

## Niveles de cobre y zinc en eritrocitos de estudiantes universitarios fumadores

*Copper and zinc levels in erythrocytes of university students smokers.*

Eduard Maury-Sintjago<sup>1,2</sup>, Teiddy Meza-Márquez<sup>2</sup>, Alfonso Bravo-Henriquez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Micronutrientes. INTA-Universidad de Chile.

<sup>2</sup>Laboratorio de Investigaciones y Desarrollo en Nutrición. Universidad del Zulia.

**Correspondencia:** Eduard Maury Sintjago, INTA, U de Chile. Av. El Líbano 5524, Macul, Santiago de Chile. eduard.maury@inta.uchile.cl

**Palabras Claves:** Cobre, Zinc, Eritrocitos, Universitarios, Fumadores

**Keywords:** Copper, Zinc, Erythrocytes, University Students, Smokers.

### Resumen

El cobre (Cu) y el zinc (Zn) son minerales que tienen funciones celulares muy importantes, ya que actúan como cofactores de varias enzimas, algunas participando en los sistemas de defensa antioxidante. Una alteración en los niveles sanguíneos de estos elementos pone en riesgo su papel preventivo de situaciones que producen estrés oxidativo, tales como el hábito de fumar cigarrillos. En el presente estudio se determinaron los niveles de Cu y Zn en eritrocitos en un grupo de estudiantes universitarios fumadores de cursas carreras del área de la salud. La muestra estuvo conformada por 36 individuos aparentemente sanos, del sexo masculino, con edades entre 18 y 25 años e índice de masa corporal normal, divididos en grupo de fumadores crónicos (n=86) y no fumadores (n=50). El contenido de Cu y Zn se determinó en lisados de eritrocitos, por espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer 3100). En los fumadores, los niveles de Zn ( $46,08 \pm 11,09 \mu\text{g/g Hb}$ ) fueron significativamente mayores que los detectados en los no fumadores ( $30,90 \pm 17,83 \mu\text{g/g Hb}$ ) ( $p < 0,05$ ). No hubo diferencias en el contenido de Cu eritrocitario entre ambos grupos ( $3,27 \pm 1,82$  y  $1,93 \pm 1,57 \mu\text{g/g Hb}$  en fumadores y no fumadores, respectivamente) ( $p > 0,05$ ). Se observó en los fumadores una relación inversa significativa entre Zn-Cu ( $r = -0,44$ ) y Cu-hemoglobina ( $r = -0,38$ ) ( $p < 0,05$ ). Los resultados obtenidos indican que los fumadores crónicos tienen una mayor demanda celular de elementos antioxidantes como el zinc, lo cual explicaría el elevado contenido de este elemento en los eritrocitos.

### Abstract

Copper (Cu) and zinc (Zn) are minerals that have important cellular functions, since they act as cofactors for several enzymes, some involved in antioxidant defense systems. An alteration in blood levels of these elements jeopardizes its preventive role of oxidative stress-producing situations, such as smoking cigarettes. This study determined the levels of Cu and Zn in erythrocytes in a group of college students taking courses smoking health area. The sample consisted of 136 apparently healthy, male, aged between 18 and 25 years and normal body mass index, divided into group of chronic smokers (n = 86) and nonsmokers (n = 50). The contents of Cu and Zn were determined in lysates of erythrocytes by atomic absorption spectrophotometry (Perkin Elmer 3100). In smokers, levels of Zn ( $46,08 \pm 11,09 \mu\text{g/g Hb}$ ) were significantly higher than those detected in non-smokers ( $30,90 \pm 17,83 \mu\text{g/g Hb}$ ) ( $p < 0,05$ ). There were no differences in erythrocyte Cu content between the two groups ( $3,27 \pm 1,82$  y  $1,93 \pm 1,57 \mu\text{g/g Hb}$  in smokers and non-smokers, respectively) ( $p > 0,05$ ). In smokers was observed a significant inverse relationship between Zn-Cu ( $r = -0,44$ ) and Cu-hemoglobin ( $r = -0,38$ ) ( $p < 0,05$ ). The results indicate that chronic smokers have a higher demand for cellular antioxidant elements such as zinc, which would explain the high content of lead in erythrocytes.

### Introducción

El tabaquismo ha sido relacionado con un alto riesgo para el desarrollo de cáncer, enfermedades cardiovasculares y muchas otras enfermedades crónicas (Baker *et al.*, 2000). Según un informe publicado por el Instituto Nacional de Epidemiología de Cáncer de Estados Unidos, la incidencia del cáncer de pulmón se asocia en un 90% al hábito de fumar cigarrillos, ocupando Venezuela el onceavo lugar a nivel mundial con una tasa de mortalidad para los hombres de un 16,4% (INECEU, 2000).

En el humo del cigarrillo se han descrito aproximadamente 4500 sustancias tóxicas, de éstas las de mayor importancia son la nicotina, el monóxido de carbono (CO) y carcinógenos como el alquitrán (Ramos *et al.*, 2002). El fumador expone sus alvéolos a 400 ppm de CO en cada aspirada. Esta cantidad de CO entra en contacto con la hemoglobina produciendo carboxihemoglobina, que es la responsable de una gran parte de la patología asociada al consumo del cigarrillo, sobre todo la que afecta a la pared vascular, por la disminución de la cantidad de oxígeno transportado por la sangre y una mayor dificultad de que este sea cedido a los tejidos, favoreciendo la hipoxia tisular. A través del CO se producen cambios fibróticos de la pared vascular por el efecto de la carboxihemoglobina que produce necrosis y degeneración de las miofibrillas de la capa muscular de las arterias (Patel y Homnick, 2000). Como consecuencia, los efectos clínicos de la exposición crónica a niveles elevados de carboxihemoglobina, podrían favorecer episodios coronarios agudos o incluso descompensar enfermedades respiratorias crónicas. Otros efectos atribuidos al CO son la alteración de la actividad mitocondrial y de la fosforilación oxidativa, degradación de ácidos grasos y desmielinización reversible del sistema nervioso central por reacciones de peroxidación (Pryor y Stone, 1993).

Las sustancias contenidas en el humo del cigarro implicadas en el origen y desarrollo de procesos neoplásicos se conoce como carcinógenos. La carcinogénesis química es un proceso secuencial en el que se distinguen al menos dos fases bien diferenciadas: iniciación y promoción. Dependiendo en que fase de la carcinogénesis actúe la sustancia química habrá carcinógenos iniciadores y promotores. Los iniciadores provocan un daño permanente en el aparato genético celular, dando a las células expresión neoplásica. La iniciación es un proceso rápido irreversible y con memoria, actuando directamente sobre el ADN nuclear y mitocondrial, dañando su estructura o modificando su expresión. Los promotores o provocadores favorecen el desarrollo neoplásico de las células iniciadas pero no son carcinógenos (Baker *et al.*, 2000, Ramos *et al.*, 2002).

Por otra parte, existe evidencia de que los fumadores están expuestos a un mayor estrés oxidativo, debido en primer lugar al gran número de radicales libres (RL) contenido en el humo del cigarrillo. Los radicales libres son átomos o moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que

genera una alta inestabilidad, por lo que reaccionan con varias biomoléculas tales como los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos, entre otras, y por lo tanto son capaces de producir alteraciones de diferentes funciones celulares (Muglioli *et al*, 1993). En segundo lugar, en los fumadores se evidencia un potencial antioxidante insuficiente como consecuencia de la depleción de algunos minerales esenciales como el zinc (Zn) (Sulochana *et al*, 2001) y el cobre (Cu) (Marangon *et al*, 1998), los cuales además de sus funciones en procesos de la respiración celular, reproducción de DNA y RNA, también participan en el mantenimiento de la integridad de las membranas celulares, gracias a que forman parte de los sistemas protectores antioxidantes (Chan *et al*, 1998).

Es importante acotar que las señales químicas relacionadas con la funcionalidad de la membrana celular y la expresión génica, muy sensibles al estrés oxidativo, son críticas para el mantenimiento de la funcionalidad de los eritrocitos y otras células sanguíneas que participan en la respuestas inmunológica y de su capacidad para defenderse de un amplio rango de antígenos a los que están expuestos. Por ello, no es de extrañar que estas células contengan en su interior un mayor número de antioxidantes en comparación con otras, y que deficiencias, aunque leves, de antioxidantes tales como la vitamina C, vitamina E,  $\beta$ -caroteno, zinc, cobre, selenio, y otros, causen una respuesta inmunológica diferente. Los componentes del humo del cigarrillo son capaces de activar el sistema inmuno-inflamatorio, lo cual podría ser el mecanismo por el que se relaciona con las enfermedades derivadas del hábito de fumar (Racz *et al*, 1994).

Los macrófagos alveolares generan RL pero por otro lado también ejercen una acción antioxidante y de esta forma son capaces de proteger al pulmón del daño mediado por estas especies químicas altamente reactivas. Otras células de la mucosa respiratoria, los neutrófilos y los eosinófilos también son productores de RL, y su producción se incluye dentro del conjunto de mecanismos celulares inespecíficos encaminados a defender al organismo de cualquier agresión física, química, así como también de la proliferación tumoral (Patel y Homnick, 2000).

A pesar de la insistente presencia de estos compuestos altamente reactivos, el organismo dispone de sistemas antioxidantes defensivos para combatir la producción normal de RL. De las numerosas clasificaciones de los antioxidantes, se ha recomendado adoptar la que los divide en: exógenos o antioxidantes que ingresan a través de la cadena alimentaria, tales como las vitaminas C (ácido ascórbico) y E (tocoferol), Beta-carotenos, flavonoides, licopenos, y endógenos, que son sintetizados por la célula, incluyendo el glutatión, coenzima Q, y las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa (GPX), catalasa (CAT) y sus correspondientes cofactores metálicos, los minerales hierro, selenio, manganeso. Particularmente, el cobre y el zinc son cofactores de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD), la cual cataliza la conversión de dos moléculas del radical superóxido ( $O_2^-$ ) a una molécula de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y una de oxígeno. Cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado RL o hacia varios (Rodríguez *et al*, 2001).

Se ha demostrado que un aumento en el consumo natural de antioxidantes contenidos en frutas y vegetales, tiene el efecto de disminuir la susceptibilidad a la oxidación de lípidos celulares, lo que ofrece protección contra las enfermedades oxidativas. Sin embargo, hay evidencia considerable de que los fumadores tienen ingestiones dietéticas y concentraciones sanguíneas más bajas de antioxidantes en contraste con los no fumadores (Dietrich *et al*, 2003, Steinberg y Chait, 1999, Ma *et al*, 2000, Chopra *et al*, 2000, Palaniappan *et al*, 2001). Si el complejo sistema antioxidante falla, aunado a la mayor producción de RL en las personas con hábito tabáquico (Pryor *et al*, 1993), se produce un incremento en el daño oxidativo a macromoléculas, lo cual pudiera contribuir con la aparición de diferentes enfermedades relacionadas con fumar cigarrillos (Baker *et al*, 2000).

En este orden de ideas, los profesionales en el área de la salud constituyen un colectivo con mayor capacidad de influir positiva o negativamente en la prevalencia del hábito de fumar en la sociedad. Sin embargo, diferentes trabajos publicados recientemente ponen de manifiesto que los profesionales y estudiantes de ciencias de la salud (medicina, odontología, farmacia, enfermería, y otras), presentan unas tasas de prevalencia de tabaquismo y unas actitudes en relación a este hábito que, si bien han ido mejorando progresivamente en los últimos años, todavía no alcanzan los niveles que serían deseables para el normal funcionamiento de las defensas del organismo (Prat-Marin *et al*, 1994, Villar *et al*, 2004, Hernández *et al*, 2006, Moreno *et al*, 2006). Se ha

encontrado además que la prevalencia de este hábito se incrementa progresivamente a través del curso en las escuelas de medicina (Baptista *et al*, 2004).

A pesar de que se han estudiado diferentes aspectos sobre el hábito tabáquico en jóvenes venezolanos (Núñez *et al*, 2003, Granero y Sánchez, 2006, Salas *et al*, 2006), ninguna de estas investigaciones ha relacionado el hábito tabáquico con alteraciones en la química sanguínea de metales en estudiantes universitarios. Sólo un estudio reciente realizado con una muestra de jóvenes de la facultad de Odontología de La Universidad del Zulia, ha evaluado la influencia del hábito de fumar sobre los niveles de metales esenciales en suero sanguíneo (Vargas *et al*, 2007).

Por lo tanto, el presente estudio se propone como objetivo determinar los niveles de cobre y zinc en eritrocitos de un grupo de estudiantes universitarios fumadores, cursantes de carreras relacionadas con el área de la salud en la Universidad del Zulia.

## **Materiales y Métodos**

### ***Diseño de la Investigación***

Se realizó un estudio transversal, prospectivo y analítico, donde fueron evaluados individuos fumadores y no fumadores, con el propósito de determinar los niveles de zinc y de cobre en eritrocitos. El período de la investigación comprende desde el primer semestre de 2003 al segundo semestre de 2005.

### ***Población en Estudio***

Se incluyeron sujetos del sexo masculino con edades comprendidas entre 18 a 25 años, todos estudiantes de las Facultades de Medicina y Odontología de la Universidad del Zulia. Para la selección de la muestra, a todos los individuos del estudio se les realizó una valoración nutricional, la cual contaba con una evaluación antropométrica para certificar que todos tuvieran un Índice de Masa Corporal IMC normal, una evaluación dietética con la finalidad de incluir aquellos individuos cuyo consumo de nutrientes cubriera los requerimientos nutricionales específico para ese grupo etario. Además se les practicó una evaluación clínica a través de una historia clínica completa, a fin de descartar procesos patológicos agudos o crónicos que pudiesen aportar falsos resultados. La muestra seleccionada estuvo conformada por 136 individuos y fue dividida en dos grupos: un grupo control (n=50) y un grupo de fumadores crónicos (n=86) con un consumo de 10 ó más cigarrillos/día por un período de 5 años o más. Todos los participantes del estudio manifestaron su consentimiento en forma escrita. Todos los procedimientos empleados fueron ejecutados de acuerdo con las normas éticas de la declaración de Helsinki y CIOMS (CIOMS/OMS, 2002).

### ***Toma de las Muestras Sanguíneas***

Las muestras sanguíneas se tomaron en ayunas, mediante punción de la vena braquial una vez desinfectada previamente la zona de punción mediante la utilización de alcohol isopropílico al 70 % (v/v). Para la extracción de la muestra se utilizó jeringas de 10 mL, el volumen de la muestra oscilo entre 2-5 mL. La sangre se depositó en tubos para muestras sanguíneas conteniendo heparina como anticoagulante.

### ***Preparación de Lisados de Eritrocitos***

Los lisados de eritrocitos se prepararon a partir de la sangre heparinizada procediendo de la siguiente manera: Dispensar 500  $\mu$ L de las muestras de sangre en tubos eppendorf. Centrifugar a 4500 r.p.m durante 10 min. a una temperatura entre 2-8°C. Remover el sobrenadante (plasma sanguíneo) y almacenar a -70°C. Lavar las células sanguíneas con 4 volúmenes de solución salina al 0,9%, realizando el procedimiento tres veces. Lisar el residuo de células sanguíneas mediante la adición de 4 volúmenes de agua desionizada fría. Almacenar en frío a -70°C hasta el momento del análisis enzimático.

### ***Reactivos y Soluciones para Espectrofotometría de Absorción Atómica***

Todos los reactivos empleados en el procesamiento de las muestras fue grado analítico. Se utilizó instrumental de vidrio y plástico químicamente limpio, obtenido por lavados sucesivos con

detergente no iónico (Noión, Wiener Lab, Argentina), ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) al 10% (v/v) (Fisher Scientific Company, USA) y agua desionizada.

### *Análisis de Minerales*

Se determinaron los niveles de cobre y zinc en eritrocitos mediante la técnica de espectrofotometría de absorción atómica, bajo la modalidad de llama, con un equipo espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer modelo 3100, provisto de lámparas de cátodo hueco específico para cada mineral. Las longitudes de onda empleadas fueron las siguientes: 324,8 nm (Cu) y 213,9 nm (Zn). Los estándares para calibración en esta técnica consistieron en diluciones seriadas obtenidas a partir de una solución stock conteniendo 1000 mg/mL (ppm) de cobre (Cu) y zinc (Zn) en medio ácido (Aldrich, cat. N<sup>o</sup> 24,792-8). Se utilizó agua bidestilada y desionizada como diluyente.

Las muestras de lisados de eritrocitos fueron previamente sometidas a digestión ácida en bombas tipo Parr, empleando HNO<sub>3</sub> concentrado en una proporción de 3 mL de ácido por cada 5 mL de lisado. Esto, con la finalidad de disminuir las posibles interferencias espectrales durante el análisis por absorción atómica, debido a la complejidad de la matriz orgánica representada por los eritrocitos, la cual es destruida por acción del ácido. Las bombas serán mantenidas en estufa a una temperatura de 110°C, por 4 horas. Finalmente, las muestras digeridas se diluyeron en balones aforados de 5 mL, con agua bidestilada y desionizada. Las muestras fueron analizadas por triplicado y los valores correspondientes a la concentración de minerales se expresaron en mg/L ó µg/g de hemoglobina.

Antes del análisis de minerales, se valoró el método para tener precisión y exactitud por medio de muestras del material de referencia tejido de ostra (Oyster Tissue, NIST Standard Reference Material 1566a, USA) y un blanco reactivo. Los resultados obtenidos (promedio ± desviación estándar) durante este control de calidad fueron, en mg/kg, Cu: 63,50 ± 2,99, Zn: 772,38 ± 34,30, con un valor certificado para Cu: 66,3 ± 4,3, Zn: 830 ± 57, correspondientes a porcentaje de recuperación de 96% y 93%, respectivamente.

### *Análisis Estadístico*

Se empleó la estadística descriptiva para expresar los resultados de las diferentes determinaciones como promedio ± la desviación estándar. La distribución normal de los resultados fue determinada con la prueba de Shapiro-Wilks. Con el propósito de establecer diferencias entre las variables, los datos obtenidos fueron analizados con la prueba “t” de Student, y la prueba de correlación de Pearson. Se consideró un valor de  $p < 0,05$  (intervalo de confianza del 95%) como estadísticamente significativo. Se usó el paquete SPSS versión 10.0 para Windows.

## **Resultados**

El estudio estuvo conformado por una muestra de 136 individuos, del sexo masculino divididos en dos grupos: un grupo de fumadores (n=86) y un grupo de no fumadores (n=50), con edades comprendidas de 18 a 25 años (Tabla 1).

Características	Fumadores (n=86)*	No fumadores (n=50)*
Edad (años)	21,34 ± 2,19	22,65 ± 4,54
Peso (kg)	65,16 ± 7,06	63,37 ± 6,71
Talla (m)	1,70 ± 0,04	1,64 ± 0,09
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	22,55 ± 1,48	23,56 ± 1,15

**Tabla 1.** Características de los individuos fumadores y no fumadores. \* Los resultados se expresan como promedio ± la desviación estándar ó valores absolutos. \*\* Indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

**Table 1.** Characteristics of smokers and nonsmokers. \* Results are expressed as mean ± standard deviation or absolute values. \*\* Indicates significant differences ( $p < 0.05$ ).

La Tabla 2 muestran los niveles séricos de los metales cuantificados para cada grupo de estudio. Se observó en el grupo de fumadores los niveles de zinc en eritrocitos ( $2,51 \pm 0,39$  mg/L,  $46,08 \pm 11,09$   $\mu$ g/g Hb) fueron significativamente mayores que los encontrados en los no fumadores ( $1,58 \pm 0,19$  mg/L,  $32,51 \pm 7,85$   $\mu$ g/g Hb) ( $p < 0,05$ ). En relación con los niveles de cobre, se pudo observar que en el grupo de fumadores ( $0,17 \pm 0,08$  mg/L,  $3,27 \pm 11,82$   $\mu$ g/g Hb) fueron más altos que en los no fumadores ( $0,11 \pm 0,06$  mg/L,  $2,41 \pm 1,51$   $\mu$ g/g Hb) pero sin diferencias estadísticas ( $p > 0,05$ ). La relación Cu/Zn fue similar para ambos grupos ( $p > 0,05$ ).

Metal	Fumadores (n=86)*	No Fumadores (n=50)*
Cu		
mg/L	$0,17 \pm 0,08$ **	$0,09 \pm 0,07$ **
$\mu$ g/g Hb	$3,27 \pm 1,82$	$1,93 \pm 1,57$
Zn		
mg/L	$2,51 \pm 0,39$ **	$1,52 \pm 0,86$ **
$\mu$ g/g Hb	$46,08 \pm 11,09$ **	$30,90 \pm 17,83$ **
Cu/Zn	$0,07 \pm 0,03$	$0,06 \pm 0,04$

**Tabla 2.** Comparación de los niveles de cobre y zinc en eritrocitos de estudiantes fumadores y no fumadores. \* Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  la desviación estándar. \*\* Indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

**Table 2.** Comparison of copper and zinc levels in erythrocytes of smokers and non-smokers students. \* Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation or absolute values. \*\* Indicates significant differences ( $p < 0,05$ ).

En la Tabla 3 se presenta los resultados de la correlación de Pearson entre los niveles de cobre y zinc en eritrocitos y el contenido de hemoglobina. En este estudio, se observó en los fumadores una relación inversa significativa entre los niveles séricos de cobre y zinc ( $r = -0,44$ ,  $p < 0,05$ ), así como también una baja correlación significativa entre los niveles de cobre y hemoglobina ( $r = -0,38$ ,  $p < 0,05$ ). En los controles no se encontró correlación entre las variables en estudio.

Correlación	Fumadores (n=26)*	No Fumadores (n=20)*
Zn-Cu	$r = -0,44$ , $p = 0,03$ **	$r = 0,74$ , $p = 0,02$ **
Zn-hemoglobina	$r = 0,28$ , $p = 0,17$	$r = -0,16$ , $p = 0,68$
Cu-hemoglobina	$r = -0,38$ , $p = 0,05$ **	$r = -0,06$ , $p = 0,87$

**Tabla 3.** Correlación entre los niveles de zinc, cobre y contenido de hemoglobina en eritrocitos de estudiantes fumadores y no fumadores. \* Los resultados corresponden al coeficiente de correlación de Pearson. \*\* Indica correlaciones significativas ( $p < 0,05$ ).

**Table 3.** Correlation between the levels of zinc, copper and hemoglobin content in erythrocytes of smokers and non-smokers students. \* Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation or absolute values. \*\* Indicates significant differences ( $p < 0,05$ )

En la Tabla 4 aparece la comparación de los resultados del presente estudio con otras fuentes bibliográficas. En general, las concentraciones de zinc en eritrocitos fueron similares a las reportadas para este mineral en el mismo tejido muestral. Sin embargo, las concentraciones de cobre fue más bajo en comparación con otros estudios que evalúan cobre en eritrocitos y otros tejidos.

Metal	Presente estudio	Otros estudios
Cu	0,17 mg/L (3,27 µg/g Hb) [E]	89 µg/dl (0,89 mg/L) ([B] <sup>a*</sup> 0,96 mg/L [S] <sup>b*</sup> 14,50 µmol/L (0,92 mg/L) [S] <sup>c*</sup> 122,50 µg/dl (1,23 mg/L) [P] <sup>d*</sup> 123,71 µg/dl (1,24 mg/L) [S] <sup>e*</sup> 1,42 µg/g Hb [E] <sup>f**</sup> 86-106 µg/100 ml (0,86-1,06 mg/L) [E] <sup>g**</sup> 2,41 µg/g Hb [E] <sup>h**</sup>
Zn	2,51 mg/L (46,08 µg/g Hb) [E]	530 µg/dl (5,30 mg/L) ([B] <sup>a*</sup> 0,36 mg/L [S] <sup>b*</sup> 15,80 µmol/L (1,03 mg/L) [S] <sup>c*</sup> 83,59 µg/dl (0,83 mg/L) [S] <sup>e*</sup> 12,52 µg/g Hb [E] <sup>f**</sup> 21,60 µmol/L (1,42 mg/L) [S] <sup>g*</sup> 40-44 µg/g Hb [E] <sup>h**</sup> 42,2 µg/g Hb [E] <sup>i**</sup> 49,00 µg/g Hb [E] <sup>j**</sup>

**Tabla 4.** Comparación del contenido de cobre y zinc en eritrocitos de estudiantes fumadores con otros estudios ( ) Indica unidades equivalentes. [ ] Indica la matriz evaluada. B: sangre completa. S: suero. P: plasma. E: eritrocito. \*Individuos fumadores. \*\*Individuos no fumadores. <sup>a</sup>Hombres fumadores de 40-58 años (Sulochana *et al.*, 2001). <sup>b</sup>Individuos del sexo masculino con edades 18 a 25 años (Vargas *et al.*, 2007). <sup>c</sup>Estudiantes sexo femenino de 15-17 años (Kim *et al.*, 2003). <sup>d</sup>Individuos adultos (Lapenna *et al.*, 1995). <sup>e</sup>Hombres adultos de 33-51 años (Al-Numair, 2006). <sup>f</sup>Hombres no fumadores de 51,10 ± 8,87 años (Raga, 2001). <sup>g</sup>Hombres de 18-60 años (Blomfield y Macmahon, 1969). <sup>h</sup>Hombres adultos (Hatano *et al.*, 1982). <sup>i</sup>Fumadores crónicos de 10-38 años (Uz *et al.*, 2003). <sup>j</sup>Valores normales (Guthrie y Picciano, 1994). <sup>k</sup>Individuos adultos (Gibson y Ferguson, 1998). <sup>l</sup>Pacientes renales no dializados (Mafra y Cozzolino, 2004).

**Table 4.** Comparison of copper and zinc in erythrocytes of smokers students in other studies. ( ) Indicates equivalent units. [ ] indicates the matrix tested. B: whole blood. S: serum. Q: plasma. E: erythrocyte. \*Individuals smokers. \*\*Individual no smokers. <sup>a</sup>Men smokers 40-58 years (Sulochana *et al.*, 2001). <sup>b</sup>Male students aged 18-25 years. (Vargas *et al.*, 2007). <sup>c</sup>Female students aged 15-17 years. (Kim *et al.*, 2003). <sup>d</sup>Adults individuals (Lapenna *et al.*, 1995). <sup>e</sup>Adults individuals aged 33-51 years. (Al-Numair, 2006). <sup>f</sup>Men non-smokers aged 51,10±8,87 years. (Raga, 2001). <sup>g</sup>Men aged 18-60 years. (Blomfield y Macmahon, 1969). <sup>h</sup>Men adults. (Hatano *et al.*, 1982). <sup>i</sup>Chronic smokers since 10-38 years. (Uz *et al.*, 2003). <sup>j</sup>Normal value (Guthrie y Picciano, 1994). <sup>k</sup>Adults individuals (Gibson y Ferguson, 1998). <sup>l</sup>Kidney patients not on dialysis (Mafra y Cozzolino, 2004).

## Discusión

El hábito de fumar es considerado una epidemia mundial teniendo en cuenta los efectos sobre la salud de los fumadores y de los expuestos al humo del cigarrillo. Los adolescentes son el grupo de población hacia el cual se dirigen las actividades de publicidad de las compañías productoras de tabaco al considerarse el más sensible al tratar de imitar las costumbres presentadas por los medios de comunicación, así como las de sus padres o de grupos de población mayores (Tafur *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que en el grupo etario de 20 a 24 años, presumiblemente bien informada respecto a los efectos del tabaco, el consumo se incrementa en dicho rango de edad (Hernández *et al.*, 2003). Desde un punto de vista evolutivo, esta etapa coincide con la incorporación al trabajo de aquellos jóvenes para quienes el bachillerato o la formación profesional constituyen el objetivo terminal de sus estudios, y con la carrera universitaria. En relación con el consumo de tabaco, se trata de una edad de especial relevancia para la investigación de las variables que determinan la consolidación del hábito puesto que en esta etapa emergen los patrones de consumo que se mantendrán a lo largo de la vida adulta (Eissenberg y Balster, 2000, White *et al.*, 2002).

Varios estudios han confirmado que los fumadores, en comparación con individuos no fumadores, presentan alteración en las concentraciones sanguíneas de algunos minerales esenciales para las diferentes funciones celulares (Faruque *et al.*, 1995, Kocugit *et al.*, 2001, Kim *et al.*, 2003, Kim *et al.*, 2004, Galan *et al.*, 2005), lo cual pudiera comprometer a importantes

mecanismos de defensa contra la agresión representada por los compuestos tóxicos contenidos en el humo del cigarrillo. El propósito del presente estudio fue determinar el contenido de cobre y zinc en eritrocitos de fumadores crónicos de la Universidad del Zulia, como un indicador del status antioxidante.

En el organismo, la mayor parte del Zn y Cu se encuentran tanto en el compartimiento intracelular como asociado al tejido óseo. Una pequeña parte se halla en el plasma unido a proteínas. Es, por lo tanto, y según algunos autores, improbable que la concentración sérica de estos elementos traça refleje con exactitud el contenido total corporal. El músculo esquelético es probablemente el tejido más apropiado para el estudio de los elementos traça. Este tejido no es fácilmente accesible y, por lo tanto, debería usarse otro. Sin embargo, las células sanguíneas (leucocitos y eritrocitos) son una buena alternativa debido a su fácil obtención. A la hora de optar por eritrocitos o leucocitos, se podría pensar que los leucocitos presentan alguna ventaja sobre los hematíes porque quizá son más representativos del resto de los tejidos dado que poseen núcleo y mitocondrias. Pero el contenido de elementos traça en los leucocitos mononucleares es diferente del de los leucocitos polimorfonucleares y, en consecuencia, la valoración del contenido de elementos traça debería hacerse separadamente en cada grupo de células (Raz & Havivi, 1989). Debido a esto último, en el presente trabajo se optó finalmente por estudiar el contenido de metales traça de los eritrocitos.

Los resultados de esta investigación demostraron que los fumadores tienen niveles de zinc en eritrocitos significativamente más altos en comparación con el grupo de no fumadores. Son escasas las referencias sobre los valores normales de Zn en eritrocitos humanos,  $1,40 \pm 0,10$  mg/L en individuos sanos (Whang-Sheng *et al.*, 2005), ó  $0,0386 \pm 0,0068$   $\mu\text{moles}/\mu\text{moles Hb}$  (Valberg *et al.*, 1965), pero en general se puede decir que se encuentran en el mismo orden de magnitud que en otros mamíferos, de aproximadamente 18 a 47  $\mu\text{g/g Hb}$  (Yur *et al.*, 2002). Aún cuando no son frecuentes los reportes sobre el contenido de metales en eritrocitos de fumadores, se han encontrado en este grupo valores incrementados de Zn en suero (Faruque *et al.*, 1995, Kocygit *et al.*, 2001), lo que pudiera relacionarse con los altos niveles de Zn detectados en eritrocitos. Por otra parte, en el presente estudio los fumadores presentaron concentraciones ligeramente elevadas de cobre en eritrocitos, pero sin diferencias significativas versus el grupo de no fumadores. Se han reportado valores de Cu en el orden de los  $0,09 \pm 0,01$  mg/L (Wang-Sheng *et al.*, 2005) y de  $0,00345 \pm 0,00049$   $\mu\text{moles}/\mu\text{moles Hb}$  (Valberg *et al.*, 1965), en individuos sanos.

Los eritrocitos humanos son un blanco importante para el ataque electrofílico y de otros compuestos oxidantes externos dañinos (Orhan *et al.*, 2005). Así, el aparente aumento del contenido de Zn y Cu en los fumadores evaluados puede ser el resultado de una utilización incrementada de estos minerales en los eritrocitos, debido a la condición de estrés oxidativo al cual están sometidos los fumadores, lo que a su vez provoca alteraciones en el sistema antioxidante mediados por enzimas como la superóxido dismutasa (Cu/Zn-SOD), cuya actividad suele estar elevada en los fumadores (Ozguner *et al.*, 2005, Kanehira *et al.*, 2006).

El cociente Cu/Zn no varió entre los fumadores y no fumadores. En este sentido, se ha descrito que cuanto mayor es el cociente Cu/Zn en suero, mayor es el contenido de peróxidos lipídicos, es decir, existe una relación entre el cociente Cu/Zn y la carga oxidante sistémica, y las alteraciones de este cociente pueden servir como un marcador distintivo de diferentes patologías, incluyendo aterosclerosis y cáncer (Mezzetti *et al.*, 1998). Se ha postulado que el cuerpo humano tiene ciertos mecanismos compensatorios, a través de los cuales un incremento en la absorción de Zn o una disminución en la excreción pudiera contribuir al aumento de los niveles de este mineral, pero, el incremento en el Zn también puede reprimir la absorción de Cu, disminuyendo por lo tanto los niveles de este mineral (Wang *et al.*, 1998). Esto último explicaría la correlación inversa observada entre ambos elementos en el grupo de fumadores.

En individuos jóvenes, el estrés oxidativo es menor, debido a la eficiencia de sus sistemas antioxidantes, en comparación con personas mayores de 40 años, pero en los fumadores crónicos tan sólo una hora después de fumar uno o dos cigarrillos aumenta la generación de radicales libres e inversamente disminuye la eficiencia de los sistemas antioxidantes que requieren de Cu y Zn (Abdurrahim *et al.*, 2001). Es importante destacar que los niveles de estos cofactores en el organismo dependen de su aporte en la dieta, así como también de las condiciones metabólicas



que pudiera presentar el individuo (Czajka, 1996), pero la variable dietética no influyó en los resultados obtenidos en este estudio, ya que todos los individuos que participaron en el mismo cubrieron los requerimientos nutricionales de estos minerales, de acuerdo con los criterios de inclusión establecidos.

Nuestros hallazgos sugieren un incremento del estrés oxidativo en los estudiantes fumadores crónicos de la Universidad del Zulia, evidenciado por la presencia de un elevado contenido de algunos elementos como el Zn en el eritrocito, como parte esencial de los mecanismos antioxidantes celulares que protegen a estas células contra la acción tóxica de los componentes del humo del cigarrillo.

### Referencias Bibliográficas

- Abdurrahim, K., Ozcan, E., Selahattin, G. 2001. "Effects of tobacco smoking on plasma selenium, zinc, copper and iron concentrations and related antioxidative enzyme activities". *Clinical Biochemistry* 34(8):629-633.
- Al-Numair, K.S. 2006. The influence of cigarette smoking on vitamin C, trace elements and lipid profile of healthy, Saudi adult males. *Journal of Food, Agriculture & Environment* Vol.4 (3&4): 79-83.
- Baker, F., Ainsworth, S.R., Dye, J.T., Crammer, C. 2000. "Health risks associated with cigar smoking". *JAMA* 284:735-740.
- Baptista Menezes, A.M., Curi Hallal, P., Silva, F., Souza, M., Paiva, L., D'ávila, A., Weber, B., Vaz, V., Marques, F., Horta, B.L. 2004. "Tabagismo em estudantes de Medicina: tendências temporais e fatores associados". *J Bras Pneumol* 30(3) 223-228.
- Blomfield, J., Macmahon, R.A. 1969. Micro determination of plasma and erythrocyte copper by atomic absorption spectrophotometry. *J. clin. Path.* 22: 136-143.
- Chan, S., Gerson, B., Subramaniam, S. 1998. "The role of copper, molybdenum, selenium, and zinc in nutrition and health". *Clinical Laboratory Medical* 18(4):673-685.
- Chopra, M., O'neill, M., Keogh, N., Wortley, G., Southon, S., Thurnham, D. 2000. "Influence of increased fruit and vegetable intake on plasma and lipoprotein carotenoids and LDL oxidation in smokers and nonsmokers". *Clinical Chemistry* 46(11):1818-1829.
- Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas /Organización Mundial de la Salud, CIOMS/OMS. 2002. Pautas éticas internacionales para la investigación biomédica en seres humanos. [Documento Electrónico]. Disponible en: [http://www.ub.es/rceue/archivos/Pautas\\_Eticas\\_Internac.pdf](http://www.ub.es/rceue/archivos/Pautas_Eticas_Internac.pdf). [Consultado el 20/06/2007].
- Czajka-Narins, D. Minerales. 1996. En: Mahan K, Wscott-Stump S. *Nutrición y Dietoterapia de Krause*. 9<sup>na</sup> ed. McGraw-Hill Interamericana. p. 321-41.
- Denise Mafrá\* and Silvia M. F. Cozzolino. Erythrocyte zinc and carbonic anhydrase levels in nondialyzed chronic kidney disease patients. *Clinical Biochemistry* 37 (2004) 67– 71.
- Dietrich, M., Block, G., Norkus, E., Hudes, M., Traber, M., Cross, C., Packer, L. 2003. "Smoking and exposure to environmental tobacco smoke decrease some plasma antioxidants and increase  $\gamma$ -tocopherol in vivo after adjustment for dietary antioxidant intakes". *American Journal of Clinical Nutrition* 77(1):160-166.
- Eissenberg, T, Balster, R. L. 2000. "Initial tobacco use episodes in children and adolescents: current knowledge, further directions". *Drug and Alcohol Dependence* 59:S41-S60.
- Faruque, M.O., Khan, M.R., Rahman, M.M., Ahmed, F. 1995. "Relationship between smoking and antioxidant nutrient status". *Br. J. Nutr.* 73 (4):625-32.
- Galan. P., Viteri, F.E., Bertrais, S., Czernichow, S. 2005. "Serum concentrations of beta-carotene, vitamins C and E, zinc and selenium are influenced by sex, age, diet, smoking status, alcohol consumption and corpulence in a general French adult population". *European Journal of Clinical Nutrition* 59(10):1181.
- Gibson, R.S., Ferguson, E.L. 1998. Assessment of dietary zinc in a population. *Am J Clin Nutr* 68 (Suppl): 430S-34S.
- Granero, R., Sánchez, M. 2006. Cambios en el uso de tabaco y factores relacionados en estudiantes del sexto al noveno grado, Estado Lara, Venezuela, años 2000 y 2003. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 22(9):1893-1899.

- Guthrie, H.A., Picciano, M.F. 1994. *Human nutrition*. Boston: McGraw Hill. 654p.
- Hatano, S., Nishi, Y., Usui, T. 1982. Copper levels in plasma and erythrocytes in healthy Japanese children and adults. *American Journal of Clinical Nutrition* 35: 120-126.
- Hernández, J., Guevara, C.L., García, M.F., Tascón, J.E. 2006. "Hábito de fumar en los estudiantes de primeros semestres de la Facultad de Salud: Características y percepciones. Universidad del Valle, 2003". *Colombia Médica* 37(1): 31-38.
- Instituto Nacional de Epidemiología de Cáncer de Estados Unidos (INECEU). 2000. Valores de cáncer. Departamento de Investigación sobre tabaco. [Documento en línea]. Disponible: <http://w.w.w.msds.gov.ve>. [Consulta: 2006, Enero 19].
- Kanehira, T., Shibata, K., Kashiwazaki, H., Inoue, N., Morita, M. 2006. "Comparison of antioxidant enzymes in saliva of elderly smokers and non-smokers". *Gerodontology* 23(1):38-42.
- Kim, S.H., Ensunsa, J.L., Zhu, Q.Y., Kim, J.S., Shin, H.S., Keen, C.L. 2004 "An 18-month follow-up study on the influence of smoking on blood antioxidant status of teenage girls in comparison with adult male smokers in Korea". *Nutrition*. 20(5):437-44.
- Kim, S.H., Kim, J.S., Shin, H.S., Keen, C.L. 2003. "Influence of smoking on markers of oxidative stress and serum mineral concentrations in teenage girls in Korea". *Nutrition* 19(3):240-3.
- Kocyigit, A., Erel, O., Gur, S. 2001 "Effects of tobacco smoking on plasma selenium, zinc, copper and iron concentrations and related antioxidative enzyme activities". *Clin. Biochem.* 34(8):629-33.
- Lapenna, D., Mezzetti, A., De Gioia, S., Pierdomenico, S.D., Daniele, F., Cucurullo, F. 1995. Plasma copper and lipid peroxidation in cigarette smokers. *Free Radical Biology and Medicine* 19(6): 849-852.
- Ma, J., Hampl, J., Betts, N. 2000. "Antioxidant intakes and smoking status: Data from the continuing survey of food intakes by individuals 1994-1996". *American Journal of Clinical Nutrition* 71(3):774-780.
- Marangon, K., Bernard, H., Lecomte, E., Agnes, P., Grolier, P., Chancerelle, Y., Artur, Y., Siest, G. 1998. "Diet, antioxidant status, and smoking habits in French men". *American Journal of Clinical Nutrition* 67:231-239.
- Mezzetti, A., Pierdomenico, S.D., Costantini, F., Romano, F., De Cesare, D., Cucurullo, F., Imbustaro, T., Riario-Sforza, G., Di Giacomo, F., Zuliani, G., Fellin, R. 1998. "Copper/zinc ratio and systemic oxidant load: effect of aging and aging-related degenerative diseases". *Free Radic. Biol. Med.* 25:676-681.
- Moreno San Pedro, E., Gil Roales-Nieto, J., Blanco Coronado, J.L. 2006. "Hábitos y creencias de salud en médicos y estudiantes de Medicina". *International Journal of Psychology and Psychological Therapy* 6(1): 99-110.
- Mugli, R. 1993. "Free radicals tissue damage: the prospective role of antioxidant nutrients. In: free radicals and antioxidants in nutrition". *Tobacco control* 23(5):189-201.
- Núñez, R., Rodríguez, J., Silva, E., Urquiola, K., de Finizola, A. "Evaluación de un programa de intervención educativa para la cesación de tabaquismo en estudiantes de medicina y de enfermería de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, en el lapso junio-noviembre 2003". *Boletín Médico de Postgrado*. Vol. XX N° 2 Abril – Junio 2004. UCLA. Decanato de Medicina. Barquisimeto-Venezuela.
- Orhan, H., Evelo, C.T., Sahin, G. 2005. "Erythrocyte antioxidant defense response against cigarette smoking in humans-the glutathione S-transferase vulnerability". *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 19(4):226-33.
- Ozguner, F., Koyu, A., Cesur, G. 2005. "Active smoking causes oxidative stress and decreases blood melatonin levels". *Toxicol. Ind. Health.* 21(1-2):21-6.
- Palaniappan, U., Starkey, L., O'loughlin, J., Gray-Donald, K. 2001. "Fruit and vegetable consumption is lower and saturated fat intake is higher among Canadians reporting smoking". *Journal of Nutrition* 131:1952-1958.
- Patel, D., Homnick, D. 2000. "Pulmonary effects of smoking". *Adolescents Medical* 11:567-577.
- Prat-Marin, A., Fuentes-Almendras, M.M., Sanz-Gallen, R., Canela-Argues, R., Canela-Soler, J., Pardell-Alenta, H., Salleras-Sanmarti, L.L. 1994. Epidemiología del tabaquismo en los estudiantes de ciencias de la salud. *Rev. Saúde Pública* 28(2): 100-106.

- Pryor, W.A., Stone, K. 1993. "Oxidants in cigarette smoke: radicals hydrogen peroxides peroxyxynitrate and peroxyxynitrite". *Annals N. Y. Acad. Sci.*686:12-28.
- Rácz, O., Ništiar, F., Tomori, Z., Kuchta, M., Lovásóvá, E. 1994. "Effects of smoking on human health". *Nutrition Reviews* 52(8):253-265.
- Raga Luria, X. 2001. Alteraciones en el metabolismo del zinc, cobre y metalotioneína en la diabetes mellitus tipo 2. Memoria para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía. Universitat Rovira I Virgili. Tarragona, España. p. 76.
- Ramos, C., Ruiz, A., Fernández, J. 2002. Composición del humo del tabaco. Manual de Tabaquismo. México. Solano. p. 35-46.
- Raz, I., Havivi, E. 1989. "Trace elements in blood cells of diabetic subjects". *Diabetes Res.* 10:21-24.
- Rodríguez, J.M., Menéndez, J.R., Trujillo, Y. 2001. "Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo". *Rev. Cubana Med. Milit.* 30(1), 36-44.
- Salas, A., Villarroel, V., Arata-Bellabarba, G. 2006. "Hábito de fumar, presión arterial, frecuencia cardiaca y glicemia en estudiantes del área de la salud". X Congreso Venezolano de Endocrinología y Metabolismo – V Curso Panamericano de Obesidad. Julio Margarita-Venezuela. p. 24.
- Steinberg, F., Chait, A. 1999. "Antioxidant vitamin supplementation and lipid peroxidation in smokers". *American Journal of Clinical Nutrition* 68(6):319-327.
- Sulochana, K., Punitham, R., Ramakrishnan S. 2001. "Oral supplementation of zinc promotes erythrocyte superoxide dismutase activity in chronic cigarette smoker: report on a pilot clinical trial". *Indian. Journal of Pharmacology* 33:224.
- Tafur, L.A., Ordoñez, G.A., Millán, J.C., Varela, J.M., Rebellón, P. 2005. "Tabaquismo en personal de la Universidad Santiago de Cali". *Colombia Médica* 36(3): .
- Uz E., Sakurai, H., Hepsen, I.F., Var, A., Sogut, S., Akyol, O. 2003. The relationship between serum trace element changes and visual function in heavy smokers. *Acta Ophthalmol Scand*,81:161-164.
- Valberg, L., Holt, J., Paulson, E., Szivek, J. 1965. "Spectrochemical Analysis of Sodium, Potassium, Calcium, Magnesium, Copper, and Zinc in Normal Human Erythrocytes". *Journal of Clinical Investigation* 44(3): 379-389 .
- Vargas, M.E., Martínez, N., Bravo, A., Bohórquez, L., Araujo, S., Souki, A., Paz, P., Fernández, A.C., Ferrer, D. 2007. Influencia del hábito de fumar sobre las concentraciones séricas de zinc, cobre y selenio en adultos jóvenes. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* 26(1): 42-45.
- Villar Hoz, E., Viñas Poch, F., Ferrer, J.J., Caparrós Caparrós, B., Pérez Guerra, I., Cornellá Canals, M. 2004. "Dimensiones psicopatológicas asociadas al consumo de tabaco en población universitaria". *Anales de Psicología* 20(1):33-46.
- Wang, W., Wang, L., Lu, Y. 1998. "Serum Concentrations of Copper and Zinc in Patients with Silicosis". *J. Occup. Health*, 40:230-231.
- Wang-Sheng, K., Chih-Hung, G., Maw-Sheng, Y., Li-Yun, L., Guoo-Shyng, W., Hsu Pei-Chung, C., Mei-Ching, L., Chia-Yeh, L. 2005. "Blood micronutrient, oxidative stress, and viral load in patients with chronic hepatitis C". *World J. Gastroenterol* 11(30):4697-4702.
- White, H. R., Pandina, R. J., Chen, P.H. 2002. "Developmental trajectories of cigarette use from early adolescence into young adulthood". *Drug and Alcohol Dependence* 65:167-178.
- Yur, F., Bildik, A., Belge, F., Kiliçalp, D. 2002. "Serum, plasma and erythrocyte zinc levels in various animal species". *YYÜ. Vet. Fak. Derg.* 13(1-2):82-83.