



Universidad de Valparaíso
Escuela de Kinesiología
Facultad de Medicina

**EFFECTOS DEL CONSUMO DE TABACO Y NIVEL DE ACTIVIDAD
FÍSICA, EN EL BALANCE REDOX DE FUNCIONARIOS DE
ENTRE 35 Y 55 AÑOS DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO**

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO
EN KINESIOLOGÍA

AUTORES: CAMILA CABRERA CERDA
SEBASTIÁN ORMEÑO ORTIZ

PROFESOR GUÍA: DANIEL PONCE CORREA
Klgo, Mg.

Escuela de Kinesiología
Facultad de Medicina
Universidad de Valparaíso

Valparaíso-Chile

2020



Universidad de Valparaíso
Escuela de Kinesiología
Facultad de Medicina

**EFFECTOS DEL CONSUMO DE TABACO Y NIVEL DE ACTIVIDAD
FÍSICA, EN EL BALANCE REDOX DE FUNCIONARIOS DE
ENTRE 35 Y 55 AÑOS DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO**

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO
EN KINESIOLOGÍA

AUTORES: CAMILA CABRERA CERDA
SEBASTIÁN ORMEÑO ORTIZ

PROFESOR GUÍA: DANIEL PONCE CORREA
Klgo, Mg.

Escuela de Kinesiología
Facultad de Medicina
Universidad de Valparaíso

Valparaíso-Chile

2020

CAPITULO I

I. Dedicatoria

Luego de este largo proceso tan importante, queremos dedicar esta investigación a nuestras familias, las cuales fueron un pilar importante durante el desarrollo de este proceso.

II. Agradecimientos

En primer lugar queremos agradecer a nuestro profesor guía Daniel Ponce Correa, por su gran apoyo y paciencia durante la realización de esta investigación y entrega de su conocimiento para el desarrollo de esta, también queremos nombrar a la profesora Maria Ignacia Grossi Bagnara por su apoyo durante la aplicación de la investigación al igual que los profesores Carlos Jara Gutiérrez, Karinna Agurto Hernández, Marilyn Paz Araos y Juan Cristian Rojas Montero por su ayuda en la resolución de dudas y formar parte de este proceso tan significativo para nosotros.

En último lugar, pero no menos importante, agradecemos a nuestros amigos y familiares que estuvieron presentes entregando su apoyo incondicional y constante ánimo en los momentos difíciles que se nos fueron presentando.

A todos y cada uno de ellos, gracias totales.

III. ÍNDICE

CAPÍTULO I

I.	DEDICATORIA.....	I
II.	AGRADECIMIENTOS.....	II
III.	ÍNDICE.....	III
IV.	ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRAFICOS.....	V
V.	ABREVIATURAS Y/O SIGLAS.....	VI
VI.	RESUMEN.....	VIII
VII.	ABSTRACT.....	IX

CAPITULO II

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	MARCO TEÓRICO.....	5
2.1	Tabaquismo.....	5
2.2	Obesidad y Actividad Física.....	8
2.3	Balance REDOX.....	11
2.3.1	Estrés Oxidativo.....	12
2.3.2	Especies Reactivas de Oxígeno.....	13
2.3.3	Radicales Libres.....	15
2.4	Daño a macromoléculas.....	15
2.4.1	Anión Radical Superóxido.....	17
2.4.2	Peroxido de hidrogeno.....	17
2.4.3	Radical hidroxilo.....	18
2.4.4	Peroxinitrito.....	18
2.5	Defensas antioxidantes enzimáticas.....	18
2.5.1	SOD.....	19
2.5.2	CAT.....	19
2.5.3	GSH/GSSG.....	20
2.6	Antioxidantes no enzimáticos.....	20
2.6.1	Moléculas de sacrificio.....	20
2.6.2	Quelantes.....	20
2.6.3	Inductores.....	21
2.7	Tabaquismo y Balance REDOX.....	21
2.8	Obesidad y Balance REDOX.....	22

CAPITULO III

3	METODOLOGÍA.....	27
3.1	Hipótesis de Investigación.....	27
3.2	Objetivo General.....	28
3.3	Objetivos Específicos.....	28
3.4	Aprobación del comité.....	28
3.5	Proceso de Reclutamiento.....	29
3.6	Criterios de selección de la muestra.....	31
3.7	Criterios de inclusión y exclusión.....	31
3.8	Población.....	34
3.9	Muestra.....	34
3.10	Materiales.....	35
3.10.1	Extracción de muestra sanguínea.....	35
3.10.2	Instrumentos de medición.....	36
3.10.3	Equipos.....	36
3.10.4	Reactivos.....	36
3.11	Evaluación del daño oxidativo.....	37
3.11.1	TBARS.....	38
3.11.2	CARBONILOS.....	38
3.11.3	PAOP.....	39
3.12	Evaluación de defensas antioxidantes	39
3.12.1	Proteínas totales.....	39
3.12.2	SOD.....	39
3.12.3	CAT.....	39
3.12.4	TRAP.....	40
3.13	Análisis estadístico.....	41
3.13.1	Resultados.....	41
3.13.2	Descripción de la muestra.....	41
3.13.3	Actividad física.....	41
3.13.4	Perfil antropométrico	42
3.13.5	Dependencia física a la nicotina	45
3.13.6	Perfil REDOX.....	46
3.13.6.1	Daño oxidativo.....	46
3.13.6.2	Defensas no enzimáticas.....	46
3.13.6.3	Defensas enzimáticas.....	47
3.13.7	Análisis correlacional.....	47
4	Discusión.....	48
5	Conclusión.....	53
6	Bibliografía.....	55

7 Anexos.....	59
---------------	----

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla N°1: Variables en estudio	24
Tabla N°2: Criterios de inclusión y exclusión del grupo fumador	31
Tabla N°3: Criterios de inclusión y exclusión del grupo no fumador	32
Tabla N°4: Reactivos para determinar parámetros REDOX	36
Tabla N°5: Clasificación del nivel de actividad física en grupo fumador y no fumador	42
Tabla N°6: Valores de media, desviación estándar, normalidad (p-valor) y comparación de medias entre grupos para subvariables de todos los sujetos	44
Tabla N°7: Valores de media, desviación estándar, normalidad (p-valor) y comparación de medias para la medición de parámetros REDOX según todos los sujetos.	46
Gráfico N°1: Comparación de medias de peso en grupo fumador y no fumador.	43
Gráfico N°2: Comparación de medias de IMC en grupo fumador y no fumador.	43
Gráfico N°3: Comparación de medias de iCE en grupo fumador y no fumador.	44
Gráfico N°4: Comparación de puntajes en el test de Fargeström en sujetos fumadores.	45

ABREVIATURAS Y/O SIGLAS

OMS:	Organización Mundial de la Salud
OPS:	Organización Panamericana de la Salud
EROS:	Especies Reactivas de Oxígeno
ERNS:	Especies Reactivas de Nitrógeno
IMC:	Índice de Masa Corporal
MINSAL:	Ministerio de Salud
EPOC:	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
TNF- α :	Factor de necrosis tumoral alfa
IL:	Interleucinas
TGF- β :	Factor de crecimiento transformante beta
MCP-1:	Proteína quimioatrayente de monocitos
PAI-1:	Inhibidor del activador del plasminógeno 1
NF-KB:	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
REDOX:	Balance oxido reductivo
ATP:	Adenosin trifosfato
MDA:	Malondialdehido
SOD:	Enzima Superóxido Dismutasa
NO:	Óxido nítrico
GSH:	<i>Reduced glutathione</i>
GSSG:	<i>Oxidized glutathione</i>
NRF-2:	Factor nuclear 2 derivado del eritroide 2
AP-1:	Proteína activadora -1
PAOP:	Productos avanzado de oxidación de proteínas
GS-TNB:	Glutación oxidado
GR:	Glutación reductasa

QPAQ: Cuestionario global de actividad física
ICE: Índice cintura estatura
AF: Actividad física

Resumen

Objetivo: *Evaluar el efecto del consumo de tabaco, el nivel de actividad física y el perfil antropométrico sobre el perfil REDOX en funcionarios de la Universidad de Valparaíso, Facultad de Medicina.*

Método: *El presente estudio corresponde a un diseño observacional descriptivo analítico, con una muestra no probabilística con comparación entre dos grupos. La muestra la conformaron 12 sujetos de sexo masculino, con edades entre 35 y 55 años, divididos en 2 grupos (Grupo fumadores y Grupo no fumadores) funcionarios de la facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso, Chile. En cada grupo se evaluó parámetros antropométricos (peso, talla, IMC e índice C/E), parámetros REDOX (indicadores de Daño oxidativo y defensas antioxidantes) y nivel de actividad física (GPAQ).*

Resultados: *No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) para las evaluaciones antropométricas, además la mayoría de los sujetos en estudio presentaban un nivel de actividad física moderado. El grupo fumador presentó mayor daño oxidativo ($p < 0.05$) en comparación al grupo no fumador. Además de diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos respecto a las defensas antioxidantes enzimáticas.*

Conclusiones: *El consumo crónico de tabaco genera un desbalance REDOX predominando un estado oxidativo el cual promueve un aumento de las defensas antioxidantes que no son suficientes para evitar el daño oxidativo a membranas y proteínas en la población estudiada, la variable de consumo de tabaco va a repercutir en el perfil REDOX del consumidor.*

Palabras claves: *Tabaquismo, actividad física, estrés oxidativo, defensa antioxidante.*

Abstract

Objective: *To evaluate the effect of tobacco consumption, the level of physical activity and the anthropometric profile on the REDOX profile in officials of the University of Valparaíso, Faculty of Medicine.*

Methods: *The present study corresponds to an analytical descriptive observational design, with a non-probabilistic sample with comparison between two groups. The sample was made up of 12 male subjects, aged between 35 and 55 years, divided into 2 groups (Smoking group and Non-smoking group) officials of the Faculty of Medicine of the University of Valparaíso, Chile. Anthropometric parameters (weight, height, BMI and C / E index), REDOX parameters (indicators of oxidative damage and antioxidant defenses) and level of physical activity (GPAQ) were evaluated in each group.*

Results: *There were no statistically significant differences ($p > 0.05$) for anthropometric evaluations, in addition, most of the study subjects had a moderate level of physical activity. The smoker group showed greater oxidative damage ($p < 0.05$) compared to the non-smoker group. In addition to statistically significant differences in both groups regarding enzymatic antioxidant defenses.*

Conclusions: *Chronic tobacco consumption generates a REDOX imbalance, with an oxidative state prevailing, which promotes an increase in antioxidant defenses that are not sufficient to prevent oxidative damage to membranes and proteins in the studied population, the variable of tobacco consumption will have an impact on the REDOX profile of the consumer.*

Key words: *Smoking, physical activity, oxidative stress, antioxidant defense.*

CAPITULO II

Introducción

En la actualidad el tabaquismo es considerado como una de las pandemias que genera mayor amenaza de la salud pública. Anualmente mata a más de 8,2 millones de personas donde 7 millones son consumidores directos de cigarrillos y 1,2 millones son no fumadores expuestos al humo ajeno, conocidos como fumadores pasivos. (OMS, 2019). El consumo directo e indirecto de cigarrillos son considerados las principales causas de mortalidad, morbilidad y discapacidad prevenibles. (OPS, 2013).

El consumo de cigarrillos es un factor de riesgo para padecer patologías crónicas no transmisibles, donde es responsable del 71% de los cánceres de pulmón, 42 % de las enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, y de cerca del 10 % de las enfermedades cardiovasculares. (Plá, 2016).

Se ha relacionado el aumento de las especies reactivas de oxígeno (EROS) y de Nitrógeno (ERNS) con el consumo de cigarrillos producto del humo de combustión de estos (Nagamma, 2011). El humo del cigarrillo contiene una alta concentración de EROS incluyendo a Radicales libres, un grupo de EROS altamente reactivos y de muy baja vida media, además de sustancias adictivas y productos de combustión altamente nocivos para el organismo, que en

conjunto activan las respuestas inmunes gatillando reacciones inflamatorias que desempeñan un papel importante en la injuria tisular producto del desbalance entre las especies oxidantes y las defensas antioxidantes propias del organismo como las adquiridas a través de la dieta (Karademirci, 2017).

Tanto EROS como ERNS tendrían un rol importante en el mecanismo fisiopatológico de las enfermedades mencionadas anteriormente (Filaire, 2013). Pero es importante destacar que éstas, también tienen un papel esencial como segundos mensajeros en la regulación de diversos procesos fisiológicos como apoptosis, supervivencia y vías de señalización (Filaire, 2013).

El rol de EROS y ERNS en el funcionamiento del organismo, depende del equilibrio entre estas (sustancias Pro oxidantes) y la capacidad antioxidante del organismo, lo que se denomina Balance óxido reductivo (Balance REDOX). La capacidad antioxidante de un organismo, que se ve influida por múltiples factores, dentro de ellos cabe destacar la dieta como el nivel de actividad física (Filaire, 2013), dependiendo de la cantidad como la calidad de esta, la capacidad antioxidante se puede ver aumentada o disminuida.

La organización mundial de la salud (OMS) define a la obesidad como una enfermedad crónica no transmisible y un factor de riesgo para patologías como Diabetes Mellitus tipo II, Hipertensión, Dislipidemia, entre otros. La OMS define sobrepeso en adultos con un índice de masa corporal (IMC) de 25-29,9 Kg/m² y la obesidad con un IMC superior o igual a 30 Kg/m². La obesidad ha alcanzado

características epidémicas a nivel mundial donde en el año 2016, más de 1900 millones de adultos de 18 o más años tenían sobrepeso, de los cuales, más de 650 millones eran obesos, estas cifras van relacionadas con datos de sedentarismo, donde al menos el 60% de la población mundial no realiza algún tipo de actividad física (OMS, 2020)

La actividad física bajo el concepto de salud pública, es una de las estrategias más relevantes a implementar debido a sus beneficios en la salud de los sujetos sanos como aquellos que padecen de alguna patología (Barrera, 2017). Existe relación inversa entre el nivel de actividad física y la obesidad, siendo la actividad física un factor que promueve la prevención y controla los efectos deletéreos de la obesidad, al generar mejoras en la función cardiovascular, perfil lipídico, pérdida de la masa ósea y muscular, además de beneficios en la salud mental del sujeto (Cuadri, 2018).

La obesidad produce un estado proinflamatorio y por consiguiente un desbalance oxido reductivo con un aumento de las EROS y una disminución de la capacidad antioxidante en el organismo, esto ya que la malnutrición por déficit o por exceso se relaciona con un impacto de manera negativa sobre la capacidad antioxidante (Salazar, 2019).

Tanto el aumento en la concentración de EROS y ERNS como la disminución en la capacidad antioxidante de un organismo genera un desequilibrio en el Balance REDOX conocido como Estrés oxidativo el cual tiene un rol esencial en

la patogénesis de variadas enfermedades, procesos de envejecimiento, etc. (Filaire, 2013). La obesidad, por sí sola, puede inducir estrés oxidativo sistémico a través de diversos procesos bioquímicos (Manna, 2015).

Se ha demostrado que el aumento de triglicéridos a nivel intracelular reduce la velocidad de la cadena de transporte de electrones causando desacoplamiento y liberación de EROS. (García, 2017). Está descrito que una reducción en el peso en sujetos con sobrepeso y obesidad, disminuye los marcadores de estrés oxidativo, aumenta las defensas antioxidantes y reduce los factores de riesgo patológicos asociados a la obesidad (Manna, 2015).

Tanto el aumento en la concentración de EROS y ERNS como la disminución en la capacidad antioxidante de un organismo genera un desequilibrio en el Balance REDOX conocido como estrés oxidativo el cual tiene un rol esencial en la patogénesis de variadas enfermedades, procesos de envejecimiento, etc. (Filaire, 2013). La práctica regular de actividad física como el entrenamiento constante, promueve una mantención del balance redox, influyendo tanto en la generación de EROS como en el aumento de la capacidad antioxidante endógena. (Arquer, 2010).

Tanto el consumo de tabaco, como la inactividad física y la obesidad pueden generar una alteración del balance redox promoviendo un estado oxidativo facilitando la generación de enfermedades crónicas.

Es por esto que el propósito de esta investigación es medir los efectos del consumo de tabaco en el Balance Redox de funcionarios de entre 35 y 55 años de la facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso, para conocer su estado oxido reductivo, además a través de una encuesta evaluar el nivel de actividad física y así poder relacionar los resultados con los datos obtenidos.

A continuación, dentro del marco teórico se definirán los conceptos necesarios para comprender la relación entre el tabaquismo, obesidad, actividad física, el desbalance oxido-reductivo (REDOX) y el daño tisular.

Marco Teórico

Tabaquismo

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define al tabaquismo como una enfermedad adictiva crónica que evoluciona con recaídas. La nicotina es la principal sustancia responsable de la adicción, actuando a nivel del sistema nervioso central, la cual tiene como característica generar tolerancia, dependencia física y psicológica (Lieberman, 2018). Una de las herramientas más utilizadas para medir el grado de dependencia a la nicotina es el test de Fagerström (ANEXO N° 1). Cabe mencionar que actualmente, el tabaquismo, es considerado como una pandemia que genera la mayor cantidad gastos no solo a nivel de salud pública, sino que también al costo del capital humano producto de su morbilidad (OMS, 2019). (MINSAL, 2003)

El tabaquismo es la principal causa de enfermedad, discapacidad y muerte prematura prevenible (OMS, 2015) y los fumadores pierden en promedio diez años de esperanza de vida en comparación con los no fumadores (Thun, 2013), sumado a esto se ha establecido una relación negativa entre fumar y la calidad de vida, la magnitud de esta relación es directamente proporcional a la cantidad de cigarrillos consumidos, aquellos que consumen menos de 10 cigarrillos al día, la expectativa de vida promedio disminuye en 5 años, y el riesgo de padecer cáncer de pulmón aumenta en 20 veces, mientras que los que fuman menos de 4 cigarrillos al día, el riesgo de padecerlo es de 5 veces más en comparación a un no fumador (Grossi, 2018).

Así también el humo consumido de segunda mano parece estar asociado de la misma forma con la calidad de vida (Goldenberg, 2014), causando así una pérdida de años de vida saludables en los fumadores (Grossi, 2018). Dejar de fumar mejora de manera significativa la calidad de vida y todo lo descrito anteriormente se ha replicado en todo el mundo, independientemente del grupo socioeconómico o de las culturas (Goldenberg, 2014).

Según el último informe de la Organización Panamericana de Salud (OPS), Chile es el país con la mayor prevalencia al consumo de tabaco con un 38,7% (OPS, Año), entre los países de América, y a nivel Nacional según la Encuesta Nacional de Salud, el 33,3% de los chilenos son fumadores (ENS, 2017).

El tabaquismo es un factor causal de diversas enfermedades que afectan a todos los sistemas del organismo, más aún, esta enfermedad afecta tanto a

fumadores como no fumadores (OMS, 2015). Una de las principales patologías causadas por el consumo de tabaco es la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) (Salvi & Barnes, 2009; Eisner et al, 2010), enfermedad pulmonar con una afectación sistémica, la cual es la responsable de la mayoría de los gastos en salud. Además, el consumo de cigarrillos es considerado como uno de los principales factores de riesgos de las cuatro principales patologías crónicas no transmisibles consideradas más prevalentes en la actualidad, las cuales son, las patologías cardiovasculares, cáncer, patologías respiratorias crónicas y diabetes mellitus tipo II. (Barral, 2018).

Las patologías que afectan al sistema respiratorio implican una respuesta inflamatoria en donde hay una activación de células endoteliales, células epiteliales, macrófagos residentes además de una activación de neutrófilos, eosinófilos, monocitos, y linfocitos (Colombo, 2014).

Colombo (2014) relaciona el consumo de cigarrillos y su rol importante en la activación de vías celulares que promueven la inflamación, la cual actúa a través de tres vías:

- (i) Producción de moléculas quimiotácticas directamente estimuladas por EROS presentes en el humo de combustión del cigarrillo.
- (ii) Activación de diversas vías de señalización intracelular induciendo la expresión de citoquinas y moléculas de adhesión.
- (iii) Estimulación de la remodelación de la cromatina que promueve la expresión de diversos genes con un rol proinflamatorio.

La inflamación crónica a nivel pulmonar produce un engrosamiento de la pared bronquial por lo tanto aumenta la resistencia al paso del aire, también hay destrucción de alvéolos disminuyendo la cantidad de unidades donde ocurre el intercambio gaseoso y una disminución de la distensibilidad propia del tejido pulmonar. (Paredes, 2017). Este proceso inflamatorio a nivel pulmonar genera una respuesta de reparación y remodelación del tejido dañado, donde hay un reemplazo de elastina por colágeno por lo tanto los componentes elásticos pulmonares se ven disminuidos. (Franks, 2015)

Dentro de la composición del humo generado por la combustión del cigarrillo se pueden encontrar 4000 sustancias químicas que son altamente tóxicas, algunas de éstas con alto potencial cancerígeno, además que cada cigarrillo produce 250 cc de humo. (MINSAL, 2003)

Obesidad y actividad física

Según la OMS (2020), la obesidad se define como una acumulación excesiva de grasa la cual es perjudicial para la salud donde hay un desbalance entre la ingesta y el gasto. El concepto de obesidad va de la mano con el IMC el cual es un indicador para identificar el nivel de sobrepeso u obesidad en adultos donde de 25-29,9 Kg/m² es considerado sobrepeso y obesidad con un IMC superior o igual a 30 Kg/m². En la actualidad la obesidad es considerada como una enfermedad crónica no transmisible la cual ha ido en aumento y que

actualmente se encuentra dentro de las grandes problemáticas para la salud pública a nivel mundial.

La obesidad se relaciona con el estilo de vida de las personas como la inactividad física, consumo excesivo de alcohol, insuficientes horas de sueño y hábito tabáquico, además de factores propios de la persona como la edad, sexo, genética, factores fisiológicos, ambientales y socioeconómicos. (Pettermann, 2017).

En la obesidad el tejido adiposo presenta una alteración en la función de almacenamiento de grasas (Suárez, 2017), caracterizado por una acumulación anormal o excesiva como resultado de la hipertrofia y/o hiperplasia de adipocitos (Savini, 2016). Además, se acompaña de una inflamación crónica que lleva a una activación del sistema inmune y lipotoxicidad dada por los adipocitos cuando alcanzan su máximo de almacenaje para grasas, lo cual es un factor de estrés metabólico (Salazar, 2019).

En la obesidad hay mayor número de adipocitos y aquellos ácidos grasos que no logran depositarse en el tejido adiposo, se almacena en otros órganos generando lipotoxicidad por acumulación en forma reactiva de ácidos grasos. Además, el tejido adiposo de un sujeto obeso se caracteriza por tener mayor número de macrófagos infiltrantes los cuales son activados por ácidos grasos generando la activación de una respuesta inflamatoria (Ricote, 2016).

Esta respuesta inflamatoria está influenciada de manera directa por las citoquinas y adipoquinas secretadas por el tejido adiposo como la leptina, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-18), Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), Proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) e interleucinas (IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13) y por consiguiente esta respuesta inflamatoria crónica genera un desbalance oxidoreductor (Liñán, 2016).

La actividad física se entiende como cualquier movimiento producido por los músculos esqueléticos que implican un gasto de energía. Por ejemplo, caminar, practicar yoga, bailar, nadar, trabajar en la huerta o jardín, entre otros. Son movimientos corporales que se realizan con el fin de ejecutar una tarea, juego, o una actividad recreativa que benefician la salud. En sujetos adultos se recomienda la realización de actividad física como mínimo de 150 minutos semanales de actividad física aeróbica, de intensidad moderada, o bien 75 minutos de actividad física aeróbica vigorosa cada semana, o bien una combinación equivalente de actividades moderadas y vigorosas. (OMS, 2018).

Se plantea que la práctica de actividad física de manera regular es un protector frente a la inflamación crónica, produce cambios en el fenotipo de los macrófagos pasando del fenotipo de macrófago M1, el cual es proinflamatorio, a un fenotipo de macrófago M2, los cuales inhiben la actividad citotóxica. Además, genera angiogénesis, aumento de la circulación sanguínea, y

regeneración celular, disminuye la infiltración de macrófagos, vasoconstricción y citoquinas inflamatorias. (Liñán, 2016).

Balance Oxido Reductivo

El Balance REDOX en sistemas biológicos se define como el equilibrio entre las sustancias oxidantes y los mecanismos antioxidantes. Existen dos parámetros muy importantes para evaluar este equilibrio, la capacidad antioxidante total y el estado oxidante total (Maciejczyk, 2018). Este concepto es un componente crítico en el proceso de envejecimiento, iniciación y desarrollo de enfermedades de notable mortalidad y morbilidad (aterosclerosis, cáncer, enfermedades autoinmunes, daño por isquemia-reperfusión, entre otras) y estrechamente vinculado con el estrés oxidativo en donde las especies reactivas de oxígeno provocan daño celular directo, además de actuar como segundos mensajeros intracelulares al modular las vías de transducción de señales (Martínez, 2005)

El rol fisiológico de las EROS tiene relación con la activación e inhibición de procesos celulares que regulan la concentración hormonal, además de estar involucradas en la activación enzimática. Por ejemplo, las EROS inducen la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kB) responsable del control de la transcripción del ADN.

A nivel del sistema nervioso, la potenciación a largo plazo relacionado con la memoria, ha demostrado que requiere la participación de EROS, también en el sistema inmune actúan mediando respuestas inmunes y ayudando en el mecanismo de defensa contra patógenos, además de participar en la producción de células T reguladoras. (Zuo, 2015).

Estrés oxidativo

El Estrés Oxidativo se da en las células y tejidos cuando hay un desbalance entre las sustancias Pro-oxidantes y Antioxidantes, particularmente, éste se puede instaurar con un aumento de las sustancias pro-oxidantes, una disminución de las defensas antioxidantes, o una combinación de ambas (Viada, 2017). Esta condición provoca la oxidación de diversos componentes tisulares y celulares tales como lípidos, proteínas y ADN, lo cual puede modificar la función de estas macromoléculas alterando la función y la indemnidad celular y tisular (Kalyanaraman, 2013).

El antioxidante se define como cualquier sustancia o proteína capaz de disminuir la generación de EROS, evitar el daño oxidativo y promover la reparación de las macromoléculas afectadas. En condiciones normales los antioxidantes se encuentran en una concentración suficiente para evitar el daño oxidativo, pero permitiendo la acción fisiológica de las sustancias oxidantes (Balance REDOX) (Finkel, 2000), la actividad antioxidante en condiciones de

normalidad se adecúa a las demandas sistémicas aumentando cuando existe una mayor cantidad de sustancias prooxidantes, proceso que muchas veces conlleva la transcripción de complejos enzimáticos y por tanto es una respuesta lenta considerando la vida media de las EROS. (Kalyanaraman, 2013).

En la normalidad el organismo cuenta con mecanismos de saneamiento tanto de las EROS como del daño producido por estas, como lo es el glutatión y su complejo enzimático, las vitaminas C y E, y las enzimas, incluyendo las catalasas, peroxidasas y superóxido dismutasas. Un aumento de los niveles de EROS o una disminución en la capacidad antioxidante endógena puede generar procesos celulares que son sensibles a estados REDOX, como la apoptosis mediada por la vía mitocondrial, secundario a la alteración en la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial. (Coen, 2015).

A continuación, para comprender de mejor manera se definen las principales especies reactivas de oxígeno y sus roles dentro del organismo.

Especies reactivas de Oxígeno

El oxígeno es vital para la supervivencia de los organismos aeróbicos, durante el metabolismo aeróbico en una célula normal se generan entre 30-32 moléculas de Adenosín trifosfato (ATP) de una molécula de oxígeno. Durante este proceso el oxígeno es reducido a una molécula de agua, en el cual se realizan cuatro reducciones de forma consecutiva. Además, el oxígeno es un

cofactor esencial en muchas oxidaciones biológicas, como en el *Burst* oxidativo generado por los fagocitos, y en la metabolización de algunos fármacos. (Kalyanaraman, 2013)

Las EROS son metabolitos del oxígeno reducido que poseen una alta capacidad oxidante, estas se producen de manera normal en el organismo, dentro de estos procesos destaca la producción de anión radical superóxido en el metabolismo aeróbico, la metabolización de sustancias (peroxisomas y citocromo p450), defensa inmune (NADPh oxidasa) y regulación del tono vasomotor y comunicación nerviosa (óxido nítrico sintasa desacoplada). (Carvajal, 2019).

Estas tienen propiedades químicas inherentes que confieren reactividad a diferentes componentes biológicos. Las EROS a menudo están asociadas con el principio de estrés oxidativo, lo que sugiere que causan patologías a través del daño de proteínas, lípidos y ADN entre otros componentes que se ven afectados por el aumento de EROS (Schieber, 2014). Pero, por otra parte, cuando se encuentran en concentraciones controladas, su rol es actuar como moléculas de señalización en el mantenimiento de algunas funciones fisiológicas y biológicas (Schieber, 2014), por ejemplo, en la activación de la autofagia (Scherz-Shouval, 2011). Las EROS cumplen un rol importante en la proliferación, diferenciación, supervivencia y metabolismo celular, además de la transducción de señales (Salas, 2017).

Radicales libres

Dentro de las EROS se encuentran los radicales libres, éstos corresponden a un átomo o molécula con un solo electrón no apareado en su último orbital. Los electrones son más estables cuando se encuentran apareados en los orbitales por lo tanto los radicales libres son reactivos frente a otras especies debido a su inestabilidad. El electrón desapareado del radical libre puede donar su electrón a otra molécula o formar un par electrónico con el electrón de otra molécula, sin embargo, en cualquiera de estas dos situaciones la otra molécula se transforma en radical libre (Carvajal 2019).

Daño oxidativo a macromoléculas

Las EROS tienen el potencial de interactuar, desestabilizar y dañar a diversas estructuras celulares, dentro de las cuales destacan: ADN, lípidos y proteínas.

i) Daño al ADN: Ocurre un daño oxidativo en los ácidos nucleicos, donde el ADN mitocondrial es más dañado que el ADN nuclear debido a la cercanía del lugar donde se generan EROS. Aquí el radical hidroxilo juega un rol importante ya que reacciona directamente en los componentes del ADN, ocurre una pérdida de la continuidad de uniones mono y bicatenarias en el ADN, junto con producir alteraciones en la estructura helicoidal. El daño producido por el radical

hidroxilo produce 8-hidroxi desoxiguanosina considerada como biomarcador del daño oxidativo en el ADN, además de estar relacionado como carcinogénesis, mutagénesis y envejecimiento.

ii) Lípidos: Dentro de los lípidos de membrana los más susceptibles al daño oxidativo son ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos, aquí ocurre la lipoperoxidación, una reacción en cadena iniciada por EROS, la cual genera una disminución de la fluidez de la membrana, inactivación de las enzimas unidas a la membrana y receptores. La peroxidación lipídica ocurre cuando cualquier radical libre ataca y extrae hidrógeno de un grupo metileno en un ácido graso dando la formación de un radical lipídico, este puede reaccionar con el oxígeno molecular para formar un radical peroxilo lipídico el cual se reordena mediante una reacción para formar endoperóxidos, que finalmente forman malondialdehído (MDA) el cual es un producto final tóxico de la peroxidación de lípidos que causan daño al ADN. y proteínas.

iii) Proteínas: Las EROS oxidan aminoácidos que se encuentran dentro de las proteínas y pueden alterar ciertos enlaces (como puentes disulfuros), lo que da como resultado enlaces cruzados proteína-proteína generando así una desnaturalización de estas, llevando a una pérdida o alteración de su actividad enzimática y de la función de los receptores y proteínas de transporte. Esta oxidación puede ser producida por diversas EROS dentro de las cuales destaca el anión radical superóxido y el radical hidroxilo. (Phaniendra, 2015)

Anión Radical superóxido (O_2^-)

Corresponde al radical en más abundancia a nivel celular, su formación principalmente es en la cadena transportadora de electrones (Corrales, 2012). Esta molécula corresponde al primer paso en la reducción univalente del oxígeno, y es generado por la reducción parcial del oxígeno (Takakashi & Asada, 1983), además esta molécula es de carga negativa, con alta reactividad y con una vida útil en el organismo de pocos segundos, sin embargo, es dañino cuando aumenta su biodisponibilidad (Kalyanaraman, 2013).

Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)

Especie reactiva de oxígeno estable que se encuentra en su mayoría en la matriz mitocondrial, la cual puede cruzar membranas y afectar sectores aledaños a su génesis. Presenta una actividad reactiva de gran importancia ya que en presencia de hierro es capaz de formar el radical hidroxilo. Esta molécula se forma a través de una reducción parcial del oxígeno o en la dismutación del radical superóxido por la enzima superóxido dismutasa (SOD). (Corrales, 2012).

Óxido Nítrico (NO .)

Es un radical libre, generado enzimáticamente por la acción de la enzima NOS (*Nitric Oxide Synthase*), es permeable a la membrana celular, lo que le permite difundir a las células adyacentes y participar de vías de señalización, dentro de

la cual destaca la vasodilatación local. Ante la presencia de anión radical superóxido se puede generar peroxinitrito.

La disminución de su biodisponibilidad promueve la vasoconstricción, el aumento del estrés de roce y por tanto la generación de placas arteroscleróticas. (Farah y cols, 2018).

Radical Hidroxilo ($\text{OH}\cdot$)

Especie radicalaria que posee una alta reactividad, su vida media es corta ya que reacciona muy rápidamente con blancos celulares como ADN, proteínas, lípidos y carbohidratos. A nivel enzimático no hay fuente antioxidante contra esta especie radicalaria lo que la hace una de las especies reactivas de oxígeno con mayor capacidad de generar daño a nivel celular. (Corrales, 2012).

Peroxinitrito (ONOO^-)

Anión con alta actividad reactiva que incluso daña al ADN además de nitrar proteínas, por lo tanto, altera su función afectando a su vez a la regulación celular. Este anión es formado por la reacción entre óxido nítrico y anión radical superóxido (Pacher y cols, 2007).

Defensas antioxidantes:

Como se comentó previamente, las EROS son necesarias para el funcionamiento del organismo, sin embargo, cuando se encuentran en elevadas

concentraciones pueden generar daños. Es por eso que frente a esto y con el fin de regular, están las defensas antioxidantes enzimáticas que son fuentes endógenas, propias del organismo, las cuales juegan un rol importante en la prevención del daño producto del exceso de EROS. También se encuentran las defensas antioxidantes no enzimáticas o exógenas, las cuales se adquieren mediante la alimentación, una misma molécula puede tener varios mecanismos antioxidantes por lo tanto entrega una protección más completa al organismo.

Antioxidantes enzimáticos:

Superóxido Dismutasa (SOD)

SOD1 se ubica principalmente en citosol y en la intermembrana mitocondrial, mientras que SOD2 se ubica en la matriz mitocondrial evita la acumulación de superóxido, que puede dañar o inactivar proteínas (Schieber, 2014)

Catalasas

La enzima catalasa tiene por función catalizar la reacción de H_2O_2 a O_2 y H_2O , cuenta con una estructura de 4 subunidades, una de las cuales contiene un sitio de unión a NADPH el cual actúa como cofactor. Esta enzima se encuentra ampliamente presente en los organismos aeróbicos, presentando diversas subfamilias, siendo la catalasa humana perteneciente a la subfamilia Clase 3. (Pons, 2008)

Complejo glutatión peroxidasa, glutatión reductasa

La enzima glutatión peroxidasa tiene por función catalizar la reacción de H_2O_2 o LOOH (Peroxyl Radical) en H_2O , utilizando como cofactor GSH (Reduced Glutathione), formando como consecuencia GSSG (Oxidized Glutathione), el cual es nuevamente reducido por la acción de la enzima glutatión reductasa, utilizando como cofactor NADPH (Fig.6). (Espinoza y cols, 2008)

Antioxidantes no enzimáticos:

Moléculas de sacrificio

Los antioxidantes pueden actuar como moléculas de sacrificio, oxidándose al ceder un electrón para estabilizar a una especie reactiva de oxígeno. El antioxidante, ahora oxidado, es más estable y menos dañino que la especie reactiva de oxígeno, por lo cual se disminuye el daño a las macromoléculas celulares aledañas (Nimse, 2015)

Quelantes

Su actividad se basa en disminuir la disponibilidad de metales, con lo cual se disminuye la generación del radical Hidroxilo por la reacción de Fenton / Haber-Weiss. (Adjimandi y Asare, 2015)

Inductores

Otro medio de acción de algunos componentes con propiedades antioxidantes corresponde a la inducción de defensas antioxidantes endógenas, esto puede ser realizado a través de la facilitación de la liberación del Factor nuclear 2 derivado del eritroide 2 (NRF-2) y su translocación al núcleo, o a través de un mecanismo de prooxidación, induciendo entonces un estrés oxidativo fomentando la transcripción de defensas endógenas. (Kubo y cols, 2017)

Tabaquismo y Balance REDOX

El humo de cigarrillo es una mezcla de numerosos químicos cancerígenos, tóxicos, junto con radicales libre estables y EROS, estos últimos tienen un rol significativo en la toxicología del humo de cigarrillo. (Valavanidis, 2009)

En cuanto a la inhalación de los productos de combustión del tabaco, esto promueve una inflamación crónica, promoviendo una remodelación de la vía aérea con una limitación del flujo aéreo. La combustión del tabaco genera especies reactivas de oxígeno, Zhao (2012) estableció que el humo de cigarrillo convencional y cigarrillo “light” (el cual presenta un contenido menor de alquitrán y nicotina) presentan una cantidad total de especies reactivas de oxígeno de 120-150 nmol y 90-110 nmol, respectivamente. Estas sustancias son capaces de generar la activación de cadenas inflamatorias en el epitelio respiratorio promoviendo un desbalance oxido reductivo, lo que conlleva un

aumento de las sustancias oxidativas y una disminución de las defensas antioxidantes provocando un estrés oxidativo (Coen, 2015).

Las EROS y los radicales libres encontrados en el humo de cigarrillo son considerados como los principales promotores de la peroxidación lipídica de los lípidos de la membrana celular, lo cual aumenta la probabilidad de que exista una disfunción endotelial, aterosclerosis y patologías futuras. (Valavanidis, 2009). Cuando existe lipoperoxidación se generan productos finales de esta reacción los cuales se pueden medir para cuantificar el daño sufrido por las membranas celulares, dentro de estos marcadores destaca el malondialdehído, una de las principales consecuencias de la lipoperoxidación es una alteración en la fluidez e integridad de la célula lo cual disminuye la viabilidad de esta. (Jaggi, 2015).

Las EROS que se encuentran en la fase gaseosa al consumir cigarrillos genera una destrucción de los antioxidantes endógenos, disminuyendo las defensas propias del organismo frente a estas. (Valavanidis, 2009). Además, el humo de cigarrillo induce el plegamiento y agregación de proteínas, junto con un estrés en el retículo endoplasmático de las células ubicadas en el epitelio bronquial humano, al aumentar la activación de NADPH oxidasa y la producción de EROS (Lin, 2012).

Obesidad y Balance REDOX

Estudios han demostrado una fuerte asociación entre obesidad, estado redox alterado e inflamación, los sujetos obesos además suelen mostrar niveles elevados de ERNS, EROS, defensas antioxidantes deterioradas y niveles elevados de adipoquinas inflamatorias (Savini, 2016). La obesidad es un estado crónico que se relaciona con la producción de radicales libres a través de diversas vías: hiperglucemia, actividad muscular aumentada, defensas antioxidantes inadecuadas, oxidación de lípidos, inflamación crónica, hipertensión e hiperleptidemia son algunos posibles contribuyentes al estrés oxidativo en personas con obesidad (Manna, 2015 & Piva, 2011). La hiperglucemia está relacionada con la formación de productos finales de glicosilación avanzada, a partir de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos que se unen con receptores específicos de la superficie celular, generando EROS (Piva, 2011). La sobrealimentación alta en grasas, especialmente en ácidos grasos trans y saturados, y altos en carbohidratos promueven estrés oxidativo e inflamación en diferentes tipos de células (Savini, 2016).

En sujetos obesos el estrés oxidativo está relacionado de manera tan estrecha con la inflamación como para desencadenar un círculo vicioso donde las sustancias pro-oxidantes activan factores de transcripción sensibles a alteraciones redox como NF-kB y proteína activadora-1 (AP-1) las cuales impulsan la expresión de citoquinas proinflamatorias, estos mediadores a su vez, aumentan la producción de EROS contribuyendo así a la aparición y mantenimiento del estrés oxidativo (Savini, 2016)

VARIABLES EN ESTUDIO

Tabla N° 1: Variables en estudio

Variable	Sub-variables	Tipo	Definición	Dimensiones	Operación	
Antropometría	Índice de masa corporal (IMC)	Independiente	El índice de masa corporal (IMC), que relaciona el peso con la estatura, es una medida confiable y válida para identificar a adultos en riesgo de mortalidad y morbilidad, debido a sobrepeso u obesidad: $IMC = \frac{\text{peso (kg)}}{\text{estatura}^2 \text{ (m)}}$. Se considera sobrepeso a una persona con un IMC igual o superior a 25 y obeso desde	IMC:		IMC = Kg/m2
				Bajo peso	18,5 Kg/m2	
				Normal	18.5-24,9 Kg/m2	
				Sobre peso	> o igual 25.0-29,9 Kg/m2	
				Obesidad	> o igual 30 Kg/m2	
				Obesidad clase I	30.0-34.9 Kg/m2	
				Obesidad	35.0-39.9 Kg/m2	

			un IMC igual o mayor a 30.	<table><tr><td>dad clase II</td><td>9.9 Kg/m 2</td></tr><tr><td>Obesi dad clase III</td><td>> o igual a 40 Kg/m 2</td></tr></table> Guía clínica 2008 Examen Medicina Preventiva. (OMS)	dad clase II	9.9 Kg/m 2	Obesi dad clase III	> o igual a 40 Kg/m 2	
dad clase II	9.9 Kg/m 2								
Obesi dad clase III	> o igual a 40 Kg/m 2								
	Índice cintura estatura	Indepe ndiente	El índice cintura/ estatura tiene una gran capacidad para predecir factores de riesgo relacionados con la obesidad en niños y adultos, siendo un predictor de mortalidad general	Hombres: Bajo riesgo < 0,56 Alto Riesgo ≥0,56	IC/E = cintura (cms) /estatura (cms)				
Daño oxidativo	TBARS	Depend iente	Prueba que permite estimar el daño	Concentración de MDA	nM				

			oxidativo a lípidos (lipoperoxidación)		
	Carbonilos	Dependiente	Prueba que permite estimar el daño a proteínas	Concentración grupo carbonilo	mol carbonilo s/proteínas
	PAOP	Dependiente	Prueba que permite estimar productos avanzados de oxidación de proteínas	Concentración de productos avanzados de oxidación de proteínas	nM
	GSH/GSSG	Dependiente	Prueba que permite estimar la relación que existe entre la cantidad de glutatión oxidado y reducido	Relación entre la concentración de glutatión oxidado y reducido	
Capacidad antioxidante enzimática	SOD	Dependiente	Ensayo que estima la actividad antioxidante de la enzima SOD	Actividad enzimática	U enzima SOD/ mg proteína
	Catalasas	Dependiente	Ensayo que estima la actividad antioxidante de la enzima catalasa	Actividad enzimática	U enzima CAT / mg proteína

Capacidad antioxidante no enzimática	TRAP	Dependiente	Ensayo que mide la capacidad antioxidante total en sangre	Concentración equivalente de Trolox	nM
---	------	-------------	---	-------------------------------------	----

CAPITULO III

METODOLOGÍA

Pregunta investigación

¿Pueden el consumo de tabaco, la actividad física y el perfil antropométrico influir en el perfil REDOX de funcionarios de entre 35-55 años de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso?

Hipótesis de investigación

1. El consumo de tabaco tendrá un efecto negativo sobre el perfil oxidativo en los funcionarios de entre 35-55 años de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.
2. La inactividad física tendrá un efecto negativo sobre el perfil oxidativo en los funcionarios de entre 35-55 años de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

3. Un perfil antropométrico alterado tendrá un efecto negativo sobre el perfil oxidativo en los funcionarios de entre 35-55 años de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

Objetivo general:

Evaluar el efecto del consumo de tabaco, el nivel de actividad física y el perfil antropométrico sobre el perfil REDOX en funcionarios de la Universidad de Valparaíso, Facultad de Medicina.

Objetivos específicos

- Describir el perfil antropométrico y el nivel de actividad física de los grupos de estudio
- Determinar el perfil REDOX de los grupos de estudio (Daño oxidativo, Defensa antioxidante endógena y defensa antioxidante exógena).
- Evidenciar diferencias de los parámetros evaluados entre los grupos de estudio.
- Evaluar el nivel de correlación entre las variables estudiadas.

Aprobación del comité

Una vez seleccionado el tema y desarrollado como proyecto, fue enviado siendo aprobado por el comité de bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso el 20 de junio del 2019 (Anexo n°2)

1.1. Proceso de reclutamiento

Una vez aceptado el estudio por parte del comité de bioética se procede al proceso de reclutamiento de funcionarios de la Universidad de Valparaíso, en donde se realizaron los siguientes eventos enumerados:

1. Se solicitó la constancia del decano de la Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso Dr. Antonio Orellana Tobar para la participación de los funcionarios de la Facultad en esta investigación. (Anexo n°3).
2. Elaboración de Encuesta para determinar Criterios de Inclusión y Exclusión (Anexo n°4).
3. Elaboración del afiche publicitario para invitar a los funcionarios de la Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso (Anexo n°5)
4. Se procedió a enviar el afiche publicitario vía mail a las Secretarías Docentes de todas las carreras de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

5. Se pegaron afiches publicitarios por las dependencias de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.
6. Se realizó una capacitación para la medición de técnicas REDOX impartido por el laboratorio de bioensayos de la Universidad de Valparaíso.
7. Se recepcionaron todos los mails enviados por los posibles participantes y fueron citados para la lectura del consentimiento informado, posterior de la lectura su firma si gusta de participar, y fue aplicada la encuesta de criterios de inclusión y exclusión.
8. Se llevó a cabo la investigación con todos los sujetos que firmaron de manera voluntaria el consentimiento informado y cumplieron con todos los criterios de inclusión y exclusión.

Una vez terminada la primera parte, se planificó realizar la segunda parte relacionada a daño oxidativo, pero por motivos de fuerza mayor no se pudo llevar a cabo postergándose al año 2020. Durante la primera semana de marzo del 2020 el equipo de estudiantes se reunió junto a los profesores guías y el profesor Carlos Jara, para coordinar la fecha de toma de muestras, quedando pendiente a la confirmación del enfermero del laboratorio quien realizaría la extracción de los 10 ml de sangre por paciente y así poder comenzar con la aplicación de técnicas para la medición de parámetros oxidativos. Una vez confirmadas las fechas se procedió a tomar las muestras correspondientes al grupo de fumadores el día lunes 2 de marzo y en ese mismo día se prepararon

las muestras y se realizó la prueba de TBARS, la segunda fecha para la toma de muestras del grupo de no fumadores se realizó el viernes 6 de marzo y al igual que en el primer grupo se realizó TBARS. La segunda semana de marzo se trabajó en el laboratorio de lunes a viernes, de 9:00-17:30 realizando las siguientes pruebas: Carbonilos (9 de marzo), PAOP y proteínas totales (10 de marzo), SOD (11 de marzo), CAT y TRAP (12 de marzo) y GSH/GSSG (13 de marzo), quedaron pruebas pendientes y otras que se tenían que repetir producto de la situación mundial provocada por el COVID-19: SARS-CoV-2

Criterios de selección de la muestra

Durante el proceso de selección de la muestra, se aplicaron los criterios de exclusión e inclusión los cuales se puede visualizar en la Tabla N°2 y Tabla N°3

Criterios de Inclusión y Exclusión Grupo Fumador:

Tabla N° 2: Criterios Inclusión y exclusión grupo fumador

<i>Criterios de Inclusión</i>	<i>Criterios de Exclusión</i>
• Los sujetos deben ser de sexo masculino. • Los sujetos deben estar en un rango de edad entre los 35 a 55 años • Los sujetos deben ser sedentarios (Es decir	• Sujetos con diagnóstico médico de cáncer pulmonar. • Sujetos deportistas de alto rendimiento • Sujetos con Infarto al miocardio menor a 1 mes. • Sujetos con diagnóstico médico de miocarditis o pericarditis.

que no realicen al menos 150 minutos de actividad física) Los pacientes deben ser fumadores activos de cigarrillos de tabaco (Aquel que fuma	• Sujetos con diagnóstico médico de Angina inestable. • Sujetos con neumotórax reciente (2 semanas tras la resolución). • Sujetos con diagnóstico médico de inestabilidad hemodinámica. • Sujetos con aneurisma aórtico de gran tamaño o que ha crecido. • Sujetos con aneurisma cerebral complicado. • Sujetos con desprendimiento de retina reciente (1 mes). • Sujetos con diagnóstico médico de síndrome de hipertensión endocraneana. • Sujetos con crisis de hipertensión arterial/ Hipertensión arterial sistémica no controlada. • Sujetos con posoperatorio de biopsia pulmonar (una semana). • Sujetos con posoperatorio de cirugía abdominal o genitourinaria. • Sujetos con diagnóstico médico de incontinencia urinaria. • Sujetos con diagnóstico médico de insuficiencia cardíaca. • Sujetos con diagnóstico médico de Limitación crónica al flujo aéreo. • Sujetos con diagnóstico médico de cáncer pulmonar. • Sujetos con alguna discapacidad física que impida realizar la prueba. • Sujetos con diagnóstico médico de arritmias cardíacas. Sujetos con un asma no controlado (tres o más características del asma parcial controlada presentes en cualquier semana, con una exacerbaciones por semana, GINA,2008).
--	--

Criterios de Inclusión y Exclusión Grupo No Fumador:

Tabla N° 3: Criterios Inclusión y exclusión grupo no fumador

Criterios de Inclusión	Criterios de Exclusión
• Los sujetos deben ser hombres • Los sujetos deben estar en un rango de edad entre los 40 a 50 años • Los sujetos deben ser sedentarios (es decir que no realicen al menos 150 minutos de actividad física a la semana)	• Sujetos fumadores activos de cigarrillos en al menos 10 años. • Sujetos con diagnóstico médico de cáncer pulmonar. • Sujetos deportistas de alto rendimiento. • Sujetos con Infarto al miocardio menor a 1 mes. • Sujetos con diagnóstico médico de miocarditis o pericarditis. • Sujetos con diagnóstico médico de Angina inestable. • Sujetos con neumotórax reciente (2 semanas tras la resolución). • Sujetos con diagnóstico médico de inestabilidad hemodinámica. • Sujetos con aneurisma aórtico de gran tamaño o que ha crecido. • Sujetos con aneurisma cerebral complicado. • Sujetos con desprendimiento de retina reciente (1 mes). • Sujetos con diagnóstico médico de síndrome de hipertensión endocraneana. • Sujetos con crisis de hipertensión arterial/ Hipertensión arterial sistémica no controlada. • Sujetos con posoperatorio de biopsia pulmonar (una semana). • Sujetos con posoperatorio de cirugía abdominal o genitourinaria. • Sujetos con diagnóstico médico de incontinencia urinaria. • Sujetos con diagnóstico médico de insuficiencia cardíaca. • Sujetos con diagnóstico médico de Limitación crónica al flujo aéreo. • Sujetos con diagnóstico médico de cáncer pulmonar. • Sujetos con alguna discapacidad física que impida realizar la prueba.

	• Sujetos con diagnóstico médico de arritmias cardíacas. Sujetos con un asma no controlado (tres o más características del asma parcial controlada presentes en cualquier semana, con una exacerbaciones por semana, Guía Clínica 2008 “Asma Bronquial del Adulto”).)
--	--

Población:

1. Universo: Funcionarios de la Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso, ubicada en Angamos 655, Reñaca, Viña del Mar, de sexo masculino.
2. Población: Funcionarios de la Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso, ubicada en Angamos 655, Reñaca, Viña del Mar, de sexo masculino. Entre 35 y 55 años.

Muestra:

Previo a determinar la muestra definitiva, los sujetos contactados fueron invitados a participar del estudio mediante la firma de un consentimiento informado. Este documento (Anexo n°6) contiene información para el sujeto acerca de las características y el propósito de este estudio, además de explicar su participación dentro del desarrollo de la investigación. El consentimiento

informado utilizado en este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso. Cabe señalar que los sujetos que accedieron a participar firmaron voluntariamente el consentimiento informado, previa lectura completa de su contenido y tomando consciencia de las implicancias de su participación, tal y como se estipula en el mismo documento.

Finalmente, la muestra definitiva contó con 12 sujetos, los cuales se agruparon en grupo de fumadores de cigarrillos ($n=4$) y un grupo de no fumadores ($n=8$).

Al grupo de fumadores se les aplicó Test de Fagerström, encuesta de frecuencia alimentaria y encuesta de actividad física de la OMS, además de medición de parámetros REDOX, mientras que al grupo de sujetos no fumadores se les aplicó la encuesta de frecuencia alimentaria y encuesta de actividad física de la OMS, además de medición de parámetros REDOX.

Para la determinación de los parámetros REDOX se utilizaron los siguientes materiales, equipos y reactivos, los cuales son nombrados a continuación:

Materiales:

Extracción de muestra sanguínea

Jeringas hipodérmicas estéril de 10 mL

Tubos heparinizados. Marca Vacutainer ®

Algodón hidrófilo prensado

Alcohol 95%

Parche adhesivo

Determinación de parámetros REDOX

Instrumentos de medición

Espectrofotómetro UV visible. Marca Rayleigh. UV-2601

Software estadístico Graphpad Prisma 8.

Equipos

Balanza analítica. Marca RADWAG, modelo AS220-C/2

PHmetro. Marca JENCO, modelo 60

Centrífuga clínica. Marca HETTICH, modelo UNIVERSAL / K2S

Centrífuga de alta velocidad. Marca HERMLE, modelo Z 233 M –2

Spinner. Marca SCIOLOGEX, modelo D1008

Placa calefactora. Marca LabTech, modelo LMS - 1003

Vórtex, Marca, modelo 37600 Mixer

Sonicador. Marca Elma, modelo TRANSSONIC 310

Baño termoregulado. Marca K, modelo YCW – 04M (11 L)

Micropipeta. Marca GILSON (volúmenes 1-10 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L y 1-5 mL)

Macbook Air, 13-inch, 2017, N° Serie C02V1BLCJ1WK

Software Microsoft Office 365. Versión 16.15 (180709)

Reactivos

Tabla N°4. Reactivos para determinar parámetros REDOX

ABTS: 2,2'-azinobi(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)
ABAP: 2,2'-azobis(2-amidinopropano)
Acetato de etilo
Ácido clorhídrico (HCl)
Citocromo C
Cloruro de Sodio (NaCl)
Carbonato de Sodio (Na_2CO_3)
DNPH: 2,4 dinitrofenilhidracina
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
Etanol
Fosfato de disódio (Na_2HPO_4)
Fosfato sódico dihidrogenado (NaH_2PO_4)
Folin-Ciocalteu
Hidróxido de Sodio (NaOH)
Peroxido de Hidrogeno (H_2O_2)
Sulfato de cobre (CuSO_4)
Tartrato Sodio Potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$)
TBA: ácido tiobarbitúrico
TCA: ácido tricloroacético
Xantina
Xantina Oxidasa (XO)
Urea

Una vez firmado el consentimiento informado por parte de los sujetos para la participación en el estudio, se les citó el día lunes 2 de marzo del 2020 al grupo de no fumadores y el día viernes 6 de marzo del 2020 al grupo fumadores para una extracción de 10 mL de muestra sanguínea para ser utilizada en la medición de parámetros REDOX

Evaluación del Daño oxidativo:

Posterior a la extracción de la muestra sanguínea en cada grupo, se procedió a realizar el protocolo de lavado de sangre (Anexo n° 7), realización de la prueba para TBARS (Esterbauer et al. 1992) y a la preparación de las muestras para la posterior realización de los protocolos faltantes con relación a daño oxidativo y defensa antioxidante endógena y exógena.

TBARS (Esterbauer et al.,1992) (Anexo n°8)

La técnica TBARS tiene la finalidad, a través de un análisis bastante simple, de evaluar la reacción de TBA con el malondialdehído (MDA), presente en una muestra biológica. El MDA es un producto de término del proceso de lipoperoxidación, ampliamente utilizado en el área del estrés oxidativo. La concentración de MDA es, por lo tanto, evidencia de oxidación de membranas lipídicas y biomarcador de daño oxidativo.

Durante la semana del 9 de marzo al 13 de marzo del presente año se trabajaron en ambos grupos medidos (fumadores y no fumadores) a través de las siguientes pruebas, las cuales serán descritas según el orden de aplicación:

Carbonilos (Levine et al.,1990): (Anexo n°9)

Esta prueba fue aplicada durante el lunes 9 de marzo del 2020.

El estrés oxidativo genera productos de oxidación, en el caso de la oxidación de proteínas uno de estos productos son los grupos carbonilos. Este método se basa en la reacción de los grupos carbonilos con la 2-4-dinitrofenilhidrazina,

formando 2-4-dinitrofenilhidrazona de color amarillo el que es detectado a 370 nm.

Posterior a la aplicación de la prueba de carbonilos, el día martes 10 de marzo se aplicaron las siguientes pruebas:

Productos avanzados de oxidación de proteínas PAOP: (Anexo n°10)

Las proteínas son susceptibles al daño por radicales libres dando lugar, mediante reacciones de agregación, entrecruzamiento y fragmentación a los productos avanzados de oxidación de proteínas.

Evaluación de la Defensa Antioxidante

Proteínas totales (Anexo n°11)

La concentración total de proteínas será determinada por medio de la reacción entre los residuos de tirosina presentes en la muestra y el reactivo de Folin-Ciocalteu, usando albúmina como patrón. La reacción es medida espectrofotométricamente.

SOD (Fridovich, 1995): (Anexo n°12)

Esta técnica se aplicó durante el día miércoles 11 de marzo.

Técnica utilizada para la evaluación de la actividad de SOD, a través de una espectrofotometría en donde se ve la reducción de la formación del anión radical superóxido.

Durante el día jueves 12 de marzo se aplicaron las siguientes pruebas:

Catalasas (Aebi, 1984) (Anexo n°13)

La enzima catalasa forma parte de la primera línea de defensa contra las EROS a nivel celular. Esta enzima cataliza la dismutación del peróxido de hidrógeno y lo reduce a agua; la técnica consiste en hacer reaccionar la enzima presente y seguir su reducción a través de una cinética enzimática.

TRAP (Romay et al., 1996) (Anexo n°14)

Esta prueba mide las propiedades antioxidantes reactivas totales, para medir la capacidad antioxidante total se hace a través de esta técnica en donde se debe generar un radical coloreado.

Finalmente, el día viernes 13 de marzo del presente año, se aplicó la técnica descrita a continuación:

GSH/GSSG (Rahnam et al., 2006) (Anexo n° 15)

Este ensayo se basa en la reacción del glutatión reducido (GSH) con el reactivo de Ellman (DTNB) que forma un cromóforo TNB con una absorbancia máxima a 412 nm, además de formar un aducto con el glutatión oxidado (GS-TNB). El aducto de GS-TNB es reducido por glutatión reductasa (GR), en presencia de NADPH, reciclando GSH.

Debido a que a partir de una molécula de GSSG se forman 2 GSH, por acción de GR, la cantidad de glutatión medido representa la suma del glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) en una muestra problema ($[GSH]_{total}$

=[GSH] + 2 x [GSSG]). Así la concentración de una muestra desconocida se determinará usando curvas de GSH y GSSG estándar.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizará el *Graphpad Prisma*, programa con el cual se realizará las mediciones de Medias, pruebas de normalidad (*Shapiro-Wilk*), comparación de medias paramétricas con la prueba *T-student* con corrección de *Welch* y para la comparación de medianas no paramétricas se utilizará la prueba de Mann-Whitney test.

Resultados

Descripción de la muestra

Luego de aplicar los criterios de inclusión y exclusión, la muestra total corresponde a 12 adultos de sexo masculino, de los cuales 8 son no fumadores y 4 fumadores. La edad de las participantes fluctuó entre 37 y 54 años, presentando una edad promedio de 45 años. Ambos grupos fueron sometidos a la evaluación de parámetros antropométricos, parámetros REDOX, nivel de actividad física, mientras que al grupo fumador se le realizó además el test de Fagerström (nivel de dependencia física a la nicotina). Respecto a la presencia de comorbilidad solo 2 sujetos presentan hipertensión arterial controlada farmacológicamente, lo que podría en cierta forma alterar alguno de los parámetros redox.

Nivel de actividad física

La medición del nivel de actividad física se realizó a través del cuestionario global de actividad física (GPAQ) diseñado por la OMS, el cual mide la participación de los sujetos actividades de la vida diaria que sean de baja, moderada y alta intensidad, además del comportamiento sedentario de los sujetos evaluados. A continuación, en la tabla N°5 podemos visualizar la clasificación del nivel de actividad física de los sujetos evaluados.

Tabla N°5. Clasificación del nivel de actividad física en el grupo de fumadores y no fumadores

Grupo no fumadores	
Sujeto	Nivel de actividad física
1	Baja
2	Alta
3	Alta
4	Moderada
5	Alta
6	Moderada
7	Moderada
8	Baja

Grupo fumadores	
Sujeto	Nivel de actividad física
1	Moderada
2	Baja
3	Baja
4	Moderada

Perfil antropométrico

La antropometría evalúa la composición corporal, y permite estimar el riesgo cardiovascular. Al evaluar normalidad en las subvariables de antropometría: peso ($p = 0,53$), IMC ($p = 0,29$), e ICE ($p = 0,0011$), nos indica que las subvariables peso e IMC tienen una distribución normal, sin embargo, el índice C/E no presenta una distribución normal.

Comparando ambos grupos, las subvariables de antropometría: IMC ($p = 0,6085$), ICE ($p = 0,2038$) y peso ($p = 0,615$) indicando que no existen diferencias significativas entre grupo fumadores y no fumadores. (Tabla N°6).

Gráfico n°1. Comparación de medias de peso en grupo fumador y no fumador

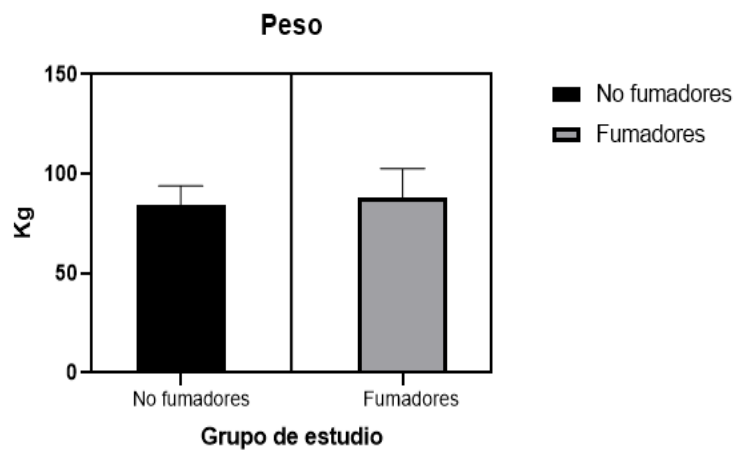


Gráfico n°2. Comparación de medias de IMC en grupo fumador y no fumador

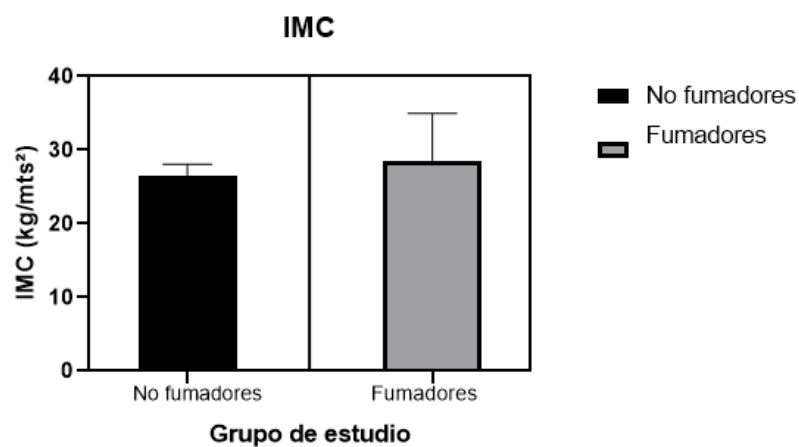


Gráfico n°3. Comparación de medias de ICE en grupo fumador y no fumador

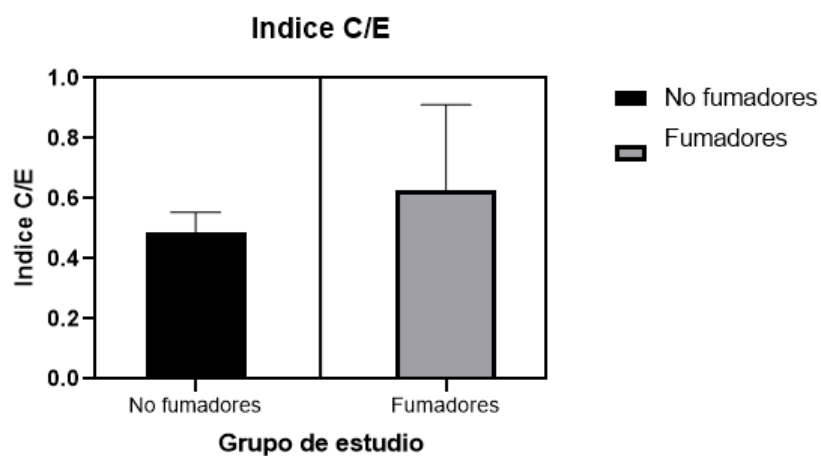


Tabla N°6. Valores de media, desviación estándar y normalidad (p-valor) y comparación de medias entre grupos para las subvariables de antropometría según todos los sujetos.

	Antropometría No Fumadores	Antropometría Fumadores	T-student/U mman
--	----------------------------	-------------------------	------------------

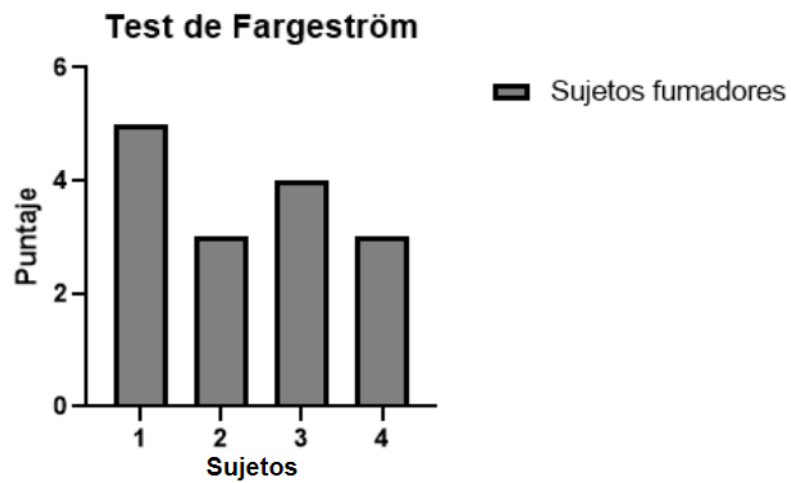
							Whitney
Variables	X	DS	P-valor	X	DS	P-valor	P-valor
Peso	84,23	27,25	0,4863	87,95	28,58	0,6250	0,6315
IMC	9,743	3,66	0,17	16,81	6,367	0,2864	0,6085
IC/E	0,9078	0,2918	0,0454	0,6206	0,9524	0,3814	0,2038

Media (X), Desviación estándar (DS) y Shapiro Wilk test (p-valor) = para valorar la normalidad

Dependencia a la nicotina

Para medir el nivel de dependencia a la nicotina en los sujetos fumadores, se aplicó el Test de Fagerström, en el siguiente gráfico (N°4) se pueden observar el puntaje obtenido, donde 10 es el puntaje máximo y 0 es el puntaje mínimo relacionado con la adicción a la nicotina. Uno de los sujetos con puntaje 5 posee un nivel de dependencia media al igual que el sujeto con puntaje 4. Los siguientes dos, poseen un nivel de dependencia 3, lo cual se traduce en una dependencia a la nicotina baja.

Gráfico n°4. Comparación de puntajes en el Test de Fagerström en sujetos fumadores



Perfil Oxido reductivo:

A continuación, en la tabla n°7 podemos observar los resultados en el perfil oxido reductivo de ambos grupos medidos.

Tabla. N°7. Valores de media, desviación estándar y normalidad (p-valor) y comparación de medias entre grupos para las técnicas de medición de parámetros REDOX según todos los sujetos.

	Grupo de estudio: Fumadores			Grupo de estudio: No Fumadores			T-Student (P-valor)	Correlaciones Grupo fumadores			Correlaciones Grupo fumadores	
	Media	DS	Shapiro wilk test (P-valor)	Media	DS	Shapiro wilk test (P-valor)		REDOX-AF (Pearson:R)	REDOX-ICE (Pearson:R)	REDOX-Fagerström (Pearson:R)	REDOX-AF (Pearson:R)	REDOX-ICE (Pearson:R)
TRAP (nM)	2,251	0,09903	0,9448	1,898	0,04985	0,9892	<0,0001	-0,193	0,0863	-0,1479	-0,1668	0,2352
Catalasas (U Enzima/mg proteínas)	8,272	0,1318	0,8869	7,926	0,2635	0,3845	0,0001	-0,193	0,129	-0,0341	0,3002	-0,0713
SOD (U Enzima/mg proteínas)	11,19	0,1509	0,9999	10,99	0,2143	0,5021	0,0072	0,000	-0,107	-0,4096	0,0333	0,3039
MDA (nM)	3,388	0,03375	0,3543	2,105	0,01709	0,5353	<0,0001	0,0482	0,0863	0,33001	-0,1209	0,0211
Carbonilos (mol carbonilos/mg proteínas)	0,3893	0,0107	0,2482	0,2292	0,003184	0,2879	<0,0001	0,000	-0,129	-0,375	-0,1612	0,2537
PAOP (nM)	1,1	0,1464	0,5107	0,5029	0,04088	0,0074	<0,0001	0,434	-0,259	0,3755	-0,5101	0,44002
GSH/GSSG	130,3	3,964	0,191	129	4,71	0,5623	0,4145	0,386	-0,237	0,18207	-0,1112	0,14006

Daño oxidativo

Para medir el nivel de daño oxidativo en esta población, se realizaron técnicas de laboratorio de TBARS, carbonilos, PAOP las cuales arrojaron resultados con diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (P-valor<0.0001).

Defensas antioxidantes no enzimáticas

Para objetivar la capacidad antioxidante no enzimática de los individuos en este estudio se realizó TBARS, la cual nos indica la capacidad antioxidante total del organismo. Este ensayo arrojó resultados con diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (P-valor<0.0001).

Defensa antioxidante enzimática

Para medir la capacidad antioxidante enzimática de los individuos de este estudio se realizaron técnicas de laboratorio para medir la capacidad de las siguientes enzimas: SOD, Catalasas y el complejo glutatión. Todas las pruebas mencionadas anteriormente dieron resultados con diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de estudio, excepto en el ensayo de GSH/GSSG donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Análisis Correlacional

Se realizó un análisis correlacional para evidenciar si existía correlación entre las variables de actividad física, índice cintura/estatura y puntaje en el Test de Fagerström con los parámetros REDOX medidos. Según la tabla N°6 en el grupo de no fumadores existe una correlación negativa moderada entre niveles de actividad física y parámetros de PAOP, con valores entre 0.5 y 0.7 según los valores entregados por Mukaka,2012.

Discusión

El estudio en seres humanos si bien tiene una mayor cercanía con la realidad, presenta un mayor número de variables intervinientes como lo son la dieta, la polifarmacia, estilo de vida y comorbilidad. Con el objetivo de disminuir la presencia de variables intervinientes se busca homogeneizar la muestra otorgando mayor validez a los resultados

A través de este estudio se pudo evidenciar el efecto del consumo de tabaco, el nivel de actividad física y el perfil antropométrico sobre el perfil REDOX en la población seleccionada.

Respecto al nivel de actividad física de los sujetos, podemos evidenciar que la tendencia es un nivel bajo-moderado de actividad física lo cual se traduce en que los sujetos realizan 3 o más días de actividad física vigorosa por lo menos 20 minutos por día o 5 o más días de actividad física moderada y/o caminata al menos 30 minutos por día o por último 5 o más días de cualquiera de las combinaciones de caminata, actividad física moderada o vigorosa logrando como mínimo un total de 600 MET (Cuestionario internacional de actividad física, 2007). A nivel nacional, según la Encuesta de actividad física y deporte el 18,7% de la población encuestada realiza actividad física según las recomendaciones de la OMS, esto se traduce en que solo 2 de cada 10 chilenos realiza ejercicio de 150 minutos de forma moderada o 75 minutos intensos a la semana, sin embargo, durante el transcurso de los años la tasa de inactividad ha ido disminuyendo. (Encuesta de actividad física y deporte, 2018).

Por lo tanto, los resultados encontrados pueden ser relacionados con las variables del perfil antropométrico.

En relación al perfil antropométrico no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, lo que indica que basalmente estos sujetos son comparables para efectos de las variables consumo de tabaco y nivel de actividad física, además dentro de esta evaluación indica que los participantes se encontraban en sobrepeso con un IMC entre 25 y 30, lo cual eran resultados esperados según el nivel de actividad física en los sujetos. Según lo que indica la OMS acerca de la realidad chilena más del 60% de la población tiene algún grado de exceso de peso, ya sea sobrepeso u obesidad, sin embargo esta clasificación de sobrepeso en base al IMC de los sujetos es amplia e imprecisa ya que no distingue entre masa magra y la masa grasa (Del campo, 2015) es por eso que se evalúa el índice de cintura/estatura, entregando un valor superior a 0.5 lo cual indica un alto riesgo de padecer síndrome metabólico (Huamán, 2017) y por tanto un elevado riesgo cardiovascular.

Los niveles de actividad física, IMC e índice cintura estatura estarían indicando sobrepeso en la población de estudio, lo cual se traduce en que existiría un estado inflamatorio crónico debido al crecimiento del tejido adiposo inducido por agrupaciones de adipocitos modificados que se convertirían en una fuente inagotable de citoquinas inflamatorias con efectos sobre el balance REDOX, es

por eso que lo esperable a encontrar es que en aquellos sujetos donde se tienen niveles de actividad física bajos, IMC sobre 25 e índice cintura estatura sobre 0.5 un mayor desbalance REDOX, con un mayores niveles de marcadores de daño oxidativo (lipoperoxidación, alteración de proteínas) y mayor actividad de defensas antioxidantes endógenas (Tursi, 2013). Además, a esto debemos agregar el hecho de que la muestra presenta sujetos fumadores, considerando que el consumo de cigarrillo incorpora especies reactivas de oxígeno y nitrógeno al organismo ya sea directamente por la inhalación del humo o secundario a la reacción inflamatoria subsecuente a la exposición del humo de cigarro, era esperable encontrar en los sujetos fumadores un aumento mayor del daño oxidativo y de la actividad de las defensas antioxidantes. Respecto a esto y según los resultados de la aplicación del test de Fagerström podemos encontrar una dependencia media a la nicotina, el cual es uno de los componentes del cigarrillo más estudiados, jugando un rol fundamental mediante una producción alta de especies reactivas de oxígeno (Yarahmadi, 2017).

En relación a la evaluación del perfil REDOX, se destaca que ambos grupos se distribuyen de forma normal para todos los parámetros medidos exceptuando los resultados de PAOP en el grupo no fumadores. Como se especificó anteriormente, los grupos al no tener diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las variables antropométricas, podemos decir que los resultados de la evaluación del perfil REDOX de ambos grupos son comparables.

Para los parámetros obtenidos en cuanto a las defensas antioxidantes vistas en TRAP, actividad enzimática de catalasas y SOD se observaron diferencias significativas entre los grupos, en donde encontramos una media de mayor valor en el grupo fumador en comparación a la media del grupo no fumador, dando a entender que existe una mayor capacidad antioxidante total y mayor actividad de enzimas antioxidantes para el grupo de fumadores. Lo cual se puede explicar por la constante exposición a humo de tabaco y por ende mayor expresión de especies reactivas de oxígeno, lo que llevaría al organismo a generar las defensas antioxidantes necesarias para combatir el desbalance oxidoreductor provocado por dicha exposición.

Para el ensayo de TBARS se encuentran diferencias significativas entre ambos grupos, donde la media es superior en el grupo fumador, lo que nos indica que este grupo presenta mayor cantidad de MDA el cual es un marcador de lipoperoxidación de la membrana, dando cuenta que a pesar de tener una defensa antioxidante mayor que el grupo no fumador, no es suficiente para evitar los daños producidos por la mayor expresión de radicales libres promoviendo así un estado de estrés oxidativo.

En cuanto al ensayo de PAOP y carbonilos, se pueden observar diferencias significativas entre ambos grupos, donde el grupo fumador posee una media por sobre la del grupo no fumador, lo que indica que el grupo fumador presenta mayores indicadores de daño oxidativo a proteínas, relacionándose con lo

descrito anteriormente sobre la exposición al humo de tabaco sumado a las altas concentraciones de MDA que además de ser un indicador de lipoperoxidación de membrana, es un producto final tóxico que causa daño tanto a ADN, como a proteínas.

Para el índice GSH/GSSG no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, lo que nos indica que tanto para fumadores como no fumadores las concentraciones de glutatión reducido y oxidado son similares dando cuenta que ambos grupos presentan la misma capacidad antioxidante por parte del complejo glutatión. Sin embargo, al no existir en la literatura un acuerdo para establecer parámetros de normalidad en esta población no se puede establecer si el índice se encuentra dentro de los rangos de normalidad o fuera de estos, dificultando así la interpretación de este resultado.

Finalmente en cuanto a las correlaciones entre las variables de nivel de actividad física y parámetros REDOX solo se encontró una correlación negativa moderada entre el nivel de actividad física y PAOP en el grupo fumador lo que nos indica que a mayor actividad física hay menor cantidad de productos avanzados de oxidación de proteínas, lo cual se explica que el organismo al verse enfrentado al estrés oxidativo producido por el ejercicio físico aumenta la expresión de defensas antioxidantes siendo así un factor protector para el daño oxidativo de proteínas.

Esta investigación presenta ciertas limitaciones, dentro de las más relevantes destaca el bajo n muestral, además del inicio de la pandemia el cual afectó el reclutamiento de sujetos fumadores.

Una debilidad importante en cualquier investigación en balance REDOX es que no hay un rango de normalidad para la población en estudio, en cualquier rango etario, lo que dificulta entender cuál es la basal normal de la población, por lo tanto, solo se cuenta con el estado de los grupos como referencia.

Conclusión

El consumo de tabaco generó diferencias significativas en los parámetros REDOX de daño oxidativo y defensas antioxidante entre ambos grupos, existiendo mayor daño oxidativo y actividad enzimática en el grupo de fumadores. Respecto a la mayor capacidad antioxidante encontrada en el grupo fumador, esta no es suficiente para contrarrestar el daño oxidativo producido por el consumo de tabaco.

En relación a la actividad física esta podría considerarse un factor protector frente al daño oxidativo en proteínas. Por lo tanto, se acepta la Hipótesis 1 ya que se observa que el consumo de tabaco aumenta el daño oxidativo, sin embargo, no es posible aceptar o rechazar la Hipótesis 2 y 3 ya que los sujetos presentaban niveles de actividad física y perfil antropométrico similares.

Consideramos que es importante para futuros estudios es importante considerar la dieta y consumo de fármacos de los sujetos para poder homogeneizar aún

más la población de estudio al igual que considerar un nivel mayor de adicción a la nicotina física para que sea más evidente la comparación entre el grupo fumador y no fumador.

En conclusión, el consumo crónico de tabaco va a generar un desbalance REDOX hacia un estado oxidativo el cual promueve un aumento de las defensas antioxidantes que no son suficientes para evitar el daño oxidativo a membranas y proteínas en la población estudiada la variable de consumo de tabaco va a repercutir en el perfil REDOX del consumidor.

Bibliografía:

1. Organización Panamericana de la Salud. Informe sobre Control del Tabaco [Internet]. Washington, DC. Estados Unidos; 2013. 1-66 p. Available

from:

http://www.paho.org/chi/index.php?option=com_content&view=article&id=551:informe-sobre-control-de-tabaco-para-la-region-de-las-americas-2013&Itemid=300.

2. Plá García, A., Elizalde Gálvez, M. G., Cárdenas Frier, E., Solares Carreño, J. C., & Nieves Sardiñas, B. N. (2016). Tabaquismo: valores e integralidad. *Revista Médica Electrónica*, 38(3), 460-469.
3. Karademirci, M., Kutlu, R. y Kilinc, I. (2018). Relación entre el tabaquismo y el estado antioxidante total, estado oxidante total, índice de estrés oxidativo, vit C, vit E. *The Clinical Respiration Journal*, 12 (6), 2006-2012.
4. Barrera, R. (2017). Cuestionario Internacional de actividad física (IPAQ). *Revista Enfermería del trabajo*, 7(2), 49-54.
5. Cuadri Fernández, J., Tornero Quiñones, I., Sierra Robles, Á., & Sáez Padilla, J. (2018). Revisión sistemática sobre los estudios de intervención de actividad física para el tratamiento de la obesidad.
6. Liberman, K., Van Schuerbeek, P., Herremans, S., Meysman, M., De Mey, J., & Buls, N. (2018). The effect of nicotine patches on craving in the brain: A functional MRI study on heavy smokers. *Medicine*, 97(39).
7. García, B. J. (2017). La suplementación con ácidos grasos insaturados revierte en aumento del estrés oxidativo en órganos de ratones obesos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 11(Especial), 46.
8. Salazar-Lugo, R., Segura, A., Velásquez, P., & Vilachá, D. (2019). Marcadores de estrés oxidativo en adultos con sobrepeso y obesidad, Venezuela. *Observador del Conocimiento*, 4(1), 111-121.
9. Arquer, A., Elosua, R., & Marrugat, J. (2010). Actividad física y estrés oxidativo. *Apunts. Medicina de l'Esport*, 45(165), 31-40.
10. Thun, M. J., Carter, B. D., Feskanich, D., Freedman, N. D., Prentice, R., Lopez, A. D., ... & Gapstur, S. M. (2013). 50-year trends in smoking-related mortality in the United States. *N engl J med*, 368, 351-364.
11. Amigo, H., & Erazo, M. (2005). Problemas asociados al tabaquismo en Chile. *Revista Chilena de Salud Pública*, 9(1), 46-50.
12. Salvi, S. S., & Barnes, P. J. (2009). Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *The lancet*, 374(9691), 733-743.
13. Eisner, M. D., Anthonisen, N., Coultas, D., Kuenzli, N., Perez-Padilla, R., Postma, D., ... & Balmes, J. R. (2010). An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 182(5), 693-718.
14. Valavanidis, A., Vlachogianni, T., & Fiotakis, K. (2009). Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles. *International journal of environmental research and public health*, 6(2), 445-462.

15. Zhao, J., & Hopke, P. K. (2012). Concentration of reactive oxygen species (ROS) in mainstream and sidestream cigarette smoke. *Aerosol Science and Technology*, 46(2), 191-197.
16. Barral, N. C., Cascudo, C. B., Aparicio, V. R., & Pérez, E. Á. (2018). Causas, consecuencias y prevención del tabaquismo. *Geroinfo*, 13(1), 1-27.
17. Colombo, G., Clerici, M., Giustarini, D., Portinaro, NM, Aldini, G., Rossi, R., & Dalle - Donne, I. (2014). Fisiopatología de la exposición al humo del tabaco: percepciones recientes de la proteómica comparada y redox. *Revisiones de espectrometría de masas*, 33 (3), 183-218.
18. Paredes, C. S., & Bello, L. M. (2017). Factor de necrosis tumoral como marcador inflamatorio en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 36(1), 22-25.
19. Goldenberg, M., Danovitch, I., & IsHak, W. W. (2014). Quality of life and smoking. *The American journal on addictions*, 23(6), 540-562.
20. Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91-100.
21. Salas-Silva, E. S., Simoni-Nieves, A., Miranda-Labra, R. U., & Gómez-Quiroz, L. E. (2017). Fundamentos de la señalización redox: Lecciones de los sistemas generadores de especies reactivas de oxígeno.
22. Scherz-Shouval, R., & Elazar, Z. (2011). Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends in biochemical sciences*, 36(1), 30-38.
23. Franks, T. J., & Galvin, J. R. (2015). Smoking-related "interstitial" lung disease. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 139(8), 974-977.
24. Martínez Sánchez, G. (2005). Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Revista Cubana de Farmacia*, 39(3), 0-0.
25. Maciejczyk, M., Żebrowska, E., Zalewska, A., & Chabowski, A. (2018). Redox balance, antioxidant defense, and oxidative damage in the hypothalamus and cerebral cortex of rats with high fat diet-induced insulin resistance. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018.
26. Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry*, 30(1), 11-26.
27. Zuo, L., Zhou, T., Pannell, BK, Ziegler, AC y Best, TM (2015). Papel biológico y fisiológico de las especies reactivas de oxígeno: lo bueno, lo malo y lo feo. *Acta fisiológica*, 214 (3), 329-348.
28. Grossi, M. (2018). Dependencia física de la nicotina en estudiantes que fumen cigarrillos mentolados y no mentolados de tres carreras de kinesiología de la V región
29. Nagamma, T., Anjaneyulu, K., Baxi, J., Dayaram, P., & Singh, P. P. (2011). Effects of cigarette smoking on lipid peroxidation and antioxidant status in cancer patients from Western Nepal. *Asian Pac. J. Cancer Prev*, 12(1), 313-316.

30. Filaire, E., Dupuis, C., Galvaing, G., Aubreton, S., Laurent, H., Richard, R., & Filaire, M. (2013). Lung cancer: what are the links with oxidative stress, physical activity and nutrition. *Lung cancer*, 82(3), 383-389.
31. Manna, P., & Jain, S. K. (2015). Obesity, oxidative stress, adipose tissue dysfunction, and the associated health risks: causes and therapeutic strategies. *Metabolic syndrome and related disorders*, 13(10), 423-444.
32. Petermann, F., Durán, E., Labraña, A. M., Martínez, M. A., Leiva, A. M., Garrido-Méndez, A., ... & Celis-Morales, C. (2017). Factores asociados al desarrollo de obesidad en Chile: resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2009-2010. *Revista médica de Chile*, 145(6), 716-722.
33. Suárez-Carmona, W., Sánchez-Oliver, A. J., & González-Jurado, J. A. (2017). Fisiopatología de la obesidad: Perspectiva actual. *Revista chilena de nutrición*, 44(3), 226-233.
34. Ricote, A. I. R. (2016). *Fisiopatología de la Obesidad* (Doctoral dissertation, Tesis pregrado]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
35. Liñán, Á. C., Sánchez-Oliver, A. J., Reina, I. G., Carmona, W. S., & González-Jurado, J. A. (2016). Ejercicio físico, obesidad e inflamación. *EmásF: revista digital de educación física*, (41), 65-82.
36. Savini, I., Gasperi, V., & Catani, M. V. (2016). Oxidative stress and obesity. In *Obesity* (pp. 65-86). Springer, Cham.
37. Piva, S. J., Duarte, M. M., Da Cruz, I. B., Coelho, A. C., Moreira, A. P. L., Tonello, R., ... & Moresco, R. N. (2011). Ischemia-modified albumin as an oxidative stress biomarker in obesity. *Clinical biochemistry*, 44(4), 345-347.
38. Del Campo Cervantes, J. M., González, L. G., & Rosales, A. G. (2015). Relación entre el índice de masa corporal, el porcentaje de grasa y la circunferencia de cintura en universitarios. *Investigación y Ciencia*, 23(65), 26-32.
39. Tursi Ríspoli, L. D., Vázquez Tarragón, A., Vázquez Prado, A., Sáez Tormo, G., Ismail, A. M., & Gumbau Puchol, V. (2013). Estrés oxidativo: estudio comparativo entre un grupo de población normal y un grupo de población obesa mórbida. *Nutrición Hospitalaria*, 28(3), 671-675.
40. Yarahmadi, A., Zal, F. y Bolouki, A. (2017). Efectos protectores de la quercetina sobre el estrés oxidativo inducido por la nicotina en 'células HepG2'. *Mecanismos y métodos de toxicología*, 27 (8), 609-614.
41. Mukaka, M. M. (2012). A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi medical journal*, 24(3), 69-71.

Anexos

Anexo nº1: Test de Fargeström

TEST DE FAGERSTRÖM

Pregunta	Respuesta	Puntuación
¿Cuánto tiempo tarda en fumar su primer cigarrillo después de despertarse?	< 5 minutos	3
	6-30 minutos	2
	31-60 min.	1
	> 60 minutos	0
¿Encuentra dificultad para no fumar en los sitios en que está prohibido (cine...)?	Sí	1
	No	0
¿A que cigarrillo le costaría más renunciar?	El primero	1
	Otros	0
¿Cuántos cigarrillos fuma cada día?	Más de 30	3
	21-30	2
	11-20	1
	Menos de 11	0
¿Fuma más durante las primeras horas tras levantarse que durante el resto del día?	Sí	1
	No	0
¿Fuma si está tan enfermo que ha estado tan enfermo que ha estado en la cama la mayor parte del día?	Sí	1
	No	0
Puntuación		
Menor de 4 dependencia baja		
Entre 4 y 6, dependencia media		
Igual o mayor de 7 dependencia alta		

Anexo nº2: Acta de aprobación del comité de bioética

ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA No. 19/2019

I. El Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso, constituido por Jimena Le Roy, tecnólogo médico, Presidenta; Eva Sotelo, profesora de Castellano, Vice-presidenta; Ivanny Marchant, médico cirujano; Angelo Bartsch, kinesiólogo; Patricia Herrera, educadora de párvulos; Paulina Hurtado, enfermera – matrona; Paula Eherenfeld, matrona; y Lourdes Andrade, representante de la comunidad, en su sesión del día 20 de junio de 2019, declara haber evaluado el protocolo experimental del proyecto “Efecto del tabaquismo crónico sobre la función cardiorrespiratoria y producción de Especies Reactivas de Oxígeno en Funcionarios de la Universidad de Valparaíso, Facultad de Medicina”, presentado por la investigadora responsable María Ignacia Grossi Bagnara, adscrita a esta Facultad.

II. Para su evaluación el Comité de Bioética revisó los siguientes antecedentes:

1. Protocolo n° 78/2018, versión en español.
2. Hoja Informativa y Acta de Consentimiento Informado, versión en español, cuyos destinatarios son participantes de investigación.
3. *Currículum Vitae* del investigador responsable.
4. Instrumentos: Encuesta para determinar criterios de inclusión y exclusión y Test Fagetröm.

III. En la valoración bioética del proyecto, el Comité consideró que dicha propuesta cumple con los principios éticos necesarios para su realización, entre otros, los de beneficencia y atención a potenciales riesgos; se concluyó que su pertinencia fundamental radica en:

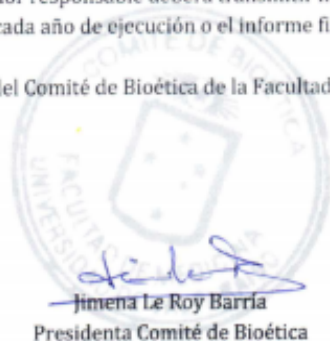
1. El diseño se ajusta a las Normas de Investigación en Seres Humanos.
2. El estudio propuesto podrá aportar al conocimiento acerca de la capacidad inspiratoria máxima pulmonar y su relación con el tabaquismo y contribuir así a la prevención de manera temprana a sus complicaciones. El potencial beneficio de esta investigación supera a los riesgos, estimados en una cuantía no mayor a la habitual exposición de los sujetos de investigación.
3. El Consentimiento Informado da cuenta de la finalidad de la investigación en forma clara; explícita y respeta la voluntariedad del posible participante, además de ofrecerle la oportunidad de retirarse en cualquier momento sin que ello le revista algún perjuicio; asegura la confidencialidad de los datos y de la identidad del sujeto; se precisa que no existen riesgos, ni costos involucrados como tampoco

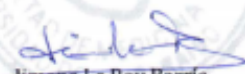
remuneración por participar; especifica en qué consistirá la colaboración del sujeto, señalando tiempo que involucrará su participación. Así también, el investigador da a conocer su teléfono e E-mail de contacto para ubicarlo en caso de cualquier consulta o duda.

4. Los antecedentes curriculares del Investigador Principal garantizan la ejecución del estudio dentro de los marcos éticos y técnicos aceptables.
5. Los miembros del Comité declararon no tener conflicto de interés.

IV. Por lo anterior, el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina aprueba el presente protocolo de investigación, que se llevará a cabo en la Universidad de Valparaíso durante el año 2019 bajo la supervisión del investigador responsable, María Ignacia Grossi Bagnara. Las eventuales modificaciones que pudiera sufrir el protocolo al que serán sometidos los participantes deberán ser evaluadas por este Comité y aprobadas previo a su aplicación. El investigador responsable deberá transmitir informe de estado de avance del estudio al término de cada año de ejecución o el informe final, según proceda.

Firma en representación del Comité de Bioética de la Facultad de Medicina,




Jimena Le Roy Barria
Presidenta Comité de Bioética

Viña del Mar, 20 de junio de 2019



C/C

- Secretaría CBI-FAMED
- Comisión de Investigación Facultad de Medicina

Anexo 3: Constancia Decano Dr. Andrés Orellana Tobar



**Universidad
de Valparaíso**
CHILE
Facultad de Medicina



CONSTANCIA

Yo, ~~Antonio Orellana Tobar~~, Decano de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso, tomo conocimiento de que la Prof. María Ignacia Grossi Bagnara, académico de la Escuela de Kinesiología, presentará ante el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina, para la evaluación de los requisitos éticos y metodológicos, su proyecto de investigación, titulado "Efecto del tabaquismo crónico sobre la función cardiorrespiratoria y producción de Especies Reactivas de Oxígeno en Funcionarios de la Universidad de Valparaíso, Facultad de Medicina". Este estudio sólo podrá ser ejecutado en esta Facultad una vez que sea aprobado por dicho Comité de Bioética. Posteriormente, el investigador deberá solicitar a funcionarios de la Facultad de Medicina su participación voluntaria mediante firma de su consentimiento informado.

Se extiende la presente constancia para efectos de la evaluación bioética de la investigación antes señalada.

Viña del Mar, marzo 2019

FACULTAD DE MEDICINA
Angamos #655, Refaca, Viña del Mar | Teléfono: 32 260 30 01 | E-mail: decano.medicina@uv.cl

Anexo nº4: Encuesta para determinar criterios de Inclusión y Exclusión



*"Efecto del tabaquismo crónico sobre la función
cardiorrespiratoria y producción de Especies Reactivas de
Oxígeno en Funcionarios de la Universidad de Valparaíso, Facultad de
Medicina".*

ENCUESTA PARA DETERMINAR CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Nombres: _____

Apellidos: _____

Sexo: _____ Edad: _____

Marque con una "X" según corresponda.

¿Usted fuma? (Ha consumido al menos un cigarrillo en el último mes)

SI _____ NO _____

Solo si la respuesta es **SI**, ¿Hace cuánto fuma?

Menos de 30 Días _____ Meses _____ Años _____

(especifique cantidad de años) _____

Solo si en la pregunta "¿usted fuma?" marcó **NO**, ¿Usted alguna vez fumó? (consumió al menos un cigarrillo todos los días por 30 días)

SI _____ NO _____

Solo si la respuesta es **SI**, ¿Cuántos años fumó?

1 año _____ 5 años _____ 10 años _____ >10 años _____

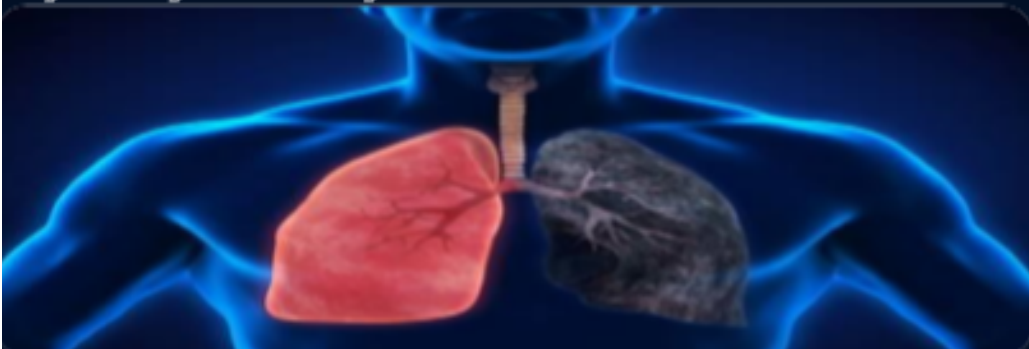
Anexo n°5: Afiche publicitario



¡VEN A PARTICIPAR DE NUESTRA TESIS!

"EFECTO DEL TABAQUISMO CRÓNICO SOBRE LA FUNCIÓN CARDIORRESPIRATORIA Y PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN FUNCIONARIOS DE LA UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO, FACULTAD DE MEDICINA"

Kiga. María Ignacia Grossi Sagnara



Lugar: Laboratorio 7.15

¿QUIÉNES PUEDEN PARTICIPAR?

- FUNCIONARIOS FACULTAD MEDICINA, UV**
- HOMBRES ENTRE 35-55 AÑOS**
- FUMADORES Y NO FUMADORES**

Escuela de Kinesiología   Laboratorio de Respiración

Contáctanos via mail: mariaignacia.grossi@uv.cl, alondra.montero@alumnos.uv.cl, gonzalo.carrasco@alumnos.uv.cl, camila.cabrera@alumnos.uv.cl, sebastian.ormeno@alumnos.uv.cl

O WhatsApp: +56978396863 o +56995838439

Anexo n° 6: Consentimiento informado



Consentimiento Informado Información para funcionarios de la Facultad de Medicina Casa Central

El propósito del presente documento es invitarlo a participar en el estudio "Efecto del tabaquismo crónico sobre la función cardiorrespiratoria y producción de Especies Reactivas de Oxígeno en Funcionarios de la Universidad de Valparaíso, Facultad de Medicina". Usted ha sido elegido por ser hombre entre los 40 a 50 años de edad y por cumplir todos los criterios de inclusión. La investigadora principal es María Ignacia Grossi Bagnara, Kinesióloga, el Coinvestigador es Daniel Ponce Curva, Kinesiólogo, ambos docentes de la Universidad de Valparaíso y los alumnos testistas son Sr. Sebastián Demeño Ortiz, Srta. Camila Cabrera Cerda, Sr. Gonzalo Carrasco Neira y Srta. Alondra Montero Machuca. Para que usted pueda tomar una decisión informada, le explicaremos a continuación cuáles serán los procedimientos involucrados en la ejecución de la investigación, así como en qué consistiría su participación:

1. Dónde y cuándo se llevará a cabo la investigación

La investigación mencionada se realizará en la Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso, ubicada en Angamos 655, Refaca durante los meses de junio a diciembre del año 2019.

2. Motivación y propósito del estudio

El tabaquismo es la principal causa de problemas cardiorrespiratorios, dentro de las principales complicaciones asociadas al consumo de tabaco destaca la generación de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica sin cura conocida, que altera a todos los sistemas, disminuyendo la calidad de vida de las personas.

Actualmente más de 7 millones de personas mueren anualmente producto del consumo de tabaco.

Las alteraciones de la función cardiorrespiratoria como la producción de Especies Radicales de Oxígeno nos orientan a la posible generación de enfermedades, como lo es la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, lamentablemente el diagnóstico de esta enfermedad es tardío en relación a la cantidad de años que se consume cigarrillos de tabaco, por lo tanto, al momento del diagnóstico, el daño a nivel cardiopulmonar ya es irreversible.

Ante esta situación, el propósito de los investigadores es determinar si existe una alteración en la función cardiorrespiratoria como en la producción de Especies Radicales de Oxígeno en los sujetos fumadores crónicos de cigarrillos de tabaco, de este modo determinar posibles daños a nivel pulmonar que promuevan a la aparición de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, con el fin de buscar una variable que detecte daños a nivel pulmonar más temprano que nos orienten a una posible enfermedad a futuro, con el fin de orientar a la persona sobre su condición de salud, sobre las posibles enfermedades que puede desarrollar si no hay cese del hábito tabáquico, y producto de esto progresar el daño a nivel cardiorrespiratorio, llevándolo a disminuir su calidad de vida.

3. En qué consiste su participación

Su participación es completamente voluntaria, y consta de asistir a la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso, al inicio de la investigación se le aplicará un test para medir su dependencia al tabaco denominado "test de Fagerström" (si usted no es fumador, no responderá dicho test), además se realizarán 5 mediciones que buscan evaluar su composición corporal, su función pulmonar, el daño oxidativo presente en su organismo y su capacidad para realizar un ejercicio de intensidad moderada. A continuación, se le detallará cada procedimiento para que quede todo muy claro.

a) Medición de la composición corporal:

La evaluación consiste en una medición antropométrica se le tomará peso, talla y la medición de su circunferencia de cintura y tiene una duración no mayor a 10 minutos.

b) Función Respiratoria: para poder evaluar su función respiratoria, se realizarán 3 evaluaciones:

Espirometría: Para evaluar la capacidad inspiratoria máxima, se utilizará un instrumento llamado espirometro, lo que permitirá conocer sus volúmenes y capacidades pulmonares. Esta prueba requiere de su participación de manera activa, consta de tomar aire llenándose al máximo los pulmones para luego votar todo el aire que pueda de manera lenta, el investigador le dará las indicaciones e incentivará para poder lograr tener las mediciones necesarias, cuenta con un máximo de 8 intentos. La prueba en general no tomará más de 1 hora. En el caso de no poder realizar la medición se agendará otra cita.

Días previos a la prueba, se le enviará vía mail las instrucciones para realizar la prueba, ya sea de presentación (vestimenta) como consideraciones previas, ya sea no fumar la hora previa, el tiempo de suspensión del broncodilatador según el medicamento usado (solo si usa broncodilatadores), a menos que en su orden médica diga que no se puede suspender, entre otras consideraciones.



Pimometría y Penometría: mediante un instrumento llamado pinómetro se medirán las presiones respiratorias máximas, la cual consiste en meter y sacar el aire con toda la fuerza posible, así se podrá conocer la fuerza de los músculos que utiliza para respirar. Se realizarán varias mediciones y cuando se obtengan tres mediciones casi iguales habremos terminado. En el laboratorio se le mostrará la maniobra, explicará y deberá realizarla, las indicaciones serán por parte de los investigadores. El tiempo del procedimiento puede variar, pero no tomará más de 1 hora.

En el caso de no poder realizar la medición se agendará otra cita.

Tolerancia al esfuerzo: Para evaluar su capacidad de tolerancia al esfuerzo de intensidad moderada, se realizará la prueba *Shuttle Walking Test* o *test de lanzadera* el cual permite evaluar en forma global la respuesta de su cuerpo ante un ejercicio de intensidad conocida, progresiva y segura. Consiste de caminar de manera rápida de un extremo a otro señalado por un cono, donde la partida lo dará una señal acústica, la velocidad irá incrementando a medida que pasan los minutos. Al inicio y al término se le tomarán signos vitales como PA y saturación de oxígeno, con la finalidad de confirmar los criterios de exclusión del paciente y además completar el procedimiento completo de esta prueba. En el laboratorio recibirá instrucciones claras del procedimiento. No demora más de media hora.

Días antes de estas pruebas se le enviará vía mail las instrucciones para realizar la prueba, ya sea de presentación (vestimenta) como consideraciones previas para llevar a cabo la prueba.

c) **Medición producción de Especies Radicales de Oxígeno (EROS)**

Toma de sangre: Se le extraerán 10 ml de sangre venosa para hacer estudios sobre estrés oxidativo, todos los datos serán tratados con la debida confidencialidad, para ello se le asignará un código numérico que lo representará durante toda la investigación. Las muestras sanguíneas que se obtendrán serán ocupadas y manejadas según protocolos metodológicos del laboratorio. La parte de las muestras que no será requerida para el estudio se eliminará según protocolos del laboratorio, sin la posibilidad de reservirlas para otros usos.

Todas estas pruebas serán tomadas en diferentes fechas, para poder realizarlas se le será citado vía mail, siempre buscando su disponibilidad.

4. **Riesgos**

Durante la aplicación del Shuttle Walking Test, podría existir la posibilidad que presente calambres en las piernas o una falta de aliento si usted no realiza actividad física de manera constante. En relación a la extracción de sangre, posterior a esto, puede sentir mareos o sensación de fatiga. En caso de que presente algún tipo de complicación durante el Shuttle Walking Test o debido a la punción endovenosa, la Facultad cuenta con Protocolo de la Facultad de Medicina, usted será atendido por los investigadores y por la Técnica en Enfermería a cargo Seta Rosa Canessa, que le brindará primeros auxilios, en el caso de que se requiera de mayor atención, se llamará a un radio Taxi Refaca para poder trasladarlo al servicio de salud más cercano Sano 131 del Hospital Gustavo Frickel ya que es el establecimiento de Salud pública más cercana a la Universidad, siempre en compañía de la investigadora principal María Ignacia Grossi Bagnara.

5. **Beneficios**

Usted no tendrá beneficios directamente, pero si obtendrá beneficios en el sentido de la información que se le proporcionará al finalizar con la investigación, en relación a su función pulmonar y daño oxidativo. Si usted llegase a presentar algún factor de riesgo para su salud evidenciado en la presente investigación, se le realizará una consejería breve con el fin de prevenir futuros daños.

6. **Costos y pagos**

Todos los gastos realizados los asumirán los encargados de la investigación, usted como participante no debe asumir ningún tipo de gasto.

7. **Derechos del participante**

a) **A manifestar dudas, preguntas**

Usted como participante tiene derecho a manifestar todas sus dudas a los investigadores en cualquier momento y en el caso que de que requiera aclaraciones respecto a la investigación podrá contactarse por medio de teléfono celular o vía mail con María Ignacia Grossi Bagnara 982081625 o mariaignacia.grossi@uv.cl; Daniel Ponce Correa 971932529 o daniel.ponce@uv.cl, como también a los técnicos Sebastián Ormeño 95838439 o sebastian.ormeno@abummos.uv.cl; Camila Cabrera 958466786 o camila.cabrera@abummos.uv.cl; Gonzalo Carrasco 978396862 o gonzalo.carrasco@abummos.uv.cl o a Alondra Montero 944873009 o alondra.montero@abummos.uv.cl



b) **A la participación voluntaria y a la revocación del consentimiento**

Usted puede retirarse en cualquier momento de la investigación, si así estima necesario, solo debe comunicárselo a la investigadora principal. Su retiro será completamente entendido.

c) **A la atención y derivación oportunas en casos identificados de hallazgos a consecuencia de la investigación**

Si la presente investigación llegase a detectar algún factor de riesgo para su salud, se le instruirá a consultar para continuidad de tratamiento en la red pública asistencial que corresponda, dando énfasis a la consulta en el centro de salud familiar en el que esté inscrito.

d) **A recibir información relevante derivada de la investigación que lo pueda beneficiar o hacer cambiar su opinión respecto de su participación.**

Usted como participante tiene derecho a conocer sus resultados obtenidos en nuestra investigación, es por eso que al finalizar la investigación se le informará vía mail que se dirija a la oficina n°4 de Escuela de Kinesiólogía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso, para que se le expliquen los resultados obtenidos, así tener una visión sobre su condición actual. Esta información estará por escrita en un informe que podrá llevarse a su casa.

II. Confidencialidad

a) **Reserva de la identidad del participante**

Durante toda nuestra investigación será mantenida a la confidencialidad de sus datos, con el fin de presentar los resultados nunca será revelado su nombre, en su lugar se le asignará un código numérico que lo representará durante toda la investigación, estos datos serán almacenados para su futuro análisis, comparación y procesamiento estadístico con el fin de obtener las conclusiones del estudio, y solo tendrán acceso los investigadores y serán resguardados por la investigadora principal María Ignacia Grossi Bagnara en un archivo de computadora con clave, en la oficina n°4 de la Escuela de Kinesiólogía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso. Todos los documentos que contengan datos personales a excepción del consentimiento informado serán destruidos una vez finalice la investigación.

b) **De los datos personales y sensibles**

Todos los datos registrados por nuestra investigación serán reservados y solo tendrán acceso los investigadores y serán resguardados por la investigadora principal, como se indicó anteriormente.

c) **Difusión y entrega de los resultados**

Los resultados de esta investigación pueden ser divulgados según lo estimen los investigadores, ya sea mediante publicaciones, seminarios, reuniones de tipo científicas y/o académicas y que podrán ser utilizadas o no por otras investigaciones que no se deriven de la presente investigación, siempre resguardando su identidad.

9. Evaluación Ética Científica

Esta investigación ha sido evaluada y aprobada por el Comité de Bioética en Investigación de la Facultad de Medicina, Casa central (CBI FAMED) de la Universidad de Valparaíso. Si usted lo requiriera, en caso de tener alguna duda acerca de este estudio o respecto de sus derechos como participante en esta investigación, puede contactar a su presidente en el teléfono 32-260 30 02 o al correo electrónico etica@facultadmedicina@uv.cl.



Acta de Consentimiento Informado

Yo, ... (nombre y apellidos),
C.I. (dígitos numéricos). Declaro que el investigador principal
María Ignacia Grossi Bagnara, Kinesióloga junto con Daniel Ponce Correa, Kinesiólogo y los
estudiantes de pregrado Camila Cabrera Cerda, Gonzalo Carrasco Neira, Alondra Montero Machuca y
Sebastián Ormeño Ortiz de la Carrera de Kinesiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de
Valparaíso, ubicada en calle Angamos Nro 665 de la ciudad de Viña del Mar, me ha/n informado en
forma completa en qué consiste la investigación "Efecto del tabaquismo crónico sobre la función
cardiorrespiratoria y producción de Especies Reactivas de Oxígeno en Funcionarios de la Universidad
de Valparaíso, Facultad de Medicina" que llevarán a cabo en la Facultad de Medicina de la Universidad
de Valparaíso, en Viña del Mar. He leído completamente la información proporcionada en este
documento acerca de mi participación. Me han informado y explicado cuáles son los procedimientos
del estudio (Antropometría, Tolerancia al esfuerzo, Función pulmonar y Producción de Especies
Reactivas de Oxígeno) los que será sometido, y en qué consistirá mi participación. Asimismo, he
tenido la oportunidad de hacer preguntas y aclarar todas mis dudas con el investigador(a). Entiendo
que poseo el derecho de revocar mi consentimiento sin que esta decisión pueda ocasionarme algún
perjuicio.

De acuerdo a lo declarado por mí en este documento, firmo aceptando voluntariamente mi
participación en esta investigación. Recibo una copia completa de este documento.

Nombre y Firma Participante
C.I.:
Fecha:

Nombre y Firma Investigador Responsable
C.I.:
Fecha:

Nombre y Firma Director del Establecimiento o su delegado
C.I.:
Fecha:

Refusa, ...



Anexo n°7: Separación sanguínea

Reactivos:

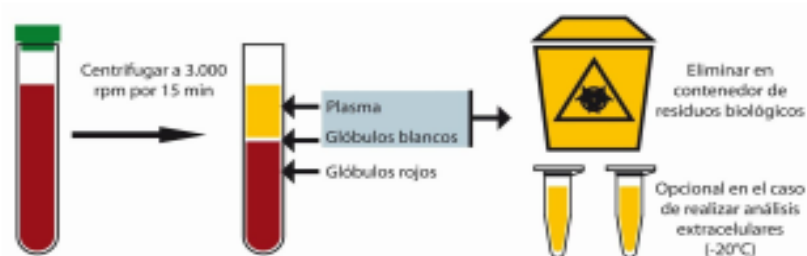
Separación sanguínea

- **Buffer de lavado:** NaCl 0,15 M
Na₂HPO₄ 0,01 M
NaH₂PO₄ 0,01 M } pH 7,4
- **Solución hipotónica:**
Primero preparar una solución isotónica
Na₂HPO₄ 0,022 M
NaH₂PO₄ 0,088 M
Para lograr la hipotónica diluir al 6,7% v/v

Procedimiento:

Separación sanguínea

El primer paso de la separación es la centrifugación de las muestras de sangre completa a **3.000 rpm por 15 min.** Posterior a este proceso obtendremos 3 estratos, plasma, glóbulos blancos y glóbulos rojos. Descartaremos los glóbulos blancos (**Descartar en contenedor para residuos biológicos**) y guardaremos el plasma en tubos Eppendorf rotulados.



Luego de eliminar los glóbulos blancos y guardar el plasma (-20°C si es por corto tiempo hasta el traslado, si es mayor a -80°C), procederemos a **lavar los glóbulos rojos**. El lavado consiste en agregar aproximadamente **10 mL de Buffer de lavado** a los tubos con los glóbulos rojos sucios y centrifugar a **3.000 rpm por 15 min.** Una vez centrifugado, se elimina el sobrenadante y el resto de los glóbulos blancos. Este paso se repite 2 veces más (**3 lavados**).

Finalmente, limpios los glóbulos rojos, realizaremos la **hemolisis para las pruebas enzimáticas** en tubos Eppendorf rotulados, usando una solución hipotónica. Agregaremos 10 μ L de glóbulos rojos mas 990 μ L de hipotónica (**1:100**), sonicaremos y agitaremos con vortex. Este hemolizado será nuestra muestra problema para evaluar la actividad de **SOD, catalasa, carbonilos y proteínas totales**. Al igual que el plasma, se almacenará a -20°C o -80°C dependiendo del tiempo de envío.



El resto de los glóbulos rojos limpios, con su correspondiente rótulo, será utilizado **para TBARS** y se guardará a -80°C hasta su traslado.

Anexo n°8: TBARS

Practico de parámetros de oxidación de biomoléculas blanco: TBARS y PAOP

REACTIVOS:

TBARS (Reacción del ácido tiobarbitúrico - Lipoperoxidación)

- Ácido tricloroacético (TCA) 30% p/v.
- Ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% p/v.

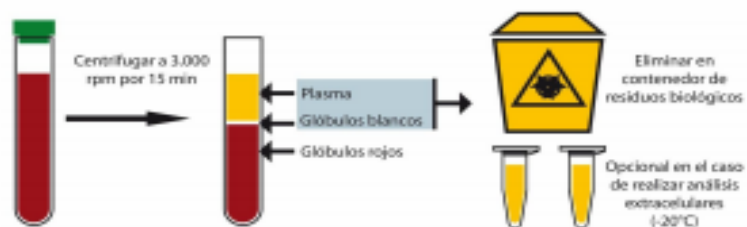
PAOP (Productos avanzados de oxidación de proteínas)

- Buffer PAOP: Na_2HPO_4 10 mM
 NaH_2PO_4 10 mM } pH 7,4
- Yoduro de potasio (KI) 115 Mm
- Ácido acético glacial (37%)

Procedimiento:

TBARS (Esterbauer *et al.*, 1982)

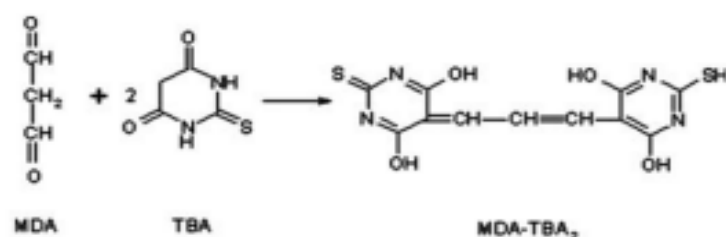
Hay que recordar que en el practico de separación realizado anteriormente, obtuvimos **glóbulos rojos** limpios y **plasma**. Para la evaluación de la lipoperoxidación por la técnica TBARS, se usan los **glóbulos rojos limpios**.



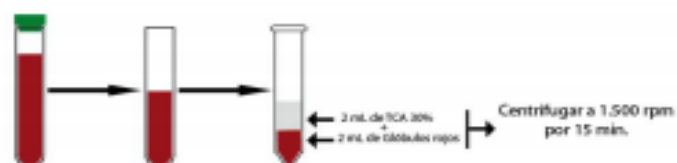
La técnica TBARS tiene la finalidad, a través de un análisis bastante simple, de evaluar la reacción del TBA con el malondialdehído (MDA) presente en una muestra biológica. El MDA es un producto de término del proceso de lipoperoxidación, ampliamente utilizado en el área del estrés oxidativo. La concentración de MDA es, por lo tanto, evidencia

de oxidación de membranas lipídicas y biomarcador de daño oxidativo.

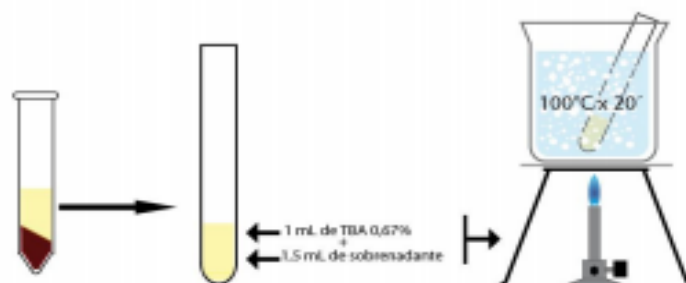
El TBA al reaccionar con el MDA, presente en la muestra problema, forma un aducto coloreado cuyo pick de absorbancia es a los 535 nm de λ .



Para generar la reacción entre el TBA y el MDA, tenemos que mezclar **2 mL de glóbulos rojos limpios** con **2 mL de TCA 30%** y centrifugar a **1.500 rpm por 15 min** (En tubo cónico de 15 mL).



Transcurrido el tiempo, obtendremos un sobrenadante el cual usaremos para la reacción con el TBA. Agregar **1,5 mL de sobrenadante** más **1 mL de TBA 0,67%** y calentar a **100°C por 20 min** (En tubo largo de 30 mL). Transcurrido el tiempo, **enfriar** y leer en un espectro entre **400-600 nm** de λ .



Obtenido el espectro, hay que estimar y corregir el pick real del MDA, con una regla de 3 simple y extrapolar en una curva de MDA puro.

Anexo n°9: Carbonilos

Practico de parámetros de oxidación de biomoléculas blanco: CARBONILOS

REACTIVOS:

- HCl 2M
- 2,4 DINITROFENILHIDRAZINA 10mM en HCl 2M
- A.C. TRICLOROACETICO 20%
- BUFFER CARBONILOS: Na₂HPO₄ y NaH₂PO₄ 20mM en TCA 20% pH 2,3
- UREA 6M EN BUFFER CARBONILO
- ETANOL:ACETATO DE ETILO (1:1)

Procedimiento:

Determinación de carbonilos (Levine et al., 1990):

El estrés oxidativo genera productos de oxidación, en el caso de la oxidación de proteínas uno de estos productos son los grupos carbonilos. Este método se basa en la reacción de los grupos carbonilos con la 2-4-dinitrofenilhidrazina, formando 2-4-dinitrofenilhidrazona de color amarillo el que es detectado a 370 nm (Figura 1).

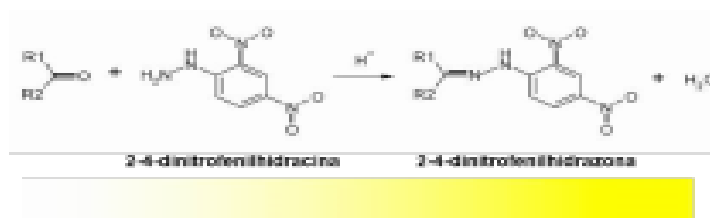


Figura 1: Reacción de la 2-4-dinitrofenilhidrazina con los grupos carbonilos durante el desarrollo de la técnica para la cuantificación de estos últimos.

El análisis consistirá en mezclar 100 μ L de lisado de eritrocitos (1:100) con 300 μ L de ácido tricloroacético (TCA 50% p/v) en tubos Eppendorf, se dejará 5 minutos en hielo y se centrifugará a 8.000 g por 5 minutos a 15 °C, dejando el pellet y eliminando el sobrenadante. Esto se hace por triplicado más un control del experimento. A continuación, a tres de los tubos se les agregará 1 mL de

2-4-dinitrofenilhidrazina (0,3% en ácido clorhídrico, HCL 2 N) y al control 1 mL de HCL 2 N, se agitará y se dejará por 1 hora en oscuridad agitando periódicamente. Transcurrido el tiempo, a cada tubo se agregará 0,5 mL de TCA 50%, se agitará y se conservará en hielo por 5 minutos para luego centrifugar a 8.000 g por 5 minutos a 15 °C. Posteriormente, será eliminado cuidadosamente el sobrenadante y procederá a lavar 3 veces con 1mL de mezcla etanol:acetato de etilo (1:1), se agitará durante 10 minutos y se centrifugará a 8000 g durante 5 minutos a 15°C, eliminando el sobrenadante en cada oportunidad. Luego, será evaporado lo que quedó del solvente utilizando nitrógeno gaseoso. Finalmente, se agregará en cada tubo 2 mL de urea al 6 M y será incubado a 37 °C por 30 minutos. La reacción será detectada espectrofotométricamente a 370 nm y se calculará el contenido de carbonilos usando su coeficiente de absorción molar ($E = 22.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) y la ecuación 5.

$$\text{Concentraci3n de carbonilos (mol)} = \frac{\text{Absorbancia}_{370\text{nm}}}{\text{Ancho cubeta } E} \quad (5)$$

Donde E corresponde al coeficiente de absorci3n molar de los grupos carbonilos y el ancho de la cubeta correspondi3 a 1 cm.

Referencias

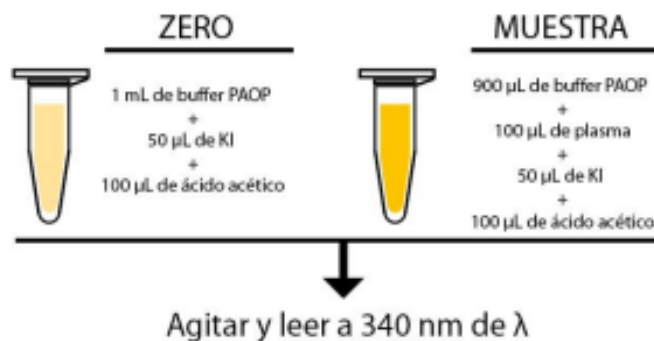
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol. 186:464-78.

Anexo n°10: PAOP

Determinación de PAOP (Witko *et al.*, 1998)

Las proteínas son susceptibles al daño por radicales libres dando lugar, mediante reacciones de agregación, entrecruzamiento y fragmentación a los **Productos Avanzados de Oxidación de Proteínas**. La concentración de estos productos es expresada como equivalentes de cloramina T (patrón) en condiciones ácidas a 340 nm. En presencia del yoduro de potasio, seguidas de transformaciones de los iones yodo a yodo diatómico, provocan estos PAOP.

La técnica es muy simple, se debe **trabajar bajo campana** y primero debemos preparar un **ZERO** que lleva todos los reactantes menos la muestra. Para ello debemos mezclar **1 mL de buffer PAOP** más **50 µL de KI** más **100 µL de ácido acético** y agitamos (**tubo Eppendorf**). Además, de otro tubo Eppendorf para la muestra problema, constituida por **900 µL de buffer PAOP** más **100 µL de plasma** más **50 µL de KI** y más **100 µL de ácido acético**, agitamos y medimos a **340 nm** de λ . Los datos de absorbancia son extrapolados en una curva de cloramina T.



Al finalizar el práctico eliminar los desechos y lavar el material, Gracias.

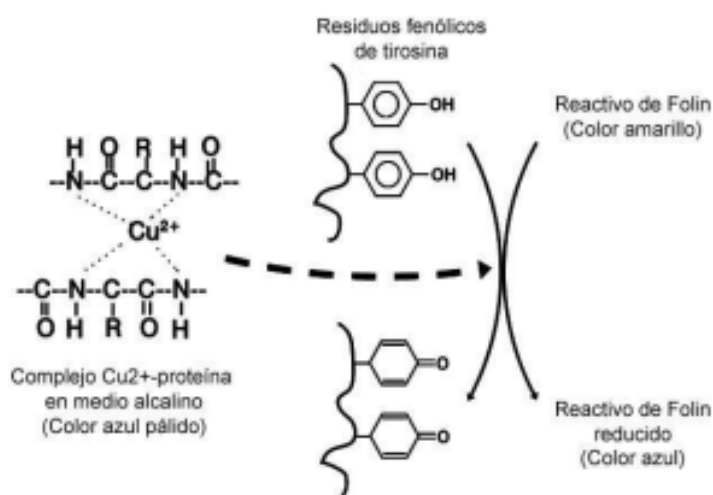
Referencias

- Esterbauer K, Cheeseman H, Dianzani M, Poli G, Slater T. 1982. Separation and characterization of the aldehydic

Anexo nº11: Proteínas totales

Determinación de proteínas totales (Lowry et al., 1951):

La concentración total de proteínas será determinada por medio de la reacción entre los residuos de tirosina presentes en la muestra y el reactivo de Folin-Ciocalteu, usando albúmina como patrón. Los iones de Cu^{2+} presentes en un reactivo de cobre alcalino (RCA), se unen a las proteínas presentes en los lisados celulares formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. La formación del complejo Cu^{2+} -proteína, de color azul claro, provoca el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiendo los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción, al unirse al reactivo Folin-Ciocalteu. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, el que es medido espectrofotométricamente.



Determinación de proteínas totales usando el método de Lowry. Reacción del ion cúprico presente en el RCA y el reactivo de Folin-Ciocalteu con los residuos de tirosina de las proteínas presentes en una muestra problema.

El análisis consistirá en generar la reacción de 1 mL del RCA (Na_2CO_3 0,94 M, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ 3,5 mM, CuSO_4 2 mM y NaOH 0,5 M) y 10 μL del lisado de eritrocitos de cada tratamiento, incubando a temperatura ambiente por 10 minutos. Transcurrido el tiempo, será agregado a la reacción 4 mL del reactivo Folin-Ciocalteu mezclado con agua destilada (1:20). Luego será incubada la solución resultante a 55°C por 5 minutos y se leyó a 650 nm. Los valores serán extrapolados en una curva de albumina y expresados en mg de proteína.

Referencias

- Witko-Sarsat V, Friedlander M, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocytes activation in chronic renal failure. *J Immunol* 1998; 161: 2524-2532.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A & Randall R. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.

Anexo nº12: SOD

Practico de parámetros de oxidación de biomoléculas blanco: SOD

REACTIVOS:

- BUFFER SOD:
EDTA 0,1mM
NaH₂PO₄ 50mM
Na₂HPO₄ 50mM } Disueltos en EDTA pH 7,8
- Xantina 0,5mM en Buffer SOD
- Citocromo c (Cit c) 20 µM en Buffer SOD

SOLUCIÓN A):

10mL de Xantina + 100mL Cit c (mantener a 37°C)

SOLUCIÓN B):

25µL de Xantina Oxidasa + 1mL EDTA (mantener en hielo)

Procedimiento:

Determinación de SOD (Fridovich, 1995):

Para la evaluación de la actividad de SOD se medirá espectrofotométricamente la reducción de la formación de O₂⁻ en el sistema xantina/xantina oxidasa.



Reacción utilizada para el análisis de la actividad de SOD descrita por Fridovich, 1995.

En esta técnica, se usará una alícuota de lisado de eritrocitos (1:28). Serán preparadas una solución A, compuesta por xantina 0,5 mM y citocromo c 20 µM disueltas en PBS pH 7,8 (Na₂HPO₄ y NaH₂PO₄ 50mM disueltos en EDTA 0,1 Mm) y una solución B compuesta por

xantina oxidasa y EDTA 0,1 mM en una proporción 1:40. La actividad enzimática será detectada en una cinética de 2 minutos a 550 nm, mezclando 2,9 mL de la solución A, 50 µL de la solución B y 50 µL de la muestra. Los datos serán extrapolados en una curva de la enzima pura y divididos por las proteínas totales con los datos obtenidos en la determinación de proteínas totales de Lowry, expresándola como unidades de enzima*mg de proteína⁻¹.

Referencias

- Fridovich I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*, 64: 97-112.

Anexo n°13: Catalasas

Practico de determinación in vitro de capacidad antioxidantes: TRAP y CAT.

Reactivos:

Evaluación de la actividad de Catalasa

- **Buffer Catalasa:** Na_2HPO_4 50 mM
 NaH_2PO_4 50 mM } pH 7,0
- H_2O_2 0,3 M

TRAP

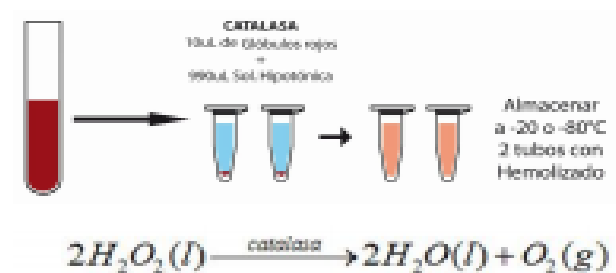
- ABTS 150 μM
- ABAP (AAPH) 10 mM

Ambos preparados en agua destilada

Procedimiento:

Determinación de la actividad de Catalasa (Aebi, 1984)

La enzima Catalasa forma parte de la primera línea de defensa contra las especies reactivas de oxígeno (ROS) a nivel celular. Esta enzima cataliza la dismutación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y lo reduce a agua.



La técnica consiste en hacer reaccionar la enzima presente en el hemolizado con una concentración conocida de H_2O_2 y seguir su reducción a través de una cinética enzimática.

En celdas de cuarzo, mezclar:

Muestra problema

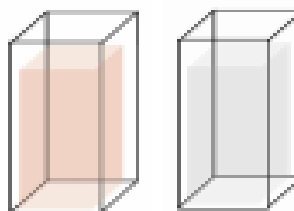
2900 μL de Buffer Catalasa

+

100 μL de H_2O_2

+

5 μL Hemolizado



Blanco (zero)

3000 μL de Buffer Catalasa

Punto crítico: El Buffer Catalasa debe estar a 37°C .

La reacción se sigue en una **cinética** de **1 minuto 30 segundos** a una longitud de onda (λ) de **240 nm**. Una vez obtenidos los valores de absorbancia, se realiza un **gráfico de dispersión** (X: tiempo; Y: Absorbancia), se obtiene la **ecuación de la recta** y el índice de correlación r . Con los datos de la ecuación de la recta obtendremos la **constante de velocidad enzimática (K)**, despejando la ecuación de Michaelis-Menten:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \left[S \right] + \frac{1}{V_{max}}$$

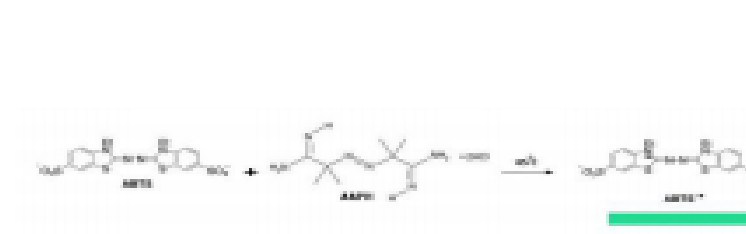
Donde el intercepto (b) de la ecuación de la recta es igual a $1/V_{max}$ y la pendiente (m) es igual a K_m/V_{max} . Con el valor de K extrapolaremos en una curva de calibrado de Catalasa pura y dividiremos por la concentración de proteínas. Es importante considerar el **factor de dilución** usado durante la hemólisis (1:100).

La unidad de medida de la actividad de Catalasa es U enzima * mg proteína⁻¹.

Anexo n°14: TRAP

TRAP – Total reactive antioxidant properties (Romay et al., 1996)

Para realizar la evaluación de la capacidad antioxidante total a través de esta técnica, se debe generar un radical ABTS coloreado estable al reaccionar con el reactivo ABAP, como muestra la figura:



Para ello, debemos mezclar en una relación 1:1 el ABTS con el ABAP en incubar a 45°C por 30 min (**OJO: Dejar al menos 1 mL de ABTS para el blanco**). En la medida que pasa el tiempo iremos notando que de una solución incolora pasa a un verde turquesa. Una vez que se cumple el tiempo, debemos frenar la reacción enfriando bajo llave.

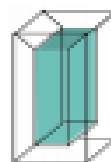
Para evaluar la capacidad antioxidante a través del secuestro del electrón desapareado por parte de la muestra problema, mezclar de la siguiente forma:

Muestra problema

1000 µL de la mezcla ABTS:ABAP

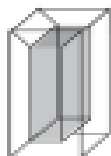
+

10 µL de la muestra problema



Blanco (zero)

1000 µL ABTS



Realizar una cinética de 50 seg. Con lecturas de la absorbancia cada 10 seg. a λ 734 nm.

Calcular:

$$A = A_0 - A_{50} / A_{30}$$

Donde

A = Es la absorbancia media

A_0 = Es la absorbancia a tiempo 0

A_{50} = Es la absorbancia a tiempo 50

A_{30} = Es la absorbancia a tiempo 30

Los datos se extrapolan en una curva de calibrado de un antioxidante de referencia, TROLOX® un mimic de la Vit E.

Referencias

Aebi H. B. Isolation, purification, characterization, and assay of antioxygenic enzymes [13] Catalase in vitro. Methods in Enzymology. (1984) 105: 121-126.

Romay C, Pascual C, Lissi E.A. The reaction between ABTS radical cation and antioxidants and its use to evaluate the antioxidant status of serum samples. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. (1996), 29(2):175-83.

Anexo n°15: GSH/GSSG

Practico de parámetros de oxidación de biomoléculas blanco: GSH/GSSG

REACTIVOS:

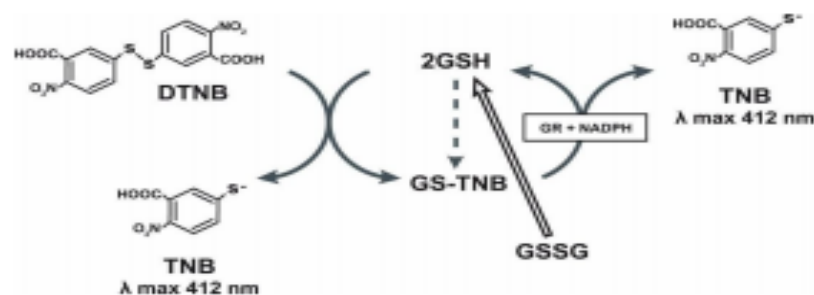
- EDTA 5mM
 - Buffer KPE
 - KH_2PO_4 0,1M (160mL)
 - K_2HPO_4 0,1M (840mL)
- en EDTA
- *al mezclar en este volumen se logra pH 7,5

- 2-vinilpiridina: 1:10 en buffer KPE (Hielo y bajo campana)
- DTNB: 2mg en 3mL de buffer KPE (Oscuridad)
- β -NADPH: 2mg en 3mL de buffer KPE (Oscuridad)
- Glutatión reductasa (GR): 4 μ L (250 U/mL) en 3mL de buffer KPE

Procedimiento:

GSH/GSSG (Rahman *et al.*, 2006):

Este ensayo se basa en la reacción del glutatión reducido (GSH) con el reactivo de Ellman (DTNB) que forma un cromóforo TNB con una absorbancia máxima a 412 nm, además de formar un aducto con el glutatión oxidado (GS-TNB). El aducto GS-TNB es reducido por glutatión reductasa (GR), en presencia de NADPH, reciclando el GSH. Debido a que a partir de una molécula de GSSG se forman 2 GSH, por acción de GR, la cantidad de glutatión medido representa la suma del glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) en una muestra problema ($[\text{GSH}]_{\text{total}} = [\text{GSH}] + 2 \times [\text{GSSG}]$). Así, la concentración de una muestra desconocida se determinará usando curvas de GSH y GSSG estándar.



Reacción de reciclaje del reactivo de Ellman (DTNB) para la determinación de la razón GSH/GSSG (Esquema obtenido de el artículo de Rahman *et al.*, 2006).

Brevemente, los eritrocitos serán resuspendidos en 1 mL de buffer de extracción en hielo (0,1% Triton-X y 0,6% de ácido sulfosalicílico en KPE, Buffer fosfato potásico 0,1 M en EDTA 5Mm ajustado a pH 7,5) y homogeneizados. Luego serán sonicados en agua con hielo por 2-3 minutos, agitando en vortex por 30 segundos. Para asegurarse de que las células estén bien lisadas, se congelarán a -80°C. Posteriormente, se descongelarán los tubos y se centrifugaron a 3.000g por 4 minutos a 4°C. Una vez realizado este paso, el sobrenadante será transferido a un tubo Eppendorf, previamente refrigerado, el cual será utilizado para la estimación de GSH/GSSH. Para ello, en una celda de cuarzo de 1mL, se agregarán 700 µL de buffer KPE potasio fosfato 0.1M con EDTA 5 Mm (pH 7,5), 100 µL del lisado y 120 µL de solución DTNB / GR (1:1) (2 mg de DTNB en 3 mL de buffer KPE; 40µL de GR (25 unidades mL-1) en 3 mL de KPE) y serán mezclados. Se esperarán 30 segundos y se agregarán 60 µL de β-NADPH (2 mg de β-NADPH en 3 mL de KPE), se agitará con parafilm y se leerá a 412 nm a los 2 minutos. Se usará como blanco todos los reactantes menos la muestra. Finalmente, la cantidad de GSH y GSSG será obtenida a partir de curvas estándar y luego divididos los valores para obtener el índice GSH/GSSG.

Referencias

- Rahman I, Kode A, Biswas S. 2006. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*. 1(6): 3159-3165.