

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



DIABETES MELLITUS TIPO 2: EVALUACIÓN DEL DAÑO AL DNA NUCLEAR
EN PACIENTES SOMETIDOS A DIFERENTES ESQUEMAS DE TRATAMIENTO
MEDIANTE ENSAYO COMETA

Por:

MSP EMMA IBARRA COSTILLA

Como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Biología Celular y Genética

Diciembre de 2005

DIABETES MELLITUS TIPO 2: EVALUACIÓN DEL DAÑO AL DNA NUCLEAR
EN PACIENTES SOMETIDOS A DIFERENTES ESQUEMAS DE TRATAMIENTO
MEDIANTE ENSAYO COMETA

Comité de Tesis:

Dr. Ricardo M. Cerda Flores

Director de la tesis

Dra. Elva I. Cortés Gutiérrez

Director externo de la tesis

Dr. Mohammad H. Baddi Zabeh

Vocal

Dra. Adriana Elizabeth Flores Suárez

Vocal

Dr. Roberto Mercado Hernández

Vocal

Dra. Julia Verde Star

Jefe de la División de Estudios de Postgrado

Dr. Ricardo Gómez Flores

Secretario de Postgrado

Dra. Emma Ibarra Costilla

Noviembre de 2005

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas

DIABETES MELLITUS TIPO 2: EVALUACIÓN DEL DAÑO AL DNA NUCLEAR
EN PACIENTES SOMETIDOS A DIFERENTES ESQUEMAS DE TRATAMIENTO
MEDIANTE ENSAYO COMETA

Candidato al Grado de

Doctor en Ciencias con especialidad en Biología celular y Genética

Firma del Asesor

Dr. Ricardo M. Cerda Flores

Dra. Elva I. Cortés Gutiérrez

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México por la beca recibida que me permitió realizar los estudios de doctorado.

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León donde realice el doctorado, por todo el apoyo recibido de los maestros de postgrado.

A mis asesores los doctores Ricardo M. Cerda Flores y Elva I. Cortés Gutiérrez por su valiosa guía en el campo de la investigación biomédica, gracias a la cual culmina con éxito mi trabajo de investigación.

A mis compañeros médicos familiares de la Unidad de Medicina Familiar No. 26 del Instituto Mexicano del Seguro Social por su valiosa colaboración en el envío de pacientes candidatos para el estudio.

A la Dra. Graciela García Pérez Jefe del laboratorio clínico del Hospital General de Zona No. 17 del Instituto Mexicano del Seguro Social y a sus colaboradores por su apoyo.

A la Dra. Adriana Sampayo Reyes jefe de la división de farmacología del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social, a los compañeros de la misma división: Dra. Carmina C. Calzado Flores y a los químicos Miguel A. Echavarri, Antonio Narro y Sigifredo Lazcano por el apoyo recibido para la realización del trabajo de laboratorio.

DEDICATORIA

A mis padres:

† Fermín Ibarra Camarillo
† Guadalupe Costilla

Que me dieron amor, apoyo y comprensión en el difícil camino de la vida y que realizaron un gran esfuerzo por proporcionarme los medios necesarios para mi educación que culmina hoy con este trabajo.

A mi familia:

A mi esposo Luis Ramón,
A mis hijos Gina y Germán
A mis nietos Daniela, Mateo, Viviana y Valentina.

Por el apoyo y entusiasmo que me brindaron para continuar con mi superación profesional.

A mis grandes amigos:

Luz maría
Ricardo

Por su amistad, apoyo y enseñanzas que me ayudaron a llegar a esta meta profesional.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. RESUMEN Y ABSTRACT	11
2. INTRODUCCION	13
2.1 Hipótesis	14
2.2 Objetivos	14
2.3 Importancia	15
3. ANTECEDENTES	16
3.1 Diabetes mellitus	17
3.1.1 Epidemiología	17
3.1.2 Definición	17
3.1.3 Célula pancreática, insulina y receptores	18
3.1.4 Clasificación de la diabetes	18
3.1.5 Etiología	19
3.1.6 Fisiopatología de las complicaciones crónicas	20
3.1.7 Tratamiento farmacológico	20
3.1.8 Control metabólico	22
3.1.9 Complicaciones crónicas	22
3.2 ESTRÉS OXIDATIVO Y DAÑO EN EL DNA	25
3.2.1 Definición	25
3.2.2 Génesis del estrés oxidativo	25
3.2.3 Métodos para evaluar el estrés oxidativo	26
3.2.4 Daño en el DNA	26
3.2.5 El estrés oxidativo y la diabetes mellitus	27
3.3 ENSAYO COMETA	29
3.3.1 ¿En que consiste la técnica Ensayo cometa?	29
3.3.2 Campos de aplicación	29
3.2.3 Evaluación del daño en el DNA	30
3.2.4 Ensayo cometa y diabetes mellitus	31

Capítulo	Página
4. MATERIALES Y METODOS	33
4.1 Metodología	
4.2 Análisis estadístico	35
4.3 Definición de variables	37
5. RESULTADOS	39
6. DISCUSION	51
7. CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES	53
7.1 Recomendaciones	54
8. LITERATURA CITADA	55
9. APENDICES	61
Apéndice A.- Encuesta cuestionario	61
Apéndice B.- Carta de consentimiento informado	64
10. RESUMEN CURRICULAR	65

10. LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Distribución de la población por nivel de escolaridad	40
2	Antecedente de familiares con diabetes mellitus	41
3	Distribución de la población por tabaquismo	42
4	Distribución de la población por alcoholismo	43
5	Distribución de la población de acuerdo a la actividad física que realizan	44
6	Distribución de la población por Índice de Masa Corporal (IMC)	45
7	Tipo de oftalmopatía en la población	46
8	Complicaciones crónicas en los grupos de diabéticos	47
9	. Distribución de la población por Hemoglobina glicosilada	48
10	Evaluación del daño del DNA de acuerdo al grupo de estudio	49
11	Parámetros bioquímicos de acuerdo al grupo de estudio	50

11. LISTA DE FIGURAS

FORMATION OF COMETS

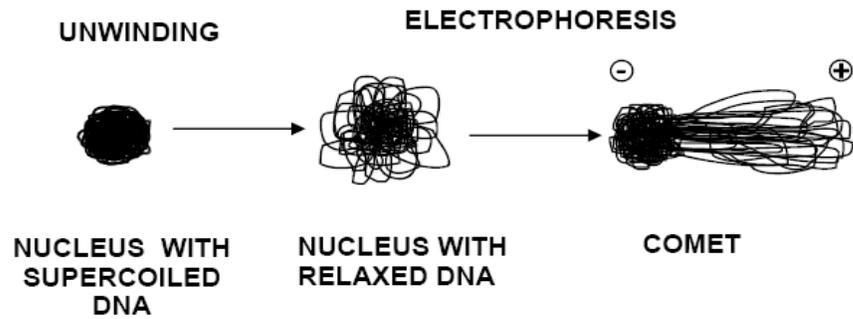


Figura 1.- Esquema de la formación de cometa

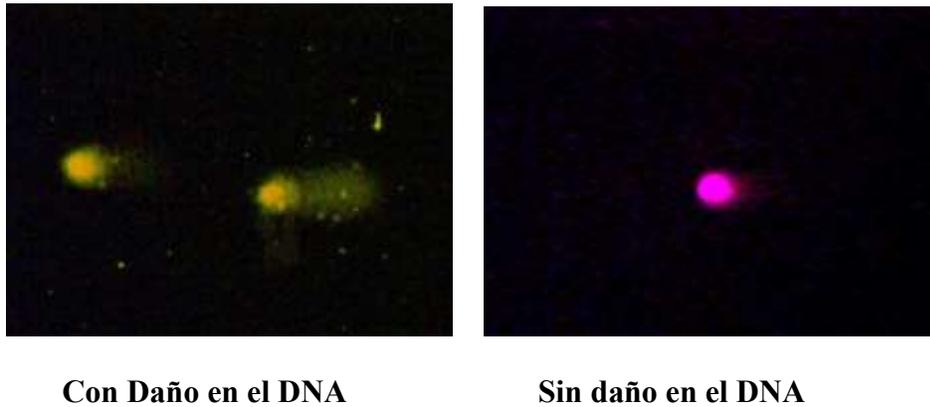


Figura 2.- Imágenes de cometa en Linfocitos de sangre periférica obtenidos de pacientes con y sin diabetes mellitus

12. NOMENCLATURA

AGEs	Productos de la glicosilación avanzada
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EO	Estrés oxidativo
EROs	Especies reactivas de oxígeno
HbA _{1c}	Hemoglobina glicosilada
REDOX	Reacciones de oxido reducción
DNA	Ácido desoxiribonucleico
OMS	Organización Mundial de la Salud
ALAD	Asociación Latinoamericana de Diabetes
DMID	Diabetes Mellitus Insulina Dependiente
DSMNID	Diabetes Mellitus No Insulina dependiente
HLA	Antígeno de histocompatibilidad
INEGI	Instituto nacional de Estadística general e Informática
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
NADH	Dinucléotido de nicotinamida y adenina
NADPH	Fosfato de dinucléotido de nicotinamida y adenina
ATP	Adenosin trifosfato
SCGE	Single cell gel electrophoresis
DAPI	4', 6-Diamidino-2-fenilindol
pH	Potencial de hidrógeno
ANOVA	Análisis de varianza
IMC	Índice de masa corporal
nm	Nanómetros
LCC	Longitud de la cola del cometa
OTM	Momento de la oliva de la cola
TEM	Momento de la extensión de la cola

1. RESUMEN

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica en la que como consecuencia de la hiperglicemia crónica se genera estrés oxidativo, el cual ocasiona daño en las proteínas, membranas celulares y en el DNA; este daño puede ser evaluado por diferentes métodos uno de ellos es la técnica de citogenética llamada “Ensayo cometa” (SCGE). Con la finalidad de determinar si existe daño en el DNA nuclear en los pacientes diabéticos con tratamiento farmacológico para su enfermedad, se planteo la siguiente pregunta: ¿Existe diferente daño en el DNA nuclear de sujetos diabéticos en comparación a sujetos sanos? En el presente trabajo se estudiaron cuatro grupos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 con diferente esquema de tratamiento farmacológico y un grupo de sujetos clínicamente sanos, provenientes de las consulta de medicina familiar, con la finalidad de evaluar y comparar el daño en el DNA nuclear secundario a estrés oxidativo mediante la técnica Ensayo cometa, además se evaluó el control metabólico en los sujetos diabéticos mediante los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) y la presencia de complicaciones crónicas secundarias a la diabetes mellitus.

A cada uno de los participantes se les realizó una historia clínica completa, se les tomaron muestras de sangre venosa periférica para estudios de: Hemoglobina glicosilada, perfil de lípidos, proteínas (albúmina y globulina) y para Ensayo cometa. Se realizaron las pruebas estadísticas de Modelo lineal general (GLM univariado), anova unifactorial (ANOVA) y diferencia mínima significativa (LSD).

De acuerdo a los resultados obtenidos se encontraron diferencias significativas en el daño en el DNA nuclear (parámetros evaluados: longitud de la cola, olive tail moment y extent tail moment) en los grupos de diabéticos con tratamiento farmacológico en comparación con el grupo de sujetos sanos ($p = 0.0001$), así como diferencia en los niveles de HbA_{1c} ($p = 0.0001$) entre los grupos de estudio. En los sujetos sanos a pesar de que clínicamente no presentaban ningún problema clínico aparente, se encontraron alteraciones en el perfil de lípidos, lo que contribuye al incremento del riesgo para enfermedades cardiovasculares.

Es necesario un manejo integral, estricto y supervisado de la población de diabéticos por parte de un equipo de trabajo integrado por profesionales de la salud con la ayuda de la familia del paciente, para lograr un control metabólico adecuado, con la finalidad de retardar la presentación de complicaciones crónicas.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a chronic disease, in this secondary to the chronic hyperglycemic to appear oxidative stress with protein, cellular membranes and DNA damage; this damage should be evaluated through different methods, as comet assay or single cell gel electrophoresis (SCGE). In order to determine if diabetic patients with pharmacological treatment have nuclear DNA damage, we asked ¿have the diabetic patients higher DNA damage that healthy people? Four groups of patients with type 2 diabetes with different kind of therapy drugs and a group of healthy persons, from the family physician clinic. The aims were to compare and to evaluate the nuclear DNA damage secondary to oxidative stress, through comet assay, besides was evaluated the metabolic control in diabetic patients through glycosilated hemoglobin (HbA_{1c}), and the presence of chronic complications.

Clinical history of each individual was carried out. A sample of peripheral vein blood samples was obtained for HbA_{1c}, lipid profile, proteins (albumin, globulin) and comet assay. General lineal model, ANOVA one way and minimal difference significant (LSD) was applied for statistical purposes.

A higher nuclear DNA damage (parameters assessed: length tail, Olive tail moment, extent tail moment) on the diabetic patients in pharmacological treatment, in comparison to the healthy people ($p = 0.0001$), and differences in the levels HbA_{1c} ($p = 0.0001$) between the studied groups was found. Healthy people had not clinical problems but some alterations in the lipids profile were found contributing probably to increase the risk of cardiovascular diseases.

It is necessary the integral management, strict and supervised in the diabetic population, from a team that included health professional with the help of family patient, that propose to obtain an adequate metabolic control and to reach to delay the chronic complications.

2. INTRODUCCION

Debido a los avances tecnológicos, nuevos y potentes fármacos, vacunas, mayor cobertura de los sistemas de salud y mejores condiciones sanitarias en la sociedad, los seres humanos han incrementado la esperanza de vida, esto es viven ahora un mayor número de años, lo que ha traído como consecuencia un aumento en las enfermedades crónicas degenerativas como la diabetes mellitus tipo 2, obesidad, hipertensión arterial, enfermedad cardiovascular, diversos tipos de cáncer etc. En la actualidad se considera a la diabetes mellitus tipo 2 como una epidemia a nivel mundial, ya que de acuerdo a los reportes de la Organización Mundial de la Salud y la Federación Internacional de Diabetes, la mayoría de los países en el mundo han experimentado un incremento en la prevalencia de esta enfermedad.

El paciente diabético al vivir un mayor número de años, está expuesto a diversos factores ambientales como: radiaciones, contaminación ambiental en el aire o el agua, fármacos para diversas enfermedades, exposición a múltiples productos químicos como pesticidas etc., los cuales pueden causar efectos adversos en su organismo como daño en el DNA celular el cual, debido a avances en técnicas citogenéticas, en la actualidad puede ser estudiado en cualquier organismo vivo. Por lo que se concibe la idea de realizar una investigación formal, con la finalidad de determinar si existe daño en el DNA en los pacientes diabéticos que están recibiendo fármacos para el tratamiento de su enfermedad, por lo que se plantea la siguiente pregunta:

¿Existe diferente daño en el DNA nuclear del diabético en comparación a un sujeto sano?

Para dar respuesta a esta pregunta se plantea la siguiente hipótesis:

2.1 Hipótesis

Los pacientes con DM2 con tratamiento farmacológico presentan un mayor daño en el DNA nuclear comparado con los sujetos sanos.

2.2 Objetivos:

Objetivo general:

Mediante la técnica *Ensayo Cometa* evaluar y comparar el daño en el DNA nuclear (secundario a EO) en pacientes con DM2 con diferentes esquemas de tratamiento farmacológico y en un grupo control (sujetos clínicamente sanos).

Objetivos específicos:

1. Evaluar y comparar el daño en el DNA en los siguientes grupos de estudio:
 - Grupo I. Control (sanos).
 - Grupo II. Glibenclamida + Metformina.
 - Grupo III Glibenclamida.
 - Grupo IV. Insulina + Metformina.
 - Grupo V. Insulina.
2. Para conocer algunos de los parámetros bioquímicos en las poblaciones en estudio, se evaluarán y compararán los niveles de HbA_{1c}, perfil de lípidos, proteínas y glicemia en cada uno de los esquemas de tratamiento.

3. Determinar las características demográficas y sociales de la población bajo estudio.
4. Desde el punto de vista clínico se determinara la presencia de complicaciones crónicas en los pacientes con DM2.

2.3 Importancia

Al evaluar el daño en el DNA nuclear en los pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 en tratamiento farmacológico permite:

- a. A nivel poblacional diferenciar si el tipo de esquema de medicamento produce daño en el DNA.
- b. A nivel individual evaluar el daño (por medio de Ensayo cometa) pudiera ser utilizado como un biomarcador de la respuesta al tratamiento farmacológico en el paciente diabético.
- c. A nivel clínico permitiría valorar el ajuste del tratamiento para prevenir complicaciones crónicas en el diabético.

3. ANTECEDENTES

La población mundial en la era moderna a presentado cambios en los patrones de morbilidad y mortalidad, por lo que en 1971 Omran²³ definió el término de “transición epidemiológica” para explicar estos cambios , en donde se observa una disminución de la morbi-mortalidad por enfermedades infecto contagiosas, incrementándose la esperanza de vida de la población y como consecuencia se presenta un incremento de las enfermedades crónico degenerativas como: diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, tumores etc.; aunado a esto una mayor cobertura en los sistemas de salud, nuevos medicamentos, nuevas vacunas y diagnóstico temprano de las enfermedades gracias a los avances tecnológicos y a la investigación en salud.

México se encuentra en este proceso de transición epidemiológica determinada por cambios en el estilo de vida, modificaciones en los hábitos alimenticios (dieta alta en grasas y azúcares refinados) y cambios en la actividad física con aumento del sedentarismo y la obesidad que es un riesgo tanto para la diabetes mellitus como para las enfermedades cardiovasculares^{42, 12}. Debido a su naturaleza crónica y la severidad de sus complicaciones, la diabetes requiere un control prolongado lo que afecta la economía, del individuo, su familia y de los sistemas de salud, lo que impacta fuertemente en la calidad de vida del paciente y su familia^{8, 67}.

3.1 DIABETES MELLITUS

3.1.1 Epidemiología

En la actualidad se considera a la diabetes mellitus (DM) un problema de salud pública mundial, ya que de acuerdo a los datos reportados en 1999 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) ⁶⁸ existían entre 120 y 140 millones con DM en el mundo y se proyecta que serán aproximadamente 300 millones de personas diabéticas para el año 2025, de los cuales el 90 a 95% corresponden a diabetes mellitus tipo 2 (DM2), ocupa el 4º lugar a nivel mundial con una prevalencia del 14.2% de acuerdo al reporte de la Federación Internacional de Diabetes²⁵ y el 7º lugar de acuerdo a en América Latina de acuerdo a la Asociación Latinoamericana de Diabetes⁴ hay 4.4 millones de personas diabéticas entre 20 y 79 años de edad en año 2000 millones de diabéticos y en México de acuerdo a los datos reportados por el INEGI y la Secretaria de Salud³⁵ la diabetes mellitus ocupó el primer lugar en al mortalidad general del país en el año 2001, en el IMSS³⁶.- En México, la herencia genética de la diabetes mellitus es muy alta debido a que el mestizaje propició aún más la tendencia a desarrollar el padecimiento, al tiempo que los factores ambientales con los que se vive en el país también propician el desarrollo de la enfermedad.,

3.1.2 Definición

La diabetes es una enfermedad crónico degenerativa, caracterizada por la alteración en el metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas, en la que se encuentra además disminución en la producción de insulina y o resistencia de su acción en los tejidos blanco⁴⁴.

3.1.3 Células beta del páncreas, insulina y receptores.

El páncreas órgano situado en la cavidad retroperitoneal en el abdomen, está formado por células destinadas a la secreción exócrina para la digestión de los alimentos y por las células β en islotes de Langerhans que son acúmulos celulares dispersos, encargados de producir y secretar dos hormonas: Insulina y glucágon ambas encargadas de la homeostasis de la glicemia³⁰. La insulina se sintetiza como pre-proinsulina, la cual es proteína inactiva que mas tarde en respuesta a una señal bioquímica se convierte en proteína bioactiva la proinsulina una cadena polipeptídica formada por 110 residuos de aminoácidos, la cual se fragmenta por de la enzima tripsinoide antes de salir de las células beta del páncreas, quedando un fragmento de 35 residuos que es la insulina para ser excretada a la sangre y actúa en los tejidos blanco⁷. La insulina interviene en el almacenamiento y liberación de sustratos energéticos como: glucosa, aminoácidos y ácidos grasos, con efectos anabólicos como lipogénesis, inhibición de la lipólisis, síntesis de glucógeno, anabolismo proteico y captación de glucosa en el tejido adiposo y muscular.

Cuando esta en concentraciones normales y cuando se presenta deficiencia se favorece el efecto catabólicos de las hormonas glucágon, catecolaminas, cortisol y hormona del crecimiento¹⁰.

3.1.4 Clasificación de la diabetes mellitus

De acuerdo al consenso del panel de expertos para el estudio de la diabetes la clasificación actual² es la siguiente:

- a. Diabetes tipo 1 (Insulino dependiente o DM1)
- b. Diabetes tipo 2 (No insulino dependiente o DM2).
- c. Diabetes gestacional

- d. Otros tipos: Defectos genéticos en la función de células beta, Defectos genéticos en la acción de la insulina, Enfermedades de la función exócrina del páncreas, Endocrinopatías (Acromegalia, Síndrome de Cushing etc.), inducida por drogas o químicos (Pentamida, Glucocorticoides, hormona tiroidea), Infecciones (Rubéola congénita, citomegalovirus), Otros síndromes genéticos asociados con diabetes (Síndrome de Down, Klinefelter, Wolfram, Corea de Huntington, Porfiria etc.)

3.1.5. Etiología de la diabetes mellitus

Existe diferencia clara clínica y fisiológica entre la diabetes mellitus tipo 1 (DM1) y tipo 2 (DM2). En la tipo uno^{49, 50, 54} presenta por lo regular en individuos jóvenes y niños, en la cual hay destrucción completa de los islotes de Langerhans con deficiencia absoluta de insulina, hay anticuerpos contra múltiples antígenos de las células β , con un locus de susceptibilidad localizado en el cromosoma 6⁵⁹ y en relación con los calotipos HLA-DR3 y HLA-DR4. En los familiares de primer grado de los pacientes con DM1 se estima que existe la probabilidad de desarrollar la enfermedad entre un 5 y 10%.

En la DM2 la etiología es multifactorial, con diferentes tipos de factores:

- a. Factores ambientales: relacionados con la alimentación (dietas ricas en azúcares refinadas y grasas), la obesidad y el sedentarismo.
- b. Factores genéticos en los cuales se han reportado genes de susceptibilidad como el del sustrato del receptor de insulina, gen de la glucocinasa, factores transcripcionales como calpaína-10, y PPAR- γ , receptor de glucosa y transportadores de gluco^{17, 32}.

Considerándose a la DM2 como una interacción entre ambos tipos de factores, con mayor incidencia de la enfermedad en algunas familias, mayor prevalencia en algunos grupos étnicos (Indios Pima) y mayor concordancia de incidencia en gemelos monocigóticos^{29, 39, 45, 65}.

3.1.6 Fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2.

Las alteraciones fisiológicas se caracterizan por una secreción insuficiente de insulina por las células β del páncreas y una resistencia a la acción de ésta hormona³ en los tejidos blanco, principalmente, hígado, tejido adiposo y músculo, además se ha observado que la distribución corporal de grasa especialmente la grasa intrabdominal son los mayores determinantes de la resistencia a la insulina³⁸ lo cual se traduce en un estado de hiperglicemia, la cual es responsable del daño a la macro y micro circulación, que son el sustrato de las complicaciones crónicas en la diabetes³⁷.

3.1.7 Tratamiento farmacológico

El manejo de la diabetes implica un plan integral con cambios en el estilo de vida^{3, 37} lo que incluye:

- a. Dieta equilibrada, balanceada, que incluya un 60 a 70% de las calorías totales como hidratos de carbono complejos (leguminosas, cereales integrales, frutas y vegetales), 10 a 20% de proteínas, y un 20 a 30% de grasas polinsaturadas restringiendo el consumo de grasas saturadas y evitar el consumo de azúcares refinados.

- b. Incremento en la actividad física para aumentar el consumo de la glucosa, disminuir la resistencia a la insulina y llevar el peso corporal a lo normal (de acuerdo a género y la edad).
- c. Fármacos.- En la actualidad se cuenta con diferentes tipos de fármacos^{22, 52, 55} los cuales difieren de acuerdo a su mecanismo de acción:
- Sulfonilureas.- Su mecanismo de acción es estimulando la secreción de insulina a partir de las células beta del páncreas, requieren para su efectividad que exista aún células beta funcionales; algunas sulfonilureas disponibles en el mercado son: Glibenclamida, Gliburide Glipizide, Glimepiride.
 - Biguanidas.- Estimulan la captación y el metabolismo de glucosa en los tejidos periféricos, se utilizan solas o en combinación con sulfonilureas y como efecto secundario causan una reducción de los niveles de triglicéridos, LDL colesterol; una complicación de las biguanidas es la acidosis láctica, por lo que esta contraindicado su uso cuando los pacientes tienen niveles de creatinina en sangre igual o mayor a 1.4 mg/dl y en pacientes con falla cardiaca o pulmonar pues están predispuestos a la hipoxia o bien a falla hepática secundaria a alcoholismo, el medicamento en uso es la Metformina³.
 - Inhibidores de la enzima α glucoxidasa.- Disminuyen la absorción de glucosa a nivel intestinal con lo que contribuyen a la disminución de los niveles post-prandiales de glucosa, ejemplos de estos medicamentos son: Acarbosa y Miglitol.
 - Glitazonas.- Su mecanismo de acción es promover la captación de glucosa por el músculo, el tejido adiposo y el hígado, esto se lleva a cabo estimulando al receptor de celular llamado receptor activador del proliferador de peroxisomas (PPAR- γ), este receptor regula la

transcripción de genes que responden a la insulina y están involucrados en el transporte de la glucosa y metabolismo de ácidos grasos, los medicamentos disponibles de este grupo son: Troglitazona, Rosiglitazona y Pioglitazona.

- Insulina.- Generalmente se inicia en el paciente con diabetes mellitus tipo 2 cuando fallan los hipoglicemiantes orales y se inicia con dosis pequeñas de insulina de acción intermedia (NPH), sola o en combinación con biguanidas que coadyuvan a su acción en los tejidos periféricos; también se encuentra indicada cuando el paciente cursa con estados infecciosos graves, en el postoperatorio, coma cetoacidótico o hiperosmolar y durante el embarazo para el tratamiento de la diabetes gestacional.

3.1.8 Control metabólico de la diabetes mellitus

En todas las personas como parte del metabolismo de la glucosa, esta se une a una molécula de hemoglobina en la sangre circulante, formando la hemoglobina glucosilada (HbA_{1c}), los valores de ésta se expresan en porcentaje, actualmente de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud se considera un valor de 4 a 6% como normal en sujetos no diabéticos, hasta 7% en diabéticos con un buen control glicémico y superior a 7% control glicémico inadecuado. La Federación Internacional de Diabetes y la Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos recomiendan que la meta de control metabólico en el paciente con diabetes mellitus, debe ser un nivel de HbA_{1c} de 6.5%, lo cual contribuye a un menor riesgo de complicaciones crónicas^{19,21}.

3.1.9 Complicaciones crónicas

Las complicaciones crónicas en la diabetes mellitus como nefropatía con falla renal, retinopatía que es la principal causa de ceguera, neuropatía periférica o visceral con alteraciones sensoriales y motoras es la causa de úlceras en los pies⁴¹ y junto con la

insuficiencia arterial periférica, esta última complicación es la principal causa de amputación en miembros inferiores; las complicaciones crónicas secundarias a la hiperglicemia crónica se desarrollan a través de los siguientes mecanismos fisiopatológicos^{34, 47}:

- a. Aumento de la actividad de la enzima Aldosa Reductasa que produce acumulo del sorbitol celular, reduce la actividad de la bomba de sodio/potasio ATPasa y altera la proporción intracelular de NADH₂ y de NADPH.
- b. Aumento del Diacilglicerol y de la actividad de la β_2 Protein Kinasa C, la cual a través de la fosfolipasa A-2 produce cambios en la respuesta celular a la angiotensina II y alteración en la presión hidrostática y permeabilidad de los capilares como se presenta en la nefropatía diabética.
- c. Aceleración de la glicosilación no enzimática de proteínas, por medio de este mecanismo al combinarse la glucosa con el grupo amino de las proteínas se forma un compuesto llamado producto de Amadori, el cual es reversible y se des-glicosila y en este proceso se forma un ketoaldehído altamente oxidante la 3-deoxiglucosona, el cual a su vez al combinarse repetidas veces con los productos de Amadori genera los productos de la glicosilación avanzada “AGEs” por las siglas en inglés (advanced glycosilation endproducts), los AGEs forman enlaces anormales entre las proteínas lo que ocasiona disfunción proteica, como es el caso de la elastina y colágena que forman la pared de los vasos sanguíneos, por lo que se la capacidad elástica de los vasos contribuyendo al aumento de la resistencia vascular, como se observa en la hipertensión arterial.

En el caso de los trastornos vasculares, el problema se agrava al asociarse trastorno en el metabolismo de los lípidos, en donde la elevación de las lipoproteínas de baja densidad y los triglicéridos son el sustrato para la formación de ateromas en la pared endotelial, ocasionando alteraciones en la circulación sanguínea hasta llegar a la

obstrucción completa de los vasos como en el caso de la aterosclerosis coronario; esto incrementa el riesgo de mortalidad en el paciente con diabetes mellitus⁶⁶ por lo que es necesario un control estricto de la hiperglicemia con la finalidad de prevenir la enfermedad renal terminal en el diabético que deteriora su calidad de vida y consume una gran parte del presupuesto de las instituciones de salud³³.

3.2 ESTRES OXIDATIVO

3.2.1 Definición

El estrés oxidativo (EO) se define como un desbalance persistente entre la excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y las defensas antioxidantes del organismo, lo cual ocasiona trastornos fisiológicos y bioquímicas en los tejidos como peroxidación lipídica, daño de las membranas celulares, rupturas en el DNA y degradación proteica, lo que ocasiona deterioro y muerte celular^{24, 48}.

3.2.2 Génesis del estrés oxidativo

Los EROs son moléculas muy reactivas e inestables que pueden reaccionar con otras moléculas a través de reacciones de oxidación-reducción (REDOX), produciéndose por reducción univalente de radicales libres como: el radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH); estas especies al producirse en gran cantidad y no ser eliminadas por completo por el sistema antioxidante del organismo genera el estrés oxidativo que causa el daño y la disfunción celular⁴⁸.

El sistema de defensa antioxidante en el organismo encargado de neutralizar los EROs está formado por:

1. Enzimas como: Citocromo oxidasa, superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa.
2. Eliminadores de radicales como vitamina E, vitamina C, glutatión, transferrina y ceruloplasmina.
3. Sistemas de reparación celular encargados de reparar el daño en la cadena del DNA, eliminadores de componentes celulares oxidados como macroproteinasas y las endonucleasas.

3.2.3 Medición del estrés oxidativo

El daño oxidativo en el organismo puede medirse de manera directa o indirecta⁴⁸:

A) Directa.- Midiendo la concentración de agentes oxidantes lo cual es difícil por su vida media muy corta, la única técnica analítica disponible que mide directamente los EROs es la espectrometría de la resonancia de la rotación de electrones, otra manera es medir los productos fenólicos que se forman en las reacciones REDOX en un equipo fotométrico.

B) Indirecta:

1. Determinando los productos terminales de la acción oxidante como peróxidos lipídicos sobre las biomoléculas.
2. Medición del estado antioxidante total.
3. Medición de la concentración de enzimas antioxidantes como Glutatión, Superóxido dismutasa, Transferrina y Ceruloplasmina (utilizados como marcadores de enfermedad o para el seguimiento del efecto terapéutico de medicamentos) y de las vitaminas C y E.

3.2.4 Daño al DNA

El daño oxidativo en el DNA es consecuencia del ataque de los radicales libres, las fuentes del daño al DNA se clasifican de la siguiente manera:^{27, 60}

- a. Intencional al administrar compuestos que son mutagénicos.
- b. Errores en la replicación en el proceso normal de la replicación y reparación del DNA en el ciclo celular.
- c. Espontáneo a través de la división celular en los procesos evolutivos de los organismos vivos.

- d. Daño por agentes ambientales a los que los organismos vivos se encuentran expuestos como radiación ultravioleta⁶², , metabolismo de xenobioticos, agentes alquilantes y medicamentos utilizados como quimioterapia para el tratamiento de algunas enfermedades como leucemia o cáncer y por los compuestos generados en la combustión del tabaco.

3.2.5 Estrés oxidativo y la diabetes mellitus

El incremento en la producción de EROs y la concentración elevada de productos de la peroxidación de lípidos como el ácido tiobarbitúrico, puede contribuir a la génesis de las complicaciones secundarias en la diabetes mellitus y al daño oxidativo en el DNA^{20, 60}.

La hiperglicemia crónica es el mediador entre los EROs y las complicaciones, a través de la activación de diversas vías en el metabolismo de los hidratos de carbono como son la vía de los polioles, de la proteína kinasa C, de la glicosilación no enzimática de proteínas estructurales y circulantes como las lipoproteínas, lo cual ocasiona procesos inflamatorios con disfunción endotelial aguda en los vasos sanguíneos, contribuyendo así al desarrollo de las complicaciones micro y macrovasculares^{1, 11, 13}.

Por otra parte las células β del páncreas son muy susceptibles al daño oxidativo ocasionado por la producción especies reactivas de oxígeno durante la hiperglicemia crónica, lo cual agrava el daño en éstas células con la consecuente disminución en la producción de insulina, lo cual contribuye a la progresión de la diabetes²⁸.

En la diabetes mellitus mal controlada se han encontrado cambios transitorios en la actividad de enzimas antioxidantes^{16, 5, 9} como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peoxidasa, como consecuencia de la hiperglicemia, contribuyendo al incremento del estrés oxidativo y al daño de las biomoléculas: lípidos, proteínas y

DNA, es en este último donde a consecuencia de los radicales libres se genera la oxidación en las bases que forman la hélice del DNA, produciendo rupturas a nivel los enlaces fosfodiéster, este daño oxidativo ha sido evaluado a través de los productos de de la oxidación eliminados del organismo a través de la orina como 8-oxo-deoxy-guanosina¹⁶, midiendo los niveles de enzimas antioxidantes⁴⁶ y a través de la técnica de citogenética “comet assay” o SCGE (por sus siglas en inglés single cell gel electrophoresis)¹⁵ en donde se evalúan las rupturas permanentes en el DNA.

3.3 ENSAYO COMETA

3.3.1 ¿En que consiste la técnica Ensayo cometa?

Es una técnica creada por los investigadores suecos Ostlin y Johansen utilizando células aisladas embebidas en una capa de agarosa, en un medio con pH neutro, que permite evaluar daño en la doble cadena del DNA, una versión modificada fue implementada en 1988 por el investigador estadounidense Singh y sus colaboradores, los cuales utilizaron un medio alcalino con un pH mayor de 13, y usaron 3 capas de agarosa para proteger la capa de células de la muestra, de esta manera se puede detectar daño en la cadena sencilla del DNA⁵⁷.

Es una técnica para evaluar daño en el DNA, simple, sensible, versátil, rápida y económica¹⁴, empleada en estudios de citogenética como un biomarcador de efecto, es un indicador pre-clínico de anomalías, al igual que las técnicas de intercambio de cromátides hermanas, aberraciones cromosómicas y la de micronúcleos.

3.3.2 Campos de aplicación de la técnica ensayo cometa

En el estudio de monitoreo humano se utilizan marcadores biológicos o moleculares en individuos expuestos a químicos en el medio ambiente que potencialmente peligrosos que pudieran afectar o ser un riesgo para la salud. Se han identificado tres tipos de marcadores biológicos⁶⁴:

- a. Marcadores de exposición.- Permiten detectar un químico xenobiótico, sus metabolitos o el producto de la interacción del químico con una biomolécula (lípidos, proteínas o DNA), los cuales podemos medir en orina, pelo, sangre, tejidos o bien ligado al DNA o a las proteínas.

- b. Marcadores de susceptibilidad.- Indican que el individuo es particularmente sensible al efecto del xenobiótico, lo cual puede ser evaluado a través de respuestas orgánicas.
- c. Marcadores de efecto.- Puede ser un componente endógeno, una medida de la capacidad funcional o bien una condición del organismo afectada por la exposición a químicos, se puede evaluar a través de:
- Micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica o de médula ósea, por
 - Intercambio de cromátides hermanas o aberraciones cromosómicas en un cariotipo.
 - Ensayo cometa en cualquier tipo de células y en cualquier organismo vivo.

El “Ensayo cometa” ha sido utilizado además en pruebas de genotoxicidad y ecogenotoxicidad, para evaluar la exposición ambiental a contaminantes a través del aire, agua y la tierra, para monitorear la respuesta al el tratamiento de enfermedades oncológicas (cáncer de diversos tipos, leucemias etc.)⁵⁷.

En esta técnica se puede utilizar cualquier tipo de célula o tejido como: células de mucosa nasal, oral, vaginal, de cervix, en leucocitos de sangre periférica o médula ósea, tejido hepático etc., en diversos organismos como: seres humanos, plantas, peces^{63, 53}.

3.3.4 Evaluación del daño en el DNA mediante Ensayo Cometa

La evaluación del daño en las células se realiza observando las muestras teñidas con algún colorante fluorescente como: bromuro de etidio, naranja de acridina o DAPI, en microscopio de fluorescencia utilizando el filtro de excitación adecuado para el colorante empleado en la tinción, se buscan las imágenes del DNA nuclear que forman

una imagen redondeada cuando no hay daño o bien la imagen de un cometa (figura 1), en donde los fragmentos dañados del DNA se rompen y migran formando una estela (cola del cometa) cuando la muestra es sometida a electroforesis. En donde a mayor longitud de la cola del cometa mayor daño; algunos investigadores han realizado la medición del daño reportando la extensión de la cola en tipos^{40, 26} del 1 al 5 donde uno corresponde a una imagen del DNA sin daño y cinco al daño mayor, otros utilizan la escala ocular del microscopio para evaluar la longitud de la cola del cometa^{64, 31} y otros han utilizado un analizador de imágenes; en la actualidad existen diversos paquetes computacionales para análisis de imágenes, desde los que realizan mediciones en cualquier tipo de imagen hasta los que fueron diseñados específicamente para medir los cometas^{14, 43}, en este último tipo de analizadores se toman varios parámetros de medición como: el porcentaje de DNA en la cabeza y en cola del cometa, longitud y amplitud de la cola del cometa en micras.

El número de imágenes analizadas va desde 50 a 200 imágenes, contabilizando las imágenes en dos laminillas por cada muestra, y posteriormente se realiza el promedio de las mediciones en cada parámetro para reportar cada muestra, o bien se analizan las mediciones de todas las imágenes de cada muestra.

3.3.5 Ensayo cometa y diabetes mellitus

Dado que el estrés oxidativo juega un papel importante en la patogénesis de las complicaciones en la diabetes mellitus, se ha reportado en la literatura científica el empleo de la técnica ensayo cometa para evaluar el daño oxidativo en el DNA en leucocitos de sangre periférica, en pacientes con DM2 y sujetos sanos⁵¹, para evaluar la respuesta en el daño celular al administrar a los pacientes tratamiento con antioxidantes como la vitamina E⁵⁶; algunos investigadores con la finalidad de hacer más sensible y específica la técnica cometa, han introducido un paso extra de digestión con el uso de

enzimas que reconocen daño oxidativo como la enzima endonucleasa III que detecta pirimidinas oxidadas, la formamidopirimidina DNA glicosilasa que detecta purinas oxidadas, la T4 endonucleasa que detecta dímeros de pirimidina inducidos por radiación ultravioleta¹⁴, mencionando que el daño en el DNA en los linfocitos es un marcador de estrés oxidativo y que se puede detectar específicamente los sitios sensibles en el DNA con el uso de estas enzimas, lo cual representa cambios relacionados con la hiperglicemia⁶ en los sujetos con diabetes mellitus.

4. MATERIAL Y METODO

4.1 Metodología

El protocolo de investigación fue aprobado por el comité de ética e investigación del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste (CIBN) del IMSS.

Se evaluó una muestra de 114 sujetos adscritos a la Unidad de Medicina Familiar No. 26 del IMSS en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, México, de los cuales 97 tenían diagnóstico de DM2 y estaban en tratamiento con fármacos, los cuales fueron enviados de manera aleatoria de la consulta de medicina familiar por su médico tratante de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión: diagnosticados como diabéticos tipo 2, mayores de 40 años de edad, con 5 ó más años en tratamiento farmacológico, sin hipertiroidismo o hipotiroidismo y sin antecedentes de cualquier tipo de cáncer o leucemia, y 17 pacientes enviados de manera aleatoria de la consulta de medicina familiar por su médico tratante de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión mayores de 40 años de edad, aparentemente sanos sin ninguna enfermedad y sin tomar ningún medicamento, vitaminas o suplementos alimentarios, sin alcoholismo ni tabaquismo; con el total de los sujetos se formaron 5 grupos uno de controles y 4 de diabéticos de acuerdo a su esquema de tratamiento de la manera siguiente:

Grupo I. Control. (n = 17)

Grupo II. Glibenclamida + Metformina. (n = 44)

Grupo III. Glibenclamida (n = 26)

Grupo IV. Insulina + Metformina. (n = 13)

Grupo V Insulina (n = 14)

Cabe hacer notar que se agruparon a los diabéticos con la combinación de los medicamentos antes descrita, ya que en la consulta de medicina familiar son los

esquemas con que se maneja el tratamiento farmacológico de los pacientes diabéticos, no había pacientes que tuviera más de 5 años en tratamiento con metformina solamente, o que tuviera la combinación de glibenclamida con insulina o bien la combinación con los 3 fármacos.

A cada uno de los participantes se les explicó el objetivo del trabajo de investigación, a los que aceptaron voluntariamente participar se les dio a leer o se les leyó (porque no sabían leer) una carta de consentimiento informado (Anexo B) la cual fue firmada por ellos, el investigador y testigos. Enseguida se procedió a realizarles un estudio clínico utilizando para el levantamiento de los datos un cuestionario (Anexo A) y se les dio una cita para la toma de muestras de sangre para los estudios de laboratorio.

La toma de muestras de sangre se realizó previa asepsia local, se tomaron muestras de sangre venosa periférica (dos tubos de 5 mililitros: uno con anticoagulante EDTA y otro sin anticoagulante) en el antebrazo para estudios de laboratorio clínico que incluyeron: Hemoglobina glicosilada, glicemia, creatinina, perfil de lípidos (colesterol, triglicéridos, HDL, LDL) proteínas totales, albúmina y globulina; las muestras fueron procesadas en el laboratorio de estudios clínicos del Hospital General de Zona No. 17 del IMSS en Monterrey Nuevo León, y las muestras para la prueba ensayo cometa fueron procesadas en el departamento de citogenética de la división de Genética de poblaciones en el CIBIN en Monterrey Nuevo León.

La técnica ensayo cometa realizada fue la versión alcalina con un pH >13, en leucocitos de sangre periférica (muestra con anticoagulante EDTA), una vez realizada la técnica las muestras montadas en portaobjetos de cristal fueron teñidas con el colorante fluorescente bromuro de etidio, se les colocó un cubreobjetos y se analizaron en un microscopio de fluorescencia invertido Olympus IX70 con objetivo de 40X y un filtro de excitación de 340 nm. Se capturaron 100 imágenes de los núcleos de cada muestra por duplicado y posteriormente fueron analizadas con el programa de análisis de

imágenes Kinetic imagen 5.5 exclusivo para este tipo de imágenes; como se observa en la figura 2.

Se tomaron en micrómetros los parámetros de medición siguientes:

1. Longitud de la cola del cometa (LCC).
2. Extensión del momento de la cola (ETM) que corresponde a la longitud de la cola multiplicado por el porcentaje de DNA en la cola y dividido entre 100.
3. Oliva del momento de la cola (OTM) que es el promedio de la cola menos el promedio de la cabeza multiplicada por el porcentaje de DNA en la cola dividido entre 10.

Algunos autores realizan el promedio de las mediciones de cada parámetro para el análisis estadístico, en el presente estudio se trabajaron las mediciones de cada uno de los parámetros en las 100 células capturadas de cada sujeto.

Cada una de estas imágenes representa el daño ocasionado por el estrés oxidativo secundario a la hiperglicemia en las células analizadas, lo que permite realizar los análisis correspondientes de acuerdo a las variables estudiadas.

Para evaluar el control metabólico de cada sujeto se realizó HbA_{1c} (sangre con anticoagulante EDTA) utilizando un kit específico para en el equipo automatizado DC 2000 (BAYER) cuyos valores normales en sujetos no diabéticos son de 6% y para diabéticos controlados de menos de 7%. Para las pruebas de perfil de lípidos y proteínas sanguíneas se utilizó suero y se procesaron en equipo automatizado de laboratorio clínico convencional.

4.2 Análisis estadístico

Dado que los sujetos diabéticos ya tenían un tratamiento farmacológico instituido por el médico tratante, los que reunieron los criterios de inclusión conformaron la muestra

de estudio, a partir de la cual se formaron los subgrupos de acuerdo al fármaco(s) que recibían, así que quedaron conformados por diferente número de sujetos, ante esta situación se decidió utilizar la prueba de ANOVA encajado con distinto tamaño de muestra⁵⁸.

Para cada individuo las 100 mediciones de LCC, OTM y TEM fueron tomadas a partir de cada muestra por grupos de estudio, los cuales fueron exportados de EXCEL a SPSS.

Con respecto a los resultados de HbA_{1c} y de perfil de lípidos y proteínas fueron capturados y procesados en el programa computacional SPSS versión 10.0.

Con esta base de datos, se realizaron los siguientes análisis estadísticos de acuerdo a cada objetivo planteado:

Objetivo 1.- Evaluar el daño en el DNA en los siguientes grupos de estudio: Grupo I. Control (sanos), Grupo II. Glibenclamida + Metformina, Grupo III Glibenclamida, Grupo IV. Insulina + Metformina, Grupo V. Insulina.

1. Descriptiva de cada variable en los cinco grupos de estudio para ver el tipo de distribución de cada variable cuantitativa.

2. Como las tres mediciones de ensayo cometa presentaban una distribución binomial negativa (la varianza mayor que la media dentro de cada grupo) se realizó una transformación: $\text{Sinh}^{-1} X = \ln (X + \sqrt{X^2+1})$.

3. Modelo lineal general (GLM univariado) donde:

- a. La variable dependiente fue considerada t_loco (transformación de la longitud de la cola del cometa), t_tem (transformación de la extensión del momento de la cola) y t_otm (transformación de oliva del momento de la cola).
- b. El factor fijo fue considerado el grupo
- c. El factor aleatorio las 100 células de |cada individuo estudiado.
- d. El modelo fue tipo II.

- e. Diferencia mínima significativa (LSD) para conocer que medias de los grupos eran iguales o diferentes.

Objetivo 2.- Evaluar y comparar los niveles de HbA_{1c}, perfil de lípidos, proteínas y glicemia en cada uno de los esquemas de tratamiento.

Se realizó anova unifactorial (ANOVA) y diferencia mínima significativa (LSD) para conocer que medias de los grupos eran iguales o diferentes.

Objetivo 3.- Determinar la presencia de complicaciones crónicas en pacientes con DM2.

Se realizó estadística descriptiva.

4.3 Definición de variables

- a. *Daño oxidativo en DNA.*- En el análisis del núcleo de los leucocitos de sangre venosa periférica mediante la técnica citogenética Cometa, los núcleos con daño se observan como una imagen de cometa, donde la cola está formada por los fragmentos rotos del DNA, se realiza un análisis de las imágenes en el software específico para esta prueba de Kinetic imaging 5.5, que evalúa el porcentaje de material en la cola del cometa, así como su longitud.
- b. *Control metabólico.*- Para el presente estudio se considera que el paciente diabético está controlado cuando se determina una cifra de Hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) \leq de 7 % y sin control cuando la cifra de HbA_{1c} es $>$ de 8%, de acuerdo a la metodología utilizando “DCA 2000 Hemoglobin A1c Reagent Kit de lab. Bayer”.
- c. *Índice de masa corporal (IMC) I.*- De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud se clasifica en:
 - Normal.- De 18.5 a 24.9
 - Sobrepeso.- De 25
 - Obesidad.- 30 o más

- d. *Química sanguínea.*- Cifras normales de Colesterol de 0 a 200 mgs/dl , Triglicéridos de 35 a 160 mgs./dl, LDL de 70 a 177 mgs./dl, HDL de 27 a 67 mgs./dl, glicemia de 75 a 105 mgs./dl.
- e. *Complicaciones.*- Se realizó el diagnóstico de acuerdo a los datos clínicos o alteraciones de la función, encontrados a la exploración física o consignada en el expediente clínico de acuerdo a la valoración del especialista.
- Retinopatía.- Hallazgos en el fondo de ojo de exudados, hemorragias y alteraciones de los vasos.
 - Insuficiencia arterial periférica.- Disminución o ausencia de pulsos pedio o tibial posterior, cianosis, pérdida de pelo o uñas, alteraciones de la pigmentación (ocronosis) de la piel en miembros inferiores.
 - Neuropatía periférica.- Alteraciones de la sensibilidad o anestesia en miembros inferiores.
 - Insuficiencia renal.- Diagnostico previo por medio de elevación de azoados y creatinina consignado en el expediente clínico.

5. RESULTADOS

De los 114 sujetos estudiados 51 (44.74%) eran originarios del estado de Nuevo León y 63 (55.26%) de otros estados de la república mexicana, 81 femeninos (71.1%) y 33 masculinos (28.9%), con una edad promedio en general de 59.11 ± 9.31 mínima de 41 y máxima de 84 años, los sujetos diabéticos tuvieron una edad promedio de 60.77 ± 8.58 años, con un tiempo de evolución de la enfermedad de 13 ± 5.75 años.

En la distribución por estado civil se encontró que 60 diabéticos y 14 controles su estado civil es casado, 6 diabéticos son solteros, 3 diabéticos y uno del grupo control son divorciados y 18 diabéticos y dos del grupo control son viudos.

TABLA 1
Distribución de la población por nivel de escolaridad

Nivel de escolaridad	Controles		Diabéticos	
	Fc.	%	Fc.	%
Analfabeta	1	5.88	16	16.49
Primaria incompleta	0	0.00	33	34.02
Primaria completa	0	0.00	32	32.98
Secundaria incompleta	0	0.00	1	1.03
Secundaria completa	0	0.00	4	4.12
Preparatoria incompleta	0	0.00	1	1.03
Preparatoria completa	4	23.52	3	3.09
Técnica	2	11.76	5	5.15
Profesional	10	58.82	2	2.06
Total	17		97	

Fuente.- Directa

Destaca la baja escolaridad en el grupo de diabéticos 16.49% de analfabetismo y un 34.02% con primaria incompleta.

TABLA 2
Antecedente de familiares con diabetes mellitus

Parentesco	Control			Diabetes		
	Si	No	No sabe	Si	No	No sabe
Papá	6	11	0	13	77	7
Mamá	5	12	0	37	56	4
Hermanos	2	15	2	67	30	0
Hijos	0	17	0	24	73	0
Familiar en 2° grado	9	4	4	30	20	47
Pareja	0	17	0	24	73	0

Fuente.- Directa

Se observa que 22 sujetos en el grupo control y 117 en el grupo respondieron tener uno o más familiares en primer grado (padre, madre, hermanos o hijos)

TABLA 3
Distribución de la población por Tabaquismo

Tiene el hábito	Control	Diabético	Total	
Si	0	10	10	8.78%
No	17	87	104	91.22%
Total	17	97	114	100%

Fuente.- Directa

El mayor porcentaje dentro de la población estudiada refirieron no tener el hábito de fumar cigarrillos.

TABLA 4
Distribución de la población por Alcoholismo

Tiene el hábito	Control	Diabético	Total	
Si	0	9	9	7.90%
No	17	88	105	92.10
Total	17	97	114	100%

Fuente.- Directa

El mayor porcentaje dentro de la población estudiada refirió no tener el hábito de tomar bebidas alcohólicas.

TABLA 5
Distribución de la población de acuerdo a la actividad física que realizan

Actividad física	Control		Diabético	
	Fc.	%	Fc.	%
Gimnasia rítmica	0	0.00	2	2.06
Caminata	7	41.17	35	36.08
Trote	0	0.00	1	1.03
Bicicleta estacionaria	2	11.76	3	3.09
Aerobics	1	5.88	4	4.12
Correr	1	5.88	0	0.00
Tenis	1	5.88	0	0.00
Ninguna	5	29.41	52	53.60
Total	17		97	

Fuente.- Directa

Destaca que el 53.60% de los diabéticos no realizan ninguna actividad física

TABLA 6
Distribución de la población por Índice de Masa Corporal (IMC)

Peso	Grupo				Total
	Controles		Diabéticos		
Normal	6	35.29%	16	16.49%	22
Sobrepeso	4	23.52%	35	36.08%	39
Obesidad	7	41.17%	46	47.42%	53
Total	17		97		114

Fuente.- Directa

Tanto en el grupo de sujetos controles como en los grupos de diabéticos el mayor porcentaje presentan sobrepeso y obesidad.

TABLA7
Tipo de oftalmopatía en la población

Tipo	Control		Diabético		Total
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	
Ninguna	2	11.76	15	15.46	17
Presbicia	10	58.82	40	41.23	50
Vicio de refracción	5	29.42	2	2.06	7
Catarata	0	0.00	23	23.71	23
Retinopatía	0	0.00	17	17.52	17
Total	17		97		114

Fuente.- Directa

Resalta que en el grupo de pacientes diabéticos el 41.23% presenta complicaciones oftalmológicas secundarias a la diabetes como catarata y retinopatía.

TABLA 8
Complicaciones crónicas en los grupos de diabéticos

Complicación	Frecuencia	%
Insuficiencia venosa periférica	45	48.91
Ninguna	16	17.39
Retinopatía	11	11.95
Insuficiencia arterial periférica	10	10.86
Neuropatía periférica	6	6.52
Insuficiencia renal	4	4.34

Fuente.- Directa

El 48.91 % de los pacientes diabéticos presentan insuficiencia venosa periférica y un 11.95% presenta retinopatía.

TABLA 9
Distribución de la población por Hemoglobina glicosilada

		Grupo de estudio					Total
		Control	Glib-Metf	Glib.	Ins-Metf	Insulina	
Control metabólico	Si (<7%)	17	3	5	2	0	27
	No (>7%)	0	41	21	11	14	87
Total		17	44	26	13	14	114

Fuente.- Directa

Destaca que 87 (89.69%) de los diabéticos tienen descontrol metabólico de acuerdo a los niveles de hemoglobina glicosilada.

TABLA10
Evaluación del daño al DNA de acuerdo al grupo de estudio.

Parámetros	Grupo de Estudio					
	Signif.	Control	Glib. + Metf.	Glibenclamida	Ins. + Metf.	Insulina
No. sujetos		17	44	26	13	14
No. Células		1700	4400	2600	1300	1400
*Long. cola	0.0001	3.96 ± 0.29	4.38 ± 0.018	4.41 ± 0.023	4.41 ± 0.033	4.08 ± 0.032
*TEM	0.0001	2.70 ± 1.97	2.84 ± 2.06	2.70 ± 2.31	2.97 ± 2.03	2.86 ± 1.99
*OTM	0.0001	2.79 ± 1.79	2.79 ± 1.59	2.65 ± 1.94	2.81 ± 1.66	2.80 ± 1.73
*HbA _{1c}	0.0001	5.48 ± 0.33	9.65 ± 1.75	8.44 ± 1.55	9.24 ± 2.19	10.87 ± 1.65

Fuente.- Directa

Media ± SE (long. Cola, TEM, OTM)

***Control ≠ Insulina ≠ Glib-Metf. = Glibenclamida = Insu.-Metf.**

****Control ≠ Insulina = Glib.-Metf = Glibenclamida = Insu.-Metf.**

TABLA 11
Parámetros bioquímicos de acuerdo al grupo de estudio

Parámetro	Grupo de estudio					Significancia
	Control	Gli-Metf	Glib	Ins-Met	Insulina	
*HbA _{1c}	5.48 ± 0.33	9.65 ± 1.75	8.44 ± 1.55	9.24 ± 2.19	10.87 ± 1.65	0.0001
**Glicemia	101.05 ± 10.23	215.09±71.32	173±51.58	238.38±107.83	239.42±89.78	0.0001
Creatinina	0.86 ± 0.16	0.87 ± 0.27	0.95 ± 0.29	1.16 ± 0.83	1.04 ± 0.55	-----
Colesterol	221.11 ± 34.63	230.88±67.01	215.76±41.92	213.69±39.16	231.35±42.65	-----
Triglicéridos	179.83±112.42	372.70±378.03	270.50±178.67	210.86±102.0	269.85±201.30	-----
HDL	41.82 ± 14.75	35.02 ± 13.73	38.42 ± 10.57	40.92 ± 11.21	41.35 ± 11.52	-----
LDL	143.32 ± 39.97	136.97± 57.48	123.36±38.39	128.89±33.15	136.02±31.74	-----
Proteínas totales	7.15 ± 0.38	7.50 ± 0.57	7.46 ± 0.56	7.43 ± 0.39	7.30 ± 0.59	-----
Alúmina	4.22 ± 0.30	3.96 ± 0.48	3.95 ± 0.43	3.97 ± 0.30	3.88 ± 0.32	-----
***Globulina	2.98 ± 0.47	3.58 ± 0.52	3.57 ± 0.60	3.44 ± 0.33	3.42 ± 0.42	0.001

Fuente.- Directa

Los parámetros bioquímicos se expresan en mg/dl a excepción de HbA_{1c} que se expresa en porcentaje

*** Control ≠ Insulina ≠ Glibenclamida-Metformina ≠ Glibenclamida ≠ Insulina**

**** Control ≠ Glibenclamida ≠ Glibenclamida-Metformina = Insulina-Metformina = Insulina**

***** Control ≠ Insulina = Insulina-Metformina = Glibenclamida = Glibenclamida-Metformina**

6. DISCUSION

De acuerdo a los resultados obtenidos se corrobora la hipótesis propuesta en este estudio de que los pacientes con DM2 con tratamiento farmacológico presentan un mayor daño en el DNA nuclear comparado con los sujetos sanos, ya que al evaluar la longitud de la cola del cometa que es la medida que refleja el daño en el DNA, como ha sido encontrado en otros estudios por diversos investigadores como Blasiak y cols.⁶ se encontraron diferencias entre los grupos (Control \neq Insulina \neq Glib-Metf. = Glibenclamida = Insu.-Metf). Este daño como se cita en la literatura en el paciente diabético es posible que sea consecuencia del estrés oxidativo secundario a un estado de hiperglicemia crónica que tal vez refleja la inhibición directa de las enzimas antioxidantes como ha sido reportado por Collins y colaboradores¹⁶.

En cuanto a los parámetros bioquímicos estudiados solo se encontraron diferencias entre los grupos para: Colesterol, globulina y HbA_{1c}, este último parámetro ha sido estudiado por Collins¹⁶ siendo los niveles mayores en los sujetos diabéticos, a pesar de que en su investigación los diabéticos no fueron agrupados por tipo de medicamento para la diabetes. La posible causa del incremento en los niveles de HbA_{1c} que refleja un pobre control metabólico puede ser el resultado de una ingesta mayor de calorías, de inactividad física o bien pobre respuesta al tratamiento farmacológico^{29, 37}.

En cuanto a las variables demográficas, el bajo grado de escolaridad y analfabetismo en el grupo de diabéticos pudiera influir en el apego del tratamiento, pues las indicaciones sobre el manejo de la diabetes la prescripción de medicamentos y los programas educativos que se le proporcionan al paciente son por medios escritos por ejemplo recetas, folletos etc.

En cuanto a los antecedentes familiares al igual que la American Family Physician³ y como que reporta Collado y colaboradores.¹² se encontró que los pacientes diabéticos tienen familiares en primer o segundo grado con diabetes mellitus, además entre los sujetos diabéticos como en los controles se encontró que tiene hijos diabéticos.

En cuanto al IMC, de acuerdo a algunos investigadores como Tuomilehto y colaboradores⁶¹, algunos componentes del estilo de vida previene el desarrollo de la diabetes mellitus, es importante resaltar que la mayoría de los sujetos control y de los diabéticos no realizan ninguna actividad física y un gran porcentaje en la población estudiada presentan sobrepeso y obesidad; por lo que de acuerdo a la guía de manejo del paciente diabético del IMSS³⁷, la población estudiada tiene factores de riesgo que pueden contribuir a complicaciones crónicas.

En cuanto a las complicaciones que se pueden presentar en el diabético, los resultados muestran que los diabéticos presentan complicaciones como la retinopatía diabética y trastornos como la insuficiencia venosa periférica, lo que aunado a los niveles altos de colesterol, triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad tienen incremento el riesgo de enfermedad cardiovascular y como consecuencia disminuye su calidad de vida.

En resumen, dado que el estrés oxidativo secundario a la hiperglicemia crónica desencadena daño en el DNA con la activación de vías sensibles a este (factor nuclear K B, protein cinasa p38 mitogen y la vía de cinasas) de manera crónica se encuentra asociada a las complicaciones en la diabetes, así como a la deficiente transcripción de gen de la insulina, como ha sido reportado por Evans y cols²⁴ se encontró hiperglicemia crónica reflejada a través de niveles altos de HbA_{1c} (> de 7%) en el 75.8% de los pacientes diabéticos, por lo que este grupo de pacientes presentan estrés crónico que conlleva la posibilidad de menor producción de insulina por el páncreas y mayor riesgo de complicaciones crónicas.

7. CONCLUSIONES

1. Este es el primer estudio en México de mutagenicidad donde se encontró que los pacientes diabéticos en tratamiento farmacológico presentan mayor daño en el DNA (reflejado en las mediciones de la cola del cometa) con respecto a los sujetos sanos.
2. Estas diferencias son debidas probablemente al tratamiento farmacológico, donde el grupo control tuvo un menor daño (reflejado a través de la longitud de la cola del cometa) que los 4 grupos que recibieron tratamiento con: glibenclamida, glibenclamida-metformina, insulina e insulina-metformina.
3. Para dar mayor validez a los resultados obtenidos se deberán realizar estudios similares de caso control y posteriormente en caso de encontrara similitudes, se puedan realizar estudios de ensayo clínico, con seguimiento de los pacientes diabéticos desde su detección.
4. A pesar de que los sujetos del grupo control no presentaron ningún problema clínico aparente, se encontraron elevados los niveles de lípidos como colesterol y triglicéridos, lo cual incrementa el riesgo de enfermedad cardiovascular.

7.1 Recomendaciones

- a. Dado que con la técnica Ensayo cometa mostró diferencias significativas entre los diabéticos y los controles, consideramos que la evaluación del daño en el DNA nuclear puede ser utilizado como un biomarcador para ser utilizado como una prueba en la evaluación de la efectividad del tratamiento y la progresión de la enfermedad, con la finalidad de ajustar o cambiar el esquema de tratamiento. Pero futuros estudios deberían corroborar la validez de estos hallazgos.

- b. Desde el punto de vista clínico es necesario el manejo integral, estricto y tal vez supervisado de la población de diabéticos por parte de los profesionales de la salud con la ayuda de la familia del paciente, para lograr un control metabólico adecuado con la finalidad de prevenir las complicaciones crónicas.

8. LITERATURA CITADA

1. Acitis dato SM., Rebolledo OR. 2000. La Glicación y Glicoxidación de las Lipoproteínas su importancia en la Diabetes Mellitus. *Medicina* 60:645-656.
2. American Diabetes Association. 2004. Diagnosis and Classification of Diabetes. *Diabetes Care* 27:Suppl.
3. American Family Physician. 1999. Diagnosis and Management of Type 2 Diabetes. Monograph No. 1.
4. Asociación Latinoamericana de Diabetes A.L.A.D. Guías ALAD 2000. Para el diagnóstico y manejo de la Diabetes mellitus tipo2 con Medicina Basada en Evidencia. Capítulo 1. <http://www.alad.org/guiasalad/guiacap1.html>
5. Belda Sanchíz JI., Puertas J., Bosch Morell F., Romero Gómez B., Marín N., Díaz-Llopiz M., Romero Gómez FJ.1999. Determinación de los Niveles de Glutación, Enzimas del Sistema Glutación y Productos de la Peroxidación Lipídica en el cristalino cataratoso y en el Cristalino Sano. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología* No. 11.
6. Blasiak J, Arabski M, Krupa R, Wozniack K, Zadro M, Kasznicki J, Zurawska, DrzewoskiJ. 2004. DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mutat Res* 4:297-304.
7. Bohinski R.C. 1998. *Bioquímica*. Pearson Educación. México, pp.210-211.
8. Calderón Velasco R. 1999. Panorámica actual de la diabetes mellitus.. <http://www.encolombia.com/medicina/academiamedicina/medicina23201-articulosien.htm>.
9. Carmeli E., Coleman R., Berner YN. 2004. Activities of antioxidant scavenger enzymes (superoxide dismutase and glutathione peroxidase) in erythrocytes in adult women with and without type II diabetes. *Exp Diabetes Res* 5:171-175.
10. Casanueva E. et al. 1998. *Nutriología Médica*. Editorial médica panamericana. México, pp. 293-295.
11. Ceriello A. 2003. New Insights on Oxidative Stress and Diabetic Complications May Lead to a “Casual” Antioxidant Therapy. *Diabetes Care* 26:1589-1596.

12. Collado Mesa F., Vidal Rivalta MG., Durruty Esparraguera V., Sordo Rivero ME., Montero Silva RM. 1998. Diabetes Mellitus como causa básica de muerte. *Revista Cubana Endocrinología* 9:184-193.
13. Clapés S., Torres O., Comopani M., Villariño U., Broche F., Céspedes EM. 2001. Peroxidación lipídica y otros indicadores de estrés oxidativo en pacientes diabéticos. *Rev Cubana Invest Biomed* 20:93-98.
14. Collins AR. 2004. The Comet Assay for DNA Damage and Repair. *Molecular Biotechnology*. 26:249-261.
15. Collins AR., Dusinská M., Horská A. 2001. Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay. *Acta Biochimica Polonica* 48: 611.614.
16. Collins AR., Raslová K., Somorovská M., Petrovská H., Ondrusová A., Vohnout B., Fábry R., Dusinská M. 1998. DNA Damage in Diabetes: Correlation with a Clinical Marker. *Free radical Biology & Medicine* 25:373-377.
17. Cruz M., Montoya C., Gutiérrez M., Wachter NN., Kumate J. 2002. Polimorfismo de genes relacionados con diabetes tipo 2. *Rev Med IMSS* 40: 113-125.
18. Czyzyk A., Szczepanik. 2000. Diabetes mellitus and cancer. *European Journal of Internal Medicine*;11:245-252.
19. Charca AR., Tambascia MA. 2003. Conceptos y Práctica del Tratamiento por Objetivos: El Auto-Monitoreo Domiciliario de la Glucemia. Curso latinoamericano sobre Diabetes y Síndrome Metabólico para Clínicos. Asociación Latinoamericana de Diabetes.
20. Dandona P., Thusu K., Cook S., Makowski J., Armstrong D., Nicotera T. 1996. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* 17:444-445.
21. Derr R., Garrett E., Stacy GA., Saudek Ch. 2003. Is HbA1c Affected by Glicemic Instability? *Diabetes Care* 26:2728-2733.
22. Dickerson LM., PharmD., BCPS., Ye X., MS., Sack JL., Hueston WJ. 2003. Glycemic Control in Medical Inpatients with Type 2 Diabetes Mellitus Receiving Sliding Scale Insuline Regimens versus Routine Diabetes Medications: A Multicenter Randomized Controlled Trial. *Ann Fam Med*. 1:29-35.

23. Escobedo de la Peña J., Santos Burgoa C. 1995. La Diabetes Mellitus y la Transición de la Atención a la Salud. *Salud Pública Méx.*; 37:37-46.
24. Evans JL., Goldfine ID., Maddux BA., Grodsky GM. 2003. Are Oxidative Stress-Activated Signaling Pathways mediators of Insulin resistance and Beta-Cell Dysfunction? *Diabetes* 52:1-8.
25. Federación Internacional de Diabetes. www.idf.org.
26. Ferraro MV., Fenocchio AS., Mantovani MS., Ribeiro C., Cestari MM. 2004. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. Malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and the chromosome tests. *Genetics and Molecular Biology* 27:103-107.
27. Gedik CM., Boyle SP., Wood SG., Vaughan NJ., Collins AR. 2002. Oxidative stress in humans: validation of biomarkers of DNA damage. *Carcinogenesis* 23:1441-1446.
28. Gottlieb MS. 1980. Diabetes in offspring and siblings of juvenile and maturity onset type diabetes. *J Chronic Dis* 33:331-339.
29. Green K., Brand MD., Murphy MP. 2004. Prevention of Mitochondrial Oxidative Damage as a Therapeutic Strategy in Diabetes. *Diabetes* 53:S110-118.
30. Ganong William F.. 2004. *Fisiología Médica. El Manual Moderno. México*, pp. 365.
31. Hartmann A., Agurell E., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Brurlinson B., Clay P., Collins A., Smith A., Speit G., Thybaud V., Tice RR. 2003. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 18:45-51.
32. Hirschler V., Preiti M.C., Caamaño a., Jadzinsky M. 2000. Diabetes tipo 2 en la infancia y adolescencia. *Arch argent pediatr* 98:382-387.
33. Hostetter T H. Prevention of End-Stage Renal Disease Due to Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.*, 2001;345:910-912.
34. Hudson BI., Stickland MH., Grant PJ. Identification of polymorphisms in the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene. *Diabetes*.1998;47:1155-1157.

35. INEGI/Secretaría de Salud Dirección General de Información en Salud. 2003. Principales causas de mortalidad general.
36. Instituto Mexicano del Seguro Social. Dirección de prestaciones médicas. SUI. 2004.
37. Instituto mexicano del Seguro Social. Guías diagnóstico terapéuticas. 1997. Rev Med IMSS 35: 352-368.
38. Kahn S.E. 2003. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 46:3-19.
39. Knowler WC., Pettit DJ., Saad MF., Bennett PH. 1990. Diabetes in Pima Indian: Incidence, risk factors and pathogenicity. *Diab Metab Rev* 61-27.
40. Kobayashi H., Sugiyama Ch., Morikawa Y., Hayashi M., Sofuni T. 1995. A comparasion between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun.* 3:103-115.
41. Manes Ch., Papazoglou N., Sossidou E., Soulis K., Milarakis D., Satsoglou A., Sakallerou A. 2002. Prevalence of Diabetic Neuropathy and Foot Ulceration: Identification of Potencial Risk factors—A Population-based Study. *Wounds Health Management Publications, Inc.* 14:11-15.
42. Medina Navarro R. 2000. Productos secundarios de oxidación de ácidos grasos en el fenómeno de lipotoxicidad y su progresión hacia la diabetes mellitus tipo 2. *Funsalud* 9.
43. McNamee JP., McLean JRN., Ferrarotto CL., Bellier PV. 2000. Comet assay: rapid processing of multiple samples. *Mutation Research* 466:63-69.
44. National Institute of Health. National Diabetes Statistics. <http://diabtes.Niddk.nih.gov/dm/pubs/satistics/index.htm>.
45. Newman B., Selby JV., King MC., Slemenda C., Fabsistz R., Friedman GD. 1987. Concordance for type II (non insulin dependent) diabetes mellitus min male twins. *Diabetologia* 30:763-768.
46. Oliveira HR., Curi R., Carpinelli AR. 1999. Glucose induces an acute increase of superoxide dismutase activity in incubated rat pancreati islets. *Am J Physiol Cell Physiol.* 276: C507-C510.

47. Olmos Coelho P. 1998. Escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile. Proteínas Glicosiladas en la Fisiopatología de la Nefropatía diabética. Boletín 27:52-55.
48. Pérez Gastell PL., Pérez de Alejo JL. 2000. Métodos para medir el daño oxidativo. Rev Cubana Med Milit. 29:192-198.
49. Parslow T.G., Suites D.P., Terr A.I., Imboden J.B. 2002. Inmunología básica y clínica. Editorial El Manual Moderno. México, pp. 309-310.
50. Passarge E. 2001. Genética texto y Atlas. Editorial médica panamericana. México, pp. 362.
51. Pitozzi V., Giovannelli L., Bardini G., Rotella CM., Dolara P. 2003. Oxidative DNA damage in peripheral blood cells in type 2 diabetes mellitus: higher vulnerability of polymorphonuclear leukocytes. Mutat Res 28: 129-133.
52. Ragucci E., Zonszein J., Frishman WH. 2003. Pharmacotherapy of Diabetes Mellitus Implications for the Prevention and treatment of Cardiovascular disease. Heart Dis. 5:18-33.
53. Rojas E, López M 1999. Single gel electrophoresis assay: methodology and applications. Journal of Chromatography B, 722: 225-254.
54. Sack GH. Jr. 2002. Genética Médica. Mc Graw Hill. México, pp. 206.
55. Samraj G., Kuritzky L., Quillen L. 2000. Mejorando el control de la diabetes mellitus tipo 2: Tiazolidinedionas. Family Practice Forum Clinical Medicine McGraw-Hill Companies In.
56. Sardas S., Yilmaz M., Oztok U., Cakir N., Karakaya AE. 2001. Assessment of DNA strand breakage by comet assay in diabetic patients and the role of antioxidant supplementation. Mutat Res 20:123-129.
57. Sing N P, Mc Coy M T, Tice R R, Schneider EI. 1998. A simple Technique for Quantification of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. Exp Cell Res. 175: 184-191.
58. Sokal R R., Rohlf FJ. 1979. BIOMETRIA Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. España. pp. 281-330.

59. Temple I K., Shield J P H. J. 2002. Transient neonatal diabetes, a disorder of imprinting. *Med Genet* 39: 872-875.
60. Tooke Je. 2000. Possible pathophysiological mechanisms for diabetic angiopathy in type 2 diabetes. *Journal of Diabetes and its Complications* 14:197-200.
61. Tuomilehto J., Lindstrom J., Eriksson JG., Valle T T., Hamalainen H., Parikka PJ., Kiukaanniemi SK., Laasko M., Louheranta A., Rastas M., Salminen V., Uusitupa M. 2001. Prevention of Type 2 Diabetes Mellitus By Changes in Lifestyle Among Subjects With Impaired Glucose Tolerance. *N Engl J Med* 344:1343-1350.
62. Ulrich Melcher. 1998. Molecular Genetics. Agricultural Sciences and Natural resources. Oklahoma State University. pp.312,3122,3123. opbs.okstate.edu/~melcher/MG/MGW3/MG313.htm.
63. Udumudi A., Jaiswal M., N. Rajeswari, Desai N., S. Jain, N. Balakrishna, K. Rao V., Y.R. Ahuja. 1998. Risk assessment in cervical dysplasia patients by single cell gel electrophoresis assay: a study of DNA damage and repair. *Mutat Res* 412:195-205.
64. Valderde M., Ostrosky-Wegman P., Rojas E., Fortuol T., Meneses F., Ramírez M., Díaz-barriga F., Cebrían M. 1999. The application of single cell gel electrophoresis or comet assay to human monitoring studies. *Salud Publica de México* 41 Supl 2: S109-S113.
65. Vozarova B, Fernández Real JM, Knowler WC., Gallart L., Hanson RL., Gruber JD., Ricart W., Vendrell J., Richart C., Tataranni PA., Wolford J K. 2003. The interleukin-6 (-174) G7C promoter polymorphism is associated with type 2 diabetes mellitus in native Americans and Caucasians. *Hum Genet* 112:409-413.
66. Wagner AM., Pérez. 2000. Dislipidemia diabética: significación clínica y actitud terapéutica. *Rev Clin Esp.* 200:688.
67. World Health Association. 1999. The costs of Diabetes. Fact Sheet No. 236 November.
68. World Health Association. 1999. Diabetes Mellitus. Fact Sheet No. 138, November.

9. APENDICES

Anexo A Cuestionario de entrevista

Unidad de medicina Familiar No. 26 No. De Proyecto en el IMSS 2002-364-003

Fecha _____

Nombre _____ Edad ____ Sexo _____

No. De Afiliación _____ No. De Consultorio ____ Turno ____

Lugar de nacimiento del paciente _____

Lugar de Nacimiento de:

Papá _____ Mamá _____

Abuelo materno _____ Abuela materna _____

Abuelo paterno _____ Abuela paterna _____

Peso en Kg. _____ Estatura en metros _____ IMC _____

Perímetro de cintura en centímetros _____

Perímetro de cadera en centímetros _____ ICC _____

Año en que se diagnosticó la diabetes _____ Tiempo de evolución _____

Tipo de tratamiento:

1. Glibenclamida Si ____ No ____
2. Glibenclamida + Metformina Si ____ No ____
3. Insulina Si ____ No ____
4. Insulina + Metformina Si ____ No ____
5. Control sano ____

¿Padece otra enfermedad? Si ____ No ____ Cual _____

¿Que otros medicamentos toma usted? _____

¿Toma algún tratamiento de hierbas para control de la diabetes? Si ____ No ____

¿Toma vitaminas o suplementos alimentarios? Si ____ No ____

Familiares con diabetes mellitus Si ___ No ___ ¿Quién?: Papá ___ Mamá ___
Hermanos ___ Abuela materna ___ Abuelo Materno ___ Abuela Paterna ___ Abuelo
Paterno ___ Tíos ___ Primos ___ Hijos ___ Pareja ___

Hábitos

Tabaquismo Si ___ No ___ Años que dejó de fumar ___ Años fumando ___
Alcoholismo Si ___ No ___ Años que dejó de beber ___ Años bebiendo ___
Toma café Si ___ No ___ Cuantas tazas por día ___ Años tomando café ___

Estado civil:

Casado ___ Soltero ___ Viudo ___ Divorciado ___ Unión libre ___
Cuantos hijos ___ hijas ___ tiene.

Escolaridad

Primaria: completa ___ incompleta ___ Secundaria: completa ___ incompleta ___
Preparatoria: completa ___ incompleta ___ Técnica ___
Profesional _____

Ocupación

Hogar ___ Jubilado ___ Obrero ___ Técnico ___ Comerciante ___ Oficinista
___ Profesional ___

Conocimientos sobre la diabetes

¿Qué órgano o parte de su cuerpo está enfermo? _____
¿La diabetes tiene relación con los alimentos que usted come? Si ___ No ___
¿Que alimentos puede usted no comer?: Azúcares refinados ___ Pan dulce ___ Grasas
___ Galletas y pastel ___ Nieve ___ Refrescos regulares (no dietéticos) ___
¿Quien le dio la información sobre su enfermedad o alimentación?: El médico ___
Nutricionista ___ Otra persona ___
¿Sabe si la diabetes le puede causar problemas de salud en el futuro? Si ___ No ___
Cuales _____

¿Su familia sabe que usted padece de azúcar alta? Si ____ No ____

¿Su familia sabe cual es el tratamiento que usted toma? Si ____ No ____

¿Su familia sabe cuales alimentos puede comer y cuales no? Si ____ No ____

Actividad física

¿Qué tipo de ejercicio físico realiza?

Subir y bajar escaleras ____ Trabajo de casa ____ Caminata ____ Trotar ____ Correr ____

Bicicleta estacionaria ____ Banda sin fin ____ Natación ____ Foot ball ____

Cuantas veces por semana realiza el ejercicio _____

Cuanto dura cada sesión de ejercicio _____

Exploración Física

Presenta secuelas de parálisis facial Si ____ No ____ Tensión arterial _____

Fondo de ojo Normal _____ Con alteraciones _____

Diagnóstico previo de oftalmopatía _____

Adoncia: parcial ____ completa ____ Gingivitis: Si ____ No ____

Área precordial _____

Campos pulmonares _____

Cuello _____

Onicomycosis: Si ____ No ____ Tiña en piel de pies: Si ____ No ____

Insuficiencia venosa periférica: Si ____ No ____

Insuficiencia arterial periférica: Si ____ No ____

Alteraciones de la sensibilidad de miembros inferiores: Si ____ No ____

Insuficiencia renal Si ____ No ____

Anexo B
Carta de consentimiento informado

Fecha. _____

Mediante esta carta autorizo mi participación en el estudio de investigación:

DIABETES MELLITUS TIPO 2: EVALUACIÓN DEL DAÑO AL DNA NUCLEAR
EN PACIENTES SOMETIDOS A DIFERENTES ESQUEMAS DE TRATAMIENTO
MEDIANTE ENSAYO COMETA

El cual tiene por objetivo determinar el daño en los tejidos de mi cuerpo a consecuencia de la diabetes que padezco. Mi participación en el estudio es voluntaria y tengo la opción de retirarme en cualquier momento, sin que esto represente pérdida de mis derechos como paciente.

Se me ha explicado que mi participación consiste en responder las preguntas de un cuestionario sobre mis antecedentes familiares con relación a la diabetes que padezco, sobre mi alimentación, organización de mi familia y la donación de 10 mililitros de mi sangre para los estudios de laboratorio

Mi participación no incluye recibir algún tipo de tratamiento diferente a lo que tengo prescrito por mi médico tratante, ni tengo ningún riesgo adicional excepto lo ocasionado por la toma de sangre venosa, y el estudio concluirá en una sola entrevista.

Los resultados del estudio darán a mi médico tratante un panorama sobre el control de mi enfermedad, así como si presento algún tipo de complicación relacionada con la diabetes, lo cual pudiera ayudarle a mi médico a modificar mi tratamiento, además de contribuir al conocimiento sobre la diabetes que otras personas padecen como yo.

Estoy entrado(a) y acepto que un comité de investigación y ética tengan acceso a mi expediente de la entrevista, con la finalidad de verificar los procedimientos y los datos generados en esta investigación, de igual manera es de mi conocimiento que los registros de la entrevista son confidenciales.

Dado que se trata de un estudio de investigación el tiempo estimado para el reporte global de los resultados será de 2 años y los resultados de mis exámenes personales los tendrá mi médico tratante en un mes a partir de la fecha de mi participación.

En caso de requerir información adicional podré solicitarla y me será otorgada por el investigador o sus superiores.

Por lo anterior acepto mi participación libre, voluntaria e informada en la presente investigación, lo cual signo con mi firma.

Participante _____

Investigador _____

Testigo _____

10. RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Emma Ibarra Costilla
Candidato para el Grado de
Doctor en Ciencias con Especialidad en Biología celular y Genética

Tesis: DIABETES MELLITUS TIPO 2: EVALUACIÓN DEL DAÑO AL DNA
NUCLEAR EN PACIENTES SOMETIDOS A DIFERENTES ESQUEMAS
DE TRATAMIENTO MEDIANTE ENSAYO COMETA

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Datos Personales: Nacida en Saltillo, Coahuila el 18 de Abril de 1953, hija de Fermín Ibarra Camarillo y Guadalupe Costilla.

Educación:

Egresado de la Universidad de Monterrey con el grado de Médico Cirujano y Partero en 1981.

Especialidad en Medicina Familiar otorgado por la Universidad Autónoma de Nuevo León y el Instituto Mexicano del Seguro Social en 1986.

Maestría en Salud Pública otorgado por la facultad de Salud Pública y Nutrición en 2002.

Experiencia Profesional: Médico familiar en el Instituto mexicano del Seguro Social desde 1986 a la fecha, en el departamento de consulta externa en la Unidad de Medicina Familiar No. 26.