

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

ESCUELA DE POST GRADO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

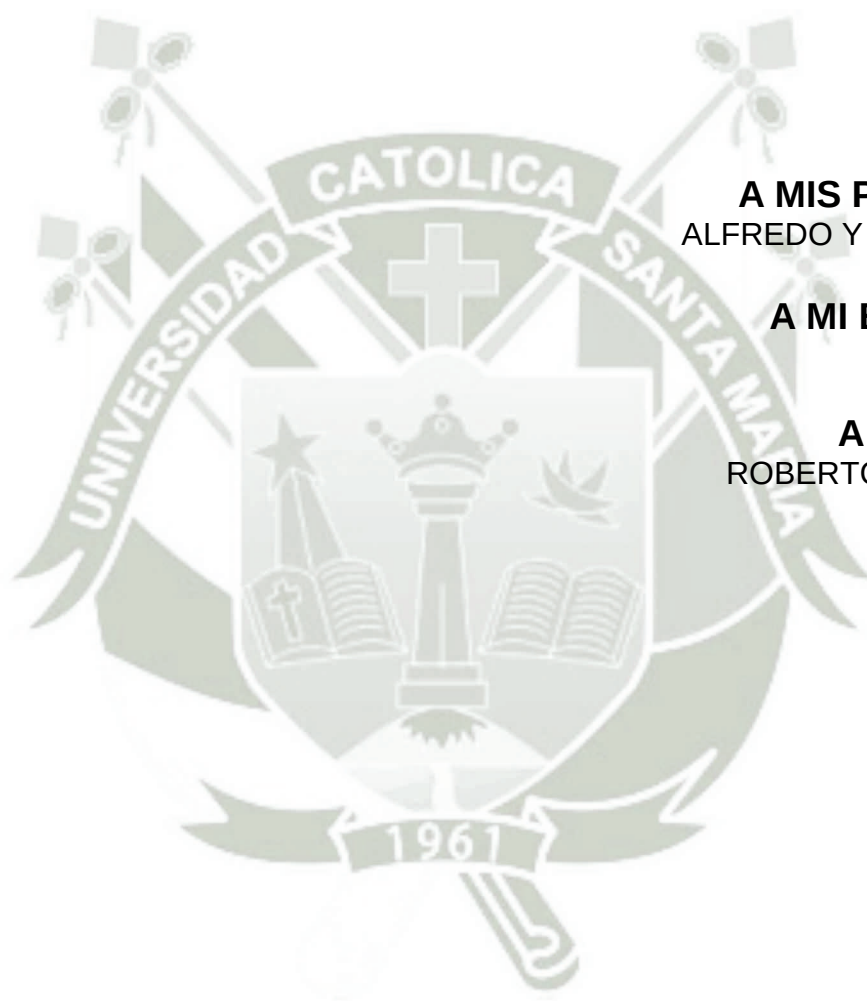


"EFECTO DEL ACIDO ASCORBICO SOBRE EL ESTRES OXIDATIVO PRODUCIDO POR LA INHALACION DE HUMO DE CIGARRILLO EN RATAS"

Tesis Presentada por el Magíster:
NÚÑEZ QUIROZ, Roberto Orlando.
Para optar el Grado Académico de
Doctor en Ciencias de la Salud.

AREQUIPA-PERU

2008



A MIS PADRES
ALFREDO Y ADRIANA

A MI ESPOSA
ROSA

A MI HIJO
ROBERTO ADRIAN



“EN LAS ADVERSIDADES SALE A LA LUZ LA VIRTUD”

Aristóteles.

INDICE

	Pág.
RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
INTRODUCCION	01
CAPITULO I: Material y métodos	04
CAPITULO II: Resultados	11
CAPITULO III: Discusión	55
CONCLUSIONES	61
RECOMENDACIONES	63
REFERENCIAS	65
ANEXOS	69
• Anexo 1: Proyecto de Tesis	70
• Anexo 2: Base de Datos	105
• Anexo 3: Fotografías	107
• Anexo 4: Modelo de Instrumento de Recolección de Datos	110
• Anexo 5: Principales Fuentes Vegetales y Suplementos de Ácido Ascórbico	112

RESUMEN

El propósito del trabajo fue identificar el efecto del ácido ascórbico sobre el estrés oxidativo producido por la inhalación de humo de cigarrillo en los pulmones de ratas de experimentación a través de la determinación del efecto broncodilatador del salbutamol en anillos bronquiales de segundo grado y de la medición del malonaldehído (MDA) producido en el tejido pulmonar.

Se realizó un estudio experimental de laboratorio. Para esto se contó con 18 ratas divididas en 3 grupos: Grupo I ó control, Grupo II expuesto a humo de cigarrillo y Grupo III expuesto a humo de cigarrillo y a la administración de ácido ascórbico. El ácido ascórbico fue administrado por vía oral a razón de 5 mg/kg de peso/día durante 6 días a la semana por 4 semanas; 15 minutos después de esto se realizó la exposición al humo por 15 minutos durante las 4 semanas. Al cabo de este tiempo se procedió a sacrificar a los animales para obtener el tejido pulmonar y los bronquiolos de segundo grado con lo que se determinó la cantidad de MDA producido y la respuesta broncodilatadora al salbutamol respectivamente. Seguidamente se llevaron los resultados a una matriz de datos para el análisis, aplicación de pruebas estadísticas y representación en tablas y figuras.

Se encontró que la inhalación pasiva del humo del cigarrillo produce una disminución en la respuesta broncodilatadora cuando se administra salbutamol a los bronquiolos de las ratas expuestas, la misma que revierte en parte en el Grupo III ($p \leq 0,05$).

También encontramos que la medición de MDA en tejido pulmonar en los grupos I y III, fue estadísticamente similar. En cambio el valor del MDA en el Grupo II fue mayor en relación a los otros 2 grupos ($p \leq 0,05$).

Concluimos señalando que existiría un efecto protector pulmonar del ácido ascórbico al ser añadido como suplemento en la dieta de ratas expuestas pasivamente al humo del cigarrillo. Lo observado nos permite sugerir el probable efecto beneficioso que tendría el ácido ascórbico sobre la disminución del estrés oxidativo a nivel pulmonar en humanos expuestos a la inhalación pasiva del humo del cigarrillo.

PALABRAS CLAVE: estrés oxidativo, humo de cigarrillo, malonaldehído(MDA), broncodilatación.

ABSTRACT

The purpose of this work was to identify the effect of ascorbic acid on the oxidative stress produced by the inhalation of cigarette smoke on the lungs of laboratory rats through the determination of the bronchodilatory effect of salbutamol on second degree bronchial rings and the measurement of malondialdehyde (MDA) produced in the pulmonary tissue.

An experimental laboratory study was conducted in which 18 rats were used. They were divided into 3 groups: Group I or the control group, group II – the group that was exposed to cigarette smoke and group III - the group that was exposed to cigarette smoke and to which ascorbic acid was administered. The ascorbic acid was administered orally: 5mg/kg per day for 6 days a week for a period of 4 weeks; 15 minutes after the intake of the ascorbic acid, the rats were then exposed to cigarette smoke for 15 minutes for a further period of 4 weeks.

After this time we proceeded to sacrifice the animals to obtain the pulmonary tissue and the second degree bronchioli, which were used to determine the quantity of MDA produced and to determine the bronchodilatory response to salbutamol respectively. Following this, the results were introduced to a database to be analyzed. Statistical tests were applied and the results represented in tables and graphics.

It was found that the passive inhalation of cigarette smoke produces a reduction in the bronchodilatory response when salbutamol is applied to the bronchiolos of exposed rats and this response is reverted in part in group III ($p \leq 0,05$).

It was also found that the measurement of MDA on pulmonary tissue in groups I and III was statistically similar. On the other hand, the value of MDA in group II was higher in relation to the other 2 groups ($p \leq 0,05$).

We would conclude by pointing out that there exists a protective pulmonary effect of the ascorbic acid when it is added as a supplement in the diet of rats exposed passively to the cigarette smoke. What we observed allows us to suggest the probable beneficial effect that ascorbic acid would have on the decrease of oxidative stress at pulmonary level in human beings exposed to the passive inhalation of cigarette smoke.

KEY WORDS: oxidative stress, cigarette smoke, malonaldehyde (MDA), bronchial dilatation



CAPITULO I

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS

1. MATERIALES

A. Animales de experimentación:

Se utilizaron 18 ratas machos de la especie *rattus rattus*ⁱ, variedad albina swiss, obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNSA, las cuales fueron de similar peso y de 2 a 4 meses de edad.

Dos semanas antes de realizar la parte experimental de la investigación, los animales fueron observados cuidadosamente, siendo sometidos además a una estandarización en su alimento, luego se dividió al azar en tres grupos cada uno con 6 animales.

B. Material de laboratorio:

Equipos:

- Balanza analítica Dember a-160 (sensibilidad 0,0001 g).
- Baño de órganos aislados de doble pared con regulación de temperatura y oxígeno.
- Transductor de presión isométrica marca GRASS modelo FT-10.
- Polígrafo marca GRASS modelo 7 con preamplificador, amplificador y aguja registradora.
- Espectrofotómetro marca GILFORD modelo Stasar III.
- Balanza analítica marca SARTORIUS.
- Homogenizador de Potter marca BIOSPEC modelo 985-370.

Reactivos:

Los indicados en:

- Obtención y preparación de los anillos bronquiales aislados de segunda generación y en determinación de malonaldehído.

ⁱ Roedor originario de Asia tropical que está presente en Europa desde el siglo VIII, y desde allí se dispersó por el resto del mundo adaptándose a casi todos los hábitat. (18)

- Procedimiento para la determinación del nivel total de oxidación a través de la determinación de malonaldehído.
- Salbutamol GENFAR 2mg/5ml jarabe frasco por 170 ml

Otros Materiales:

- 2 envases de plástico tipo “botellón” con orificios para el ingreso y salida de aire.
- 16 Cajetillas de cigarrillos marca “Hamilton” (10 unidades cada una) para administrar 3 cigarrillos diarios 6 días por semana durante 4 semanas.
- Vitamina C en gotas (Redoxon) al 20% (20 gotas = 1 ml = unos 200 mg), cantidad suficiente para todo el trabajo.
- Jeringa y sonda para administración de ácido ascórbico a razón de 5 mg/kg de peso vía oral diario 6 días por semana durante 4 semanas. (Ver Anexo 5: Principales fuentes vegetales y suplementos de ácido ascórbico).

2. CAMPO DE VERIFICACION

- A. Ubicación espacial: Centro de Investigaciones y Desarrollo Científico (CIDECE) de la Facultad de Medicina de Universidad Nacional de San Agustín y Bioterio del CIDECE.
- B. Ubicación temporal: La investigación se realizó durante diciembre del 2006 y febrero del 2007.

3. ANALISIS ESTADISTICO

Para el análisis estadístico, se empleó la estadística descriptiva (frecuencias absolutas y relativas), medidas de tendencia central (media aritmética), medidas de dispersión (varianza y desviación estándar). También se aplicó las pruebas de los efectos intergrupos, Contraste de Levene, Prueba de

Shapiro-Wilk, Prueba HSD Tukey, Prueba de Dunnett, Prueba de Efectos Intersujetos según correspondió. En todos los casos, se consideró significativa una $p \leq 0,05$, con intervalo de confianza del 95%.

4. UNIVERSO Y MUESTRA

Dada la naturaleza del estudio se consideraron 3 **grupos** de ratas, con 6 animales en cada uno, de la especie *rattus rattus*, variedad albina swiss, obtenidas del Bioterio del CIDEA, las cuales fueron de similar peso y de 2 a 4 meses de edad.

5. ESTRATEGIA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

- Se elaboró una ficha de recolección de datos, considerando todos los aspectos a evaluar en el estudio (ver anexo 4).
- Se procedió a formar los 3 grupos de ratas al azar: grupo I: grupo control conformado por 6 ratas no expuestas; grupo II: 6 ratas expuestas al humo del cigarrillo; y grupo III: 6 ratas expuestas al humo del cigarrillo y al suplemento de ácido ascórbico. Todos los animales de cada grupo fueron alimentados de manera adecuada durante toda la investigación. Durante 6 días a la semana y por 4 semanas se administró lo siguiente a los grupos expuestos (II y III).

Grupos	1er semana	2da semana	3er semana	4ta semana
II (n=6)	Humo de 3 cigarrillos por día	Humo de 3 cigarrillos por día	Humo de 3 cigarrillos por día	Humo de 3 cigarrillos por día
III (n=6)	Humo de 3 cigarrillos por día y vitamina C 5mg/kg/día	Humo de 3 cigarrillos por día y vitamina C 5mg/kg/día	Humo de 3 cigarrillos por día y vitamina C 5mg/kg/día	Humo de 3 cigarrillos por día y vitamina C 5mg/kg/día

En primer lugar se les administró por vía oral 5mg/kg de peso/día de vitamina C a cada animal del tercer grupo, 15 minutos después los grupos II y III fueron expuestos al humo del cigarrillo, dentro de un botellón especialmente adaptado para esto, encendiéndose un cigarrillo por vez

dentro del botellón hasta completar los 3 por día, lo cual demoró aproximadamente 15 minutos. Terminada cada exposición el ambiente fue renovado por aire ambiental. El botellón tuvo pequeños orificios para introducir los cigarrillos en la parte inferior así como en la parte superior para la salida del humo. (Ver Anexo 3).

- c) Al término del experimento se procedió al sacrificio de los animales procediendo inmediatamente a la extracción de los pulmones para realizar las pruebas y mediciones necesarias.
- d) Obtención y preparación de los anillos bronquiales aislados de segunda generación: los pulmones extraídos fueron perfundidos para su preservación con suero fisiológico a 4°C. Completada la perfusión se procedió a la ligadura y sección de la tráquea con el pulmón en semiinsuflación. La disección terminó con el reconocimiento de los bronquiolos de segunda generación y su extracción con la mayor longitud posible. El trozo aislado bronquial se suspendió dentro de una cápsula Petri conteniendo solución Krebs/Henseleitⁱⁱ (K-H) a 4° C con burbujeo continuo de la mezcla carbógena. Dentro de este medio, se terminó su limpieza y se procedió a seccionarlo en anillos de 3,0 +/-0,05 mm de longitud. Uno a uno fueron insertados dentro del pozo de la cámara de órganos aislados para su estudio, sujetándolos entre dos ganchos de acero inoxidable. Uno de ellos fijo, a manera de poste cerca del borde interno de la cámara y el otro, constituido por el extremo Terminal de un transductor de tensión isométrico conectado al polígrafo Grass con su aguja inscriptora. Seguidamente se llenó el pozo de la cámara con 850 ul de solución K-H burbujeada con la mezcla carbógena y mantenida a 37,0 +/-0,5° C, mediante un termociclador. A continuación, se dejó la preparación en reposo durante 30 minutos aproximadamente, para que se estabilice cambiándose la solución K-H cada 10 minutos para evitar la acumulación

ⁱⁱ Solución K-H compuesta de 119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃ y 5.6 mM glucosa (34)

de metabolitos. Estabilizada la preparación, lo cual se verificó porque la aguja inscriptora del polígrafo dejó de oscilar, se administró al baño de la cámara de órganos aislados, las drogas en estudio en las dosis señaladas según el protocolo (ver a continuación). Para el registro de relajación con el transductor de presión isométrica, se balanceó el equipo con un peso de 2 gramos.

Protocolo de administración de los fármacos en estudio:

1. Estabilizada la preparación, se añadió en primer lugar 34 microgramos de salbutamol disuelto en 20 microlitros de solución fisiológica al baño de órganos aislados para determinar la magnitud de la respuesta relajante considerada como patrón (100%) con los animales del primer grupo. Obtenido este dato, se realizó el estudio con los anillos procedentes de los demás grupos comparando la magnitud de sus respuestas con el patrón.
 2. Luego se lavó el anillo (3 veces) con solución K-H, hasta lograr el retorno de la aguja a la línea de base.
 3. Finalizado el experimento, se extrajo el anillo de los soportes de la cámara para determinar su peso seco, lo que se logró extrayendo previamente su humedad mediante baño María, previo al pesado.
 4. El estudio terminó después de ser sometidos al mismo protocolo los anillos bronquiales procedentes de todos los grupos de trabajo.
- e) Procedimiento para la determinación del nivel total de oxidación a través de la determinación de malonaldehído.

En tejido pulmonar: Cada anillo bronquial se colocó en un envase a 4° C convenientemente identificado para proceder a su determinación por separado. Cada muestra de tejido se homogenizó en 9 volúmenes (1:10 p/v) de tampón tris HCl 20 mM pH 7.4 mediante un homogenizador tipo Potter, durante 5 minutos manteniendo el recipiente en hielo picado. Finalizada la homogenización del tejido pulmonar se centrifugó durante 30

minutos a 10.000 rpm.

A continuación se agregó al sobrenadante del homogenizado, 2 mL de una mezcla de ácido tricloroacético (15% p/v), ácido tiobarbitúrico (0,37%) y ácido clorhídrico (25 mmol/L). Luego la solución fue incubada a 100° C durante 20 minutos con la adición de 2,5 ml de n-butanol procediéndose a su centrifugación a 3.000 rpm durante 10 min. La absorbancia del sobrenadante fue leída a 532 nm contra un blanco de n-butanol.

- f) Todos los resultados fueron llevados a una matriz de datos, elaborada en el programa Excel, que nos sirvió como hoja de cálculo.
- g) Se tabuló y graficó los resultados según los objetivos propuestos.





CAPITULO II

RESULTADOS

**INTERACCIONES DE LOS FACTORES
Y LOS EFECTOS PRINCIPALES
BRONCODILATACION Y
PRODUCCION DEL MALONALDEHIDO**

MODELO MATEMATICO

1. ELEMENTOS

Variable Dependiente (efectos): BRONCODILATACION y producción de MALONALDEHIDO

FACTORES:

Grupos:

Nivel 0: Grupo Control.

Nivel 1: Exposición a humo del cigarrillo.

Nivel 2: Exposición a humo del cigarrillo y administración de ácido ascórbico.

DISEÑO

Modelo bifactorial de efectos fijos.

REPLICAS:

Cada unidad de experimentación (rata) bajo un solo tratamiento.

Número de réplicas 18 unidades de experimentación.

2. MODELO

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + e_{ijk}$$

$i = 1, 2$

$j = 1, 2, 3$

$k = 1, 2, 3, 4$

Con las restricciones:

$$\sum_{i=1}^2 \alpha_i = 0$$

$$\forall_j = 1, 2, 3 \quad \beta_j \approx N(0, \sigma_{\beta}) \text{ independientes.}$$

$$\forall_i = 1, 2 \quad j = 1, 2, 3 \quad (\alpha\beta)_{ij} \approx N(0, \sigma_{\alpha\beta}) \text{ independientes.}$$

Además, $e_{ijk} \approx N(0, \sigma)$ independientes

Entonces, $y_{ijk} \approx N(\mu + \alpha_i, \sqrt{\sigma_\beta^2 + \sigma_{\alpha\beta}^2 + \sigma^2})$ independientes.

$e_{ij} \approx \mu(0, G)$ independientes

3. PRUEBA DE LA HIPOTESIS

Análisis Unifactorial de Varianza.

Hipótesis Nula H_0

$$H_0: \sigma_1 = \sigma_2$$

$$H_0: \sigma_\beta^2 = 0$$

$$H_0: \sigma_{\alpha\beta}^2 = 0$$

Hipótesis Alternativa

$$H_1: \sigma_1 \neq \sigma_2$$

$$H_1: \sigma_\beta^2 \neq 0$$

$$H_1: \sigma_{\alpha\beta}^2 \neq 0$$

Estadístico de contraste: F de Snecdor.

**TABLA 01. ESTADISTICOS DESCRIPTIVOS DE LAS VARIABLES
DEPENDIENTES**

Estadísticos Descriptivos

Variable Dependiente: EFECTO

TRATAMIE	Humo Cigarr	H.Cigarr+Vit C	Media	Desv Típic	N
1	1	1	98.0000	12.32883	6
		2	64.6667	10.11270	6
		Total	81.3333	20.45986	12
	2	1	33.0000	6.81175	6
		Total	33.0000	6.81175	6
	Total	1	85.5000	35.24847	12
		2	64.6667	10.11270	6
		Total	85.2222	28.88223	18
2	1	1	1.1000	0.07874	6
		2	1.1983	0.07414	6
		Total	1.1492	0.08918	12
	2	1	1.7567	0.20646	6
		Total	1.7567	0.20646	6
	Total	1	1.4283	0.37389	12
		2	1.1983	0.07414	6
		Total	1.35517	0.32330	18
Total	1	1	49.5500	51.28252	12
		2	32.9325	33.83926	12
		Total	41.2413	43.32976	24
	2	1	17.3783	16.95087	12
		Total	17.3783	16.95087	12
	Total	1	33.4642	40.80687	24
		2	32.9325	33.83926	12
		Total	33.2869	38.13432	36

N: 18 uua.

FUENTE: Elaboración Personal.

En la Tabla 1, se muestran los promedios observados, las desviaciones estándar y las frecuencias de las interacciones de los factores y sus niveles, covariables y las frecuencias observadas por cada variable dependiente en todas las celdas.

TABLA 02. MATRIZ GENERAL DE DATOS DE LAS INTERACCIONES DE LOS FACTORES Y DE LOS EFECTOS PRINCIPALES BRONCODILATACIÓN Y PRODUCCION DE MALONALDEHIDO

EFFECTOS	FACTORES (tratamientos)			Medias Marginales
	H.Cigarrill	H.Cigarrill y Ac. Ascórbico	Control	
Broncodilatación	33.00	64.67	98.00	65.22
Malonaldehido	1.76	1.20	1.10	1.35
Medias Marginales	17.38	32.94	49.55	33.29

N: 18 uua.

En la Tabla 2, se expone la matriz de análisis de las frecuencias observadas en cada categoría de la clasificación cruzada. Las frecuencias de la variable dependiente se encuentran en cada una de las celdas de la tabla de contingencia de doble entrada. Las variables explicativas representadas por los factores y covariables se encuentran en las casillas externas. Esta disposición nos permite estimar los parámetros de máxima verosimilitud en el modelo matemático longilineal. Las medias marginales son comparadas con las parejas no corregidas para determinar cualquier efecto principal del modelo, es decir para los factores inter sujetos e intra sujetos. La broncodilatación se corrige con respecto a la covariable (salbutamol).

TABLA 03: INTERACCIONES DE LOS FACTORES (tratamientos) Y DE LOS EFECTOS PRINCIPALES BRONCODILATACION Y PRODUCCION DE MALONALDEHIDO.

Pruebas de los efectos Inter-Grupos

Variable dependiente: **EFECTO**

EFFECT PRINCIPALES	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	f	p	Eta al cuadrado parcial	Parámetro de no centralidad	Potencia observada^a
Modelo corregido	49394.31 ^b	5	9878.86	197.10	0.000	0.970	985.52	1.000
Intersección	30068.71	1	30068.71	599.93	0.000	0.952	599.93	1.000
TRATAMIE	27327.01	1	27327.02	545.23	0.000	0.948	545.23	1.000
H.Cigarrillo	6210.10	1	6210.10	123.90	0.000	0.805	123.90	1.000
H.Cig.VITC	1656.85	1	1656.85	33.06	0.000	0.524	33.06	1.000
TRATAMIE * H.Cigarri	6466.20	1	6466.20	129.01	0.000	0.811	129.01	1.000
TRATAMIE * H.Cig.VITC	1676.52	1	1676.52	33.45	0.000	0.527	33.45	1.000
H.Cigarri* H.Cigarr VITC	0.00	0	.	.	.	0.000	0.00	.
TRATAMIE * H.Cigarrill * H.Cigarr VITC	0.00	0	.	.	.	0.000	0.00	.
Error	1503.61	30	50.12					
Total	90786.66	36						
Total corregida	50897.92	35						

^a. Calculado con alfa = 0.05

^b. R cuadrado = 0.970 (R cuadrado corregida = 0.966)

N: 18 uua.

CONTRASTE DE LEVENE.

F= 3.66

P = 0.010 (**P ≤ 0.05**)

FUENTE: Elaboración Personal.

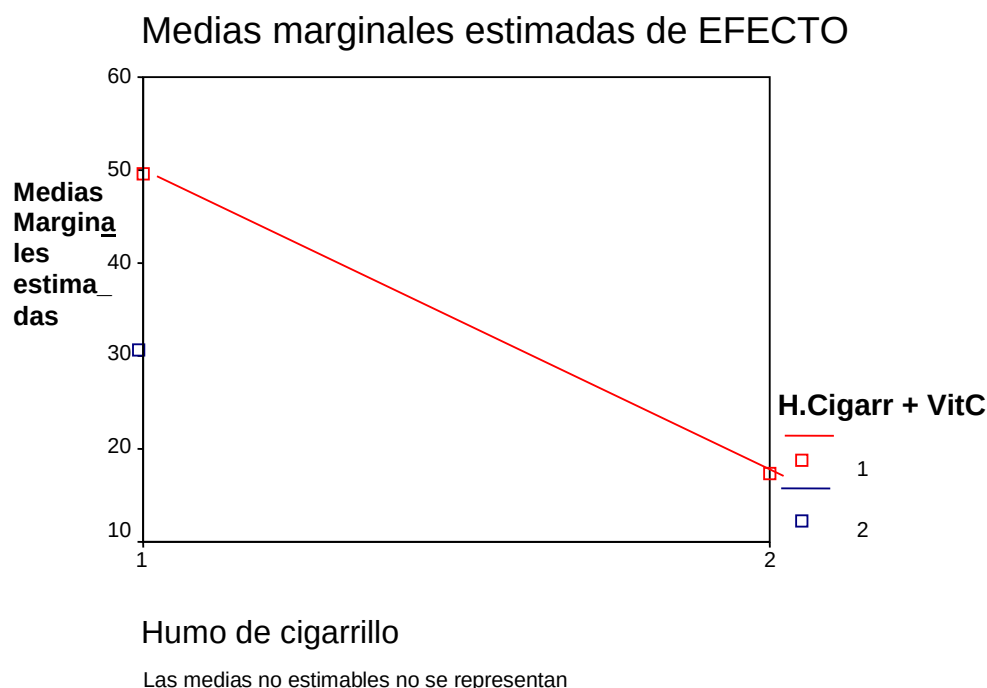


FIGURA 01 INTERACCIONES DE LOS FACTORES (tratamientos) Y DE LOS EFECTOS PRINCIPALES BRONCODILATACION Y PRODUCCION DE MALONALDEHIDO.

FUENTE: Elaboración Personal.

En la Tabla 03 y la Figura 01; se analiza las interacciones de los factores estudiados, en sus diferentes niveles y las variaciones que se produjeron en las variables dependientes o efectos principales: Broncodilatación y niveles oxidativos por la medición del metabolito malonaldehido. La variación entre grupos fue ($p \leq 0.05$), con el valor crítico del estadístico f de Snecdor: 197.10. La fuente de variación es debida a los factores y los diferentes tratamientos aplicados. La intersección de dichos efectos fue también diferente, no produciéndose entrecruzamiento, debido a que no tienen un mismo origen, mostrando un valor de α ($p = 0.000$). Existe suficiente información para aceptar la hipótesis alternativa $H_1: \sigma_{\alpha\beta}^2 \neq 0$, ambos factores tienen comportamientos diferentes. Ello evidencia que la fuente de variación también es estadísticamente significativa, es decir sus orígenes son diferentes. Lo anterior se evidencia por la prueba de homogeneidad de varianzas para cada variable dependiente en todas sus combinaciones para los factores intersujeto. El valor de la homogeneidad de varianzas de error fue ($p \leq 0.05$); ello significa que la varianza de la variable dependiente no es

igual a lo largo de todos los grupos. Por consiguiente asumimos que los grupos de estudio son diferentes en su origen y naturaleza, no pudiendo ser analizados en forma corporativa, sino independientemente. Esta asunción se comprueba con el análisis visual de la Figura 01, en la que se observa que no hay interacción de los promedios de las frecuencias de las variables dependientes analizadas. En este las curvas representativas no se intersecan.



BRONCODILATACION

(Efectos del Salbutamol)

MODELO MATEMATICO

ELEMENTOS

Variable Dependiente: BRONCODILATACION (mm de diámetro)

FACTOR:

Grupos:

Nivel 1: Grupo Control

Nivel 2: Exposición a humo de cigarrillo.

Nivel 3: Exposición a humo de cigarrillo y administración de ácido ascórbico.

DISEÑO

Unifactorial aleatorio multigrupos

REPLICAS:

Cada unidad de experimentación (rata) bajo un solo tratamiento.

Número de replicas 18 unidades de experimentación.

4. MODELO

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij}$$

$i = 1, \dots, 3$ (tratamientos)

$j = 1, \dots, 6$ (N° de unidades de experimentación)

μ = Media poblacional de Y.

$\alpha_i = \mu_i - \mu$ (efecto medio adicional debido al tratamiento con i)

Con la condición: $\sum_{i=1}^3 \alpha_i = 0$

e_{ij} = Error cuadrático

$e_{ij} \approx \mu$ (0, G) independientes

5. PRUEBA DE LA HIPOTESIS

Análisis Unifactorial de Varianza.

Hipótesis Nula H_0

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_j + E_{ij}$$

Hipótesis Alternativa

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$$

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_j + E_{ij}$$

Estadístico de contraste: F de Snedcor.

6. SUPUESTOS DEL MODELO MATEMATICO

NORMALIDAD

Prueba de Shapiro - Wilk

$$Y \cong N(\mu, \sigma_y^2)$$

HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS

Prueba de Levene

$$\sigma_i^2 = \sigma_j^2 = \sigma_y^2, \forall i \neq j$$

INDEPENDENCIA

$$E_{ij} \cong N(0, \sigma_E^2)$$

7. COMPARACIONES MULTIPLES

Comparaciones múltiples

Prueba HSD Tukey

Comparaciones entre pares

Prueba de Dunnett



CARACTERÍSTICAS GENERALES

TABLA 04. DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DEL PORCENTAJE DE BRONCODILATACIÓN POR EFECTOS DEL SALBUTAMOL EN EL GRUPO DE CONTROL

NIVEL 1	N°	Frecuenc	%	%	%	%
% Broncodilat	Ratas	Acumul		Acumulado	Total	Acumulad Total
70.00>x≤80.00	1	1	16.67	16.67	16.67	16.67
80.00>x≤90.00	0	1	0.00	16.67	0.00	16.67
90.00>x≤100.00	3	4	49.99	66.67	50.00	66.67
100.00>x≤110.00	1	5	16.67	83.33	16.67	83.33
110.00>x≤120.00	1	6	16.67	100.00	16.67	100.00
TOTAL		6	100.00			

N= 06 UUA.

SUPUESTO DE NORMALIDAD.

Prueba de Shapiro-Wilks: W = 0.87125 (p = 0.23123)

FUENTE: Elaboración Personal.

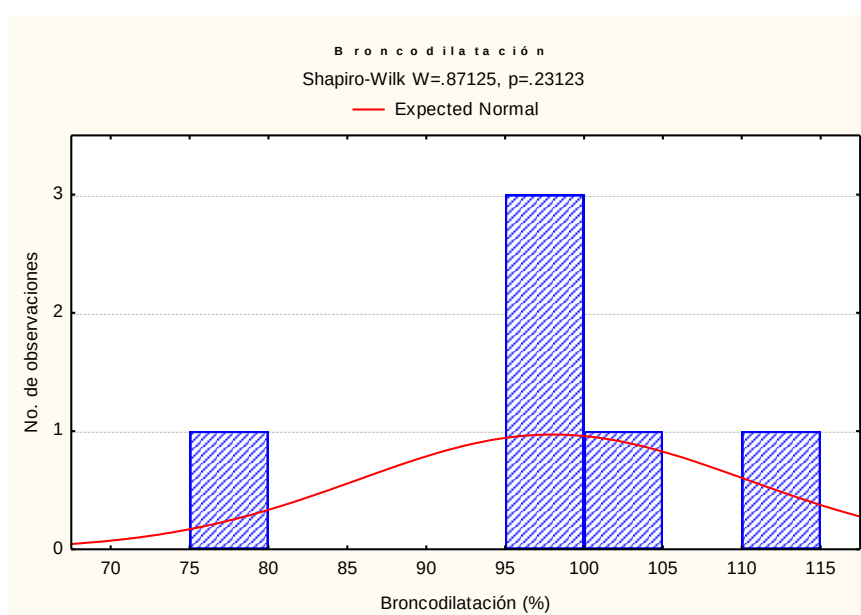


FIGURA 02 DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DE LA BRONCODILATACIÓN POR EFECTOS DEL SALBUTAMOL EN EL GRUPO DE CONTROL

FUENTE: Elaboración Personal.

Tabla 04 y Figura 02; muestran la distribución de los porcentajes de broncodilatación en el grupo de unidades de estudio expuestas al efecto del salbutamol. La mayor frecuencia de porcentaje de broncodilatación en el rango de broncodilatación $[90.00 < x \leq 100.00]$ 03 casos, 50.00% de

frecuencias. El supuesto de normalidad se cumple ($p > 0.05$); es decir la muestra procede de una población normalmente distribuida.



TABLA 05. DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DE LA BRONCODILATACION POR EFECTO DEL SALBUTAMOL EN EL GRUPO EXPUESTO AL HUMO DE CIGARRILLO

NIVEL 2	N°	Frecuenc.	%	%	%	%
% Broncodilat	Ratas	Acumuls.		Acumulado	Total	Acumulad Total
20.00>x≤25.00	1	1	16.67	16.67	16.67	16.67
25.00>x≤30.00	1	2	16.67	33.33	16.67	33.33
30.00<x≤35.00	2	4	33.33	66.67	33.33	66.67
35.00>≤40.00	1	5	16.67	83.33	16.67	83.33
40.00>x≤45.00	1	6	16.67	100.00	16.67	100.00
TOTAL		6				100.00

N= 06 UUA.

SUPUESTO DE NORMALIDAD.

Prueba de Shapiro-Wilks: W = 0.98434 (p = 0.9710)

FUENTE: Elaboración Personal.

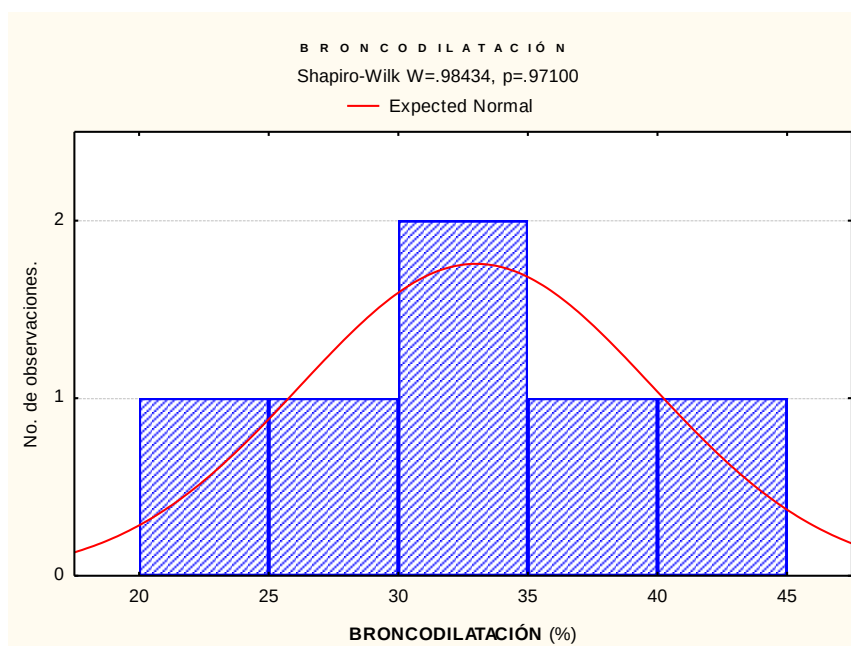


FIGURA 03. DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DE LA BRONCODILATACION POR EFECTOS DEL SALBUTAMOL EN EL GRUPO EXPUESTO AL HUMO DE CIGARRILLO

Tabla 05 y Figura 03; se evidencia que el 66.67% de unidades de experimentación alcanzaron una dilatación menor o igual al 35%, por efecto del humo de cigarrillo. La diferencia, aproximadamente 1/3 de la muestra alcanzaron hasta el 45% de broncodilatación por efecto del humo de

cigarrillo; este valor es 2.4 veces menor a la broncodilatación máxima alcanzada por el efecto del Salbutamol en las unidades de control.

Se cumple con el supuesto de normalidad.



TABLA 06. DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DE LA BRONCODILATACION POR EFECTOS DEL SALBUTAMOL EN EL GRUPO EXPUESTO AL HUMO DE CIGARRILLO Y VITAMINA C

NIVEL 3	N°	Frecuencias	%	%	%	%
% Broncodilat	Ratas	Acumuladas		Acumulado	Total	Acumula Total
45.00>x<=50.00	1	1	16.67	16.67	16.67	16.67
50.00>x<=55.00	0	1	0.00	16.67	0.00	16.67
55.00>x<=60.00	1	2	16.67	33.33	16.67	33.33
60.00>x<=65.00	1	3	16.67	50.00	16.67	50.00
65.00>x<=70.00	1	4	16.67	66.67	16.67	66.67
70.00>x<=75.00	1	5	16.67	83.33	16.67	83.33
75.00>x<=80.00	1	6	16.67	100.00	16.67	100.00
TOTAL	6				100.00	

N= 06 UUA.

SUPUESTO DE NORMALIDAD.

Prueba de Shapiro-Wilk: W = 0.95463 (p = 0.77752)

FUENTE: Elaboración Personal.

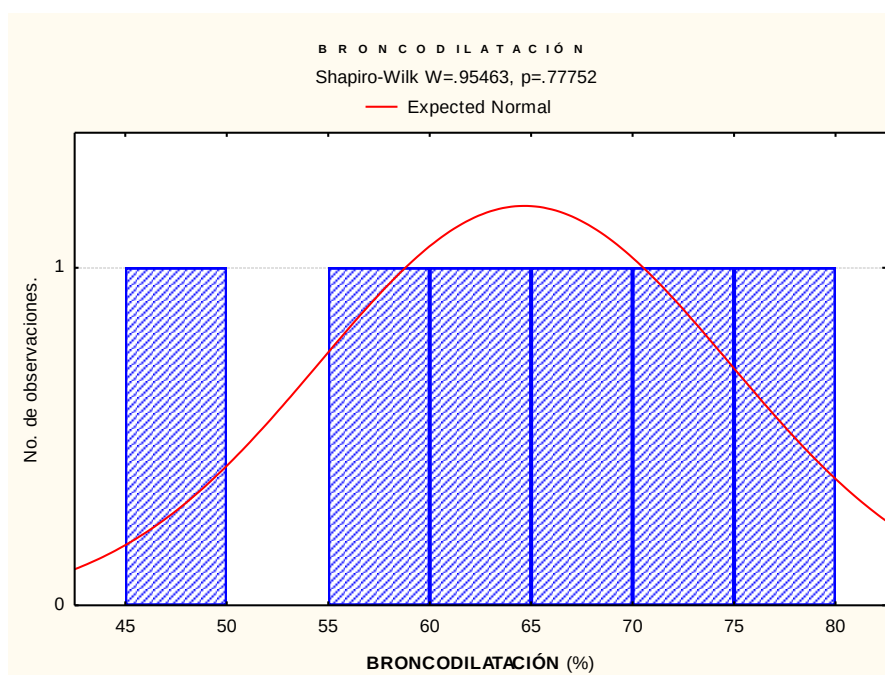


FIGURA 04 DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DE LA BRONCODILATACION POR EFECTOS DEL SALBUTAMOL EN EL GRUPO EXPUESTO AL HUMO DE CIGARRILLO Y ACIDO ASCORBICO

En la Tabla 06 y Figura 4 se muestra que la adición de ácido ascórbico (5 mg / kg de peso) a las unidades de experimentación en conjunto, alcanzan una mínima proporción de broncodilatación de 45% y máxima del 80%. Estos

valores constituyen 35% más del valor máximo alcanzado en las unidades de experimentación del Grupo expuesto al humo de cigarrillo. Esta apreciación cuantitativa indirecta y simple nos permite asumir que la vitamina C podría intervenir en mejorar la proporción de broncodilatación, al parecer limitada por los efectos broncoconstrictivos del humo de cigarrillo; es decir que la adición de vitamina C podría aumentar la proporción de broncodilatación en 3.4 veces, cuando se administra el tratamiento humo de cigarrillo. Esta observación visual se evidencia en la Figura 04.

Se cumple con el supuesto de normalidad.

TABLA 07. CARACTERISTICAS DE LOS ESTIMADORES ESTADISTICOS DE LA PROPORCIÓN DE BRONCODILATACIÓN POR EFECTO DEL SALBUTAMOL EN LOS DIFERENTES NIVELES DE TRATAMIENTO

Estadísticos	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
Media	98.00 ± 25.80	33.00 ± 14.30	64.67 ± 21.23
Mediana	99.00	32.50	66.50
Media Geométr.	97.30	32.41	63.96
Media Armónica	96.55	31.83	63.19
Varianza	152.00	46.40	102.27
C.V.	13%	21%	16%
DE.	12.33	6.81	10.11
E E M	5.03	2.78	4.03
Máx.	114.00	43.00	76.00
Min.	76.00	24.00	48.00
Rango	38.00	19.00	28.00
Lím. Confianza			
-95.00%	85.06	25.85	54.05
+95.00%	110.94	40.15	75.28

n = 06 UUA.

N = 18 UUA.

FUENTE: Elaboración Personal.

En la Tabla 07 las diferentes proporciones de broncodilatación en respuesta a la acción del Salbutamol frente a los diferentes niveles de tratamiento son analizadas por los diferentes estadísticos descriptivos. Las medidas de tendencia central (media aritmética, mediana, media geométrica y media armónica) tienen diferencias muy próximas a la unidad, ello nos permite asumir que las muestras de estudio tienen una distribución simétrica. Las diferencias entre la DE y el EEM, no son significativas, asumiéndose que las distribuciones de los datos tienen una tendencia a ser homogéneos. Esta asunción se corrobora por los valores de varianza similares y los coeficientes de variación también son muy próximos; y el recorrido de las diferencias

extremas también son similares, demostrando que no hay una variabilidad amplia (dispersión) en los porcentajes de broncodilatación producido por el salbutamol; entonces los valores tienen tendencia estocástica. El límite de confianza mínimo es mayor que la unidad, no involucrando el valor nulo; por lo que podemos confirmar que las asociaciones estadísticas de los factores estudiados son significativas. Las diferencias de los límites de confianza en los diferentes niveles no son muy alejadas, lo que nos permite concluir que los tamaños de la muestra y de los grupos en comparación son aceptables y representativos de la población de la que provienen.



TABLA 08. IGUALDAD DE VARIANZAS DE ERROR DE LOS DIFERENTES NIVELES DEL TRATAMIENTO EN EL EFECTO DE LA PROPORCION DE BRONCODILATACION.

TRATAMIENTOS (Niveles 1,2,3)	$\bar{X}$	D.E	EEM
Control	98.00	12.33	5.03
Humo cigarrillo	33.00	06.81	2.78
Humo cigarrillo Ac. Ascorb.	64.67	10.11	4.03

CONTRASTE DE LEVENE: F: 0.280 gl_1 : 2 gl_2 : 15 (p: 0.759)
(p > 0.05)

En la Tabla 08, se analiza el supuesto de homogeneidad de varianzas de los niveles del factor del modelo. El valor α del estadístico de contrastación de la hipótesis F; en la prueba de Levene, tiene un valor $p > 0.05$; ello informa que no existen diferencias significativas producidas por el azar, demostrándose que las varianzas de los datos de los subgrupos de estudio son similares y la procedencia es de una misma población.

TABLA 09. COMPARACION DE LA INTENSIDAD DEL EFECTO BRONCODILATADOR DEL SALBUTAMOL EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS ADMINISTRADOS A TODOS LOS GRUPOS DE ESTUDIO

PRUEBA DE EFECTOS INTER - SUJETOS

EFECTO BRONCODILAT	SUMA DE CUADRADOS	gl	MEDIA CUADRÁTICA	F	Sig.	Eta Cuadrado parcial
Modelo corregid	12677.78	2	6338.89	63.25	0.000	0.894
Intercept	76570.89	1	76570.89	764.01	0.000	0.981
TRATAMIENT	12677.78	2	6338.89	63.25	0.000	0.894
Error	1503.33	15	100.22			
Total	0752.00	18				
Total Corregido	4181.11	17				

Variable dependiente: BRONCODILATACIÓN

a. R cuadrado= 0.894 (R cuadrada corregida: 0.880)

N = 06 UUA.

FUENTE: Elaboración Personal.

En la Tabla 09, se muestra el contraste principal de igualdad de promedios del efecto broncodilatador del SALBUTAMOL. El valor de α : ($p \leq 0.05$); los promedios fueron significativos, demostrándose que existen diferencias en el porcentaje de broncodilatación en los tres niveles de tratamiento (factor). Es decir que los porcentajes de broncodilatación por efecto del Salbutamol son diferentes en los intergrupos: Grupo control, con humo de cigarrillo y con humo de cigarrillo más ácido ascórbico.

El grado en que cada factor contribuye y finalmente la combinación de todos los factores se estima que afecta a la variable dependiente BRONCODILATACIÓN, en el 88.00%, esta es la proporción de varianza que se explica en el experimento. La diferencia es explicada por otros factores ajenos a la covariable.

TABLA 10. COMPARACION DE LA EFECTIVIDAD DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS EN LA BRONCODILATACIÓN PRODUCIDA POR EL SALBUTAMOL

PRUEBA DE DHS de Tukey

Variable dependiente: BRONCODILATACIÓN

TRATAMIENTO (Comparaciones múltiples)		Dif entre Medias	Error Típ	Significac	Interval. confianza 95%g	
					Lím inf	Lím Sup
1	2	65.00	5.780	0.000	49.99	80.01
	3	33.33	5.780	0.000	18.32	48.35
2	1	-65.00	5.780	0.000	-80.01	-49.99
	3	-31.67	5.780	0.000	-46.68	-16.65
3	1	-33.33	5.780	0.000	-48.35	-18.32
	2	31.67	5.780	0.000	16.65	46.68

Basado en los promedios (medias) observadas.

*La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

SUBCONJUNTOS HOMOGENEOS

Tratamiento	N	Subconjuntos		
		1	2	3
DHS de Tukey				
2	6	33.00		
3	6		64.67	
1	6			98.00
Significación		1.000	1.000	1.000

Se muestran los promedios para los diferentes GRUPOS en subconjuntos homogéneos.

Basada en la suma de cuadrados tipo III.

El término error es la media cuadrática (error) = 100.222

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.0

b. Alfa = 0.05

NIVELES (tratamientos)

1: Control (sin exposición)

2: Exposición al humo de cigarrillo

3: Exposición al humo de cigarrillo más la administración de ácido ascórbico.

FUENTE: Elaboración Personal.

En la Tabla 10; se observan las comparaciones múltiples de los promedios de la broncodilatación, en los diferentes niveles de tratamiento. La efectividad de los tratamientos, en la broncodilatación producida por el

Salbutamol, es diferente ($p \leq 0.05$), aceptándose la contrastación de la H_1 , es decir no hay respuestas iguales o similares entre los diferentes niveles. La significación estadística arribada en el modelo matemático explica que los efectos broncodilatadores del Salbutamol se modifican por la exposición al humo de cigarrillo y al humo de cigarrillo más la administración de ácido ascórbico; siendo el Grupo de Control (I) el del valor referente.

El análisis de la suma de los cuadrados tipo III de la prueba estadística, basados en las comparaciones de la medias armónicas, muestran efectos ÍNTER GRUPOS diferentes. Los promedios de broncodilatación en los anillos bronquiales de segundo orden, son mayores en el Grupo control; y de menor proporción en el Grupo expuesto al humo de cigarrillo. Esta prueba corrobora los resultados de la comparación múltiple con el análisis cuantitativo de las diferencias observadas en los límites de confianza.

En los valores de los subconjuntos homogenizados; se evidencia cuantitativamente que la respuesta de broncodilatación fue mayor en el nivel 1 - Grupo control-, seguido por el nivel 3 (expuesto a humo del cigarrillo más vitamina C) y luego el Grupo expuesto al humo de cigarrillo.

TABLA 11. COMPARACION DE LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO HUMO DE CIGARRILLO MÁS ACIDO ASCORBICO CON LOS EFECTOS DE LOS DEMÁS TRATAMIENTOS EN LA BRONCODILATACION PRODUCIDA POR EL SALBUTAMOL EN LOS OTROS NIVELES DE ESTUDIO

PRUEBA DE Dunnett

Variable dependiente: BRONCODILATACIÓN

T de Dunnett bilateral ^a

TRATAMIENTO (Comparaciones múltiples)		Dif entre Medias	Error Típ	Significac	Interval. confianza 95%ig	
					Lím inf	Lím Sup
1	3	65.00	5.780	0.000	19.24	47.43
2	3	-31.67	5.780	0.000	-46.68	-17.57

Basado en las medias observadas

* La diferencia de medias es significativa al nivel .05

^a Las pruebas t de Dunnett tratan al grupo que está expuesto a humo del cigarrillo y vitamina C como CONTROL y lo comparan con los demás grupos.

GRUPOS

1: Control (sin exposición)

2: Exposición a humo del cigarrillo.

3: Exposición a humo del cigarrillo con administración de ácido ascórbico.

FUENTE: Elaboración Personal.

Tabla 11. El modelo matemático compara el efecto del tratamiento motivo de estudio (2) la exposición al humo de cigarrillo más la administración de ácido ascórbico, con el Grupo expuesto al humo de cigarrillo y el grupo control (sin exposición). La contrastación de la hipótesis tiene un valor debido al azar ($p \leq 0.05$). Por el análisis de los intervalos de confianza; los resultados nos indican que ninguno de los otros dos grupos tiene efectos similares a los efectos de la exposición al humo de cigarrillo más la administración de ácido ascórbico. Por lo que existe suficiente información para no aceptar las asunciones de la H_0 . Lo confirman los valores de los límites de confianza que no incluyen valores nulos.

PRODUCCION DE MALONALDEHIDO

(nM / g)



CARACTERISTICAS GENERALES

TABLA 12. DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DE LA CONCENTRACION DE MALONALDEHIDO EN EL GRUPO DE CONTROL.

NIVEL 1 Malonaldehido (nM/g)	Número de Ratas	Frecuencias Acumuladas	%	% Acumulado
0.95>x≤1.00	1	1	16.67	16.67
1.00>x≤1.05	1	2	16.67	33.33
1.05>x≤1.10	1	3	16.67	50.00
1.10>x≤1.15	1	4	16.67	66.67
1.15>x≤1.20	2	6	33.33	100.00
TOTAL	6		100.00	

N= 06 UUA.

SUPUESTO DE NORMALIDAD.

Prueba de Shapiro-Wilks: W: 0. 66789 (p = 0. 00279)

FUENTE: Elaboración Personal.

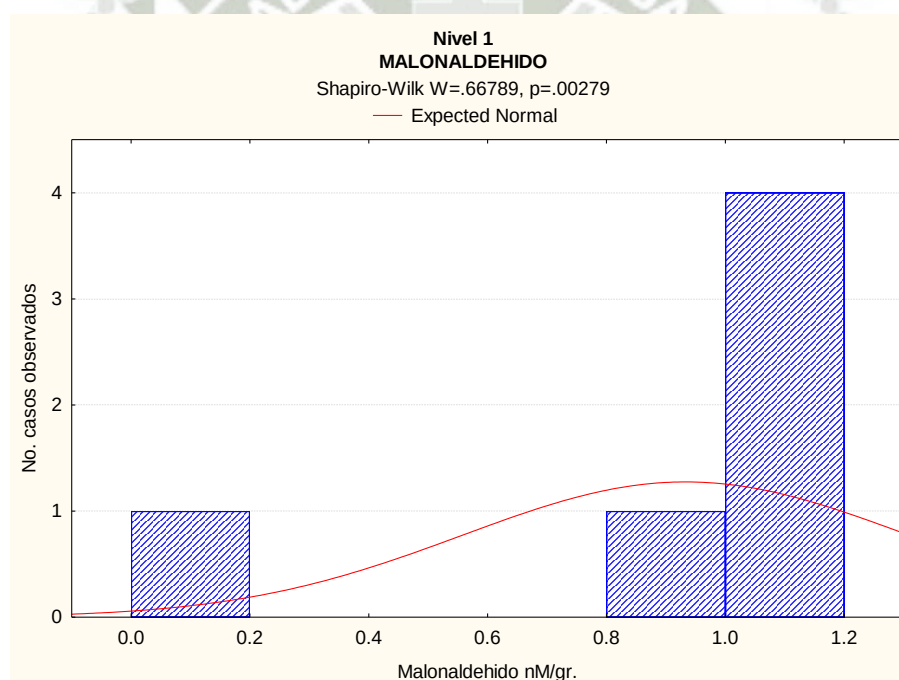


FIGURA 05 DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DE LA CONCENTRACION DE MALONALDEHIDO EN EL GRUPO DE CONTROL

FUENTE: Elaboración Personal.

Tabla 12 y Figura 05; muestran la distribución de los porcentajes de la producción de malonaldehído en el Grupo control. La mayor frecuencia del porcentaje de producción de éste se encuentra en el rango de $[1.15 < x \leq 1.20]$ 02 casos, 33.33% de frecuencias.

No se cumple el supuesto de normalidad ($p \leq 0.05$), como se observa en la Figura 05.



TABLA 13. DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DE LA CONCENTRACION DE MALONALDEHIDO EN EL GRUPO EXPUESTO AL HUMO DE CIGARRILLO

NIVEL 2 Malonaldehído (nM/g)	Número de ratas	Frecuencias acumuladas	%	% Acumulado
1.40>x≤1.50	1	1	16.67	16.67
1.50>x≤1.60	0	1	0.00	16.67
1.60>x≤1.70	1	2	16.67	33.33
1.70>x≤1.80	1	3	16.67	50.00
1.80>x≤1.90	1	4	16.67	66.67
1.90>x≤2.00	2	6	33.33	100.00
TOTAL		6	100.00	

N= 06 UUA.

SUPUESTO DE NORMALIDAD.

Prueba de Shapiro-Wilks: W: 0.90142 (p = 0.382419)

FUENTE: Elaboración Personal.

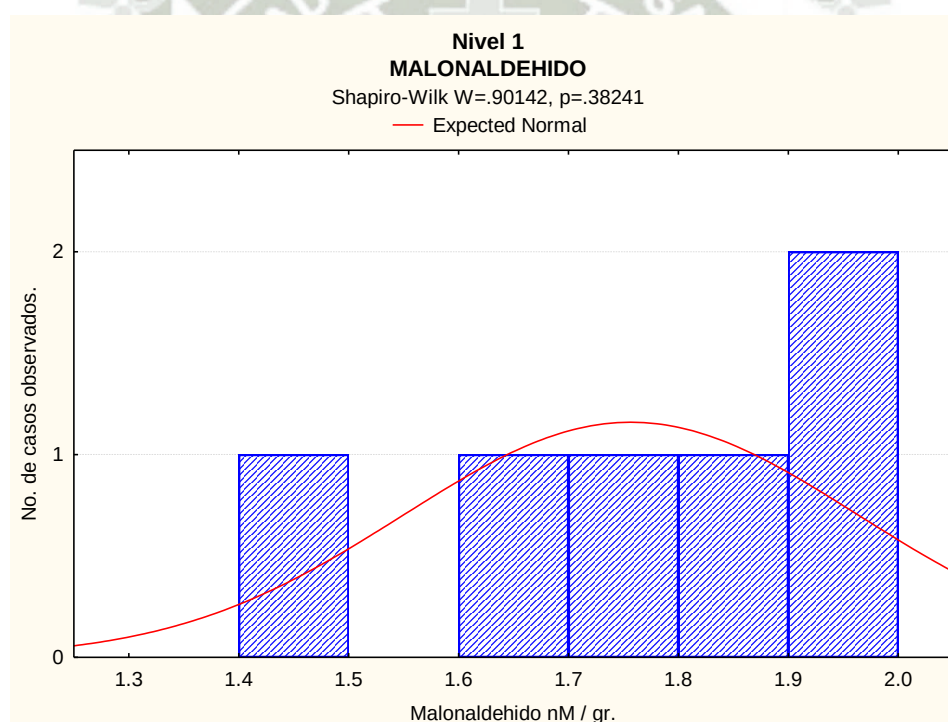


FIGURA 06. DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DE LA CONCENTRACION DE MALONALDEHIDO EN EL GRUPO EXPUESTO AL HUMO DE CIGARRILLO

En la Tabla 13, la mayor frecuencia en la proporción de producción de malonaldehído se observó en el rango de $[1.90 > x \leq 2.00]$, constituyendo 1/3 (2 casos); los valores máximos están en este rango; comparando con los máximos valores del Grupo de control; el efecto del humo de cigarrillo

aumenta la producción de malonaldehído en 1.6, en sus valores máximos y de mayor frecuencia relativa para ambos grupos.

La observación de la Figura 06, informa que esta distribución cumple con el supuesto de normalidad ($p > 0.05$).



TABLA 14. DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DE LA CONCENTRACION DE MALONALDEHIDO EN EL GRUPO EXPUESTO AL HUMO DE CIGARRILLO Y VITAMINA C

NIVEL 3 Malonaldehido (nM/g)	Número de ratas	Frecuencias Acumuladas	%	% Acumulado
1.10>x≤1.15	2	2	33.33	33.33
1.15>x≤1.20	1	3	16.67	50.00
1.20>x≤1.25	2	5	33.33	83.33
1.25>x≤1.30	0	5	0.00	83.33
1.30>x≤1.35	1	6	16.67	100.00
TOTAL		6	100.00	

N= 06 UUA.

SUPUESTO DE NORMALIDAD.

Prueba de Shapiro-Wilks: W: 0.96676 (p = 0.87003)

FUENTE: Elaboración Personal.

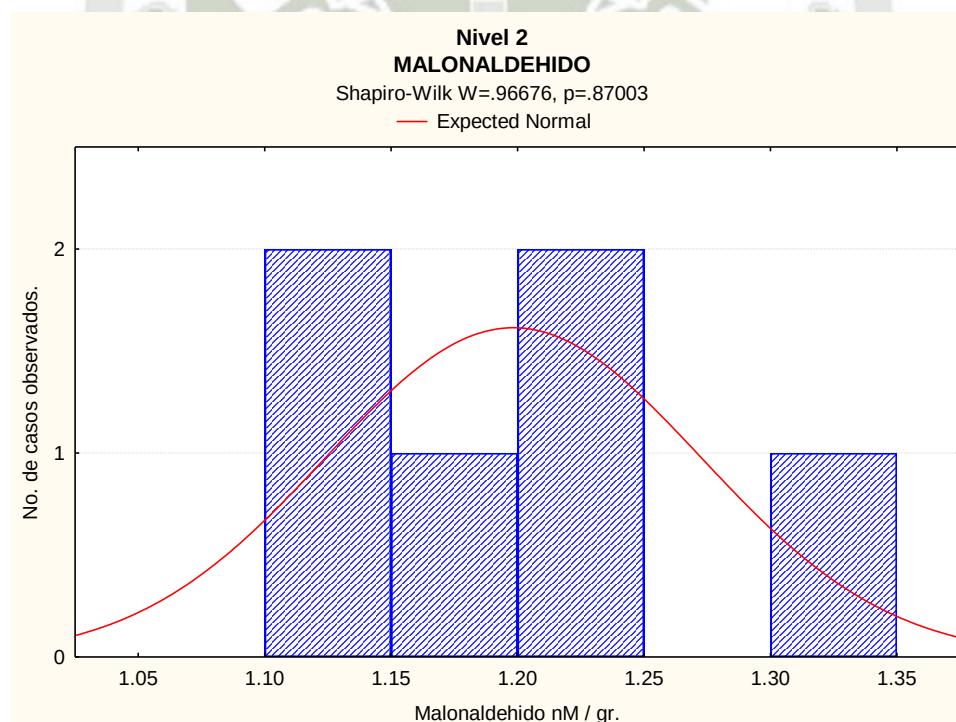


FIGURA 07 DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DE LA CONCENTRACIÓN DE MALONALDEHIDO EN EL GRUPO EXPUESTO AL HUMO DE CIGARRILLO Y VITAMINA C

En la Tabla 14 y Figura 07, se evidencia que la distribución del Grupo de unidades de experimentación expuestas al humo de cigarrillo con la administración de ácido ascórbico, es de tipo bimodal, mostrando frecuencias del 33.33% (02 casos) en los rangos $[1.10 > x \leq 1.15]$ y $[1.20 > x \leq 1.25]$.

Comparando esta distribución con los rangos del grupo de control son de cuantificación similar. Comparando los rangos con valores máximos del Grupo de las unidades expuestas al humo de cigarrillo, tienen una diferencia proporcional próxima a la unidad.



TABLA 15. CARACTERÍSTICAS DE LOS ESTIMADORES ESTADÍSTICOS DE LA CONCENTRACION DE MALONALDEHIDO EN LOS DIFERENTES NIVELES DE TRATAMIENTO

Estadísticos	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
Media	1.10 ± 0.16	1.76 ± 0.43	1.20 ± 0.16
Mediana	1.12	1.82	1.20
Media Geométrica	1.10	1.73	1.20
Media Armónica	1.10	1.73	1.19
Varianza	0.0062	0.0426	0.0055
C.V.	0.07	0.12	0.06
DE.	0.08	0.21	0.07
E E M	0.03	0.08	0.03
Máx.	1.18	1.95	1.31
Mín.	0.98	1.41	1.11
Rango	0.20	0.54	0.20
Límite de confianza			
-95.00%	1.02	1.54	1.12
+95.00%	1.18	1.97	1.28

N = 06 UUA.

FUENTE: Elaboración Personal.

En la Tabla 15; se expone los estimadores estadísticos de la producción del malonaldehído en sus diferentes niveles de tratamiento. Las medidas de tendencia central (media aritmética, mediana, media geométrica y media armónica) demuestran que las muestras aleatorizadas tienen una distribución simétrica, favoreciendo sus comparaciones intersujeto e intragrupos. Las diferencias entre las medidas de dispersión DE y el EEM, son menores a la unidad, demostrando que la distribución de los datos obtenidos son homogéneos y comparables. La variabilidad de los datos tienen diferencias de varianza mínimas, mostrando coeficientes de variación próximos los niveles 1 y 3, marcando una diferencia leve el nivel 2

con los dos niveles anteriores, sin embargo las diferencias son despreciables por lo que asumimos que los datos son homocedásticos con rangos cortos. Los valores cuantificados de los límites de confianza y sus diferencias nos llevan a concluir que las asociaciones que se realizaron fueron significativas y los tamaños muestrales son adecuados.



TABLA 16. IGUALDAD DEL ERROR DE VARIANZAS DE LOS DIFERENTES NIVELES DE TRATAMIENTO EN EL EFECTO DE LA PROPORCION DE PRODUCCION DE MALONALDEHIDO

TRATAMIENTOS (Niveles 1,2,3)	$\bar{X}$	D.E	EEM
Control	1.1000	0.07874	0.03
Humo de cigarrillo	1.7567	0.20646	0.08
Humo cigarrillo Ac. Ascórb.	1.1983	0.07414	0.03

CONTRASTE DE LEVENE: F: 2.108 gl_1 : 2 gl_2 : 15 (p: 0.156)
(p > 0.05)

En la Tabla 16, se analizó el supuesto de homogeneidad del error de varianzas. Las observaciones hechas sobre los estimadores descriptivos, se confirman con la contrastación de la hipótesis con la prueba de Levene, con un valor de $p > 0.05$. Concluimos que los errores de varianza son similares, demostrándonos que las muestras aleatorizadas provienen de una misma población.

**PRODUCCION DE MALONALDEHIDO
EN LOS DIFERENTES NIVELES DE
TRATAMIENTO**

MODELO MATEMATICO

ELEMENTOS

Variable Dependiente: MALONALDEHIDO nM/g.

FACTOR:

Grupos:

Nivel 1: Grupo Control

Nivel 2: Exposición a humo de cigarrillo

Nivel 3: Exposición a humo de cigarrillo y ácido ascórbico.

DISEÑO

Unifactorial Aleatorio multigrupos

REPLICAS:

Cada unidad última de análisis (rata) bajo un solo tratamiento.

Número de replicas 18 UUA.

8. MODELO

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij}$$

$i = 1, \dots, 3$ (tratamientos)

$j = 1, \dots, 6$ (N° de unidades de experimentación)

μ = Media poblacional de Y.

$\alpha_i = \mu_i - \mu$ (efecto medio adicional debido al tratamiento con i)

Con la condición: $\sum_{i=1}^3 \alpha_i = 0$

e_{ij} = Error cuadrático

$e_{ij} \approx \mu$ (0, G) independientes

9. PRUEBA DE LA HIPOTESIS

Análisis Unifactorial de Varianza.

Hipótesis Nula H_0

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_j + E_{ij}$$

Hipótesis Alternativa

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$$

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_j + E_{ij}$$

Estadístico de contraste: F

10. SUPUESTOS DEL MODELO MATEMATICO NORMALIDAD

Prueba de Shapiro - Wilk

$$Y \cong N(\mu, \sigma_y^2)$$

HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS

Prueba de Levene

$$\sigma_i^2 = \sigma_j^2 = \sigma_y^2, \forall i \neq j$$

INDEPENDENCIA

$$E_{ij} \cong N(0, \sigma_E^2)$$

11. COMPARACIONES MÚLTIPLES

Comparaciones múltiples

Prueba HSD Tukey

Comparaciones entre pares

Prueba de Dunnett

TABLA 17. COMPARACION DE LA CONCENTRACION DE MALONALDEHÍDO EN LOS DIFERENTES NIVELES DE TRATAMIENTO ADMINISTRADOS

PRUEBA DE EFECTOS INTER - SUJETOS

EFFECTO MALONALDE.	SUMA DE CUADRADOS	gl	MEDIA CUADRÁTICA	F	Sig.	Eta Cuadrado parcial
Modelo corregid	2.12	2	1.06	16.82	0.000	0.692
Intercept	30.23	1	30.24	480.00	0.000	0.970
TRATAMIENT	2.12	2	1.06	16.82	0.000	0.692
Error	0.95	15	6.30.E-02			
Total	33.30	18				
Total Corregido	3.07	17				

Variable dependiente: MALONALDEHIDO

a. R cuadrado= 0.692 (R cuadrada corregida: 0.651)

N = 06 UUA.

FUENTE: Elaboración Personal.

En la Tabla 17, se demuestra que los promedios de la producción del malonaldehído fueron estadísticamente significativos ($p \leq 0.05$). Es decir que las cantidades producidas de malonaldehído fueron diferentes en cada nivel o tratamiento. La proporción de varianza que explica el efecto de cada uno de los niveles y la combinación de estos, del factor se estimó en el 65.10%.

TABLA 18. COMPARACION DE LA EFECTIVIDAD DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS EN LA PRODUCCION DEL MALONALDEHIDO POR EL EFECTO OXIDATIVO DEL HUMO DE CIGARRILLO

PRUEBA DE DHS de Tukey

Variable dependiente: MALONALDEHIDO.

TRATAMIENTO (Comparaciones múltiples)		Diferencia entre medias	Error Típ	Significac	Interval. confianza 95%ig	
					Lím inf	Lím Sup
1	2	-0.82	0.145	0.000	-1.20	-0.45
	3	-0.29	0.145	0.194	-0.64	-0.11
2	1	-0.82	0.145	0.000	0.45	1.20
	3	-0.56	0.145	0.004	0.19	0.93
3	1	0.27	0.145	0.194	-0.11	0.64
	2	-0.56	0.145	0.004	-0.93	-0.19

Basado en los promedios (medias) observadas.

*La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

SUBCONJUNTOS HOMOGENEOS

Tratamiento	N	Subconjuntos	
		1	2
DHS de Tukey			
1	6	0.93	
2	6	1.20	
3	6		1.76
Significación		0.194	1.000

Se muestran los promedios para los diferentes GRUPOS en subconjuntos homogéneos.

Basada en la suma de cuadrados tipo III.

El término error es la media cuadrática (error) = 100.222

c. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.0

d. Alfa = 0.05

NIVELES (tratamientos):

1: Control (sin exposición)

2: Exposición a humo del cigarrillo.

3: Exposición a humo del cigarrillo con administración de ácido ascórbico.

FUENTE: Elaboración Personal.

La prueba de las comparaciones múltiples en base a los promedios con un nivel de significación aceptado 0.05, teniendo como valor de referencia el de los controles.

Se observó que la producción de malonaldehído en el Grupo de control fue similar, estadísticamente con la producción en el Grupo de expuestos a humo de cigarrillo con ácido ascórbico ($p > 0.05$) y fue diferente con el Grupo expuesto a humo de cigarrillo ($p \leq 0.05$). La producción de malonaldehído fue diferente entre el Grupo expuesto a humo de cigarrillo y el Grupo expuesto a humo de cigarrillo más ácido ascórbico.

El análisis de la suma de los cuadrados tipo III de la prueba estadística, basados en las comparaciones de la medias armónicas, muestra efectos ÍNTER GRUPOS diferentes. La mayor producción de malonaldehído por efecto oxidativo del humo de cigarrillo, fue mayor en el Grupo de expuestos a humo de cigarrillo; siendo menor en el Grupo de control y los valores muy próximos en los expuestos al humo de cigarrillo y ácido ascórbico.



TABLA 19. COMPARACION DE LOS EFECTOS DE LOS NIVELES DE TRATAMIENTO HUMO DE CIGARRILLO Y ÁCIDO ASCORBICO CON LA PRODUCCION DE MALONALDEHIDO.

PRUEBA DE DHS de Dunnett

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: MALONALH

t de Dunnet (bilateral)^a

(I) TIPOTRAT	(J) TIPOTRAT	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	3	-.2650	.14491	.152	-.6185	.0885
2	3	.5583*	.14491	.003	.2049	.9118

Basado en las medias observadas.

*. La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.

GRUPOS

1: Control (sin exposición)

2: Exposición al humo del cigarrillo.

3: Exposición al humo del cigarrillo con administración de ácido ascórbico.

FUENTE: Elaboración Personal.

El estadístico T de Dunnett, corrobora que la producción de malonaldehído en el Grupo de control y el Grupo expuesto al humo de cigarrillo más ácido ascórbico fue similar ($p > 0.05$), con intervalos de confianza que incluyen al valor nulo. En el Grupo de expuestos a humo de cigarrillo y a humo de cigarrillo más ácido ascórbico, la producción de malonaldehído fue diferente ($p \leq 0,05$).

CAPITULO III

DISCUSION

Si bien se sabe que el fumar cigarrillos es una causa de estrés oxidativo²¹ -así como también el oxígeno hiperbárico³¹ y el cloruro de mercurio ¹⁹-, hay muchos aspectos que aún son desconocidos respecto a los efectos del humo del cigarrillo por lo que esta investigación fue realizada con el propósito de determinar el efecto del ácido ascórbico sobre el estrés oxidativo producido por la inhalación pasiva del humo de cigarrillo en ratas de experimentación que fueron divididas en 3 grupos de 6 unidades de estudio cada uno: Grupo I: control, Grupo II : expuesto a humo del cigarrillo y Grupo III: expuesto a humo del cigarrillo más ácido ascórbico.

La exposición duró cuatro semanas al cabo de las cuales se sacrificaron las unidades de estudio y se procedió a realizar la medición del efecto broncodilatador como respuesta al salbutamol en bronquiolos de segundo orden en todas las unidades de estudio así como también la medición del nivel de estrés oxidativo por medio de la valoración del malonaldehído en el tejido pulmonar de los animales sacrificados encontrándose, como se aprecia en la Tabla 3 y en la Figura 1, que estos efectos (broncodilatación y producción de malonaldehído) tienen vías y comportamientos independientes por lo que no interactúan entre sí y por lo tanto no son comparables.

Observando los resultados de las Tablas 4, 5 y 6 podemos asumir que el ácido ascórbico podría intervenir en mejorar la acción broncodilatadora del salbutamol, al parecer limitada por los efectos broncoconstrictivos del humo del cigarrillo; es decir que la adición de ácido ascórbico aumentaría la proporción de broncodilatación cuando se administra a las ratas expuestas a humo del cigarrillo. Estos resultados son similares a los reportados por Kamachi et al²⁹ que sugieren que el uso de salbutamol aumenta la respuesta de la vía aérea en un modelo de ratas con asma atópica.

Al observar la Tabla 7 podemos decir que el tamaño de la muestra y el de los grupos en comparación son aceptables y representativos de la población de la que provienen.

Por otro lado en la Tabla 8 demostramos que las varianzas de los datos de los subgrupos de estudio son similares y la procedencia es de una misma población.

En las Tablas 9, 10 y 11 observamos que el porcentaje de broncodilatación por efecto del agonista β_2 salbutamol, cuya acción in vivo es de inicio rápido²⁵, resultó diferente en los intergrupos: Grupo control, Grupo con humo de cigarrillo y Grupo con humo de cigarrillo más ácido ascórbico; existiendo una mayor broncodilatación en el Grupo control seguida del Grupo expuesto al humo del cigarrillo más ácido ascórbico y finalmente la broncodilatación es menor en el Grupo expuesto al humo del cigarrillo, sugiriéndonos esto el probable efecto protector del ácido ascórbico confirmando la hipótesis planteada. Estos resultados coinciden con los reportados por Gonzáles-Mandago y Morera²⁶ en su estudio que demostró que en las ratas sometidas al humo del tabaco que además reciben N- acetil-cisteína (antioxidante) se produce una inhibición casi total de la activación del factor nuclear NF- κ B, factor de transcripción de numerosos genes de citocinas, o expresión del factor de crecimiento beta (TGF- β) sin presentar valores distintos a los del Grupo control. Se ha visto, por otro lado, que el humo del tabaco induce la activación del factor nuclear NF- κ B, de la expresión del colágeno pulmonar y del TGF- β , un poderoso agente fibrogénico³⁶.

En cuanto a la producción de malondialdehído (MDA), producto final de la oxidación de ácidos grasos³⁰, en las Tablas 12,13 y 14 apreciamos la distribución de frecuencias de la concentración de MDA, en los Grupos control, expuesto al humo del cigarrillo y expuesto al humo del cigarrillo más ácido ascórbico. Comparando los valores máximos del Grupo control con los valores máximos del Grupo expuesto al humo del cigarrillo encontramos que en este último Grupo la producción de MDA aumenta en 1.6. Comparando también la distribución del Grupo expuesto al humo del cigarrillo más ácido ascórbico con

los rangos del Grupo de control apreciamos que son de cuantificación similar y comparando los rangos del Grupo expuesto al humo del cigarrillo más ácido ascórbico con las unidades expuestas al humo del cigarrillo encontramos que hay una diferencia proporcional próxima a la unidad. Estos resultados concuerdan con los hallados por Bloomer²⁰ quien encontró un nivel estadísticamente significativo mayor de MDA en plasma de fumadores frente a no fumadores. El efecto del ácido ascórbico sobre el nivel de MDA en el Grupo III es similar al encontrado por: (i) Deger et al²⁴ en su estudio que evaluó el efecto protector del alfa tocoferol sobre el estrés oxidativo en fibrosis pulmonar experimental en ratas; (ii) Cruz et al²² cuando encontró que la melatonina previene el estrés oxidativo cerebral inducido por ictericia obstructiva en ratas; (iii) Ozturk et al³² en su trabajo acerca del efecto del celecoxib sobre el estrés oxidativo hepático inducido por isquemia/reperfusión en ratas; y (iv) Johnsen-Soriano et al²⁸ en su estudio del efecto del ebselen sobre el estrés oxidativo en la retina de la rata inducido por la administración crónica de etanol. Así podemos decir que los 4 últimos grupos de investigadores señalados en este párrafo encontraron que diversos tratamientos disminuyen los niveles de MDA en diferentes órganos, al igual que nuestros hallazgos en los pulmones de las ratas del Grupo expuesto al humo de cigarrillo más la administración suplementaria de ácido ascórbico (Grupo III). Con esto también confirmamos la hipótesis planteada. Sin embargo encontramos en el estudio de Darko et al²³ que al usar vitamina C en pacientes con diabetes tipo II no se encontró una disminución en el estrés oxidativo evaluado a través de las concentraciones plasmáticas de 8-epi-prostaglandina-F_{2α}. Este resultado es inesperado pero podría relacionarse a la fuente del estrés oxidativo, la vitamina C es efectiva en hurgar por los aniones superóxido extracelulares, pero relativamente inefectiva al hacerlo con los aniones superóxido intracelulares, y es posible que éstos últimos sean una fuente más importante de aniones superóxido en la diabetes que en otras condiciones asociadas con estrés oxidativo, particularmente con el fumar²³.

En la Tabla 15 se aprecia los estimadores estadísticos de la concentración de MDA en los diferentes niveles de tratamientos demostrándose con las medidas de tendencia central que las muestras aleatorizadas tienen una distribución

simétrica, favoreciendo las comparaciones intersujeto e intragrupos. Las diferencias entre las medidas de dispersión siendo menores a la unidad demuestran que la distribución de los datos obtenidos es homogénea y comparable. Los valores cuantificados de los límites de confianza y sus diferencias nos llevan a decir que las asociaciones que se realizaron fueron significativas y los tamaños de muestra son adecuados.

La Tabla 16 nos permite concluir que los errores de varianza son similares, demostrándonos que las muestras aleatorizadas provienen de una misma población.

Dado que el consumo de tabaco es el principal factor etiológico necesario para el desarrollo de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y sabiendo que el estrés oxidativo está aumentado en estos pacientes de forma que los radicales libres son importantes en la fisiopatología de la enfermedad³⁵. Este hecho sugiere que los fármacos antioxidantes pueden ser de utilidad en el tratamiento de la EPOC³⁵. Considerando lo señalado en este párrafo observamos en la Tabla 17 que las cantidades producidas de MDA fueron diferentes en cada grupo lo cual podría ser por la muy probable EPOC producida a las ratas expuestas al humo del cigarrillo (Grupo 2) y por el probable efecto antagonizante de los mediadores de la inflamación del ácido ascórbico produciendo la disminución del nivel de MDA observado en el Grupo III ó expuesto al humo del cigarrillo más el suplemento de ácido ascórbico.

Se observó, en la Tabla 18, que la producción de MDA en el Grupo control fue estadísticamente similar a la del Grupo de expuestos al humo del cigarrillo más ácido ascórbico y fue diferente al Grupo expuesto a humo de cigarrillo. La producción de MDA también fue diferente entre el Grupo expuesto a humo de cigarrillo y el Grupo expuesto al humo de cigarrillo más ácido ascórbico. El análisis de la suma de los cuadrados tipo III de la prueba estadística muestra efectos intergrupos diferentes. La mayor producción de MDA por efecto oxidativo del humo de cigarrillo fue mayor en el Grupo de expuestos a humo de cigarrillo, siendo menor en el Grupo control, con valores muy próximos en los expuestos al humo de cigarrillo más ácido ascórbico.

Con el estadístico T de Dunnett se corrobora, como se observa en la Tabla 19, que la producción de MDA en el Grupo control y el Grupo expuesto al humo del cigarrillo más vitamina C fue similar y la producción de MDA en el Grupo de expuestos al humo de cigarrillo y expuestos al humo de cigarrillo más ácido ascórbico fue diferente.

Los resultados observados en las Tablas 17 a 19 coinciden con los hallazgos reportados por Ozyurt et al³³ en cuanto a que la exposición al humo de cigarrillo produce elevación de MDA estadísticamente significativa frente al Grupo no expuesto. Otros autores como Helen y Vijayammal²⁷ señalan respecto a los resultados de su estudio que “parecen sugerir que el consumo de una megadosis de vitamina C puede proteger al hígado del daño oxidativo causado por el fumar cigarrillos” esto debido a que el suplemento de vitamina C a ratas expuestas a humo de cigarrillo mostró una resistencia incrementada a la peroxidación lipídica. Si bien estos hallazgos se han dado en otro órgano (hígado) podemos pensar que el efecto protector pulmonar del suplemento de ácido ascórbico observado en las ratas expuestas al humo del cigarrillo de nuestro experimento se debería al mismo mecanismo que señalan Helen y Vijayammal²⁷.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Primera: En las ratas expuestas al humo del cigarrillo se encontró una disminución del efecto broncodilatador del salbutamol en comparación a los animales no expuestos.

Segunda: La administración de ácido ascórbico a las ratas expuestas al humo del cigarrillo determinó un aumento del efecto broncodilatador del salbutamol.

Tercera: El nivel de malonaldehído pulmonar en las ratas expuestas al humo del cigarrillo fue más alto en comparación con el grupo control.

Cuarta: La administración de ácido ascórbico a las ratas expuestas al humo del cigarrillo prácticamente normalizó los niveles de malonaldehído.

Se evidencia en las conclusiones segunda y cuarta el efecto protector del ácido ascórbico con lo que se comprueba plenamente la hipótesis planteada.



RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

- Primera:** Investigar el efecto del sistema antioxidante no enzimático de la vitamina E y carotenos frente al efecto oxidante en el pulmón, del humo de cigarrillo.
- Segunda:** Investigar el mecanismo intrínseco por el cual el suplemento de ácido ascórbico en ratas expuestas a humo de cigarrillo produce una resistencia incrementada a la peroxidación lipídica en el pulmón de éstas.
- Tercera:** Investigar si los hallazgos de este trabajo pueden ser extrapolados a los seres humanos para prevenir, de alguna manera, los efectos nocivos de la inhalación pasiva del humo de cigarrillo que tanto afecta a nuestra población.
- Cuarta:** Promover, desde los niveles iniciales de la educación y en todo nivel, la cultura de no fumar haciendo hincapié en los daños a la salud relacionados con este hábito tan nocivo.
- Quinta:** Promover el consumo de dietas ricas en antioxidantes, especialmente ácido ascórbico que se encuentra principalmente en el camu camu, la acerola, el casho, la naranja, la guanábana, el limón entre otras fuentes vegetales. Sobre todo en los hogares donde ya existe el problema del tabaquismo para así revertir el estrés oxidativo producido por el humo del cigarrillo primordialmente en los menores de edad quienes muchas veces, por su misma condición, no tienen independencia para optar por el no fumar pasivamente.



REFERENCIAS

BIBLIOGRAFIA

1. BARTAL M. (2001), Health effects of tobacco use and exposure. Monaldi Arch Chest Dis;56:545-54
2. KÖNIG HORST (2005), Anatomía de los animales domésticos. Editorial médica panamericana. Madrid. pg 97.
3. OUTTERIDGE, P. (1985), Inmunología Veterinaria. Acribia, S.A., Zaragoza España. pg. 247.
4. STITES DANIEL P. Y PARSLOW T. (1998), Inmunología Básica y Clínica. El Manual Moderno. México, pg 79.

INFORMATIGRAFIA

5. <http://www.saludpublica.com/ampl/ampl16/05o04002.htm>
6. <http://www.inmunologia-online.tripod.com>, 2005/10/30.
7. <http://www.uned.es/pea-nutricion-y-dietetica-l/guia/infancia/alergias.htm>. 2005/11/03.
8. <http://www.drzurita.com/alergias.html>. 2005/11/03
9. <http://www.revista.seaic.es/extraalergiajunio2001/39-45.pdf>. 2005/11/03
10. <http://www.quimicayciencias.cjb.net>. 2005/12/06.
11. <http://www.zonadiet.com/nutricion/vit-c.htm>.2006/11/13.
12. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pmcentrez&artid=44467>.2006/11/10.
13. <http://www.bio.puc.cl/vinsalud/boletin/22estres.htm>
14. <http://www.neogym-online.com/nutest.htm>
15. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/medmaster/a682145-es.html>
16. http://www.camucamuperu.com/camucamu_informacion.htm.2008/2/23
17. <http://www.botanical-online.com/medicinalesvitaminac.htm>.2008/2/23
18. http://es.wikipedia.org/wiki/Rattus_rattus

HEMEROGRAFIA

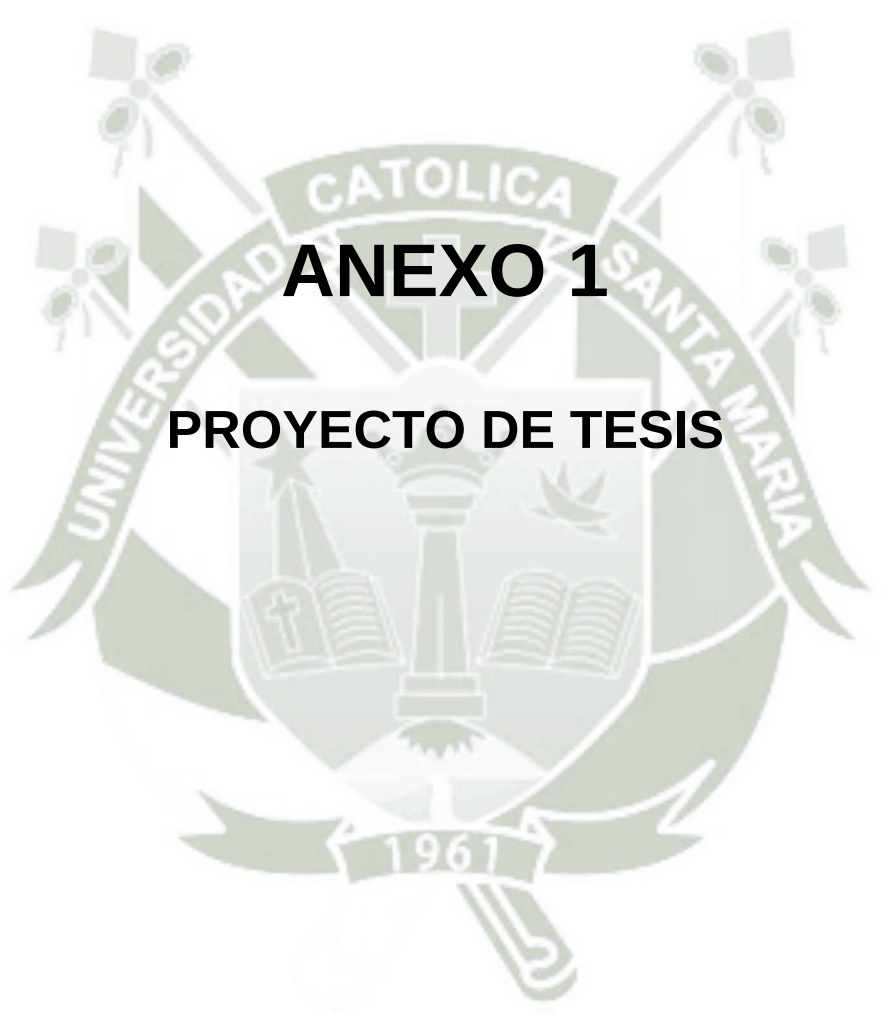
19. Augusti PR, Conterato GM, Somacal S, Sobieski R, Spohr PR, Torres JV, Charao MF, Moro AM, Rocha MP, Garcia SC, Emanuelli T. (2008) Effect

- of astaxanthin on kidney function impairment and oxidative stress induced by mercuric chloride in rats. *Journal Article. Food Chem Toxicol.* 46(1):212-9.
20. Bloomer RJ. (2007) Decreased blood antioxidant capacity and increased lipid peroxidation in young cigarette smokers compared to nonsmokers: Impact of dietary intake. [Journal Article. Research Support, Non-U.S. Gov't] *Nutrition Journal.* 6:39.
 21. Bruno RS. Traber MG. (2006) Vitamin E biokinetics, oxidative stress and cigarette smoking. [Journal Article] *Pathophysiology.* 13(3):143-9.
 22. Cruz A. Tunez I. Martinez R. Munoz-Castaneda JR. Ramirez LM. Recio M. Ochoa L. Arjona A. Montilla P. Muntane J. Padillo FJ. (2007) Melatonin prevents brain oxidative stress induced by obstructive jaundice in rats. [Journal Article] *Journal of Neuroscience Research.* 85(16):3652-6.
 23. Darko D, Dornhorst A, F J Nelly F J, Ritter J M, Chowienczyk P J. (2002) Lack of effect of oral vitamin C on blood pressure, oxidative stress and endothelial function in Type II diabetes. *Clinical Science* 103, (339–344) (Printed in Great Britain).
 24. Deger Y. Yur F. Ertekin A. Mert N. Dede S. Mert H. (2007) Protective effect of alpha-tocopherol on oxidative stress in experimental pulmonary fibrosis in rats. [Journal Article] *Cell Biochemistry & Function.* 25(6):633-7.
 25. Echave-Sustaeta JM, Villena Garrido MV y Pérez V. (2002) Nuevos avances en el tratamiento de la EPOC. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud Vol 26-Nº 2. España.* (34-43).
 26. Gonzáles-Mandago N y Morera Prat J. (2001) Oxidación celular y fármacos mucoactivos antioxidantes. *Arch Bronconeumol*; 37: 407 - 410 ISSN : 0579-2129. *España.*
 27. Helen A. Vijayammal PL. (1997) Vitamin C supplementation on hepatic oxidative stress induced by cigarette smoke. [Journal Article] *Journal of Applied Toxicology.* 17(5):289-95.
 28. Johnsen-Soriano S. Genoves JM. Romero B. Muriach M. Sancho-Tello M. Bosch-Morell F. Romero FJ. (2007) [Chronic ethanol feeding induces oxidative stress in the rat retina: treatment with the antioxidant ebselen.]. [Spanish] [English Abstract. Journal Article] *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología.* 82(12):757-62.

29. Kamachi A, Munakata M, Nasuhara Y, Nishimura M, Ohtsuka Y, Amishima M, Takahashi T, Homma Y, Kawakami Y. (2001) Enhancement of goblet cell hyperplasia and airway hyperresponsiveness by salbutamol in a rat model of atopic asthma. *Thorax*. 56(1):19-24.
30. Mahmut Bulut, Salih Selek, H. Serdar Gergerlioglu, Haluk A. Savas, H. Ramazan Yilmaz, Murat Yuce, and Giyasettin Ekici (2007) Malondialdehyde levels in adult attention-deficit hiperactivity disorder. *Journal of Psichiatry & Neuroscience*.32(6): 435-438.
31. Öter S. Topal T. Sadir S. Ozler M. Uysal B. Ay H. Yaren H. Korkmaz A. Akin A. (2007) Oxidative stress levels in rats following exposure to oxygen at 3 atm for 0-120 min. [Journal Article. Research Support, Non-U.S. Gov't] *Aviation Space & Environmental Medicine*. 78(12):1108-13.
32. Ozturk H. Gezici A. Ozturk H. (2006) The effect of celecoxib, a selective COX-2 inhibitor, on liver ischemia/reperfusion-induced oxidative stress in rats. [Journal Article] *Hepatology Research*. 34(2):76-83.
33. Ozyurt Huseyin, Pekmez Hidir, Parlaktas Bekir Suha, Kus Ilter, Ozyurt Birsen & Sarsilmaz Mustafa (2006) Oxidative stress in testicular tissues of rats exposed to cigarette smoke and protective effects of caffeic acid phenethyl ester. *Asian Journal of Andrology*. 8(2):189-193.
34. Ramírez J, Palacios M y Gutiérrez O. (2007) Implementación de la técnica en órgano aislado vascular como herramienta para la validación de plantas medicinales: Estudio del efecto vasodilatador de la Salvia scutellarioides. *Colomb. Med.*, ene./mar. vol.38, no.1, p.28-33. ISSN 1657-9534.
35. Rodríguez J M, López Martín S, De Lucas Ramos P. (2006) Avances en el tratamiento de la EPOC. *Rev Patol Respir* 9 (Supl. 2): España. (124-131).
36. Rubio ML, Ortega M, Sánchez-Cifuentes MV, Martín Mosquero MC, Peces-Barba G, González Mangado N. (1999) Expression of extracellular matrix proteins and transforming growth factor- β in rats following exposure to cigarette smoke role of n-acetylcysteine. *Eur Respir J* ; 14 (Supl 30): S297.



ANEXOS



ANEXO 1

PROYECTO DE TESIS

“EFECTO DEL ACIDO ASCORBICO SOBRE EL ESTRES OXIDATIVO PRODUCIDO POR LA INHALACION DE HUMO DE CIGARRILLO EN RATAS”

I. PREAMBULO

Los cigarrillos son un producto de consumo con características muy peculiares dentro de las que destaca una fatal dado que estando autorizados matan directamente a sus consumidores. El consumo de tabaco provoca en todo el mundo alrededor de 4 millones de muertes anuales, y está relacionado con enfermedades respiratorias, entre ellas el enfisema y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedades cardiovasculares y, al menos, 12 tipos de neoplasias¹, pues multiplica por 2 el riesgo de padecer cáncer en la edad media de la vida. Es bien sabido que en las embarazadas expuestas al humo del tabaco aumentan la posibilidad de crecimiento intrauterino retardado y la morbilidad y mortalidad perinatales para el feto. Los niños, especialmente durante los primeros años de la vida, son la población más vulnerable.

Hoy en día, el tabaquismo pasivo afecta entre el 20 y el 80% de la población, según los países, e implica riesgos para la salud tanto a largo como a corto plazo, siendo la cardiopatía isquémica y el cáncer de pulmón los principales riesgos para los no fumadores expuestos al humo de tabaco.

El impacto que tiene el tabaquismo en la población constituye una preocupación creciente en todo el mundo en las últimas décadas.

Los niños que son fumadores pasivos presentan un mayor nivel oxidativo y una menor respuesta antioxidativa; esta diferencia influye en la génesis de un centenar de patologías incluyendo la arterioesclerosis⁵, es decir que tienen un estrés oxidativo mayor que los niños no fumadores pasivos.

Resulta interesante determinar el grado de estrés oxidativo y el efecto sobre éste de un suplemento de ácido ascórbico en ratas ante un estímulo como el humo de cigarrillo con sus miles de componentes. Es por ello que, por razones éticas desarrollamos un experimento de este tipo, utilizando ratas de experimentación.

II. PLANTEAMIENTO TEORICO

1. PROBLEMA DE INVESTIGACION

¿Cuál es el grado de estrés oxidativo producido por la inhalación pasiva de humo de cigarrillo en ratas de experimentación?

¿Cuál es el efecto de la administración suplementaria de ácido ascórbico sobre el estrés oxidativo en ratas de experimentación expuestas a la inhalación pasiva de humo del cigarrillo?

A. DESCRIPCION DEL PROBLEMA

Área General : Ciencias de la Salud
Área Específica : Medicina
Línea : Fisiología

B. TIPO DE INVESTIGACION

Se trata de un estudio de laboratorio.

C. NIVEL DE INVESTIGACION

Estudio experimental

D. OPERACIONALIZACION DE VARIABLES:

VARIABLE	INDICADOR	SUBINDICADOR	CATEGORIA	ESCALA
Inhalación Pasiva de humo de cigarrillo	Frecuencia	0	Grupo I	Cuantitativa discreta
		c/24 hrs.	Grupo II	
		c/24 hrs.	Grupo III	
	Cantidad	0	Grupo I	Cuantitativa discreta
		3 cigarrillos / día	Grupo II	
		3 cigarrillos / día	Grupo III	
	Tiempo	0	Grupo I	Cuantitativa discreta
		+/- 15 min / día	Grupo II	
		+/- 15 min / día	Grupo III	
Suplemento de Vitamina C vía oral	Frecuencia	0	Grupo I	Cuantitativa discreta
		0	Grupo II	
		c/24 hrs.	Grupo III	
	Cantidad	0	Grupo I	Cuantitativa discreta
		0	Grupo II	
		5 mg/kg de peso	Grupo III	
	Tiempo	0	Grupo I	Cuantitativa discreta
		0	Grupo II	
		6 días/sem por 4 semanas	Grupo III	
Estrés Oxidativo	Nivel total de oxidación	Escasa/Moderada/ Gran Cantidad de MDA	Grupo I	Nominal
		Escasa/Moderada/ Gran Cantidad de MDA	Grupo II	Nominal
		Escasa/Moderada/ Gran Cantidad de MDA	Grupo III	Nominal
Administración de salbutamol	Grado de broncodilatación	Escasa/Moderada/ Gran Cantidad de broncodilatación	Grupo I	Nominal
		Escasa/Moderada/ Gran Cantidad de broncodilatación	Grupo II	Nominal
		Escasa/Moderada/ Gran Cantidad de broncodilatación	Grupo III	Nominal

E. INTERROGANTES BASICAS

- ¿Cuál es el efecto broncodilatador del salbutamol en anillos bronquiales de segundo grado en ratas normales?
- ¿Cuál es el efecto broncodilatador por la administración del salbutamol en anillos bronquiales de segundo grado en ratas expuestas al humo de cigarrillo?
- ¿Cuál es el efecto broncodilatador por la administración del salbutamol en anillos bronquiales de segundo grado en ratas expuestas al humo del cigarrillo y a la administración suplementaria de ácido ascórbico simultáneamente?
- ¿Cuál es el nivel total de oxidación a través de la medición del malonaldehído (MDA) en tejido pulmonar de ratas normales?
- ¿Cuál es el nivel total de oxidación a través de la medición del malonaldehído en tejido pulmonar de ratas expuestas al humo del cigarrillo?
- ¿Cuál es el nivel total de oxidación a través de la medición del malonaldehído en tejido pulmonar de ratas expuestas al humo del cigarrillo y a la administración suplementaria de ácido ascórbico simultáneamente?

F. JUSTIFICACION DEL PROBLEMA

- a) Originalidad: Luego de una exhaustiva búsqueda bibliográfica no se ha encontrado trabajos similares en nuestra ciudad, cuyo nivel de consumo de cigarrillo creciente, tanto activo como pasivo, hace necesario un estudio al respecto, más aún si consideramos que los fumadores pasivos podrían tener alguna forma de protección con la vitamina C.
- b) Relevancia Científica: Con este estudio se conocerá más al detalle, y de manera objetiva, las repercusiones directas del efecto de un suplemento de vitamina C sobre el estrés oxidativo producido por la inhalación pasiva del humo del cigarrillo.

- c) Relevancia Social: El tabaquismo, siempre vigente, es un problema social -y de Salud Pública- que afecta sobretodo a los más jóvenes (fumadores pasivos) cuyas repercusiones deben ser estudiadas en detalle y sobretodo las alternativas de protección.
- d) Relevancia Humana: los hallazgos nos permitirán entender mejor y tratar más adecuadamente a los pacientes que fumen o estén expuestos al humo del cigarrillo.

2. MARCO CONCEPTUAL

A. ESTRUCTURA DEL PULMON DE LOS MAMIFEROS²

Los pulmones están compuestos por parénquima pulmonar y tejido intersticial. El parénquima pulmonar es el tejido específico del órgano y tiene a su cargo el intercambio de gases. Este parénquima está formado por la totalidad de los bronquiólos que poseen alvéolos y todas sus ramificaciones hasta llegar a los alvéolos del pulmón. El tejido intersticial está compuesto por tejido conectivo fibroso elástico y colágeno, glándulas mixtas, musculatura lisa, fibras nerviosas vegetativas, vasos sanguíneos y linfáticos y también por las subdivisiones del árbol bronquial. El pulmón está recubierto superficialmente por la pleura pulmonar. Debajo de la pleura hay una cápsula de tejido conectivo de la que se desprenden, según la especie, tabiques más marcados o menos marcados que se interponen entre los lobulillos pulmonares. La cápsula y los tabiques están formados por fibras de tejido conectivo colágeno y elástico que son responsables de la capacidad de retracción del pulmón.

En caso de enfisema pulmonar estas fibras están hiperextendidas o desgarradas. La espiración en estos casos presenta claras dificultades, lo que lleva a fuertes contracciones de la musculatura abdominal. Entre la aponeurosis y la parte muscular hipertrofiada del músculo oblicuo externo del abdomen se produce el denominado canal o “hendidura asmática”.

El pulmón tiene la estructura de un sistema de conductos compuesto por túmulos y alvéolos. Los dos bronquios principales se dividen en bronquios lobulares cuya conformación difiere en el pulmón derecho y en el izquierdo según los diferentes mamíferos.

La ramificación de los bronquios hasta los alveolos pulmonares terminales se realiza en forma dicotómica y tricotómica y da lugar a la formación del árbol bronquial o árbol pulmonar.

B. COMPOSICION QUIMICA DEL HUMO DEL CIGARRILLO

El cigarrillo es una forma de consumir el tabaco. El tabaco es una planta herbácea³. Una solanácea del género nicotina, cuyo nombre científico es *Nicotiana tabacum*.

Es una hierba perenne, robusta, de 50 a 120 cm de altura, pegajosa al tacto. Tiene hojas grandes y sésiles. Flores verde amarillentas⁴. Es una planta oriunda de América tropical. El tabaco moderno deriva casi en su mayoría de la *N. tabacum*. El componente más característico del tabaco es el alcaloide nicotina, que se encuentra en las hojas en proporciones variables (desde menos del 1% hasta el 12%). El género *Nicotiana* abarca más de 50 especies clasificadas en cuatro grupos principales: *N. tabacum*, *N. petunoides*, *N. rustica* y *N. polidiclia*. La especie *N. tabacum*, se puede clasificar en cuatro variedades: *havanesis*, *brasiliensis*, *virgínica* y *purpúrea*, que son el origen de las distintas variedades usadas en la comercialización.

Sus hojas curadas y preparadas a través de un proceso químico, se preparan en diversas formas para ser fumadas, mascadas, inhaladas y para la extracción de la nicotina.

1. ¿Cuál es la composición química del humo del tabaco?

En el aerosol formado por el humo del cigarrillo hay más de 3 mil compuestos químicos diferentes, de los cuales se han identificados más de un mil doscientos. Estos compuestos están agrupados tanto en la fase gaseosa como en la fase particulada. Por término medio se obtienen unos 200 mg de materia total al fumar un cigarrillo, de los cuales el 85% es de nitrógeno (N₂), oxígeno (O₂) y dióxido de

carbono (CO₂); un 8% de materia húmeda particulada, sobre un alquitrán o brea, que es la sustancia aceitosa marrón-amarillenta que mancha los dientes y manos de los fumadores, así como la que impregna las ropas y cabellos de los fumadores activos (el que fuma) y fumadores pasivos (el que inhala el humo de los fumadores activos) produciendo el fuerte y desagradable olor conocido y padecido por todos (lamentablemente).

El 7% restante es monóxido de carbono CO (gas sumamente tóxico que compite con el oxígeno por la hemoglobina formando la carboxihemoglobina e impidiendo el transporte de oxígeno a nuestras células), hidrógeno(H₂), argón(Ar), cianuro de hidrógeno HCN(gas venenoso) y otros gases.

2. La nicotina

La nicotina para el organismo es comparable a la figura de un terrorista que simula ser una persona seria actuando con una vida normal, estudia el lugar y, en forma falaz, realiza su tarea de destrucción. Desde el inicio como una fiera salvaje vigila a su presa, le muestra los dientes en falsa sonrisa, y luego se prende al cerebro con la adicción y termina destrozando el corazón y los pulmones⁶.

La nicotina es una droga que se encuentra en las hojas de tabaco. Cuando un fumador inhala la nicotina, ésta va directamente a los pulmones y a la sangre. En siete segundos una cuarta parte de la nicotina ha llegado al cerebro, a través de la arteria pulmonar. Es una droga psicoactiva y un potente reforzador conductual, capaz de producir severa dependencia química en el consumidor.

Actúa según la dosis pues a dosis bajas es psicoestimulante mejorando la capacidad mental, sobre todo la concentración, y a dosis altas tiene un efecto sedante al actuar como depresor.

Se encuentra en un porcentaje de 1 a 2 % en los cigarrillos, de manera que un cigarrillo normal de 1 gramo contiene 10 a 20 miligramos. El 10 % de esta nicotina pasa al humo del cigarrillo, es decir 1 a 2 miligramos.

Forma de Absorción:

El primer lugar que toca el humo del tabaco es la boca y luego el pulmón que es donde se realiza la absorción a todo el organismo.

Esta se hace con extraordinaria rapidez y por la circulación llega al corazón, desde donde es impulsada llegando en pocos segundos al cerebro donde reside la "adicción".

La nicotina es una sustancia que se absorbe fundamentalmente a través de los pulmones (de un 79 a un 90 %) y en menor medida a través de la mucosa bucal y plexos sublinguales (4 a 40 %) y de la piel, siendo en este caso la absorción variable y dependiente de varios factores, como son la temperatura y el pH cutáneos, el grado de humedad y de higiene personal, etc. Se absorbe rápidamente de la mucosa nasal, oral y respiratoria llegando al cerebro donde están los receptores al cabo de unos 7 segundos. Es allí donde ejerce su acción sobre el SNC así como en el sistema nervioso autónomo. Esta relación casi inmediata entre la inhalación del humo y su efecto a nivel cerebral es uno de los factores que contribuye al alto poder adictivo de la nicotina.

La vida media de la nicotina es de dos horas, oscilando entre 1 a 4 horas de acuerdo a la variabilidad individual, y la mayor parte se metaboliza en el hígado transformándose en uno de sus metabolitos inactivos -la cotinina- y solamente el 7 % de la nicotina se excreta por vía renal sin transformarse junto con la cotinina. También pasa a la leche materna y atraviesa la barrera placentaria.

La velocidad con que se absorbe la nicotina depende de su nivel de pH (acidez alcalinidad). Al pH "normal" del humo, 6,0 o menos, la mayoría de la nicotina está ligada químicamente a las sustancias "ácidas" del humo de tabaco, por lo que es no volátil y es absorbida lentamente por el fumador. Conforme aumenta el pH del humo de tabaco, más de 6,0, una mayor proporción de nicotina de las sustancias "ácidas" se libera y se convierte en **nicotina libre**, la cual es volátil y es absorbida más rápidamente por la persona.

La nicotina libre penetra con mayor rapidez en la corriente sanguínea, atravesando fácilmente la mucosa de la boca y la pared de los pulmones, especialmente cuando se compara con la velocidad de absorción de las sales de nicotina.

Las empresas productoras de cigarrillos suelen usar aditivos para aumentar la absorción de nicotina del humo del cigarro. Los compuestos de amoníaco alteran el pH de la nicotina en el tabaco, convirtiendo a la nicotina de nicotina cargada positivamente y ligada

a otros compuestos (varias sales de nicotina), a nicotina libre sin carga eléctrica.

Acción Cerebral:

Las señales nerviosas se transmiten de una neurona a otra a través de las uniones interneuronales llamadas sinapsis, en donde el impulso nervioso se transforma en mensajes químicos que toman la forma de una sustancia secretada por la neurona, que es el neurotransmisor o neuromediador. Estos atraviesan la sinapsis actuando sobre las proteínas del receptor de membrana de la siguiente neurona.

El control neurohormonal de la actividad encefálica se realiza de dos maneras:

- Control directo por la transmisión de señales nerviosas específicas desde la parte inferior del encéfalo a las regiones corticales del cerebro.
- Control por liberación de agentes neurotransmisores excitadores o inhibidores en la sustancia encefálica. Neurotransmisores que ejercen el control por períodos más prolongados que los producidos por una activación o inhibición instantáneas. En el cerebro humano hay cuatro sectores de activación y control por neuromedidores:
 - ◊ El locus ceruleus y el sistema de la norepinefrina.
 - ◊ La sustancia negra con el núcleo accumbens y el sistema de la dopamina.
 - ◊ Los núcleos del rafe y el sistema de la serotonina.
 - ◊ El núcleo gigantocelular de la formación reticulada y el sistema de la acetilcolina.

Si bien todos intervienen en los procesos de adicción a distintas drogas, en la **adicción a la nicotina** tiene principal importancia el Sistema Mesolímbico Dopaminérgico, y en su Síndrome de Abstinencia interviene el Locus Ceruleus y el Sistema de la Norepinefrina.

La nicotina responsable de la nicotino dependencia puede ser definida como una sustancia psicoactiva cuya acción consiste principalmente en la activación de dos centros cerebrales:

- El Sistema Mesolímbico Dopaminérgico que es considerado como el centro cerebral del placer y de la gratificación y su estimulación es responsable de la fármacodependencia, en la cual el sujeto intenta encontrar el efecto euforizante (Craving).
- El Locus Ceruleus que es responsable del estado de alerta y de vigilia. Su estimulación por parte de la nicotina mejora las funciones cognoscitivas, la capacidad de concentración, las performances intelectuales y al mismo tiempo puede reducir las reacciones de estrés, proporcionando una impresión de seguridad y de relajación en las situaciones críticas.

La nicotina se une a los receptores para la nicotina en el cerebro y estimula la liberación de dopamina elevando sus niveles. La dopamina es liberada hacia la sinapsis (el espacio entre las terminaciones nerviosas y la célula receptora) y se une a los receptores de la siguiente neurona. La dopamina rápidamente se reabsorbe o se elimina por la enzima monoaminooxidasa (MAO). Sin embargo, cuando se introduce la nicotina al fumar, la nicotina estimula la liberación de dopamina mientras que otra sustancia en el humo de cigarro bloquea la acción de la MAO. Los niveles bajos de MAO resultan en niveles elevados de dopamina. Esto interviene en la biología de la adicción a la nicotina, agregándose al aumento de dopamina en el núcleo accumbens.

La nicotina favorece la liberación de algunos neurotransmisores a nivel cerebral como la dopamina y la norepinefrina que generan sensaciones de placer y alerta. El neurotransmisor es una sustancia producida por una célula nerviosa capaz de alterar el funcionamiento de otra célula de manera breve o durable, por medio de la ocupación de receptores específicos y por la activación de mecanismos iónicos y/o metabólicos.

Un mensaje de una neurona a otra es transmitida con la ayuda de diferentes transmisores químicos. Esto ocurre en puntos de contacto específicos, las sinapsis, entre células nerviosas. El transmisor

químico dopamina se forma a partir de los precursores tirosina y L-dopa y es almacenada en vesículas de las terminales nerviosas. Cuando un impulso nervioso causa que las vesículas se vacíen los receptores para dopamina en la membrana de la célula receptora son influenciados de tal manera que el mensaje es llevado al interior de la célula.

La nicotina imita la acción de un mediador natural, la acetilcolina. Ella se liga a los receptores nicotínicos en el sistema nervioso e incluidos en diferentes estructuras cerebrales.

Adicción a la Nicotina:

La adicción a la nicotina es básicamente un trastorno cerebral mediado neurobiológicamente y que se localiza en el sistema mesocórtico-límbico-dopaminérgico, lugar donde se genera la recompensa. Y esto se produce de la misma forma que para otras drogas, con la vía dopaminérgica localizada en el núcleo accumbens⁷.

En el cerebro tiene lugar el proceso de adicción, originándose las vías en las neuronas dopaminérgicas del segmento ventral del cerebro medio (Área Ventral Tegmental) y de allí asciende al Núcleo Accumbens en las áreas prefrontales de la corteza del cerebro. Se estimula el aumento de dopamina en el núcleo accumbens, lo cual es el sistema de recompensa y gratificación, que establece la necesidad por la droga y la dependencia.

La abstinencia sigue la vía noradrenérgica, mediada por la norepinefrina que se concentra en las neuronas del locus ceruleus. Cuando un fumador trata de no fumar los niveles de nicotina caen y la frecuencia de los disparos de las neuronas noradrenérgicas en el locus ceruleus llega a ser anormalmente alta y causa de los síntomas de abstinencia a la nicotina⁸.

En el cerebro del fumador la nicotina estimula la liberación de dopamina y muestra el sello característico neurobiológico de las drogas adictivas: Un exceso de dopamina en el núcleo accumbens.

La nicotina actúa a través de los receptores colinérgicos de nicotina, produciendo liberación de neurotransmisores dopamina, GABA, serotonina, norepinefrina, péptidos opiáceos vasopresina y endorfinas. También otras sustancias del humo del tabaco actúan aumentando la

dopamina al disminuir la enzima monoaminooxidasa (MAO) que la degrada.

C. EFECTOS DEL HUMO DEL CIGARRILLO EN LA SALUD HUMANA

Investigaciones recientes muestran que no sólo los fumadores crónicos, sino los niños, adolescentes y adultos expuestos al humo del tabaco sufren serios problemas de salud. Los padres deben estar pendientes de cómo el fumar afecta a los miembros de la familia, ya sea bebés, niños, adolescentes o adultos⁹.

1. En Bebés y niños:

Si fuma cerca de ellos, el humo del cigarro puede causarles daños a su salud, al convertirlos en fumadores pasivos. Si se comparan los hijos de personas no fumadoras con hijos de personas fumadoras, estos últimos tienen mayor riesgo de contraer neumonía, bronquitis, asma e infecciones en el oído y de desarrollar a largo plazo daños en los pulmones.

Fumar causa también serios problemas de salud a las mujeres embarazadas y al bebé. El cigarro se ha asociado a bajo peso en el recién nacido, crecimiento retardado, abortos y muerte del bebé en el parto y a mayor riesgo de morir por síndrome de muerte infantil súbita; con cinco cigarrillos o más que una madre fume durante su embarazo puede producirse todo lo anterior.

No hay duda de que la exposición al humo del tabaco daña seriamente la salud de los niños. Fumar produce una adicción que es difícil de superar, además de disminuir la calidad de vida, tanto para el fumador como para la gente que le rodea. Los fumadores pasivos representan un porcentaje considerable de la población.

2. En Adolescentes:

Los adolescentes son fuertemente influenciados por el medio en el que se desenvuelven. Al año se gastan enormes cantidades de dinero en publicidad, los anuncios generalmente están dirigidos a los adolescentes, por lo que no es de extrañar que la mayoría de los fumadores hayan adquirido el hábito en esta etapa; además, el

número de mujeres adolescentes fumadoras se ha incrementado. Muchos de los fumadores inician el hábito por motivos sociales como la curiosidad y la presión de los amigos.

Los anuncios de cigarros hacen pensar a las personas que si fuman son más atractivas, fuertes, triunfadoras, etc.; lo que realmente obtienen es: adicción a la nicotina, mal aliento, dientes manchados, tos frecuente, taquicardia, disminución en las funciones pulmonares, incremento en la presión sanguínea, disminución de las habilidades físicas, mayor riesgo de desarrollar cáncer pulmonar y enfermedades del corazón, entre otras.

El tabaco libre de humo no es una opción segura. El término de tabaco libre de humo se refiere al que se mastica y al que se inhala; ambos producen adicción a la nicotina al absorberse en la sangre. Los productos derivados del tabaco pueden lastimar la boca y la garganta, causar cáncer, además del mal aliento, dientes manchados, retardo en la curación de heridas en la boca y pérdida de sensibilidad en el gusto y el olfato.

3. En Adultos:

La mayor parte de los adultos conocen los efectos dañinos del cigarro y a muchos les gustaría romper con el hábito. Una tercera parte de las muertes por cáncer y enfermedades del corazón son causadas por el uso del tabaco. Tres cuartas partes de las muertes por enfermedades crónicas de los pulmones se relacionan con el tabaco.

El esposo (a) de un fumador (a) tiene 30 por ciento de riesgo de padecer de los pulmones, lo que contribuye con miles de muertes al año.

Los niños y adolescentes cuyos padres son fumadores tienen dos veces más posibilidades de empezar a fumar a temprana edad que los hijos de los no fumadores. Fumar no es una actividad natural y causa graves efectos sobre la salud.

Fumar cigarrillo es la causa PREVENIBLE de muerte prematura más importante y un contribuyente mayor al desarrollo de numerosas enfermedades. Así lo han entendido en los países desarrollados,

donde el consumo ha disminuido progresivamente en los últimos años.

4. Efectos del Cigarrillo sobre la Salud

Fumar cigarrillo es la principal causa prevenible de muerte prematura. Se estima que el fumador reduce su expectativa de vida entre cinco y ocho años; en otras palabras, por cada cigarrillo fumado, se pierden aproximadamente 5 y ½ minutos de vida. El aumento de la mortalidad puede ser tan grande que una de cada seis muertes se produce como consecuencia de fumar. El hábito se refleja también en un incremento de una buena variedad de enfermedades agudas y crónicas, que propician más días de ausentismo escolar, laboral, y mayor utilización de servicios hospitalarios.

El cigarrillo genera estos efectos al desencadenar una serie de fenómenos en nuestro cuerpo que se pueden clasificar así:

- Inflamación e irritación aguda y crónica.
- Estimulación de procesos celulares y bioquímicos.
- Bloqueo de funciones metabólicas y biológicas normales.
- Daño tóxico a elementos celulares y bioquímicos.
- Carcinogénesis (estímulo en el crecimiento de células cancerosas).

Hay dos grupos de personas que pueden presentar problemas de salud como consecuencia de fumar:

- El fumador activo, que voluntariamente se expone al humo, al fumar cigarrillo.
- El fumador pasivo, que de manera involuntaria se ve expuesto al humo del cigarrillo.

Los efectos del cigarrillo se reflejan en una serie de enfermedades entre las cuales se destacan las siguientes:

Cáncer de Pulmón: El riesgo de desarrollar cáncer de pulmón es 5 a 20 veces mayor en los fumadores que entre quienes no fuman. La mayoría de las muertes por cáncer de pulmón tienen como causa fumar cigarrillo, cifras que son muy significantes.

Cáncer de Laringe: Existe una fuerte asociación entre el cáncer de laringe y el consumo de cigarrillo, por lo que se dice que es una enfermedad casi exclusiva de personas adictas al cigarrillo¹⁰.

Cáncer de Esófago: Muchos de los casos de cáncer de esófago se deben a fumar. Hay una clara relación entre la dosis de cigarrillo y la mortalidad relacionada con este tipo de cáncer.

Cáncer de Vejiga: La proporción de casos de cáncer de vejiga que es consecuencia de fumar va en aumento en hombres y mujeres.

Otros tipos de cáncer: Se han relacionado con el hábito de fumar, aunque en menor proporción que los ya mencionados, los cánceres de boca, páncreas, estómago y cuello del útero.

Enfermedad coronaria: Hace referencia a la obstrucción de los vasos sanguíneos del corazón y se traduce en problemas serios como la angina de pecho o infartos del corazón. Un número considerable de las muertes por enfermedad coronaria dependen de fumar cigarrillo, y así este hábito se convierte en el principal factor de riesgo modificable para esta enfermedad. Existe una franca relación entre la dosis (edad en que se empezó a fumar, número de cigarrillos al día, tiempo de exposición y profundidad de la inhalación) y el riesgo de muerte por esta enfermedad. Además, la exposición al cigarrillo aumenta los efectos nocivos que sobre la enfermedad ejercen otros factores como la diabetes y el exceso de colesterol sanguíneo.

Enfermedad cerebro-vascular: El fumador tiene el doble de posibilidades de presentar un accidente cerebro-vascular; este riesgo es mayor en el grupo de fumadores jóvenes. En las mujeres fumadoras que utilizan anticonceptivos orales la posibilidad de presentar cuadros trombo-embólicos (desprendimiento de coágulos sanguíneos hacia ciertos órganos vitales del cuerpo) y hemorragia subaracnoidea, aumenta hasta 20 veces.

Enfermedad oclusiva arterial periférica: Esta enfermedad consiste en la oclusión progresiva de un vaso sanguíneo, con mayor frecuencia en las piernas, y puede llevar a la suspensión del flujo circulatorio a esa zona y la pérdida de la extremidad. Fumar cigarrillo es el principal factor que predispone a esta dolencia. Si el paciente tiene además

diabetes, la oclusión del vaso se puede presentar mucho más temprano y ser más severa.

Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC): La EPOC se manifiesta en dos formas principales: La BRONQUITIS CRÓNICA que produce tos y expectoración en forma persistente, y el ENFISEMA PULMONAR, que genera destrucción del pulmón y dificultad respiratoria en forma progresiva. Se podría aseverar que en la práctica la EPOC es patrimonio de los fumadores, tanto en la forma de bronquitis crónica como en la de enfisema pulmonar. En el gran fumador la posibilidad de EPOC es 30 veces mayor que en el no fumador. Adicionalmente, fumar acelera el deterioro de la función de los pulmones, con aumento en la frecuencia de síntomas como tos, expectoración, dificultad respiratoria y sibilancias. Además, se incrementa el número de personas que presentan enfermedades respiratorias agudas.

Úlcera péptica: Existe mayor riesgo de desarrollarla en el fumador, también se retarda la curación y se aumenta la posibilidad de recaídas de la enfermedad.

Efectos sobre el embarazo: Hay una clara relación entre fumar cigarrillo y hechos como retardo del crecimiento intrauterino, aborto espontáneo, prematuridad, muerte fetal y neonatal, alteraciones en el desarrollo físico y mental del infante y muerte súbita en la infancia. Además, hay una relación entre la cantidad de cigarrillo fumado y la posibilidad de la presencia de desprendimiento de la placenta y ruptura prematura prolongada de membranas.

Riesgos para el fumador pasivo: Los hijos de padres fumadores tienen mayor frecuencia de síntomas y enfermedades respiratorias como bronquitis, neumonías y asma. En los adultos la exposición involuntaria se relaciona con síntomas como irritación ocular, secreción de moco nasal, dolor de cabeza y tos. En las personas alérgicas la exposición al humo de cigarrillo desencadena o empeora los síntomas de la enfermedad. El contacto crónico disminuye en forma importante la función de las vías respiratorias pequeñas. Además, el fumador pasivo tiene probabilidad una y media veces mayor de presentar cáncer pulmonar que la persona que no se expone al humo.

Esta es una relación funesta. Los embarazos de madres fumadoras tienden a complicarse y si durante el embarazo no se suspende el cigarrillo, hay muchas probabilidades que el niño nazca con problemas de peso bajo o que lo haga antes de tiempo (pretérmino). Así como la nicotina puede cerrar los vasos sanguíneos de la madre, esto mismo puede suceder con la circulación de la placenta y el feto no va a recibir la cantidad de oxígeno que requiere para su desarrollo intrauterino.

Las consecuencias del cigarrillo no se quedan allí. Hay estudios y revisiones científicas sólidas que demuestran que el síndrome de muerte súbita infantil, una condición trágica en la que el niño se muere de manera súbita, se presenta con el doble de frecuencia en niños de madres fumadoras que en las no fumadoras.

Consecuencias en el Sistema Respiratorio:

Entre los aparatos más afectados está el Respiratorio; cuadros de irritabilidad de las vías respiratorias se presentan constantemente y con mayor secuencia entre los fumadores; estos padecimientos tienden a hacerse crónicos. Esto se produce a través de la inhalación hacia el pulmón del humo producido por la combustión del tabaco quemado. De esta forma, cada vez que el fumador aspira el humo, sus pulmones entrarán en contacto con aproximadamente 10^9 a 10^{10} partículas por cada mililitro de aerosol; entre estas partículas se incluyen agentes irritantes, oxidantes y una gran variedad de toxinas y carcinógenos (sustancias generadoras de cáncer). Muchos de los constituyentes tóxicos del chorro principal del humo están en concentraciones que podrían ser rápidamente fatales si la exposición fuera interrumpida. Las razones que impiden que el humo tenga un efecto letal inmediato son la dilución en el aire del medio y la naturaleza intermitente de la inhalación. Por otra parte, la fracción del humo que el fumador retiene, varía de acuerdo con el patrón de inhalación, por este motivo quienes inhalan con más profundidad y sostienen la inhalación, pueden retener hasta 90% de los componentes del humo en su organismo.

D. VITAMINA C¹¹

Perteneciente junto con las vitaminas B al grupo de las hidrosolubles, la vitamina C interviene en el mantenimiento de huesos, dientes y vasos

sanguíneos por ser buena para la formación y mantenimiento del colágeno. Protege de la oxidación a la vitamina A y vitamina E, como así también a algunos compuestos del complejo B (tiamina, riboflavina, ácido fólico y ácido pantoténico). Desarrolla acciones anti-infecciosas y antitóxicas y ayuda a la absorción del hierro no hémico en el organismo.

El ácido ascórbico no es sintetizable por el organismo, por lo que se debe ingerir desde los alimentos que lo proporcionan: Vegetales verdes, frutas cítricas y papas.

Tal como en el caso de los hombres en que el ácido ascórbico no es sintetizable por el organismo, los animales no pueden sintetizarlo tampoco, por tanto ningún alimento animal cuenta con esta vitamina.

La vitamina C se oxida rápidamente y por tanto requiere de cuidados al momento de exponerla al aire, calor y agua. Por tanto cuanto menos calor se aplique, menor será la pérdida de contenido. Las frutas envasadas por haber sido expuestas al calor, ya han perdido gran contenido vitamínico, lo mismo ocurre con los productos deshidratados. En los jugos, la oxidación afecta por exposición prolongada con el aire y por no conservarlos en recipientes oscuros. Las dosis requeridas diarias de vitamina C no están definidas exactamente, sin embargo la FDA de Estados Unidos comprueba que con 60 mg/día se mantiene un total corporal de un gramo y medio, cantidad suficiente para servir las demandas corporales de un mes. Por tanto, el consumo de una fruta cítrica por día, cumple con tales requerimientos.

Existen infinidad de productos comerciales que aportan 500 mg o más por comprimido y hay quienes, recomiendan la ingestión de cinco comprimidos (caso de los que creen que su administración es anticancerígena). Si bien como con la mayoría de las vitaminas, los excesos se descartan por vía urinaria, el alerta radica en que como lo ingerido es un ácido, las dosis excesivas pueden rebasar la resistencia de la pared gástrica y su intensa recirculación renal puede afectar el riñón.

No es inocua la administración indiscriminada de ácido ascórbico, dado que a medida que el organismo se satura, disminuye su absorción, y aportando grandes dosis, la suprime abruptamente. Por tanto si se continúa con dieta escasa en la vitamina, puede aparecer "escorbuto de rebote".

Adicionalmente al "escorbuto de rebote", a la intolerancia gástrica y renal, su consumo disminuye la cobalamina (vitamina B12), que es una sustancia sintetizada por el organismo.

Funciones:

- Mejora la visión y ejerce función preventiva ante la aparición de cataratas o glaucoma.
- Es antioxidante, por lo tanto neutraliza los radicales libres, evitando así el daño que los mismos generan en el organismo. Su capacidad antioxidante hace que esta vitamina elimine sustancias toxicas del organismo, como por ejemplo los nitritos y nitratos presentes en productos cárnicos preparados y embutidos. Los nitratos y nitritos aumentan la probabilidad de desarrollar cáncer. Su virtud como antioxidante nos protege ante el humo del cigarrillo, y como mejora el sistema inmune, es también utilizada en pacientes sometidos a radio y quimioterapia.
- Es antibacteriana, por lo que inhibe el crecimiento de ciertas bacterias dañinas para el organismo.
- Reduce las complicaciones derivadas de la diabetes tipo II
- Disminuye los niveles de tensión arterial y previene la aparición de enfermedades vasculares
- Tiene propiedades antihistamínicas, por lo que es utilizada en tratamientos antialérgicos, contra el asma y la sinusitis.
- Ayuda a prevenir o mejorar afecciones de la piel como eccemas o soriasis.

- Es cicatrizante de heridas, quemaduras, ya que la vitamina C es imprescindible en la formación de colágeno.
- Aumenta la producción de estrógenos durante la menopausia, en muchas ocasiones esta vitamina es utilizada para reducir o aliviar los síntomas de sofocos y demás.
- Mejora el estreñimiento por sus propiedades laxantes.
- Repara y mantiene cartílagos, huesos y dientes.

Aporte de Vitamina C:

- **Fuentes de origen animal:** La vitamina C no aparece en alimentos de origen animal.
- **Fuentes de origen vegetal:** la gran mayoría de las frutas y verduras contienen vitamina C. Los que tienen mayor contenido de vitamina C son los pimientos, los cítricos, las coles, el coliflor, espinacas, las patatas (papas) frutas como el plátano, los mangos, la manzana, piña (ananá) y melón. Los escaramujos o rosa canina son la fuente más potente en vitamina C. Aproximadamente el 7% de su peso corresponde a la vitamina.
- **Suplementos:** pueden ser tabletas, efervescentes, cápsulas, etc.

Deficiencia de vitamina C: La deficiencia o carencia de vitamina C (ácido ascórbico) puede producir o verse reflejada por:

- Inflamación y sangrado de las encías
- Piel áspera y reseca
- Hematomas espontáneos
- Deficiencia en la cicatrización de heridas
- Sangrado nasal
- Dolor e inflamación articular
- Anemia
- Esmalte dental debilitado

- La carencia más grave de vitamina C se conoce como escorbuto, que se observa con mayor frecuencia en ancianos y desnutridos. El escorbuto esta caracterizado por un debilitamiento general del organismo, anemia, encías inflamadas y hemorragias.

Consumiendo una dieta variada y balanceada con un alto contenido de frutas y verduras, la dosis mínima de vitamina C, esta absolutamente cubierta. Los requerimientos diarios en un hombre adulto son de 90 mg./dia y en una mujer de 75 mg./dia (miligramos/día), aunque existen siempre situaciones donde es necesario aumentar la dosis de vitamina a través de la suplementación. Esas circunstancias o situaciones son:

- Embarazo y lactancia
- Personas alcohólicas y fumadoras
- diabéticos
- Alérgicos y asmáticos
- personas que toman diariamente fármacos o medicamentos como anticonceptivos orales, cortisona, antibióticos, etc.

Dosis diarias recomendadas de vitamina C: En la siguiente tabla se establecen la ingesta diaria recomendada de vitamina C según el Departamento de Nutrición del IOM (Institute of Medicine: Instituto de Medicina) y USDA (United States Department of Agriculture: Departamento de Agricultura de Estados Unidos) tanto para infantes, niños y adultos.

EDAD	Hombres (mg/día)	Mujeres (mg/día)
0 a 12 meses	ND	
1 a 3 años	15	
4 a 8 años	25	
9 a 13 años	45	45
14 a 18 años	75	65
19 a 50 años	90	75
>50 años	90	75
Embarazo		80 a 85
lactancia		115

Toxicidad: Es poco probable que exista una intoxicación de vitamina C, puesto que es una vitamina hidrosoluble y los excesos son eliminados a través de la orina. Pero si la dosis diaria supera los 2000 mg/día pueden aparecer molestias gastrointestinales como: diarreas, malestar en el estómago, cálculos renales, insomnio y exceso de absorción de hierro.

E. PRINCIPALES EFECTOS DE LA VITAMINA C EN EL PULMON DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION EXPUESTOS AL HUMO DEL CIGARRILLO

No existen estudios recientes acerca del papel protector de la vitamina C sobre el pulmón de ratas de experimentación expuestas al humo del cigarrillo, sin embargo existen algunos estudios en hamsters que determinaron que la vitamina C previene la agregación leucocitaria y la adhesión al endotelio in vivo ocasionadas por el humo del cigarrillo¹².

F. ESTRES OXIDATIVO

Se define como una situación en la que existe tanto un aumento en la velocidad de generación de especies reactivas del oxígeno (EROs) como una disminución de los sistemas de defensa, lo que resulta en una mayor concentración, en estado estacionario, de EROs. Es en esta situación de estrés oxidativo en la que se manifiestan las lesiones que producen los radicales libres. Estos reaccionan químicamente con lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN al interior de las células, y con componentes de la matriz extracelular, por lo que pueden desencadenar un daño irreversible que, si es muy extenso, puede llevar a la muerte celular¹³.

El estrés oxidativo es considerado como el padecimiento de nuestro tiempo, la vida tan acelerada que llevamos, las preocupaciones, agotamiento mental y físico, nos llevan a que nuestras defensas contra la oxidación sufran desequilibrios, es decir la vida nos oxida.

Las células no utilizan todo el oxígeno que les llega, un 2 % de ese oxígeno se convierte en formas químicas nocivas que se denominan

radicales libres, los cuales son definidos como fragmentos moleculares con un electrón suelto en su orbita exterior que provoca una oxidación muy alta, son inestables y reaccionan instantáneamente con otras sustancias que estén cercanas.

La vida biológica media de los radicales libres es de microsegundos; pero tienen la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a las moléculas básicas en la vida de la célula: Los carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, alterando sus estructuras cambiando sus funciones, envejeciendo a la célula y aniquilándola.

Las reacciones químicas de los radicales libres se dan constantemente y son necesarias para la salud pero el proceso debe ser controlado con una adecuada protección antioxidante.

Afortunadamente el organismo ha desarrollado en el curso de la evolución sistemas de defensa antioxidante que protegen o reparan a las mitocondrias; estos son, los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos expuestos en la siguiente tabla:

Antioxidantes

ENZIMATICOS	NO ENZIMATICOS
SOD (Superóxido dismutasa)	Vitamina E
Glutación-Peroxidasa	Carotenoides
Catalasa	Vitamina C
	Coenzima Q -10
	Proantocianidinas
	Selenio
	NAC (N-acetyl-cysteina)
	Ácido Alfa Lipoíco

Ya que cuando el equilibrio entre la producción de radicales libres y la acción de los antioxidantes da como resultado lo que se denomina estrés oxidativo, la pérdida de este equilibrio ocurre en aquellos organismos que están desnutridos, enfermos, con malos hábitos de alimentación, sobre entrenados y que están expuestos a altos índices de contaminación.

Enfermedades vinculadas al estrés oxidativo:

- ☐ Aterosclerosis
- ☐ Cáncer
- ☐ Cataratas
- ☐ Enfermedad de Parkinson
- ☐ Enfermedades auto inmunes
- ☐ Artritis
- ☐ Diabetes
- ☐ Enfermedades cardiovasculares
- ☐ Hipertensión arterial
- ☐ Enfermedades de la piel.

Por ello es importante saber que es necesario tomar estrategias de alimentación adecuadas, consistentes en un alto consumo de frutas y verduras crudas, pescado, pollo y reducir lo más que se pueda el consumo de carnes rojas y claro que para nada las de cerdo.

El ejercicio físico genera radicales libres en mayor proporción que en personas que son sedentarias, y esto es lógico, ya que el entrenamiento genera un mayor consumo de oxígeno, por eso es vital el uso de un adecuado suplemento de antioxidantes ya que la sola dieta no puede proporcionarlos en cantidades adecuadas.

Otro punto que es importante es evitar el consumo de cigarros ya que el ser fumador es un factor de riesgo para padecer enfermedades cardiovasculares y cáncer, el humo del cigarro contiene un gran número

de oxidantes los cuales pueden dar origen a un daño oxidativo LDL (partículas de lipoproteína de baja densidad) fenómeno que contribuye a la aterosclerosis, lo que nos provocará un alto riesgo de desarrollar esta peligrosa enfermedad cardiovascular caracterizada por un endurecimiento de las arterias teniéndose con esto una mala circulación y predisponiéndose a un infarto.

En conclusión, alimentación equilibrada + suplementación antioxidante = buen manejo del estrés oxidativo lo cual dará un retardamiento del proceso de envejecimiento celular producto de la oxidación¹⁴.

G. SALBUTAMOL

El salbutamol se usa para prevenir y tratar el resoplo (silbido al respirar), la respiración entrecortada y la dificultad para respirar provocada por el asma, la bronquitis crónica, el enfisema y las enfermedades al pulmón de otro tipo. La inhalación de salbutamol también se usa para prevenir la dificultad para respirar (broncoespasmos) durante el ejercicio. El salbutamol pertenece a una clase de medicamentos llamados beta-agonistas. Funciona al relajar y abrir las vías respiratorias, haciendo más fácil la respiración¹⁵.

3. ANALISIS DE LOS ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Si bien no se encontró dentro de las bases de datos trabajos similares existen algunos como los de Öter S. et al³¹ y Karachi A. et al²⁹ que nos permiten determinar, el número de animales a usar (49 ratas usadas por Öter³¹ divididas en 5 grupos) y el tiempo de experimentación (4 semanas empleadas por Kamachi²⁹).

4. OBJETIVOS

General: Determinar el efecto del ácido ascórbico sobre el estrés oxidativo producido por la inhalación de humo de cigarrillo en ratas.

Específicos:

- Determinar el efecto broncodilatador del salbutamol en anillos bronquiales de segundo grado en ratas normales.

- Indicar el efecto broncodilatador por la administración del salbutamol en anillos bronquiales de segundo grado en ratas expuestas al humo de cigarrillo.
- Señalar el efecto broncodilatador por la administración del salbutamol en anillos bronquiales de segundo grado en ratas expuestas al humo del cigarrillo y a la administración suplementaria de ácido ascórbico simultáneamente.
- Determinar el nivel total de oxidación a través de la medición del malonaldehído (MDA) en tejido pulmonar de ratas normales.
- Indicar el nivel total de oxidación a través de la medición del malonaldehído en tejido pulmonar de ratas expuestas al humo del cigarrillo.
- Señalar el nivel total de oxidación a través de la medición del malonaldehído en tejido pulmonar de ratas expuestas al humo del cigarrillo y a la administración suplementaria de ácido ascórbico simultáneamente.

5. HIPOTESIS:

Dado que la exposición a la inhalación pasiva del humo del cigarrillo ocasiona estrés oxidativo es probable que, dependiendo del nivel de estrés alcanzado, la administración suplementaria simultanea de ácido ascórbico pueda tener un efecto protector.

III. PLANTEAMIENTO OPERACIONAL DE LA INVESTIGACION

1. TECNICAS E INSTRUMENTOS DE VERIFICACION

VARIABLE	TECNICA	INSTRUMENTO
Humo del cigarrillo	Observación	Ficha de registro de datos
Acido ascórbico	Observación	Ficha de registro de datos
Estrés oxidativo	Observación	Ficha de registro de datos
Salbutamol	Observación	Ficha de registro de datos

A. Animales de experimentación:

Se utilizarán 18 ratas de sexo masculino de la especie *rattus rattus*, variedad albina swiss, obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNSA, las cuales serán de similar peso y de 2 a 4 meses de edad.

Dos semanas antes de realizar la parte experimental de la investigación, los animales serán observados cuidadosamente, siendo sometidos además a una estandarización en su alimento, luego se dividirá al azar en tres grupos cada uno con 6 animales.

B. Material de laboratorio:

Equipos:

- C. Balanza analítica Dember a-160 (sensibilidad 0,0001 g).
- D. Baño de órganos aislados de doble pared con regulación de temperatura y oxígeno.
- E. Transductor de presión isométrica marca GRASS modelo FT-10.
- F. Polígrafo marca GRASS modelo 7 con preamplificador, amplificador y aguja registradora.
- G. Espectrofotómetro marca GILFORD modelo Stasar III.
- H. Balanza analítica marca SARTORIUS.
- I. Homogenizador de Potter marca BIOSPEC modelo 985-370.

Reactivos:

Los indicados en:

1. La obtención y preparación de los anillos bronquiales aislados de segunda generación.
2. La determinación de malonaldehído.

Otros Materiales:

- 2 envases de plástico tipo “botellón” con orificios para el ingreso y salida de aire.
- 16 Cajetillas de cigarrillos marca “Hamilton” (10 unidades cada una) para administrar 3 cigarrillos diarios 6 días por semana durante 4 semanas.
- Vitamina C en gotas (Redoxon) al 20% (20 gotas = 1 ml = unos 200 mg), cantidad suficiente para todo el trabajo.
- Jeringa y sonda para administración de ácido ascórbico (5 mg/kg de peso vía oral diario 6 días por semana durante 4 semanas).

- Salbutamol.

2. CAMPO DE VERIFICACION

- A. Ubicación espacial: Centro de Investigaciones y Desarrollo Científico (CIDEDEC) de la Facultad de Medicina de Universidad Nacional de San Agustín y Bioterio del CIDEDEC.
- B. Ubicación temporal: La investigación se realizará durante diciembre del 2006 y febrero del 2007.

3. CUADRO DE VARIABLES, INDICADORES, TECNICAS E INSTRUMENTOS

VARIABLE	INDICADOR	SUBINDICADOR	TECNICA	INSTRUMENTO
Inhalación Pasiva de humo de cigarrillo	Frecuencia	0	Observación	Ficha de registro de datos
		c/24 hrs.	Observación	
		c/24 hrs.	Observación	
	Cantidad	0	Observación	Ficha de registro de datos
		3 cigarrillos / día	Observación	
		3 cigarrillos / día	Observación	
	Tiempo	0	Observación	Ficha de registro de datos
		+/- 15 min / día	Observación	
		+/- 15 min / día	Observación	
Suplemento de Vitamina C vía oral	Frecuencia	0	Observación	Ficha de registro de datos
		0	Observación	
		c/24 hrs.	Observación	
	Cantidad	0	Observación	Ficha de registro de datos
		0	Observación	
		5 mg/kg de peso	Observación	
	Tiempo	0	Observación	Ficha de registro de datos
		0	Observación	
		6 días/sem por 4 semanas	Observación	
Estrés Oxidativo	Nivel total de oxidación	Escasa/Moderada/ Gran Cantidad de MDA	Observación	Ficha de registro de datos
		Escasa/Moderada/ Gran Cantidad de MDA	Observación	Ficha de registro de datos
		Escasa/Moderada/ Gran Cantidad de MDA	Observación	Ficha de registro de datos
Administración de salbutamol	Grado de broncodilatación	Escasa/Moderada/ Gran Cantidad de broncodilatación	Observación	Ficha de registro de datos
		Escasa/Moderada/ Gran Cantidad de broncodilatación	Observación	Ficha de registro de datos
		Escasa/Moderada/ Gran Cantidad de broncodilatación	Observación	Ficha de registro de datos

Para el análisis estadístico, se empleará la estadística descriptiva (frecuencias absolutas y relativas), medidas de tendencia central (media aritmética), medidas de dispersión (varianza y desviación estándar). También se comparará la distribución de frecuencias mediante la prueba de Chi cuadrado o prueba exacta de Fisher, según corresponda. Asimismo, la comparación de medias en los 3 grupos se hará mediante el análisis de varianza. En algunos casos, de datos apareados, se empleará la prueba t. Además, se determinará la relación entre variables mediante la Rho de Spearman. En todos los casos, se considerará significativa una $p \leq 0,05$, con intervalo de confianza del 95%.

4. UNIVERSO Y MUESTRA

Dada la naturaleza del estudio se considerará 3 **grupos** de ratas, con 6 animales en cada uno, de sexo masculino de la especie *rattus rattus*, variedad albina swiss, obtenidas del Bioterio del CIDEA, las cuales serán de similar peso y de 2 a 4 meses de edad.

5. ESTRATEGIA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

- Se elaborará una ficha de recolección de datos, considerando todos los aspectos a evaluar en el estudio (ver anexo).
- Se procederá a formar los 3 grupos de ratas al azar: grupo I: grupo control conformado por 6 ratas no expuestas; grupo II: 6 ratas expuestas al humo del cigarrillo; y grupo III: 6 ratas expuestas al humo del cigarrillo y al suplemento de ácido ascórbico. Todos los animales de cada grupo serán alimentados de manera adecuada durante toda la investigación. Durante 6 días a la semana y por 4 semanas se administrará lo siguiente a los grupos expuestos (II y III).

Grupos	1er semana	2da semana	3er semana	4ta semana
II (n=6)	Humo de 3 cigarrillos por día	Humo de 3 cigarrillos por día	Humo de 3 cigarrillos por día	Humo de 3 cigarrillos por día
III (n=6)	Humo de 3 cigarrillos por día y vitamina C 5mg/kg/día	Humo de 3 cigarrillos por día y vitamina C 5mg/kg/día	Humo de 3 cigarrillos por día y vitamina C 5mg/kg/día	Humo de 3 cigarrillos por día y vitamina C 5mg/kg/día

En primer lugar se les administrará por vía oral 5mg/kg de peso/día de vitamina C a cada animal del tercer grupo, 15 minutos después los grupos II y III serán expuestos al humo del cigarrillo, dentro de un botellón especialmente adaptado para esto, encendiéndose un cigarrillo por vez dentro del botellón hasta completar los 3 por día, lo cual demora aproximadamente 15 minutos. Terminada cada exposición el ambiente será renovado por aire ambiental. Cabe mencionar que cada grupo, por condiciones de espacio en el botellón, será expuesto en dos partes, es decir que primero se expondrán 3 ratas y luego las otras 3 de cada grupo. El botellón tiene pequeños orificios para introducir los cigarrillos en la parte inferior así como en la parte superior para la salida del humo.

- c) Al término del experimento se procederá al sacrificio de los animales procediendo inmediatamente a la extracción de los pulmones para realizar las pruebas y mediciones necesarias.
- d) Obtención y preparación de los anillos bronquiales aislados de segunda generación: los pulmones extraídos serán perfundidos para su preservación con solución fisiológica (NaCl al 0,9%) a 4°C. Completada la perfusión se procederá a la ligadura y sección de la tráquea con el pulmón en semiinsuflación. La disección terminará con el reconocimiento de los bronquiolos de segunda generación y su extracción con la mayor longitud posible. El trozo aislado bronquial se suspenderá dentro de una cápsula Petri conteniendo solución Krebs/Henseleit (K-H) a 4° C con burbujeo continuo de la mezcla carbógena. Dentro de este medio, se terminará su limpieza y se procederá a seccionarlo en anillos de 3,0 +/-0,05 mm de longitud. Uno a uno serán insertados dentro del pozo de la cámara de órganos aislados para su estudio, sujetándolos entre dos ganchos de acero inoxidable. Uno de ellos fijo, a manera de poste cerca del borde interno de la cámara y el otro, constituido por el extremo Terminal de un transductor de tensión isométrico conectado al polígrafo Grass con su aguja inscriptora. Seguidamente se llenará el pozo de la cámara con 850 ul de solución KH burbujeada con la mezcla

carbógena y mantenida a $37,0 \pm 0,5^{\circ} \text{C}$, mediante un termociclador. A continuación, se dejará la preparación en reposo durante 30 minutos aproximadamente, para que se establezca cambiándose la solución KH cada 10 minutos para evitar la acumulación de metabolitos. Estabilizada la preparación, lo cual se verificará porque el aguja inscriptora del polígrafo deja de oscilar, se administrará al baño de la cámara de órganos aislados, las drogas en estudio en las dosis señaladas según el protocolo (ver a continuación). Para el registro de relajación con el transductor de presión isométrica, se balanceará el equipo con un peso de 2 gramos.

Protocolo de administración de los fármacos en estudio:

1. Estabilizada la preparación, se añadirá en primer lugar 34 microgramos de salbutamol disuelto en 20 microlitros de solución fisiológica al baño de órganos aislados para determinar la magnitud de la respuesta relajante considerada como patrón (100%) con los animales del primer grupo. Obtenido este dato, se realizará el estudio con los anillos procedentes de los demás grupos comparando la magnitud de sus respuestas con el patrón.
 2. Luego se lavará el anillo (3 veces) con solución KH, hasta lograr el retorno de la aguja a la línea de base.
 3. Finalizado el experimento, se extraerá el anillo de los soportes de la cámara para determinar su peso seco, lo que se logra extrayendo previamente su humedad mediante baño María, previo al pesado.
 4. El estudio termina después de ser sometidos al mismo protocolo los anillos bronquiales procedentes de todos los grupos de trabajo.
- e) Procedimiento para la determinación del nivel total de oxidación a través de la determinación de malonaldehído.

En tejido pulmonar: Cada anillo bronquial se colocará en un envase a 4°C convenientemente identificado para proceder a su determinación por separado. Cada muestra de tejido se

homogenizará en 9 volúmenes (1:10 p/v) de tampón tris HCl 20 mM pH 7.4 mediante un homogenizador tipo Potter, durante 5 minutos manteniendo el recipiente en hielo picado. Finalizada la homogenización del tejido pulmonar se centrifugará durante 30 minutos a 10.000 rpm.

A continuación se agregará al sobrenadante del homogenizado, 2 mL de una mezcla de ácido tricloroacético (15% p/v), ácido tiobarbitúrico (0,37%) y ácido clorhídrico (25 mol/L). Luego la solución será incubada a 100° C durante 20 minutos con la adición de 2,5 ml de n-butanol procediéndose a su centrifugación a 3.000 rpm durante 10 min. La absorbancia del sobrenadante será leída a 532 nm contra un blanco de n-butanol.

- f) Todos los resultados serán llevados a una matriz de datos, elaborada en el programa Excel, que nos servirá como hoja de cálculo.
- g) Se procederá a la tabulación y gráfica de los resultados, según los objetivos propuestos.

6. PRESENTACION DE LOS INSTRUMENTOS COMO ANEXOS

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Ficha N° _____

1. GRUPO DE ESTUDIO:

GRUPO I ()

GRUPO II ()

GRUPO III ()

2. ESTUDIO DEL EFECTO BRONCODILATADOR DEL SALBUTAMOL EN ANILLOS BRONQUIALES DE SEGUNDO GRADO:

.....

3. DETERMINACION DEL MALONALDEHÍDO EN TEJIDO PULMONAR

.....

OTROS HALLAZGOS:

.....

.....

7. SISTEMATIZACIÓN:

7.1. Codificación: Numeral

7.2. Matrices: Se elaborarán matrices con campos de conteo y de acuerdo a los indicadores.

7.3. Cálculos estadísticos: Se aplicarán medidas de tendencia central y de varianza.

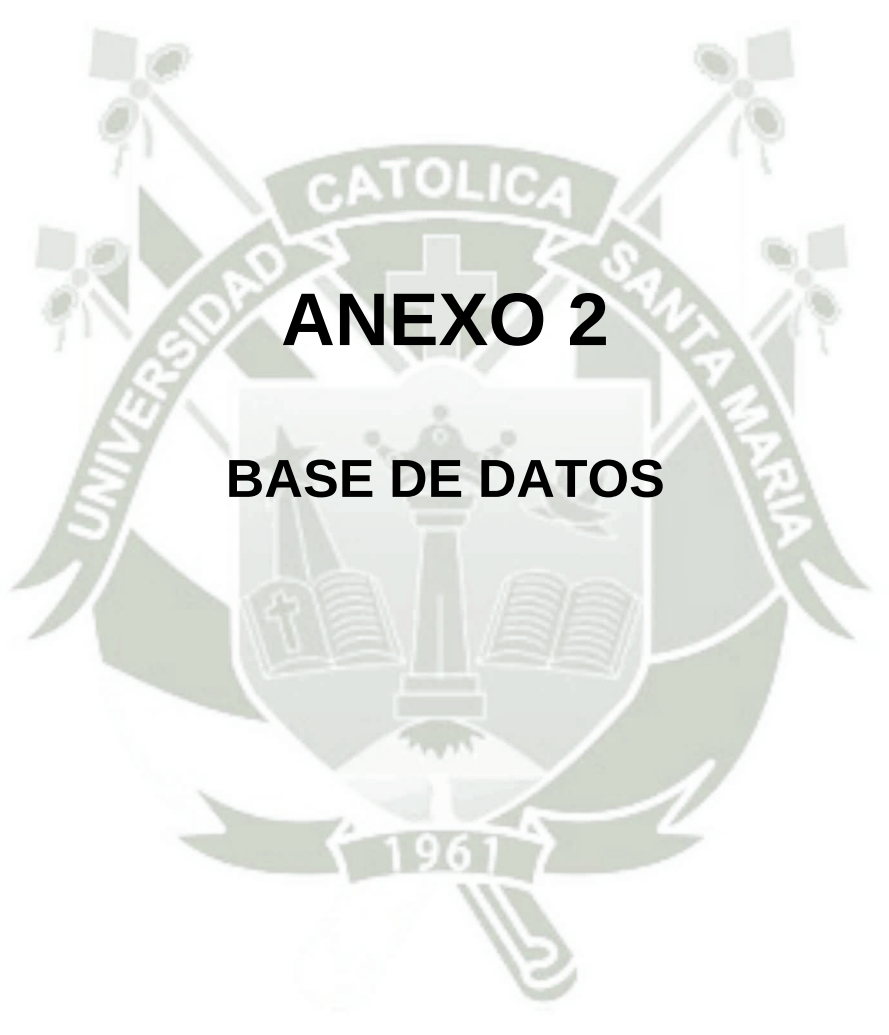
7.4. Tabulación: Cuadros de doble entrada considerando las variables.

7.5. Graficación de los datos: Se aplicarán histogramas tipo barra.

8. CRONOGRAMA

ACTIVIDAD	TIEMPO (semanas)
– Selección de línea problemática y Revisión bibliográfica	06
– Elaboración del plan de tesis y dictamen	04
– Ejecución	04
– Análisis estadístico	01
– Elaboración de resultados	01
– Elaboración del Informe Final	01
TOTAL	17 semanas

ACTIVIDAD (2006-2007)	SET	OCT	NOV	DIC	ENE y FEB
– Selección de línea problemática y Revisión bibliográfica	→				
– Elaboración del plan de tesis y dictamen			→		
– Ejecución				→	
– Análisis estadístico					→
– Elaboración de resultados					→
– Elaboración del Informe Final					→



ANEXO 2

BASE DE DATOS

% de BRONCODILATACIÓN (Salbutamol)

FACTOR		
Caso	Grupo	%
1	I	100
2	I	102
3	I	98
4	I	76
5	I	114
6	I	98
7	II	32
8	II	38
9	II	24
10	II	43
11	II	33
12	II	28
13	III	48
14	III	64
15	III	59
16	III	76
17	III	69
18	III	72

MALONALDEHIDO en tejido pulmonar (nM/g)

FACTOR		
Caso	Grupo	nM / g
1	I	1.04
2	I	0.98
3	I	1.17
4	I	1.14
5	I	1.09
6	I	1.18
7	II	1.95
8	II	1.63
9	II	1.41
10	II	1.87
11	II	1.92
12	II	1.76
13	III	1.18
14	III	1.22
15	III	1.11
16	III	1.24
17	III	1.31
18	III	1.13



ANEXO 3

FOTOGRAFIAS

FOTOGRAFÍA 1: RATAS ANTES DEL EXPERIMENTO



FOTOGRAFÍA 2: BOTELLÓN, BALANZA Y CIGARRILLOS PARA EL EXPERIMENTO, ADEMÁS DE ALIMENTO PARA RATAS

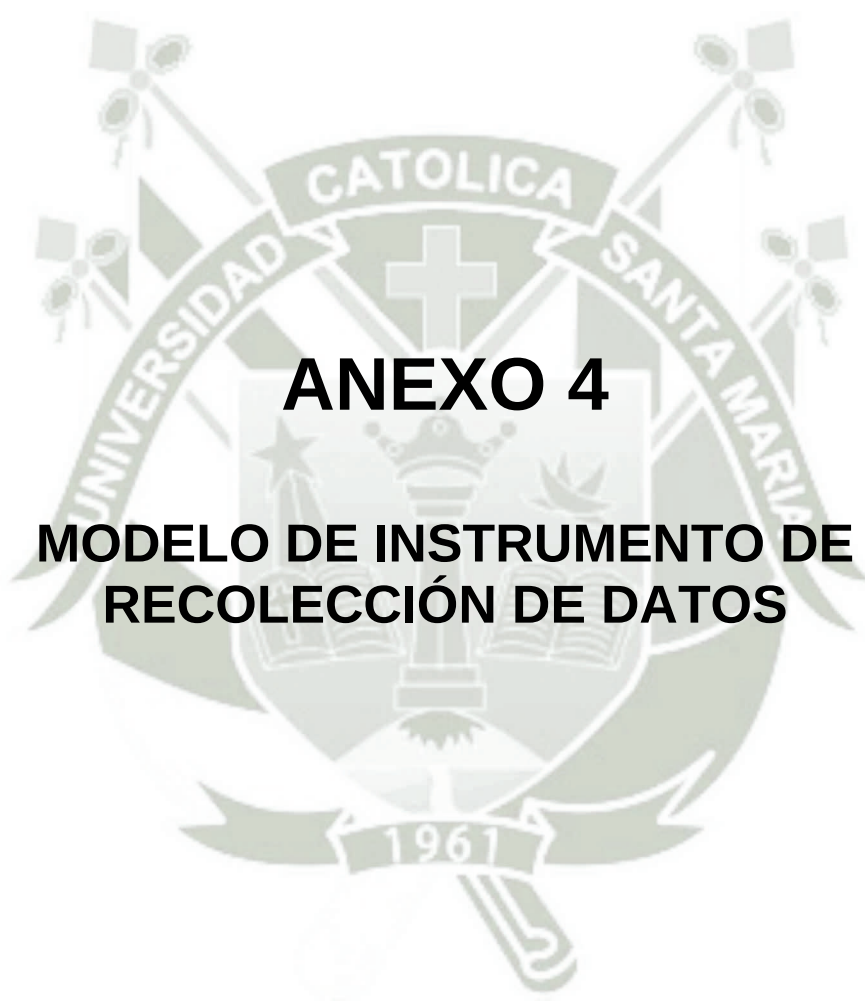


FOTOGRAFÍA 3: INVESTIGADOR JUNTO A LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN EN PLENA EXPOSICIÓN AL HUMO DEL CIGARRILLO



FOTOGRAFÍA 4: BOTELLÓN CON LAS RATAS SIENDO EXPUESTAS AL HUMO DEL CIGARRILLO





ANEXO 4

MODELO DE INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Ficha N° _____

1. **GRUPO DE ESTUDIO:**

GRUPO I ()

GRUPO II ()

GRUPO III ()

2. **ESTUDIO DEL EFECTO BRONCODILATADOR DEL SALBUTAMOL
EN ANILLOS BRONQUIALES DE SEGUNDO GRADO:**

.....

3. **DETERMINACION DEL MALONALDEHÍDO EN TEJIDO PULMONAR**

.....

OTROS HALLAZGOS:

.....

.....

ANEXO 5

PRINCIPALES FUENTES VEGETALES Y SUPLEMENTOS DE ACIDO ASCORBICO

PRINCIPALES FUENTES VEGETALES Y SUPLEMENTOS DE ACIDO ASCORBICO

A. FUENTES VEGETALES

Contenido de vitamina C (mg/100 grs.) en la pulpa de frutas seleccionadas¹⁶:

Fruta	Ácido Ascórbico
Piña	20
Maracuya	22
Fresa	42
Limón	44
Guayabana	60
Naranja	92
Casho	108
Acerola (total)	1300
Camu camu	2780



Camu camu



Otras fuentes de Vitamina C

B. SUPLEMENTOS.¹⁷

Vitamina C efervescente: consta de ácido ascórbico, ácido cítrico y bicarbonato de sodio. De esta manera resulta muy tolerante para el organismo.

Cápsulas y tabletas de ácido ascórbico: son las más utilizadas, se toman enteras.

Vitamina C con bioflavonoides: de esta manera se consigue una colaboración mutua entre los dos componentes. Resulta muy adecuada esta combinación para tratar la fragilidad capilar.

Vitamina C no ácida: está formada por ascorbato de sodio o ascorbato de calcio, especialmente adecuada para los que tengan problemas de acidez.

Tabletas de vitamina C de disolución lenta: al igual que las anteriores, se utilizan cuando hay problemas de acidez estomacal.

Tabletas para masticar: se utilizan especialmente para los niños. Tienen un sabor entre ácido y dulzón