



**UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

ÍNIVELES SÉRICOS DE MALONDIALDEHÍDO COMO MARCADOR BIOLÓGICO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN ESTUDIANTES FUMADORES ACTIVOS DE LA CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD DE CUENCAÍ.

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIA AL
TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

AUTORES

Diego Freddy Espinoza Barzallo

José Luis Flores Orellana

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Ruth Eugenia Rosas Castro. MSc.

CUENCA- ECUADOR

2016



RESUMEN

El consumo de tabaco en la población se considera un problema de salud que está relacionado con el estrés oxidativo en la peroxidación lipídica, por lo que el malondialdehído (MDA) es considerado un biomarcador en individuos fumadores. En este trabajo se valoró la concentración sérica de MDA de fumadores y no fumadores. Participaron 70 estudiantes de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca divididos en dos grupos, 50 para grupo expuesto (fumadores activos) y 20 para grupo control (no fumadores).

Para la determinación de MDA en suero se utilizó el kit comercial OxiSelect[®] TBARS Assay Kit (MDA Quantitation), detección colorimétrica. Mediante encuesta se valoró las características demográficas y epidemiológicas de cada estudiante. El resultado obtenido del grupo de fumadores se comparó con el grupo control (no fumadores).

En los resultados obtenidos los niveles de MDA ($\mu\text{mol/L}$) mostró un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,001$) en los estudiantes fumadores ($10,74 \pm 3,17$) con respecto a los no fumadores ($3,52 \pm 1,11$). Adicionalmente se realizó 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 ($r = 0,476$). Por ende la concentración en suero de MDA se correlaciona significativamente con el nivel de estrés oxidativo a que se someten los estudiantes fumadores.

Palabras clave: Estrés oxidativo, malondialdehído, fumadores, peroxidación lipídica.



ABSTRACT

The tobacco consumption in the population is considered a health issue that is related to the oxidative stress in the lipidic peroxidation, therefore, malondialdehyde MDA is considered as a biomarker in individuals with smoking habits, in this work, the seric concentration of MDA of smokers and non-smokers was valued. 70 students from the faculty of Biochemistry and Pharmacy of the University of Cuenca took part, divided into two groups, 50 in the exposed group (smokers) and 20 in the control group (non-smokers).

The commercial kit OxiSelec TBARS Assay kit (MDA Quantitation), was used in the serum MDA determination, colorimetric detection; the demographic and epidemiological characteristics of each student was assessed through a survey. The results from the smokers group were compared to the control group (non-smokers).

The MDA level results ($\mu\text{mol/L}$) showed a statistically significant increase ($p < 0.001$) in smoker students (10.74 ± 3.17) respect to the non-smokers (3.52 ± 1.11). Additionally, an analysis of the variation of the concentration of MDA regarding to the number of cigarettes / day and the time of the habit of smoking, was made, which showed a correlation lineal significant and high ($r = 0,875$ and $r = 0,848$, respectively); in relation to the access time to the first cigarette a day showed a positive linear trend ($r = 0.476$). So, the MDA serum concentration is significantly correlated to the oxidative stress level in the smoker students.

Keywords: Oxidative stress, malondialdehyde, smoking, lipid peroxidation.



ÍNDICE DE CONTENIDO

Contenido	pág.
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
LISTA DE TABLAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA.....	11
CLÁUSULAS DE DERECHOS DE AUTOR	13
CLÁUSULAS DE PROPIEDAD INTELECTUAL.....	15
DEDICATORIA.....	17
AGRADECIMIENTOS	19
INTRODUCCIÓN	20
1 ESTRÉS OXIDATIVO.....	22
1.1 Generalidades del estrés oxidativo	22
1.2 Radicales libres y estrés oxidativo	22
1.2.1 Radicales libres	22
1.2.2 Biomecanismos de formación de radicales libres	23
1.2.3 Fuentes de radicales libres	25
1.2.3.1 Fuentes endógenas	25
1.2.3.2 Fuentes exógenas.....	26
1.2.4 El daño producido por especies reactivas del oxígeno.....	27
1.3 Estrés oxidativo en el consumo de cigarrillo	28
1.3.1 Consumo de cigarrillo en la población universitaria	28
1.3.2 Propiedades físicas y químicas del humo del cigarrillo.....	29



1.3.2.1	El humo del cigarrillo como fuente de especies reactivas de oxígeno....	30
1.3.3	Humo del cigarrillo y daño celular.....	31
1.3.4	Efecto de los radicales libres en la peroxidación lipídica	31
1.4	Estrés oxidativo y enfermedades	34
1.4.1	El envejecimiento.....	34
1.4.2	La aterosclerosis.....	34
1.4.3	Hipertensión arterial.....	35
1.4.4	Diabetes.....	35
1.4.5	Cirrosis, insuficiencia hepática y hepatopatía alcohólica	35
1.4.6	La catarata senil	35
1.4.7	Cáncer.....	36
1.5	Sistema antioxidante y terapia antioxidante.....	36
1.5.1	Funciones de los antioxidantes.....	38
1.6	Marcadores biológicos del estrés oxidativo.....	39
1.7	Métodos de evaluación del estrés oxidativo.....	41
1.7.1	Ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.....	41
2	METODOLOGÍA.....	43
2.1	Tipo de investigación o estudio.....	43
2.2	Variables.....	43
2.2.1	Identificación de variables.....	43
2.3	Población y muestra.....	43
2.4	Criterios de inclusión y exclusión	44



2.4.1	Criterios de inclusión de casos	44
2.4.2	Criterios de exclusión de casos	44
2.4.3	Criterios de inclusión de controles	44
2.4.4	Criterios de exclusión de controles	44
2.5	Procedimientos y técnicas	44
2.5.1	Procedimiento cumplido para la investigación	44
2.5.2	Análisis de laboratorio	45
2.5.2.1	Tratamiento de la muestra	45
2.5.2.2	Determinación de malondialdehído.....	45
2.5.2.3	Principio del ensayo	45
2.5.2.4	Información del reactivo: OxiSelecti TBARS Assay Kit (MDA Quantitation)õ ...	47
2.5.2.5	Flujograma de trabajo (Anexo 5 y 10).....	47
2.5.2.6	Materiales y reactivos (Anexo 3 y 4)	47
2.5.2.7	Equipo lector de microplacas Synergy H1, Biotek.....	47
2.6	Análisis de la información	48
2.7	Aspectos éticos de la investigación.....	48
3	RESULTADOS	50
3.1	Descripción general de la muestra.....	50
3.2	Relación de la concentración de malondialdehído según las variables edad y sexoõ ...	53
3.3	Relación entre las concentraciones de malondialdehído entre grupo expuesto (fumadores) y grupo control (no fumadores)	54
3.4	Comparación de la concentración de malondialdehído según el tiempo del hábito de fumar.....	55



LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Principales especies reactivas de oxígeno que se producen en los sistemas biológicos.	23
Tabla 2: Vida media de las especies reactivas del Oxígeno.	25
Tabla 3: Compuestos cuya toxicidad puede estar relacionada con la formación de radicales libres.....	27
Tabla 4: Antioxidantes exógenos.	39
Tabla 5: Marcadores de estrés oxidativo.	40
Tabla 6: Descripción del kit de reactivo.....	47
Tabla 7: Comportamiento de las variables demográficas y epidemiológicas en el grupo expuesto (fumadores).....	50
Tabla 8: Comportamiento de las variables demográficas y epidemiológicas en el grupo control (no fumadores).	52
Tabla 9: Concentración promedio de malondialdehído por grupo de edad y sexo en el grupo expuesto (fumadores activos).....	53
Tabla 12: Concentración promedio de malondialdehído por grupo de edad y sexo en el grupo control.....	53
Tabla 13: Coeficientes de correlación parcial entre concentración de malondialdehído, el tiempo fumando, el tiempo para consumo de primer cigarrillo al día y su frecuencia de consumo.....	59



LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formación de radicales libres.	24
Figura 2: Fuente y formación de Radicales Libres.	26
Figura 3: Daños por especies reactivas de oxígeno.	28
Figura 4: Reacciones de peroxidación lipídica.	32
Figura 5: Esquema de las vías de peroxidación lipídica en un fosfolípido y formación de malondialdehído.	33
Figura 6: Enzimas que eliminan los radicales libres.	37
Figura 7: Reacción del ácido tiobarbitúrico con el malondialdehído.	42
Figura 8: Formación aducto malondialdehído-ácido tiobarbitúrico.	46
Figura 9: Curva estándar de malondialdehído.	46
Figura 10: Comportamiento de las variables demográficas y epidemiológicas en el grupo expuesto (fumadores).	51
Figura 11: Comportamiento de las variables demográficas y epidemiológicas en el grupo control (no fumadores).	52
Figura 12: Concentración promedio de malondialdehído \pm 1 EEM en fumadores y no fumadores.	54
Figura 13: Comparación de las concentraciones séricas de malondialdehído \pm 1 EEM según el tiempo del hábito de fumar con población control (ANOVA). ..	55
Figura 14: Comparación entre las concentraciones séricas de malondialdehído \pm 1 EEM y el tiempo transcurrido hasta el primer cigarrillo del día (ANOVA).	56
Figura 15: Comparación entre las concentraciones séricas de malondialdehído \pm 1 EEM y el nivel de consumo de cigarrillos por día (ANOVA).	57
Figura 16: Concentración promedio de malondialdehído \pm 1 EEM según la presencia de algún problema de salud relacionado al hábito de fumar, $p < 0,001$	58



LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1: Consentimiento informado voluntario para la participación en el estudio de Niveles Séricos de Malondialdehído como marcador biológico del estrés oxidativo en estudiantes fumadores activos de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca+	75
ANEXO 2: Encuesta para la clasificación de consumidores de cigarrillo en la carrera de Bioquímica y Farmacia de la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca.	78
ANEXO 3: Componentes del kit de reactivo.	79
ANEXO 4: Materiales.	79
ANEXO 5: Flujograma del protocolo de ensayo.	80
ANEXO 6: Curva de calibración del kit de ensayo.	81
ANEXO 7: Características demográficas, epidemiológicas y concentración de malondialdehído en la población problema.	82
ANEXO 8: Características demográficas, epidemiológicas y concentración de malondialdehído en la población problema (no fumadores).	85
ANEXO 9: Registro fotográfico.	86
ANEXO 10: Inserto del reactivo.	90



ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

A: Absorbancia
ADN: Ácido desoxirribonucleico
AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados
CT: Catalasa
°C: Grados Celsius
-CH₂-: Grupo metilo
CO: Monóxido de carbono
EDTA: Etilendiaminotetraacetato
EROs/ ROS: Especies reactivas de oxígeno
GHS: Glutatión
GHX: Glutatión peroxidasa
H⁺: Átomo de hidrógeno
H₂O: Agua
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
HC: Humo del cigarrillo
HTA: Hipertensión arterial
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
LDL: Lipoproteínas de baja densidad
L⁺: Radical libre lipídico
MDA: Malondialdehído
NO: Óxido Nítrico
NO₂: Dióxido de nitrógeno
O₂⁻: Anión superóxido
O₂: Oxígeno
ONOO: Peroxinitrito
OH⁺: Radical hidroxilo
PGF: Prostaglandina
RL: Radicales libres
ROO⁺: Radical peroxilo
ROOH: Hidroperóxido



UNIVERSIDAD DE CUENCA

SOD: Superóxido dismutasa

T-OH: Alfa-tocoferol

TBA: Ácido Tiobarbitúrico

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

uM=umol/L: Micromoles por litro



CLÁUSULAS DE DERECHOS DE AUTOR



Universidad de Cuenca
Clausula de derechos de autor

Diego Freddy Espinoza Barzallo, autor de la tesis “NIVELES SÉRICOS DE MALONDIALDEHÍDO COMO MARCADOR BIOLÓGICO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN ESTUDIANTES FUMADORES ACTIVOS DE LA CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD DE CUENCA”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 20 de Julio del 2016

Diego Freddy Espinoza Barzallo

C.I: 0105732309



Universidad de Cuenca
Clausula de derechos de autor

José Luis Flores Orellana, autor de la tesis "NIVELES SÉRICOS DE MALONDIALDEHÍDO COMO MARCADOR BIOLÓGICO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN ESTUDIANTES FUMADORES ACTIVOS DE LA CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD DE CUENCA", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 20 de Julio del 2016

José Luis Flores Orellana

C.I: 1103898431



CLÁUSULAS DE PROPIEDAD INTELECTUAL



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

Diego Freddy Espinoza Barzallo, autor de la tesis “NIVELES SÉRICOS DE MALONDIALDEHÍDO COMO MARCADOR BIOLÓGICO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN ESTUDIANTES FUMADORES ACTIVOS DE LA CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD DE CUENCA”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 20 de Julio del 2016

Diego Freddy Espinoza Barzallo

C.I: 0105732309



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

José Luis Flores Orellana, autor de la tesis “NIVELES SÉRICOS DE MALONDIALDEHÍDO COMO MARCADOR BIOLÓGICO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN ESTUDIANTES FUMADORES ACTIVOS DE LA CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD DE CUENCA”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 20 de Julio del 2016

José Luis Flores Orellana

C.I: 1103898431



DEDICATORIA

Este trabajo en primer lugar va dedicado a mis queridos padres Gonzalo y Amparito, por ser el pilar fundamental para mí desarrollo tanto académico como de la vida, quienes me demostraron su amor y apoyo incondicional en cada momento. Mis éxitos y triunfos los debo a ustedes.

A mis hermanos Hernán, Gloria, José quienes sentaron en mi las bases de responsabilidad y deseos de superación para hacer cumplir mi sueño. Y a mis cuñadas quienes son el empuje de mis metas.

A mis sobrinas y sobrinos, son muchos, no los nombro, pero les llevo en mi corazón, quienes son mi motivación, inspiración y felicidad.

A mis tías Mariana, Alegría a quienes les considero mis segundas madres, gracias por su apoyo y ser parte de mis logros.

A mi amor, Melina, te sumaste a mi vida para ser la persona que estuvo noche y día apoyándome hasta donde te era posible, incluso más que eso y poder terminar con éxito este trabajo de titulación, Muchas gracias, amor.

Diego Espinoza B.



DEDICATORIA

El presente trabajo va dedicado a Dios, quien supo guiarme por el buen camino, darme las fuerzas necesarias para seguir adelante y no desmayar ante los inconvenientes, enseñándome a enfrentar las adversidades sin perder nunca la fe ni desfallecer por alcanzar el objetivo.

Para mis padres José y Gloria un agradecimiento imperecedero por su amor, apoyo, consejos, comprensión, persistencia, sacrificio y ayuda con recursos económicos necesarios para estudiar. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, principios, carácter, empeño, perseverancia, mi coraje para alcanzar mis metas.

A mis hermanos queridos Ana, Cristian, Francisco y Carolina gracias por estar siempre presentes no solo en esta etapa de mi vida si no en todo momento, ofreciéndome y buscando lo mejor.

A mi compañera, amiga y esposa Maribel Pinos Martínez quien ha creído en mí y me ha brindado su amor y apoyo incondicional, a mi hija Emilia Monserrath, mi inspiración y quien me impulsa a superarme en mi carrera universitaria para brindarle siempre lo mejor.

A mis abuelitos, tíos, sobrinos, suegros, cuñados, de manera especial a esa persona que pese a conocerme pocos años me ha brindado su amistad sincera y su amor como el de una segunda madre Mamita Esperanza.

Compañeros, amigos que de una y otra forma me apoyaron, especialmente en los momentos más difíciles. GRACIAS A TODOS.

José Luis Flores Orellana.



AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por habernos dado la sabiduría, salud y fortaleza para llegar a culminar una etapa más de nuestras vidas.

Un agradecimiento muy especial a la Dra. Ruth Rosas Castro MSc. directora de este trabajo de titulación, por su apoyo, motivación y uso de sus conocimientos nos supo guiar de manera clara y eficaz a la realización de este trabajo y poder culminar esta etapa de formación académica.

A la Dra. Zulma Zamora Jefa del Laboratorio de Atención al Público, por su confianza y apoyo, al permitirnos hacer uso de las instalaciones del laboratorio, para el desarrollo de la parte práctica de nuestra investigación.

A la Dra. Paulina Escobar, Dra. Paola Cabrera, Dra. Maritza Lamulle por su colaboración y asesoría para realizar nuestro trabajo de titulación, del cual estamos inmensamente agradecidos.

Y a todos nuestros docentes por impartirnos sus conocimientos durante la vida universitaria que nos ha servido para aportar en la mayor medida posible nuestros conocimientos adquiridos hacia los demás.

Los Autores.



INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han acumulado evidencias que permiten afirmar que los radicales libres se les asocian que juegan un papel muy importante en el estrés oxidativo y que lleva a una alteración en el equilibrio homeostático y al desarrollo de algunas enfermedades en el ser humano (Avello & Suwalsky, 2009). Por lo que la exposición al humo de cigarrillo, promueve la producción de especies reactivas de oxígeno, generando un desbalance entre pro-oxidantes y anti-oxidantes, resultando en un fuerte ciclo de óxido-reducción (Rodrigues & Strauss, 2009), provocando que las lipoproteínas de baja densidad (LDL) sean más susceptibles a la oxidación especialmente en presencia de ácidos grasos poliinsaturados. Estos cambios se pueden observar en adolescentes con un consumo de tan sólo 6 cigarrillos diarios. (Sabán, 2012).

El estrés oxidativo que ocurre en los organismos vivos puede ser evaluado mediante la utilización marcadores biológicos; como lo es el malondialdehído (MDA) producto de la peroxidación lipídica, el cual se le define como una característica que puede ser medida y valorada como un indicador indirecto de los cambios fisiológicos y bioquímicos, los cuales ocasionan el deterioro y muerte celular (Rodríguez et al, 2010). Se estima que en cada bocanada de humo ingresa al organismo la impresionante cifra de 1.015 radicales libres (RL), carga tan elevada que explica el estrés oxidativo al cual se someten los fumadores y que se muestra en indicadores como el aumento de malondialdehído en suero, indicador del incremento de la peroxidación lipídica y, por tanto, afectación profunda de la estructura y función celular en los adictos al hábito del tabaco (Bermúdez et al, 2010)

En nuestro país no se han publicado estudios frente a la exposición al humo de cigarrillo y su influencia en el estrés oxidativo, es por eso que este trabajo se describirá el impacto que tiene el humo de cigarrillo en las concentraciones séricas de malondialdehído, ya que estos resultados son muy importantes para el ámbito



clínico, y abrirá una nueva vía en el campo de la investigación sobre el estrés oxidativo por los que el cigarrillo resulta perjudicial para la salud.

La exposición al humo del cigarrillo aumenta la formación de radicales libres con lo que lleva al desarrollo del estrés oxidativo en los estudiantes fumadores activos, por lo que el objetivo de esta investigación es determinar la concentración de malondialdehído (MDA) como índice del estrés oxidativo provocado por el consumo del cigarrillo, en estudiantes fumadores activos de la Carrera de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca. Además evaluar el impacto a la exposición del humo del cigarrillo y su relación con las concentraciones séricas de malondialdehído.

Esta investigación ofrecerá a la población en estudio datos oportunos que sirvan para conocer más a detalle sobre el estrés oxidativo ocasionado por el consumo de tabaco, y su impacto en el daño y muerte celular. También concientizar a las personas los efectos que ocasiona en la salud el consumo del cigarrillo.

Además permitirá tener estudios relevantes sobre el estrés oxidativo ocasionado por especies reactivas de oxígeno (EROS) producto de la exposición al humo de tabaco, mediante la cuantificación de su marcador biológico malondialdehído.



1 ESTRÉS OXIDATIVO

1.1 Generalidades del estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un estado de la célula en la cual se encuentra alterada la homeostasis intracelular, donde se ve involucrado el proceso de óxido-reducción intracelular, donde se produce un desbalance entre pro-oxidantes y anti-oxidantes. El desbalance se produce a causa de una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y también por deficiencia en los mecanismos antioxidantes, conduciendo a la alteración celular (Ríos, 2003).

Cuando existe un exceso de radicales libres rompen el equilibrio oxido-reducción produciendo el llamado estrés oxidativo. Se producen durante las reacciones metabólicas, mientras las células del organismo transforman los alimentos en energía especialmente en situaciones de hiperoxia, ejercicio intenso e isquemia y también por exposición a determinados agentes externos como las radiaciones ionizantes o luz ultravioleta, polución ambiental, humo del tabaco, entre otros; que son fuente importante de radicales libres (Guerra, 2011).

1.2 Radicales libres y estrés oxidativo

1.2.1 Radicales libres

Se definen como moléculas inestables que perdieron un electrón desapareado muy reactivo en un orbital exterior, que puede iniciar reacciones en cadena por eliminación de un electrón de otra molécula que está a su alrededor para obtener su estabilidad. (Camps et al, 2010).

Los radicales libres tienen una reactividad más alta comparada con moléculas cuyos átomos están ligados a otros por covalencia (enlace por compartición de electrones). Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón (reducción) que necesita, la molécula estable que lo pierde (oxidación) se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena. Debido a que estas especies reactivas no



poseen receptores específicos, tienen una capacidad de agresión indiscriminada sobre células y tejidos vivos (Maldonado et al, 2010).

Tabla 1: Principales especies reactivas de oxígeno que se producen en los sistemas biológicos.

O_2^+	Radical anión superóxido
HO_2^+	Radical perhidroxilo
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
OH^+	Radical hidroxilo
RO^-	Radical alcoxilo
ROO^+	Radical peroxilo
gO_2	Oxígeno sínglate delta
O_2	Oxígeno molecular

Fuente: (Hernández, 2010).

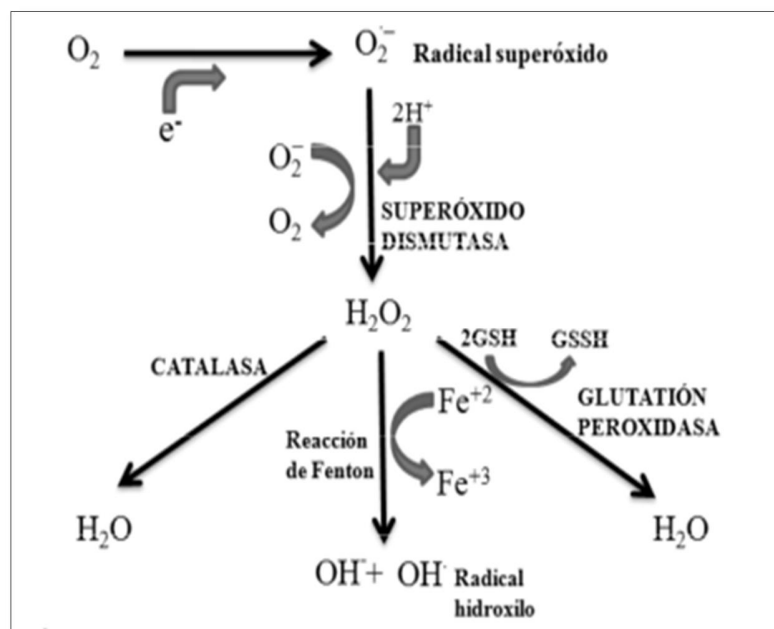
1.2.2 Biomecanismos de formación de radicales libres

Los radicales libres se producen generalmente en la célula a través de reacciones de transferencia de electrones, con o sin participación enzimática, pero mediada por iones metálicos de transición; tal es el caso del radical *OH que es generado siempre que el H_2O_2 entra en contacto con iones cobre (Cu^{+2}) o iones hierro (Fe^{+2}); ya que el H_2O_2 y los complejos metálicos están presentes en humanos (Maldonado et al, 2010). A continuación se detalla los mecanismos de formación de los radicales libres:

1. Transferencia electrónica, en la que se produce la cesión de un electrón a una molécula.
2. Pérdida de un protón de una molécula.
3. Ruptura homolítica de un enlace covalente de cualquier molécula, de manera que cada fragmento obtenido conserva uno de los electrones apareados del enlace.

Una vez que se ha formado el radical libre en la reacción de iniciación, éste tiene la capacidad de ceder el electrón a cualquier otro compuesto, originándose nuevos radicales, lo cual constituye la reacción de propagación en cadena que puede amplificarse tanto, que llegue a afectar a los tejidos corporales (Maldonado et al, 2010). Esta producción deliberada de radicales libres en el cuerpo, junto con la activación de los macrófagos, el consumo de oxígeno por la célula se incrementa drásticamente, por lo que se la llama estallido respiratorio (Vasudevan & Vaidyanathan, 2011).

Figura 1: Formación de radicales libres.



Fuente: (Maldonado et al, 2010).

La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos (Avello & Suwalsky, 2009)

Tabla 2: Vida media de las especies reactivas del Oxígeno.

Nombre de los ROS	Símbolo	Vida media
Superóxido	O_2^+	10^{-6} seg
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Minutos
Hidroxil	OH^*	10^{-9} seg
Hidroperoxil	HOO^*	N/D
Alcoxil	RO^*	10^{-6} seg
Peroxil	ROO^*	Seg
Oxígeno	O_2	10^{-6} seg
Ozono	O_3	Seg
Óxido nítrico	NO	Seg
Peroxinitrito	$ONOO^*$	10^3 seg
Dióxido de nitrógeno	NO_2	Seg
Ión nitronio	NO_2^+	Seg

Fuente: (Vasudevan & Vaidyanathan, 2011).

1.2.3 Fuentes de radicales libres

1.2.3.1 Fuentes endógenas

El predominio de los radicales libres se debe a múltiples causas: las endógenas (producidas por el propio organismo en su funcionamiento) tales como la respiración mitocondrial; la activación de polimorfonucleares; el metabolismo de ácido araquidónico; las acciones enzimáticas, entre otros (Fina, 2009) .

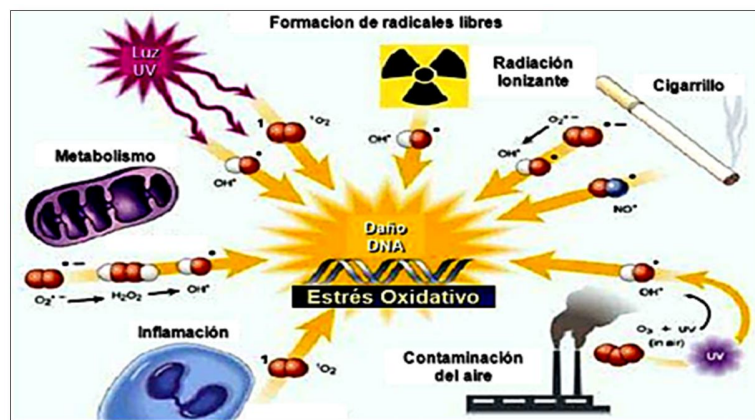
Los radicales libres generados de forma endógena destacan al radical hidroxilo (OH^*) y el anión superóxido (O_2^-). Los radicales libres de oxígeno y concretamente el radical hidroxilo (OH^*) son especies altamente reactivas; es decir poseen una vida media extraordinariamente corta y reaccionan con cualquier ácido nucleico o proteína que encuentren en su camino. La formación de radicales hidroxilo es una consecuencia de nuestro metabolismo aeróbico (Oliva et al, 2010).

1.2.3.2 Fuentes exógenas

Los radicales libres de origen endógeno se deben a factores externos: contaminación ambiental; obesidad; sedentarismo; hábitos tóxicos; estrés prolongado; desconocimiento nutricional; exposición indebida al sol o a diversas enfermedades como la diabetes, artritis, SIDA, cáncer, hepatitis; insuficiencia renal crónica, asma, enfermedades cardiovasculares (Fina, 2009).

Los diferentes tipos de radiaciones que se exponen los seres humanos tales como: radiación ionizante, la radiación ultravioleta y las radiaciones particulares son fuentes de radicales libres por transferir su energía a componentes celulares como el agua. La luz visible de longitud de onda apropiada, puede causar fotólisis de los enlaces químicos para generar radicales libres. Este proceso ocurre en presencia de fotosensibilizadores (Vasudevan & Vaidyanathan, 2011).

Figura 2: Fuente y formación de Radicales Libres.



Fuente: (Vasudevan & Vaidyanathan, 2011).

Distintos compuestos entre los que se encuentran pesticidas, contaminantes atmosféricos, el humo del cigarrillo, anestésicos, antimicrobianos, fármacos anticancerígenos y otros medicamentos cuando son metabolizados en el organismo, dan lugar a la formación de radicales libres. Realmente muchos de estos xenobióticos ejercen su efecto tóxico mediante su acción metabólica a productos intermedarios que son radicales libres (Hernández, 2010).

Al fumar cigarrillos se está expuesto a una importante fuente externa de radicales libres, cuando se produce este exceso les cuesta trabajo a los antioxidantes mantenerse en equilibrio. De hecho se requieren 20 mg de vitamina C, la tercera parte de la cantidad diaria recomendada para neutralizar el efecto de un solo cigarrillo (Yeager, 2010).

Tabla 3: Compuestos cuya toxicidad puede estar relacionada con la formación de radicales libres.

Xenobiótico	Uso
Adriamicina	Antitumoral
Alquitrán, nicotina	Hábito tabáquico
Dióxido de nitrógeno	Contaminante atmosférico
Etanol	Bebida alcohólica
Iproniazida	Antidepresivo
Isoniazida	Antimicobacteriano
Metronidazol	Antimicrobiano
Paracetamol	Analgésico y antipirético
Tetracloruro de carbono	Disolvente orgánico
Psoralenos	Tratamientos de enfermedades de la piel

Fuente: (Hernández, 2010).

1.2.4 El daño producido por especies reactivas del oxígeno

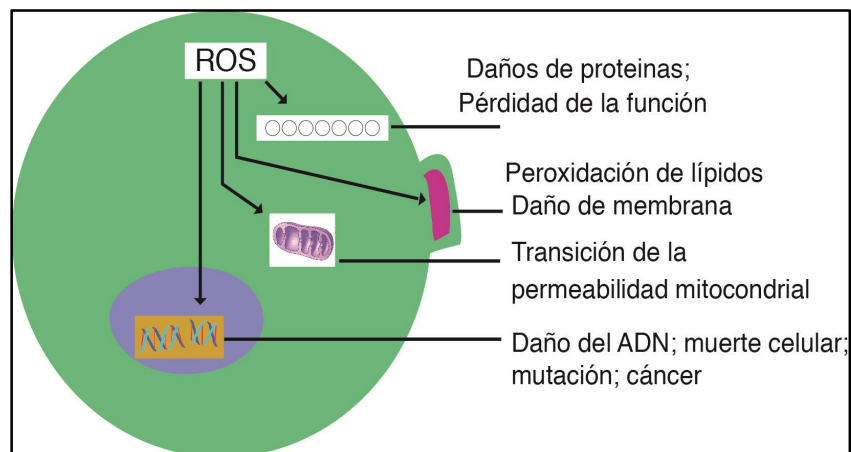
Los radicales libres son extremadamente reactivos. Tienen un radio de acción eficaz, que es de 30 Å, su vida media es de unos pocos milisegundos. Cuando un radical libre reacciona con un compuesto normal, se generan otros radicales libres. Esta reacción en cadena lleva a miles de eventos (Vasudevan & Vaidyanathan, 2011).

La peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en la membrana plasmática conduce a la pérdida de funciones de la membrana. La peroxidación de lípidos y la consiguiente degradación de los productos tales como malondialdehído (-CHO-CH₂-CHO-) se observan en los líquidos biológicos. Casi todas las

macromoléculas biológicas son dañadas por los radicales libres. Por lo tanto, la oxidación del grupo sulfhidrilo que contiene las enzimas, la pérdida de la función y la fragmentación de las proteínas puede ser evidente. Los polisacáridos también sufren degradación (Vasudevan & Vaidyanathan, 2011).

En el interior de la célula los radicales libres (RL) atacan al ácido desoxirribonucleico (ADN) que es dañado por cortes en las cadenas. El daño del ADN puede causar directamente la inhibición de la síntesis de proteínas y enzimas, e indirectamente causar la muerte celular o mutaciones y carcinogénesis (Vasudevan & Vaidyanathan, 2011).

Figura 3: Daños por especies reactivas de oxígeno.



Fuente: (Vasudevan & Vaidyanathan, 2011).

1.3 Estrés oxidativo en el consumo de cigarrillo

1.3.1 Consumo de cigarrillo en la población universitaria

El consumo de tabaco es uno de los principales factores de riesgo de varias enfermedades crónicas. A pesar de su riesgo, su consumo está muy extendido en todo el mundo. En varios países existen leyes que regulan su consumo del cigarrillo como edad para comprar, lugar donde fumar, etc. (Organización Mundial de la Salud, 2015).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Según el Estudio Epidemiológico Andino sobre Consumo de Drogas en la Población Universitaria del año 2013, la prevalencia de consumo en el Ecuador corresponde al 33,9 %, siendo considerablemente mayor la prevalencia en los hombres que en las mujeres. La edad promedio para el inicio del consumo de cigarrillo se encuentra en los 16,6 años. El mayor índice de consumo con respecto al número de cigarrillos se registra en los estudiantes de los ciclos superiores de las carreras universitarias.

A nivel nacional en el Ecuador, el consumo promedio mensual es de 68,4 cigarrillos, donde la cantidad de cigarrillos consumidos por una persona al mes juega un papel importante, puesto que su consumo habitual causa una fuerte dependencia a la nicotina. El consumo medio en hombres es de 68,8 cigarrillos al mes y en las mujeres es de 64,3 cigarrillos mensuales (INEC, 2013).

1.3.2 Propiedades físicas y químicas del humo del cigarrillo

El humo del cigarrillo se divide en dos fases: una fase sólida y otra gaseosa. La fase de partículas sólidas está constituida principalmente por el alquitrán. La fase gaseosa es el material que pasa a través del filtro. La fase sólida del humo del cigarrillo contiene más de 1.017 radicales libres/g, y la fase gaseosa contiene más de 1.015 radicales libres/bocanada. Los radicales libres asociados a la fase del alquitrán son de duración prolongada (horas a meses), mientras que los radicales asociados a la fase gaseosa son de duración más breve, actuando tan solo unos segundos (Sabán, 2012).

En el humo del cigarrillo existen más de 4.000 componentes, derivados de la hoja del tabaco como del proceso de curación del mismo y de las distintas sustancias aditivas, como azúcares, humectantes y sustancias aromáticas. Con la aspiración del cigarrillo, la temperatura de combustión llega a unos 600 °C, y se genera la denominada corriente principal de humo, que contiene numerosas sustancias vaporizadas junto con partículas mayores y radicales libres. A ello habría que añadir el humo ambiental o corriente secundaria, generado en el espacio, muchas veces cerrado, que rodea al fumador. De esta forma el humo del tabaco que llega



a los pulmones de la persona fumadora puede tener dos orígenes, la denominada corriente principal y la corriente secundaria (Sabán, 2012).

1.3.2.1 El humo del cigarrillo como fuente de especies reactivas de oxígeno

En el humo del cigarrillo (HC) se encuentra una mezcla compleja de más de 4000 compuestos químicos, de los cuales sólo pocos compuestos se han estudiado bien, entre ellos la nicotina y el monóxido de carbono (CO), pero que son mucho menos dañinos que el humo en su conjunto, pues los RL y otros oxidantes presentes en altas concentraciones en el HC pueden ser los responsables de la mayoría de los daños funcionales y morfológicos que acompañan el hábito de fumar (Gutiérrez, 2003).

En la fase gaseosa se han detectado las siguientes especies reactivas: superóxido, radicales hidroxilo y peroxilo, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete, óxido nítrico (NO), peroxinitrito y dióxido de nitrógeno (NO_2). Sin embargo, la principal fuente de superóxido y H_2O_2 en el HC es debida a los polifenoles de la fase sólida, la que contiene cientos de compuestos orgánicos. Entre ellos los más importantes son las quinonas que son una mezcla en equilibrio entre semiquinonas, hidroquinonas y quinonas, y que están muy probablemente envueltas en la toxicidad del hábito de fumar porque este sistema produce gran cantidad de EROs como superóxido, H_2O_2 y el radical hidroxilo (Gutiérrez, 2003).

El óxido nítrico (NO) de la fase gaseosa y el producido en los pulmones por la enzima sintetasa de NO al reaccionar con el superóxido originado por la autooxidación de los compuestos polifenólicos de la fase sólida forman rápidamente el peroxinitrito ($ONOO^-$), un fuerte agente oxidante y nitrante que junto a otras especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (NO, NO_2) puede desempeñar un importante papel en las enfermedades relacionadas con el cigarrillo, incluyendo el cáncer y la aterosclerosis (Gutiérrez, 2003).

Los metales de transición como el hierro, también están presentes en el HC donde tienen un papel clave en el daño celular inducido por EROs, dada su función en la



producción de especies muy agresivas mediante la reacción de Fenton (Gutiérrez, 2003).

1.3.3 Humo del cigarrillo y daño celular

La exposición excesiva y prolongada a EROs, como sucede a los fumadores activos, provoca estrés patológico a células y tejidos, estado conocido como estrés oxidativo (EO), donde se produce un daño a proteínas esenciales, peroxidación lipídica, ruptura de cadenas en el ADN, modificación de sus bases, aumento intracelular anormal de Ca^{+2} libre y en ciertos casos, apoptosis o necrosis (Gutiérrez, 2003).

Por cada bocanada de humo, que ingresa al organismo existe una carga muy elevada de radicales libres, que explica al EO que se ven sometidos los fumadores activos y que se muestra en indicadores como el aumento de malondialdehído en suero, de los dienos conjugados del ácido linoleico y de los niveles de F2-isoprostanos en estos individuos, indicadores todos del incremento en la peroxidación lipídica y, por tanto, afección profunda de la estructura y función celular en los adictos al hábito de fumar (Gutiérrez, 2003).

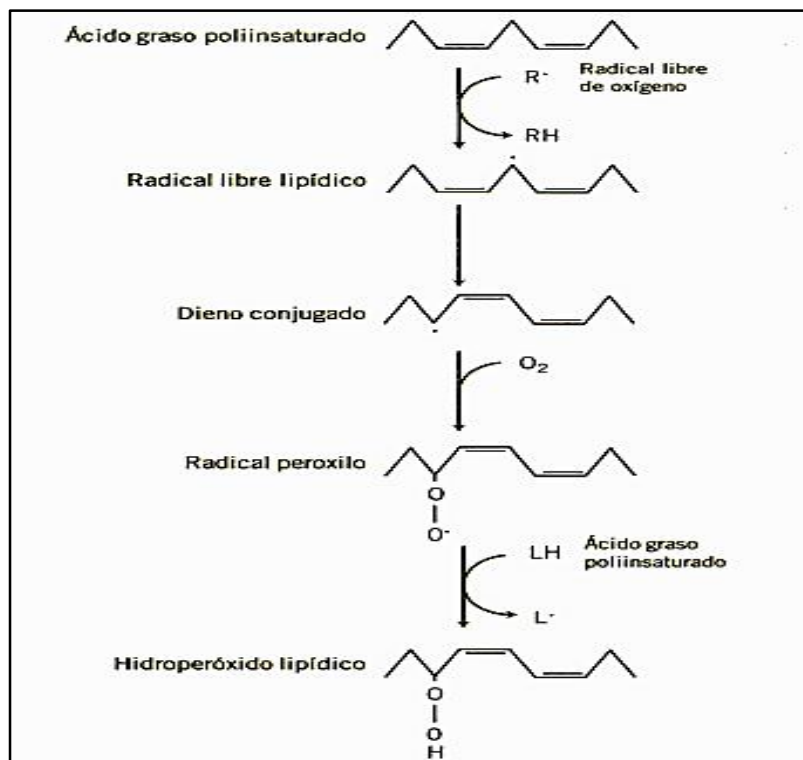
1.3.4 Efecto de los radicales libres en la peroxidación lipídica

El humo del cigarrillo hace a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) sean más susceptibles a la oxidación especialmente en presencia de ácidos grasos poliinsaturados. Los radicales libres reaccionan con los ácidos grasos poliinsaturados de los lípidos de membrana, provocando el deterioro oxidativo de estos. Este fenómeno, conocido como peroxidación lipídica, es el responsable de la alteración de la cubierta de las LDL. La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de estas lipoproteínas las modifica de tal manera, que las hace susceptibles, de ser captadas por los macrófagos de la íntima arterial, iniciándose así el proceso aterosclerótico en algunos casos. Se ha demostrado in vitro que el humo del tabaco, presumiblemente mediado por la nicotina, inhibe la paroxanasa,

una enzima que protege las lipoproteínas de la peroxidación (Sabán, 2012) (Hernández, 2010).

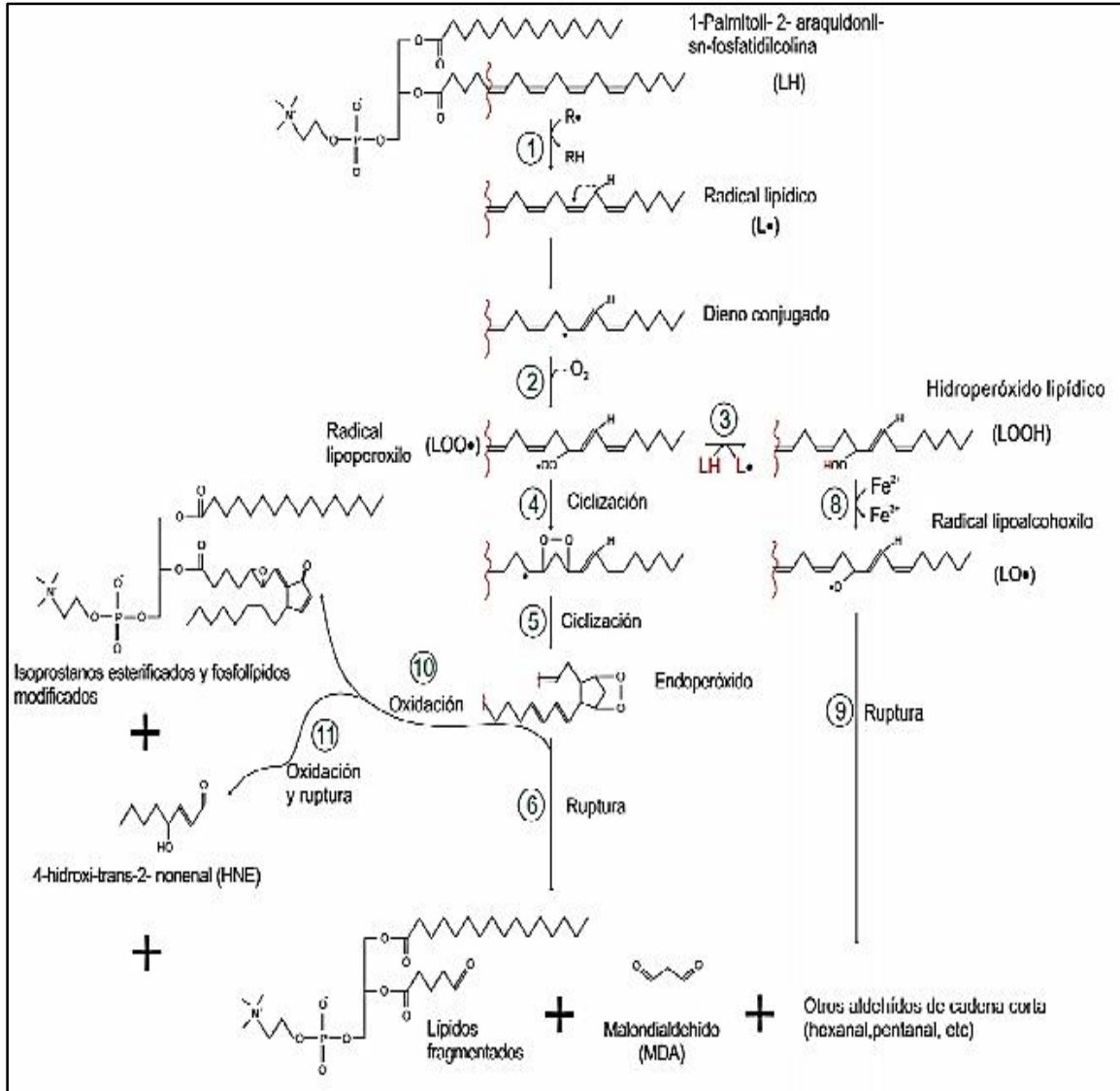
El proceso comienza cuando el radical libre quita un átomo de hidrógeno (H^+) de un grupo metileno ($-CH_2-$) para rendir un radical libre lipídico (L^+). La presencia de un doble enlace en el ácido graso debilita los enlaces C-H del átomo de carbono adyacente en ese doble enlace y, de esta manera, facilita la liberación de H^+ . El radical lipídico formado tiende a estabilizarse por medio de un reajuste molecular que produce un dieno conjugado, el cual reacciona con el oxígeno molecular para originar un radical peroxilo (ROO^+). El radical peroxilo puede quitar un átomo de hidrógeno de otra molécula lipídica para convertirse en un hidroperóxido ($ROOH$) y formar un nuevo radical libre lipídico. Este radical libre lipídico puede reaccionar con otra molécula de oxígeno y así puede establecerse una cadena de propagación del daño oxidativo (Hernández, 2010).

Figura 4: Reacciones de peroxidación lipídica.



Fuente: (Hernández, 2010).

Figura 5: Esquema de las vías de peroxidación lipídica en un fosfolípido y formación de malondialdehído.



Los átomos de hidrógeno de los ácidos grasos polisaturados, luego de la interacción con un radical (R^*), son removidos para formar un radical lipídico (L^*) (1). El radical lipídico reacciona con oxígeno molecular para formar un radical peroxilo (LOO^*) (2). El radical peroxilo puede sustraer un hidrógeno de una molécula de ácido graso cercana, generando un hidroperóxido lipídico ($LOOH$) estable en ausencia de metales (3) o bien, por ciclización, (4) producir un peróxido cíclico. Tras una segunda ciclización (5) puede formar un endoperóxido que al descomponerse (6) genera diversos lípidos fragmentados, malondialdehído y otros aldehídos e hidrocarburos de cadena corta. El hidroperóxido lipídico puede reaccionar con metales redox (por ejemplo hierro) para producir un radical alcohexilo (LO^*) (8) que por ruptura (9) puede generar aldehídos e hidrocarburos. Por oxidación (10), el endoperóxido genera isoprostanos esterificados y fosfolípidos modificados. Una nueva reacción de oxidación y posterior ruptura (11) genera aldehídos tales como el 4-hidroxi-trans-2-nonenal. Los productos de peroxidación lipídica son capaces de reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos.

Fuente: (Valko et al, 2005) (Spickett et al, 2010).



1.4 Estrés oxidativo y enfermedades

Existe una serie de procesos patológicos atribuibles razonablemente al ataque de los radicales libres (RL), al menos estarían implicados en algunas de sus fases o secuencias bioquímicas.

1.4.1 El envejecimiento

Se caracteriza por la acumulación de todas las macromoléculas dañadas, y un desgaste progresivo de los mecanismos de reparación y degeneración. El envejecimiento celular es el resultado de la acumulación de lesiones orgánicas debidas a la acción de radicales libres. También se ha detectado una menor actividad proteolítica que en las células jóvenes, una disminución de las concentraciones de antioxidantes e inactivación de las enzimas detoxificadoras de RL y una acumulación de proteínas oxidadas no degradadas (Guerra, 2011).

1.4.2 La aterosclerosis

Es un proceso que comienza con un exceso de RL, se produce cuando se sustrae un electrón a la grasa poli-insaturada del colesterol LDL. En determinadas condiciones oxidativas las lipoproteínas se fragmentan y se alteran determinados residuos de aminoácidos de la apoproteína de la LDL. Estas LDL oxidadas o productos liberados de ellas, van a tener mayor poder aterogénico ya que son captadas más ávidamente por los macrófagos, son citotóxicas para el endotelio y estimulan la producción de factores vasoactivos, de adhesión, trombóticos y de proliferación de células musculares lisas de la vasculatura, iniciando o extendiendo la lesión aterosclerótica. Se ha demostrado una estrecha relación entre RL y lipoproteínas de baja densidad (LDL) y se sabe que su aumento tiene un conocido valor predictivo directo en la aparición de aterosclerosis. Muchos factores de riesgo de la aterosclerosis ampliamente identificados, como pueden ser la hipertensión, hipercolesterolemia y tabaquismo, pueden actuar induciendo un desequilibrio entre prooxidación y antioxidación (Guerra, 2011).



1.4.3 Hipertensión arterial

La hipertensión arterial (HTA) puede ser considerada como un conjunto de resultados sistémicos de las lesiones vasculares, parenquimatosas, entre otras; producidas por los RL. En la HTA se ha encontrado aumento de la peroxidación de lípidos, tanto en plasma como en las membranas celulares, así como un aumento en la cantidad total de lípidos y una disminución de la capacidad antioxidante. La HTA predispone a acelerar la aterosclerosis, al menos en parte a causa de la sinergia entre elevación de presión sanguínea y otros estímulos aterogénicos que inducen estrés oxidativo en los vasos arteriales (Camp et al, 2010)

1.4.4 Diabetes

Los altos niveles de glucosa característicos de la diabetes inducirían la glicosilación no enzimática de proteínas, donde se altera la estructura y la función de las proteínas. Es sabido que la autooxidación de azúcares genera especies reactivas de oxígeno. A concentraciones altas de glucosa, típicas de estados diabéticos, la producción de RL se incrementa en presencia de metales de transición. Pero el aumento de estrés oxidativo en los diabéticos, no está relacionado únicamente con la aceleración en la producción de EROs, sino también por la disminución de antioxidantes (Camps et al, 2010).

1.4.5 Cirrosis, insuficiencia hepática y hepatopatía alcohólica

El daño hepático inducido por alcohol está relacionado, al menos en parte, a un estrés oxidativo causado por la producción de RL y/o a un descenso de los antioxidantes (Camps et al, 2010).

1.4.6 La catarata senil

En esta enfermedad el cristalino está sujeto al constante bombardeo de radiaciones diversas causantes de procesos químicos irreversibles, que con el tiempo, por acumulación, producen una creciente opacificación del cristalino; es decir, la catarata. Los RL generados en el cristalino producen entrecruzamiento,



desnaturalización, degradación de sus proteínas y otros efectos, formándose gránulos microscópicos de composición compleja por apelsonamiento desordenado de moléculas, que crecen en tamaño y cantidad, produciendo inicialmente el efecto tyndall, y finalmente la total opacificación del cristalino (Guerra, 2011).

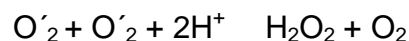
1.4.7 Cáncer

Este tipo de enfermedad es de origen multifactorial, se ha sugerido la implicación de los RL en el desarrollo tumoral. El humo del tabaco es el causante del cáncer de pulmón: además de la nicotina y del alquitrán, en el que se encuentran RL en abundancia, que atacan los tejidos y destruyen las sustancias protectoras presentes en ellos, tenemos óxidos radicalarios de nitrógeno que forman con las proteínas carcinógenos como las nitrosaminas. Las especies reactivas de oxígeno estimulan el crecimiento de las células musculares lisas, lo que sugiere un papel del estrés oxidativo en la neovascularización tumoral o angiogénesis (Guerra, 2011).

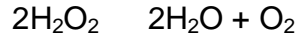
1.5 Sistema antioxidante y terapia antioxidante

El daño oxidativo en nuestro organismo puede ser prevenido por moléculas antioxidantes, las cuales son capaces de donar electrones para estabilizar a los radicales libres y neutralizar sus efectos perjudiciales, éstas pueden ser de origen endógeno y exógeno (Delgado et al, 2010).

- **Antioxidantes endógenos:** Estos son sintetizados por el organismo, dentro de estos tenemos a la superóxido dismutasa (SOD) que cataliza la dismutación del $O_2^{\cdot -}$ para dar origen al H_2O_2 de acuerdo a la siguiente reacción:

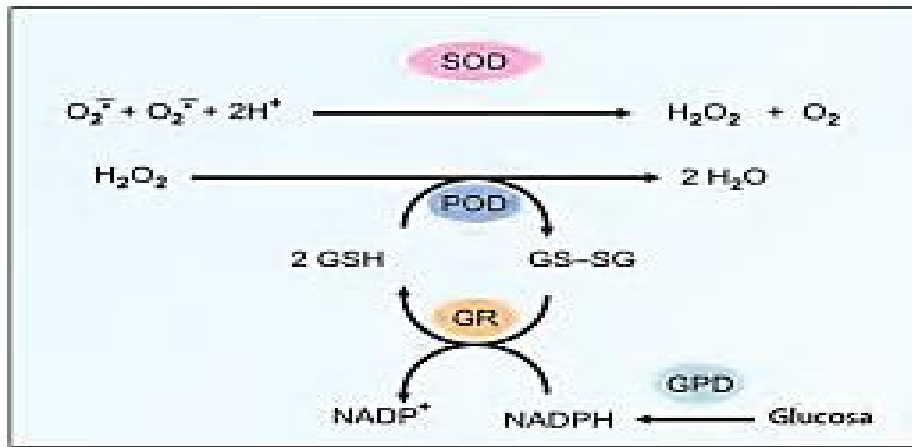


El H_2O_2 es descompuesto en oxígeno y agua por la catalasa (CT), mediante la siguiente reacción:



También tenemos a la glutatión peroxidasa (GHX), dependiente de selenio que cataliza la reducción del H_2O_2 . La glutatión (GHS), quien contribuye con la GHX, para reducir el H_2O_2 a agua, así mismo neutraliza al OH^* cediéndole un electrón. Además recicla antioxidantes como la vitamina C, reduciéndolos para que puedan continuar neutralizando a los RL (Delgado et al, 2010).

Figura 6: Enzimas que eliminan los radicales libres.



Fuente: (Vasudevan & Vaidyanathan, 2011)

- **Antioxidantes exógenos:** Proviene de fuentes externas, se encuentran principalmente en los alimentos de origen natural (Tabla 5), entre estos están las vitaminas A, E y C, los β -carotenos, luteína, flavonoides, licopenos, el ácido lipoico, los cofactores (cobre, zinc, manganeso, hierro y selenio) que son necesarios para la actividad del sistema enzimático endógeno y la coenzima Q (Delgado et al, 2010).

Algunos reportes muestran a la terapia antioxidante como una alternativa para prevenir y contrarrestar a las diversas enfermedades asociadas al estrés oxidativo,



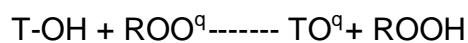
manteniendo el balance entre la formación y neutralización de los RL (Delgado et al, 2010).

Los antioxidantes que se obtienen de la dieta, pueden actuar de dos formas: primero, previniendo la generación excesiva de RL, evitando así que se produzca el daño celular por efecto del estrés oxidativo. Y segundo, después de que se ha producido el daño, los antioxidantes pueden controlar los niveles de RL evitando que el daño continúe avanzando y con ello algunos síntomas de las enfermedades producidas por el efecto del estrés oxidativo pueden disminuir (Delgado et al, 2010).

1.5.1 Funciones de los antioxidantes

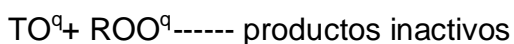
Además de las enzimas de desintoxicación, existen otros dos tipos de antioxidantes.

- **Antioxidantes preventivos.** Estos inhiben la producción inicial de los radicales libres. Estos son la catalasa, la glutatión peroxidasa y el etilendiaminotetraacetato (EDTA).
- **Antioxidantes que rompen la cadena de propagación.** Actúan inhibiendo la fase de propagación. Estos incluyen a SOD, al ácido úrico y a la vitamina E. También pueden interceptar a los radicales libres peroxilo e inactivarlos antes de que los AGPI puedan ser atacados.



El hidrógeno fenólico del alfa-tocoferol reacciona con el radical peroxilo convirtiéndolo en un producto hidroperóxido. El radical tocoperoxilo así formado es estable y el ciclo no se propaga más.

El radical tocoperoxilo puede reaccionar con otro radical peroxilo hasta que es convertido a un producto inactivo.



- **La Vitamina E (alfa-tocoferol)** es el antioxidante natural más eficaz que actúa en los tejidos rompiendo la reacción de propagación. Solo algunas trazas de tocoferol se requieren para proteger a considerables cantidades de grasas poliinsaturada (una molécula de tocoferol por cada 1.000 moléculas de lípidos) (Vasudevan & Vaidyanathan, 2011).

Tabla 4: Antioxidantes exógenos.

Antioxidante	Fuente	Acción antioxidante
Vitamina E (tocoferol)	Aguacate, espinacas, tomate, brócoli, zanahoria, arroz integral, lentejas, huevos, mantequilla, plátano, moras, frutos secos.	Mantiene la integridad de la membrana celular, protege la destrucción de la vitamina A, retarda el envejecimiento celular.
Vitamina C (ácido ascórbico)	Acelgas, tomates, perejil, pimiento verde, coliflor, nabos, grosellas, cítricos, melón, kiwi, fresas.	Inhibidor de la oxidación de lípidos, regenera a la vitamina E, ofrece protección contra todo tipo de cánceres.
-caroteno (pro- vitamina A)	Zanahoria, tomates, espinacas, melón, melocotón, mango.	Protege al DNA, detiene el deterioro de tejidos
Flavonoides (polifenoles)	Espinacas, cebolla, ajo, té verde, vino, manzanas, peras, cítricos.	Quela metales
Oligoelementos Selenio (Se), Zinc (Zn), Manganeso (Mn), Cobre (Cu)	Carne, pescado, cereales integrales, lácteos, ajo, cebollas, brócoli, frutos secos, te, piña, vísceras, cacao y derivados.	Forman parte del núcleo activo de las enzimas con actividad antioxidante, mantienen en buen estado las funciones hepáticas, cardíacas y reproductoras, protector contra el cáncer.

Fuente: (Delgado et al, 2010).

1.6 Marcadores biológicos del estrés oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno determinan un daño a los diversos componentes celulares. A partir de ese daño a biomoléculas, se forman sustancias que indirectamente nos muestran el grado de estrés oxidativo que existe en el



organismo vivo. La modificación molecular, por oxidación no controlada metabólicamente, se estudia mediante el aislamiento y cuantificación de los distintos productos que se generan. Los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos rinden metabolitos de oxidación de fácil identificación y valoración (Camps, et al, 2010).

Para cada una de las moléculas susceptibles de modificación por estrés oxidativo existe un marcador representativo que así lo identifica. Para la peroxidación lipídica se mide, habitualmente, por la cantidad de malondialdehído (MDA) encontrado en suero, orina o muestra de tejido. Pero existen otros metabolitos igualmente válidos, si bien, los métodos analíticos requieren tecnologías más sofisticadas, como es el caso de compuestos volátiles (pentano, etano), isoprostanoides, etc. (Camps et al, 2010).

Tabla 5: Marcadores de estrés oxidativo.

Productos de peroxidación lipídica	Malondialdehído (MDA), TBARS.
Productos proteicos oxidados	Proteínas carboniladas
Productos de la glucoxilación	Pentosinas
Dosaje directo de radicales libres	Anión superóxido, Óxido nítrico
Dosaje indirecto de radicales libres	Nitrotirosina
Niveles de sustancias antioxidantes	Coenzima Q10
Anticuerpos anti-LDL y anti-DNA oxidados	

Fuente: (Camps et al, 2010).

Para el estudio de la oxidación de proteínas el protocolo más utilizado es la formación de grupos carbonilos, que puede complementarse con la identificación de disulfuros proteicos, como resultado de la oxidación de grupos tiólicos reducidos (Camps et al, 2010).

En la valoración del estrés oxidativo, también es recomendable realizar la cuantificación de actividades o concentraciones de antioxidantes. El análisis enzimático proporciona información válida sobre posibles deficiencias en la



síntesis o inactivación de estas, lo que orientará hacia un posible agotamiento de las proteínas responsables, o bien, déficit nutricionales de diversa naturaleza (Camps et al, 2010).

1.7 Métodos de evaluación del estrés oxidativo

Existen métodos directos e indirectos. Entre los primeros tenemos la medición de agentes antioxidantes, lo cual es muy difícil por su corta vida media y lo caro de los equipos; lo que obliga a medirlos indirectamente mediante:

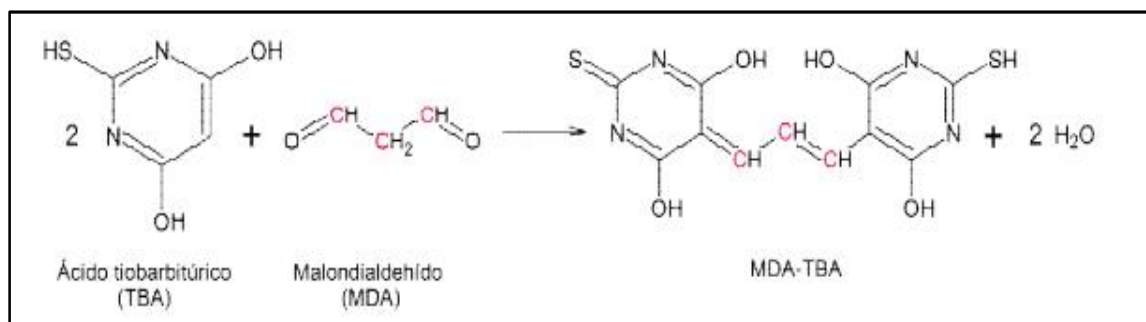
- **Determinación de productos terminales de la acción oxidante sobre biomoléculas:** Los métodos para medir peróxidos lipídicos son el patrón de oro cuando se trata de probar el papel de los oxidantes en algún tipo de daño celular. Ejemplo, malondialdehído (MDA).
- **Medición de la concentración de antioxidante:** Que se realiza con la técnica de HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), sobre material biológico que puede ser plasma, orina o tejido. A fines prácticos solo se determinan niveles plasmáticos de los antioxidantes siguientes: vitaminas E, B, C, coenzima Q (ubiquinol), glutatión y vitamina C.
- **Medición del estado oxidativo:** Refleja el balance entre el sistema oxidante y pro-oxidante y es beneficioso en muchas enfermedades (Rodríguez et al, 2010).

1.7.1 Ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

El uso de la reacción con ácido tiobarbitúrico (TBA) para medir la peroxidación lipídica se remonta al año 1944 cuando Kohn y Liversedge (1944) observaron que tejidos animales incubados aeróbicamente con TBA producían un color rosado. Bernheim y colaboradores (1948) descubrieron que el color rosado se debía a un complejo formado por productos de oxidación de ácidos grasos no saturados y TBA. Yu y Sinnhuber (1957) reportaron que malondialdehído (MDA) era la principal sustancia reactiva al TBA (Fagali, 2011).

El método espectrofotométrico del TBA es el más comúnmente utilizado para la cuantificación de MDA. La reacción ocurre por ataque del MDA sobre el grupo metileno activo del TBA. Un mol de MDA reacciona con dos moles de TBA en medio ácido y a alta temperatura. La velocidad de esta reacción depende de la concentración de TBA, la temperatura y el pH. El pigmento generado posee un pico máximo de absorbancia a 532-535 nm y otro secundario a 245-305. El ensayo de TBA puede determinarse también por un procedimiento espectrofluorométrico dado que el espectro de excitación del pigmento TBA-MDA posee un máximo a 532 nm. La especificidad de este método es similar al del método espectrofotométrico, debido a que otros compuestos originados en la degradación de peróxidos lipídicos también pueden generar fluorescencia (Cell Biolabs. Inc, 2012).

Figura 7: Reacción del ácido tiobarbitúrico con el malondialdehído.



Fuente: (Cell Biolabs, INC. STA-330).



2 METODOLOGÍA

2.1 Tipo de investigación o estudio

Estudio descriptivo, cuasiexperimental.

2.2 Variables

2.2.1 Identificación de variables

VARIABLES	TIPO	RELACION
Malondialdehído	Continua	Dependiente
Características personales: Edad, sexo; hábito de fumar: tiempo fumando, tiempo al primer cigarrillo al día, número de cigarrillos/día.	Discreta	Intervinientes

Como indicadores de las características personales y hábitos tabáquicos, se utilizó el registro de datos obtenido de las encuestas realizadas a los estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia (Anexo 2).

2.3 Población y muestra

El universo de estudio estuvo constituido por 70 estudiantes de la Facultad de Ciencias Químicas de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca, divididos en dos grupos: 70% (n=50) estudiantes fumadores activos a quienes se consideró grupo expuesto y 30% (n=20) estudiantes no fumadores a quienes se consideró como grupo control.

El muestreo fue con una estrategia no probabilística, esto es seleccionando los participantes que desearon participar voluntariamente a criterio del investigador, debido a la accesibilidad de la selección y que el kit de reactivo fue solo para 200 ensayos. En este proceso se realizó una determinación de MDA en cada alumno o



alumna con muestras de suero obtenidos de los alumnos seleccionados.

2.4 Criterios de inclusión y exclusión

2.4.1 Criterios de inclusión de casos

Se incluyó a los estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia fumadores activos, que manifestaron su voluntad de participar previa firma del consentimiento informado.

2.4.2 Criterios de exclusión de casos

Se excluyeron aquellos estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia fumadores que tengan una terapia antioxidante.

2.4.3 Criterios de inclusión de controles

Se incluyó a los estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia que no estén sujetos a consumo de cigarrillo.

2.4.4 Criterios de exclusión de controles

Se excluyeron aquellos estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia fumadores pasivos.

2.5 Procedimientos y técnicas

2.5.1 Procedimiento cumplido para la investigación

- **Aprobación:** Se solicitó aprobación del estudio a la Unidad de Titulación de la Carrera de Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca.
- **Consentimiento informado:** Se obtuvo de los alumnos de la Carrera de Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca, según las consideraciones bioéticas en la investigación (Méndez & Silveira, 2007) (Anexo 1).
- **Encuesta de consumo de Tabaco:** La encuesta se realizó de acuerdo al



cuestionario para la clasificación de consumidores de tabaco para jóvenes. (Londoño et al, 2011) (Anexo 2).

- **Instrumental/laboratorio:** Para los análisis sanguíneos se realizó una extracción sanguínea a cada estudiante, mediante venopunción basado en los procedimientos prescritos en el Manual de Flebotomía. (Navarro, 2005) Se utilizó tubos con sistema al vacío de tapa roja y capacidad para 10 mL.

2.5.2 Análisis de laboratorio

2.5.2.1 Tratamiento de la muestra

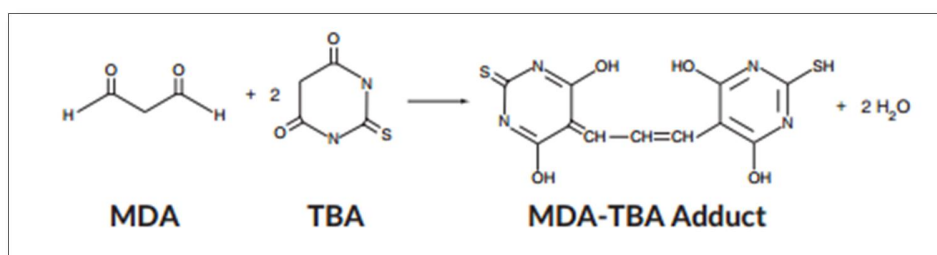
Una vez obtenidos las muestras de sangre, se procedió a centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos, obteniendo la fracción de suero a la cual se le adicionó un antioxidante Butil hidroxitolueno (BHT) (100 uL de suero=1uL BHT) que fueron almacenados a -80°C para, posteriormente, realizar la pertinente determinación.

2.5.2.2 Determinación de malondialdehído

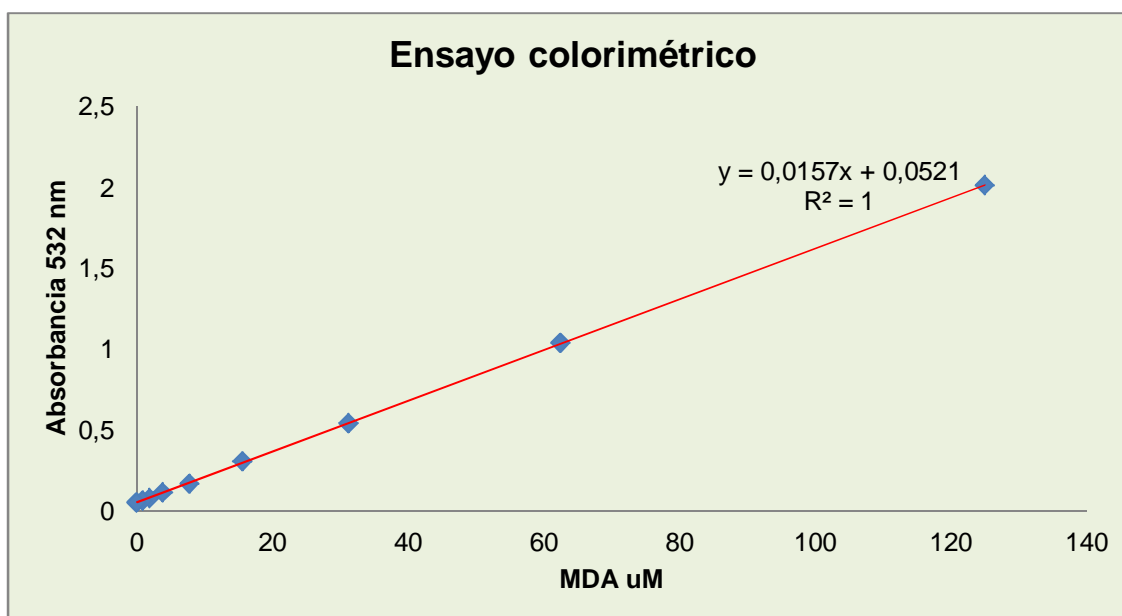
Con las muestras almacenadas en ultracongelación se procedió a la determinación de malondialdehído de acuerdo a las especificaciones del kit comercial OxiSelect[®] TBARS Assay Kit (MDA Quantitation) (Anexo 10).

2.5.2.3 Principio del ensayo

El ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS Assay kit) 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 a 540 nm. El contenido de MDA en las muestras desconocidas se determina por comparación con la curva estándar MDA predeterminado (Figura 9).

Figura 8: Formación aducto malondialdehído-ácido tiobarbitúrico

Fuente: (Cell Biolabs. INC. STA-330)

Figura 9: Curva estándar de malondialdehído.

Fuente: Autores.

La curva estándar de MDA se creó como se describe en el protocolo de trabajo, datos y procedimientos inserto del reactivo (Anexo 6 y 10).



2.5.2.4 Información del reactivo: OxiSelect[®] TBARS Assay Kit (MDA Quantitation)

El ensayo de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) ha proporcionado la información pertinente sobre la actividad de los radicales libres en estados de enfermedad. El Kit de ensayo de TBARS OxiSelect[®] ofrece un sistema simple, reproducible y consistente para la detección de la peroxidación de lípidos en homogeneizados de orina, plasma, suero, lisados, y tejidos.

Tabla 6: Descripción del kit de reactivo

Marca	CELL BIOLABS, INC. STA-330
Lote	10091311
Procedencia	USA
Fecha de expiración	04/2017

Fuente: (Cell Biolabs, INC. STA-330).

2.5.2.5 Flujoograma de trabajo (Anexo 5 y 10)

Las determinaciones espectrofotométricas, se realizaron en un lector Multi-Modal Synergy H1 compatible para microplacas.

2.5.2.6 Materiales y reactivos (Anexo 3 y 4)

2.5.2.7 Equipo lector de microplacas Synergy H1, Biotek

El Synergy[®] H1 es un flexible lector multi-modal de microplacas basado en monocromadores, que se puede escalar a un sistema híbrido patentado de alto desempeño con la adición de un módulo óptico basado en filtros. Las ópticas del monocromador usan un diseño de gradillas cuádruples de tercera generación, que permiten trabajar con cualquier longitud de onda de excitación o de emisión en pasos de 1 nm. Este sistema es compatible con metodologías de intensidad de fluorescencia superior e inferior, absorbancia UV-visible y detección de luminiscencia de alto desempeño. Es el sistema ideal para todas las aplicaciones



estándar en microplacas que se encuentran en laboratorios de investigación en ciencias para la vida (Bio Tek Instruments, 2016).

2.6 Análisis de la información

El procesamiento estadístico se realizó en el programa SPSS v.22.0. Se obtuvieron medidas de resumen como media, desviación estándar y error estándar de la media para variables cuantitativas y para variables cualitativas se resumieron en frecuencias relativas (%) y absolutas, las mismas que se representaron en tablas y gráficos.

Para comparar las medias de las concentraciones séricas de MDA en dos grupos diferentes se empleó la prueba Test T de Student mientras que para más de dos grupos se empleó el ANOVA de una vía con la prueba de Duncan para observar cuáles grupos diferían entre sí.

Para las tablas de contingencia se empleó la prueba Chi-cuadrado. Cuando las tablas tenían pocas frecuencias por casillas se utilizó la prueba de exacta de Fisher.

Para establecer relación lineal se empleó el coeficiente de correlación lineal de Pearson y para eliminar el efecto confusor de las variables edad y presencia de enfermedades se empleó el coeficiente de correlación parcial.

En todos los casos se empleó un nivel de significancia estadística de $p < 0,05$, lo que significa la probabilidad de estar equivocados al rechazar la H_0 en una prueba de hipótesis.

El programa Excel 2013 se empleó para realizar los gráficos.

2.7 Aspectos éticos de la investigación

En la presente investigación se recurrió a la firma del consentimiento informado, donde fueron informados del procedimiento que tiene la misma y su condición



UNIVERSIDAD DE CUENCA

voluntaria de participación. También se garantizó el derecho a la privacidad, anonimato y confidencialidad en el manejo de la información de cada uno de los participantes.

Este trabajo de titulación cumple con los objetivos citados en el reglamento general de titulación de la Universidad de Cuenca y está exento de conflictos de interés.

El informe final de este trabajo de titulación pasará a formar parte del repositorio digital de la Universidad de Cuenca, de acuerdo a sus disposiciones legales, y que sirva de un medio de información para instituciones de salud y futuras investigaciones, eso sí respetando la propiedad intelectual de los autores.

3 RESULTADOS

3.1 Descripción general de la muestra

En esta investigación se trabajó con 70 estudiantes de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca, dividida en dos grupos, grupo expuesto (fumadores activos) y grupo control (no fumadores). A continuación se resumen las características de la población de estudio (Anexo 7 y 8).

Tabla 7: Comportamiento de las variables demográficas y epidemiológicas en el grupo expuesto (fumadores).

Variable	N	%
Edad		
menos 23 años	19	38
23 y más años	31	62
Sexo		
M	40	80
F	10	20
Problema de salud		
NO	17	34
SI	33	66
Tiempo fumando (años)		
menos de 3 años	13	26
de 3 a 5 años	9	18
más de 5 años	28	56
Tiempo al primer cigarrillo al día		
30 min. o menos	9	18
31 min a 60 min	9	18
más de 60 min	32	64
Frecuencia de cigarrillos al día		
1 a 10 cig./d	20	40
11 a 20 cig./d	13	26
21 a 30 cig./d	17	34

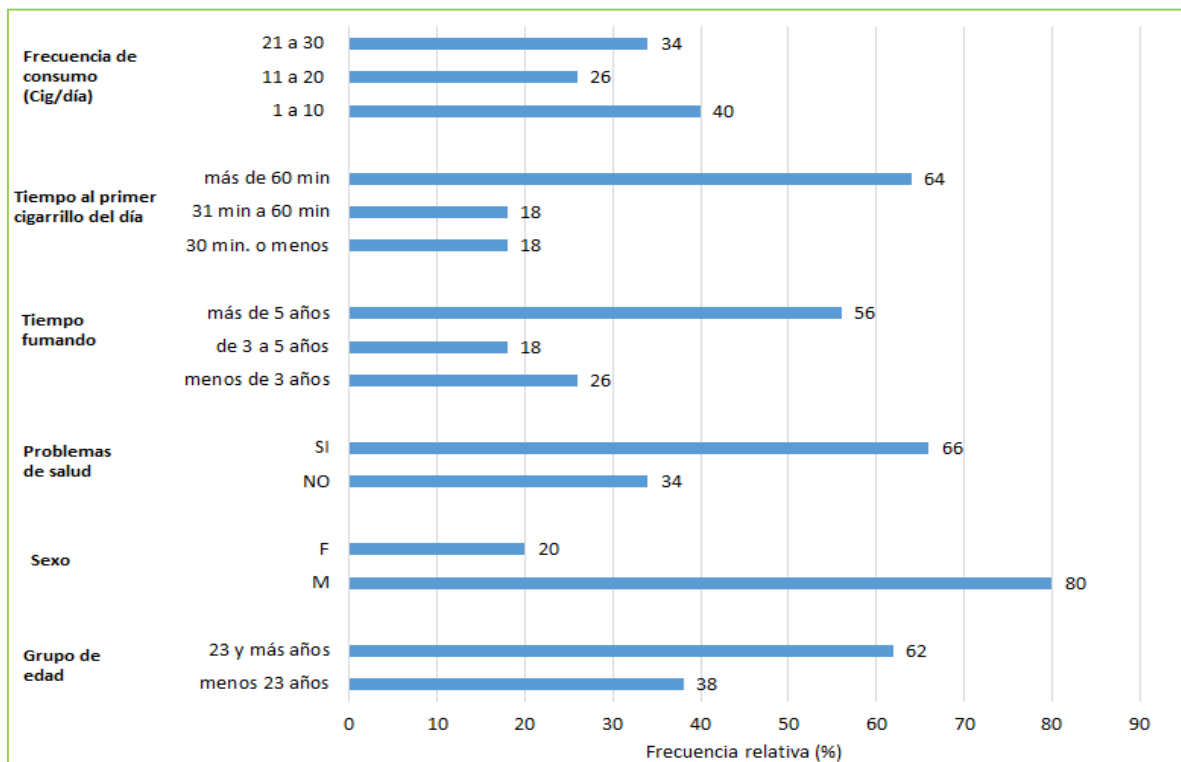
F: Femenino, M: Masculino, **Fuente:** Autores.



En ésta, predominaron las personas con edades de 23 años y más (62%) y las del sexo masculino (80%). Los problemas de salud se presentaron de forma más frecuente entre los fumadores respecto a los no fumadores (dos de cada tres fumadores), siendo la falta de condición física el más frecuente de estos problemas (93,9 %) seguido de las infecciones respiratorias (6,1 %).

En cuanto a las características del hábito de fumar de los participantes, más de la mitad de los fumadores consumía hace más de cinco años, y aproximadamente el 64 % comenzaba su día fumando un cigarrillo a partir de una hora después de levantarse en la mañana. Además predominaron las personas que fumaban con una frecuencia de 1 a 10 cigarrillos por día, seguidos de los fumadores de más de 21 cigarrillos. No hubo ningún participante que fumara más de 30 cigarrillos diarios.

Figura 10: Comportamiento de las variables demográficas y epidemiológicas en el grupo expuesto (fumadores).



Fuente: Autores.



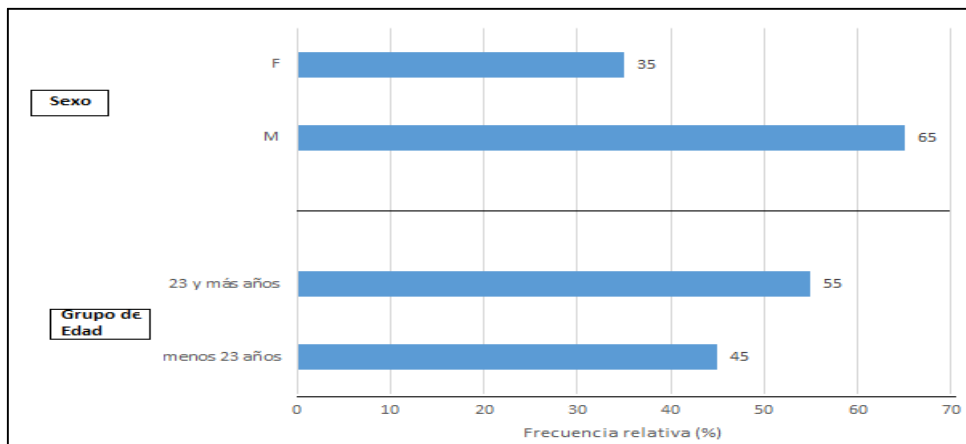
En esta figura se pueden apreciar mejor la frecuencia de presentación de las características socio-demográficas en la muestra de estudio, donde llama la atención el predominio del género masculino, la elevada frecuencia de problemas de salud, el elevado número de personas que fuman por más de 5 años y que la mayoría de ellas consume su primer cigarrillo al día después de una hora de levantarse. Asimismo, que el 60 % de los fumadores consumían más de 10 cigarrillos al día, de los cuales más de la mitad son clasificados como fumadores fuertes (más de 20 cigarrillos al día).

Tabla 8: Comportamiento de las variables demográficas y epidemiológicas en el grupo control (no fumadores).

Variable	N	%
Edad		
menos 23 años	9	45,0
23 y más años	11	55,0
Sexo		
M	13	65,0
F	7	35,0

F: Femenino, M: Masculino, **Fuente:** Autores.

Figura 11: Comportamiento de las variables demográficas y epidemiológicas en el grupo control (no fumadores).



Fuente: Autores.

Por otro lado, en el grupo control no hubo tanto contraste respecto a la edad de los pacientes 55% 23 y más años y 45% menos de 23 años, pero de igual modo predominó el sexo masculino 65%.

3.2 Relación de la concentración de malondialdehído según las variables edad y sexo

Tabla 9: Concentración promedio de malondialdehído por grupo de edad y sexo en el grupo expuesto (fumadores activos).

Variable	n	Concentración MDA ($\mu\text{mol/l}$)			P
		MEDIA	S	EE	
Edad					
menos 23 años	19	8,77	2,84	0,65	<0,001
23 y más años	31	11,94	2,77	0,50	
Sexo					
M	40	10,63	3,15	0,50	0,619
F	10	11,19	3,37	1,07	
Total	50	10,74	3,17	0,45	

S: Desviación estándar; EE: error estándar de la media; p: probabilidad de error tipo I en las pruebas de hipótesis. **Fuente:** Autores.

El grupo de mayor edad presentó niveles superiores de MDA promedio, mientras que no hubo diferencias en la concentración de este metabolito según el sexo de los individuos fumadores estudiados.

Tabla 10: Concentración promedio de malondialdehído por grupo de edad y sexo en el grupo control.

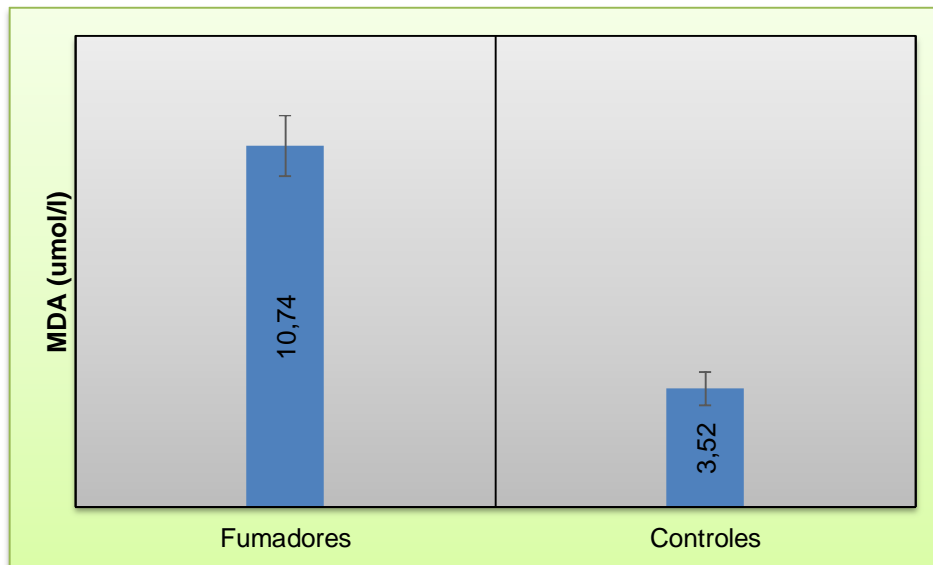
Variable	n	Concentración MDA ($\mu\text{mol/l}$)			P
		MEDIA	S	EE	
Edad					
menos 23 años	9	3,53	1,30	0,43	0,970
23 y más años	11	3,51	1,00	0,50	
Sexo					
M	13	3,56	1,22	0,84	0,839
F	7	3,45	0,97	0,87	
Total	20	3,52	1,11	0,25	

S: Desviación estándar; EE: error estándar de la media; p: probabilidad de error tipo I en las pruebas de hipótesis. **Fuente:** Autores.

En el grupo control no se presentaron diferencias por grupo de edad ni por sexo respecto a concentración sérica de MDA, indicando que se trata de un grupo homogéneo para estas variables.

3.3 Relación entre las concentraciones de malondialdehído entre grupo expuesto (fumadores) y grupo control (no fumadores)

Figura 12: Concentración promedio de malondialdehído \pm 1 EEM en fumadores y no fumadores.

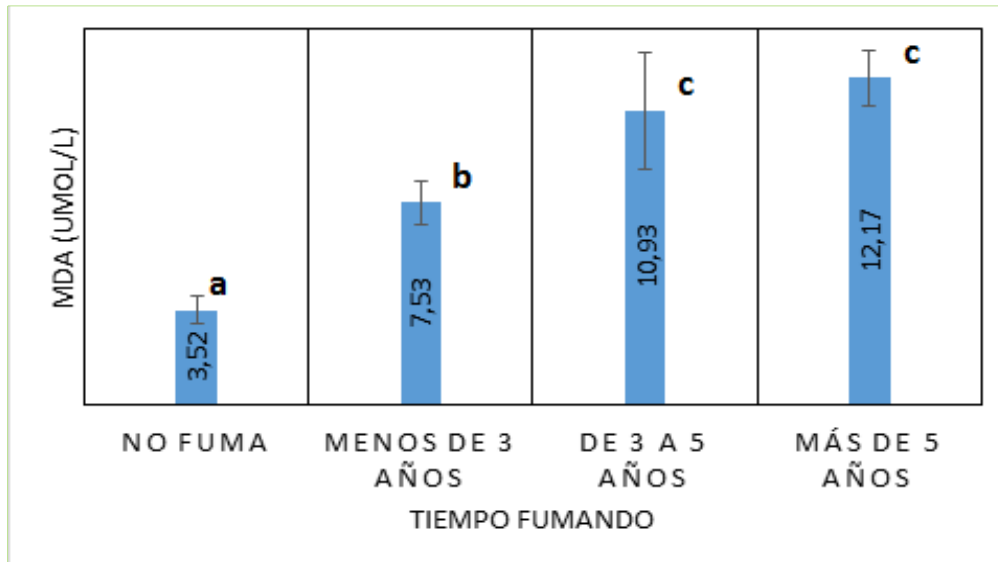


$p < 0,001$. EEM: se refiere al error estándar de la media. **Fuente:** Autores

La comparación de la concentración de MDA entre fumadores y grupo control se pudo constatar que el grupo de estudiantes fumadores posee valores promedio de MDA en suero de aproximadamente tres veces a los observados en el grupo control, con diferencias estadísticamente significativas detectadas por la prueba T de Student para muestras independientes ($p < 0,001$).

3.4 Comparación de la concentración de malondialdehído según el tiempo del hábito de fumar

Figura 13: Comparación de las concentraciones séricas de malondialdehído \pm 1 EEM según el tiempo del hábito de fumar con población control (ANOVA).

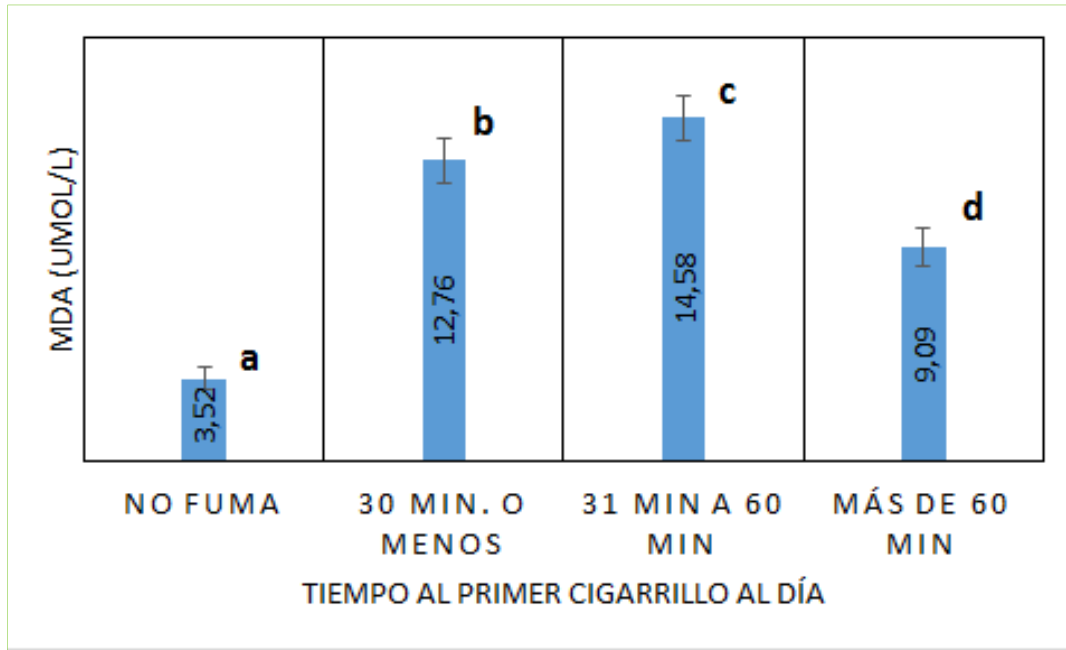


EEM: se refiere al error estándar de la media. $p < 0,001$ y prueba post-hoc de Duncan: letras diferentes indican medias diferentes para $p < 0,05$) **Fuente:** Autores.

Al analizar la concentración promedio de MDA según el tiempo del hábito de fumar, se observó una correlación lineal significativa y elevada ($r = 0,848$; $p < 0,001$), donde las medias de concentración de este metabolito aumenta de forma lineal y progresivamente desde los no fumadores hasta aquellos que fuman hace más de 5 años la que llega a ser aproximadamente 3,5 veces más que los encontrados en el grupo control. Los que fumaban entre tres y cinco años no mostraron diferencias estadísticas respecto a aquellos que fumaban hacía más tiempo.

3.5 Comparación entre las concentraciones de malondialdehído según el tiempo transcurrido hasta fumar el primer cigarrillo en el día

Figura 14: Comparación entre las concentraciones séricas de malondialdehído ± 1 EEM y el tiempo transcurrido hasta el primer cigarrillo del día (ANOVA).

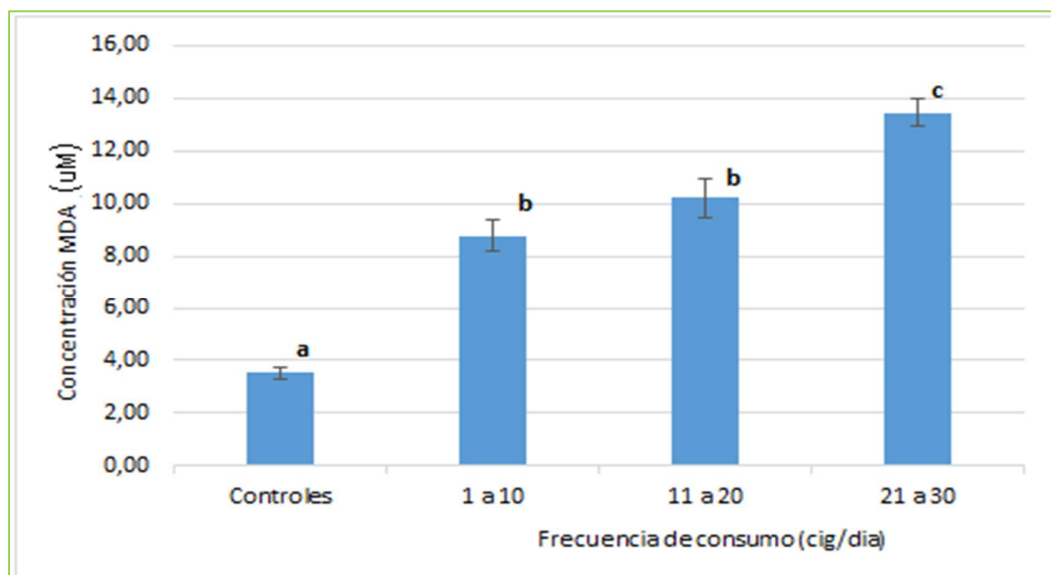


EEM: se refiere al error estándar de la media. $p < 0,001$ y prueba post-hoc de Duncan: letras diferentes indican medias diferentes para $p < 0,05$) **Fuente:** Autores.

Un análisis similar respecto al tiempo que transcurre entre el levantarse de mañana y el primer cigarrillo del día, también mostró una correlación lineal positiva ($r = 0,476$; $p < 0,001$). Los datos muestran que el inicio del consumo diario de cigarrillos a cualquier hora se relaciona con mayores concentraciones séricas de MDA, no obstante, los mayores valores de este compuesto se registraron en aquellos que consumían su primer cigarrillo dentro de la primera hora después de levantarse.

3.6 Comparación entre las concentraciones de malondialdehído y el número de cigarrillos día

Figura 15: Comparación entre las concentraciones séricas de malondialdehído \pm 1 EEM y el nivel de consumo de cigarrillos por día (ANOVA).

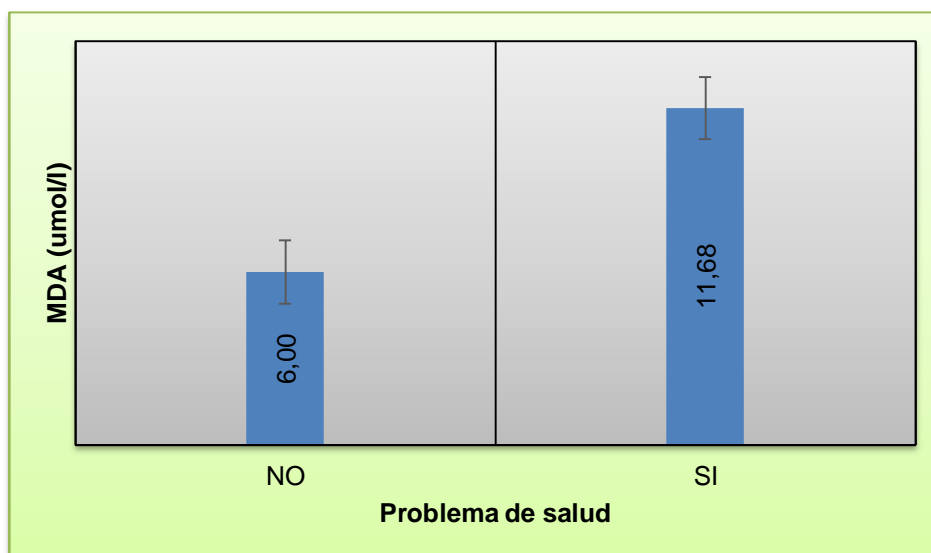


EEM: se refiere al error estándar de la media. $p < 0,001$ y prueba post-hoc de Duncan: letras diferentes indican medias diferentes para $p < 0,05$ Fuente: Autores

El consumo de cigarrillos/día muestra un incremento significativo de la concentración promedio de MDA al comparar el grupo control con el grupo de fumadores $p < 0,001$. El grupo que consume de 1-10 cig/día no mostró diferencias estadísticamente significativas con el grupo que consume 11 a 20 cig/día (8,9 uM vs 10,2 uM), en las que sí existe diferencias estadísticamente significativa en los que fuman con mayor frecuencia de 21 a 30 cig/día $p < 0,05$ (13,6 uM). Este incremento tiene una tendencia bastante lineal con un coeficiente de correlación elevado de $r = 0,875$ ($p < 0,001$).

3.7 Relación entre las concentraciones de malondialdehído y problemas de salud

Figura 16: Concentración promedio de malondialdehído ± 1 EEM según la presencia de algún problema de salud relacionado al hábito de fumar, $p < 0,001$.



EEM: se refiere al error estándar de la media. **Fuente:** Los autores.

Se observa que los que reportan algún problema de salud tuvieron concentraciones de MDA aproximadamente dos veces mayores a los que no reconocieron ninguna condición de salud relevante $p < 0,001$, presentando entonces una diferencia estadística significativa.

3.8 Correlación entre variables de control y variable analizada

Considerando que este estudio persigue analizar la posible asociación entre las concentraciones séricas de este metabolito (MDA) y el hábito de fumar, y que esta variable está caracterizada en la muestra de estudio por el tiempo que se lleve fumando y el tiempo de acceso diario al primer cigarrillo, se decide estimar el coeficiente de correlación lineal entre estas variables controlando por variables secundarias como la edad y la presencia de problemas de salud.



Tabla 11: Coeficientes de correlación parcial entre concentración de malondialdehído, el tiempo fumando, el tiempo para consumo de primer cigarrillo al día y su frecuencia de consumo.

<i>Variables de control</i>	<i>Variable Analizada</i>		TIEMPO FUMANDO	TIEMPO PRIMER CIGARRILLO	FRECUENCIA DE CONSUMO
PROBLEMA de SALUD & GRUPO DE EDAD	MDA	r_p	0,712**	0,379**	0,797**
		r_t	0,848**	0,476**	0,875**

r_t : coeficiente de correlación lineal total; r_p : coeficiente de correlación parcial. **: Coeficientes de correlación diferentes de cero para $p < 0,01$. **Fuente:** Autores.

El coeficiente de correlación lineal entre la concentración de MDA y el tiempo que llevan fumando las personas participantes se reduce un poco cuando se controla por edad y por presencia de problemas de salud, sin embargo aún permanece elevado. Esto ocurre de igual modo con la frecuencia de consumo y de forma menos relevante se mantiene la relación lineal también con el tiempo de acceso al primer cigarrillo diario. Tales resultados dan a entender que la relación entre estas variables es independiente de la presencia o no de problemas de salud, así como de la edad que tengan los estudiantes analizados. Se debe notar lo elevado de la correlación de la concentración de este metabolito con la frecuencia de cigarrillos al día respecto a las otras dos variables.



4 DISCUSIÓN

El tabaquismo constituye uno de los principales hábitos tóxicos a nivel mundial. La exposición al mismo puede comenzar desde edades muy tempranas y se asocia significativamente a problemas de salud que se agravan con el envejecimiento de las personas. En el caso de jóvenes universitarios latinoamericanos en países como México, Argentina, Colombia y Guatemala, entre otros, estudios recientes ubican este hábito entre el 5 % al 27 % de la población universitaria (Gómez et al, 2014) (Becerra et al, 2014) (Maldonado et al, 2013) (Cheesman et al, 2015) por lo que constituye uno de los principales determinantes de salud en este grupo poblacional.

En la muestra en estudio, la mayoría de los estudiantes fumaban por un tiempo superior a los cinco años (56%). Esto sugiere el inicio temprano del hábito tabáquico en estos jóvenes como ha sido demostrado en investigaciones previas realizadas en Ecuador (Guamán Sandoval, 2011) (Pacheco et al, 2014).

También al caracterizar el hábito tabáquico se observa que una proporción considerable de la muestra investigada (36%) consume su primer cigarrillo dentro de la primera hora después de levantarse en la mañana lo que puede estar asociado a una elevada frecuencia de consumo. Esta hipótesis pudo sustentarse puesto que el 60 % de los fumadores consumían más de 10 cigarrillos/día catalogado como moderado a fuerte por algunos autores (Nagaraj et al, 2014).

Por otro lado, el malondialdehído o MDA es un biomarcador de estrés oxidativo, especialmente de la peroxidación lipídica. Sin embargo, no es un marcador específico para las condiciones de salud o enfermedades asociadas si bien puede ser útil para el seguimiento de las mismas o el riesgo de lesiones cancerosas por su capacidad mutagénica (Céspedes et al, 2008) (Del Rio et al, 2005).



La determinación de un rango normal para la concentración de MDA en suero constituye un verdadero reto para la investigación clínica puesto que es un metabolito que se modifica sustancialmente con múltiples condiciones fisiológicas, patológicas, ritmos circadianos, así como en poblaciones de diferentes orígenes y del método empleado, por lo que seleccionar una muestra de pacientes saludable y representativa de toda una población resulta ser muy difícil y costosa (Trevisan et al, 2001) (Nielsen et al, 1997) (Khairunnisa et al, 2016).

Por lo anterior, las investigaciones consultadas en el campo de la salud solo emplean el MDA como un biomarcador de peroxidación lipídica y estrés oxidativo para comparar el efecto de una característica clínico-epidemiológica o condición experimental controlada. De esta forma evitan la comparación de valores séricos entre estudios realizados en poblaciones diferentes y bajo procedimientos metodológicos distintos. A pesar de esto, varias de las investigaciones revisadas indican un rango de concentración sérica de MDA en personas saludables que oscila entre $0,99 \text{ uM} \pm 0,60 \text{ uM}$ y $3,47 \text{ uM} \pm 0,65 \text{ uM}$ (Singh & Kaur, 2015) (Adunmo G et al, 2015) (Rodríguez et al, 2010) (Chancerelle et al, 1998) (DeMirtas et al, 2014), que al comparar los resultados obtenidos en nuestra investigación el rango de concentración sérica de MDA del grupo control oscila entre $(3,52 \text{ umol/L} \pm 1,11)$ que se encuentra dentro de los valores referenciados en las investigaciones citadas anteriormente.

Actualmente existen varios métodos para cuantificar el MDA, no obstante, la mayoría depende de la reacción de este aldehído con el ácido tiobarbitúrico (TBA). Los Kits comercializados y que se basan en esta metodología son bastante sensibles para determinar el MDA pero poco específicos porque pueden reaccionar con otros derivados de la oxidación lipídica como los lipoperóxidos y otros aldehídos por ejemplo. Además se debe tener en cuenta que la mayoría de los trabajos consultados no hacen referencia si la determinación de las concentraciones de MDA es libre o MDA total. Es así que se puede explicar por qué existe una variabilidad tan elevada en los niveles de MDA en pacientes saludables para la concentración sérica de este metabolito (Del Rio et al, 2005).



Por otro lado la mayoría de las investigaciones consultadas apoyan los resultados obtenidos en el trabajo de investigación realizado si se compara sólo el efecto o la relación del hábito de fumar con la presencia de niveles elevados de MDA en suero respecto a grupos saludables. En este sentido, un estudio metodológicamente similar realizado en la Universidad de Carabobo sobre un grupo de estudiantes de Bioanálisis concuerda con los resultados obtenidos en que el hábito de fumar se asocia con una mayor concentración de MDA en sangre, aún en personas clasificadas como fumadores ocasionales (un aumento de casi un 60 % respecto a los valores del grupo control saludable). Los niveles obtenidos por ellos se relacionaron significativamente con los de vitamina C en suero un reconocido antioxidante eliminador de radicales libres (Rodríguez et al, 2010). En la investigación realizada por (Singh & Kaur, 2015) se reportó en personas con un rango de edad más amplio en lo que los valores promedios de concentración de MDA sérico de pacientes fumadores saludables superaron en un 64 % a los de los no fumadores. Otras publicaciones sugieren que las diferencias entre las concentraciones de MDA en fumadores y no fumadores pudieran oscilar desde 1,2 veces y 3 veces siendo siempre superior en los primeros. (RafiqKhan & Sellappa, 2013) (Aduamo G et al, 2015) (Chancerelle et al, 1998) (Akbar Shah et al, 2015) (Nagaraj, Kumar, & Paunipagar, 2014) (Shankar & Kalaiselvi, 2016). Los valores obtenidos en nuestra investigación fue aproximadamente 3 veces más altos en los pacientes fumadores respecto a los controles, lo que considerando las posibles diferencias metodológicas y poblacionales, se puede decir que coinciden con lo reportado previamente.

No obstante lo anterior, se debe notar que dentro del grupo de los fumadores, aquellos que consumieron un mayor número de cigarrillos al día se asociaron con una mayor concentración de MDA. Este resultado concuerda plenamente con estudios similares, como el que se reportó en el estudio de (Nagaraj et al, 2014), en los que los niveles de este compuesto se elevan casi linealmente con el número de cigarrillos diarios consumidos, siendo muy superior en las personas que fuman más de 20 cigarrillos al día.



En la investigación realizada las concentraciones séricas de MDA se asoció además con la edad de los pacientes y con problemas de salud, especialmente con falta de capacidad o rendimiento físico. En ambos casos se encuentra documentada tal relación y por tanto puede enmascarar la verdadera magnitud de la relación entre las características del hábito de fumar y los niveles de MDA sérico.

El envejecimiento como proceso biológico tiene disímiles aristas, pero sin duda su relación con el estrés oxidativo ha llamado mucho la atención durante los últimos 20 años. En tal caso algunas teorías consideran en esencia el establecimiento de un círculo vicioso donde la exposición de una persona a especies reactivas de oxígeno (ROS, siglas en inglés) u otros agentes oxidantes, podría dañar biomoléculas importantes como el ADN y las enzimas, los mismos que en el caso de la mitocondria podrían traer disfunción de este organelo y con ello mayor producción de ROS. También podrían dañarse proteínas y enzimas antioxidantes y con ello disminuir las defensas contra los procesos oxidativos, lo que conduciría sin dudas a una disfunción celular y tisular, conducente al envejecimiento del organismo (Bhooshan et al, 2010) (Cui et al, 2012). Esto se asociaría sin dudas con el incremento de biomarcadores serológicos de estrés oxidativo como el observado en este estudio. Por lo anterior se puede pensar que en este caso la edad no influye directamente sobre la oxidación de biomoléculas puesto que se trata de una muestra relativamente joven, sino más bien de los efectos del tiempo que cada persona lleve fumando y de la dosis de exposición a las ROS del humo del cigarrillo.

Asimismo, la falta de rendimiento físico planteada por los estudiantes puede estar marcada por una disminución de la capacidad respiratoria, signo observado muy frecuentemente en las personas fumadoras, especialmente asociado al número de cigarrillos diarios consumidos y al tiempo de consumo reportado en la investigación de (Pulgar Muñoz, 2014). Además, también se ha documentado la estrecha dependencia de la dosis de cigarrillos diarios sobre los niveles de MDA séricos con niveles promedios de este metabolito unas dos veces superiores en



las personas fumadoras moderadas (11 a 20 cigarrillos/día) respecto a los no fumadores (Nagaraj et al, 2014) y cerca de 1,5 veces más en aquellas que fuman más de cinco cigarrillos al día a los que fuman menos de esa cantidad (Jaggi & Singh Yadav, 2015). Ambos aspectos mencionados pudieran explicar una relación colateral entre las condiciones físicas y los niveles de MDA en la muestra de estudio debido a la relación de ambas variables con el nivel de consumo de cigarrillos al día. Esto puede constituirse en una hipótesis para futuros trabajos similares.

Considerando los planteamientos anteriores se decidió evaluar en que medida se relacionan las concentraciones de MDA, el tiempo fumando, así como el tiempo transcurrido hasta fumarse el primer cigarrillo y el número de cigarrillos diarios consumidos. Los resultados mostraron claramente que estas variables se asocian significativamente con los niveles de MDA $p < 0,001$, correlación que se mantuvo aún después de calcular los coeficientes de correlación parcial controlados por grupos de edad y por la presencia de problemas de salud. Esto puede interpretarse de modo que la asociación entre la concentración sérica de MDA y el tiempo fumando, el número de cigarrillos al día, así como con el consumo del primer cigarrillo al día es independiente de la edad de estos individuos y de la presencia en ellos de un bajo rendimiento físico o de enfermedades del sistema respiratorio.

El número de cigarrillos consumidos al día constituyó uno de los factores más detallados respecto a su relación con el estrés oxidativo, así como el tiempo que llevan fumando cada persona. En tal caso una investigación sobre 150 personas fumadoras y 50 controles, se encontró que la concentración promedio de MDA se elevaba con el número de cigarrillos diarios al pasar de fumadores de menos de 10 cigarrillos/día hasta aquellos que consumían más de 20 cigarrillos/día (Nagaraj et al, 2014). De igual modo a lo planteado anteriormente, otro estudio detectó un aumento en la concentración sérica de este metabolito en personas que consumen más de 5 cigarrillos/día respecto a aquellos que consumían menos de esa cantidad (Jaggi & Singh Yadav, 2015), algo similar a lo que ocurre en la saliva



de personas fumadoras respecto a las fumadoras pasivas y controles saludables (DeMirtas et al, 2014). A esto se une además los datos de un estudio reciente realizado en Nigeria el mismo que mostró un incremento casi lineal entre el tiempo de consumo desde 0 hasta más de 20 años y los niveles promedio de MDA sérico (Adunmo G et al, 2015). Todos estos resultados previos indican una relación entre la dosis de consumo de cigarrillos y la peroxidación lipídica. Que al ser comparados con los resultados obtenidos se puede deducir que los estudiantes que consumían entre 1 y 30 cigarrillos al día se observó una significativa correlación entre el tiempo en que se consume el primer cigarrillo diario, la duración del hábito de fumar, el número de cigarrillos al día y las concentraciones séricas de MDA. Sin embargo en la población fumadora la variación notoria se observó en el grupo de fumadores de 20 a 30 cigarrillos /día, y los que tienen un tiempo de hábito de fumar de más de 5 años donde existe una correlación muy estrecha, por lo que se consideró que el MDA constituyó un biomarcador de estrés oxidativo, en la población fumadora, según lo establecido en los trabajos de investigación anteriormente citados.

En este trabajo se presentaron estudiantes que consumían entre 1 y 30 cigarrillos al día en los que se observó una significativa correlación entre el tiempo en que se consume del primer cigarrillo diario, la duración del hábito de fumar, el número de cigarrillos al día y las concentraciones séricas de MDA, lo que apoya la hipótesis de una relación dosis-respuesta en la oxidación de lípidos inducida por el humo del cigarro.



5 CONCLUSIONES

- La edad de las personas fumadoras superó los 23 años y más (62%), con respecto a los menos de 23 años (38%), predominando en éstos el género masculino (80%), aquellos con problemas de salud (66%), los que consumen por más de cinco años (56%) y los que consumen 1 a 10 cig/día (40%).
- El kit comercial (OxiSelect[®] TBARS Assay Kit (MDA Quantitation) permite detectar adecuadamente las diferencias en la concentración sérica de MDA entre individuos fumadores y no fumadores.
- La concentración sérica de MDA en estudiantes fumadores muestra un aumento estadísticamente significativo al comparar con los niveles de MDA en estudiantes no fumadores ($10,74 \mu\text{mol/L} \pm 3,17$ vs. $3,52 \pm 1,11 \mu\text{mol/L}$ $p < 0,001$) que se corresponde con manifestaciones de estrés oxidativo producido por el efecto de fumar.
- El tiempo del hábito de fumar es un factor para el incremento del MDA sérico, donde la concentración de este metabolito aumenta de forma lineal y progresiva desde el grupo de no fumadores hasta aquellos que fuman por más de 5 años ($r=0,848$), no mostrando diferencias estadísticamente significativas entre el grupo que fuma de 3 a 5 años con el grupo de más de 5 años pero si con el grupo de menos de 3 años ($p < 0,05$). También se evidencia que el número de cig/día es otro factor que interviene en el incremento de MDA sérico teniendo un incremento progresivo desde el grupo de no fumadores hasta el grupo de consumo de 21 a 30 cig/día ($r=0,875$, no mostrando diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de 1 a 10 y el grupo de 11 a 20 pero si con el grupo de 21 a 30 cig/día ($p < 0,05$).



- El tiempo al acceso al primer cigarrillo del día es otro factor que incrementa el MDA sérico, con un incremento lineal ($r= 0,476$), teniendo un aumento estadísticamente significativo entre el grupo que accede a su primer cigarrillo dentro de la hora después de levantarse con respecto al grupo que acceden después de una hora ($p<0,05$).
- El nivel de estrés oxidativo en los estudiantes fumadores se correlacionan significativamente con el tiempo del hábito de fumar, el tiempo en acceder a su primer cigarrillo/día y el número de cigarrillos/día independientemente de la edad y la presencia de enfermedades asociadas a este hábito, lo que se concluye que existe una relación de dependencia entre la dosis de exposición y el nivel de estrés oxidativo valorado en la determinación de MDA en suero sanguíneo.



6 RECOMENDACIONES

1. Estimar el rango de valores normales en población ecuatoriana aparentemente sana que permita establecer comparaciones más adecuadas respecto a otros países o entre grupos poblacionales en los estudios epidemiológicos de acuerdo al rango de edades.
2. Validar los resultados del presente estudio extendiéndole a toda la comunidad universitaria, analizando otros biomarcadores de estrés oxidativo y variables potencialmente confusoras como la dieta (consumo de vitaminas antioxidantes), el uso de suplementos, la actividad física, los niveles plasmáticos de nicotina, entre otras.
3. Extender este estudio en enfermedades relacionadas con el ataque de EROs por consecuencia del hábito de fumar como enfermedades respiratorias, pulmonares y sanguíneas.



BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Rasheed, O., & Al-Rubayee, W. (2013). Effects of cigarette smoking on lipid peroxidation and antioxidant status in Iraqi men at Baghdad city. *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(1), 47-50.
- Adunmo G, O., Adesokan A, A., A. M., B. S., M, A. I., & E., A. (2015). Lipid Peroxide Levels, Antioxidant Status, and Protein Changes in Nigerian Smokers. *IJSBAR*, 2(1), 69-77.
- Akbar Shah, A., Khand, F., & Uddin Khand, T. (2015). Effect of smoking on serum xanthine oxidase, malondialdehyde, ascorbic acid and -tocopherol levels in healthy male subjects. *Pak J Med Sci*, 31(1).
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2009). *Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección*. Recuperado el 5 de 02 de 2016, de http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-04622006000200010&script=sci_arttext
- Becerra-Bulla, F., Pinzón-Villate, G., Vargas-Zárate, M., Vera-Barrios, S., & Ruíz-Cetina, M. (2014). Estilos de vida de estudiantes universitarios admitidos al pregrado de la carrera de medicina, Bogotá 2010-2011. *Rev Fac Med.*, 62(Supl. 1:), S51-56.
- Bermúdez, V., Acosta, L., Aparicio, D., Finol, F., Canelón, R., & Bustamante, M. (2010). Hábito tabáquico y enfermedad cardiovascular. *REVISTA LATINOAMERICANA DE HIPERTENSIÓN*, 19-27.
- Bhooshan Pandey, K., & Ibrahim Rizvi, S. (2010). Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(1), 2-12.
- Bio Tek Instruments. (2016). *Bio Tek*. Recuperado el 2 de 06 de 2016, de www.biotek.es/products/microplate_detection.html
- Camps, D., Ruffino, S., Majul, E., & Joison, A. (2010). En *Bioquímica del Estrés Oxidativo y de las especies reactivas del oxígeno*. Cordova - Argentina: Lulu S.A.
- Cell Biolabs. Inc. (15 de 9 de 2012). *Cell Biolabs. Inc.* Obtenido de www.cellbiolabs.com/.../STA-330-tbars-assay-kit.pdf
- Céspedes Miranda, E., & Castillo Herrera, J. (2008). La peroxidación lipídica en el diagnóstico del estrés oxidativo del paciente hipertenso. ¿Realidad o mito? *Rev Cubana Invest Biomed*, 27(2), 1-10.
- Chancerelle, Y., Artur, Y., & Siest, G. (1998). Diet, antioxidants status, and smoking habits in French men. *Am J Clin Nutr*, 67, 231-9.



- Cheesman Mazariegos, S., & Suárez Lugo, N. (2015). Tabaquismo en estudiantes de medicina de la Universidad de San Carlos de Guatemala. *Rev Cubana Salud Pública*, 41(1), 18-32.
- Comunidad Andina. (2013). II Estudio Epidemiológico Andino sobre el Consumo de Drogas en la Población Universitaria, Informe Regional 2012. 14.
- Cui, H., Kong, Y., & Zhang, H. (2012). Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. *Journal of Signal Transduction*, 13 pags.
- Del Rio, D., Stewart, A., & Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 15, 316e328.
- Delgado, L., Betanzos, G., & Sumaya, T. (2010). Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Redalyc*, 13-14.
- DeMirtas, M., Senel, U., Yuksel, S., & Yuksel, M. (2014). A comparison of the generation of free radicals in saliva of active and passive smokers. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 44, 208-211.
- Estepa, V., Ródenas, S., & Martín, M. (2010). Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano. *ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA*, 1-2.
- Fagali, N. (2011). Peroxidación de diferentes especies lipídicas: Efecto de antioxidantes. 132.
- Fina, B. (2009). *Estrés oxidativo. Laboratorio de Biología Ósea y Metabolismo Mineral Facultad Cs. Médicas - UNR - Rosario - Argentina*. Recuperado el 24 de 03 de 2016, de <http://www.biologiaosea.com.ar/files/seminarios/sem%20estres%20oxidativo.pdf>
- Gómez Cruz, Z., Hernández Tinoco, A., Torres Morán, J., & Landeros Ramírez, P. (27 de JUNIO de 2014). Hábitos de alimentación, tabaquismo y consumo de alcohol en estudiantes del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. *eCUCBA*(1), 21-26.
- Guamán Sandoval, J. (2011). *CONSUMO DE ALCOHOL Y TABACO EN ADOLESCENTES DE SEGUNDO Y TERCERO DE BACHILLERATO DEL COLEGIO ADOLFO VALAREZO PERIODO OCTUBRE 2010 . OCTUBRE 2011. LOJA-ECUADOR: UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA.*
- Guerra, E. (2011). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna*, 18(6), 50.



- Gutiérrez, A. (2003). Oxidantes del humo del cigarro y enfermedades cardiopulmonares. *Revista Cubana de Medicina*.
- Hernández, A. (2010). *Tratado de Nutrición: Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición*. Madrid: Médica Panamericana.
- INEC. (2013). Influencia del Tabaco en la personas y sus Cosecuencias Negativas en la Salud. *ANÁLISIS Revista Conyuntural*, 7.
- Jaggi, S., & Singh Yadav, A. (2015). Increased serum malondialdehyde levels among cigarette smokers. *The Pharma Innovation Journal*, 4(4), 94-96.
- 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.
- Londoño, C., Rodríguez, I., & Gantiva, C. (2011). Cuestionario para la clasificación de consumidores de cigarrillo para jóvenes. *Diversitas*, 290 - 291.
- Maldonado , O., Jiménez, E., & Cevallos, G. (2010). *Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas*. Recuperado el 20 de 02 de 2016, de <http://www.medigraphic.com/pdfs/veracruzana/muv-2010/muv102e.pdf>
- Maldonado Villalón, J., Carranza Cervantes, C., Ortiz González, M., Gómez Alonso, C., & Cortés-Gallegos, N. (2013). Prevalencia de factores de riesgo cardiometabólico en estudiantes universitarios de la región centro-occidente, en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México. *Revista Mexicana de Cardiología.*, 24(2), 76-86.
- Méndez, V., & Silveira, H. (2007). *Bioética y Derecho*. Barcelona: UOC.
- Nagaraj, Kumar, S., & Paunipagar, P. (2014). Study of serum malondialdehyde and vitamin c in smokers. *Journal of Scientific and Innovative Research*, 3(6), 569-571.
- Navarro, C. L. (2005). *Manual de Técnicas de toma de muestra para exámenes de laboratorio*. Valparaiso : Cecilia Landman Navarro.
- Nielsen, F., Borg Mikkelsen, B., Bo Nielsen, J., Raun Andersen, H., & Grandjean, P. (1997). Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clinical Chemistry*, 43(7), 1209. 1214.
- Oliva, R., Ballesta, F., Oriola, J., & Clària, J. (2010). *Genética Médica*. Barcelona - España: Panamericana S.A.



Organización Mundial de la Salud. (07 de 2015). Recuperado el 23 de 06 de 2016, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/es/>

Pacheco, R., Mesa, I., & Torres, F. (2014). Prevalencia y factores asociados al consumo de cigarrillos en los estudiantes de la facultad de medicina de la Universidad Católica de Cuenca, 2014. *Panorama Médico*, 8(1), 46-51.

Pulgar Muñoz, S. F.-L. (2014). Síntomas Respiratorios Percibidos en Estudiantes de Ciencias del Deporte vs. Estudiantes Universitarios Sedentarios. *KRONOS*, 14(1).

RafiqKhan, M., & Sellappa, S. (2013). Serum malondialdehyde levels in lung cancer patients. *J Appl Biol Biotechnol*, 1(4), 032-034.

Repetto, M. (2009). TOXICOLIGÍA FUNDAMENTAL. Sevilla - España: Panamericana.

Ríos, M. (04 de 2003). *El estrés oxidativo y el destino celular*. Recuperado el 15 de 01 de 2016, de <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/estres%20oxidativo.htm>

Rodrigues, Z., & Strauss, M. (2009). Respuesta cardiaca al estres tóxico por exposición al humo de cigarrillo. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*.

Rodríguez, J., Menéndez, J., & Trujillo, Y. (2010). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar (SciELO)*.

Rodríguez, M., Fernández, Y., Marrero, S., Aular, Y., Moscoso, M., Peña, K., y otros. (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), 7-13.

Sabán, J. (2012). *CONTROL GLOBAL DEL RIESGO CARDIOMETABÓLICO* (Vol. 1). Madrid: Diaz Santos.

Saldías, F. M. (2007). El riesgo de infecciones respiratorias en el fumador activo y pasivo. *Rev Chil Enf Respir*, 23, 179-187.

Shankar, H., & Kalaiselvi, K. (2016). Study of plasma levels of malondialdehyde as an oxidative stress marker"so it comes as marker in smokers an non-smokers. *Indian J Res*, 5(1), 69-70.

Singh, K., & Kaur, S. (2015). Impact on Malondialdehyde and Superoxide Dismutase in Smokers of North Indian Punjabi Population. *International Journal of Health Sciences & Research*, 5(5), 184-189.



Spickett , C., Wiswedel, I., Siems, W., & Zarkovic, K. (2010). Advances in methods for the determination of biologically relevant lipid peroxidation products. *Free Radic Res* 44:1172-1202.

Trevisan, M., Browne, R., Ram, M., Muti, P., Freudenheim, J., e Carosella, A., y otros. (2001). Correlates of Markers of Oxidative Status in the General Population. *American Journal of Epidemiology*, 154, 348. 56.

Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12: 1161-1208.

Vasudevan, D., & Vaidyanathan, K. (2011). *BIOQUÍMICA SEXTA EDICIÓN*. Mexico: Cuellar Ayala.

Yeager, S. (2010). La guía Médica de Remedios Alimenticios. En *The Coctors Book of food remedies* (pág. 634). Estados Unidos: Prevention .



ANEXOS



ANEXO 1: Consentimiento informado voluntario para la participación en el estudio de Niveles Séricos de Malondialdehído como marcador biológico del estrés oxidativo en estudiantes fumadores activos de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca+

Estimado Paciente:

La presente tiene por objetivo informarle que Ud. puede participar en el estudio investigativo que se va a realizar con la participación de los docentes y estudiantes de la carrera Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca. El estudio que se va a desarrollar es: **NIVELES SÉRICOS DE MALONDIALDEHÍDO COMO MARCADOR BIOLÓGICO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN ESTUDIANTES FUMADORES ACTIVOS DE LA CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD DE CUENCA+** Este estudio está autorizado y con visto bueno por las autoridades de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca.

La presente investigación se basa en la determinación de malondialdehído en individuos fumadores activos, un importante marcador biológico del estrés oxidativo. El averiguar la concentración de malondialdehído en suero nos permite afirmar el efecto tóxico que produce el humo del cigarrillo y su daño a biomoléculas, es la razón por lo que se realiza esta investigación.

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO:

- Determinar la concentración de malondialdehído (MDA) como índice del estrés oxidativo provocado por el consumo del cigarrillo.
- Evaluar el impacto a la exposición del humo del cigarrillo y su relación con las concentraciones plasmáticas de malondialdehído.
- Realizar el análisis estadístico en base a los resultados obtenidos.

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO: Si Ud. participa en este estudio, usted podrá ayudar a la determinación del efecto del humo del cigarrillo sobre el estrés oxidativo.



PROCEDIMIENTOS A SEGUIR: Si Ud. participa en este estudio se realizará el siguiente procedimiento:

Esta investigación incluirá una única toma de muestra de sangre.

Preparación del paciente para la toma de la muestra:

1. Identificación del paciente (códigos)
2. Posición (sentado)

Técnica:

1. Aplicar el torniquete
2. Cerrar el puño del paciente
3. Seleccionar la vena superficial de la flexura del codo o lugar de punción
4. Limpiar con alcohol el lugar elegido para realizar la punción
5. Practicar la punción.
6. Liberar el torniquete
7. Abrir el puño del paciente
8. Extraer la aguja
9. Presionar suavemente el lugar de la punción con algodón humedecido en alcohol
10. Etiquetar correctamente cada tubo.
11. Traslado y procesamiento de las muestras de sangre en los laboratorios de la Universidad de Cuenca.

RIESGOS: Si usted acepta participar en este estudio le informamos que la toma de muestra no le va traer ningún riesgo para su salud.

BENEFICIO:

Si Usted autoriza su participación en este estudio, tendrá el siguiente beneficio:

- Conocer el efecto que tiene el humo cigarrillo en el estrés oxidativo y su repercusión futura en su salud.

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria. Usted puede elegir participar o no hacerlo. La información que se recoja será confidencial y no se

UNIVERSIDAD DE CUENCA



usará para ningún otro propósito. Sus respuestas a las encuestas serán codificadas y anónimas. Si alguna de las preguntas durante las encuestas le parece incómoda, tiene usted el derecho de hacérselo saber al investigador.

Usted puede cambiar de idea más tarde y dejar de participar aun cuando haya aceptado antes.

Si tiene alguna duda sobre esta investigación, puede hacer preguntas en cualquier momento durante su participación a la Dra. Ruth Rosas C. Catedrática de la escuela de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca. Desde ya le agradecemos su participación.

Yo,

con CEDULA:

Acepto voluntariamente participar en esta investigación. He sido informado/a en todos los aspectos de este estudio: **NIVELES SÉRICOS DE MALONDIALDEHÍDO COMO MARCADOR BIOLÓGICO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN ESTUDIANTES FUMADORES ACTIVOS DE LA CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD DE CUENCA+**

Firma del Paciente Voluntario

Dra. Ruth Rosas C. Msc



ANEXO 2: Encuesta para la clasificación de consumidores de cigarrillo en la carrera de Bioquímica y Farmacia de la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca.

Responsables: Diego Espinoza y José Luis Flores

Género: Edad:

1. ¿Actualmente fuma? SÍ NO
2. ¿Ha fumado por más de seis meses alguna vez en su vida?
SÍ NO
3. ¿Hace cuánto tiempo empezó a fumar?
 - a. Hasta un año
 - b. > 1 - ≤ 3 años
 - c. > 3 - ≤ 5 años
 - d. > 5
4. ¿Cuántos cigarrillos fuma en un día normal de consumo?
 - a. 1 a 10 cigarrillos
 - b. 11 a 20 cigarrillos
 - c. 21 a 30 cigarrillos
 - d. 31 o más
5. ¿Cuánto tarda, después de despertarse en fumar su primer cigarrillo?
 - a. ≤ 5 minutos
 - b. 6 . 30 minutos
 - c. 31 . 1 hora
 - d. > 1 hora
6. ¿Cómo fuma los cigarrillos?
 - a. Traga el humo
 - b. Tiene el humo en la boca
7. ¿Ha intentado dejar de fumar? SÍ NO ¿Cuántas veces?
8. ¿Fumar le ha acarreado problemas de salud? SÍ NO
9. ¿Qué tipo de problemas de salud presenta?
10. ¿Cuándo no fuma, que síntomas presenta?

ANEXO 3: Componentes del kit de reactivo.

	Código	Descripción
MDA estándar	233001	Un vial ámbar de 1,0 mM de Malondialdehído.
Ácido tiobarbitúrico (TBA)	233002	Una botella con 1g.
SDS solución de lisis	233003	Una botella con 20 mL.
2X TBA Ácido diluyente	233004	Una botella con 25 mL.
Solución de Hidróxido Sódico	233005	Una botella con 5 mL.
100X BHT Solución	233006	Un vial de un 1 mL al 5% de Butilhidroxitolueno en metanol.

Fuente: Referencia kit de reactivo

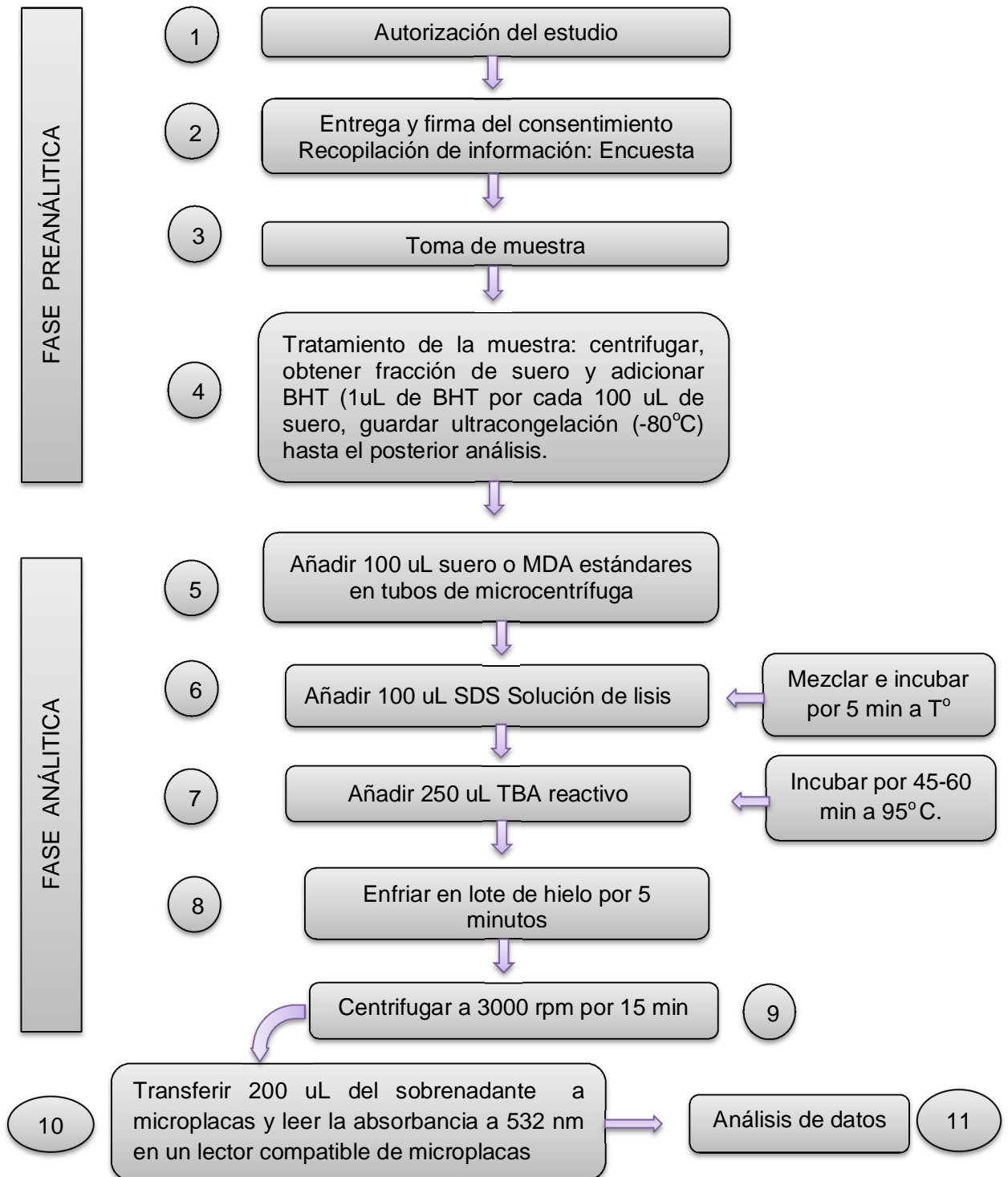
ANEXO 4: Materiales.

Análisis de la muestra	OxiSelecti [®] TBARS Assay Kit (MDA Quantitation)
	Substrato
	Microplacas
Toma de la muestra	Tubos vacutainer tapa roja
	Campana de extracción
	Torniquetes
	Agujas #20G . 21G
	Hansplast redondas
Insumos de laboratorio	Pipetas automáticas y serológicas
	Puntas para pipeta automática
	Viales criogénicos
	Tubos de ensayo
	Gradillas
	Ultracongelador, marca: Arctiko
	Microcentrífuga
	Vórtex
	Baño maría
	Balanza analítica
pH-metro, marca: Laqua	
Equipo de análisis	Lector Multi-Modal Synergy H1, marca BioTek

Fuente: Autores.

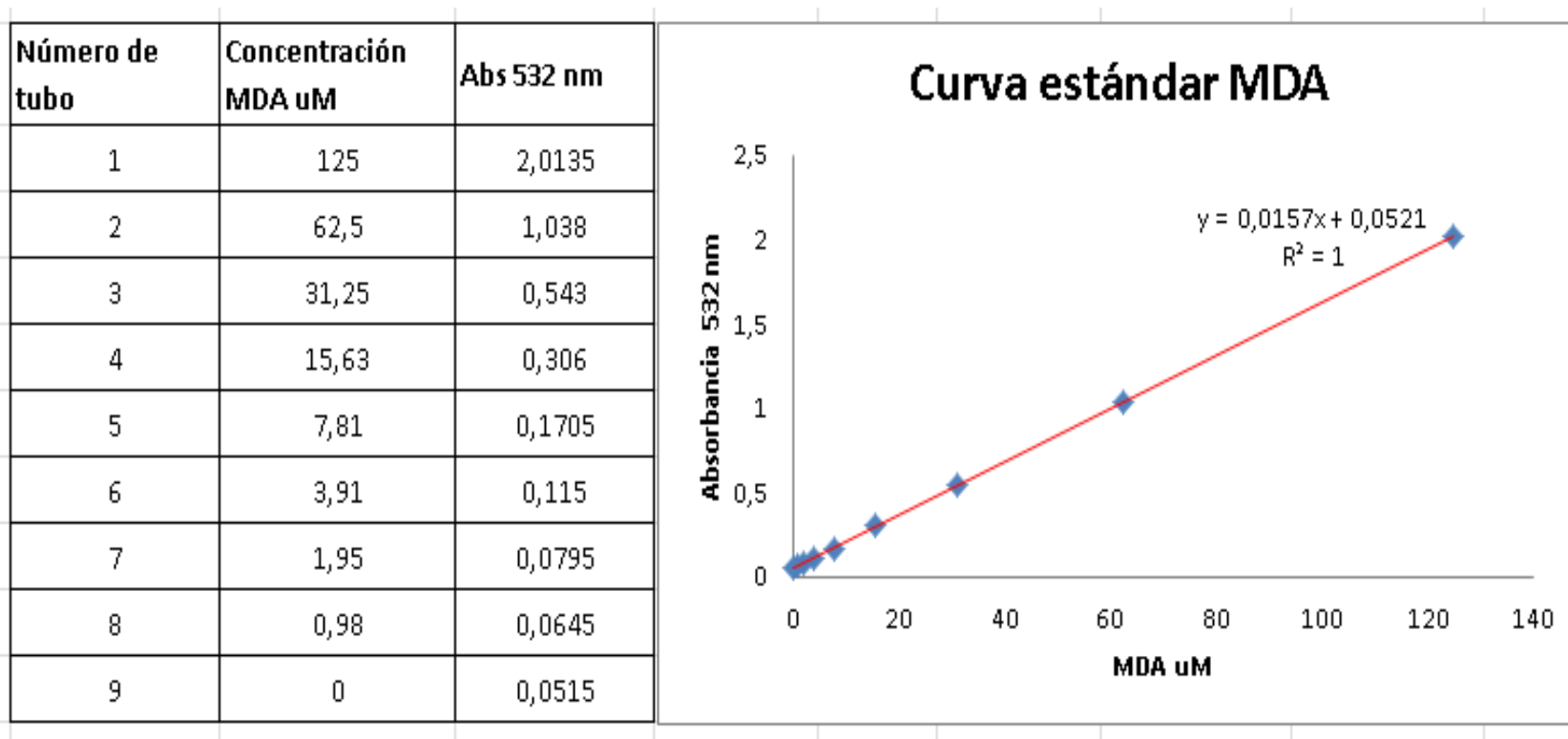


ANEXO 5: Flujograma del protocolo de ensayo.





ANEXO 6: Curva de calibración del kit de ensayo.





ANEXO 7: Características demográficas, epidemiológicas y concentración de malondialdehído en la población problema.

Código	Sexo	Edad	Tiempo que empezó a fumar	Numero de cigarrillos consumo/día	Tiempo que tarda en fumar su primer cigarrillo	Problemas de salud	Tipo problema de salud	Cuando no fuma, síntoma que presenta	Concentración MDA umol/L
1	M	25	> 5 años	21 - 30	> 1 hora	NO	NO	NO	11,261
2	M	25	> 5 años	11 - 20	> 1 hora	SI	Falta de condición física	NO	10,816
3	M	21	> 3 - m5 años	11 - 20	> 1 hora	NO	NO	NO	9,575
4	M	28	> 5 años	21 - 30	> 1 hora	SI	Falta de condición física	Ansiedad	11,77
5	M	26	> 5 años	1 . 10	> 1 hora	NO	NO	Ansiedad	8,938
6	M	25	> 1 - m3 años	11 . 20	6 - 30 minutos	NO	NO	Ansiedad	10,847
7	M	20	> 3 - m5 años	21 . 30	> 1 hora	NO	NO	Ansiedad	11,707
8	M	20	> 1 - m3 años	1 . 10	> 1 hora	SI	Falta de condición física	NO	9,161
9	M	26	> 5 años	1 . 10	6 - 30 minutos	SI	Falta de condición física	Ansiedad	8,397
10	M	25	> 5 años	11 . 20	> 1 hora	NO	NO	NO	11,738
11	F	22	> 3 - m5 años	21 - 30	31 - 1 hora	SI	Falta de condición física	NO	15,811
12	F	25	> 5 años	1 . 10	> 1 hora	SI	Problemas respiratorias	Ansiedad	9,575
13	M	22	> 5 años	1 - 10	> 1 hora	SI	Falta de condición física	Ansiedad	7,347
14	F	25	> 1 - m3 años	1 - 10	> 1 hora	NO	NO	NO	8,684
15	M	26	> 5 años	1 - 10	> 1 hora	NO	NO	NO	7,856
16	M	25	> 3 - m5 años	1 . 10	> 1 hora	SI	Problemas respiratorias	NO	8,556
17	M	20	> 3 - m5 años	21 . 30	31 - 1 hora	NO	NO	Ansiedad	14,793
18	M	21	> 5 años	11 . 20	> 1 hora	NO	NO	NO	10,084



19	M	24	> 5 años	21 . 30	31 - 1 hora	SI	Falta de condición física	Ansiedad	14,125
20	F	23	> 1 - m3 años	1 . 10	> 1 hora	SI	Falta de condición física	Ansiedad	7,22
21	M	21	> 1 - m3 años	1 . 10	> 1 hora	NO	NO	NO	6,92
22	M	22	> 1 - m3 años	1 . 10	> 1 hora	SI	Falta de condición física	Ansiedad	7,475
23	M	24	> 5 años	21 . 30	6 - 30 minutos	SI	Falta de condición física	Ansiedad	14,507
24	M	25	> 5 años	21 . 30	31 - 1 hora	SI	Falta de condición física	Ansiedad	15,111
25	M	23	> 1 - m3 años	11 . 20	> 1 hora	NO	NO	NO	8,016
26	M	24	> 5 años	21 . 30	31 - 1 hora	SI	Falta de condición física	Ansiedad	16,225
27	M	25	> 5 años	21 . 30	6 - 30 minutos	SI	Falta de condición física	Ansiedad	16,48
28	M	22	> 1 - m3 años	1 . 10	> 1 hora	SI	Falta de condición física	Ansiedad	7,029
29	M	21	> 1 - m3 años	1 . 10	> 1 hora	NO	NO	NO	5,884
30	F	23	> 3 - m5 años	21 . 30	> 1 hora	SI	Falta de condición física	Ansiedad	13,839
31	M	22	> 5 años	11 . 20	6 - 30 minutos	SI	Falta de condición física	Ansiedad	10,275
32	M	21	> 3 - m5 años	1 . 10	> 1 hora	NO	NO	NO	6,647
33	M	23	> 5 años	11 . 20	> 1 hora	SI	Falta de condición física	Ansiedad	10,784
34	M	22	> 3 - m5 años	1 . 10	> 1 hora	SI	Falta de condición física	Ansiedad	9,702
35	M	24	> 5 años	21 . 30	6 - 30 minutos	SI	Falta de condición física	Ansiedad	16,798
36	F	20	> 3 - m5 años	1 . 10	> 1 hora	SI	Falta de condición física	Ansiedad	7,761
37	M	23	> 5 años	11 . 20	> 1 hora	SI	Falta de condición física	Ansiedad	11,866
38	M	23	> 5 años	11 . 20	6 - 30 minutos	SI	Falta de condición física	Ansiedad	12,82
39	M	22	> 1 - m3 años	1 . 10	> 1 hora	NO	NO	NO	6,87
40	M	24	> 5 años	21 . 30	> 1 hora	SI	Falta de condición física	Ansiedad	13,489
41	F	21	> 1 - m3 años	1 . 10	> 1 hora	SI	Falta de condición física	Ansiedad	7,952
42	F	23	> 5 años	11 . 20	31 - 1 hora	SI	Falta de condición física	Ansiedad	11,452
43	M	23	> 5 años	11 . 20	> 1 hora	SI	Falta de condición física	Ansiedad	10,688
44	M	20	> 1 - m3 años	1 . 10	> 1 hora	NO	NO	NO	5,279
45	F	24	> 5 años	21 . 30	6 - 30 minutos	SI	Falta de condición física	Ansiedad	14,252



46	F	25	> 5 años	21 . 30	31 - 1 hora	SI	Falta de condición física	Ansiedad	15,398
47	M	25	> 5 años	21 . 30	31 - 1 hora	SI	Falta de condición física	Ansiedad	14,093
48	M	24	> 5 años	11 . 20	6 - 30 minutos	SI	Falta de condición física	Ansiedad	10,434
49	M	26	> 5 años	21 . 30	31 - 1 hora	SI	Falta de condición física	Ansiedad	14,189
50	M	21	> 1 - m3 años	1 . 10	> 1 hora	NO	NO	NO	6,542

ANEXO 8: Características demográficas, epidemiológicas y concentración de malondialdehído en la población problema (no fumadores).

Código	Sexo	Edad	Concentración de MDA μM
51	M	24	1,855
52	M	25	2,619
53	M	26	2,027
54	M	27	4,102
55	M	25	3,338
56	M	24	4,42
57	M	22	4,07
58	M	21	4,929
59	M	20	1,734
60	F	25	4,7
61	F	24	4,337
62	M	22	5,374
63	F	25	4,134
64	F	20	2,95
65	M	23	4,07
66	F	20	1,951
67	M	24	3,033
68	M	22	4,706
69	F	22	3,083
70	F	21	2,991

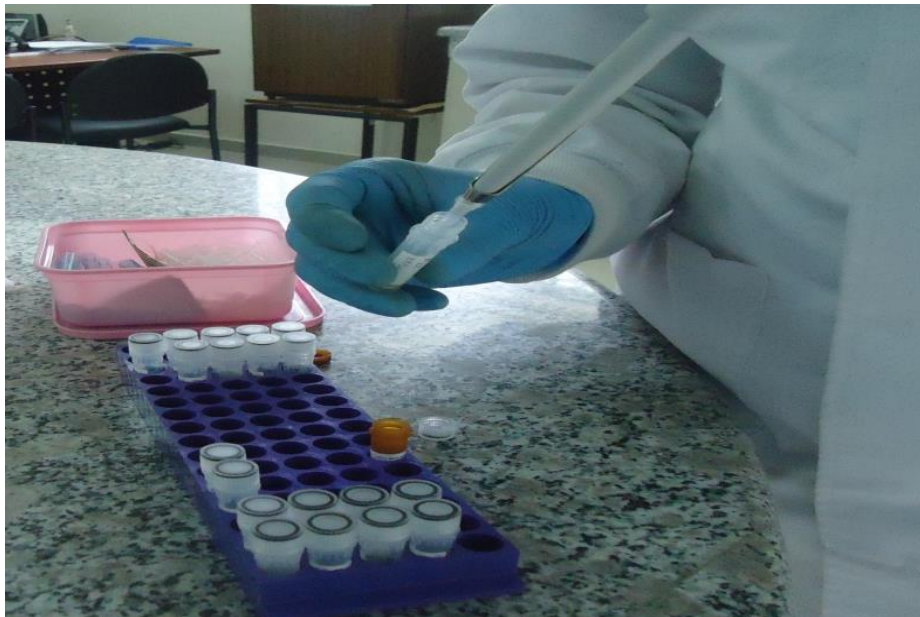
ANEXO 9: Registro fotográfico.

Foto 1: Toma de muestra de los estudiantes.



Fotografía: Autores.

Foto 2: Tratamiento de la Muestra.



Fotografía: Autores.

Foto 3: Kit de reactivo.



Fotografía: Autores.

Foto 4: Equipo de ultracongelación.



Fotografía: Autores.

Foto 5: ajuste de pH del reactivo TBA con NaOH 10%.



Fotografía: Autores.

Foto 6: Muestras en Baño María y baño de hielo.



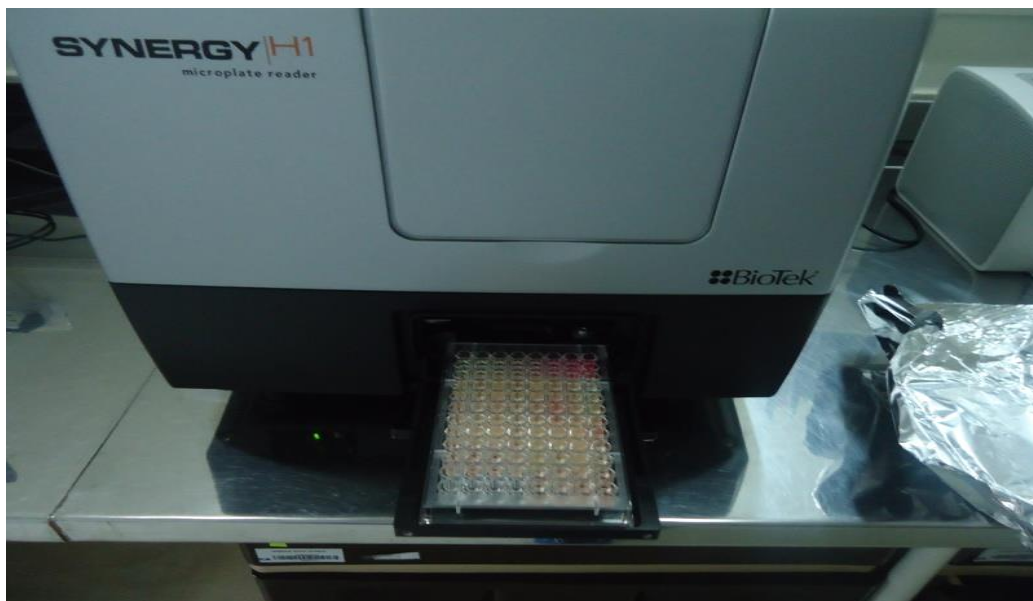
Fotografía: Autores.

Foto 7: Microplaca con muestras para su lectura.



Fotografía: Autores.

Foto 8: Equipo de lectura de microplacas.



Fotografía: Autores.

ANEXO 10: Inserto del reactivo.

Manual del producto

OxiSelect™ TBARS Assay Kit (MDA Quantitation)

Número de catálogo

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

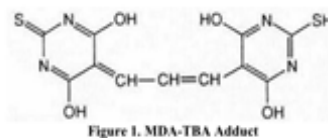


Introducción

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,

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

Materiales no 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.



- 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

Las figuras siguientes demuestran resultados típicos de la cuantificación de la MDA por Kit de ensayo de TBARS. Uno debe utilizar los datos a continuación para la referencia solamente. Estos datos no deben utilizarse para interpretar los resultados reales.

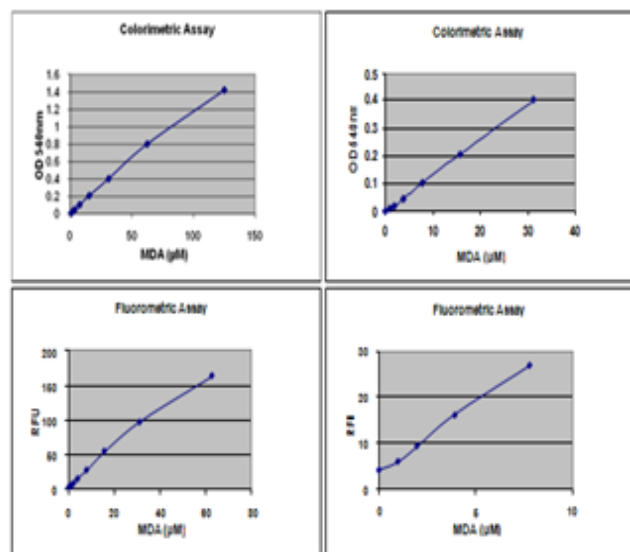


Figura 2. MDA curva estándar. La curva estándar MDA fue creado como se describe en el Ensayo.



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

