principalmente de la descomposición de peróxidos grasos con tres o más dobles enlaces. El estrés oxidativo ocasionado por el humo del cigarrillo se ve vinculado de manera especial con la oxidación de lípidos por lo que puede ser medido a través de la medición de este marcador biológico de daño oxidativo de lípidos (Souki et.al, 2007; Arroyave Hoyos et.al, 2010; Delgado Roche et.al, 2011).

Los valores de MDA dependen de muchos factores como la alimentación, la exposición a tóxicos, el ejercicio, la edad incluso la altitud de la zona geográfica donde reside un individuo entre otros factores, por lo que no se pueden establecer rangos estandarizados de este biomarcador, sin embargo en varios estudios se reporta como valor referencial $<2\text{nmol/mL}$ y dependiendo la altitud de la zona geográfica se han observado valores entre $3,14 - 4,0\mu\text{mol/L}$ los valores de MDA incrementan de manera proporcional a la altura (Suzaño Vargas, 2014; Pérez et.al, 2015; Melgarejo Pomar et.al, 2017).

La concentración de MDA puede variar en función del tipo de estrés al que se sometan las células, puede ser cuantificado mediante diferentes métodos, el más utilizado es el ensayo de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (SRATB) (Qui-Zapata et.al, 2010).

Se trata de un método espectrofotométrico, la reacción se genera por el ataque del MDA sobre el grupo metileno activo presente en el TBA, un mol de MDA puede reaccionar con dos moles de TBA en un medio ácido y elevada temperatura, por lo que la velocidad de la reacción va a depender de la concentración de TBA, el pH y la temperatura. La coloración que se genera en esta reacción presenta su pico máximo de absorbancia a $532-535\text{nm}$ y otro secundario a $245 - 305\text{nm}$. Es posible



UNIVERSIDAD DE CUENCA

realizar el ensayo por procedimiento espectrofluorométrico ya que el espectro de excitación de la pigmentación TBA-MDA posee un máximo a 532nm. La especificidad entre estas técnicas es equivalente (CELL BIOLABS, INC., 2012).



Materiales y métodos

2.1. Metodología

El presente estudio se trata de una investigación corte transversal, correlacional, cuasi experimental.

2.2. Variables

2.2.1. Identificación de variables.

Variables	Tipo	Relación
Carboxihemoglobina	Continua	Dependiente
Malondialdehído	Continua	Dependiente
Triglicéridos	Continua	Independiente
Colesterol HDL	Continua	Independiente
Colesterol LDL	Continua	Independiente
Características personales: Edad, sexo, hábito de fumar: tiempo fumando, número de cigarrillos al día.	Discretas	Intervinientes

2.3. Población y muestreo

Universo: El estudio estuvo constituido por una muestra de 58 estudiantes de la Facultad de Agronomía, Silvicultura, Pesca y Veterinaria, de la Universidad Católica de Cuenca, divididos en dos grupos: (n=30) estudiantes universitarios fumadores activos considerados como el grupo de estudio (Anexo1) y (n=28) estudiantes no fumadores a los que se les consideró como grupo control. (Anexo 2).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Muestreo: Se realizó un muestreo mediante una estrategia no probabilística, es decir, se seleccionó a los estudiantes que desearon participar de manera voluntaria bajo el criterio del investigador.

Criterios de inclusión: Para el grupo de estudio los estudiantes debían ser fumadores activos, para el grupo control debían ser estudiantes no fumadores y que no sean ex fumadores.

Criterios de exclusión: Los estudiantes del grupo de estudio no debían estar recibiendo terapia antioxidante.

Para la determinación de MDA y del perfil lipídico se realizó una toma de muestra sanguínea al inicio de la jornada de estudios y para el % COHb se realizaron dos mediciones: una al inicio de la jornada y otra al final de la jornada de estudios.

2.4. Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de datos

2.4.1. Consentimiento informado.

Se realizó a los estudiantes de la Facultad de Agronomía, Silvicultura, Pesca y Veterinaria, de la Universidad Católica de Cuenca. (Anexo 3).

2.4.2. Encuesta.

Se elaboró una encuesta de tipo cerrado y abierto de acuerdo al cuestionario para la clasificación de consumidores de tabaco jóvenes (Londoño Pérez, Rodríguez Rodríguez, & Gantiva Díaz, 2011). (Anexo 4).

2.4.3. Instrumental/Laboratorio.

Para los exámenes sanguíneos se realizó una extracción de sangre a cada estudiante, a través de venopunción según los procedimientos establecidos por la OMS/SIGN: Carpeta de material sobre



UNIVERSIDAD DE CUENCA

seguridad de las inyecciones y los procedimientos conexos, 2010. Se utilizó tubos con sistema al vacío sin anticoagulante (tapa roja) de 10ml.

Las muestras fueron tomadas y custodiadas por la maestrante, se transportaron en triple empaque, con cadena de frío (2 a 8)°C, fueron almacenadas en un ultracongelador de -80 °C hasta su procesamiento. El almacenaje y procesamiento de las muestras se llevó a cabo en el laboratorio del Centro de Referencia de Retrovirus, hepatitis y otros virus de transmisión sexual del Instituto de Investigación en Salud Pública (INSPI)-Dr. Leopoldo Izquieta Pérez CZ6.

La medición del %COHb se realizó al inicio y final de la jornada de estudios, se utilizó un CO-oxímetro de pulso, se hicieron lecturas individuales a cada estudiante.

2.4.4. Técnicas.

Las técnicas de laboratorio que se aplicaron a la población de estudio fueron según el procedimiento analítico establecido.

2.4.4.1. Análisis de laboratorio.

Luego de haber realizado la toma de muestras sanguíneas, se procedió a centrifugarlas a 2500rpm durante 5 minutos, el suero obtenido de cada muestra se lo separó en dos viales: en el primer vial se adicionó un antioxidante butil hidroxitolueno (BHT) (100uL de suero=1uL BHT) y luego fue almacenado a -80°C hasta realizar la determinación de MDA; en el segundo vial se colocó aproximadamente 1.5 ml de suero y fueron almacenado a -80°C hasta su procesamiento para colesterol LDL, colesterol HDL y Triglicéridos.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

2.4.4.1.1. Determinación de MDA.

Se realizó la determinación mediante reacción con el Ácido Tiobarbitúrico, de acuerdo a las especificaciones del kit comercial OxiSelect™TBARS Assay kit (MDA Quantitation) la información del kit se observa en la tabla 4. (Anexo 5).

Principio del Ensayo: Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) kit de ensayo es una herramienta para la medición cuantitativa directa en muestras biológicas. Se basa en la formación del aducto malondialdehído-ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA) mediante la reacción entre el MDA y TBA (1:2) bajo temperaturas altas (90-100°C) y condiciones ácidas para poder ser medidas colorimétricamente a 530-540nm. El contenido de MDA en las muestras desconocidas se determina por comparación con la curva estándar MDA predeterminado.

Las lecturas se realizaron en el lector de microplacas para absorbancia ELx808 previamente calibrado (Anexo 6).

Tabla 4. Información del kit de ensayo

OxiSelect™TBARS Assay kit (MDA Quantitation)	
Marca	CELL BIOLABS, INC.
Lote	10091316
Procedencia	USA
Fecha de expiración	04/2018

Fuente: (Cell Biolabs, INC.)

En la figura 8 se puede observar la curva de calibración realizada al kit comercial OxiSelect™TBARS Assay kit (MDA Quantitation)

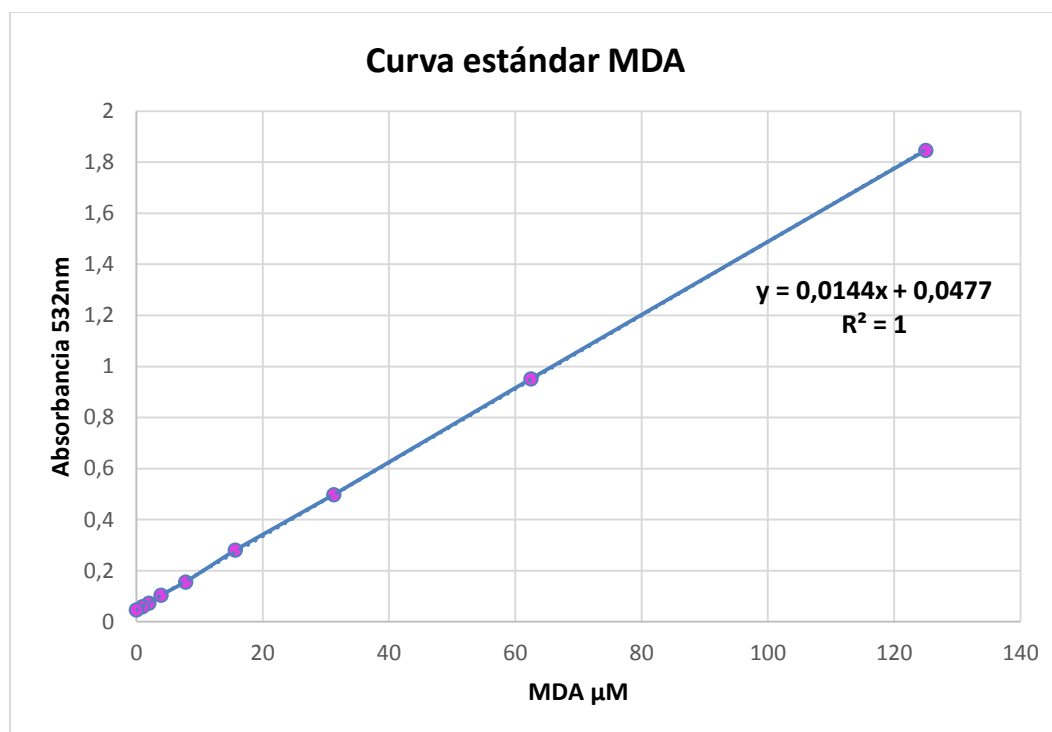


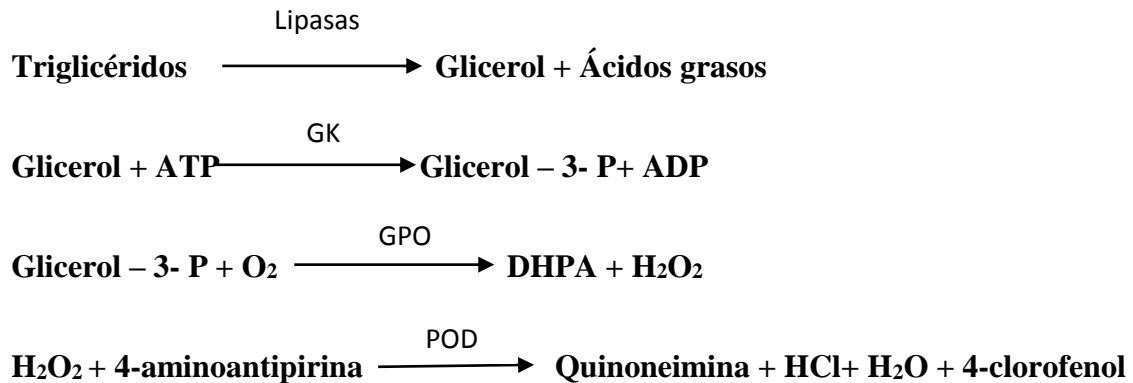
Figura 8. Curva estándar de malondialdehído.

Fuente: Autor

2.4.4.1.2. Determinación de Perfil Lipídico.

Determinación de Triglicéridos: Método enzimático colorimétrico, se utilizó el kit comercial HUMAN. (Anexo 7).

Fundamento del método: Los triglicéridos son determinados después de hidrólisis enzimática con lipasas. El indicador es Quinoneimina formada a partir de peróxido de hidrógeno, 4-aminoantipirina y 4-chlorofenol bajo la influencia catalítica de peroxidasa.



Determinación de colesterol HDL: Método enzimático colorimétrico, se utilizó el kit comercial HUMAN.

Fundamento del método: Los quilomicrones, VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad) y LDL (lipoproteínas de baja densidad) se precipitan por adición de ácido fosfotúngstico y cloruro de magnesio. Después de centrifugar, el sobrenadante contiene las HDL (lipoproteínas de alta densidad), en las que se determina HDL colesterol. (Anexo 8).

Determinación de colesterol LDL:

Fundamento del método: Esta técnica emplea un método de separación basado en la precipitación específica de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por acción del sulfato de polivinilo en el suero, sedimentación del precipitado por centrifugación y subsiguiente ensayo como colesterol residual del resto de lipoproteínas (HDL + VLDL) contenidas en el sobrenadante claro. El colesterol-LDL se calcula por diferencia, restando el colesterol del sobrenadante del colesterol total de la muestra.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Las lecturas del perfil lipídico se realizaron en el lector de elisa STAT FAX 1904 previamente calibrado (Anexo 9).

2.4.4.1.3. Técnica de medición del %COHb.

Las mediciones se realizaron con un CO-oxímetro de pulso RAD-57™ SET, este equipo brinda la precisión y fiabilidad de la pulsimetría.

Fundamento del método: Es un método no invasivo y rápido, trabaja con un sensor especial compuesto por diodos emisores de luz (LED) roja e infrarroja que transmiten luz a través del sitio hacia un fotodiodo (fotodetector), el cual al recibir la luz la convierte en una señal electrónica y se la envía al Rad-57 para ser calculada. El sensor debe ser colocado en un dedo de la mano no dominante del paciente y conectado mediante un cable al aparato, analiza diferentes longitudes de onda de luz para medir con precisión la hemoglobina total, el contenido de oxígeno, la carboxihemoglobina y la metahemoglobina (Moreno et.al, 2014)

Las lecturas se realizaron en el CO-oxímetro de pulso RAD-57™ SET son sensor autocalibrable (Anexo 10).

2.4.5. Análisis de datos.

Los resultados obtenidos a lo largo del análisis se almacenaron en una base de datos en el programa Microsoft Office Excel v. 2013 fueron procesados en el programa estadístico SPSS STATISTICS v. 20.0 en función del tipo de variables se emplearon tablas y gráficos, para su representación.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Las pruebas estadísticas básicas realizadas fueron: media, desviación estándar y error estándar de la media para variables cuantitativas y para variables cualitativas. Adicionalmente se calcularon y graficaron las frecuencias relativas (%) de las variables.

Para comparar las medias de los valores obtenidos en las determinaciones de MDA entre fumadores y no fumadores, se empleó la prueba Test T de Student, se realizó test ANOVA post hoc de Tukey para comparar la concentración de MDA, triglicéridos, HDL colesterol y LDL colesterol; así como las mediciones de %COHb inicial y final frente al número de cigarrillos diarios consumidos por los estudiantes universitarios y de esta manera determinar cuál es la relación existente entre los diferentes grupos de consumo.

Se empleó el coeficiente de correlación lineal de Pearson para comparar los valores de %COHb inicial vs. %COHb final del grupo de estudio y de igual manera para comparar los valores de %COHb inicial vs. %COHb final del grupo control, para evaluar el comportamiento de las variables por la exposición al CO.

En las tablas de contingencia se empleó la prueba Chi-cuadrado para establecer relación lineal entre las variables de la concentración de MDA, %COHB inicial y %COHB final grupo de estudio vs. grupo control se empleó el coeficiente de correlación lineal de Pearson, con un intervalo de confianza del 95%, lo que significa la probabilidad de estar equivocados al rechazar la H_0 en una prueba de hipótesis.

Capítulo III

Resultados

3.1. Comportamiento de las variables demográficas en el grupo control

El grupo control estuvo conformado por un 78,57% de estudiantes de 18 a 22 años y con predominio del género femenino (57.14%), según se observa en la figura 9.

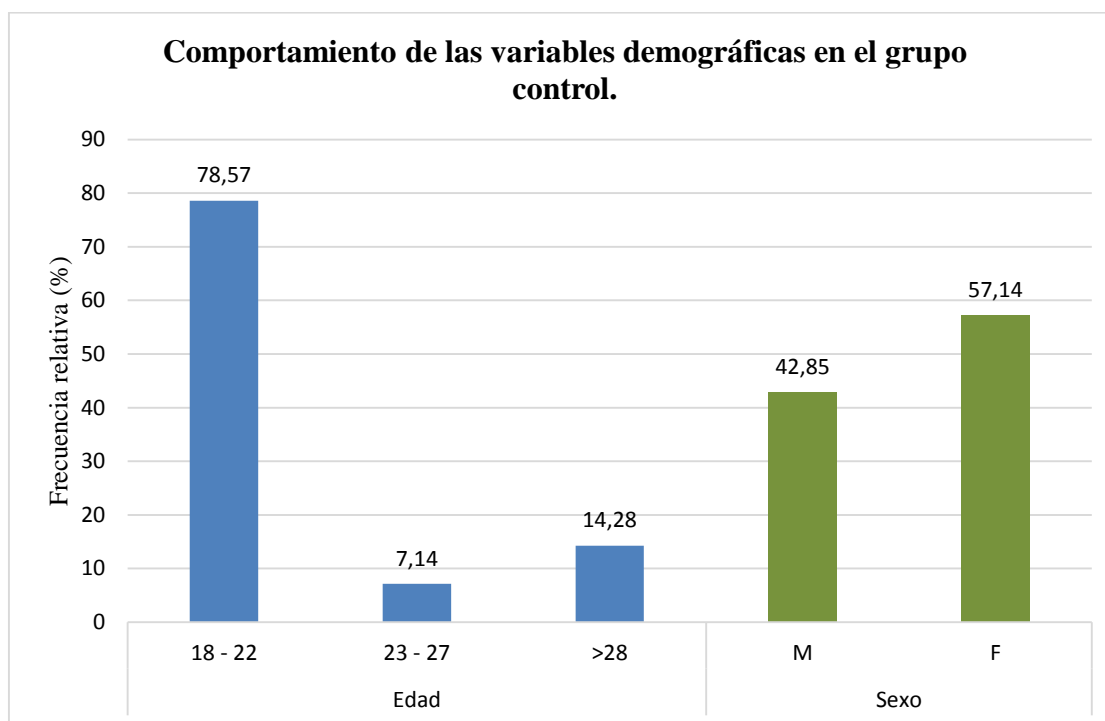


Figura 9. Comportamiento de las variables demográficas en el grupo control.

Fuente: Autor

3.2. Comportamiento de las variables demográficas en el grupo de estudio

En la figura 10 se aprecia que el grupo de estudio estuvo conformado por un 40% de estudiantes en edades de 23 y 27 años y en su mayoría pertenecían al sexo masculino (80%).

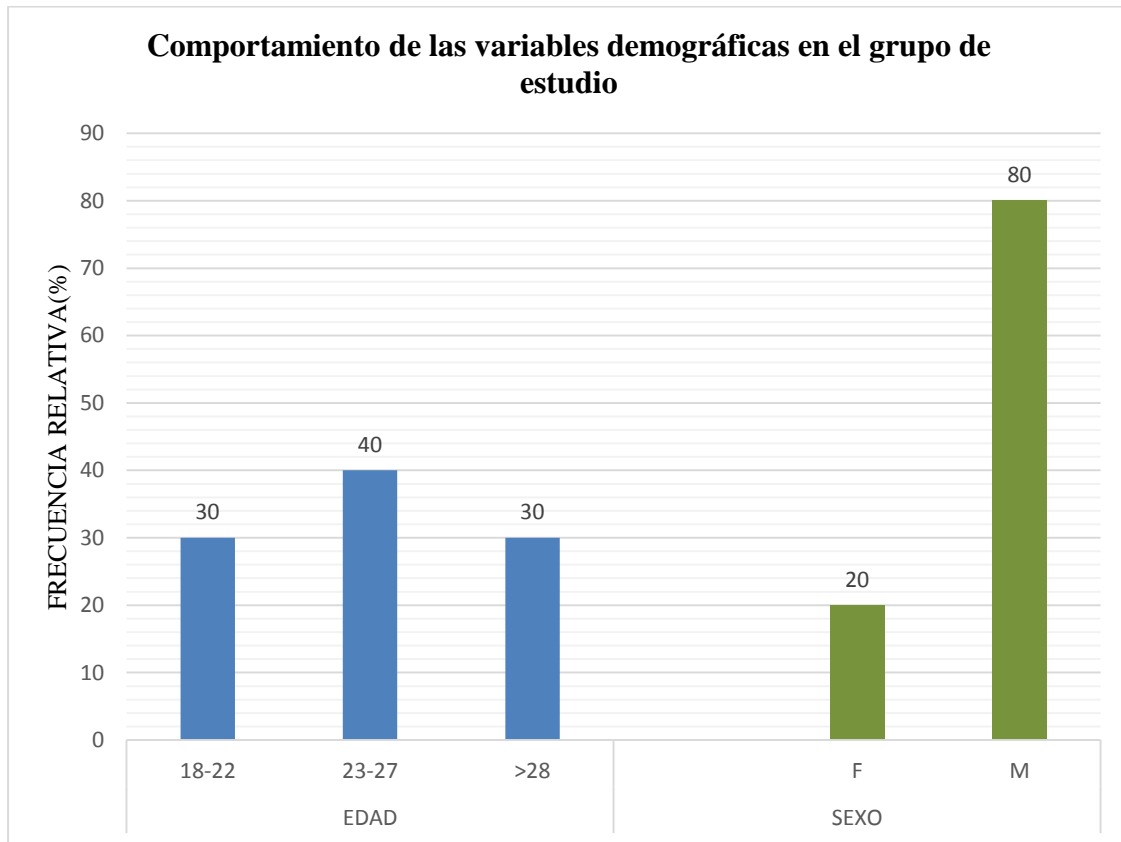


Figura 10. Comportamiento de las variables demográficas en el grupo de estudio

Fuente: Autor

3.3. Consumo de cigarrillos al día por el grupo de estudio

En la figura 11 se puede observar que el mayor porcentaje de consumo de cigarrillo es de 1 a 5 cigarrillos al día (80%), seguidos de 6 a 12 cigarrillos (16.66%) y tan solo un individuo del estudio refirió consumir entre 13 y 24 cigarrillos diarios (3.33%).

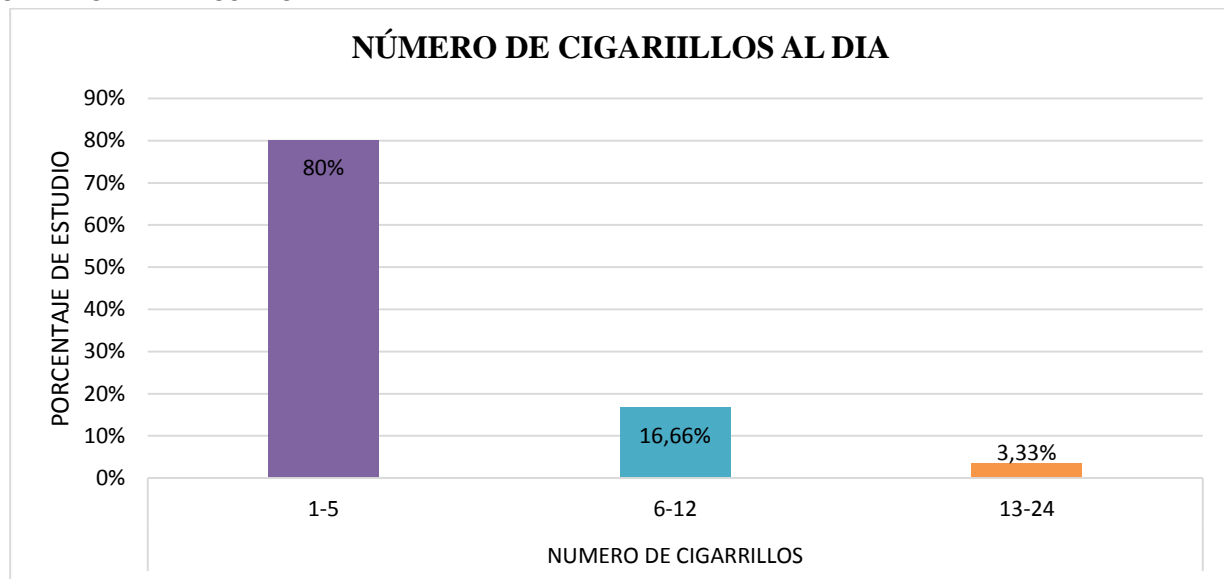


Figura 11. Número de cigarrillos al día en el grupo de estudio

Fuente: Autor

3.4. Problemas de salud relacionados por el consumo de tabaco en el grupo estudio

Mediante la encuesta realizada al grupo de estudio, los problemas de salud que les ocasionaba el consumo de cigarrillos, como se muestra en la figura 12, se evidenció que: falta de condición física 47%, cansancio (24%), problemas de garganta (13%), tos (10%), trastornos de sueño (3%), ningún síntoma (3%).

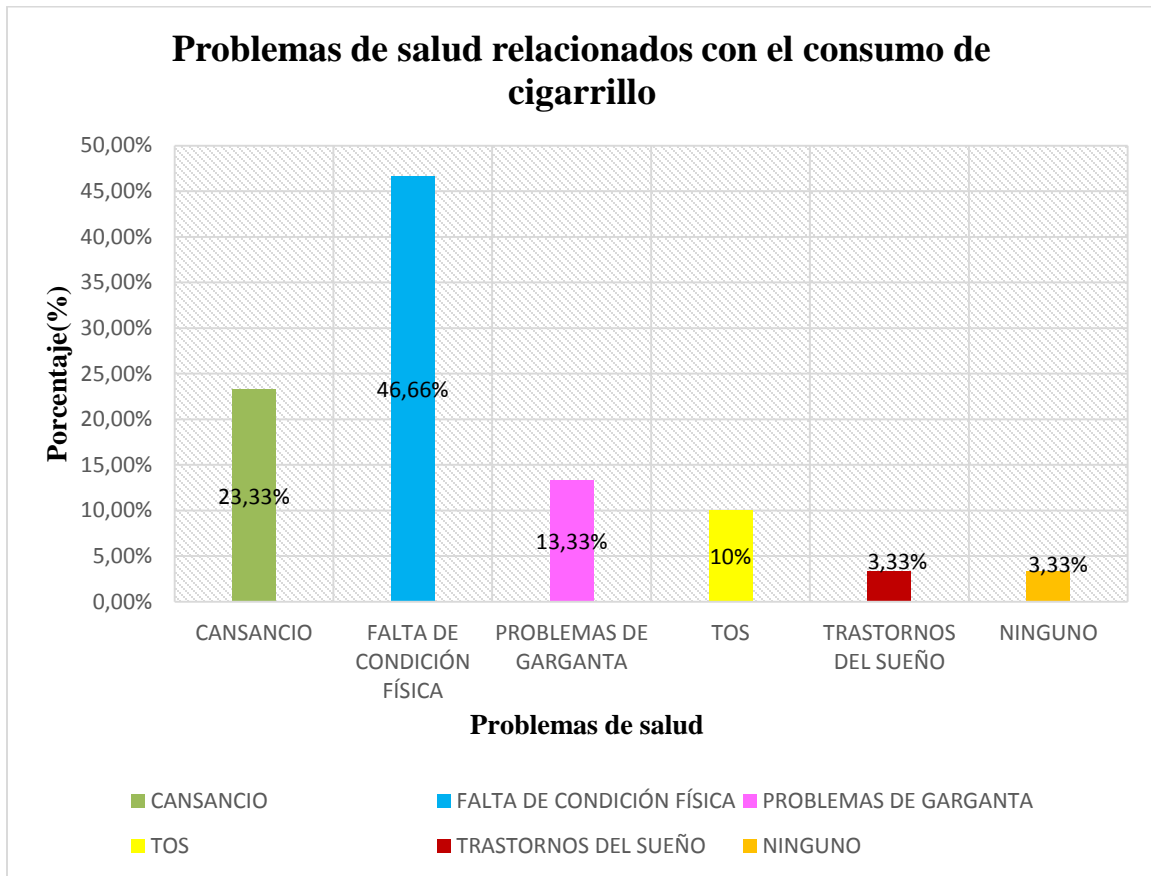


Figura 12. Problemas de salud relacionados por el consumo de tabaco en el grupo de estudio.

Fuente: Autor

3.5. Concentración promedio de MDA por grupo de edad y sexo en el grupo de estudio

En la tabla 5 se puede observar que no hubo diferencias significativas en la concentración de MDA en los diferentes subgrupos según la edad ($p= 0.371$); por otro lado según el sexo si hubieron diferencias significativas ($p<0.05$) presentándose niveles superiores de MDA promedio en estudiantes del sexo masculino.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Tabla 5. Concentración promedio de malondialdehído por grupo de edad y sexo en el grupo de estudio.

VARIABLE		n	Concentración MDA (μmol)			P
			\bar{X}	DE	EEM	
EDAD	18 - 22	8	10,95	4,78	1,69	0,371
	23 - 27	13	10,28	2,73	0,75	
	>28	9	12,18	2,97	0,99	
SEXO	F	6	8,72	2,34	0,95	<0,05
	M	24	11,61	3,44	0,70	
TOTAL	-	30	11,03	3,42	0,62	-

\bar{X} = media aritmética; DE: desviación estándar; EEM: Error estándar de la media; p: Probabilidad de error tipo I en las pruebas de hipótesis, n: número total de muestras.

Fuente: Autor

3.6. Concentración promedio de MDA por grupo de edad y sexo en estudiantes del grupo de control

El grupo control no presentó diferencias estadísticamente significativas respecto a la edad ni al sexo en la concentración sérica de MDA, como se puede ver en la tabla 6 ($p>0,05$), evidenciando que se trata de un grupo bastante homogéneo para estas variables.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Tabla 6. Concentración promedio de MDA por grupo de edad y sexo en estudiantes del grupo control.

VARIABLE		n	Concentración MDA (μmol)			P
			\bar{X}	DE	EEM	
EDAD	18 - 22	22	3.44	0.88	0.188	0.104
	23 – 27	4	4.52	1.36	0.96	
	>28	2	4.25	0.62	0.31	
SEXO	F	16	3.95	0.95	0.23	1
	M	12	3.7	0.93	0.26	
TOTAL	-	28	3.64	0.93	0,17	-

\bar{X} = media aritmética; **DE:** desviación estándar; **EEM:** Error estándar de la media; **p:** Probabilidad de error tipo I en las pruebas de hipótesis, **n:** número total de muestras.

Fuente: Autor

3.7. Comparación del % COHb inicial vs el % COHb final, por grupo de edad y sexo entre grupo de estudio y grupo control

Se puede observar en la tabla 7, que los valores de %COHb inicial y %COHb final en grupo de estudio se presentan elevados debido a la exposición al CO presente en el humo del cigarrillo, mientras que los valores en estudiantes del grupo control se encuentran cercanos o dentro de los rangos referenciales descritos en la literatura, presentando elevada correlación entre %COHb inicial y %COHb final en el grupo de estudio ($p < 0,001$) a diferencia del grupo de estudio que no presentó correlación entre %COHb inicial y %COHb final ($p > 0,001$).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Tabla 7. Comparación del % COHb inicial vs la % COHb final, por grupo de edad y sexo entre grupo de estudio y grupo control.

Variable	Categorías	%COHb Inicial					
		Grupo de estudio			Grupo Control		
		Min	Max	$\bar{X} \pm DE$	Min	Max	$\bar{X} \pm DE$
Edad	18 - 22	4	7	5,50 ± 1,30	1	4	2,64 ± 0,84
	23 - 27	4	8	5,85 ± 1,40	1	4	2,50 ± 2,12
	>28	5	8	6,22 ± 1,39	1	4	2,50 ± 1,29
Sexo	M	4	8	5,96 ± 1,19	1	4	2,33 ± 1,07
	F	4	8	5,50 ± 1,97	1	4	2,81 ± 0,83
Variable	Categorías	%COHb Final					
		Grupo de estudio			Grupo control		
		Min	Max	$\bar{X} \pm DE$	Min	Max	$\bar{X} \pm DE$
Edad	18 - 22	6	9	7,25 ± 1,16	1	5	2,95 ± 1,09
	23 - 27	5	10	7,08 ± 1,25	2	2	2,00 ± 0,00
	>28	6	15	8,67 ± 2,59	2	5	2,75 ± 1,50
Sexo	M	6	15	7,79 ± 1,88	1	4	2,58 ± 0,90
	F	5	9	6,83 ± 1,47	2	5	3,06 ± 1,23
GRUPO		%COHb inicial		%COHb final		Valor p	
Grupo de estudio		5,87 ± 1,35		7,60 ± 1,83		<0,001 ^a	
Grupo control		2,61 ± 0,95		2,86 ± 1,11		>0,001 ^b	

\bar{X} = media aritmética; DE: desviación estándar; p=coeficiente de Pearson; a=correlación entre valores; b= no correlación entre valores.

Fuente: Autor



UNIVERSIDAD DE CUENCA

3.8. Valores promedio de las variables de estudio MDA y %COHb en grupo de estudio vs. grupo control.

En la figura 13 se puede observar el promedio de los valores de las variables de estudio en los grupos de estudio y control, existen diferencias notables en los valores obtenidos entre los grupos, así el %COHb inicial en el grupo de estudio ($5,56 \pm 1,35$) vs. grupo control ($2,17 \pm 0,98$), el %COHb final en el grupo de estudio ($7,28 \pm 1,83$) vs. grupo control ($2,45 \pm 1,11$), mientras que los valores serios de MDA($\mu\text{mol/l}$) en el grupo de estudio ($11,03 \pm 3,42$) vs. grupo control ($3,64 \pm 0,93$), de esta manera se evidencia que el grupo de estudio presenta los valores más elevados en comparación del grupo control debido al consumo de cigarrillo.

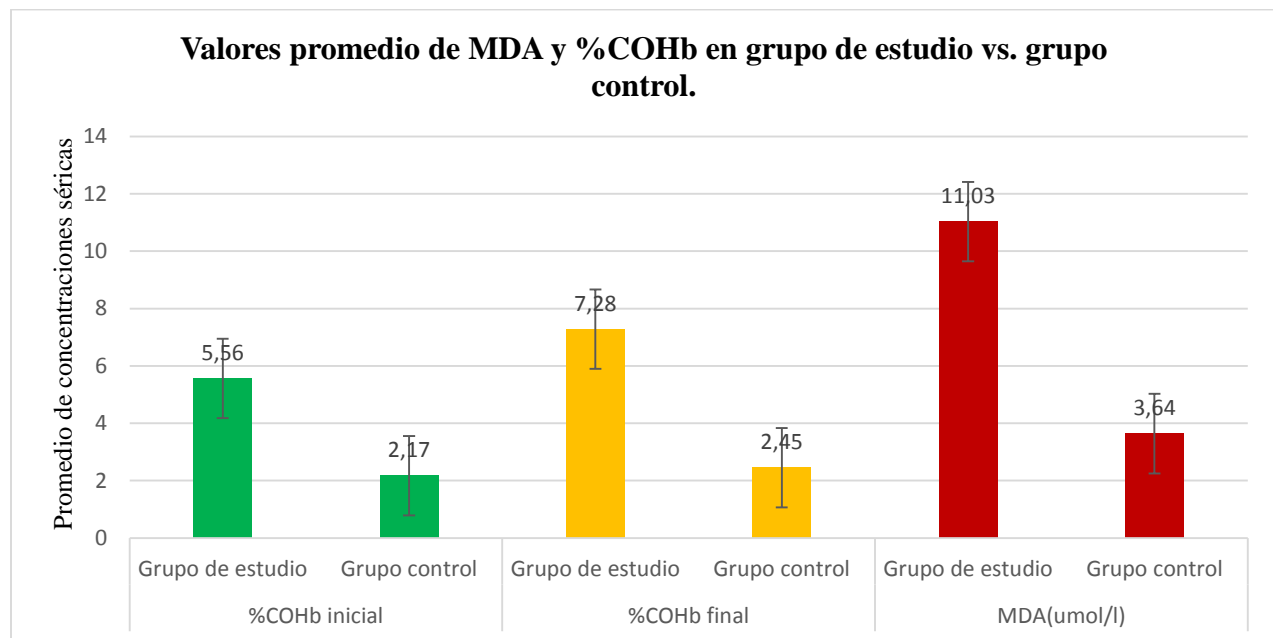


Figura 13. Valores promedio de las variables de estudio MDA y %COHb en grupo de estudio vs. grupo control.

Fuente: Autor



UNIVERSIDAD DE CUENCA

3.9. Correlación entre la concentración MDA y %COHb en grupo de estudio vs. grupo

control

Referente a los datos de la tabla 8, se obtuvo una alta correlación entre %COHb inicial y %COHb final en el grupo de estudio $p=0,671$ a diferencia del grupo control donde se obtuvo una baja correlación $p=0,154$.

El valor de la concentración de MDA y %COHb depende de la exposición a CO, la COHb es inestable y su vida media es muy corta, esto pudo evidenciarse al comparar la concentración de MDA con el %COHb inicial que tienen una correlación baja $p=0,179$, sin embargo mediante la encuesta realizada a los estudiantes se pudo observar que durante horas tarde era el momento en que consumían más cigarrillos, motivo por el cual la concentración de MDA presentó una correlación media con el %COHb final $p=0,209$.

El grupo control mostró correlación baja entre la concentración de MDA y los %COHb inicial ($p=0,191$) y final ($p=0,103$), pudiendo explicarse a que no se encontraban expuestos de forma directa a fuentes de CO como en el caso del grupo de estudio.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Tabla 8. Correlación entre la concentración MDA y %COHb en grupo de estudio vs. grupo control.

Pruebas		Grupo de estudio			Grupo control		
Parámetros	Estadística	% COHb inicial	% COHbfinal	MDA(umol/l)	%COHb inicial	%COHbfinal	MDA(umol/l)
%COHb inicial	Correlación de Pearson	-	0,671	0,179	-	0,154	0,191
	N	30	30	30	28	28	28
%COHb final	Correlación de Pearson	0,671	-	0,209	0,154	-	0,103
	N	30	30	30	28	28	28
MDA(umol/l)	Correlación de Pearson	0,179	0,209	-	0,191	0,103	-
	N	30	30	30	28	28	28
0.00 - 0.199	Correlación Baja						
0.20- 0.49	Correlación Media						
0.50 EN ADELANTE	Correlación Alta						

Fuente: Autor

3.10. Comparación entre las concentraciones séricas de MDA y el nivel de consumo de cigarrillos por día

En la figura 14, se puede observar que en relación al consumo de cigarrillos/día hubo diferencia significativa de la concentración promedio de MDA sérico, al comparar el grupo control con el grupo de estudio $p < 0,05$. El grupo que consume de 1-5 cig/día no mostró diferencias estadísticamente significativas con el grupo que consume 6 -12 cig/día (9,89 uM vs 14,77uM), no se pudo aplicar este test para los fumadores de 13-24 cig/día debido a que solo se reportó un caso cuyo valor de MDA fue 17,49uM. El incremento que se presenta tiene una tendencia bastante lineal con un coeficiente de correlación elevado de $r = 0,899$ ($p < 0,001$).

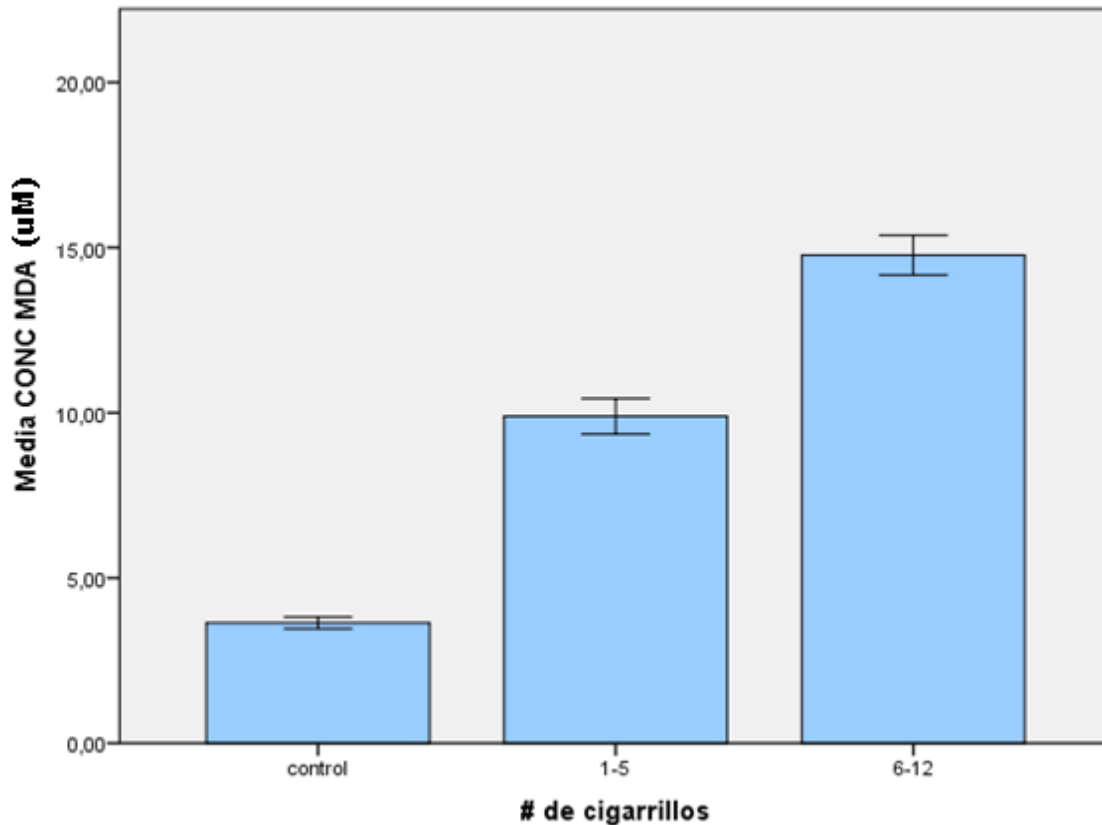


Figura 14. Comparación entre las medias de las concentraciones séricas de malondialdehído ± 1 EEM y el nivel de consumo de cigarrillos por día.

EEM: se refiere al error estándar de la media. **r=** coeficiente de pearson ($p < 0,001$) y prueba post-hoc de Tukey: $p < 0,05$)

Fuente: Autor

3.11. Comparación entre las mediciones del %COHb inicial y el nivel de consumo de cigarrillos por día

En relación al consumo de cigarrillos/día hubo diferencia significativa de la concentración promedio de %COHb inicial, al comparar el grupo control con el grupo de estudio $p < 0,05$. El grupo que consume de 1-5 cig/día no mostró diferencias estadísticamente significativas con el grupo que consume 6-12 cig/día (5,79 % vs 6%), no se pudo aplicar este test para los fumadores

UNIVERSIDAD DE CUENCA

de 13-24 cig/día debido a que solo se reportó un caso cuyo valor de COHb inicial fue 7%, estos datos se pueden visualizar en la figura 15.

El incremento que se presenta tiene una tendencia bastante lineal con un coeficiente de correlación elevado de $r = 0,749$ ($p < 0,001$).

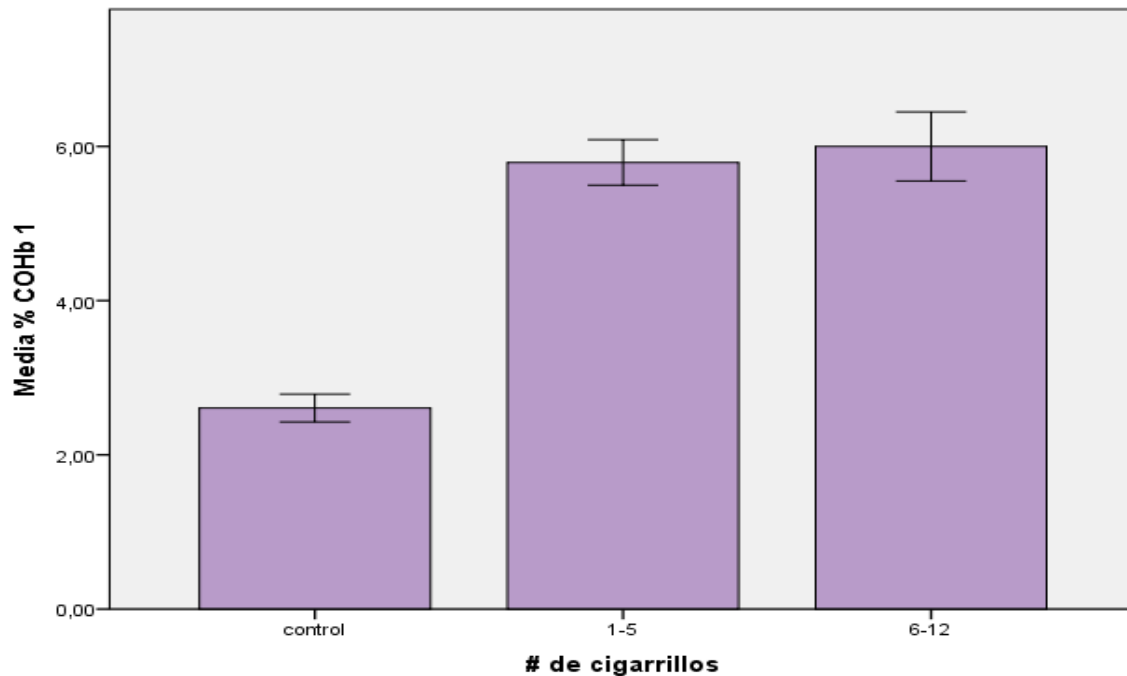


Figura 15. Comparación entre las medias de las mediciones del %COHb inicial ± 1 EEM y el nivel de consumo de cigarrillos por día.

EEM: se refiere al error estándar de la media. r = coeficiente de pearson ($p < 0,001$) y prueba post-hoc de Tukey: $p < 0,05$)

Fuente: Autor

3.12. Comparación entre las mediciones del %COHb final y el nivel de consumo de cigarrillos por día

Según la figura 16, se puede observar que en relación al consumo de cigarrillos/día hubo diferencia significativa de la concentración promedio de %COHb final, al comparar el grupo control con el grupo de estudio $p < 0,05$. El grupo que consume de 1-5 cig/día no mostró diferencias



UNIVERSIDAD DE CUENCA

estadísticamente significativas con el grupo que consume 6 -12 cig/día (7,46 % vs 8%), no se pudo aplicar este test para los fumadores de 13-24 cig/día debido a que solo se reportó un caso cuyo valor de COHb final fue 9%.

El incremento que se presenta tiene una tendencia bastante lineal con un coeficiente de correlación elevado de $r = 0,787$ ($p < 0,001$).

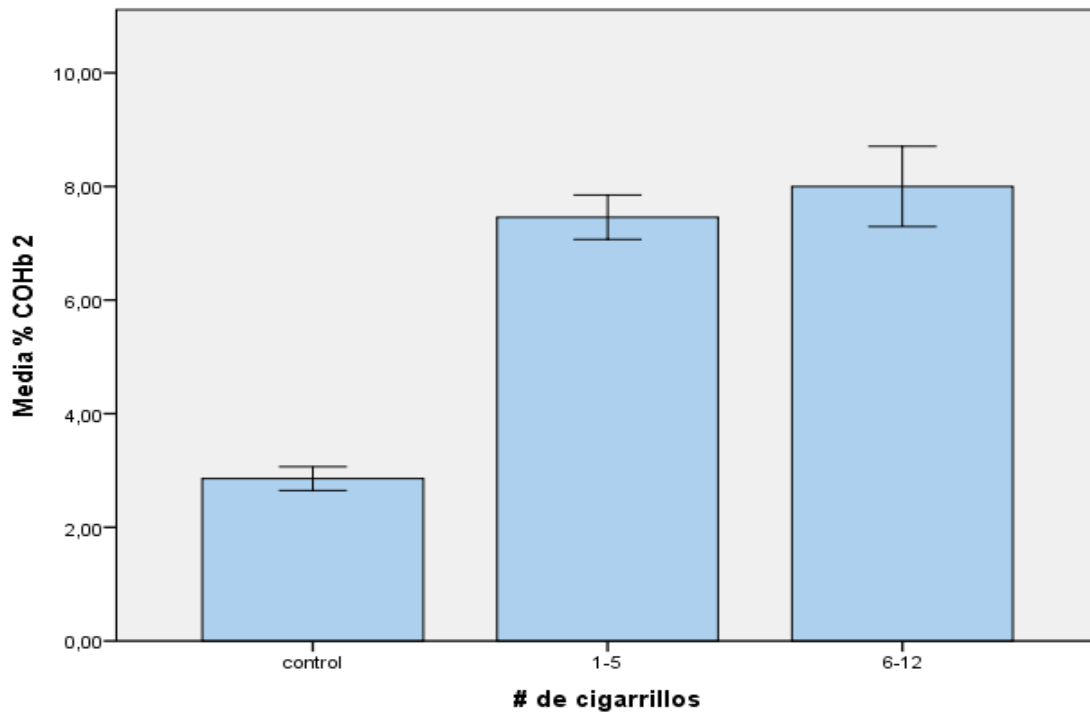


Figura 16. Comparación entre las mediciones del %COHb final ± 1 EEM y el nivel de consumo de cigarrillos por día

EEM: se refiere al error estándar de la media. **r=** coeficiente de pearson ($p < 0,001$) y prueba post-hoc de Tukey: $p < 0,05$)

Fuente: Autor

3.13. Comparación entre las concentraciones séricas de triglicéridos y el nivel de consumo de cigarrillos por día

En cuanto a la relación del consumo de cigarrillos/día y el perfil lipídico en el caso triglicéridos (TG) en la figura 17, se puede observar que existió diferencia significativa de la concentración promedio de TG, al comparar el grupo control con el grupo de estudio $p < 0,05$. El grupo que consume de 1-5 cig/día no mostró diferencias estadísticamente significativas con el grupo que consume 6 -12 cig/día (223,61 mg/dL vs 203,10mg/dL), no se pudo aplicar este test para los fumadores de 13-24 cig/día debido a que solo se reportó un solo caso, cuyo valor de TG fue de 307,4mg/dL. El incremento que se presenta tiene una tendencia relativamente lineal con un coeficiente de correlación medio de $r = 0,261$ ($p < 0,001$).

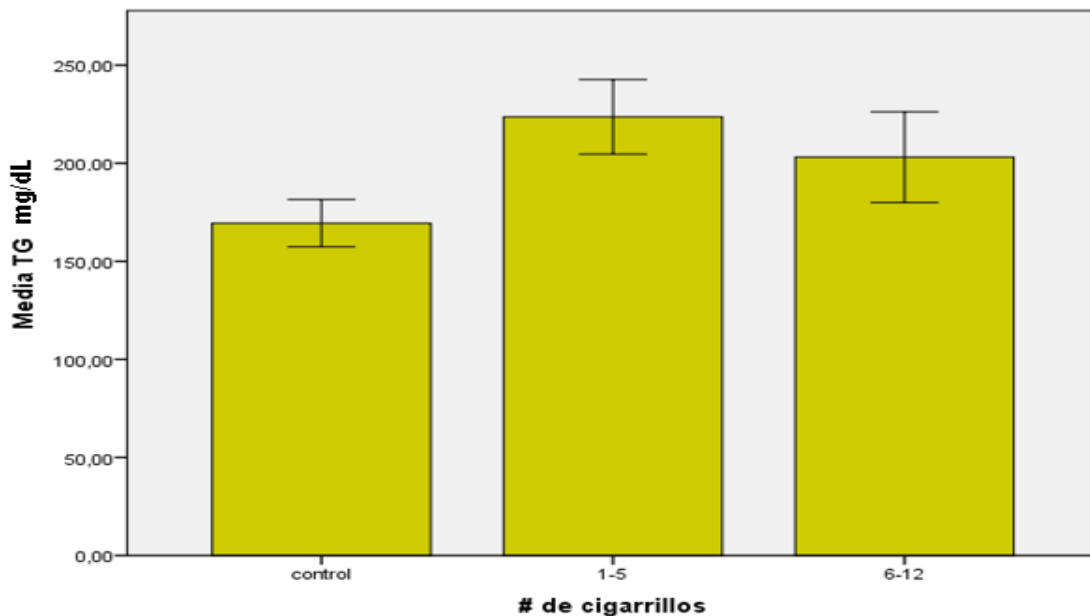


Figura 17. Comparación entre las medias de las concentraciones séricas de triglicéridos ± 1 EEM y el nivel de consumo de cigarrillos por día.

EEM: se refiere al error estándar de la media. **r=** coeficiente de pearson ($p < 0,001$) y prueba post-hoc de Tukey: $p < 0,05$)

Fuente: Autor

3.14. Comparación entre las concentraciones séricas de colesterol HDL y el nivel de consumo de cigarrillos por día

La relación del consumo de cigarrillos/día y el perfil lipídico en el caso del colesterol HDL se pudo observar que no existió diferencia significativa de la concentración promedio de HDL según la figura 18, al comparar el grupo control con el grupo de estudio $p > 0,05$. El grupo que consume de 1-5 cig/día no mostró diferencias estadísticamente significativas con el grupo que consume 6 -12 cig/día (36,59 mg/dL vs 33,34mg/dL), no se pudo aplicar este test para los fumadores de 13-24 cig/día debido a que solo se reportó un caso cuyo valor de HDL fue de 33,9mg/dL. No se presenta una relación lineal significativa entre el número de cigarrillos y el HDL ya que el coeficiente de correlación de Pearson fue de $r = -0,138$ ($p > 0,001$).

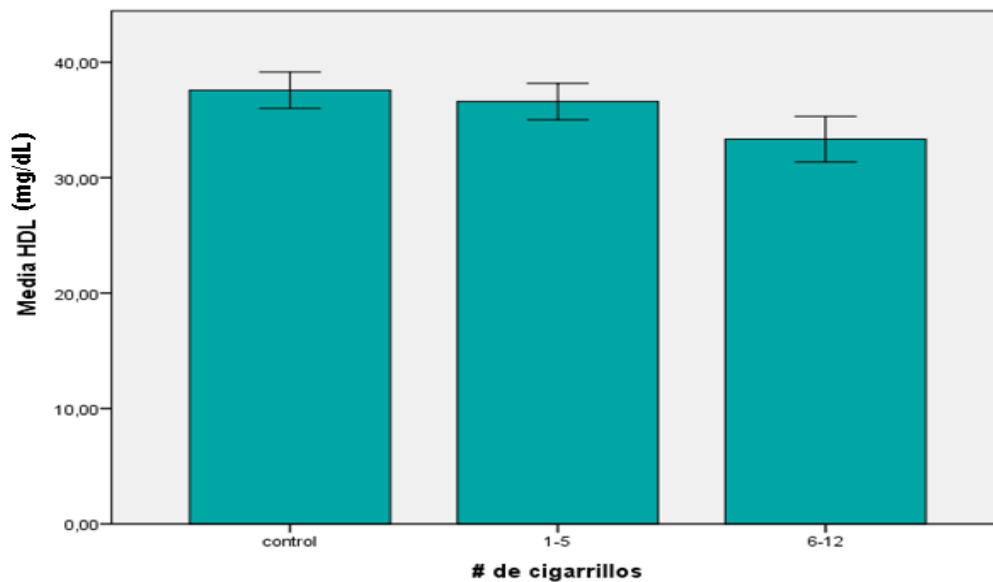


Figura 18. Comparación entre las medias de las concentraciones séricas de colesterol HDL ± 1 EEM y el nivel de consumo de cigarrillos por día.

EEM: se refiere al error estándar de la media. **r=** coeficiente de pearson ($p < 0,001$) y prueba post-hoc de Tukey: $p < 0,05$).

Fuente: Autor

3.15. Comparación entre las concentraciones séricas de colesterol LDL y el nivel de consumo de cigarrillos por día

La relación del consumo de cigarrillos/día y el perfil lipídico en el caso del colesterol LDL, en la figura 19, se puede observar que no existió diferencia significativa de la concentración promedio de LDL, al comparar el grupo control con el grupo de estudio $p > 0,05$. El grupo que consume de 1-5 cig/día no mostró diferencias estadísticamente significativas con el grupo que consume 6-12 cig/día (83,37 mg/dL vs 91,72mg/dL), no se pudo aplicar este test para los fumadores de 13-24 cig/día debido a que solo se reportó un caso cuyo valor de LDL fue de 40,72mg/dL. No se presenta una relación lineal significativa entre el número de cigarrillos y el LDL ya que el coeficiente de correlación de Pearson fue de $r = -0,139$ ($p > 0,001$).

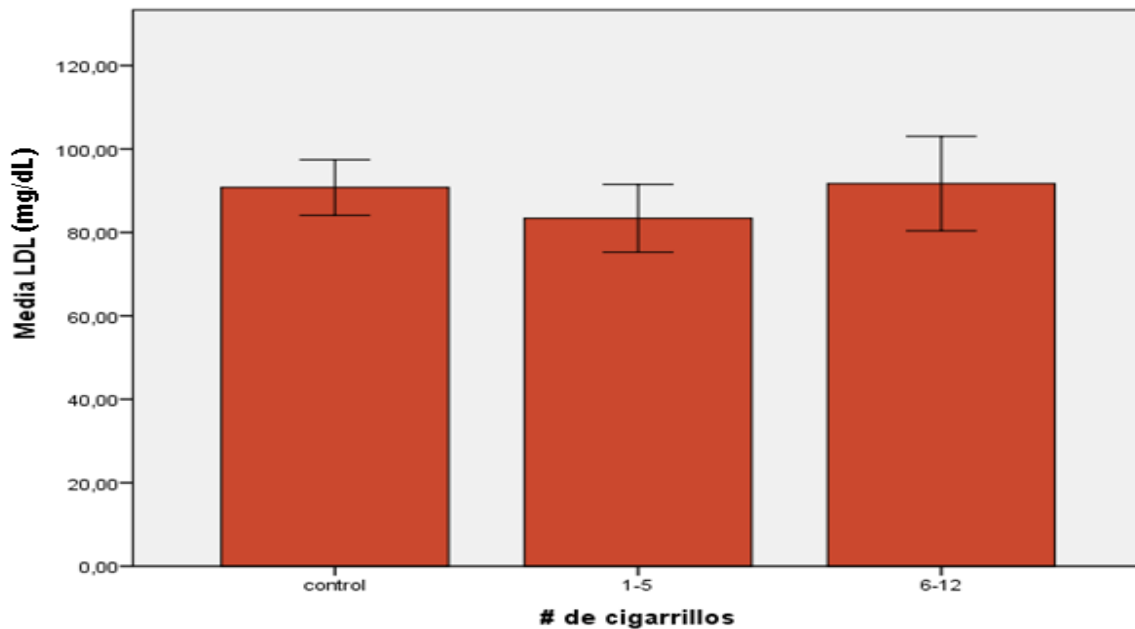


Figura 19. Comparación entre las medias de las concentraciones séricas de colesterol LDL ± 1 EEM y el nivel de consumo de cigarrillos por día.

EEM: se refiere al error estándar de la media. **r=** coeficiente de pearson ($p < 0,001$) y prueba post-hoc de Tukey: $p < 0,05$).

Fuente: Autor



Discusión

El consumo de tabaco en adolescentes y jóvenes muestra un incremento considerable, se estima que aproximadamente a nivel mundial entre 80.000 y 100.000 jóvenes se vuelven adictos al tabaco diariamente (Nachón García Castellano, 2010 & Londoño, 2017). Según el Consejo Nacional de Control de Sustancias Estupefacientes y Psicotrópicas (CONSEP) en el año 2009 la prevalencia de fumadores en los estudiantes universitarios del Ecuador era del 21%, correspondiendo el 72.98% para los hombres y el 27.02% para las mujeres. Se puede comparar esta realidad con otros países de América Latina como Brasil, Bolivia, Colombia, Perú, Chile y en países centroamericanos, cuya ubicación geográfica los posiciona de forma estratégica para ser corredor de distribución de todo tipo de drogas (Sánchez & Pillon, 2011; Gallardo Ulloa y Ramírez Romero, 2012).

El presente estudio concuerda con los datos emitidos por el CONSEP en el 2009, ya que dentro del grupo de estudio el 20% correspondían al sexo femenino y el 80% al sexo masculino, sin embargo en una investigación realizada en España por García del Castillo, Lloret Irlés & Espada Sánchez (2004), analizaron la prevalencia de consumo de tabaco en la población universitaria de la Universidad Miguel Hernández y encontraron una evidente superioridad del porcentaje en la declaración de consumo de cigarrillo en mujeres (66,2%) frente a un (32,4%) en varones. Según el estudio realizado por la Comisión Nacional Antidrogas del Salvador (2010), indica que en los países sudamericanos la percepción del riesgo sobre el consumo de tabaco, varía según la edad y el sexo de esta manera las mujeres perciben mayor riesgo que los hombres, esto explica porque los hombres consumen más que las mujeres y se relaciona con los biomarcadores.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

La mayoría de estudiantes que formaron parte del grupo de estudio consumían de 1 a 5 cigarrillos al día (80%), seguidos de 6 a 12 cigarrillos al día (16.66%) y tan sólo un estudiante indicó que consumía de 13 a 24 cigarrillos al día (3.33%), estos datos se relacionan con los obtenidos en el estudio realizado por Gallardo Ulloa & Ramírez Romero (2012); en el que reportaron que el 44.38% de los estudiantes fumadores de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador consumían de 1 a 3 cigarrillos al día y 15.33% consumían entre 10 a 30 cigarrillos al día. A lo largo de los años el número de cigarrillos consumidos diariamente por los fumadores ha disminuido de manera importante, debido a las campañas para evitar el consumo del tabaco y en gran medida se debe a la Ley de Espacios Públicos Libres de Humo, cuyas normativas limitan el consumo de cigarrillo en lugares públicos.

Para conocer el impacto del consumo de cigarrillo en el organismo del fumador es necesario analizar un marcador biológico que permita reflejar la interacción de una determinada sustancia química sobre un organismo. El biomarcador de exposición al monóxido de carbono procedente del humo del cigarrillo es el %COHb, los no fumadores tienen un %COHb < 1,5% mientras que los fumadores presentan niveles entre el 3 – 15% (Buchelli Ramírez et.al, 2014). En el presente estudio se realizaron dos mediciones de %COHb a cada estudiante, una al inicio y otra al final de la jornada de estudios, con el fin de analizar si se presentaban cambios en las concentraciones de %COHb durante la jornada de estudios que demuestren exposición al CO por el consumo de cigarrillo, puesto que los estudiantes indicaron que fumaban entre los cambios de hora. Los valores de %COHb inicial fueron: $5,87\% \pm 1,35$ en grupo de estudio y $2,61\% \pm 0,95$ en grupo control; mientras que los valores de %COHb final fueron: $7,60\% \pm 1,83$ en grupo de estudio y $2,86\% \pm 1,11$ en grupo control, de esta manera se evidenció el incremento de los valores de %COHb del



UNIVERSIDAD DE CUENCA

grupo de estudio con una tendencia bastante lineal ($p < 0,001$); en el caso del grupo control los valores de %COHb se mantuvieron constantes y dentro de los rangos referenciales con un coeficiente de correlación $p > 0,001$. Mediante el test de Tukey se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de %COHb del grupo control vs. el grupo de estudio $p < 0,05$. Entre las poblaciones del grupo de estudio de acuerdo al número de cigarrillos consumidos al día no se evidenciaron diferencias significativas pero en los fumadores de 1 a 5 cig/día se obtuvo un valor promedio de 5,79% de %COHb inicial y 7,46% de %COHb final; en el grupo de 6 a 12 cig/día el valor promedio fue 6% de %COHb inicial y 8% de %COHb final; visualizándose que al haber incremento en el consumo de cigarrillos también se incrementa la concentración de %COHb; en la investigación sólo un estudiante reportó un consumo de 13 a 24 cig/día cuyos valores fueron 7% de %COHb inicial y 9% de %COHb final, de esta manera se observa que ante una mayor exposición al humo del cigarrillo también hay aumento de la concentración de %COHb por la exposición al CO presente en el humo del cigarrillo.

Los resultados obtenidos son similares a los analizados en estudios similares como el realizado por Arístides Lázaro et.al., (2002) de “Niveles de carboxihemoglobina de fumadores activos y pasivos de un área de atención primaria de salud”, obtuvieron una media 4,57% de COHb en fumadores y de 2,11% de COHb en no fumadores, destacan que observaron correlación entre el número de cigarrillos consumidos y el nivel de %COHb alcanzado por los fumadores, de igual manera en el estudio realizado por Buchelli Ramírez et.al., (2014) de “Niveles elevados de carboxihemoglobina: fuentes de exposición a monóxido de carbono”, obtuvieron una media de 6,4% de %COHb en fumadores y de 2,8% de %COHb en no fumadores e indican que el consumo de tabaco es la causa principal de elevación de los niveles de %COHb.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) ha advertido sobre las trágicas consecuencias que implica la adicción al tabaco; en los fumadores, la inflamación celular producida por el humo de los cigarrillos origina la liberación de radicales libres y peroxidación lipídica, el parámetro que permite establecer de manera directa el daño celular producido por la peroxidación lipídica es el malondialdehído (MDA) (Rodríguez et.al, 2010; Bautista Pérez et.al, 2016).

Resulta difícil establecer un rango normal para la concentración de MDA sérico, se considera un reto para la investigación clínica, esto se debe a que es un metabolito sujeto a modificaciones multicausales como condiciones fisiológicas, patológicas, ritmos circadianos, también varía en poblaciones de diferentes orígenes y del método empleado para su determinación, por lo que seleccionar una muestra de pacientes saludable y representativa de toda una población resulta ser muy difícil y costosa (Khairunnisa, Syaerief & Madanijah, 2016; Espinoza Barzallo & Flores Orellana, 2016).

Los valores obtenidos en la presente investigación fueron $11,03\mu\text{mol} \pm 3,42$ en el grupo de estudio y $3,64 \mu\text{mol} \pm 0,93$ en el grupo control, se pudo apreciar notablemente que los valores de MDA en grupo de estudio eran superiores frente al grupo control, encontrándose diferencias estadísticamente significativas mediante el test de Tukey $p < 0,05$. Entre las poblaciones del grupo de estudio de acuerdo al número de cigarrillos consumidos al día no se evidenciaron diferencias significativas pero en los fumadores de 1 a 5 cig/día se obtuvo un valor promedio de $9,89 \mu\text{M}$ y en el grupo 6 a 12 cig/día el valor promedio fue $14,77\mu\text{M}$ visualizándose que al haber incremento en el consumo de cigarrillos también se incrementó el valor de MDA; en la investigación sólo un estudiante reportó un consumo de 13 a 24 cig/día cuyo valor de MDA fue $17,49\mu\text{M}$ de esta manera se observó que ante una mayor exposición al humo del cigarrillo incrementaron los valores de



UNIVERSIDAD DE CUENCA

MDA. Estos resultados se asemejan a los obtenidos en el estudio de Espinoza Barzallo & Flores Orellana (2016), que realizaron determinaciones de MDA en estudiantes universitarios fumadores y los resultados que obtuvieron fueron $10,74 \mu\text{mol} \pm 3,17$ en fumadores y $3,52 \mu\text{mol} \pm 1,11$ en no fumadores, la aproximación en los valores obtenidos entre estos estudios puede deberse a que tanto las condiciones como las poblaciones fueron similares, los dos estudios se llevaron a cabo en estudiantes universitarios de diferentes universidades de la ciudad de Cuenca. Según Rodríguez et.al (2010), realizaron la determinación de los niveles de MDA, mediante TBARS; y obtuvieron los siguientes valores $0,99 \pm 0,60 \mu\text{M/l}$ en No fumadores; $1,56 \pm 0,50 \text{ mm/l}$ en Fumadores ocasionales y $1,37 \pm 0,24 \text{ mm/l}$ Fumadores diarios, con diferencias estadísticamente significativas entre no fumadores y fumadores ocasionales. A pesar que la clasificación de los individuos no fue similar a la del presente estudio los investigadores también indican que los valores más elevados de MDA fueron en fumadores vs los no fumadores.

En las investigaciones de diferentes autores en fumadores no se ha realizado la comparación de los valores de MDA con el %COHb, los estudios más frecuentes analizan los valores de MDA y los valores de óxido nítrico (NO) como indicadores del perfil oxidativo; según Silva Paredes et.al., (2017), en su estudio titulado Aumento del malondialdehído y óxido nítrico en pacientes con EPOC, obtuvieron valores de MDA promedio de $0,99 \pm 0,44 \text{ mM}$, con diferencias estadísticamente significativas entre Grupo control ($0,85 \pm 0,34 \text{ mM}$) vs Grupo EPOC estables ($1,16 \pm 0,59 \text{ mM}$) y con valores de óxido nítrico promedio de ($41,87 \pm 6,34 \text{ mM}$) presentando diferencias estadísticamente significativas entre Grupo control ($37,17 \pm 2,65 \text{ mM}$) vs EPOC estable ($42,93 \pm 6,37 \text{ mM}$) y Grupo control vs EPOC exacerbado ($45,50 \pm 6,15 \text{ mM}$).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

En el presente estudio se compararon los valores de MDA con el %COHb, se obtuvo una alta correlación entre %COHb inicial y %COHb final en el grupo de estudio $p=0,671$ a diferencia del grupo control donde se obtuvo una baja correlación $p=0,154$.

El valor de la concentración de MDA y %COHb depende de la exposición a CO, la COHb es inestable y su vida media es muy corta, esto pudo evidenciarse al comparar la concentración de MDA con el %COHb inicial que tienen una correlación baja $p=0,179$, sin embargo en la encuesta realizada los estudiantes indicaron que durante horas tarde era el momento en que consumían más cigarrillos, por lo que se observó que la concentración de MDA presentó una correlación media con el %COHb final $p=0,209$.

El grupo control mostró correlación baja entre la concentración de MDA y los %COHb inicial ($p=0,191$) y final ($p=0,103$), pudiendo explicarse a que no se encontraban expuestos de forma directa a fuentes de CO como en el caso del grupo de estudio.

Los fumadores jóvenes generalmente se convierten en adictos antes de llegar a la edad adulta, de acuerdo al consumo de tabaco se incrementa el riesgo de desarrollo de accidentes cerebrovasculares. El consumo de tabaco afecta a varios factores de riesgo cardiovascular, se asocia al incremento de los niveles de lipoproteínas y lípidos en plasma (triglicéridos, colesterol) así como alteraciones estructurales de las lipoproteínas, que derivan en la aparición y desarrollo de aterosclerosis y sus complicaciones (García Donaire, 2016).

Los efectos tóxicos del tabaco son diversos, los más comunes son los trastornos del metabolismo de los lípidos y el daño directo en el endotelio, las sustancias oxidantes presentes en el humo del cigarrillo y los radicales libres ocasionan la peroxidación lipídica originando LDL oxidadas que activan a los macrófagos para que generen una respuesta inflamatoria. Actualmente se sabe que el



UNIVERSIDAD DE CUENCA

perfil lipídico está alterado en sujetos fumadores, por lo que es importante el estudio del lípidograma para detectar prematuramente o prevenir afecciones como dislipidemias, síndrome metabólico, aterosclerosis, entre otras, que ayudan al médico a brindar tratamientos oportunos y concientizar al fumador de los graves riesgos para que deje de fumar (Gorbachev et.al, 2006; Riesco Miranda J. A., & Serranilla Sánchez M. 2010).

En el presente estudio no se presentaron diferencias significativas en los valores del perfil lipídico entre estudiantes del grupo de estudio y los del grupo control, sin embargo los valores de triglicéridos a nivel general se encontraron elevados pudiendo influir el tipo de alimentación, el estilo de vida, entre otros factores. Los resultados en los estudiantes del grupo control fueron los siguientes valores promedio TG: 149,40 mg/dL ; HDLc: 35,85 mg/dL; LDLc: 74,50 mg/dL; mientras que en estudiantes del grupo de estudio de 1 a 5 cig/día se obtuvo un valor promedio de TG: 223,61 mg/dL ; cHDL: 36,59 mg/dL; cLDL: 83,37 mg/dL; en el grupo que consumía de 6 - 12 cig/día un valor promedio de TG: 203,10 mg/dL ; cHDL: 33,34 mg/dL ; cLDL: 91,72 mg/dL ; sólo se reportó un estudiante que consumía de 13-24 cig/día y los resultados fueron TG: 307,4mg/dL; cHDL: 33,9 mg/dL; cLDL: 40,72 mg/dL. Se pudo apreciar que los valores del perfil lipídico se encontraron alterados a nivel general en los estudiantes universitarios, sin embargo se observó un ligero incremento en los valores de TG y LDL colesterol en el grupo de estudio, al tratarse de una población joven el perfil lipídico se pudo afectar por diversos elementos como los hábitos alimenticios que se asocian al consumo de comida chatarra, falta de ejercicio y hábitos sociales como el alcohol y el tabaco intervienen como factores negativos en la salud de los estudiantes. Según Gorbachev et.al., (2006) de “Prevalencia de dislipidemia en los fumadores que acuden a un programa de ayuda para dejar de fumar”, en el cual los resultados del perfil de lípidos de población estudiada de fumadores (población joven) se encontraron alterados, los niveles de



UNIVERSIDAD DE CUENCA

colesterol total y triglicéridos se presentaron elevados y los niveles de HDL-colesterol disminuidos (C total 204 ± 44 mg/dL, TG 208 ± 155 mg/dL y HDL 46 ± 14 mg/dL) y con una relación CT/HDL mayor de 4. Según Masson et.al., (2009) en su estudio “Influencia del tabaquismo en los niveles plasmáticos de lípidos y apolipoproteínas en una población sana”, concluyeron que los fumadores presentaron niveles más bajos de C-HDL (47 ± 10 vs. 52 ± 17 mg/dL, $p < 0.05$) y ApoA-1 (155 ± 25 vs. 165 ± 33 mg/dL, $p < 0.05$) que el grupo de no fumadores. Por otro lado, no obtuvieron diferencias significativas entre los niveles plasmáticos de triglicéridos (125 ± 92 contra 100 ± 77 mg/dL, $p = 0.77$), ApoB (92 ± 29 contra 95 ± 26 mg/dL, $p = 0.37$), C-LDL (125 ± 37 contra 122 ± 35 mg/dL, $p = 0.82$), colesterol total (197 ± 42 contra 194 ± 41 mg/dL, $p = 0.64$) y en la relación ApoB/ApoA-1 (0.60 ± 0.2 contra 0.57 ± 0.2 , $p = 0.54$) al comparar los grupos de tabaquistas y no tabaquistas.



Conclusiones

El estudio se realizó en estudiantes de la Facultad de Agronomía, Silvicultura, Pesca y Veterinaria, de la Universidad Católica de Cuenca, divididos en dos grupos: (n=30) estudiantes universitarios fumadores activos considerados como el grupo de estudio y (n=28) estudiantes no fumadores a los que se les consideró como grupo control. Los resultados obtenidos evidenciaron la alteración de los valores de biomarcadores en el grupo de estudio referente al grupo control, de esta manera se pudo observar que la exposición al CO presente en el humo del cigarrillo afecta la salud de los estudiantes que conformaron el grupo de estudio.

- ❖ Los valores de los biomarcadores estudiados %COHb y MDA (umol/l) presentaron diferencias significativas entre el grupo de estudio y el grupo control ($p < 0,001$).
- ❖ El biomarcador de estrés oxidativo MDA presentó un incremento significativo de la concentración promedio de MDA sérico, al comparar el grupo control con el grupo de estudio $p < 0,05$. El incremento que se presentó tiene una tendencia bastante lineal con un coeficiente de correlación elevado $r = 0,749$ ($p < 0,001$), por tanto se evidencia la exposición a radicales libres por consumo de cigarrillo.
- ❖ Se realizaron dos mediciones del biomarcador de exposición al monóxido de carbono (%COHb), inicio y final de la jornada de estudios. El %COHb inicial mostró un incremento significativo, al comparar el grupo control con el grupo de estudio ($p < 0,05$). El incremento que se presentó tiene una tendencia bastante lineal con un coeficiente de correlación elevado $r = 0,749$ ($p < 0,001$). Por otro lado, el %COHb final presentó un incremento significativo, al comparar el grupo control con el grupo estudio ($p < 0,05$). El incremento



UNIVERSIDAD DE CUENCA

que se presentó tiene una tendencia bastante lineal con un coeficiente de correlación elevado $r = 0,787$ ($p < 0,001$).

- ❖ Se obtuvo una correlación significativa ($p < 0,001$), entre las variables del grupo de estudio al comparar los valores de %COHb inicial y final, lo que evidencia una tendencia a subir estos valores debido a la exposición de este grupo al CO por el consumo de cigarrillo, a diferencia del grupo control que no presentó una correlación significativa ($p > 0,001$). entre los valores de %COHb inicial y final

Los valores del perfil lipídico (Triglicéridos, LDL, HDL) en general no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de estudio y el grupo control.

- ❖ Respecto a la relación del consumo de cigarrillos/día y los triglicéridos (TG) se observó que hubo un incremento medianamente significativo de la concentración promedio de TG, al comparar el grupo control con el grupo de estudio. El incremento mostró una tendencia relativamente lineal con un coeficiente de correlación medio $r = 0,261$ ($p < 0,001$).
- ❖ La relación del consumo de cigarrillos/día y colesterol HDL no presentó incremento significativo de la concentración promedio de HDL, al comparar el grupo control con el grupo de fumadores. No se evidenció relación lineal significativa entre el número de cigarrillos y el HDL $r = -0,138$ ($p > 0,001$).
- ❖ En el caso del colesterol LDL en relación con el consumo de cigarrillos/ se pudo observar que no existió diferencia significativa de la concentración promedio de LDL, al comparar el grupo control con el grupo de estudio. No se presentó relación lineal significativa entre el número de cigarrillos y el LDL $r = -0,139$ ($p > 0,001$).



Recomendaciones

- Se recomienda realizar estudios similares con determinaciones de MDA sérico y %COHb en trabajadores de Control Vehicular, EMOV, para valorar estos marcadores de exposición y de efecto debidos al monóxido de carbono, principal contaminante por el humo de los escapes vehiculares, Electromecánicas y Mantenimiento de Vehículos Pesados y Livianos.
- Es necesario realizar nuevos controles de exposición a CO por el hábito de fumar a la población universitaria, a pesar de las normativas vigentes que prohíben el consumo de cigarrillo en los espacios públicos, sin embargo existe consumo en los espacios abiertos en los recintos universitarios.
- Ampliar el presente estudio con el análisis de otros biomarcadores de exposición a los tóxicos presentes en el humo del cigarrillo y analizar las enfermedades metabólicas asociadas al hábito de fumar que afectan a la población actual.
- Se deben considerar otras mediciones de colesterol LDL, HDL, Triglicéridos, para determinar la posible relación y variación con ciertos hábitos alimenticios y sedentarismo, etc.



Referencias bibliográficas

1. Arroyave Hoyos , C. L., Cuesta González, F., Wilches, N., Álvarez, D. L., & Cornejo, J. W. (2012). *Asociación entre las concentraciones de malondialdehído (MDA) y las alteraciones neurológicas en personas expuestas ocupacionalmente a mercurio*. *Revista Ciencias de la Salud*, 10(Especial), 17-28.
2. Almeida da Silva, L., Cruz Robazzi, M., & Terra, F. (2013). *Asociación entre accidentes de trabajo y los niveles de carboxihemoglobina en trabajadores moto-taxistas*. *Revista Latinoamericana Enfermagem*, 21(5), 1119 - 1126.
3. Alves, R., Castro Esteves, T., & Trelles, M. A. (2013). *Factores intrínsecos y extrínsecos implicados en el envejecimiento cutáneo*. *Revista de Cirugía Ibero latinoamericana*, 39(1), 89-102.
4. Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). *Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección*. *Revista Atenea Concepción* 494,161-172.
5. Ballén, M. A., Jagua Gualdrón, A., Álvarez, D. L., & Rincón , A. (2006). *EL CIGARRILLO: IMPLICACIONES PARA LA SALUD*. *Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia*, 54(3),191-205.
6. Barrientos-Gutiérrez, T., Valdés-Salgado, R., Reynales-Shigematsu, L., Navas-Aclen, A., & Lazcano-Ponce, E. (2007). *Exposición involuntaria al humo de tabáco en lugares públicos de la Ciudad de México*. *Salud Pública de México*, 49(Supl.2), 205-212.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

7. Bautista Pérez, F., Gómez Zetino, V., Aguilar de Mendoza, A., Herrador Vargas, M., & Alfaro Ramos, A. (2016). *Estudio de prevalencia de consumo de tabaco en estudiantes universitarios*. Salvador: UEES.
8. Bello, S., Michalland, S., Soto, M., Contreras, C., & Salinas, J. (2005). *Efectos de la exposición al humo de tabaco ambiental en no fumadores*. *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias*, 21(3), 179-192.
9. Bolaños Morera, P., & Chacón Araya, C. (2017). *Intoxicación por monóxido de carbono*. *Medicina Legal de Costa Rica*, 34(1), 137-146.
10. Bravo Medina, M., & Mora Ortega, S. (2016). *Determinación de carboxihemoglobina al inicio y final de jornada diurna en vendedores de kioskos en el area de embarque del terminal terrestre de cuenca*. Cuenca, Ecuador.
11. Buchelli Ramírez, H., Fernández Álvarez, R., Rubinos Cuadrado, G., Martínez González, C., Rodríguez Jerez, F., & Casan Clara, P. (2014). *Niveles elevados de carboxihemoglobina: fuentes de exposición a monóxido de carbono*. *Revista Archivos de Bronconeumología*, 50(11),465-468.
12. Cadavid Mora, L., Coral Carrillo, K., & Castillejo Pons, P. (2016). *Validación de un método de cuantificación de carboxihemoglobina y su aplicación en grupos vulnerables de Quito (Ecuador)*. *Revista de Higiene y Sanidad Ambiental*, 16(4),1477-1482.
13. Calle Vela, E., & Melgarejo Pomar, I. (2005). *Oxidantes en el humo del cigarrillo y enfermedad cardiopulmonar*. *Revista Cuadernos Hospital de Clínicas*, 50(1), 88-92.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

14. Castellano, P., & Londoño, C. (2017). *Identidad de consumo y riesgo percibido en fumadores adolescentes universitarios*. Revista de Psicología Universidad de Antioquia, 9(1), 11-30.
15. CELL BIOLABS, INC. (2012). *OxiSelect™ TBARS Assay Kit (MDA Quantitation)*. San Diego, California.
16. Céspedes Miranda, E., & Castillo Herrera, J. (2008). *La peroxidación lipídica en el diagnóstico del estrés oxidativo del paciente hipertenso. ¿Realidad o mito?*. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 27(2), 1-13.
17. Chacón Cuberos, R., Castro Sánchez, M., Caracuel Cáliz, R., Padial Ruz, R., Collardo Fernández, D., & Zurita Ortega, F. (2016). *Perfiles de consumo de alcohol y tabaco en adolescentes andaluces de primer ciclo de educación secundaria*. Revista Health and Addictions, 16(2), 93-104.
18. Chávez Domínguez, R. C. (2010). *Tabaquismo. La naturaleza causal pide respeto*. Revista Archivos de Cardiología de México, 80(4), 318-324.
19. Comisión Nacional Antidrogas. (2010). *Segundo estudio nacional sobre consumo de sustancias psicoactivas en población escolar de El Salvador, SIDUC 2008*. San Salvador, El Salvador.
20. Córdova Izquierdo, A., Saltijeral Oaxaca, J., Ruiz Lang, G., Xolalpa Campos, V., Cortés Suarez, S., Peña Betancourt, S., Córdova Jiménez, C., Córdova Jiménez, M., Méndez Mendoza, M., Huerta, C., Juárez Mosqueada, M., Guerra Liera, J. (2010). *Estrés oxidativo en gametos*. Revista Electrónica de Veterinaria, 11(7), 1-32.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

21. Coronado, M., Vega y León, S., Gutierrez, R., Vázquez, M., & Radilla, C. (2015). *Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana*. Revista Chilena de Nutrición, 42(2), 206-212.
22. Corrales, L., & Muñoz Ariza, M. (2012). *Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno*. Nova, 10(18), 213-225.
23. De Vito, E. L., & Rojas, R. A. (2005). *El humo ambiental de tabaco*. Revista de Medicina (Buenos Aires), 65, 545-549.
24. Delgado Olivares, L., Betanzos Cabrera, G., & Sumaya Martínez, M. (2010). *Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo*. Investigación y Ciencia, 18 (50), 10-15.
25. Delgado Roche, L., Fraga Pérez, A., Bécquer Viart, M., Fernández Sánchez, E., & Vázquez López, A. (2011). *Marcadores sistémicos de peroxidación lipídica en ratas Sprague Dawley tratadas con Lipofundin 20%*. Revista Química Viva, 3(10), 205-213.
26. Diaz Valencia, P. A. (2010). *Evaluación de los efectos del tabaquismo y la contaminación ambiental en la función pulmonar de adultos*. Medellín, Colombia.
27. Elejalde Guerra, J. (2001). *Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes*. Anales de Medicina Interna (Madrid), 18(6), 50-59.
28. Espinoza Barzallo, D. F., & Flores Orellana, J. L. (2016). *Niveles séricos de malondialdehído como marcador biológico del estrés oxidativo en estudiantes fumadores activos de la carrera*



UNIVERSIDAD DE CUENCA

de bioquímica y farmacia de la facultad de ciencias químicas de la universidad de cuenca.

Cuenca, Ecuador.

29. Fagali, N. (2011). *Peroxidación de diferentes especies lipídicas: Efecto de antioxidantes*. Buenos Aires, Argentina.
30. Fernández Guerrero, M., Muñoz Calero, B., García Rubira, J., & López García, V. (2010). *Tabaco y corazón. Programas actuales del control del hábito*. Revista Clínica e Investigación en Arteriosclerosis, 22(4), 167-173.
31. Fernandez Hidalgo, L. (2014). *Tabaco como factor de riesgo en el cáncer de pulmón*. España.
32. Fernandez, J. M., Da Silva-Grigoletto, M. E., & Túnez-Fiñana, I. (2009). *Estrés oxidativo inducido por el ejercicio*. Revista Andaluza de Medicina del Deporte, 2(1),19-34.
33. Ferreira Panaino, E., Baldini Soares, C., & Sivalli Campos, C. (2014). *Contexto del inicio del consumo de tabaco en lo diferentes grupos sociales*. Revista Latinoamericana Enfermagem, 22(3), 379-385.
34. Franco Ruiz, D., & Moure Varela, A. (2010). *Antioxidantes naturales. Aspectos saludables, toxicológicos y aplicaciones industriales*. Santiago de Compostela, España: Gráficas Garabal, S.L.
35. Freire de Freitas, R., Moura de Araujo, M., Soares Lima, A., Rodrigues Pereira, D., Garcia Alencar, A., & Coelho Damasceno, M. (2013). *Análisis del perfil lipídico en una población de estudiantes universitarios*. Revista Latino-Americana Enfermagem, 21(5), 09 pantallas.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

36. Gallardo Ulloa, F., & Ramírez Romero, J. (2012). *Asociación entre "craving" por consumo de tabaco y dependencia a la nicotina, en estudiantes fumadores de la Pontificia Universidad del Ecuador*. Quito-Ecuador.
37. Gamboa Aboado, R., & Rospigliosi Benavides, A. (2010). *Más allá de la hipertensión arterial*. Revista Acta Médica del Perú, 27(1), 45-52.
38. García del Castillo, J., LLoret Irlles, D., & Espada Sánchez, J. (2004). *Prevalencia del consumo de tabaco en población universitaria*. Revista de Salud y drogas, 4(1), 19-38.
39. García Donaire J.A. (2016). *Jóvenes: factores de riesgo cardiovascular*. España: Advantia, Comunicación Gráfica, S.A
40. García Pacheco, A. (2014). *Evaluación de la Terapia Pránica como tratamiento del Tabaquismo. 2013-2014*. Cuenca.
41. García, S. (2011). *Guía de prevención, diagnóstico, tratamiento y vigilancia epidemiológica de las intoxicaciones por monóxido de carbono*. Argentina: Printing shop S.R.L.
42. González Torres, M., Betancourt Rule, M., & Ortiz Muñiz, R. (2000). *Daño Oxidativo y Antioxidantes*. Bioquímica, 25(1), 3-9.
43. Gorbachev, D., Ramírez Venegas, A., Mayar Maya, M., Sansores, R., Guzmán Barragán, A., & Regalado, J. (2006). *Prevalencia de dislipidemia en los fumadores que acuden a un programa de ayuda para dejar de fumar*. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, 19(2), 102-107.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

44. Guerrero López, C. M., Muños Hernández, J. A., Sáenz de Miera, J.B., & Reynales Shigematsu, L. M. (2013). *Consumo de tabaco, mortalidad y política fiscal en México*. Revista Salud Pública de México, 55(2), S276-S281.
45. Gutiérrez Maydata, A. (2003). *Oxidantes en el humo del cigarro y enfermedades cardiopulmonares*. Revista Cubana de Medicina 42(5).
46. Gutiérrez Salinas, J., García Ortiz, L., Chima Galán, M., Suástegui Domínguez, S., Rivera Badillo, M., & Cruz Tovar, L. (2009). *Determinación de la concentración de malondialdehído y la actividad de enzimas antioxidantes en eritrocitos*. Revista Mexicana de Patología Clínica, 56(4), 223-234.
47. Gutiérrez, A. M. (2015). *Composición de ácidos grasos y peroxidación lipídica de mitocondrias y microsomas aislados de hígado, corazón y cerebro de aves de diferentes especies: relación con el tamaño corporal*. Buenos Aires, Argentina.
48. Gutiérrez Abejón, E., Rejas Gutiérrez, J., Criado Espejel, P., Campo Ortega, E., Breñas Villalón, M., & Martín Sobrino, N. (2015). *Impacto del consumo de tabaco sobre la mortalidad en España en el año 2012*. Revista de Medicina Clínica de Barcelona, 145(12), 520-525.
49. Heart & Vascular Institute. (2018). *Enfermedad Vascular Periférica*. Washington, Estados Unidos.
50. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. (2013). *Ficha Internacional de Seguridad Química: Monóxido de Carbono*.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

51. Jimenez Ruiz, C., Granda Orive, J., Solano Reina, S., Carrión Valero, F., Romero Palacios, P., & Barrueco Ferrero, M. (2003). *Recomendaciones para el tratamiento del tabaquismo*. Archivos de Bronconeumología, 39(11), 514-523.
52. Khairunnisa, N., Syarief, H., & Madanijah, S. (2016). *Association Between Smoking Habits, Physical Activity Added Sugar Consumption and Nutritional Status with Malondialdehyde (MDA) and Glucose Levels in Adults*. Pakistan Journal of Nutrition: 15(5), 439-445.
53. La Pontificia Universidad Javeriana. (2009). *Caracterización del consumo de cigarrillo en la comunidad Universitaria de La Pontificia Universidad Javeriana 2008-2009*. Bogotá, Colombia.
54. Lagos Grisales, G., Cediell Collazos, V., & Villegas Rojas, S. (2012). *Especies reactivas de oxígeno y respuesta antioxidante en pacientes VIH positivos y donantes voluntarios de sangre, Pereira, Colombia, 2007-2009*. Revista Médica de Risaralda, 18 (1), 54-63.
55. Lahoz, C., & Mostaza, J. (2007). *La aterosclerosis como enfermedad sistémica*. Revista Española de Cardiología, 60(2), 184-195.
56. Lanas, F., & Serón, P. (2012). *Rol del tabaquismo en el riesgo cardiovascular global*. Revista Médica Clínica Condes, 23(6), 699-705.
57. Lando, H., Hipple B., Muramoto M, Klein J., Prokhorov A., Ossip D. & Winickoff J. (2010). *El tabaco es un problema que afecta a los niños en el mundo entero*. Boletín de la Organización Mundial de la Salud, 88, 1-80.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

58. Lekuona Goya, I., Salcedo Arruti, A., Morillas Bueno, M., & Umaran Sánchez, J. (2009). *Tacaco y enfermedad arterial no coronaria. Intervenciones para el abandono del hábito tabáquico*. Revista Española de Cardiología, 9(D) 39-48.
59. Londoño Pérez, C., Rodríguez Rodríguez, I., & Gantiva Díaz, C. (2011). *Cuestionario para la clasificación de consumidores de cigarrillo (C4) para jóvenes*. Diversitas: Perspectivas en Psicología, 7 (2), 281-291.
60. López, M., Mongilardi, N., & Checkley, W. (2014). *Enfermedad pulmonar obstructiva crónica por exposición al humo de biomasa*. Revista Peruana de Medicina y Salud Pública, 31(1), 94-99.
61. López Tricas, J.M. (2011). *Grupo Hemo: síntesis y bioquímica*. Zaragoza, España
62. Maldonado Saavedra, O., Nahúm Jiménez, E., Bernabé Guapillo, M., Ceballos Reyes, G., & Méndez Bolaina, E. (2010). *Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas*. Revista Médica de la Universidad Veracruzana, 33-39.
63. Mañon Rossi, W., Garrido, G., & Núñez Sellés, A. (2016). *Biomarcadores del estrés oxidativo en la terapia antioxidante*. Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research, 4(2), 62-83.
64. Martín Ruiz, A., Rodríguez Gómez, I., Rubio, C., & Hardisson, A. (2004). *Efectos tóxicos del tabaco*. Revista de toxicología, 21(2-3), 64-71.
65. Masson, W., Krauss, J., Siniaswski, D., Sorroche, P., Casañas, L., Scordo, W., Bluro, I., & Cagide, A. (2009). *Influencia del tabaquismo en los niveles plasmáticos de lípidos y*



UNIVERSIDAD DE CUENCA

- apolipoproteínas en una población sana*. Revista de Bioquímica y Patología Clínica, 73(3), 40-44.
66. McRobbie, H., & Thornley, S. (2008). *La importancia de tratar la dependencia tabáquica*. Revista Española de Cardiología, 61(6), 620-628.
67. Melgarejo Pomar, I. G., Balanza Erquicia, E., Torrez Colmena, L., Quisberth Barrera, S. & Suzaño Vargas, P. L. (2017). *Concentración de malondialdehído en sujetos que residen a gran altitud: estudio exploratorio*. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, 34(4), 677-681.
68. Morán Chorro, I., Baldirà Martínez de Irujo, J., Marruecos – Sant, L., Nogué Xarau, S. *Toxicología Clínica* (págs. 311-321). Madrid, España: Difusión Jurídica y Temas de Actualidad S.A.
69. Moreno, I., Artieda, O., Vicente, R., Zarragoikoetxea, I., Vicente, J., & Barberá, M. (2014). *Evaluación de las mediciones de hemoglobina no invasiva con el dispositivo Masimo Radical 7 en un paciente portador de oxigenación extracorpórea de membrana*. Revista Española de Anestesiología y Reanimación, 61(7), 388-391.
70. Muñoz Guerrero, B. A. (2014). *Tabaquismo y las alteraciones hemodinámicas en mecánicos y operarios agremiados a la asociación interprofesional de el oro, primer semestre 2014*. Machala, Ecuador.
71. Muñoz Tébar, G. (2010). *El tabaco como factor de riesgo cardiovascular*. Avances de Cardiología, 30(1), 38-42.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

72. Murray R. K., Granner D. K, & Rodwell V. W. (2007). Harper. *Bioquímica Ilustrada*. México D.F., México: Editorial El Manual Moderno S.A. Décima séptima edición.
73. Nachón García, M., García Rivera, M., Nachón García , F., Hernández Parra, T., & Hernández Lira, G. (2010). *Tabaquismo y cáncer bucal: una revisión teórica*. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 30-37.
74. Navarro, C. L. (2005). *Manual de Técnicas de toma de muestra para exámenes de laboratorio*. Valparaiso, Chile.
75. Nuñez Naranjo, R. R. (2015). *Determinación de los niveles de carboxihemoglobina y repercusión en la salud de los trabajadores del botadero municipal de la Ciudad de Ambato*. Ambato, Ecuador.
76. Organización Mundial de la Salud. (2015). *Informe OMS sobre LA EPIDEMIA MUNDIAL DE TABAQUISMO, 2015*. Suiza.
77. Orobio Quiñones, A., & Claire Berrouet, M. (2016). *Intoxicación por monóxido de carbono: Un evento a sospechar en el servicio de urgencias*. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud Universidad del Cauca*, 18(1), 18-24.
78. Pérez Cruz , N., Pérez Cruz , H., & Fernandez Manchón , E. (2007). *Nicotina y Adicción: Un Enfoque Molecular del Tabaquismo*. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 6 (1).
79. Pérez Gastell, P., & Pérez de Alejo, J. (2000). *Métodos para medir el daño oxidativo*. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 29(3), 192-198.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

80. Pérez H., Nóbrega D., Aular Y., Núñez C., Pereira K. & Gómez M. E. (2015). *Niveles de plomo en sangre, malondialdehído y vitaminas antioxidantes en escolares*. Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud Universidad de Carabobo, 19(1), 12-19.
81. Qui-Zapata, J. A., Peña Rodríguez, L. M., Castro Concha, L. A., & Miranda Ham, M. L. (2010). *Peroxidación Lipídica como marcado de muerte celular en cultivos celulares de Cempasúchil(Tagetes erecta L.)*. Revista Mexicana de Fisiopatología, 28(2), 165-167.
82. Ramírez , P., & Rodríguez, M. F. (2012). *Alteraciones en la superficie ocular y en la película lagrimal en fumadores activos*. Revista Ciencia y Tecnología para Salud Visual y Ocular, 10(2), 23-33.
83. Ramírez Prieto, M. T., García Río, F., & Villamor, J. (2006). *Papel del estrés oxidativo en las enfermedades respiratorias y su monitorización*. Revista de Medicina Clínica de Barcelona, 127(10), 386-396.
84. Ridolfi, A. & Álvarez G. (2014). *Monóxido de Carbono - Ácido cianhídrico y Cianuros alcalinos*. Buenos Aires, Argentina.
85. Riesco Miranda J. A., & Serranilla Sánchez M. (2010). *Tabaco y lípidos: una asociación que incrementa el riesgo de enfermedad cardiovascular*. Revista de Patología Respiratoria, 13(3), 112-113.
86. Ríos Díaz, D. S., (2011). *Validación del Método para determinación de carboxihemoglobina en sangre total por técnica espectrofotométrica con reducción con ditionito de sodio*. Bogotá, Colombia.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

87. Rodríguez, M., Fernández, Y., Marrero, S., Aular, Y., Moscoso, M., Peña, K., Rodríguez, J. (2010). *Capacidad respiratoria, niveles de Vitamina C y Malonilaldehído en estudiantes de bioanálisis fumadores y no fumadores*. Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, 41(1).
88. Rosas, R. (2014). *Riesgo Toxicológico del Monóxido de carbono en el ambiente laboral de la Empresa Consorcio Revisión Vehicular Daton-Cuenca*. Cuenca, Ecuador.
89. Ruibal Brunet, I. J. (2012). *Aciertos y debilidades del control internacional del tabaco*. Revista Cuba Tabaco, 13(1), 56-68.
90. Ruiz Jiménez, M. A. (2003). *Factores de riesgo cardiovascular en niños y adolescentes*. España: Ediciones Díaz de Santos, S.A.
91. Salazar Lugo, R., Lozada, U., Rosales, M., Astudillo, H., Prin, J., Rojas de Astudillo, L., Tróccoli L., & Lemus, M. (2015). *Metales pesados y su relación con marcadores de estrés oxidativo en fumadores crónicos*. Revista de Salud Ambiental, 15(2), 88-95.
92. Sánchez Hernández, C. M., & Pillon, S. C. (2011). *Tabaquismo entre universitarios: caracterización del uso en la visión de los estudiantes*. Revista Latino-Americana Emfermagem, 19(spe), 730-737.
93. Sánchez Hernández, E., & Fernández Seara, J. (2005). *Hepatopatía alcohólica*. Revista Española de Enfermedades Digestivas, 97(7), 530



UNIVERSIDAD DE CUENCA

94. Sánchez, I., Torres, V., Moreno, O., & Rodríguez, A. (2011). *Determinación del estrés oxidativo mediante peroxidación lipídica en cristalinos humanos con cataratas*. Revista de la Facultad de Medicina, Universidad de los Andes, 20(1), 42-45.
95. Sandoya, E. (2011). *Impacto del tabaquismo y del humo de segunda mano en la salud cardiovascular*. Revista Uruguaya de Cardiología, 26(3), 207-213.
96. Sanz Parras, F. J. (2016). *Biomarcadores de daño renal temprano*. Salamanca, España.
97. Souki, A., Cano, C., Mengual, E., García, D., Torres, D., Almarza, J., Urdaneta Y., Chávez Z., Molero E., Medina M. & Amell, A. (2007). *Marcadores Biológicos de Estrés Oxidativo*. Revista Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica, 6(2), 92-97.
98. Suzaño Vargas, P. L. (2014). *Estandarización de métodos espectrofotométricos para la determinación de Malondialdehído y Carboxihemoglobina en estrés oxidativo*. La Paz, Bolivia.
99. Téllez, J., Rodríguez, A., & Farardo, Á. (2006). *Contaminación por monóxido de carbono: Un problema de Salud Ambiental*. Revista de Salud Pública, 8(1), 108-117.
100. Universidad Nacional Autónoma de México (2006). Radicales libres y antioxidantes. México, México.
101. Vargas, L. E., (2014). *Toxicidad por monóxido de carbono*. Toxicología, XVII(83),582-586.
102. Vasudevan, D. M., Sreekumari S. & Vaidyanathan, K. (2011). *BIOQUÍMICA SEXTA EDICIÓN*. México: Cuellar Ayala.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

103. Venereo Gutiérrez, J. (2002). *Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes*. Revista Cubana de Medicina Militar, 31(2), 126-133.
104. Vera Carrasco, O. (2016). *El consentimiento informado del paciente en la actividad asistencial médica*. Revista Médica La Paz, 22(1), 59-68.
105. Vomero, A., Pandolfo, S., Vázquez, M., Más, M., & Bello, O. (2009). *Intoxicación por monóxido de carbono*. Revista Archivos de Pediatría del Uruguay, 80(3), 203-208.
106. Yilmaz, G., Demirli Caylan, N., & Demir Karacan, C. (2015). *Efecto del tabaquismo materno sobre el estado oxidativo en los niños*. Revista Salud y Ciencia, 21,740-746.
107. Zuzulich, M. S. (2008). *¿El paso por la universidad afecta el consumo de tabaco? .* Horizonte de Enfermería19(1), 29-43.



Anexos

Anexo 1. Características demográficas, epidemiológicas y concentraciones de los parámetros analizados en el grupo control

REF	Edad	Sexo	MDA (μmol)	% COHb 1	% COHb 2	TG (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)
1	18	M	4,08	4	2	243,5	28,6	118
2	18	M	4,43	1	4	148,9	30	99,52
3	18	F	4,55	3	4	125,7	36	109,76
4	19	F	1,90	2	2	150	36	97,4
5	20	F	5,56	3	4	216,1	38,2	86,58
6	21	M	4,31	3	2	223,9	31,1	105,12
7	25	F	3,56	4	2	174	22,1	112,1
8	21	F	2,73	2	2	150	31,4	76,2
9	26	F	3,42	4	2	257,9	36,3	113,92
10	28	M	4,35	1	2	306,2	27,7	62,96
11	28	M	4,33	2	2	325,1	36	40
12	20	M	3,33	2	2	136,9	42	74,22
13	22	F	3,80	3	2	167,2	53,1	148,46
14	19	F	2,90	2	2	107,1	49,9	34,38
15	18	M	2,44	4	2	75,2	36,5	154,86
16	19	F	3,79	3	3	261,6	54,5	30,78
17	19	F	3,27	3	4	109,3	48,3	150,94
18	22	F	3,38	2	1	184,6	40,2	43,58
19	21	M	2,49	3	4	98,6	39	45,38
20	20	F	3,68	1	4	182,3	27,7	87,64
21	19	F	3,22	3	4	116,1	50,4	109,78
22	28	F	4,93	3	5	180,6	34,4	78,38
23	19	M	3,12	2	2	129,9	31	46,82
24	18	F	2,28	4	5	118,8	42,9	120,34
25	20	F	4,58	3	3	150,5	43,3	91,8
26	26	M	5,48	1	2	174,9	33,7	72,22
27	19	M	2,86	2	3	126,6	29,9	128,78
28	20	M	3,22	3	4	102,3	42	101,54



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Anexo 2. Características demográficas, epidemiológicas y concentraciones de los parámetros analizados en el grupo de estudio.

REF	Edad	Sexo	#de cigarrillos	Problemas de Salud	Efecto de consumo	MDA (μmol)	% COHb 1	% COHb 2	TG (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)
1	28	M	1-5	Falta de condición física	Tranquilo	9,98	8	15	225,7	38,1	116,16
2	24	M	1-5	Falta de condición física	Cansado	10,24	8	7	283,6	34,5	122,28
3	30	F	1-5	Cansancio	Ansioso	8,34	8	9	185,8	39,7	64,84
4	24	M	6-12	Falta de condición física	Ansioso	15,56	7	10	244,8	39,8	126,24
5	22	M	1-5	Cansancio	Cansado	7,72	7	7	202	40,7	112,4
6	21	M	1-5	Falta de condición física	Alegre	12,50	4	7	307,9	34,3	70,02
7	22	M	1-5	Tos	Tranquilo	8,64	7	9	141,5	34,7	123,4
8	27	M	1-5	Cansancio	Ansioso	16,56	5	7	294,3	32	97,64
9	28	M	1-5	Ninguno	Tranquilo	11,66	7	9	336,9	29	45
10	21	M	1-5	Falta de condición física	Tranquilo	7,13	5	7	273,4	33,8	101,52
11	28	M	1-5	Falta de condición física	Ansioso	13,13	6	8	322,3	26,8	97,4
12	25	M	1-5	Tos	Cansado	9,12	5	7	144	37,3	77,2
13	24	M	6-12	Cansancio	Ansioso	14,55	5	6	155	28,7	97,1
14	27	M	1-5	Cansancio	Ansioso	9,44	7	7	314,5	28,7	61,5
15	25	M	1-5	Problemas de garganta	Tranquilo	8,71	5	6	316,7	28,5	56
16	25	M	6-12	Falta de condición física	Ansioso	12,89	7	9	270,4	32,7	97,52
17	22	M	6-12	Falta de condición física	Tranquilo	16,47	5	7	184,4	30,1	80,42
18	21	F	1-5	Falta de condición física	Ansioso	7,43	5	6	179,2	26,4	61,56
19	22	M	13-24	Falta de condición física	Tranquilo	17,49	7	9	307,4	33,9	40,72
20	24	M	1-5	Falta de condición física	Tranquilo	10,27	5	6	194,7	33,3	79,16
21	25	M	1-5	Cansancio	Tranquilo	10,83	6	8	154,4	36,7	94,42
22	22	M	1-5	Falta de condición física	Ninguno	8,07	4	6	103,4	33,1	99,12
23	23	F	1-5	Cansancio	Alegre	13,35	8	8	186,6	35,4	26,38
24	24	F	1-5	Problemas de garganta	Alegre	6,87	4	7	146,6	47,7	44,38
25	27	F	1-5	Trastorno de sueño	Tranquilo	7,91	4	6	134,2	44,6	169,46
26	22	M	1-5	Problemas de garganta	Tranquilo	9,77	7	8	188,6	34,9	50,68
27	30	M	6-12	Problemas de garganta	Tranquilo	14,39	6	8	160,9	35,4	57,32
28	24	M	1-5	Falta de condición física	Tranquilo	6,52	5	7	124,7	39,2	147,46
30	23	F	1-5	Falta de condición física	Ninguno	8,44	4	5	185,1	49	95,48
31	28	M	1-5	Tos	Ansioso	14,84	5	7	190,7	59,9	12,44



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Anexo 3. Consentimiento Informado



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, María Elizabeth Campoverde O., Bioquímica Farmacéutica, estudiante de la MAESTRIA TOXICOLOGIA INDUSTRIAL Y AMBIENTAL, me encuentro realizando una Tesis de **"Evaluación del efecto toxicológico del cigarrillo a través de biomarcadores, en fumadores activos Universitarios de la Facultad de Agronomía, Silvicultura, Pesca y Veterinaria, de la Universidad Católica de Cuenca"**, que determina el Malondialdehído como principal biomarcador de estrés oxidativo ocasionado por el consumo de cigarrillo y la determinación de Carboxihemoglobina biomarcador del Monóxido de Carbono que es un tóxico presente en el humo del cigarrillo, a la vez se analiza el perfil lipídico que puede verse alterado por el consumo del cigarrillo el cual está relacionado con la aparición de enfermedades crónicas degenerativas como aterosclerosis, diabetes y diversas patologías cardiovasculares (cardiopatías)

Para la realización del estudio requiero de su consentimiento para poder aplicar en usted una encuesta 17 preguntas, la misma que tomará aproximadamente 10 minutos y proporcionará información acerca de las características sobre el hábito de fumar.

Además solicito su autorización para realizar la toma de una muestra de sangre al inicio de la jornada de estudios por personal calificado y capacitado. Y la aplicación de un pulsímetro en la los dedos de la mano al inicio y final de la jornada laboral. La participación en este estudio de usted es voluntaria.

La información que se obtenga es absolutamente confidencial y sólo la maestrante de la investigación podrá acceder a ella. Si tiene alguna duda sobre este proyecto, puede hacer preguntas en cualquier momento durante su participación en él. Igualmente, puede retirarse del proyecto en cualquier momento sin que eso lo perjudique en ninguna forma.

La maestrante Elizabeth Campoverde, me ha explicado todas las preguntas de la encuesta y las actividades que se llevará a cabo con mi participación y ha dado respuesta a todas las preguntas que he realizado, habiendo entendido el objetivo de la tesis y sus actividades, libremente y sin ninguna presión acepto mi inclusión en este estudio, sabiendo que los datos obtenidos se mantendrán en confidencialidad y los resultados serán utilizados para la realización de esta tesis.

En constancia firma:

CI:



UNIVERSIDAD DE CUENCA
Anexo 4. Encuesta

	
ENCUESTA SOBRE EL CONSUMO DE TABACO	

1. Nombres y Apellidos	<input style="width: 100%;" type="text"/>		
2. Curso/Ciclo	<input style="width: 50%;" type="text"/>	3. Cédula	<input style="width: 50%;" type="text"/>
4. Edad	<input style="width: 50%;" type="text"/>	5. Sexo	M <input style="width: 50%;" type="text"/> F <input style="width: 50%;" type="text"/>
6. ¿Ha fumado alguna vez en su vida?	Sí <input style="width: 50%;" type="text"/>	No	<input style="width: 50%;" type="text"/>
7. ¿Actualmente fuma?	Sí <input style="width: 50%;" type="text"/>	No	<input style="width: 50%;" type="text"/>
8. ¿A qué edad aproximada empezó su consumo de tabaco?	<input style="width: 50%;" type="text"/>	Años	
9. ¿Hace que tiempo dejó de fumar?	Meses <input style="width: 50%;" type="text"/>	Años	<input style="width: 50%;" type="text"/>

SI HA DEJADO DE FUMAR, le agradecemos su participación. SI SIGUE FUMANDO por favor continúe con el cuestionario.

10. Señale ¿Cuántos cigarrillos fuma al día?	a.	<input style="width: 50%;" type="text" value="De 1 a 5"/>		
	b.	<input style="width: 50%;" type="text" value="De 6 a 12"/>		
	c.	<input style="width: 50%;" type="text" value="De 13 a 24"/>		
	d.	<input style="width: 50%;" type="text" value="Más de 24"/>		
11. Señale ¿Cuánto tiempo transcurre desde que se despierta hasta que fuma el primer cigarrillo?	a.	<input style="width: 50%;" type="text" value="Menos de 5 minutos"/>		
	b.	<input style="width: 50%;" type="text" value="De 6 a 30 minutos"/>		
	c.	<input style="width: 50%;" type="text" value="De 31 a 60 minutos"/>		
	d.	<input style="width: 50%;" type="text" value="Más de 60 minutos"/>		
12. Señale ¿Cuándo fuma más?	a.	<input style="width: 50%;" type="text" value="En la mañana"/>		
	b.	<input style="width: 50%;" type="text" value="En la tarde"/>		
	c.	<input style="width: 50%;" type="text" value="En la noche"/>		
13. ¿Tiene dificultad para NO fumar donde está prohibido?	Sí	<input style="width: 50%;" type="text"/>	No	<input style="width: 50%;" type="text"/>



UNIVERSIDAD DE CUENCA

14. Señale. De las siguientes situaciones marque con un círculo en cuál o cuáles usted fuma habitualmente:

a.	Cuando está solo/a
b.	Cuando está nervioso/a
c.	Con amigos en una fiesta
d.	Con su pareja o amigo/a íntimo/a que fuma
e.	En su trabajo cuando está experimentando alguna presión
f.	En un Bar, Pub o lugar público tomando una bebida
g.	Cuando se despierta cada mañana cara a un nuevo día en su actividad
h.	Cuando está aburrido/a y no tiene nada que hacer
i.	Cuando ve que está ganando peso
j.	Cuando podría sufrir una crisis emocional

15. ¿Piensa que el tabaco perjudica su salud?

Sí

No

16. Señale ¿De qué manera le ha perjudicado el consumo de tabaco?

a.	Cansancio
b.	Tos
c.	Problemas de garganta
d.	Falta de condición física
e.	Trastornos de sueño
f.	Otros, especifique

Especifique:

17. Señale ¿Cómo se siente cuando no fuma?

a.	Cansado
b.	Alegre
c.	Triste
d.	Ansioso
e.	Tranquilo
f.	Otros, especifique

Especifique:

Toda la información recaudada mediante esta encuesta será tratada de manera confidencial, no será difundida sin su consentimiento.

GRACIAS POR SU COLABORACIÓN



Anexo 5. Inserto del Kit de MDA

Manual del producto

OxiSelect™ TBARS Assay Kit (MDA Quantitation)

Número de catálogo

STA-330	200 ensayos
STA-330-5	5 x 200 ensayos

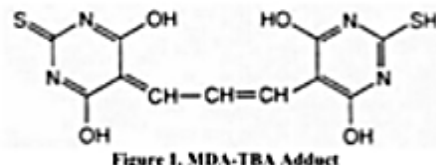


Introducción

La peroxidación lipídica es un mecanismo bien definido de daño celular en animales y plantas. Lípidos peróxidos inestables son indicadores de estrés oxidativo en las células que se descomponen para formar más complejo y compuestos reactivos tales como malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (4-HNE), bi-naturales productos de la peroxidación lipídica. La modificación oxidativa de los lípidos puede ser inducida *in vitro* por una amplia gama de agentes pro-oxidantes y se produce *in vivo* durante el envejecimiento y en ciertas condiciones de enfermedad. La medición de la productos finales de la peroxidación lipídica es uno de los ensayos más ampliamente aceptados para el daño oxidativo.

Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) es un ensayo bien establecido para la detección y monitoreo de la peroxidación lipídica. El protocolo rápido y fácil ha sido modificada por los investigadores en el evaluación de medicamentos, alimentos, así como muestras de tejidos humanos y animales. MDA forma una 1: 2 con aducto ácido tiobarbitúrico (Figura 1). El aducto MDA-TBA formado a partir de la reacción de MDA en las muestras con TBA se puede medir colorimétricamente o fluorométricamente. Niveles de TBARS se determinan a partir de una

Norma de equivalencia Malondialdehído.



El ensayo TBARS ha proporcionado la información pertinente sobre la actividad de los radicales libres en estados de enfermedad y la medición de muchos compuestos características anti-oxidantes. Aunque la especificidad de TBARS hacia compuestos distintos de MDA ha sido controvertida, el ensayo continúa siendo la mayor parte ampliamente empleada formato para el seguimiento de la peroxidación lipídica. Los lípidos con mayores grados de insaturado bonos producen altos valores de TBARS. Interferir TBARS solubles puede ser minimizado si lipoproteína fracciones son primero el ácido precipitó a partir de muestras. Las muestras biológicas pueden contener una mezcla de ácido tiobarbitúrico sustancias reactivas tales como hidroperóxidos y aldehídos, que aumentan en respuesta al estrés oxidativo. Si se obtienen valores excesivamente altos de TBARS, un ensayo más específica tales como HPLC deben emplearse

El Kit de ensayo de TBARS OxiSelect™ ofrece un sistema simple, reproducible y consistente para el detección de la peroxidación de lípidos en homogeneizados de orina, plasma, suero,



UNIVERSIDAD DE CUENCA

lisados, y tejidos. Este kit incluye un estándar MDA para su uso como un control positivo. Cada kit proporciona reactivos suficientes para realizar 200 pruebas, incluyendo curva estándar y muestras desconocidas.

Principio del ensayo

Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) Kit de ensayo es una herramienta para la cuantitativa directa medición de MDA en las muestras biológicas. Las muestras desconocidas que contienen MDA o MDA normas se hacen reaccionar primero con TBA en 95 ° C. Después de una breve incubación, las muestras y los estándares pueden ser leído o bien por espectrofotometría o fluorométricamente. El contenido de MDA en las muestras desconocidas se determina por comparación con la curva estándar MDA predeterminado.

Componentes del Kit

1. MDA estándar (N ° de pieza 233001): Un vial ámbar de 1,0 bis umol/L malondialdehído (dimetil acetal) - 1,0 ml
2. Acido tiobarbitúrico (TBA)(Parte No. 233002): Una botella - 1,0 gramos
3. SDS Solución de Lisis(Parte No. 233003): Una botella - 20 ml
4. 2X TBA Acido Diluyente (Parte No. 233004): Una botella - 25 ml
5. Solución de hidróxido sódico (Parte No. 233005): Una botella - 5 ml
6. 100X BHT Solución (Parte N° 233006): Un vial de 5% Butilhidroxitolueno (BHT) en metanol - 1.0 ml

Materialesno suministrados

1. Muestras MDA: plasma, suero, orina, tejido o célula lisado
2. Microcentrífuga y tubos cónicos
3. Bloque de calor, incubadora o baño maría
4. n-Butanol
5. Microplaca claro de 96 pozos, fondo plano para la lectura de las muestras y normas
6. Microplaca 96-pozo negro de la fluorescencia para la lectura de las muestras y normas
7. Lector de microplacas espectrofotómetro capaz de leer a 532nm
8. Lector de microplacas fluorométrico capaz de leer a 540nm de excitación y emisión de 590nm



Almacenamiento

Almacene todos los componentes a 4 ° c hasta su vencimiento.

Preparación de los reactivos

- 1X TBA Acido Diluyente: Diluir el 2X TBA diluyente de 1: 2 con agua destilada o desionizada.
- SDS Solución de Lisis: Si cristales precipitados están presentes, calentar brevemente la solución a 37 ° C a re disolver los cristales de SDS.
- Reactivo TBA: Preparar el TBA Reactivo justo antes de su uso. Preparar una solución de 5,2 mg / ml de TBA Reactivo pesando una cantidad de TBA necesario para todas las muestras y los estándares (por ejemplo: 130 mg de TBA es suficiente para preparar 100 pruebas). Añadir diluyente TBA Acido 1X (ver arriba) para la Triple Frontera y revuélvalo mezclar vigorosamente hasta que el polvo se haya disuelto (por ejemplo: 25 ml 1X TBA diluyente de 130 mg de TBA).

Ajustar el pH de la solución a pH 3,5 con solución de hidróxido sódico.

Nota: La TBA reactivo es estable durante 24 horas. No almacene ni reutilizar soluciones diluidas.

Preparación de las muestras

Todas las muestras deben ser analizadas inmediatamente o almacenar a -80 ° C durante un máximo de 1-2 meses.

- Tissue: Debido a la hemoglobina interfiere con el ensayo, la sangre se debe quitar de tejido muestra por perfusión con PBS que contenía heparina. Resuspende el tejido de 50 a 100 mg / ml en PBS 1X que contiene BHT. Homogeneizar la muestra de tejido en hielo, giran a 10.000 g durante 5 minutos para recoger el sobrenadante. El sobrenadante se puede ensayar directamente para su nivel de TBARS y resultados pueden ser normalizados en función de su concentración de proteínas.
- Plasma o suero: Para reducir al mínimo la interferencia de hemoglobina, preparar la muestra de plasma tan pronto como sea posible después de la sangre está dibujando. Añadir 1X BHT de muestra de plasma para evitar la oxidación adicional. Plasma muestra puede ensayarse directamente sin procesamiento adicional.
- Células: Resuspende las células en 1-2 x 10⁷ células / ul en PBS 1X que contiene BHT. Homogeneizar las células en hielo. Utilice todo el homogeneizado en el ensayo.

UNIVERSIDAD DE CUENCA

- Orina: Para eliminar las partículas insolubles, centrifugado a 3.000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se puede ensayar directamente.

Preparación de la curva estándar

Preparar una serie de diluciones de los estándares de MDA en el intervalo de concentración de 125 μM - 0 μM diluyendo la Norma MDA en agua destilada o desionizada (Tabla 1). Se recomienda que los estándares sean realizadas por duplicado.

Standard Tubes	MDA Standard (μL)	Water (μL)	MDA Standard
1	125 μL	875	125
2	250 μL of Tube #1	250	62.5
3	250 μL of Tube #2	250	31.25
4	250 μL of Tube #3	250	15.63
5	250 μL of Tube #4	250	7.81
6	250 μL of Tube #5	250	3.91
7	250 μL of Tube #6	250	1.95
8	250 μL of Tube #7	250	0.98
9	0 μL	250	0.0

Tabla 1. Preparación de MDA Estandar

Protocolo de ensayo

1. Preparar y mezclar todos los reactivos antes de usar. Cada MDA-que contiene la muestra y el estándar debe ser probado en duplicado. Alto contenido de MDA muestras pueden diluirse adicionalmente para el análisis.
2. Añadir 100 μL de muestras desconocidas o normas MDA para separar tubos de micro centrifuga.
3. Añadir 100 μL de la solución de lisis SDS tanto a las muestras desconocidas y las normas de MDA. Mezclar a fondo. Incubar las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Añadir 250 μL de TBA reactivo a cada muestra y estándar para ser probado.
5. Cierre cada tubo y se incuba a 95 ° C durante 45-60 minutos.
6. Retire los tubos y enfriar a temperatura ambiente en un lote de hielo durante 5 minutos.
7. Centrifugar todos los tubos de muestra a 3000 rpm durante 15 minutos. Eliminar el sobrenadante de las muestras para análisis más extenso.
8. (opcional) butanol Extracción: Para evitar la interferencia de la hemoglobina y sus derivados, que recomendar el siguiente procedimiento de extracción:

- a.- Transferir 300 μ l del sobrenadante (Paso 7) a otro tubo, añadir 300 μ l de n-butanol. Vortex vigorosamente durante 1-2 minutos y centrifugar durante 5 minutos a 3000 rpm.
- b.-La transferencia de la fracción butanol para su posterior medición.
9. Espectrofotométrica medida: Transferencia de 200 μ l de los estándares y muestras de MDA a un 96 así micro placa compatible con un lector de placas espectrofotométrico. Recuerde incluir un 0 μ M control en blanco. Se recomienda que los duplicados de cada estándar y la muestra deban ser leídos. Leer la absorbancia a 532nm.

Ejemplo de resultados

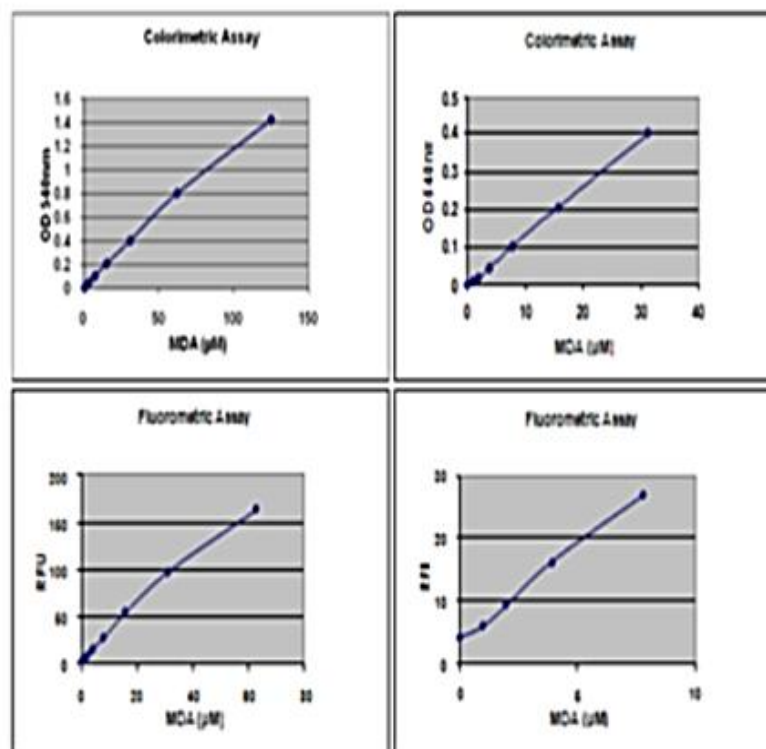


Figura 2. MDA curva estándar. La curva estándar MDA fue creado como se describe en el Ensayo.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Referencias

- 1 Armstrong, D. and Browne, R. (1994). *Free Radicals in Diagnostic Medicine*. 366: 43-58.
- 2 Armstrong, D., et al. (1998). *Free Radicals and Antioxidant Protocols*. 108: 315-324.
- 3 Boyum, A. (1966). *J. of Clinical Investigation*. 21: Supplement 97.
- 4 Braun, D. and Fromherz, P. (1997). *Applied Physics A*.
- 5 Gidez, L., et al. (1982). *J. of Lipid Research*. 23: 1206-1223.
- 6 Lefevre G., et al. (1998). *Annals de Biologie Clinique*. 56(3): 305



UNIVERSIDAD DE CUENCA

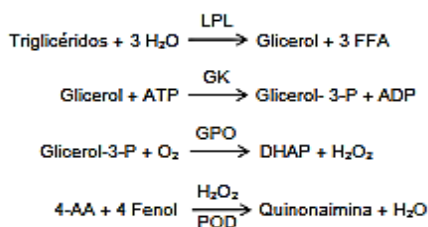
Anexo 7. Inserto del Kit de Triglicéridos

TRIGLYCERIDES MR

REF 1155005 2 x 50 mL	REF 1155010 4 x 100 mL	TRIGLICERIDOS MR <i>Método enzimático colorimétrico</i> PUNTO FINAL
CONTENIDO R1.Reactivo 2 x 50 mL CAL. Patrón 1 x 3 mL	CONTENIDO R1.Reactivo 4 x 100 mL CAL. Patrón 1 x 3 mL	
Sólo para uso diagnóstico <i>in vitro</i>		

FUNDAMENTO

El método^{1,2} está basado en la hidrólisis enzimática de los triglicéridos séricos a glicerol y ácidos grasos libres (FFA) por acción de la lipoprotein lipasa (LPL). El glicerol es fosforilado por el adenosin trifosfato (ATP) en presencia de glicerolquinasa (GK) para formar glicerol-3-fosfato (G-3-P) y adenosin difosfato (ADP). El G-3-P es oxidado por la glicerofosfato oxidasa (GPO) en dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa (POD) el fenol y la 4-aminoantipirina (4-AA) se condensan por acción del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) formándose un cromógeno rojo proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra.



COMPOSICION DE LOS REACTIVOS

R1 Monoreactivo. Tampón PIPES 50 mmol/L, pH 6,8, LPL ≥ 12 KU/L, GK ≥ 1 KU/L, GPO ≥ 10 KU/L, ATP 2,0 mmol/L, Mg²⁺ 40 mmol/L, POD ≥ 2,5 KU/L, 4-AA 0,5 mmol/L, fenol 3 mmol/L, tensioactivos no-iónicos 2 g/L (p/v). Biocidas.

CAL Patrón de Triglicéridos. Glicerol 2,28 mmol/L, equivalente a 200 mg/dL de glicerol trioleato. Patrón secundario. El valor de concentración es trazable al Material de Referencia Certificado 909b.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

✂ Conservar a 2-8°C.
Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Mantener los frascos cerrados, protegidos de la luz y evitar la contaminación durante su uso. Descartar si se observan signos de deterioro:
- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancia del Blanco (A) a 500 nm > 0,150 en cubeta de 1 cm.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

El Monoreactivo y el Patrón están listos para su uso.

MUESTRAS

Suero, plasma heparinizado u obtenido con EDTA libre de la hemólisis. Separar las células dentro de las 2 horas siguientes a la venipuntura. Analizar las muestras de inmediato o refrigerarlas. Estables 1 semana a 4-8°C.

INTERFERENCIAS

- Lipemia (intralipid >2 g/L) puede afectar los resultados.
- Bilirrubina (20 mg/dL) no interfiere.
- Hemoglobina puede afectar los resultados.
- Otros medicamentos y sustancias pueden interferir³.

EQUIPO ADICIONAL

- Fotómetro o colorímetro para mediciones a 500 ± 20 nm.
- Unidad termostaticada ajustable a 37°C.
- Pipetas de volumen variable para reactivos y muestras.

TECNICA

1. Equilibrar reactivos y muestras a temperatura ambiente.
2. Pipetear en tubos rotulados:

TUBOS	Blanco	Muestra	CAL.Patrón
R1.Monoreactivo	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Muestra	-	10 µL	-
CAL.Patrón	-	-	10 µL

3. Mezclar y reposar los tubos 15 minutos a temperatura ambiente (16-25°C) ó 5 minutos a 37°C.
4. Leer la absorbancia (A) de la muestra y el patrón a 500 nm frente al blanco de reactivo.

El color es estable como mínimo 1 hora protegido de la luz.

CALCULOS

$$\frac{A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}} \times C_{\text{Patrón}} = \text{mg/dL triglicéridos}$$

Muestras con concentraciones superiores a 800 mg/dL deben diluirse 1:2 con solución salina y repetir el ensayo. Multiplicar los resultados por 2.

Para expresar los resultados en unidades SI aplicar:
mg/dL x 0,0113 = mmol/L

QUALITY SYSTEM CERTIFIED
ISO 9001 ISO 13485



LINEAR CHEMICALS S.L. Joaquim Costa 18 2ª planta. 08390 Montgat, Barcelona, SPAIN
Telf. (+34) 934 694 990 Fax. (+34) 934 693 435. website www.linear.es

VALORES DE REFERENCIA⁴

Valores clínicos actualizados de triglicéridos empleados para clasificar los grupos de riesgo.

Triglicéridos	Clasificación
< 150 mg/dL (< 1,70 mmol/L)	Normal
150-199 mg/dL (1,70-2,25 mmol/L)	Medio/Alto
200-499 mg/dL (2,26-5,63 mmol/L)	Alto
≥ 500 mg/dL (≥ 5,65 mmol/L)	Muy alto

Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango de referencia.

CONTROL DE CALIDAD

El empleo de un calibrador para calcular los resultados permite obtener una exactitud independiente del sistema o instrumento empleado.

Para un control de calidad adecuado, se incluirán en cada serie controles valorados (normales y elevados) que se tratarán como muestras problema.

REF 1980005 HUMAN MULTISERA NORMAL
Valorado. Nivel normal de triglicéridos.

REF 1985005 HUMAN MULTISERA ABNORMAL
Valorado. Nivel elevado de triglicéridos.

Si los resultados obtenidos se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y la técnica usada. Cada laboratorio debe establecer su propio Control de Calidad y sus medidas correctoras cuando los controles no cumplan con las tolerancias exigidas.

SIGNIFICADO CLINICO

El conocimiento del nivel plasmático de lípidos (triglicéridos y colesterol) y derivados lipídicos, especialmente lipoproteínas (HDL y LDL), ayudan en la diagnosis de muchos desórdenes metabólicos o condiciones con alto riesgo. Un desequilibrio en el nivel de lipoproteínas plasmáticas conduce a una *hiperlipoproteinemia*, un grupo de trastornos que afectan a lípidos y lipoproteínas causantes de la enfermedad cardíaca coronaria y de la arterioesclerosis. Cada tipo de hiperlipoproteinemia está asociada con una elevación anormal de triglicéridos, colesterol o de subfracciones lipoproteicas.

Estudios en curso⁴ indican que la tasa de triglicéridos por sí misma es también un factor de riesgo independiente de la enfermedad cardíaca coronaria. El hallazgo que unos triglicéridos elevados sean un factor de riesgo independiente sugiere que algunas lipoproteínas ricas en triglicéridos son aterogénicas. Estas son lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) parcialmente degradadas, conocidas comúnmente como *lipoproteínas residuales*. En la práctica clínica, el colesterol VLDL es el indicador más inmediato de lipoproteínas residuales aterogénicas y como tal un objetivo potencial de la terapia hipocolesterinémica.

CARACTERISTICAS ANALITICAS

- **Límite detección** : 0,74 mg/dL

- **Linealidad** : Hasta 800 mg/dL

- **Precisión** :

mg/dL	Intraserial	Interserial		
Media	119,7	259,1	119,7	259,1
DE	0,70	1,27	2,20	4,30
CV%	0,58	0,49	1,84	1,66
N	10	10	10	10

- **Sensibilidad**: 1,3 mA / mg/dL triglicéridos.

- **Correlación**. Este ensayo (y) fue comparado con un método comercial similar (x). Los resultados fueron los siguientes:

$$N = 61 \quad r = 0,99 \quad y = 1,003x - 1,92$$

Las características analíticas han sido generadas usando un instrumento automático. Los resultados pueden variar según el instrumento utilizado.

NOTAS

- Este ensayo permite ser adaptado a distintos instrumentos automáticos. Cualquier adaptación a un instrumento deberá ser validada con el fin de demostrar que se cumplen las características analíticas del método. Se recomienda validar periódicamente el instrumento. Consultar con su distribuidor para cualquier dificultad en la adaptación del método.
- El diagnóstico clínico no debe realizarse únicamente con los resultados de un único ensayo, sino que debe considerarse al mismo tiempo los datos clínicos del paciente.

REFERENCIAS

- Buccolo G y David, H. Clin. Chem. 19 : 476 (1973).
- Fossati, R. y Prencipe, L. Clin. Chem. 28: 2077 (1982).
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACC Press, 2000.
- SPECIAL REPORT. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA. 285 : 2486 (2001).

B1155-2/0901
RI. cas

QUALITY SYSTEM CERTIFIED
ISO 9001 ISO 13485



LINEAR CHEMICALS S.L. Joaquim Costa 18 2ª planta. D8390 Montgat, Barcelona, SPAIN
Telf. (+34) 934 694 990 Fax. (+34) 934 693 435. website www.linear.es



UNIVERSIDAD DE CUENCA
Anexo 8. Inserto del Kit de colesterol HDL

HDL-CHOLESTEROL

REF 1133010 2 x 40 mL CONTENIDO R1. Reactivo 2 x 40 mL CAL. Patrón 1 x 3 mL <hr/> Sólo para uso diagnóstico <i>in vitro</i>	<h3>COLESTEROL-HDL</h3> PRECIPITACIÓN DIFERENCIAL <i>Método enzimático colorimétrico</i> PUNTO FINAL
---	--

FUNDAMENTO

Esta técnica¹ emplea un método de separación basado en la precipitación selectiva de las lipoproteínas conteniendo apoproteínas-B (VLDL, LDL y (a)lpa) por acción del ácido fosfotúngstico/C₂Mg, sedimentación del precipitado por centrifugación y subsiguiente análisis enzimático como colesterol residual de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) contenidas en el sobrenadante claro.

COMPOSICION DE LOS REACTIVOS

R1 Reactivo precipitante. Acido fosfotúngstico 0,63 mmol/L, cloruro de magnesio 25 mmol/L. Estabilizantes.

CAL Patrón de Colesterol. Colesterol 50 mg/dL (1,30 mmol/L). Patrón primario de matriz orgánica. El valor de concentración es trazable al Material de Referencia Certificado 1951a. No incluido.

R2 Colesterol MR. Optativo. Ref: 1118005, 1118010, 1118015.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Conservar a 2-8°C.
 Los Reactivos y el Patrón son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

Descartar si se observan signos de deterioro:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancia del Blanco (A) a 500 nm > 0,100 en cubeta de 1 cm.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Mantener los frascos cerrados, protegidos de la luz y evitar la contaminación durante su uso.

MUESTRAS

Suero o plasma recogido con EDTA o heparina, libre de hemólisis. El paciente estará en ayunas desde la noche anterior a la extracción. Separar las células dentro de las 3 horas siguientes a la venipuntura. Las muestras pueden conservarse 2 semanas a 4-8°C ó 3 meses a -20°C sin que se altere la tasa de colesterol-HDL.

El sobrenadante conteniendo la fracción HDL es convenientemente preparado el día de la extracción pudiendo analizarse tras 2 semanas a 4-8°C ó 3 meses a -20°C en un congelador desprovisto de auto-descongelación.²

INTERFERENCIAS

- Lipemia (triglicéridos 10 g/L) no interfiere.
- Bilirrubina (> 10 mg/dL), hemoglobina (> 5 g/L) puede afectar los resultados.
- Otros medicamentos y sustancias pueden interferir².

EQUIPO ADICIONAL

I. Precipitación

- Diluidor y pipetas.
- Tubos de centrifuga (13 x 100 m/m).
- Mezclador Vortex.
- Centrifuga de sobremesa.

II. Colorimetría

- Kit para la medición de Colesterol Total.
- Unidad termostatzada ajustable a 37°C.
- Fotómetro o colorímetro para mediciones a 500 ± 10 nm.

TECNICA

I. Precipitación

1. Equilibrar reactivos y muestras a temperatura ambiente.
2. Pipetear en tubos de centrifuga rotulados:

Muestra o patrón	0,2 mL	$\text{Razón } \frac{\text{Muestra}}{\text{Reactivo}} = \frac{1}{2}$
Reactivo precipitante	0,4 mL	
		Factor de dilución = 3

3. Mezclar en agitador rotatorio y reposar los tubos 10 minutos temperatura ambiente.
4. Centrifugar 10 minutos a 4000 r.p.m. o 2 minutos a 12000 r.p.m.
5. Decantar el sobrenadante claro dentro de las 2 horas.

En el caso de sobrenadantes turbios ocasionados por triglicéridos elevados (>350 g/dL) deberá diluirse la muestra 1:2 con solución salina y repetir los pasos 2,3,4 y 5. Multiplicar los resultados de la colorimetría por 2.

QUALITY SYSTEM CERTIFIED
 ISO 9001 ISO 13485



LINEAR CHEMICALS S.L. Joaquim Costa 18 2ª planta. 08390 Montgat, Barcelona, SPAIN
 Telf. (+34) 934 694 990 Fax. (+34) 934 693 435. website www.linear.es



UNIVERSIDAD DE CUENCA

II. Colorimetría

- Equilibrar el monoreactivo auxiliar de Colesterol MR y el patrón (50 mg/dL) del kit a temperatura ambiente.
- Pipetear en tubos rotulados:

TUBOS	Blanco	Sobrenadante muestra	Sobrenadante Patrón
Monoreactivo	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Sobrenadante	-	50 µL	-
Patrón	-	-	50 µL

- Mezclar y reposar los tubos 10 minutos a temperatura ambiente ó 5 minutos a 37°C.
- Leer la absorbancia (A) del sobrenadante y el patrón a 500 nm frente al blanco de reactivo.

El color es estable como mínimo 30 minutos protegido de la luz.

CALCULOS

$$\frac{A_{\text{Sobrenadante}}}{A_{\text{Patrón}}} \times C_{\text{Patrón}} = \text{mg/dL Colesterol-HDL}$$

Para expresar los resultados en unidades SI aplicar:
mg/dL x 0,0259 = mmol/L

VALORES DE REFERENCIA⁴

Valores clínicos de HDL-Colesterol empleados para clasificar grupos de riesgo.

Colesterol de lipoproteínas de alta densidad		RIESGO
Hombres	> 55 mg/dL (> 1,42 mmol/L)	Bajo
	35-55 mg/dL (0,90-1,42 mmol/L)	Moderado
	< 40 mg/dL (< 1,04 mmol/L)	Alto
Mujeres	> 65 mg/dL (> 1,68 mmol/L)	Bajo
	45-65 mg/dL (1,16-1,68 mmol/L)	Moderado
	< 45 mg/dL (< 1,16 mmol/L)	Alto

CONTROL DE CALIDAD

El empleo de un calibrador para calcular los resultados permite obtener una exactitud independiente del sistema o instrumento empleado.

Para un control de calidad adecuado, se incluirán en cada serie controles valorados (normales y elevados) que se tratarán como muestras problema.

Si los resultados obtenidos se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y la técnica usada. Cada laboratorio debe establecer su propio Control de Calidad medidas correctoras cuando los controles no cumplan con las tolerancias exigidas.

SIGNIFICADO CLINICO

Un valor de Colesterol-HDL bajo es un indicador independiente y firme de enfermedad coronaria. En ATP III⁴, el valor bajo de Colesterol-HDL quedó categóricamente definido como un nivel < 40 mg/dL (1,04 mmol/L), un cambio en relación al nivel < 35 mg/dL establecido anteriormente en ATP II (1993).

Un valor bajo de Colesterol-HDL se emplea como un estimador de riesgo a 10 años, de padecer la enfermedad cardíaca coronaria debiéndose ésta a diversas causas: triglicéridos elevados, sobrepeso y obesidad, inactividad física, tabaco, ingestas muy altas de carbohidratos (> 60% de calorías) y ciertas drogas como los esteroides, anabolizantes y los agentes progestacionales.

CARACTERISTICAS ANALITICAS

- **Limite de detección:** 0,3 mg/dL

- **Linealidad:** Hasta 275 mg/dL

- **Precisión:**

mg/dL	Intraserial			Interserial		
Media	42,1	45,8	54,6	42,1	45,8	54,6
DE	0,23	0,23	0,2	0,27	0,28	0,31
CV%	0,54	0,5	0,34	0,64	0,61	0,52
N	10	10	10	10	10	10

- **Sensibilidad:** 0,037 A / mg/dL

- **Correlación.** Este ensayo (y) fue comparado con un método comercial similar (x). Los resultados fueron los siguientes:

$$N = 25 \quad r = 0,995 \quad y = 0,985x + 2,6$$

Las características analíticas han sido generadas usando un instrumento automático. Los resultados pueden variar según el instrumento utilizado.

NOTAS

- Este ensayo permite ser adaptado a distintos instrumentos automáticos. Cualquier adaptación a un instrumento deberá ser validada con el fin de demostrar que se cumplen las características analíticas del método. Se recomienda validar periódicamente el instrumento. Consultar con su distribuidor para cualquier dificultad en la adaptación del método.
- El diagnóstico clínico no debe realizarse únicamente con los resultados de un único ensayo, sino que debe considerarse al mismo tiempo los datos clínicos del paciente.

REFERENCIAS

- Burstein, M., Scholnick, H.R. y Morfin, R. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 40 : 560 (1980).
- Finley, P.R., Shifman, R.B., Williams, R.S. y Lichti, D.I. Clin. Chem. 24 : 931 (1971).
- Tietz, N.W. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd Edition. W.B. Saunders Co. Philadelphia, PA. (1995).
- SPECIAL REPORT. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA. 285 : 2486 (2001).
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACC Press, 2000.

B1133-2/0901
RI.ca

QUALITY SYSTEM CERTIFIED
ISO 9001 ISO 13485


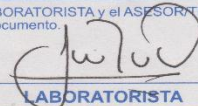
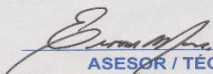


LINEAR CHEMICALS S.L. Joaquim Costa 18 2ª planta. 08390 Montgat, Barcelona, SPAIN
Telf. (+34) 934 694 990 Fax. (+34) 934 693 435. website www.linear.es



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Anexo 9. Certificado de mantenimiento lector de Elisa STAT FAX 1904

 Reactlab Import Cia. Ltda	REPORTE DE SERVICIO		N°
	DEPARTAMENTO: <u>SERVICIO TECNICO</u>		
Información General			
Fecha Solicitud: <u>27/04/18</u>	Fecha Ejecución: <u>27/04/18</u>	Asesor/Técnico: <u>EIROM MORA</u>	
Cliente: <u>DRA. LILIANA UYAGUARI</u>		Ciudad: <u>CUENCA</u>	
Laboratorista: <u>DRA. LILIANA UYAGUARI</u>		Telf.: <u>2885292</u>	
Equipo/Reactivo en: Garantía <input type="checkbox"/>	Fuera de Garantía <input type="checkbox"/>	Contrato <input type="checkbox"/>	Comodato <input checked="" type="checkbox"/>
			A. Tecnológico <input type="checkbox"/>
Tipo de Servicio:	Instalación <input type="checkbox"/>	Capacitación <input type="checkbox"/>	Asesoría <input type="checkbox"/>
	M. Preventivo <input checked="" type="checkbox"/>	M. Correctivo <input type="checkbox"/>	Otro <input type="checkbox"/>
Datos del Equipo / Reactivo			
Descripción: <u>EQUIPO DE QUIMICA</u>			
Marca: <u>AWARENESS</u>	Mod./Ref.: <u>STAT FAX 1904</u>	Ser./ Lot.: <u>1904-812</u>	
Problema Reportado y/o Encontrado			
<u>MANTENIMIENTO PREVENTIVO</u>			
<u>PROBLEMAS EN TGO Y TGP.</u>			
Diagnóstico			
<u>MANTENIMIENTO PREVENTIVO</u>			
Actividades Realizadas			
<u>CHEQUEO Y DIAGNOSTICO INICIAL.</u>			
<u>DESARME DEL EQUIPO LIMPIEZA INTERNA Y EXTERNA DEL EQUIPO</u>			
<u>DESARME Y MANTENIMIENTO DEL SISTEMA OPTICO.</u>			
<u>DESARME Y MANTENIMIENTO DE IMPRESORA INTERNA.</u>			
<u>AJUSTE DE VOLTAJE DE FILTROS</u>			
<u>ARMADO DEL EQUIPO</u>			
Observaciones y/o Recomendaciones			
<u>SE CHEQUEO PROGRAMA DE REACTIVO; SE LE SUGIRIO PROBAR REACTIVO CON OTRO EQUIPO (PARA VERIFICAR SI ESTA ESTABLE EL REACTIVO).- NO LEE LA LECTURA DEL TGO Y TGP DESDE QUE ADQUIRIO EL ULTIMO REACTIVO DE LOS MISMO</u>			
N° de Visita (Garantía o Contrato): <u>2 / 2</u>		Próxima Visita Tentativa: Del <u>09/09/18</u>	Al <u>30/09/18</u>
Producto y/o Repuestos Utilizado			
Código: <u>SER-TEC</u>	Descripción: <u>SERVICIO TECNICO</u>	Cantidad: <u>1</u>	Valor: <u>56+IVA</u>
	<u>AL CONTADO</u>		<u>EFFECTIVO</u>
Hora Entrada: <u>08 H 00</u>			
Hora Salida: <u>10 H 30</u>			
Tiempo de Servicio: <u>2 H 30</u>			
EL LABORATORISTA y el ASESOR TÉCNICO firman como constancia de la veracidad y aceptación de este documento.			
 LABORATORISTA		 ASESOR / TÉCNICO	
QUITO: Av. 6 de Diciembre N30-29 y Av. República, Edificio ALPA Construcciones 3er. piso Oficina 308. Telf.: 02-2559147			
CUENCA: Guayas N° 6-105 entre Pichincha y Tungurahua. PBX: 07 2811287 /07 2811-092 /Fax: 07 2810174			
SERVICIO TÉCNICO: 0958868788 / 0984911664 - ASESORÍA CIENTÍFICA: 0984910695			




UNIVERSIDAD DE CUENCA
Anexo 10. Documento Masimo RAD-57 autocalibrable.



Recibo de Pago
 Fecha: Cuenca., 29/03/2017
 No. de Cotización: DMM160317-1

Recibi de la Dra. Malena Mosquera con C.I.: , la cantidad de USD\$ 2350.68 (DOS MIL TRESCIENTOS CINCUENTA, CON 68/100 DÓLARES AMERICANOS)

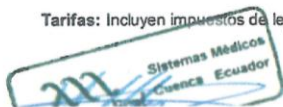
Por concepto de la compra del siguiente item descrito a continuación:

Item	Cantidad	Descripción	P. Unitario	V. Total
1	1	Oxímetro portátil para medir SpO2, PR y SpCO Marca: Masimo Modelo: RAD-57 Numero de Serie: 707039 Procedencia: USA Estado: Refurbished 	2062.00	2062.00
		Incluye: <ul style="list-style-type: none"> • Sensor masimo rainbow autocalibrable SpO2 y SpCO DCI-de3 • 4 Pilas AA • Estuche • Manual Usuario en versión digital 		
			Subtotal USD\$	2062.008
			I.V.A. 14%	288.68
			Total USD\$	2350.68

Garantía: 6 meses contra defectos de fabricación en unidad principal.

Soporte Técnico: Minimo 4 anos stock de repuestos.

Tarifas: Incluyen impuestos de ley.





UNIVERSIDAD DE CUENCA

Anexo 11. Certificado de uso de laboratorio del INSPI-CZ6

INSTITUTO NACIONAL DE
INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA INSPI
DR. LEOPOLDO IZQUIETA PÉREZ



EL
GOBIERNO
DE TODOS

COORDINACIÓN ZONAL 6

Cuenca 12 de noviembre de 2018

A quien corresponda

Por medio de la presente, me permito comunicar que la BQF. María Elizabeth Campoverde Ortiz realizó los análisis de las muestras para la determinación de malondialdehído para su tesis titulada, **“Evaluación del efecto toxicológico del cigarrillo a través de biomarcadores, en fumadores activos Universitarios de la Facultad de Agronomía, Silvicultura, Pesca y Veterinaria, de la Universidad Católica de Cuenca”**; en el laboratorio del Centro de Referencia de Retrovirus, hepatitis y otros virus de transmisión sexual del INSPI-Dr. Leopoldo Izquieta Pérez CZ6.

Es todo en cuanto puedo certificar en honor a la verdad, la interesada puede hacer uso del presente documento como bien creyere conveniente

Sin otro particular suscribo de Usted.

Atentamente,

Dra. María Cristina Pacurucu



Coordinadora Zonal 6 INSPI-Dr. Leopoldo Izquieta Pérez

Foto 1. Toma de muestra sanguínea



Fuente: Autor

Foto 2. Mediciones de %COHb con Cooxímetro de pulso



Fuente: Autor

Foto 3. Reactivos del kit de MDA



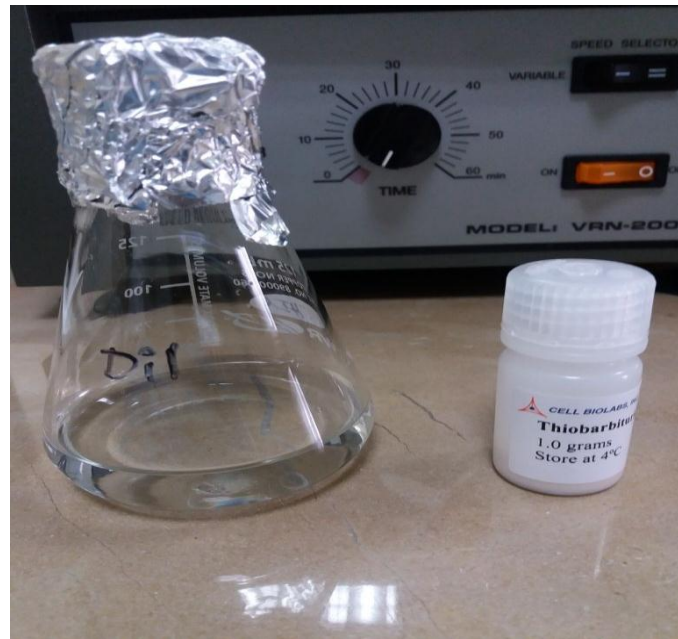
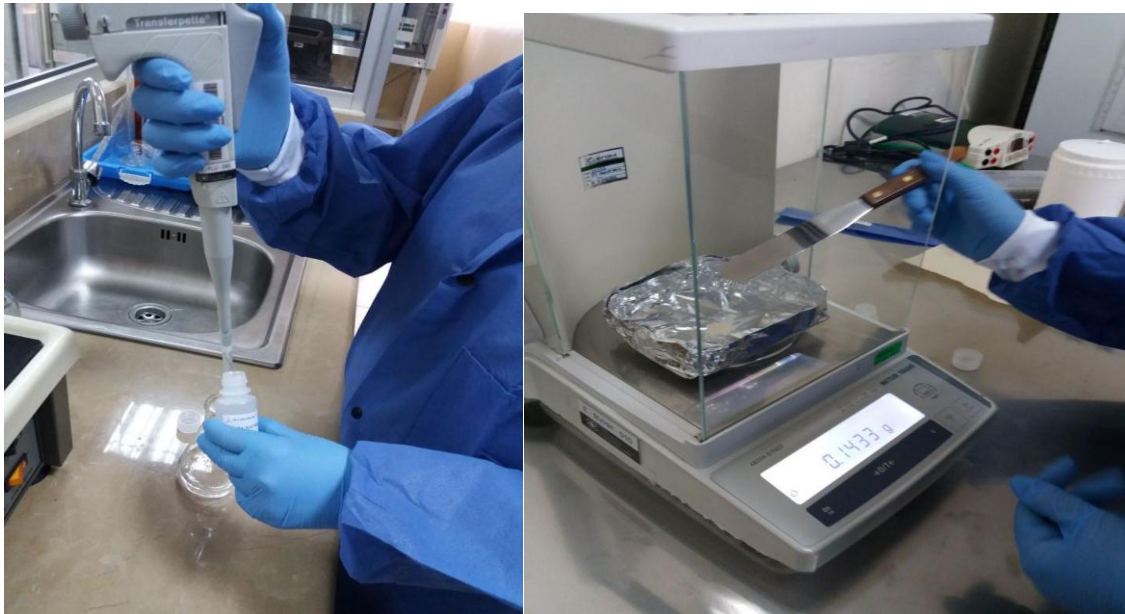
Fuente: Autor

Foto 4. Ajuste de pH del reactivo TBA con NaOH 10%



Fuente: Autor

Foto 5. Preparación de reactivos



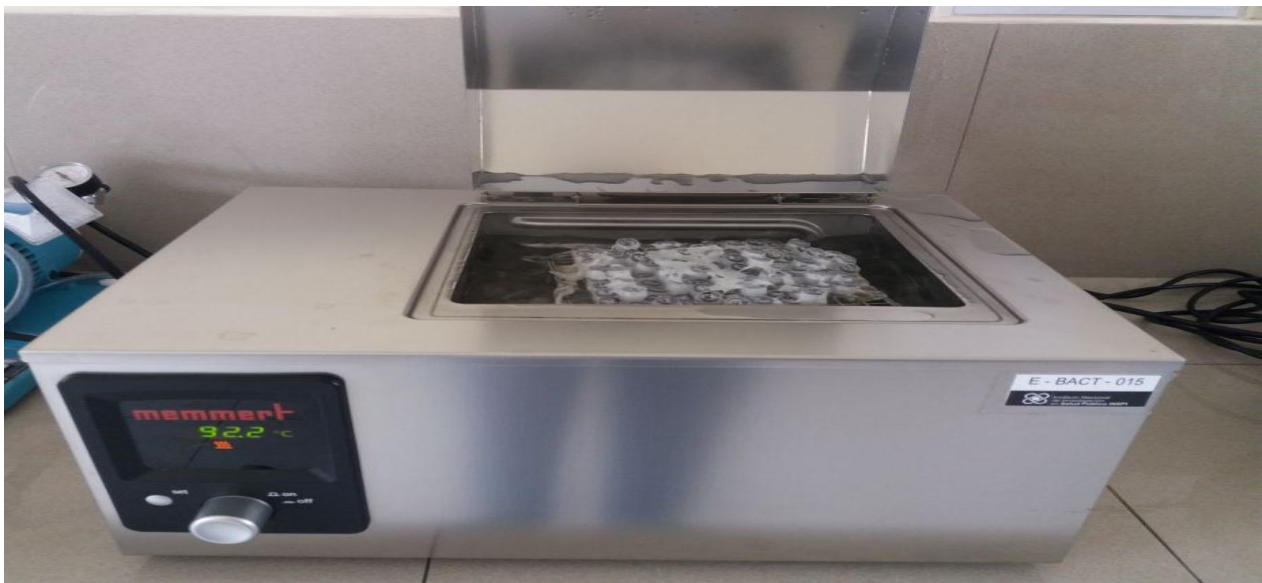
Fuente: Autor

Foto 6. Preparación de muestras



Fuente: Autor

Foto 7. Muestras en baño maría



Fuente: Autor

Foto 8. Muestras en baño de hielo



Fuente: Autor

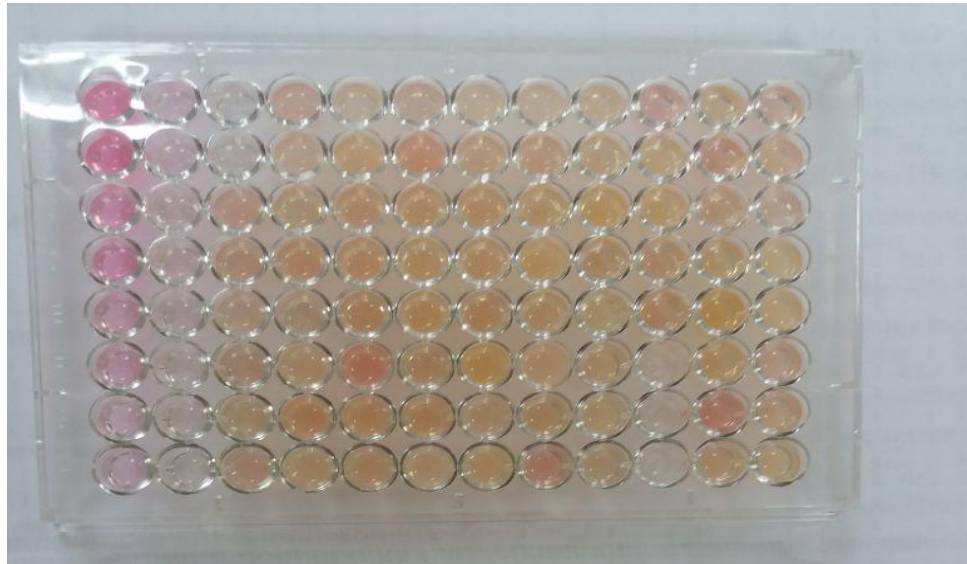
Foto 9. Montaje de muestras en microplaca



Fuente: Autor

UNIVERSIDAD DE CUENCA

Foto 10. Microplaca con muestras para su lectura



Fuente: Autor

Foto 11. Espectrofotómetro con muestras para su lectura



Fuente: Autor