



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE SUCRE  
ESCUELA DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

DAÑO OXIDATIVO DEL ADN DE LOS GLÓBULOS BLANCOS, FRAGILIDAD  
DE LOS GLÓBULOS ROJOS Y EFECTO ANTIOXIDANTE DE LA VITAMINA C  
Y EL ZINC EN INDIVIDUOS FUMADORES DE LA CIUDAD DE CUMANÁ,  
ESTADO SUCRE  
(Modalidad: Tesis de Grado)

AMANDA JOSÉ GÓMEZ HERNÁNDEZ

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

CUMANÁ, 2012



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE SUCRE  
ESCUELA DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

DAÑO OXIDATIVO DEL ADN DE LOS GLÓBULOS BLANCOS, FRAGILIDAD  
DE LOS GLÓBULOS ROJOS Y EFECTO ANTIOXIDANTE DE LA VITAMINA C  
Y EL ZINC EN INDIVIDUOS FUMADORES DE LA CIUDAD DE CUMANÁ,  
ESTADO SUCRE  
(Modalidad: Tesis de Grado)

AMANDA JOSÉ GÓMEZ HERNÁNDEZ

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

CUMANÁ, 2012

DAÑO OXIDATIVO DEL ADN DE LOS GLÓBULOS BLANCOS, FRAGILIDAD  
DE LOS GLÓBULOS ROJOS Y EFECTO ANTIOXIDANTE DE LA VITAMINA C  
Y EL ZINC EN INDIVIDUOS FUMADORES DE LA CIUDAD DE CUMANÁ,  
ESTADO SUCRE

APROBADO POR:



---

Prof. Sonia Nusetti.  
Asesora



---



## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
LISTA DE TABLA	III
LISTA DE FIGURAS	IV
RESUMEN	VI
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	7
RESULTADOS	14
DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES	31
RECOMENDACIONES	32
BIBLIOGRAFÍA	33
APÉNDICES	41
ANEXOS	53
HOJA DE METADATOS	61

## **DEDICATORIA**

A Dios, a quien con mucha devoción rogué en mis oraciones para no desvanecer y darme la fortaleza y el espíritu de seguir adelante, para no descansar y culminar con este sueño.

A mis padres, Norys y Armando, dos seres que con mucho sacrificio y esmero lograron darme todo el apoyo y amor que necesitaba en todos los momentos difíciles, pero ahora vencidos y con el reto alcanzado.

A mi hermana Gaby, quien colaboró de una u otra forma en el logro de mi meta.

A Lening, por tener la paciencia de esperar y ayudarme incondicional en todo lo que estuvo a su alcance para calmar mi impaciencia.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mí asesora la Prof. Sonia Nusetti, por su apoyo, orientaciones impartidas y su colaboración en este trabajo, ya que sin su aporte esta investigación no sería posible. Dios todopoderoso permita retribuirle en alguna forma tantos detalles; gracias.

Al Prof. Osmar Nusetti, por su asesoría y colaboración para la ejecución de este proyecto.

A la coordinadora del Postgrado de Biología Aplicada, Dra. Mariolga Berrizbeitia y a la Prof. Evelyn Flores, del Laboratorio de Histología, del Departamento de Bioanálisis, por su colaboración al prestar el microscopio de fluorescencia.

A la profesora de Postgrado de Biología Aplicada, Jessica Rodríguez, por la ayuda prestada durante la investigación.

Esta investigación no hubiera podido completarse sin la ayuda, la voluntad y el tiempo de las personas sanas, como los individuos fumadores, los cuales ofrecieron sus muestras sanguíneas para así, aportar su granito de arena para lograr esta meta.

Además, a mi compañera de estudios Jahnnellys, por ayudarnos mutuamente en lo que fue el registro y procesamiento de las muestras.

A todos, muchísimas gracias.

## LISTA DE TABLA

Tabla 1. Fragilidad osmótica de los eritrocitos medida en los diferentes grupos en estudio, expuestos a concentraciones decrecientes de NaCl en fumadores de la ciudad de Cumaná, estado Sucre. ....	21
--	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tipos de cometas detectados en glóbulos blancos de los individuos que conformaron éste estudio: a) cometa cero, b) cometa uno, c) cometa dos, d) cometa tres y e) cometa cuatro.....	12
Figura 2: Tipos y números de cometas detectados en glóbulos blancos, expuestos a concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno, provenientes del grupo control. * $p < 0,01$ con respecto al mismo cometa.....	15
Figura 3: Tipos y números de cometas detectados en glóbulos blancos, expuestos o no a peróxido de hidrógeno, provenientes de individuos fumadores. a y b corresponden a los distintos grupos obtenidos por el análisis estadístico.	16
Figura 4: Tipos y números de cometas detectados en glóbulos blancos, expuestos o no a peróxido de hidrógeno, provenientes de individuos fumadores tratados con vitamina C. a y b corresponden a los distintos grupos obtenidos por el análisis estadístico. ....	16
Figura 5: Tipos y números de cometas detectados en glóbulos blancos, expuestos o no a peróxido de hidrógeno, provenientes de individuos fumadores tratados con zinc. a y b corresponden a los distintos grupos obtenidos por el análisis estadístico.....	17
Figura 6: Tipos y números de cometas detectados en glóbulos blancos, expuestos o no a peróxido de hidrógeno, provenientes de individuos fumadores tratados con vitamina C/zinc. a, b y c corresponden a los distintos grupos obtenidos por el análisis estadístico.....	18
Figura 7: Daño oxidativo del ADN en glóbulos blancos, no expuestos a peróxido de hidrógeno, de los diferentes grupos en estudio. a, b, c y d corresponden a los distintos grupos obtenidos por el análisis estadístico.....	19
Figura 8: Daño oxidativo del ADN en glóbulos blancos, expuestos a 0,06% de peróxido de hidrógeno, de los diferentes grupos en estudio. a, b y c corresponden a los distintos grupos obtenidos por el análisis estadístico. ....	20
Figura 9. Fragilidad osmótica de los eritrocitos medida en los diferentes grupos	

en estudio..... 21

## RESUMEN

Se evaluó el daño oxidativo en el ácido desoxirribonucleico (ADN) de los glóbulos blancos, fragilidad de los glóbulos rojos y efecto antioxidante de la vitamina C y el zinc (Zn) en individuos fumadores de la ciudad de Cumaná, estado Sucre. En el estudio participaron 30 individuos aparentemente sanos (grupo control) y 60 fumadores del sexo masculino. Luego de haber tomado la primera muestra de sangre, los fumadores se dividieron en 3 grupos, para los distintos tratamientos antioxidantes: el primer grupo recibió vitamina C (250 mg), el segundo, Zn (20 mg), y el tercero, vitamina C más Zn, por un período de 20 días continuos. Finalizado el tratamiento, se tomó la segunda muestra de sangre para evaluar los efectos antioxidantes. El daño de ADN se evaluó a través del *ensayo cometa*, el cual permite detectar las lesiones en condiciones experimentales de pH alcalino. La fragilidad osmótica de los eritrocitos fue determinada mediante el cálculo del porcentaje de hemólisis. Los glóbulos blancos de los fumadores presentaron mayor daño oxidativo del ADN, en comparación con el grupo control y mostraron mayor susceptibilidad a la presencia del agente estresor, peróxido de hidrógeno. Los diferentes tratamientos antioxidantes redujeron significativamente la fragmentación del ADN y el tratamiento combinado fue el que resultó con la mayor protección y disminuyó la susceptibilidad al peróxido de hidrógeno a valores similares a los controles. La fragilidad de los glóbulos rojos de los fumadores fue similar a la de los controles. Estos resultados aportan pruebas suficientes del aumento del estrés oxidativo causado por los componentes oxidantes del cigarrillo y demuestran que un suplemento con antioxidantes puede ser eficaz para minimizar el daño oxidativo producido por el consumo de tabaco.

## INTRODUCCIÓN

El abuso del tabaco constituye uno de los problemas más importantes de la salud mundial, ya que su consumo se inicia, generalmente, en la adolescencia y puede perdurar en la adultez (1). El tabaquismo es considerado una enfermedad adictiva, al igual que el alcoholismo o la dependencia a otras drogas prohibidas. La persistencia en el consumo se origina dado que el fumador desarrolla una dependencia física y psicológica debido a la acción de la nicotina; ésta no es una sustancia cancerígena, pero es la responsable de provocar la adicción, causando daños en el individuo y perjuicios sobre la población en general (2). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), actualmente existen 1100 millones de fumadores en el mundo y año tras año, mueren alrededor de 4 millones de personas por enfermedades asociadas con su consumo; de continuar el aumento en las cifras, fallecerá una persona cada tres segundos a causa de esta adicción.

Los cigarrillos contienen una gran variedad de compuestos químicos tóxicos, cancerígenos y mutagénicos, tales como nitrosaminas, aldehídos, hidrocarburos aromáticos y heterocíclicos, acroleína, metales pesados, principalmente el cadmio (Cd) y sustancias radioactivas (3). Estos compuestos llegan directo a la sangre, viajan por el organismo, provocando un estado de intoxicación crónica, que lenta y progresivamente, van a afectar los órganos del cuerpo y su capacidad de reserva funcional, hasta finalmente desarrollar innumerables enfermedades, tales como cáncer pulmonar, cáncer bucal, bronquitis, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedades cardiovasculares (aterosclerosis), diabetes, entre otras enfermedades crónicas (4).

Los componentes químicos de los cigarrillos son generadores potenciales de radicales libres (RL), especialmente de las especies reactivas de oxígeno (ERO)

en los individuos fumadores, los cuales resultan en una permanente condición de estrés oxidativo (EO), que se define como un desequilibrio entre los oxidantes y las defensas antioxidantes de las células, ocasionando daños celulares en todos los tejidos de estos individuos (5). Las ERO, tales como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), hidroperóxidos, peróxidos orgánicos, y otros RL son extremadamente reactivos, tienden a extraer un electrón ( $e^-$ ) a las macromoléculas con la intención de aparear su  $e^-$ , provocando daños oxidativos a proteínas, carbohidratos, peroxidación de las membranas lipídicas, ruptura de cadenas en el ácido desoxirribonucleico (ADN), finalmente generan alteraciones fisiológicas y genotóxicas (6).

Se ha reportado que el humo del cigarrillo (HC) induce rompimiento en las hebras del ADN, cambios en la reparación del ADN en cultivos de diferentes células humanas, y en glóbulos blancos (GB) de ratas y ratones (7). Una gran variedad de pruebas se han desarrollado para detectar daños en el ADN de las células, entre ellas se tienen las espectrofotométricas, las citogenéticas y las basadas en la sedimentación del ADN dañado. Actualmente, la más utilizada en el monitoreo del daño al ADN en humanos expuestos a contaminantes, es la electroforesis en gel de células individuales o ensayo cometa, que se caracteriza por ser una técnica rápida, de bajo costo y muy sensible (8). La técnica optimiza el desenrollamiento del ADN, permitiendo la evaluación de ruptura de las hebras de cadena simple y de sitios lábiles a los álcalis. Este ensayo puede ser aplicado en cualquier célula eucariota, ya que permite estimar el daño genético en células de forma individual, y tiene amplias aplicaciones en estudios de reparación, biomonitoreo y toxicología genética (9).

Por otra parte, se ha demostrado que las membranas lipídicas de los glóbulos rojos de los individuos fumadores también son susceptibles al ataque de los RL. Las membranas de estas células, son ricas en ácidos grasos poliinsaturados

que los convierte en blanco de las ERO, con la subsecuente producción de peróxidos lipídicos, debilitamiento de la integridad de la membrana y, por lo tanto, aumenta la lisis de los glóbulos rojos, típico en los individuos fumadores (10). La oxidación lipídica por los RL, ocurre en una reacción en cadena en la que el ácido graso, al oxidarse, se convierte en un radical de ácido graso con capacidad de oxidar a otra molécula (11). Fumar de 5 a 7 cigarrillos diarios aumenta los resultados de la peroxidación lipídica, determinado por la medición *in vivo* de las sustancias reactivas ácido tiobarbitúrico (TBARS) plasmáticos, valorados en 90 min después de fumar (12).

Los individuos fumadores, además del problema de la elevada exposición a los RL, presentan una disminución en sus mecanismos de defensa antioxidante. El sistema de defensa antioxidante protege a las células de la acción perjudicial de las ERO (13). Este sistema, está constituido por enzimas: catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa (GR) entre otros y elementos no enzimáticos: glutatión, metalotioneinas, fitoquímicos, vitaminas E, A, C, selenio (Se) y zinc (Zn) (14).

Las actividades de las enzimas antioxidantes, tales como la SOD, GPx, GR y CAT se encuentran alteradas en el plasma y eritrocitos de los fumadores (13). En GB se ha encontrado una disminución de Se y Zn mientras que en el suero, bajos niveles de glutatión, beta-caroteno, Se y las vitaminas A, E y C (15).

La vitamina C (vit C) o ácido L-ascórbico, actúa en el organismo como un potente antioxidante; su propiedad hidrosoluble le permite interactuar con el  $O_2^{\cdot-}$  y  $\cdot OH$ , reduciendo su toxicidad en los tejidos (16). Su ingesta es requerida, debido a que el humano carece de la enzima necesaria para su síntesis, como es la L-glunolactona oxidasa, que es capaz de transformar la glucosa en vit C (17). La ingesta recomendada para los hombres es de 90 mg/día. La vida media de la vit C en el organismo es de aproximadamente 16 días, por este motivo

necesita ser ingerida diariamente de manera exógena, ya que es más fácil que se agoten sus reservas que las de otras vitaminas. Las fuentes naturales de esta vitamina son las frutas y vegetales frescos, como: la naranja, limón, mandarina, brócoli, manzanas, espárragos, mango, kiwi, melón, coliflor, duraznos, entre otros (18).

En situaciones especiales, la vit C purificada puede ser administrada por vía oral, intramuscular, subcutánea e intravenosa. La máxima absorción se obtiene con la ingestión de varias dosis menores a 500 mg/día, espaciadas cada una de ellas a lo largo del día. El alcohol, fumar y el stress inhiben su absorción. Una vez absorbida la vit C, se almacena en los tejidos del cuerpo (sangre, ojos, hígado, bazo, cerebro, glándulas suprarrenales y tiroideas), se excreta por vía renal a través de sus metabolitos: ácido dehidroascórbico, ácido oxálico, O-metil ascorbato 2, 2-ketoascorbitol o en forma de ácido L-ascórbico cuando se encuentra en exceso (19).

A la vit C se le ha atribuido múltiples beneficios, tales como: efecto antiaterogénico, antioxidante, anticancerígeno, antiinflamatorio, neuroprotector, antigripal, inmunoregulador, estimula la síntesis de colágeno y carnitina, protege moléculas indispensables para el organismo, como proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos (20). Además, esta vitamina juega un papel preponderante en la protección del ADN de agentes oxidantes en las células de personas sanas, fumadoras, diabéticas, expuestas a contaminantes ambientales, entre otras. Los individuos que ingieren dicho suplemento disminuyen el daño oxidativo, aumentando considerablemente las expectativas de vida con respecto a aquellos que no consumen constantemente vit C (21). Los fumadores no parecen ingerir sistemáticamente la cantidad sugerida suplementaria de 124-200 mg/día para prevenir el EO y desde luego, los niveles séricos de vit C entre los fumadores tiende a ser inferior a las de los no fumadores (22). El HC disminuye los niveles de la vit C en humanos y

puede generar una severa hipovitaminosis C, asociado a un aumento en su degradación. Existe evidencia científica de que el suplemento oportuno de esta vitamina y de otros antioxidantes protegen a los fumadores del daño oxidativo producido por las ERO y de los RL (23,24).

Otro importante antioxidante utilizado para disminuir los daños oxidativos inducidos por contaminantes ambientales y enfermedades degenerativas en animales de experimentación y en humanos, ha sido el Zn (25). Este metal constituye un elemento traza esencial para todos los organismos vivos, es clave para el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de células y tejidos, así como la regulación de la función inmune, como también para la función de numerosos factores de transcripción y elementos nucleares reguladores (26,27).

La ingesta recomendada de Zn para un adulto se sitúa en 11 mg/día para los hombres, según RDA. El Zn está extensamente distribuido en alimentos y bebidas, las proporciones son variables, los alimentos más ricos en Zn son los productos de origen marino, principalmente los mariscos (ostras y crustáceos), seguidos de las carnes rojas, derivados lácteos, huevos y los cereales integrales. Los vegetales, con excepción de las leguminosas, las verduras, hortalizas, frutas, grasas, pescados y dulces son fuentes pobres de Zn (28).

Varios estudios han resaltado la importancia del Zn como un antioxidante, a través de diferentes mecanismos: 1) como cofactor para la superóxido dismutasa (SOD), parte del sistema antioxidante primario de los vertebrados (29); 2) regulación de la expresión génica de la catalasa a través del estímulo del factor de transcripción SP-1 y otros elementos de respuesta transcripcional (30); 3) desplazamiento de metales activos redox de los sitios de unión en las membranas, reduciendo la iniciación de la oxidación de biomoléculas. Además, el metal también puede funcionar, indirectamente, como antioxidante, ya que

puede inducir la síntesis de metalotioneínas, proteínas de baja masa molar rica en grupos tioles, las cuales pueden formar tiolatos con metales prooxidantes (cobre (Cu), mercurio (Hg) y Cd), y eliminar el  $\cdot\text{OH}$  y el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (31).

La función antioxidante del Zn puede ser alterada por efecto de su disminución en los tejidos (29). Los individuos fumadores acumulan altos niveles de Cd y bajos de Zn en plasma, y se ha sugerido que el Cd puede actuar desplazando al Zn a nivel molecular, debido a que poseen una configuración similar de electrones en sus capas externas; el Cd tiene la capacidad de ocupar el sitio del Zn en las proteínas, los cuales alteran la estructura y función de estas macromoléculas (32-34). Sin embargo, el tratamiento oportuno de Zn a ratas, ratones y humanos, puede revertir los daños oxidativos de lípidos y ADN en diversos tejidos inducidos por el Cd y por otros prooxidantes. Además, cuando el tratamiento es combinado con otro antioxidante, como la vit C, se potencia el efecto antioxidante (35,36).

Los individuos fumadores presentan una continua sobreexposición a los RL y una disminución de su capacidad antioxidante, los cuales desencadenan alteraciones genéticas y celulares que, a largo plazo, pueden culminar en cáncer o en enfermedades degenerativas. Es bien conocido que el consumo de frutas, vegetales, vitaminas y minerales con propiedades antioxidantes poseen efecto protector, debido a su capacidad de neutralizar los RL y disminuir las lesiones oxidativas en las células. Por lo que en este trabajo se planteó evaluar el daño oxidativo del ADN de los glóbulos blancos y la fragilidad de los glóbulos rojos en individuos fumadores, y determinar si el tratamiento con antioxidantes, como la vitamina C y zinc, puede ser adecuado y oportuno para proteger a los fumadores de daños al ADN y a la membrana celular. Esto permitirá promover medidas preventivas por parte de la comunidad médico-científica, y educar tanto los individuos fumadores como no fumadores (activos y pasivos), sobre los riesgos producidos a su salud por los impactos del hábito de fumar en su sistema inmunológico y hematológico.

# METODOLOGÍA

## **Población**

La población estudiada estuvo constituida por 60 individuos fumadores (FUM) de sexo masculino, con edades comprendidas entre 20 a 35 años, los cuales tenían un promedio entre 5 y 10 años fumando la cantidad de 10 cigarrillos o más diarios. Además, se seleccionaron a 30 individuos no fumadores aparentemente sanos (grupo control), que no poseían un historial de fumador activo ni pasivo. A todas estas personas (fumadoras y no fumadoras), se les aplicó una encuesta de datos clínico-epidemiológicos para conocer los hábitos de fumar, la presencia de enfermedades u otros hábitos que pudieran haber interferido con el estudio para poder establecer los criterios de exclusión (anexo 1).

## **Diseño experimental**

A los individuos fumadores se les extrajo inicialmente una muestra sanguínea para determinar el daño del ADN en los GB y fragilidad osmótica de los glóbulos rojos, luego fueron divididos en 3 grupos experimentales, cada uno conformado por 20 fumadores, para los tratamientos con antioxidantes:

- Fumadores a los cuales se les indicó ingerir una dosis de 250 mg en forma de tabletas masticables de vit C, durante 20 días continuos.
- Fumadores que debieron ingerir una dosis de 20 mg de Zn en forma de tabletas, durante 20 días continuos.
- Fumadores que ingirieron las mismas dosis de vit C y de Zn durante 20 días

continuos.

Se mantuvo contacto con los individuos fumadores cada 5 días para garantizar el cumplimiento del tratamiento. Al finalizar el mismo, se les tomó la muestra de sangre para los respectivos análisis.

### **Criterios de exclusión**

Se excluyó del estudio aquellos individuos que tenían un historial de fumador pasivo, si presentaban alteraciones hematológicas (esferocitosis) o alguna enfermedad como diabetes mellitus, hipertensión arterial, hiperlipidemias, alcoholismo, afecciones a nivel renal, hepático, pulmonar y/o tuvieran tratamiento con medicamentos antioxidantes para el momento del estudio.

### **Normas de bioética**

La investigación se realizó siguiendo los lineamientos establecidos en la declaración de Helsinki, entre los cuales se destacan que todo trabajo de investigación debe estar sólo a cargo de personas con debida preparación científica y bajo vigilancia de los profesionales de la salud, respetando los derechos de cada individuo participante en la investigación a salvaguardar su integridad personal. Se aplicaron todas las precauciones necesarias para respetar la intimidad, integridad física y mental del sujeto, siguiendo el criterio de ética publicado por la Organización Panamericana de la Salud (37), conforme al artículo 46 numeral 3, de la Constitución de la República Bolivariana de Venezuela. Al paciente se le dio por escrito las indicaciones necesarias para la toma de muestra sanguínea y se les informó de la importancia, objetivos del estudio, métodos y procedimiento a utilizar y la finalidad de la investigación (anexo 2).

### **Obtención de la muestra**

Previa asepsia de la región del pliegue del codo a nivel de la vena cubital media, se extrajo por punción venosa, 5 ml de sangre con jeringas estériles descartables. Los 5 ml fueron transferidos a tubos de ensayo estériles con una gota de la sal sódica del ácido etilendiaminotetraacético ( $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ) al 10,00%, como anticoagulante, y se mantuvieron en cavas refrigeradas hasta llegar al laboratorio.

### **Contaje de glóbulos blancos**

Se llenó la pipeta Thomas con la sangre bien mezclada hasta la marca 0,5. Se aforó con solución de Turk (ácido acético glacial 3,00%) hasta la marca 11 y se agitó la pipeta durante 3 min, luego, se llenó la cámara de Neubauer y en el microscopio con el objetivo de 10X, se contaron los leucocitos presentes en los cuatro cuadrados grandes de los extremos del retículo. Los valores de referencia en el adulto oscilan entre  $4,5\text{-}11,0 \times 10^9/\text{l}^{-1}$  (38).

### **Detección de daños a nivel de ADN a través del ensayo cometa**

Esta técnica permite detectar daños en el ADN en una célula en condiciones experimentales de pH alcalino y permite revelar la presencia de rompimiento en una simple o doble hebra del ADN en los sitios lábiles a la alcalinidad. Las células en estudio son colocadas en agarosa, lisadas y luego sometidas a electroforesis, bajo condiciones específicas. En la lisis, la célula pierde sus proteínas y no son capaces de reparar ADN dañado. Durante la electroforesis, el ADN dañado y fragmentado, migra dentro del gel desde el núcleo hacia la dirección del ánodo. La cantidad de ADN migrado es una medida de la extensión del daño. La observación del ADN se realiza a través de la tinción con bromuro de etidium (BrEt) y examinado por la fluorescencia de emisión con un

filtro de excitación de 515 a 560 nm. Las células que contienen ADN dañado, aparecen después de la electroforesis con una apariencia de cometa con una cabeza brillante y una cola; por lo contrario, las células que contienen un ADN sin lesión, aparecen con un núcleo intacto y sin cola (39).

El diseño experimental utilizado, fue el siguiente: de 3 000 a 5 000 células de GB se mezclaron con 50  $\mu$ l de agarosa de bajo punto de fusión al 0,75% a 37°C, y después se colocaron en láminas portaobjetos, previamente cubiertas con una fina capa de agarosa 0,50%; inmediatamente la suspensión celular se cubrió con cubreobjetos y se incubaron a 4°C por 5 min para permitir la solidificación del gel (9).

Después de la solidificación de la última capa del gel que cubre las láminas, éstas se sumergieron durante 1 hora en la solución de lisis ( $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  100  $\text{mmol l}^{-1}$ , cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) 2,50  $\text{mol l}^{-1}$ , tris-hidroximetil aminometano (Tris) 10  $\text{mmol l}^{-1}$ , tritón X-100 al 1,00%, dimetil sulfóxido (DMSO) al 1,00%, N-lauril sarcosina al 2,00% y sodio dodecil sulfato (SDS) al 0,10% a pH 10,0). Posteriormente, se colocaron en una unidad de electroforesis horizontal, que contenía buffer fresco alcalino ( $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  1  $\text{mmol l}^{-1}$ , hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) 300  $\text{mmol l}^{-1}$ , pH 12,6) y luego, permanecieron por 30 min a 4°C para permitir el desenrollamiento del ADN antes de la electroforesis, la cual se realizó a una constante de 0,25 voltios y 300 mA, durante 1 hora (9).

Las láminas que representaron el control positivo de cada uno de los individuos, estuvieron previamente expuestas por 5 horas a  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0,06% para inducir el daño al ADN. Luego, se procedió con la lisis y la electroforesis.

Después de la electroforesis, las láminas lavadas ligeramente con buffer Tris (0,40  $\text{mol l}^{-1}$  a pH 7,5) permanecieron refrigeradas hasta su observación. Se realizó la tinción con BrEt (20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Para las observaciones se usó un microscopio de fluorescencia Zeiss West Axioskop Mc 100 equipado con filtro de

excitación de 515 a 560 nm y un filtro de barrera de 590 nm.

La migración del ADN, se determinó por medición de la longitud ( $\mu\text{m}$ ) de la cola del cometa, en 20 células tomadas al azar por cada lámina preparada, y los cometas observados se clasificaron en cinco clases: cometa 0 (C0) no representa daño; cometa 1 (C1): longitud de 1-6  $\mu\text{m}$ ; cometa 2 (C2): longitud de 7-13  $\mu\text{m}$ ; cometa 3 (C3): longitud de 14-20  $\mu\text{m}$  y cometa 4 (C4): longitud de 20  $\mu\text{m}$  o más que representa la máxima lesión en el ADN (40).

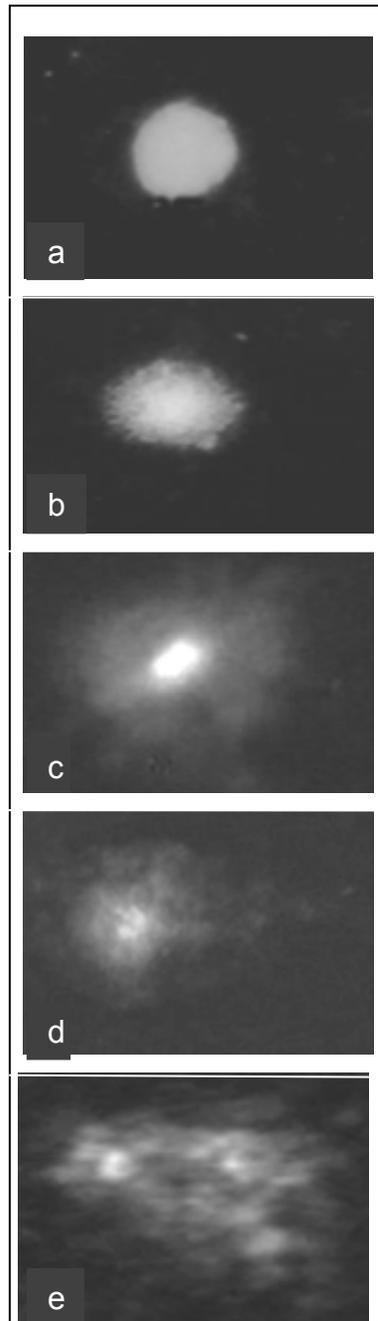


Figura 1: Tipos de cometas detectados en glóbulos blancos de los individuos que conformaron éste estudio: a) cometa cero, b) cometa uno, c) cometa dos, d) cometa tres y e) cometa cuatro.

## **Evaluación de la fragilidad osmótica de los eritrocitos**

Como etapa previa a la determinación de la fragilidad osmótica de los eritrocitos de cada individuo, una parte de la muestra anticoagulada se centrifugó a 2 500 g durante 10 min a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de centrifugación se descartó el sobrenadante y el paquete leucocitario por aspiración. Con la fracción pura de glóbulos rojos se realizó la fragilidad osmótica. Para ello, se preparó una solución amortiguadora de fosfato con NaCl al 1,00%, a partir de la cual se realizaron soluciones acuosas al 0,90; 0,70; 0,60; 0,55; 0,50; 0,45; 0,40; 0,35; 0,30 y 0,10% NaCl, a pH 7,4. De cada solución, se tomaron 5 ml y se colocaron en un tubo junto con 20 µl de la suspensión eritrocitaria, se mezclaron y se dejaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, los tubos fueron centrifugados a 64 g por 10 min, se tomaron los sobrenadantes para determinar las absorbancias (Abs) en un espectrofotómetro a 540 nm. El porcentaje de hemólisis se determinó comparándolo con la solución 0,10% (que corresponde al 100,00% de hemólisis) (41).

$$\% \text{ hemólisis} = \frac{\text{Abs.tubo X} \times 100}{\text{Abs.tubo 0,10\% NaCl}}$$

## **Métodos estadísticos**

Las diferencias probabilísticas entre las distintas condiciones experimentales se obtuvieron a través del análisis estadístico no paramétrico Kruskal-Wallis (KW) y Mann-Whitney U (MWU) con el propósito de determinar posibles diferencias significativas entre las medianas de los distintos grupos experimentales. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$  (42).

## RESULTADOS

### **Tipos y números de cometas detectados en glóbulos blancos, expuestos a concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno, provenientes del grupo control**

Los GB de individuos sanos, no expuestos a  $H_2O_2$ , presentaron principalmente C0 ( $17,37 \pm 3,47$ ), seguido por los C1 ( $2,63 \pm 1,54$ ). Al tratar las células con 0,06% de  $H_2O_2$ , disminuyeron los C0 ( $5,95 \pm 3,06$ ) y aumentaron los C1 ( $12,32 \pm 3,96$ ) significativamente; con respecto a las células no tratadas, aparecieron los C2 ( $1,84 \pm 1,30$ ) y C3 ( $0,16 \pm 0,37$ ). Las células tratadas con 0,12% de  $H_2O_2$ , arrojaron menor número de C0 ( $1,21 \pm 0,79$ ), permanecieron similares los C1 ( $11,16 \pm 3,30$ ); a las células tratadas con 0,06% de  $H_2O_2$ ; se elevaron significativamente los C2 ( $5,79 \pm 2,74$ ) y C3 ( $1,95 \pm 1,22$ ) diferenciándose éstos de los tratados con 0,06% de  $H_2O_2$ ; además surgieron los C4 ( $0,42 \pm 0,51$ ) (Figura 2; Apéndices 1-6). A partir de estos resultados, se utilizó la concentración de 0,06% de  $H_2O_2$  como control positivo para los ensayos cometas en los GB de los distintos grupos de individuos en estudio.

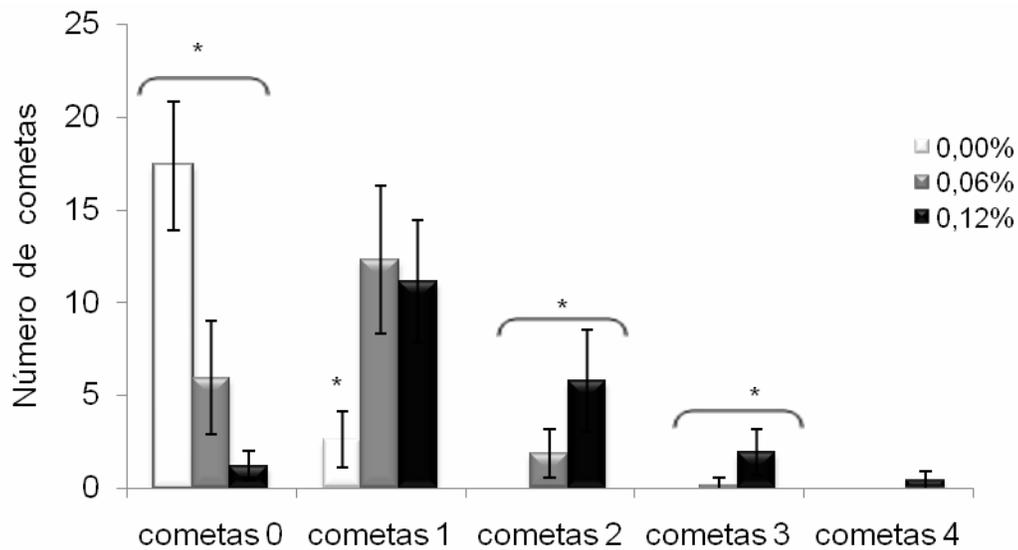


Figura 2: Tipos y números de cometas detectados en glóbulos blancos, expuestos a concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno, provenientes del grupo control. \*  $p < 0,01$  con respecto al mismo cometa.

### Tipos y números de cometas detectados en glóbulos blancos de individuos fumadores

Los GB, no expuestos a  $H_2O_2$ , de individuos fumadores presentaron menor número de C0 ( $0,60 \pm 0,50$ ) y cantidades similares de C1 ( $9,67 \pm 3,69$ ) y C2 ( $9,73 \pm 3,46$ ). Al exponer las células a 0,06% de  $H_2O_2$ , se mantuvieron similares en cuanto al número de los C0 ( $0,30 \pm 0,47$ ), C1 ( $6,13 \pm 2,96$ ) y C2 ( $13,23 \pm 3,78$ ) con respecto a las células no expuestas a  $H_2O_2$ . Sin embargo, aparecieron en menor cantidad los C3 ( $0,33 \pm 0,48$ ) (Figura 3; Apéndices 7-12).

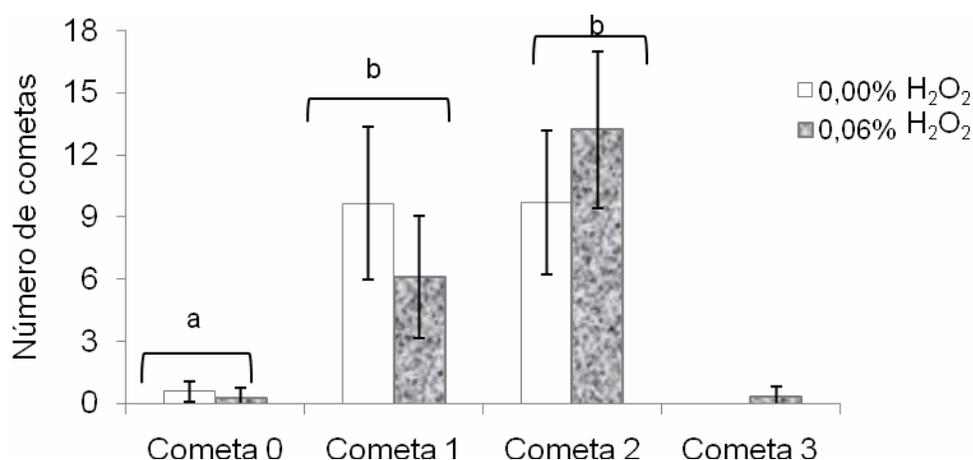


Figura 3: Tipos y números de cometas detectados en glóbulos blancos, expuestos o no a peróxido de hidrógeno, provenientes de individuos fumadores. a y b corresponden a los distintos grupos obtenidos por el análisis estadístico.

### Tipos y números de cometas detectados en glóbulos blancos de individuos fumadores tratados con vitamina C

Los GB, no expuestos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de individuos fumadores con tratamiento de vit C evidenciaron un predominio de C0 (11,70 ± 3,65), seguido por los C2 (6,00 ± 2,11) y un menor número de C1 (2,30 ± 0,95). Al exponer las células a 0,06% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se mantuvieron números similares, sin diferencia significativa, de los C0 (11,60 ± 3,72), C1 (2,40 ± 0,97) y C2 (7,50 ± 2,64) (Figura 4; Apéndices 13-17).

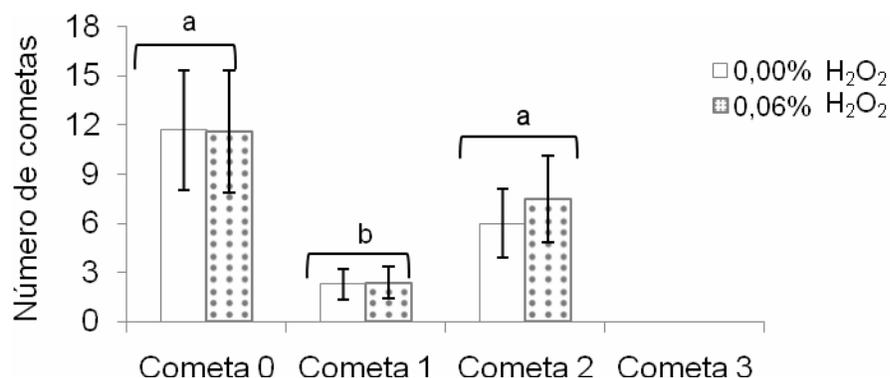


Figura 4: Tipos y números de cometas detectados en glóbulos blancos, expuestos o no a peróxido de hidrógeno, provenientes de individuos fumadores tratados con vitamina C. a y b corresponden a los distintos grupos obtenidos por el análisis estadístico.

### Tipos y números de cometas detectados en glóbulos blancos de individuos fumadores tratados con zinc

Los GB, no expuestos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de individuos fumadores con tratamiento de Zn arrojaron un predominio de C0 (8,90 ± 0,99) y C1 (8,10 ± 2,73), seguidos por los C2 (3,00 ± 1,41) en cantidades significativamente menores. Al exponer las células a 0,06% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, permanecieron números similares, sin diferencia significativa, de los C1 (8,70 ± 0,95), C0 (8,00 ± 2,58) y C2 (3,30 ± 1,25) (Figura 5; Apéndices 18-22).

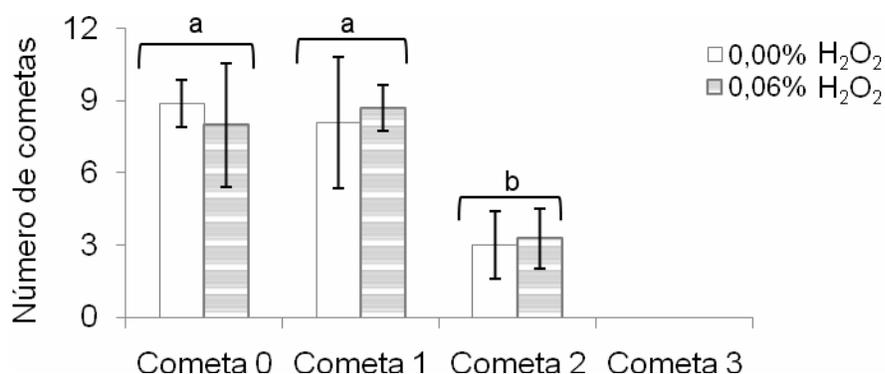


Figura 5: Tipos y números de cometas detectados en glóbulos blancos, expuestos o no a peróxido de hidrógeno, provenientes de individuos fumadores tratados con zinc. a y b corresponden a los distintos grupos obtenidos por el análisis estadístico.

### Tipos y números de cometas detectados en glóbulos blancos de individuos fumadores tratados con vitamina C/zinc

Los GB, no expuestos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de individuos fumadores con tratamiento de vit C/Zn mostraron un predominio de C1 (15,00 ± 4,08), seguido por una disminución del número de C0 (5,00 ± 0,47). Al exponer las células a 0,06% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, redujeron significativamente los C0 (2,10 ± 0,57), permanecieron números

similares, sin diferencia significativa, de los C1 ( $15,50 \pm 5,30$ ) y aparecieron en menor número los C2 ( $2,40 \pm 0,84$ ) (Figura 6; Apéndices 23-27).

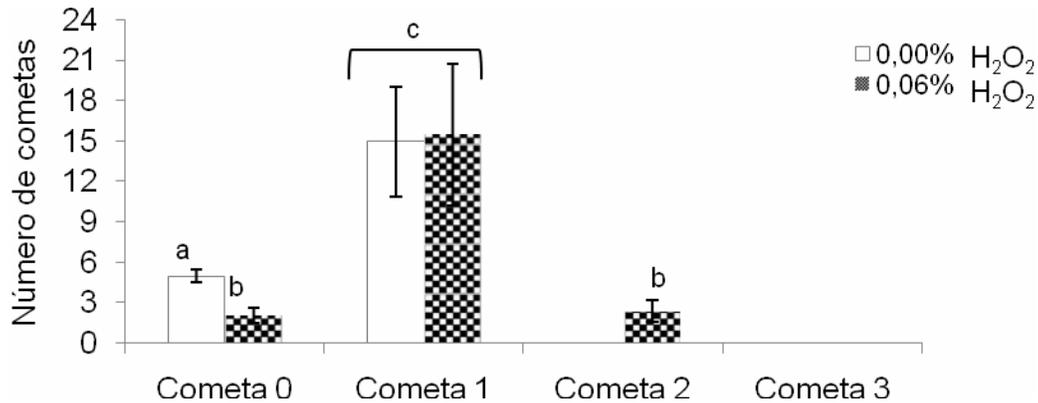


Figura 6: Tipos y números de cometas detectados en glóbulos blancos, expuestos o no a peróxido de hidrógeno, provenientes de individuos fumadores tratados con vitamina C/zinc. a, b y c corresponden a los distintos grupos obtenidos por el análisis estadístico.

### **Daño oxidativo del ADN en glóbulos blancos, no expuestos a peróxido de hidrógeno, de los diferentes grupos en estudio.**

Los GB de los fumadores presentaron menor cantidad de C0 ( $0,60 \pm 0,50$ ) en comparación con los sanos ( $17,37 \pm 3,47$ ). Después de los diferentes tratamientos antioxidantes, los tratados con vit C aumentaron significativamente los C0 ( $11,70 \pm 3,65$ ) a valores similares al de los sanos, los tratados con Zn ( $8,90 \pm 0,99$ ) y vit C/Zn ( $5,00 \pm 0,47$ ) también se elevaron significativamente con respecto a los fumadores, pero estos valores no fueron similares a los sanos.

Los fumadores presentaron significativamente mayor cantidad de C1 ( $9,67 \pm 3,69$ ) en comparación con los sanos ( $2,63 \pm 1,54$ ). Al ser tratados los fumadores con vit C disminuyeron los C1 ( $2,30 \pm 0,95$ ) a valores similares de los sanos; los tratados con Zn y vit C/Zn exhibieron cantidades de C1 ( $8,10 \pm 2,73$ ); ( $15,00 \pm 4,08$ ) respectivamente, similares a los obtenidos por los fumadores.

En cuanto a los C2, los sanos no presentaron este tipo de cometa y los fumadores mostraron mayor cantidad de C2 ( $9,73 \pm 3,46$ ). Después del tratamiento con vit C no hubo cambio significativos en el número de cometa ( $6,00 \pm 2,11$ ), pero el tratamiento con Zn disminuyó significativamente este tipo de cometa ( $3,00 \pm 1,41$ ). Los fumadores tratados con vit C/Zn no evidenciaron este tipo de cometa (Figura 7; Apéndice 28).

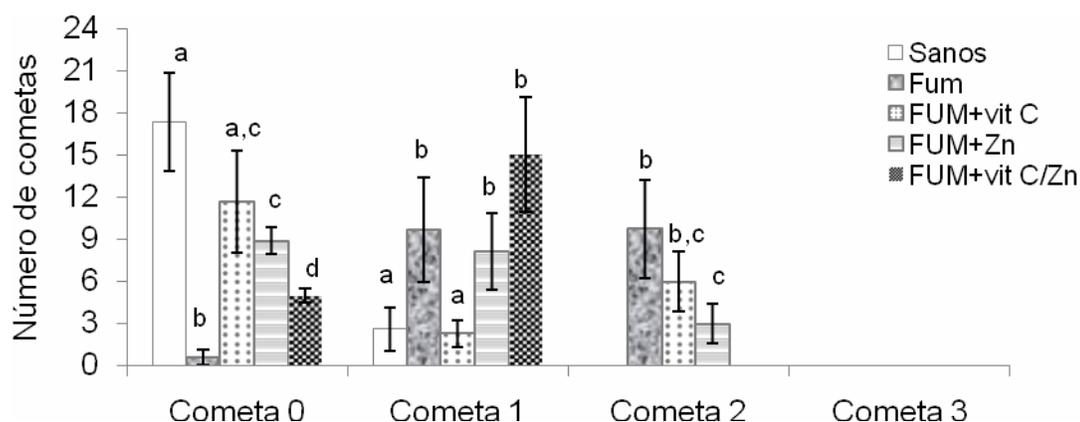


Figura 7: Daño oxidativo del ADN en glóbulos blancos, no expuestos a peróxido de hidrógeno, de los diferentes grupos en estudio. a, b, c y d corresponden a los distintos grupos obtenidos por el análisis estadístico.

**Daño oxidativo del ADN en glóbulos blancos, expuestos a 0,06% peróxido de hidrógeno, de los diferentes grupos en estudio.**

Los GB de los fumadores registraron menor cantidad de C0 ( $0,30 \pm 0,47$ ) en comparación con los sanos ( $5,95 \pm 3,06$ ). Después de los diferentes tratamientos antioxidantes los C0 de los tratados con vit C y Zn ( $11,60 \pm 3,72$ ); ( $8,00 \pm 2,58$ ), respectivamente, presentaron números de cometas similares al de los sanos; sin embargo, el tratamiento con vit C/Zn no modificó el número de C0 ( $2,10 \pm 0,57$ ) en comparación a los fumadores sin tratamiento.

Los GB de los fumadores mostraron disminución de los C1 ( $6,13 \pm 2,96$ ) en comparación con los sanos ( $12,32 \pm 3,96$ ). Al ser tratados los fumadores

con vit C y Zn no cambió el número de C1 ( $2,40 \pm 0,97$ ); ( $8,70 \pm 0,95$ ) con respecto a los valores obtenidos por los fumadores, pero en cambio los fumadores tratados con vit C/Zn aumentaron significativamente los C1 ( $15,50 \pm 5,30$ ) a valores similares al de los sanos.

En los GB de los fumadores se detectaron mayor cantidad de C2 ( $13,23 \pm 3,78$ ) en comparación con los sanos ( $1,84 \pm 1,30$ ). Después del tratamiento con vit C presentaron la misma cantidad de C2 ( $7,50 \pm 2,64$ ) en comparación con los fumadores, pero los tratados con Zn y vit C/Zn disminuyeron los C2 ( $3,30 \pm 1,25$ ); ( $2,40 \pm 0,84$ ) a valores similares a los obtenidos por los sanos.

Los GB de los sanos y fumadores arrojaron valores similares en cuanto al número de C3 ( $0,16 \pm 0,37$ ); ( $0,33 \pm 0,48$ ), respectivamente; en los diferentes tratamientos con los antioxidantes (vit C, Zn y vit C/Zn) no se observaron este tipo de cometa (Figura 8; Apéndice 29).

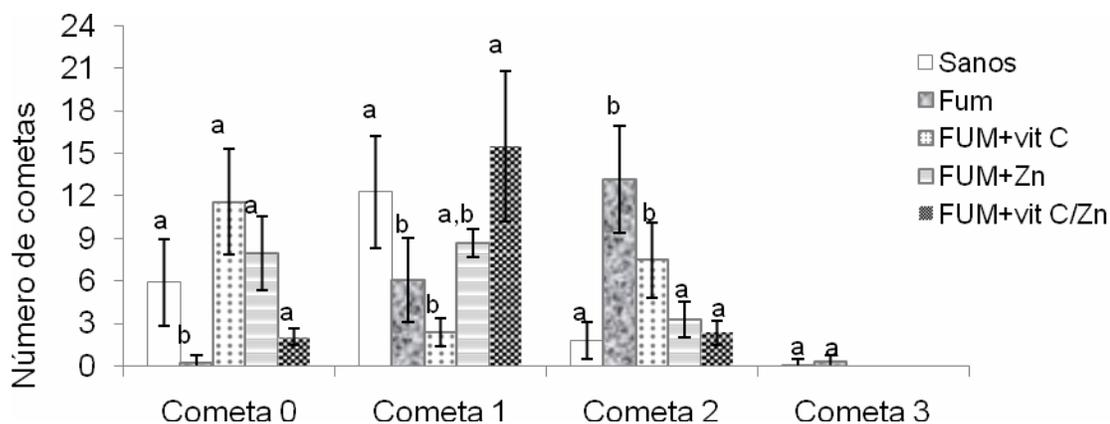


Figura 8: Daño oxidativo del ADN en glóbulos blancos, expuestos a 0,06% de peróxido de hidrógeno, de los diferentes grupos en estudio. a, b y c corresponden a los distintos grupos obtenidos por el análisis estadístico.

Al exponer las células a concentraciones hipotónicas decrecientes de NaCl todos los grupos experimentales (sanos, fumadores, fum + vit C, fum + Zn, fum + vit C/Zn) presentaron un comportamiento similar de hemólisis. La hemólisis

inicial se inicio a 0,45% NaCl y con una hemolisis total de 0,30% NaCl. No se detectaron diferencias significativas entre los grupos en estudio (Figura 9) (Tabla 1).

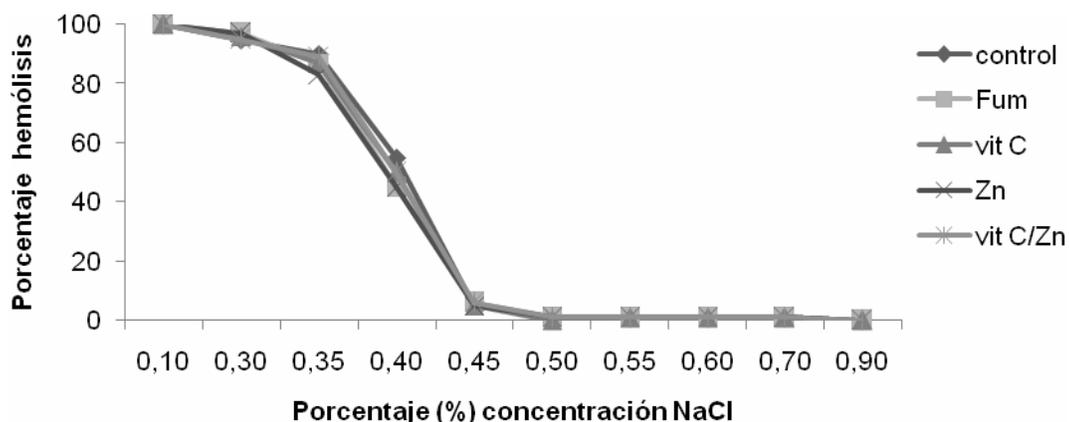


Figura 9. Fragilidad osmótica de los eritrocitos medida en los diferentes grupos en estudio.

Tabla 1. Fragilidad osmótica de los eritrocitos medida en los diferentes grupos en estudio, expuestos a concentraciones decrecientes de NaCl en fumadores de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.

[%NaCl]	Porcentaje de hemólisis					
	Sanos $\bar{X} \pm DE$	Fum $\bar{X} \pm DE$	Fum			Kruskal Wallis
			vit C $\bar{X} \pm DE$	Zn $\bar{X} \pm DE$	vit C/Zn $\bar{X} \pm DE$	
0,30	95 ± 11	97 ± 13	96 ± 12	97 ± 10	95 ± 15	
0,35	90 ± 15	87 ± 19	87 ± 15	83 ± 20	89 ± 13	
0,40	55 ± 14	45 ± 15	50 ± 9	45 ± 14	50 ± 11	ns p > 0,05
0,45	5 ± 2	6 ± 2	5 ± 2	5 ± 3	6 ± 1	
0,50	1 ± 1	1 ± 1	0 ± 0	1 ± 1	1 ± 1	

[%NaCl]: porcentaje concentración de cloruro de sodio; Fum: fumadores;  $\bar{X}$ : media; DE: desviación estándar; ns p > 0,05: no significativo.

## DISCUSIÓN

El HC contiene una gran variedad de compuestos químicos carcinogénicos que afectan prácticamente todos los sistemas funcionales del organismo humano, tanto de fumadores activos como de pasivos (43). Estos compuestos, al entrar al organismo generan RL que oxidan a las proteínas, lípidos y al ADN, que alteran la estructura y función de las mismas. Estas modificaciones pueden desencadenar muerte celular o mutaciones que a largo plazo generan cáncer o enfermedades degenerativas tales como supresión del sistema inmune (44). Varios estudios han demostrado una correlación entre la exposición al HC y lesiones en el ADN, y en los lípidos de membrana de diversos tejidos de individuos fumadores. El ensayo cometa es una técnica empleada para el monitoreo de daños oxidativos en el ADN de animales y humanos expuestos a contaminantes ambientales (45). A través de esta técnica, en esta investigación se demostró que los GB de los individuos fumadores poseen un elevado grado de daño oxidativo del ADN y que diferentes tratamientos de antioxidantes, tales como la vit C, el Zn y su combinación pueden reducir la lesión oxidativa. Además, la técnica de fragilidad osmótica permitió evaluar la permeabilidad de la membrana plasmática al ser sometida a diferentes concentraciones de cloruro de sodio, no evidenciando cambios en comparación a los individuos controles.

En cuanto al ensayo cometa, en este estudio se evidenció una mayor longitud de las colas de los cometas en los GB de los individuos fumadores en comparación con el grupo control (Figura 7). Estos resultados sugieren que el HC ejerce un efecto genotóxico en los GB de los individuos expuestos. Se ha formulado la hipótesis de que la mayor fragmentación del ADN, inducida por el tabaquismo, podría deberse, tanto a las oxidantes presentes en el HC como a la activación de células fagocíticas que generan ROS (46). Múltiples mutágenos o carcinógenos se han encontrado en el HC, tales como nitrosaminas,

hidrocarburos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas, fenoles, metales pesados y aldehídos. Muchos de estos compuestos carcinógenos necesitan de una activación metabólica antes de unirse al ADN, que generan diversas modificaciones en su estructura. Además, el HC contiene RL, la principal especie reactiva es el complejo quinona-hidroxiquinona. Este complejo radical libre genera  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  y  $\cdot OH$  durante ciclos redox. El  $\cdot OH$  es el responsable de mediar la oxidación sitio específico del ADN (47,48). Por otro lado, el HC induce una reacción inflamatoria en el epitelio con la presencia de grandes concentraciones de leucocitos activados. Estas células producen una explosión de ROS y ácido hipocloroso, a través de la expresión de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa y mieloperoxidasa, respectivamente. En este proceso inflamatorio también se generan abundantes RL como es el  $O_2^{\cdot-}$ , los cuales atacan continuamente al ADN (49). Las alteraciones que se pueden inducir en esta macromolécula incluyen: modificación química de las bases y los azúcares, pérdida de bases, ruptura de las cadenas y/o trastornos estructurales incluyendo aberraciones cromosómicas o pérdida parcial o total de determinados cromosomas (50).

El ensayo cometa permite evidenciar rompimientos de las hebras y sitios lábiles a la alcalinidad. Bajo las condiciones de esta técnica, los sitiosapurínicos y apirimidínicos son lábiles a la alcalinidad y son revelados por el rompimiento de las cadenas. Los sitiosapurínicos y apirimidínicos, y el rompimiento de las hebras son intermediarios durante el proceso de reparación por escisión de bases o de nucleótidos oxidados en el ADN (51). A mayor daño oxidativo del ADN, mayor será la fragmentación de las hebras y, por ende, el tamaño de los cometas. En los GB del grupo control fue evidente que al aumentar la concentración de  $H_2O_2$ , agente pro-oxidante, aumentó la migración del ADN, lo que permitió establecer la concentración de 0,06% de  $H_2O_2$  como control positivo del ensayo cometa, garantizando así que la migración observada se debe a daños oxidativos en el ADN (Figura 2).

Existe evidencia de que en individuos fumadores presentan un aumento en la 8-oxo-2'-desoxiguanosina(8-OHdG) en orina, el cual es un biomarcador de EO formado a partir de una lesión del daño oxidativo a los residuos de guanina en el ADN, debido a la deficiencia o pérdida de la actividad específica de la enzima glicosilasa, la cual conduce a un aumento apreciable en la tasa de mutación espontánea por el deterioro de la habilidad de las células en reparar al ADN, lo que indica el potencial mutagénico intrínseco de esta lesión al ADN (52). Aunque los leucocitos no son el objetivo directo de las carcinogénesis del cigarrillo, el 8-OHdG, es un aducto de ADN detectado en niveles elevados en los pulmones, leucocitos en sangre periférica y espermatozoides de los fumadores, los cuales se han usado para correlacionar el daño inducido por el tabaco en el cuerpo humano, así como también se han encontrado aumentos de estos niveles en fumadores pasivos expuestos al HC en su lugar de trabajo (53,54).

Trabajos previos han demostrado que los individuos fumadores, además de presentar un aumento en la producción de RL, presentan una disminución de las defensas antioxidantes enzimáticas tales como SOD, GPX, CAT y no enzimáticas como la glutatión, vitaminas C, A y E y oligoelementos Zn, Mg y Fe (55). La elevada producción de oxidantes asociados con el cigarrillo puede exceder la capacidad de neutralización de las defensas antioxidantes, resultando en el daño oxidativo de las macromoléculas (56). En este estudio es probable que los individuos fumadores igualmente presentaran una disminución de las defensas antioxidantes, lo que genera mayor daño oxidativo y una mayor susceptibilidad a la fragmentación del ADN inducido por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 7). Ésto podría estar sustentado, por el hecho de que el ADN de los GB de los individuos fumadores tratados con los distintos antioxidantes redujo significativamente el daño oxidativo y la mayor susceptibilidad por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 8).

En los GB de los fumadores, el suplemento con vit C aumentó los C0 y minimizó el número de C1 a valores similares a los controles, los C2 no presentaron

cambios y en los GB expuestos in vitro a  $H_2O_2$ , aumentaron los C0 a valores similares a los controles, los C1 y C2 permanecieron iguales a los fumadores sin tratamiento y desaparecieron los C3 (Figura 4). Tanto en los GB expuestos o no a  $H_2O_2$  se evidenció un efecto protector hacia la integridad del ADN.

En las células no expuestas al agente estresante aumentó el número de células con ADN íntegro, pero aún permanecieron los cometas de mayor magnitud detectados (C2) en los fumadores. En las células expuestas a  $H_2O_2$ , igualmente aumentaron las células con ADN intacto y desaparecieron los cometas de mayor magnitud, pero se mantuvieron los cometas con daños significativos en el ADN como son los C2. El mecanismo molecular de acción de esta vitamina la sitúa en un nivel antioxidante de alta jerarquía, porque a diferencia de otros antioxidantes que sólo están en capacidad de donar un sólo electrón, la vit C puede donar 2 electrones desde un doble enlace entre los carbonos de las posiciones 2 y 3 (Anexo 3); esta donación es secuencial, la primera especie química que se genera por la pérdida del primer electrón es el radical ascorbil, cuando se pierde el segundo electrón se forma el ácido dehidroascorbato, altamente inestable y se hidroliza con gran facilidad para producir el ácido 2,3-dicetogulonato, que posteriormente se degrada por descarboxilación, con la consiguiente pérdida del valor nutricional de la vit C (Anexo 4); de esta manera este antioxidante barre rápidamente las ERO, para evitar la oxidación biológica y reducir significativamente el EO (19,57,58).

En fumadores se ha asociado un bajo nivel de vit C correspondiente al aumento del EO, a causa de que los oxidantes en el HC aceleran el recambio metabólico de la vit C, de tal modo agotan las reservas corporales de este potente antioxidante y anticancerígeno en los fumadores activos (59). En otros estudios, el suplemento con vit C durante un período de 15 días, aumentó la actividad de las enzimas antioxidantes tales como SOD y CAT, y disminuyó los niveles de

las TBARS en los hematíes y plasma sanguíneo, así como el daño oxidativo del ADN en linfocitos de fumadores (35,60).

En cuanto al tratamiento con Zn, los GB no expuestos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentaron un aumento de los C0 y disminución de los C2, sin modificación de los C1, y en los GB expuestos *in vitro* a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, incrementaron los C0 y C1, disminuyeron los C2 todos a valores similares a los controles y desaparecieron los C3 (Figura 5). Este oligoelemento logró aumentar el número de células con ADN intacto, tanto en los GB expuestos o no a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, además logró disminuir los cometas de mayor magnitud en las células no expuestas al prooxidante y en el caso de las expuestas, la protección de la integridad del ADN fue tal que los tipos de cometas detectados fueron similares en los controles. Este tratamiento obtuvo una mayor protección contra la lesión oxidativa del ADN en comparación con la vit C. Este elemento, además de ser un antioxidante, desempeña múltiples funciones relacionados con el mantenimiento de la integridad del ADN, es un componente estructural de las histonas (proteínas íntimamente involucradas con el ADN), de las polimerasas del ADN y del ácido ribonucleico, y de las proteínas que participan en los mecanismos de reparación del ADN tal como la p53 y endonucleasa de sitiosapurínicos (APE) (61).

En diversas líneas celulares se ha demostrado que la deficiencia de Zn genera p53 y APE disfuncional; por lo tanto, la reparación del ADN está comprometida y la adicción del Zn restaura sus funciones, reanudando los mecanismos de reparación del ADN (62). Trabajos previos, han evidenciado que la insuficiencia marginal de Zn en diferentes tejidos de ratas y en GB de individuos aparentemente sanos puede alterar las defensas antioxidantes y comprometer las vías de señalización de reparación del ADN, lo que convierte a la célula altamente susceptible al daño oxidativo del ADN y al desarrollo de cáncer, esta alteración puede ser revertida con suplementos de Zn (63,64). En cuanto a los individuos fumadores existe evidencia de que presentan bajos niveles de Zn, a

los individuos de este estudio no se les determinaron los niveles de este metal, pero puede ser que presentaran una disminución que favoreciera el daño oxidativo del ADN en los GB, porque el tratamiento pudo revertir de manera muy significativa el daño del ADN y la susceptibilidad ante un agente prooxidante (64).

El tratamiento combinado (vit C/ Zn), en los GB no expuestos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementó los C0, los C1 no se modificaron y los C2 desaparecieron, y en los GB expuestos *in vitro* a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, los resultados fueron similares a los cometas obtenidos por el tratamiento con Zn (Figura 6). El tratamiento resultó con la mayor protección en cuanto a las células no expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ya que logró desaparecer los cometas de mayor magnitud (C2) y aumentar los cometas con ADN intacto (C0). El tratamiento con Zn únicamente disminuyó a los C2, pero el combinado los desapareció. Es de esperarse que el tratamiento combinado resultara con el mayor efecto protector, debido a que estos individuos recibieron vit C y Zn, ambos antioxidantes y además el Zn participa en los mecanismos de reparación del ADN.

Los distintos tratamientos antioxidantes ejercieron protección contra la lesión oxidativa del ADN, logrando proteger al ADN en las células no expuestas al agente prooxidante, resultando el tratamiento más óptimo el combinado, sin embargo este efecto antioxidante no logro alcanzar valores similares a los controles; es decir ayudo a limitar el EO pero no fue suficiente para prevenir el daño producido por el HC. Otros estudios han demostrado en fumadores deficiencias de otras macromoléculas, tales como Cu, Se o vit E y folatos que tienen función antioxidante y protectora de la integridad del ADN, aparte de otros factores los cuales podrían estar interfiriendo con el proceso de reparación del ADN (25,64,65).

Las deficiencias de nutrientes en los fumadores han sido implicadas en una gran

variedad de enfermedades crónicas que incluyen los distintos tipos de cánceres encontrados en los fumadores. Se infiere que los individuos fumadores necesiten cocteles de vitaminas y minerales (no por separado) que ayuden a aumentar las defensas y los procesos de reparación del ADN de estas personas, ya que la complejidad del tabaco produce confusiones referentes a los mecanismos por los cuales el HC produce cáncer. Estudios sugieren que más de un año sin fumar es necesario para alcanzar concentraciones plasmáticas similares a las personas que no fuman, pero muy pocos autores han considerado el estado antioxidante de los fumadores (66,67). En este estudio, los efectos de la suplementación de vit C, Zn y combinados, fue investigado en 20 personas fumadoras por cada grupo, los cuales cumplieron tratamiento por 3 semanas continuas y se logró una protección a la integridad del ADN pero no igual a los individuos sanos. Se recomienda realizar estudios con distintos tiempos de exposición por períodos más largos con estos antioxidantes y con otros, en cocteles que generan mayor protección para evaluar el efecto antioxidante y garantizar una mayor protección contra la lesión oxidativa del ADN. Se requieren también estudios adicionales que descarten o confirmen la eficiencia de los antioxidantes para prevenir o aminorar los daños producidos a la respuesta inmune y a los GB de los fumadores los cuales se ven muy afectados por esta situación.

La alteración de forma individual o colectiva en la función de cualquiera de las macromoléculas, proteínas (moléculas ejecutoras de una infinidad de funciones celulares), lípidos (esenciales para el mantenimiento de la viabilidad celular) y los ácidos nucleicos (portadoras de la información de todas estas funciones), son suficientes para inducir trastornos importantes en la función de los sistemas biológicos (68).

Por lo general, los fumadores en promedio presentan disminución del recuento en el número de células blancas en sangre periférica, aproximadamente el 30%

más que en los no fumadores. Por lo general, los fumadores son más susceptibles a la infección bacteriana y viral que los no fumadores, debido a que los neutrófilos expresan receptores de nicotina en su superficie, esto porque la nicotina es uno de los mayores componentes del cigarrillo al que está expuesto el cuerpo humano, los cuales aumentan con su consumo. Se sugiere que produce desensibilización en lugar de potenciar la respuesta a otros estímulos inflamatorios y esto ocasiona que desmejore la capacidad del sistema inmunológico para contrarrestar los virus y las bacterias (69). Es por esto que, los efectos inmunológicos asociados con el cigarrillo presentan una gran variedad de alteraciones en las funciones del sistema inmune celular y humoral, éstas incluyen: disminución en el conteo de las células CD4<sup>+</sup> linfocitos, aumento en el conteo de las CD8<sup>+</sup> linfocitos, disminución del nivel de circulación de inmunoglobulinas, depresión de las respuestas de anticuerpos a ciertos antígenos, deprime la actividad fagocitaria y disminuye la liberación de citoquinas proinflamatorias (70).

En cuanto a la fragilidad osmótica de los eritrocitos, en este estudio los fumadores no presentaron ningún cambio en los valores de la FG con respecto a los controles, a pesar de que en estudios previos se han encontrado aumentos de la FG, estos resultados se mantuvieron dentro de los intervalos de referencia (Figura 9) (Tabla 1) (71). Experimentos *in vitro* han demostrado que, tanto los RL en la fase gaseosa como la sólida del cigarrillo son un blanco favorito de los lípidos de las membranas causando una reacción en cadena conocida como lipoperoxidación lipídica implicada en una serie de efectos nocivos, ya que causa la formación de carbonilos en el plasma humano (72,73), como consecuencia aumenta la rigidez de la membrana y la fragilidad osmótica, disminuye la deformabilidad celular, reduce la supervivencia de los eritrocitos y la fluidez de los lípidos (74).

Para finalizar, la exposición al HC es de gran preocupación por sus consecuencias a largo plazo, ya que aumenta el riesgo de enfermedades

inmunológicas y la morbilidad por el deterioro de las funciones normales del organismo. Esta situación es aún más preocupante, cuando la exposición se presenta en niños y por lo tanto, son incapaces de evitar la exposición (75). La susceptibilidad al daño oxidativo del ADN frente al hábito de fumar muestra una gran variación individual, posiblemente vinculados con las diferentes capacidades metabólicas, actividad de reparación, o de las defensas antioxidantes del cuerpo que están íntimamente relacionados con el estado nutricional, la edad y el sexo del individuo (76). Los resultados de este estudio sugieren que el suplemento de vit C y zinc son importantes para la salud, dado que son necesarios para el funcionamiento normal del sistema inmunitario y forman parte de los mecanismos de protección contra el daño producido por los RL. La simple suplementación con estos antioxidantes pueden ejercer una poderosa protección ante los procesos de la enfermedad asociadas con el HC, que implican ROS y el daño tisular de los leucocitos que son los que protegen al organismo, los cuales atacan las sustancias nocivas o extrañas para eliminarlas. Por lo antes ya expuesto, el presente trabajo beneficiará al público mediante una mejor comprensión de las causas del daño al ADN que padecen las personas que están expuestos al HC.

## **CONCLUSIONES**

Los glóbulos blancos de los fumadores presentaron mayor daño oxidativo al ADN.

Los glóbulos blancos de los fumadores evidenciaron mayor susceptibilidad del daño al ADN al ser expuestos a un agente prooxidante como el peróxido de hidrógeno.

El tratamiento con zinc y el combinado disminuyeron de manera muy similar la susceptibilidad al daño del ADN.

El mejor de los tratamientos fue el combinado de vitamina C/zinc, ya que este logró una mayor protección del ADN en las células no expuestas al agente estresante.

Los individuos fumadores para este trabajo, no mostraron cambios en la fragilidad osmótica de los eritrocitos.

## RECOMENDACIONES

Que los individuos fumadores dejen el hábito de fumar y de no ser así que tomen conciencia sobre las causas y consecuencias que podrían llegar a tener, porque el hábito tabáquico aumenta el riesgo de morir prematuramente y reduce notablemente la calidad de vida.

Tomar suplementos antioxidantes como la vitamina C y zinc, para retardar o prevenir la aparición de enfermedades relacionadas con el hábito de fumar.

Se propone la realización de trabajos posteriores donde se utilicen suplementos de vitamina C y zinc, en las concentraciones ya mencionadas en el presente trabajo por un periodo más largo de tiempo, para así evaluar el efecto protector de estos antioxidantes durante el daño oxidativo.

Continuar con los estudios de estrés oxidativo inducido por el humo del cigarro, no sólo en glóbulos blancos, sino también en pulmón, hígado, cerebro, para comprender los mecanismos bioquímicos afectados que puedan estar relacionados con la aparición de enfermedades degenerativas del sistema, y así poder aportar conocimientos científicos que puedan disminuir o retrasar la evolución de estas patologías.

Se recomienda implementar campañas educativas, además de fomentar programas en las áreas de salud para que impulsen eventos, charlas, entre otros, que permitan combatir este hábito mediante la concientización a los jóvenes sobre los daños que ocasiona el cigarrillo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. González, L. y Berger, K. 2002. Consumo de tabaco en adolescentes: factores de riesgo y factores protectores. Ciencia y Enfermería, 8: 136-140.
2. Betancourt, L. y Navarro, R. 2001. Tabaquismo: panorama general y perspectivas. Revista Mexicana de Cardiología, 12: 85-93.
3. Lofroth, G. 2003. Environmental tobacco smoke: overview of chemical composition and genotoxic components. Mutation Research, 222: 73-80.
4. Pernas, A. 1998. Efectos sobre la salud de la exposición crónica al humo del tabaco en fumadores y no fumadores. Revista Cubana de Medicina General Integral, 14: 180-184.
5. Sierra, V.; Guzmán-Grenfell, A.; Olivares-Corichi, I.; Torres, R. y Hicks, G. 2004. Participación de las especies reactivas del oxígeno en las enfermedades pulmonares. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, 17: 135-148.
6. Kodama, M.; Kaneko, M.; Aida, M.; Inoua, F. y Nakajamat, T. 1997. Free radical chemistry of cigarette smoke and its implications in human cancer. Anticancer Research, 17: 433-437.
7. Ortiz, P.; Zinzato, Y.; Soares De Souza, M.; Braz, M. y Cunha, M. 2007. Evaluation of level of DNA damage in blood leukocytes of non-diabetic and diabetic rat exposed to cigarette smoke. Mutation Research, 628: 1117-1122.
8. Prieto, E. y Llopiz, N. 1999. Normalización de la electroforesis de células individuales (ensayo cometa). Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 18: 34-36.
9. Singh, N.; Mc Coy, M.; Tice, R. y Schneider, E. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individuals cells. Experimental Cell Research, 175: 184-191.

10. Asgary, G.; Naderi, A. y Ghannady, G. 2005. Effects of cigarette smoke, nicotine and cotinine on red blood cell hemolysis and their -SH capacity. Experimental Clinical Cardiology, 10: 116-119.
11. Esterbauer, H.; Schaur, R. y Zollner, H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radical Biology and Medicine, 11: 81-128.
12. Harats, D.; Ben-Naim, M. y Dabach, Y. 1990. Effect of vitamin C and E supplementation on susceptibility of plasma lipoproteins to peroxidation induce by acute smoking. Atherosclerosis, 85: 47-54.
13. Collins, A. 1999. Oxidative DNA damage, antioxidants and cancer. Bio Essays, 21: 238-246.
14. Benítez, D. 2006. Vitaminas y oxidorreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 25: 2-8.
15. Vargas, M.; Martínez, N.; Bravo, A.; Bohórquez, L.; Araujo, S.; Souki, A.; Paz, P.; Fernández, A. y Ferrer, D. 2007. Influencia del hábito de fumar sobre las concentraciones séricas de zinc, cobre y selenio en adultos jóvenes. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica, 26: 140-145.
16. Giraud, D.; Martin, H. y Driskell, J. 1995. Plasma and dietary vitamin C and E levels of tobacco chewers, smokers, and non users. Journal of American Diet Association, 95: 798-800.
17. Schewedhelm, E.; Mosa, I.; Troost, R y Boger, R. 2003. Pharmacokinetics clinical of antioxidants and their impact on systemic oxidative stress. Pharmacokinetics Clinical, 45: 437-459.
18. Byrd, J.; Schectman, G.; y Hoffman, R. 1991. Ascorbic acid requeriments for smokers: analysis of population survey. American Journal Clinical of Nutrition, 53: 1466-1470.
19. Serra, H. y Cafaro, T. 2007. Ácido ascórbico desde la química hasta su crucial función protectora en el ojo. Acta Bioquímica Clínica

Latinoamericana, 41: 525-532.

20. García, G.; Cobos, C.; Rey, C.; Mejía, O.; Casariego, C.; Clavijo, D.; García, A. y Hernández, S. 2006. Biología, patología y bioclínica de la actividad de oxidorreducción de la vitamina C en la especie humana. Universitas Médica, 47: 349-363.
21. Carrasco, B.; Cordero, M. y Fernández, E. 2003. Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. Revista de Ciencias Médicas La Habana, 9: 13-28.
22. Liu, C.; Chen, H.; Lii, C.; Chen, S. y Wei, Y. 1998. Alterations of small-molecular-weight antioxidants in the blood of smokers. Chemistry Biological Interaction, 116: 43-54.
23. Kim, S.; Kim, J.; Shin, H. y Keen, C. 2003. Influencia del hábito de fumar en los marcadores de estrés oxidativo y las concentraciones séricas de minerales en las niñas adolescentes en Corea. Nutrición, 19: 240-243.
24. Wie, W.; Kinm, Y. y Boudreau, S. 2001. Association of smoking with serum and dietary levels of antioxidants in adults. American Journal of Public Health, 91: 258-264.
25. Bashar, S. y Mitra, A. 2004. Effect of smoking on vitamin A, vitamin E, and other trace elements in patients with cardiovascular disease in Bangladesh: a cross-sectional study. The Journal of Nutrition, 3: 18.
26. Rudolf, E.; Peychl, J.; Radocha, J. y Cervinka, M. 2001. Zinc and its role in the regulation of cell death. Ceska Fysiolygy, 50: 201-210.
27. Oteiza, P. y Mackenzie, G. 2005. Zinc, oxidant-triggered cell signaling, and human health. Moleculares Aspectos Médicos, 26: 245-255.
28. Cámara, F. y Amaro, M. 2003. Nutritional aspect of zinc availability. International Journal of Food Sciences & Nutrition, 54:143-151.
29. Powell, S. 2000. The antioxidant properties of zinc. The Journal of Nutrition, 130: 1447S-1454S.
30. Glen, A. 2000. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative

- stress and metal ions. Biochemical Pharmacology, 59: 95-104.
31. Szuster-Ciesielska, A.; Stachura, A.; Slotwinska, M.; Kaminska, T.; Paduch, R. y Filar, J. 2000. The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. Toxicology, 145: 159-171.
  32. Uz, E.; Sahin, S.; Ibrahim, F.; Hepsen, A.; Sogut, S. y Akyol, O. 2003. The relationship between serum trace element changes and visual function in heavy smokers. Acta Ophthalmologica Scandinavica, 81: 161-164.
  33. Brzóska, M. y Moniuszko-Jakoniuk, J. 2001. Interactions between cadmium and zinc in the organism. Food Chemical Toxicology, 39: 967-980.
  34. Claverie, C.; Corbella, R.; Martín, D. y Díaz, C. 2002. Protective effects of zinc on cadmium toxicity in rodents. Biological Trace Element Research, 75: 1-9.
  35. Candan, F.; Gültekin, F. y Candan, F. 2001. Effect of vitamin C and zinc on osmotic fragility and lipid peroxidation in zinc-deficient haemodialysis patients. Cell Biochemistry and Function, 20: 95-98.
  36. Jemai, H.; Messaoudi, I.; Chaouch, A. y Kerkeni, A. 2007. Protective effect of zinc supplementation on blood antioxidant defense system in rats exposed to cadmium. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 21: 269-273.
  37. Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2000. Bioética. Principios éticos para las investigaciones en seres humanos. Publicación Científica. OPS-OMS. 407-420.
  38. Velásquez, M.; Vargas, A. y Betancourt, J. 2001. Fisiología práctica. Imprenta de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre. Venezuela.
  39. Patton, W.; Chakravarthy, U.; Davies, J. y Archer, D. 1999. Comet assay of uv-induced DNA damage in retinal pigment epithelial cells. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 40: 3268-3275.
  40. Wilson, J.; Pascoe, P.; Parry, J. y Dixon, D. 1998. Evaluating of the comet assay as a method for detection of DNA damage in the cells of marine

- invertebrate *Mytilus edulis* (Mollusca: Pelecypoda). Mutation Research, 399: 87-95.
41. Mackenzie, B. 1991. Hematología clínica. Segunda edición. Editorial manual moderno. México, DF. México.
  42. Tapia, F. 1994. GraphPad InStat Software. V2. 05<sup>a</sup>.
  43. Bolet, M. y Socarrás, M. 2003. Algunas reflexiones sobre el tabaquismo como factor de riesgo para diferentes enfermedades. Revista Cubana Medicina General Integral, 14:19.
  44. Toorns, M.; Slebos, D. y Bruin, H. 2007. Cigarette smoke-induced blockade of the mitochondrial respiratory chain switches lung epithelial cell apoptosis into necrosis. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology, 292: L1211-L1218.
  45. Hoffmann, H.; Hogel, J. y Speit, Gunter. 2005. The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: a meta-analysis. Mutagenesis, 20: 455-466.
  46. Uma, C. 2000. Erythrocyte lipid peroxidation and antioxidants in cigarette smokers. Cell Biochemistry and Function, 18: 99-102.
  47. Isner, C.; Hoffmann, H.; Hogel, J. y Speit, Gunter. 2005. Genetic polymorphisms and the effect of smoking on DNA effects in the comet assay. Mutagenesis, 20: 359-364.
  48. Hecht, S. 1999. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. Journal National Cancer Institute, 91: 1194-1210.
  49. Pryor, W. 1997. Cigarette smoke radicals and the role of free radicals in chemical carcinogenicity. Environmental Health Perspective, 105: 875-882.
  50. Cooke, M.; Evans, M.; Dizdaroglu, M. y Lunec, J. 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 17: 1195-1214.
  51. Collins, A.; Duthie, S. y Dobson, V. 1993. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. Carcinogenesis, 14: 1733-1735.

52. Frankenberg-Schwager, M. 1999. Repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation. Radiotherapy Oncology, 14: 307-320.
53. Tang, D.; Phillips, D.; Stampfer, M.; Mooney, L.; Hsu, Y.; Cho, S.; Tsai, W.; Ma, J.; Cole, K.; She, M. y Perera, F. 2001. Association between carcinogen-DNA adducts in white blood cells and lung cancer risk in the physicians health study. Cancer Research, 61: 6708-6712.
54. Howard, D.; Ota, R.; Briggs, L.; Hampton, M. y Pritsos, C. 1998. Environmental tobacco smoke in the workplace induces oxidative stress in employees, including increased production of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine. Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention, 7: 141-146.
55. Northrop-Clewes, C. y Thurnham, D. 2007. Monitoring micronutrients in cigarette smokers. Clinica Chimica Acta, 377: 14-38.
56. Kiyosawa, H.; Suko, M.; Okudaira, H.; Murata, K.; Miyamoto, T.; Chung, M.; Kasai, H. y Nishimura, S. 2002. Cigarette smoking induces formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, one of the oxidative DNA damages in human peripheral leukocytes. Free Radic Research Community, 11: 23-7.
57. Fain, O. 2004. Vitamin C deficiency. Revista Médica Internacional, 25: 872-880.
58. García, Z. 2002. El envejecimiento y el estrés oxidativo. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 21: 14-20.
59. Tribble, D.; Giuliano, L. y Fortmann S. 1997. Reduced plasma ascorbic acid concentrations in nonsmokers regularly exposed to environmental tobacco smoke. American Journal Clinical of Nutrition, 58: 886-890.
60. Duthie, S.; Aiguo, M.; Ross, M. y Collins, A. 1996. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human. Cancer Research, 56: 1291-1295.
61. Acosta, E.; Galdona, E.; Barón, M.; Páez, M.; Velásquez, E. y Solano, L. 2010. Zinc y cobre séricos y la relación zinc/cobre en un grupo de niños del

- sur de Valencia, Venezuela. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 44: 25-31.
62. Hainaut, M. 2001. Zinc binding and redox control of p53 structure and function. Antioxidant & Redox Signaling, 3: 611-623.
63. Ho, E. y Ames, B. 2002. Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NFκB, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line. The National Academy of Sciences Cell Biology, 99: 16770-16775.
64. Song, Y.; Chung, C.; Bruno, R.; Traber, M.; Brown, K.; King, J. y Ho, E. 2009. Dietary zinc restriction and repletion affects DNA integrity in healthy men. American Journal of Clinical Nutrition, 90: 321-328.
65. Kocycit, A.; Erel, O. y Gur, S. 2001. Effects of tobacco smoking on plasma selenium, zinc, copper, iron concentrations and related antioxidative enzyme activity. The Clinical Biochemistry, 34: 629-633.
66. Federico, A.; Iodice, P.; Federico, P.; Del Rio, A.; Mellone, M.; Catalano, G. y Federico, P. 2001. Effects of selenium and zinc supplementation on nutritional status in patients with cancer of digestive tract. European Journal of Clinical Nutrition, 55: 293-297.
67. Prieme, H.; Lykkesfeldt, J.; Steffen, L. y Poulsen, H. 1996. Effect of smoking cessation on plasma ascorbic acid concentration. British Medical Journal, 313: 91.
68. Maritim, R.; Sanders, A. y Watkins, J. 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. Journal Biochemical Molecular Toxicology, 117: 24-38.
69. Stampfli, M. y Anderson, G. 2009. ¿How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. National Revist Immunology, 9: 377-384.
70. Arcavi, Lidia. y Benowitz, M. 2004. Cigarette Smoking and Infection. Archives Internal Medicine, 164: 2206-2216.
71. Srour, B.; Juma, M. y Irhimeh, M. 2000. Exposure of human erythrocytes

to oxygen radicals causes loss of deformability, increased osmotic fragility, lipid peroxidation and protein degradation. Clinical Hemorheology Microcirculation, 23: 13-21.

72. Frei, B.; Forte, T.; Ames, B. y Cross, C. 1991. Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma. Biochemical Journal, 277: 133-138.
73. Minamisawa, E. y Oikawa, S. 1993. Membrane damage from lipid oxidation induced by free radicals and cigarette smoke. Annals of the New York Academy of Sciences, 686: 29-38.
74. Arivazhagan, S.; Kavitha, K. y Nagini, S. 1997. Erythrocyte lipid peroxidation and antioxidants in gastric cancer patients. Cell Biochemistry and Function, 15: 15-18.
75. Preston, A.; Rodriguez, C.; Rivera, C. y Sahai, H. 2003. Influence of environmental tobacco smoke on vitamin C status in children. American Journal of Clinical Nutrition, 77: 167-172.
76. Witergerst, E.; Maggini, S. y Horning, D. 2006. Immune-enhancing role of vitamin C and zinc and effect on clinical conditions. Nutrition Metabolism, 50: 85-94.

## APÉNDICES

APÉNDICE 1. Resumen estadístico del análisis no paramétrico Kruskal-Wallis para los cometas 0 presentes en glóbulos blancos de individuos sanos, expuestos a concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno.

Parámetros	C0 0,00% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C0 0,06% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C0 0,12% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Media	17,37	5,95	1,21
Desviación estándar	3,47	3,06	0,79
Mediana	19,00	5,00	1,00
Mínimo	10,00	2,00	0,00
Máximo	20,00	10,00	2,00
Rango promedio	47,68	28,68	10,63
Kruskal-Wallis			*48,21

\*: Igual para todas las concentraciones de peróxido de hidrógeno.

APÉNDICE 2. Resumen estadístico del análisis no paramétrico Kruskal-Wallis para los cometas 1 presentes en glóbulos blancos de individuos sanos, expuestos a concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno.

Parámetros	C1 0,00% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C1 0,06% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C1 0,12% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Media	2,63	12,32	11,16
Desviación estándar	1,54	3,96	3,30
Mediana	2,00	14,00	12,00
Mínimo	0,00	5,00	5,00
Máximo	5,00	19,00	16,00
Rango promedio	10,24	40,29	36,47
Kruskal-Wallis			*37,42

\*: Igual para todas las concentraciones de peróxido de hidrógeno.

APÉNDICE 3. Resumen estadístico del análisis no paramétrico Kruskal-Wallis para los cometas 2 presentes en glóbulos blancos de individuos sanos, expuestos a concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno.

Parámetros	C2 0,00% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C2 0,06% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C2 0,12% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Media	0,00	1,84	5,79
Desviación estándar	0,00	1,30	2,74
Mediana	0,00	2,00	6,00
Mínimo	0,00	0,00	1,00
Máximo	0,00	4,00	11,00
Rango promedio	0,00	40,29	36,47
Mann-Whitney U			*44,00

\*: Igual para las concentraciones de 0,06% y 0,12% de peróxido de hidrógeno.

APÉNDICE 4. Resumen estadístico del análisis no paramétrico Kruskal-Wallis para los cometas 3 presentes en glóbulos blancos de individuos sanos, expuestos a concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno.

Parámetros	C3 0,00% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C3 0,06% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C3 0,12% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Media	0,00	0,16	1,95
Desviación estándar	0,00	0,37	1,22
Mediana	0,00	0,00	2,00
Mínimo	0,00	0,00	0,00
Máximo	0,00	1,00	4,00
Rango promedio	0,00	22,97	44,53
Mann-Whitney U			*36,19

\*: Igual para las concentraciones de 0,06% y 0,12% peróxido de hidrógeno.

APÉNDICE 5. Resumen estadístico del análisis no paramétrico Kruskal-Wallis para los cometas 4 presentes en glóbulos blancos de individuos sanos, expuestos a concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno.

Parámetros	C4 0,00% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C4 0,06% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C4 0,12% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Media	0,00	0,00	0,42
Desviación estándar	0,00	0,00	0,51
Mediana	0,00	0,00	0,00
Mínimo	0,00	0,00	0,00
Máximo	0,00	0,00	1,00
Rango promedio	0,00	0,00	37,00

APÉNDICE 6. Resumen estadístico de la prueba de comparación múltiple para los tipos y números de cometas presentes en glóbulos blancos de individuos sanos, expuestos a concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno.

Comparación	Tamaño muestral	Diferencia del rango promedio	Valor de p
C0 0,00% vs. C0 0,06%	30	19,00	** p<0,01
C0 0,00% vs. C0 0,12%	30	37,05	*** p<0,001
C0 0,06% vs. C0 0,12%	30	18,05	** p<0,01
C1 0,00% vs. C1 0,06%	30	-30,05	*** p<0,001
C1 0,00% vs. C1 0,12%	30	-26,24	*** p<0,001
C1 0,06% vs. C1 0,12%	30	3,82	ns p>0,05
C2 0,06% vs. C2 0,12%	30	-16,66	** p<0,01
C3 0,06% vs. C3 0,12%	30	-21,55	*** p<0,001

\*\* p<0,01: muy significativo; \*\*\* p<0,001: extremadamente significativo; ns p>0,05: no significativo.

APÉNDICE 7. Resumen estadístico del análisis no paramétrico Mann-Whitney U para los cometas 0 presentes en glóbulos blancos de individuos fumadores, expuestos o no a peróxido de hidrógeno.

Parámetros	C0 0,00% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C0 0,06% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Media	0,60	0,30
Desviación estándar	0,50	0,47
Mediana	1,00	0,00
Mínimo	0,00	0,00
Máximo	1,00	1,00
Suma de rangos	1050,00	780,00

APÉNDICE 8. Resumen estadístico del análisis no paramétrico Mann-Whitney U para los cometas 1 presentes en glóbulos blancos de individuos fumadores, expuestos o no a peróxido de hidrógeno.

Parámetros	C1 0,00% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C1 0,06% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Media	9,67	6,13
Desviación estándar	3,69	2,96
Mediana	10,00	5,50
Mínimo	3,00	3,00
Máximo	15,00	11,00
Suma de rangos	1159,00	671,00

APÉNDICE 9. Resumen estadístico del análisis no paramétrico Mann-Whitney U para los cometas 2 presentes en glóbulos blancos de individuos fumadores, expuestos o no a peróxido de hidrógeno.

Parámetros	C2 0,00% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C2 0,06% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Media	9,73	13,23
Desviación estándar	3,46	3,78
Mediana	10,00	14,00
Mínimo	3,00	6,00
Máximo	18,00	20,00
Suma de rangos	710,50	1120,00

APÉNDICE 10. Resumen estadístico del análisis no paramétrico Mann-Whitney U para los cometas 3 presentes en glóbulos blancos de individuos fumadores, expuestos o no a peróxido de hidrógeno.

Parámetros	C3 0,00% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C3 0,06% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Media	0,00	0,33
Desviación estándar	0,00	0,48
Mediana	0,00	0,00
Mínimo	0,00	0,00
Máximo	0,00	1,00
Rango promedio	0,00	62,00

APÉNDICE 11. Resumen estadístico de la prueba Mann-Whitney U para los tipos y números de cometas presentes en glóbulos blancos de individuos fumadores, expuestos o no a peróxido de hidrógeno.

Comparación	Tamaño muestral	Valor de MWU
C0 0,00% vs. C0 0,06%	30	315,00
C1 0,00% vs. C1 0,06%	30	206,00
C2 0,00% vs. C2 0,06%	30	245,50

APÉNDICE 12. Resumen estadístico de la prueba de comparaciones múltiples para los tipos y números de cometas presentes en glóbulos blancos de individuos fumadores, expuestos o no a peróxido de hidrógeno.

Comparación	Tamaño muestral	Diferencia del rango promedio	Valor de p
C0 0,00% vs. C1 0,00%	20	-104,77	*** p<0,001
C0 0,00% vs. C2 0,00%	20	-103,07	*** p<0,001
C0 0,06% vs. C1 0,06%	20	-91,82	*** p<0,001
C0 0,06% vs. C2 0,06%	20	-146,35	*** p<0,001
C0 0,06% vs. C3 0,06%	20	2,00	ns p>0,05
C1 0,00% vs. C2 0,00%	20	1,70	ns p>0,05
C1 0,06% vs. C2 0,06%	20	-54,53	ns p>0,05
C1 0,06% vs. C3 0,12%	20	89,82	*** p<0,001
C2 0,06% vs. C3 0,06%	20	144,35	*** p<0,001

\*\*\* p<0,001: extremadamente significativo; ns p>0,05: no significativo.

APÉNDICE 13. Resumen estadístico del análisis no paramétrico Mann-Whitney U para los cometas 0 presentes en glóbulos blancos de individuos fumadores con tratamiento antioxidante de vitamina C, expuestos o no a peróxido de hidrógeno.

Parámetros	C0 0,00% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C0 0,06% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Media	11,70	11,60
Desviación estándar	3,65	3,72
Mediana	10,00	10,00
Mínimo	10,00	9,00
Máximo	20,00	20,00
Suma de rangos	109,00	101,00

APÉNDICE 14. Resumen estadístico del análisis no paramétrico Mann-Whitney U para los cometas 1 presentes en glóbulos blancos de individuos fumadores con tratamiento antioxidante de vitamina C, expuestos o no a peróxido de hidrógeno.

Parámetros	C1 0,00% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C1 0,06% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Media	2,30	2,40
Desviación estándar	0,95	0,97
Mediana	2,50	2,50
Mínimo	0,00	1,00
Máximo	3,00	4,00
Suma de rangos	104,00	106,00

APÉNDICE 15. Resumen estadístico del análisis no paramétrico Mann-Whitney U para los C2 presentes en glóbulos blancos de individuos fumadores con tratamiento antioxidante de vitamina C, expuestos o no a peróxido de hidrógeno.

Parámetros	C2 0,00% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C2 0,06% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Media	6,00	7,50
Desviación estándar	2,11	2,64
Mediana	5,00	7,50
Mínimo	5,00	5,00
Máximo	10,00	10,00
Rango promedio	90,00	120,00

APÉNDICE 16. Resumen estadístico de la prueba Mann-Whitney U para los tipos y números de cometas presentes en glóbulos blancos de individuos fumadores con tratamiento antioxidante de vitamina C, expuestos o no a peróxido de hidrógeno.

Comparación	Tamaño muestral	Valor de MWU
C0 0,00% vs. C0 0,06%	30	46,00
C1 0,00% vs. C1 0,06%	30	49,00
C2 0,00% vs. C2 0,06%	30	35,00

APÉNDICE 17. Resumen estadístico de la prueba de comparación múltiple para los tipos y números de cometas presentes en glóbulos blancos de individuos fumadores con tratamiento antioxidante de vitamina C, expuestos o no a peróxido de hidrógeno.

Comparación	Tamaño muestral	Diferencia del rango promedio	Valor de p
C0 0,00% vs. C1 0,00%	20	38,75	** p<0,01
C0 0,00% vs. C2 0,00%	20	17,40	ns p>0,05
C0 0,06% vs. C1 0,06%	20	36,35	* p<0,05
C0 0,06% vs. C2 0,06%	20	10,70	ns p>0,05
C1 0,00% vs. C2 0,00%	20	-21,35	ns p>0,05
C1 0,06% vs. C2 0,06%	20	-25,65	ns p>0,05

\*p>0,05: significativo; \*\* p<0,01: muy significativo; ns p>0,05: no significativo.

APÉNDICE 18. Resumen estadístico del análisis no paramétrico Mann-Whitney U para los cometas 0 presentes en glóbulos blancos de individuos fumadores con tratamiento antioxidante de Zinc, expuestos o no a peróxido de hidrógeno.

Parámetros	C0 0,00% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C0 0,06% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Media	8,90	8,00
Desviación estándar	0,99	2,58
Mediana	8,50	10,00
Mínimo	8,00	5,00
Máximo	10,00	10,00
Suma de rangos	107,00	103,00

APÉNDICE 19. Resumen estadístico del análisis no paramétrico Mann-Whitney U para los cometas 1 presentes en glóbulos blancos de individuos fumadores con tratamiento antioxidante de Zinc, expuestos o no a peróxido de hidrógeno.

Parámetros	C1 0,00% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C1 0,06% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Media	8,10	8,70
Desviación estándar	2,73	0,95
Mediana	10,00	8,00
Mínimo	3,00	8,00
Máximo	10,00	10,00
Suma de rangos	109,00	101,00

APÉNDICE 20. Resumen estadístico del análisis no paramétrico Mann-Whitney U para los cometas 2 presentes en glóbulos blancos de individuos fumadores con tratamiento antioxidante de Zinc, expuestos o no a peróxido de hidrógeno.

Parámetros	C2 0,00% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C2 0,06% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Media	3,00	3,30
Desviación estándar	1,41	1,25
Mediana	2,00	3,00
Mínimo	2,00	2,00
Máximo	5,00	5,00
Rango promedio	94,50	115,50

APÉNDICE 21. Resumen estadístico de la prueba Mann-Whitney U para los tipos y números de cometas presentes en glóbulos blancos de individuos fumadores con tratamiento antioxidante de Zinc, expuestos o no a peróxido de hidrógeno.

Comparación	Tamaño muestral	Valor de MWU
C0 0,00% vs. C0 0,06%	30	48,00
C1 0,00% vs. C1 0,06%	30	46,00
C2 0,00% vs. C2 0,06%	30	39,50

APÉNDICE 22. Resumen estadístico de la prueba de comparación múltiple para los tipos y números de cometas presentes en glóbulos blancos de individuos fumadores con tratamiento antioxidante de Zinc, expuestos o no a peróxido de hidrógeno.

Comparación	Tamaño muestral	Diferencia del rango promedio	Valor de p
C0 0,00% vs. C1 0,00%	20	1,70	ns p>0,05
C0 0,00% vs. C2 0,00%	20	30,50	ns p>0,05
C0 0,06% vs. C1 0,06%	20	-0,25	ns p>0,05
C0 0,06% vs. C2 0,06%	20	26,25	ns p>0,05
C1 0,00% vs. C2 0,00%	20	28,80	ns p>0,05
C1 0,06% vs. C2 0,06%	20	26,50	ns p>0,05

ns p>0,05: no significativo.

APÉNDICE 23. Resumen estadístico del análisis no paramétrico Mann-Whitney U para los cometas 0 presentes en glóbulos blancos de individuos fumadores con tratamiento antioxidante de vitamina C/ Zinc, expuestos o no a peróxido de hidrógeno.

Parámetros	C0 0,00% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C0 0,06% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Media	5,00	2,10
Desviación estándar	0,47	0,57
Mediana	5,00	2,00
Mínimo	4,00	1,00
Máximo	6,00	3,00
Suma de rangos	155,00	55,00

APÉNDICE 24. Resumen estadístico del análisis no paramétrico Mann-Whitney U para los cometas 1 presentes en glóbulos blancos de individuos fumadores con tratamiento antioxidante de vitamina C/Zinc, expuestos o no a peróxido de hidrógeno.

Parámetros	C1 0,00% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C1 0,06% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Media	15,00	15,50
Desviación estándar	4,08	5,30
Mediana	15,00	17,00
Mínimo	10,00	5,00
Máximo	20,00	20,00
Suma de rangos	99,00	111,00

APÉNDICE 25. Resumen estadístico del análisis no paramétrico Mann-Whitney U para los cometas 2 presentes en glóbulos blancos de individuos fumadores con tratamiento antioxidante de vitamina C/Zinc, expuestos o no a peróxido de hidrógeno.

Parámetros	C2 0,00% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C2 0,06% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Media	0,00	2,40
Desviación estándar	0,00	0,84
Mediana	0,00	3,00
Mínimo	0,00	1,00
Máximo	0,00	3,00
Rango promedio	0,00	41,90

APÉNDICE 26. Resumen estadístico de la prueba de Mann-Whitney U para los tipos y números de cometas presentes en glóbulos blancos de individuos fumadores con tratamiento antioxidante de vitamina C/Zinc, expuestos o no a peróxido de hidrógeno.

Comparación	Tamaño muestral	Valor de MWU
C0 0,00% vs. C0 0,06%	30	0,00
C1 0,00% vs. C1 0,06%	30	44,00

APÉNDICE 27. Resumen estadístico de la prueba de comparación múltiple para los tipos y números de cometas presentes en glóbulos blancos de individuos fumadores con tratamiento antioxidante de vitamina C/Zinc, expuestos o no a peróxido de hidrógeno.

Comparación	Tamaño muestral	Diferencia del rango promedio	Valor de p
C0 0,00% vs. C1 0,00%	20	-13,90	ns p>0,05
C0 0,06% vs. C1 0,06%	20	-31,50	ns p>0,05
C0 0,06% vs. C2 0,06%	20	-2,80	ns p>0,05
C1 0,06% vs. C2 0,06%	20	28,70	ns p>0,05

ns p>0,05: no significativo.

APÉNDICE 28. Resumen estadístico de la prueba de comparaciones múltiples para los tipos y números de cometas presentes en los glóbulos blancos de los distintos grupos en estudio, a 0,00% de peróxido de hidrógeno.

Comparación	Tamaño muestral	Valor de Kruskal-Wallis	Diferencia del rango promedio	Valor de p
C0 Sa vs. C0 Fum	20	71,57	52,79	*** p<0,001
C0 Sa vs. C0 vit C	20	71,57	11,54	ns p>0,05
C0 Sa vs. C0 Zn	20	71,57	20,79	ns p>0,05
C0 Sa vs. C0 vit C/Zn	20	71,57	32,79	** p<0,01
C0 Fum vs. C0 vit C	20	71,57	-41,25	*** p<0,001
C0 Fum vs. C0 Zn	20	71,57	-32,00	** p<0,01
C0 Fum vs. C0 vit C/Zn	20	71,57	-20,00	ns p>0,05
C0 vit C vs. C0 Zn	20	71,57	9,25	ns p>0,05
C0 vit C vs. C0 vit C/Zn	20	71,57	21,25	ns p>0,05
C0 Zn vs. C0 vit C/Zn	20	71,57	12,00	ns p>0,05
C0 Fum vs. C0 vit C/Zn	20	71,57	-20,00	ns p>0,05
C0 vit C vs. C0 Zn	20	71,57	9,25	ns p>0,05
C1 Sa vs. C1 Fum	20	64,76	-37,10	*** p<0,001
C1 Sa vs. C1 vit C	20	64,76	1,51	ns p>0,05
C1 Sa vs. C1 Zn	20	64,76	-28,63	* p<0,05
C1 Sa vs. C1 vit C/Zn	20	64,76	-56,44	*** p<0,001
C1 Fum vs. C1 vit C	20	64,76	36,82	*** p<0,001
C1 Fum vs. C1 Zn	20	64,76	8,47	ns p>0,05
C1 Fum vs. C1 vit C/Zn	20	64,76	-19,33	ns p>0,05
C1 vit C vs. C1 Zn	20	64,76	-30,15	ns p>0,05
C1 vit C vs. C1 vit C/Zn	20	64,76	-57,95	*** p<0,001
C1 Zn vs. C1 vit C/Zn	20	64,76	-27,80	* p>0,05
C2 Fum vs. C2 vit C	20	23,93	11,78	ns p>0,05
C2 Fum vs. C2 Zn	20	23,93	24,63	*** p<0,001
C2 vit C vs. C2 Zn	20	23,93	12,85	ns p>0,05

Sa: sanos, Fum: fumadores; Vit C: fum+ vit C, Zn: fum+Zn, vit C/Zn: fum+ vit C/Zn, \* p<0,05: significativo; \*\* p<0,01: muy significativo; \*\*\* p<0,001: extremadamente significativo; ns p>0,05: no significativo.

APÉNDICE 29. Resumen estadístico de la prueba de comparaciones múltiples para los tipos y números de cometas presentes en glóbulos blancos de los distintos grupos en estudio, expuestos a 0,06% de peróxido de hidrógeno.

Comparación	Tamaño muestral	Valor de Kruskal-Wallis	Diferencia del rango promedio	Valor de p
C0 Sa vs. C0 Fum	20	67,93	37,96	*** p<0,001
C0 Sa vs. C0 vit C	20	67,93	-15,49	ns p>0,05
C0 Sa vs. C0 Zn	20	67,93	-7,59	ns p>0,05
C0 Sa vs. C0 vit C/Zn	20	67,93	16,71	ns p>0,05
C0 Fum vs. C0 vit C	20	67,93	-53,45	*** p<0,001
C0 Fum vs. C0 Zn	20	67,93	-45,55	*** p<0,001
C0 Fum vs. C0 vit C/Zn	20	67,93	-21,25	ns p>0,05
C0 vit C vs. C0 Zn	20	67,93	7,90	ns p>0,05
C0 vit C vs. C0 vit C/Zn	20	67,93	32,20	* p<0,05
C0 Zn vs. C0 vit C/Zn	20	67,93	24,30	ns p>0,05
C1 Sa vs. C1 Fum	20	46,83	26,23	*** p<0,001
C1 Sa vs. C1 vit C	20	46,83	47,73	*** p<0,001
C1 Sa vs. C1 Zn	20	46,83	13,08	ns p>0,05
C1 Sa vs. C1 vit C/Zn	20	46,83	-8,92	ns p>0,05
C1 Fum vs. C1 vit C	20	46,83	21,50	ns p>0,05
C1 Fum vs. C1 Zn	20	46,83	-13,15	ns p>0,05
C1 Fum vs. C1 vit C/Zn	20	46,83	-35,15	*** p<0,001
C1 vit C vs. C1 Zn	20	46,83	-34,65	** p<0,01
C1 vit C vs. C1 vit C/Zn	20	46,83	-56,65	*** p<0,001
C1 Zn vs. C1 vit C/Zn	20	46,83	-22,00	ns p>0,05
C2 Sa vs. C2 Fum	20	63,20	-47,45	*** p<0,001
C2 Sa vs. C2 vit C	20	63,20	-32,37	** p<0,01
C2 Sa vs. C2 Zn	20	63,20	-12,32	ns p>0,05
C2 Sa vs. C2 vit C/Zn	20	63,20	-5,47	ns p>0,05
C2 Fum vs. C2 vit C	20	63,20	15,08	ns p>0,05
C2 Fum vs. C2 Zn	20	63,20	35,13	*** p<0,001
C2 Fum vs. C2 vit C/Zn	20	63,20	41,98	*** p<0,001
C2 vit C vs. C2 Zn	20	63,20	20,05	ns p>0,05
C2 vit C vs. C2 vit C/Zn	20	63,20	26,90	ns p>0,05

APÉNDICE 29. Continuación.

Comparación	Tamaño muestral	Valor de Kruskal-Wallis	Diferencia del rango promedio	Valor de p
C2 Zn vs. C2 vit C/Zn	20	63,20	6,85	ns p>0,05
C3 Sa vs. C3 Fum	20	~ 235,00	425,00	ns p>0,05

Sa: sanos, Fum: fumadores; Vit C: fum+ vit C, Zn: fum+Zn, vit C/Zn: fum+ vit C/Zn, \* p<0,05: significativo; \*\* p<0,01: muy significativo; \*\*\* p<0,001: extremadamente significativo; ns p>0,05: no significativo. ~ MWU.

## ANEXOS

### ANEXO 1. Encuesta clínico-epidemiológica

Nº muestra: \_\_\_\_\_

Fecha: / 0 / 2010.

#### Datos personales

Nombre \_\_\_\_\_ Apellido \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_

C.I. \_\_\_\_\_ Fecha de nacimiento \_\_\_\_\_ Edo.civil: \_\_\_\_\_

Ocupación: \_\_\_\_\_ Tlf \_\_\_\_\_

Domicilio \_\_\_\_\_

#### Características personales

Escolaridad: Analfabeta \_\_\_ Primaria \_\_\_ Bachillerato \_\_\_ Técnico \_\_\_ Lic. \_\_\_

Tiene alguna enfermedad diagnosticada por el médico? Si \_\_\_ No \_\_\_

Especifique \_\_\_\_\_

Consume algún tratamiento? Si \_\_\_ No \_\_\_

Especifique \_\_\_\_\_

Consume algún tipo de antioxidante? Si \_\_\_ No \_\_\_

Vit. A \_\_\_ vit. C \_\_\_ vit. E \_\_\_ otros \_\_\_\_\_

Durante cuánto tiempo? \_\_\_\_\_

#### Hábitos alimenticios

Consume alimentos enlatados? Si \_\_\_ No \_\_\_, cuantas veces por semana? \_\_\_\_\_

Consume verduras? Si \_\_\_ No \_\_\_, cuantas veces por semana? \_\_\_\_\_

Consume frutas? Si \_\_\_ No \_\_\_, cuantas veces por semana? \_\_\_\_\_

Consume cítricos? Si \_\_\_ No \_\_\_, cuantas veces por semana? \_\_\_\_\_

Consume carnes rojas? Si \_\_\_ No \_\_\_, cuantas veces por semana? \_\_\_\_\_

Consume carnes blancas? Si \_\_\_ No \_\_\_, cuantas veces por semana? \_\_\_\_\_

### **Hábitos personales**

Fuma usted actualmente? Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

Número de cigarrillos: diario \_\_\_\_\_ semanal \_\_\_\_\_ mensual \_\_\_\_\_ anual \_\_\_\_\_

Marca \_\_\_\_\_

¿Cuánto tiempo tiene fumando? \_\_\_\_\_

¿En su familia hay antecedentes de tabaquismo? \_\_\_\_\_

¿Dónde fumas cigarrillos?

No fumo ahora \_\_\_\_\_ casa \_\_\_\_\_ trabajo \_\_\_\_\_ carro \_\_\_\_\_ casa de amigos \_\_\_\_\_  
eventos (fiesta, bailes) \_\_\_\_\_ aire libre \_\_\_\_\_

¿Alguna vez intento dejar los cigarros en los últimos 12 meses? Sí \_\_\_ No \_\_\_

¿Alguna vez participaste en un programa que te ayudara a dejar de usar  
cigarro? Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

¿Cree que es seguro para tu salud si fumas durante 1 año ó 2, siempre y  
cuando luego dejes de fumar? Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

¿Piensa usted que fumar es perjudicial para su salud?. Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

¿Fumar es perjudicial para las personas que están a su alrededor?.

Sí \_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

¿Está de acuerdo con las advertencias de los peligros del cigarrillo deben estar en los paquetes? Sí\_\_ No\_\_

Consume bebidas alcohólicas? Sí\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

Tipo de bebida que consume: vinos \_\_\_\_\_ ron \_\_\_\_\_ cerveza \_\_\_\_\_ whisky \_\_\_\_\_

Frecuencia: diaria \_\_\_\_\_ semanal \_\_\_\_\_ mensual \_\_\_\_\_ anual \_\_\_\_\_

Por medio de la presente, hago constar que he dado mi consentimiento para que los datos aquí recopilados sean usados con fines de investigación.



3.-Conocer bien el protocolo experimental expuestos por los investigador el cual se establece que mi participación en el trabajo consiste en: donar de manera voluntaria una muestra de sangre, tomada por el investigador del proyecto.

4.-Las muestras de sangre, que acepto donar serán utilizadas única y exclusivamente para el proyecto de investigación titulado: “Daño oxidativo del ADN de los glóbulos blancos, fragilidad de los glóbulos rojos y efecto antioxidante de la vitamina C y el zinc en individuos fumadores de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.”

5.-El equipo de personas que realizan la investigación coordinada por la Dra. Sonia Nusetti, me han garantizado confidencialidad relacionada tanto a mi identidad como a cualquier otra información relativa a mi persona a la que tenga acceso por concepto a mi participación en el proyecto antes mencionado.

6.-Bajo ningún concepto podré restringir el uso para fines académicos de los resultados obtenidos en el presente estudio.

7.-Mi participación en dicho estudio no implica riesgo e inconveniente alguno para mi salud.

8.-Bajo ningún concepto se me ha ofrecido ni pretendo recibir ningún beneficio de tipo económico producto de hallazgos que puedan producirse en el referido proyecto de investigación.

## DECLARACIÓN DEL VOLUNTARIO

Luego de haber leído, comprendido y aclaradas mis interrogantes con respecto a este formato de consentimiento y por cuanto a mi participación es totalmente voluntaria, de acuerdo:

1. Aceptar las condiciones estipuladas en el mismo y a la vez autorizar al equipo de investigadores a realizar dicho estudio en la muestra de sangre venosa, que acepto donar para los fines indicados anteriormente.
2. Reservarme el derecho a revocar esta autorización y donación de cualquier momento sin que ello conlleve algún tipo de consecuencias negativas para mi persona.

Firma del voluntario

Nombre

Lugar

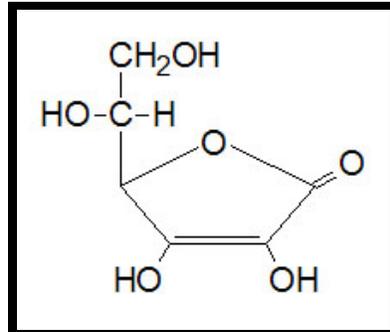
Fecha

## **DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR**

Luego de haber explicado detalladamente al voluntario la naturaleza del protocolo mencionado, certifico mediante el presente que, a mi leal saber, el sujeto que firma este formulario de consentimiento comprende la naturaleza, requerimientos, riesgos y beneficios de la participación en este estudio. Ningún problema de índole médica, de idioma o de instrucción ha impedido al sujeto tener una clara comprensión de su compromiso con este estudio.

### Anexo 3

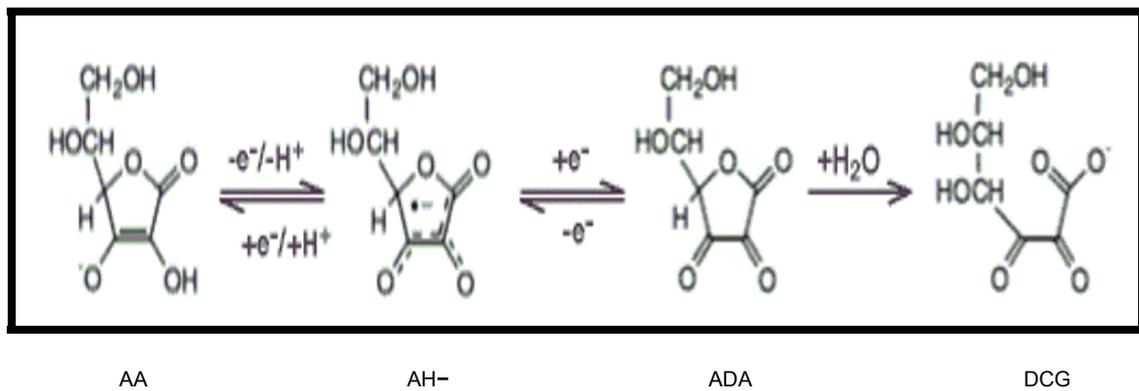
Estructura del ácido ascórbico



Fuente: Serra y Cafarro, 2007.

### Anexo 4

Degradación oxidativa del ácido ascórbico.



AA: Ácido ascórbico; AH<sup>-</sup>: monoanión ascorbato; ADA: ácido dehidroascórbico; DCG: ácido 2,3 dicetogulonico.

Fuente: Serra y Cafarro, 2007.

## HOJA DE METADATOS

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

<b>Título</b>	DAÑO OXIDATIVO DEL ADN DE LOS GLÓBULOS BLANCOS, FRAGILIDAD DE LOS GLÓBULOS ROJOS Y EFECTO ANTIOXIDANTE DE LA VITAMINA C Y EL ZINC EN INDIVIDUOS FUMADORES DE LA CIUDAD DE CUMANÁ, ESTADO SUCRE
<b>Subtítulo</b>	

### Autor(es)

<b>Apellidos y Nombres</b>	<b>Código CVLAC / e-mail</b>	
Gómez H., Amanda J	<b>CVLAC</b>	17.539.924
	<b>e-mail</b>	Gomez_a_28@hotmail.com
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	

### Palabras o frases claves:

Ensayo cometa
Estrés oxidativo
Fumadores
Fragilidad globular
Antioxidantes
Glóbulos blancos

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

## Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

## Resumen (abstract):

Se evaluó el daño oxidativo en el ácido desoxirribonucleico (ADN) de los glóbulos blancos, fragilidad de los glóbulos rojos y efecto antioxidante de la vitamina C y el zinc (Zn) en individuos fumadores de la ciudad de Cumaná, estado Sucre. En el estudio participaron 30 individuos aparentemente sanos (grupo control) y 60 fumadores del sexo masculino. Luego de haber tomado la primera muestra de sangre, los fumadores se dividieron en 3 grupos, para los distintos tratamientos antioxidantes: el primer grupo recibió vitamina C (250 mg), el segundo, Zn (20 mg), y el tercero, vitamina C más Zn, por un período de 20 días continuos. Finalizado el tratamiento, se tomó la segunda muestra de sangre para evaluar los efectos antioxidantes. El daño de ADN se evaluó a través del *ensayo cometa*, el cual permite detectar las lesiones en condiciones experimentales de pH alcalino. La fragilidad osmótica de los eritrocitos fue determinada mediante el cálculo del porcentaje de hemólisis. Los glóbulos blancos de los fumadores presentaron mayor daño oxidativo del ADN, en comparación con el grupo control y mostraron mayor susceptibilidad a la presencia del agente estresor, peróxido de hidrógeno. Los diferentes tratamientos antioxidantes redujeron significativamente la fragmentación del ADN y el tratamiento combinado fue el que resultó con la mayor protección y disminuyó la susceptibilidad al peróxido de hidrógeno a valores similares a los controles. La fragilidad de los glóbulos rojos de los fumadores fue similar a la de los controles. Estos resultados aportan pruebas suficientes del aumento del estrés oxidativo causado por los componentes oxidantes del cigarrillo y demuestran que un suplemento con antioxidantes puede ser eficaz para minimizar el daño oxidativo producido por el consumo de tabaco.

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

## Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Sonia, Nusetti	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input checked="" type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	11.380.086
	e-mail	Snusetti@yahoo.com
	e-mail	
Campos, Miguel	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	5.861.122
	e-mail	miguecampos86@hotmail.com
	e-mail	
Hernández, Chelita	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	5.681.460
	e-mail	figher@cantv.net
	e-mail	

## Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2012	04	11

Lenguaje: SPA

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

## Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-GomezAmanda.doc	Word

## Alcance:

**Espacial:** Universal (Opcional)

**Temporal:** Intemporal (Opcional)

## Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciatura en Bioanálisis

---

## Nivel Asociado con el Trabajo:

Licenciada

---

## Área de Estudio:

Bioanalista

---

## Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente-Núcleo Sucre

---

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
CONSEJO UNIVERSITARIO  
RECTORADO

CU N° 0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano  
**Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ**  
Vicerrector Académico  
Universidad de Oriente  
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
SISTEMA DE BIBLIOTECA  
RECIBIDO POR *[Firma]*  
FECHA 5/8/09 HORA 5:30

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

*[Firma]*  
JUAN A. BOLANOS CUNTELE  
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/maruja

Apartado Correos 094 / Telfs: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 6/6

**Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (VIGENTE A PARTIR DEL II SEMESTRE 2009, SEGÚN COMUNICACIÓN CU-034-2009):**

“Los trabajos de grados son de exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y solo podrá ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario, para su autorización”.

---

Amanda Gómez

Autor

---

Sonia Nusetti

Tutor

POR LA COMISIÓN DE TESIS

---