



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

DAÑO DE ADN Y LÍPIDOS DE MEMBRANA EN GLÓBULOS BLANCOS DE  
PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 QUE ASISTEN A LA  
UNIDAD DE DIABETES DEL HOSPITAL ESPECIAL "DR. JULIO  
RODRÍGUEZ". CUMANÁ, ESTADO SUCRE  
(Modalidad: Tesis de Grado)

MARTHA SILENNY MUÑOZ

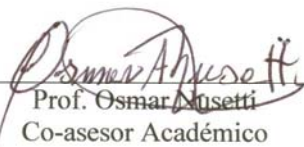
DAÑO DE ADN Y LÍPIDOS DE MEMBRANA EN GLÓBULOS BLANCOS DE  
PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 QUE ASISTEN A LA  
UNIDAD DE DIABETES DEL HOSPITAL ESPECIAL "DR. JULIO  
RODRÍGUEZ". CUMANÁ, ESTADO SUCRE

APROBADO POR:



---

Prof. Sonia Nusetti  
Asesor Académico



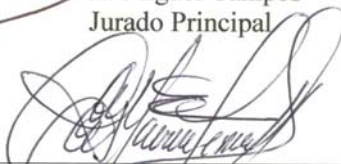
---

Prof. Osmar Nusetti  
Co-asesor Académico



---

Prof. Miguel Campos  
Jurado Principal



---

Prof. Mairin Lemus  
Jurado Principal

## INDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTO.....	ii
LISTA DE TABLAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMEN.....	vi
INTRODUCCIÓN.....	I
METODOLOGÍA.....	7
Población.....	7
Criterios de selección de la muestra.....	7
Criterios de exclusión.....	7
Normas de bioética.....	8
Obtención de la muestra.....	8
Determinación de glicemia.....	9
Determinación de hemoglobina glicosilada (HbA <sub>1c</sub> ).....	9
Aislamiento y contaje de glóbulos blancos.....	10
Los valores de referencia en el adulto oscilan 4,5 a 11 x10 <sup>9</sup> /l.....	10
Detección de daños a nivel de ADN a través del ensayo cometa.....	11
Detección de daños a nivel de las membranas celulares a través de la peroxidación de lípidos.....	12
Análisis estadístico.....	13
RESULTADOS.....	I
Niveles de glucosa y hemoglobina glicosilada en diabéticos controlados y no controlados e individuos sanos.....	14
Tipos y números de cometas inducidos en glóbulos blancos por la exposición a diferentes concentraciones de peróxido de hidrogeno en individuos sanos:.....	15
Tipos y números de cometas inducidos en glóbulos blancos, expuestos y no a peróxido de hidrogeno: pacientes diabéticos controlados.....	16

Tipos y números de cometas inducidos en glóbulos blancos, expuestos y no a peróxido de hidrogeno: pacientes diabéticos no controlados .....	18
Daños en el ADN de los glóbulos blancos no expuestos a peróxido de hidrogeno de individuos sanos, pacientes diabéticos controlados y no controlados .....	18
Daños en el ADN de los glóbulos blancos expuestos a una dosis de peróxido de hidrogeno de individuos sanos, pacientes diabéticos controlados y no controlados ...	20
Peroxidación de membranas lipídicas en globulos blancos de individuos sanos, diabeticos controlados y diabeticos no controlados.....	21
DISCUSIÓN.....	I
CONCLUSIONES.....	I
BIBLIOGRAFÍA.....	I
ANEXOS.....	36
HOJA DE METADATOS.....	46

## **DEDICATORIA**

A

Mis padres, Teresa<sup>†</sup> y Toribio, porque fueron los que me dieron el ser. Mi madre, aunque no esté físicamente, su ausencia me dio fuerzas para lograrlo, y de ella aprendí que con esfuerzo lo conseguimos todo.

Mis Hijos, Carlos Leonardo y José Leonardo, porque esperaron y fueron mi más grande incentivo para seguir y culminar.

## **AGRADECIMIENTO**

A

Jehová Dios, por haberme permitido culminar esta investigación y llegar a este momento tan importante de mi vida.

Mi madre, Teresa<sup>†</sup>, por guiarme sobre el camino de la educación y fomentar en mí el deseo de aprender; yo sé que estás feliz madre allá en el cielo.

Mi asesora, Sonia Nusetti, por su colaboración, asistencia profesional y por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica, sus consejos, paciencia y opiniones, los cuales sirvieron para que me sienta satisfecha en mi participación dentro del trabajo de investigación.

El profesor Osmar Nusetti por su orientación y los conocimientos aportados para la realización de este trabajo.

Mi esposo, José, por su paciencia, colaboración y sacrificio durante mi carrera. Gracias, mi amor.

La Dra. Josefa Velásquez, al personal y pacientes de la Unidad de Diabetes, Dra. Iris García de Mota, del Hospital Especial “Dr. Julio Rodríguez” de Cumaná, por su colaboración durante la recolección de las muestras.

La Lcda. Luz Mujica, por su apoyo, ánimo, comprensión y por sus sustanciales sugerencias durante la redacción de mi tesis, por su amistad.

Mi amiga Martina, por estar pendiente de todo el trayecto de esta investigación.  
Gracias, amiga.

La Lcda. María Guerra, por la valiosa colaboración, entera disposición y orientación en el procesamiento de las muestras.

## **LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Niveles de glucosa en sangre (mg/dl) de diabéticos controlados y no controlados e individuos sanos, que asistieron a la Unidad de Diabetes Dra. Iris García de Mota del Hospital Especial “Dr. Julio Rodríguez”, Cumaná, estado Sucre. ....	14
Tabla 2. Niveles de hemoglobina glicosilada (%) en sangre de diabéticos controlados y no controlados e individuos sanos, que asistieron a la Unidad de Diabetes Dra. Iris García de Mota del Hospital Especial “Dr. Julio Rodríguez”, Cumaná, estado Sucre....	15



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tipos de cometas presentes en los glóbulos blancos de individuos sanos expuestos a concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ). *p<0,01 entre las concentraciones de peróxido de hidrógeno. ....	16
Figura 2: Tipos de cometas presentes en glóbulos blancos no expuestos a peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) de pacientes diabéticos controlados. *p<0,001 con respecto a cometa 1, **p<0,001 respecto a cometa 2.....	17
Figura 3: Tipos de cometas presentes en glóbulos blancos, expuestos a peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), de pacientes diabéticos controlados. *p<0,001 con respecto al mismo tipo cometa de las células no expuestas a peróxido, **p<0,001 respecto a cometas tipo 0 y 1 de las células expuestas a peróxido.....	17
Figura 4: Tipos de cometas presentes en glóbulos blancos no expuestos a peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) de pacientes diabéticos no controlados. *p<0,001 respecto a cometas tipo 0. ....	18
Figura 5: Tipos de cometas presentes en glóbulos blancos, expuestos a peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), de pacientes diabéticos no controlados. *p<0,001 con respecto al mismo tipo cometa de las células no expuestas a peróxido, **p<0,001 respecto a cometa 0 y 1 de las células expuestas a peróxido.....	19
Figura 6: Daño oxidativo del ADN en glóbulos blancos, no expuestos a peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), de los distintos grupos. *p<0,01 entre los grupos en estudio.....	20
Figura 7: Daño oxidativo del ADN en glóbulos blancos, expuestos a una dosis de peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), de los distintos grupos. *p<0,01 entre los grupos en estudio.....	21
Figura 8: Niveles de malondialdehído en glóbulos blancos de individuos sanos, diabéticos controlados (DC) y no controlados (DNC). *p< 0,05 con respecto al control y diabéticos controlados DC. ....	22

## RESUMEN

Se evaluó el daño oxidativo a nivel genético y lípidos de membrana en los glóbulos blancos de pacientes diabéticos no insulino dependientes, controlados y no controlados que asistieron a la Unidad de diabetes Dra. Iris García de Mota del Hospital Especial “Dr. Julio Rodríguez”, Cumaná, estado Sucre. Los pacientes fueron divididos en diabéticos controlados (DC) y diabéticos no controlados (DNC) de acuerdo al grado de control glicémico. El daño de ADN se evaluó a través de electroforesis en gel de células individuales, o ensayo cometa, el cual permite detectar lesiones en el ADN en una célula en condiciones experimentales de pH alcalino, y permite revelar la presencia de rompimiento en una simple o doble hebra del ADN en los sitios lábiles a la alcalinidad. El nivel de peroxidación de membranas (MDA) a través de la cuantificación colorimétrica de las especies reactivas con el ácido tiobarbitúrico. Los pacientes DNC presentaron el mayor daño en el ADN de los glóbulos blancos, seguidos por los DC, en comparación a los individuos sanos. Cuando los glóbulos blancos de estos pacientes fueron expuestos *in vitro* a un agente prooxidante, el ADN exhibió una alta sensibilidad al efecto tóxico de la sustancia estresante, en comparación a los individuos sanos, siendo mayor en los DNC. Los niveles de MDA (nmoles/cel) en los DNC presentaron un aumento significativo con respecto a los individuos sanos ( $0,072 \pm 0,028$  vs  $0,118 \pm 0,031$ ). Los pacientes DNC exhibieron el mayor daño del ADN en los glóbulos blancos, seguido por los DC, en comparación con los individuos sanos. Estos resultados permiten inferir que en la diabetes existe un mayor grado de estrés oxidativo causado por los radicales libres, el cual está asociado a la calidad de control glicémico. El daño de ADN y peroxidación de membrana puede disminuir las funciones de los glóbulos blancos, los cuales son importantes en proteger al organismo contra infecciones, esto constituye un factor de riesgo importante en las infecciones recurrentes y propias del paciente diabético. Además, el daño oxidativo de ADN convierte al paciente diabético, sobre todo al no controlado, a ser propenso de desarrollar mutaciones que finalmente pueden conllevar a la aparición de cáncer.

## INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad endocrino-metabólica debida a una deficiencia absoluta o relativa en la acción de la insulina, que provoca un trastorno en el metabolismo de los glúcidos, los lípidos y las proteínas (Mojena y cols., 2002). Esta afección ha alcanzando proporciones epidémicas en todo el mundo, lo que representa un problema de salud pública por los elevados costos de su tratamiento y el impacto social de sus complicaciones en la calidad de vida de los pacientes afectados (Barr y cols., 2002). En Venezuela, se calcula que alrededor de 900 000 personas padecen de diabetes, con una prevalencia estimada de manera variable entre 1 y 6%, y una tasa de mortalidad de 16,7/100 000 habitantes, ocupando el quinto lugar entre las principales causas de muerte en el país, y con una mayor frecuencia entre los 40 y 65 años de edad (Coll, 1997).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado DM en las siguientes categorías: Tipo 1 o DM insulina-dependiente (DM 1), que ocurre cuando el páncreas produce poca o ninguna secreción endógena de insulina y suele aparecer antes de la edad adulta. Tipo 2 o DM no insulina-dependiente (DM 2), que se caracteriza por una combinación de la resistencia periférica a la insulina, dada por una alteración en los receptores de insulina de las células, y un déficit en la producción de la misma, este tipo de diabetes es más frecuente después de los 35 años, aunque en realidad, puede aparecer a cualquier edad, y por último, la diabetes gestacional que es una condición temporal que ocurre durante el embarazo (Hernández y cols., 2000).

La DM 2 es un problema de salud global que ha ido en aumento progresivo y alcanzará proporciones epidémicas en los próximos 10 a 20 años, determinado por el incremento en la frecuencia de obesidad, hábitos sedentarios y envejecimiento de la población (Hernández y cols., 2000). En la DM 2 subyacen tres tipos de anomalías: alteración en la secreción de insulina, aumento de la producción hepática de glucosa (responsable de la hiperglicemia en ayunas) y disminución de la captación periférica de

glucosa después de las comidas. El déficit de insulina es responsable de hiperglicemia por falta de inhibición de la producción hepática de glucosa, o por ausencia de estimulación de la captación de la glucosa a nivel periférico. La hiperglicemia es por sí misma responsable de la resistencia a la insulina a través del efecto tóxico de niveles elevados de glucosa circulantes (glucotoxicidad) (Temelkora-Kurktschier y Hanefeld, 2004).

La hiperglicemia está asociada a la aparición de las complicaciones que se presentan asociadas con la enfermedad. Éstas consisten en un heterogéneo grupo de disfunciones clínicas que afectan el riñón, el sistema nervioso, el sistema vascular y el sistema inmunológico. Los individuos diabéticos tienen 25 veces mayor probabilidad de contraer ceguera, 20 veces más riesgo de amputaciones, de 6 a 10 veces más riesgo de padecer de enfermedades coronarias y un aumento en la susceptibilidad y severidad de infecciones. Se sabe que la inmunidad está alterada en los pacientes con DM; la asociación entre ésta y el elevado riesgo de infecciones es una creencia mantenida en la práctica clínica habitual (Aira y Díaz, 1999; Martin y cols., 2003). Varios estudios han demostrado una alteración en la función de los neutrófilos, un efecto que contribuye a la elevada incidencia de infecciones en los pacientes diabéticos; estos cambios incluyen alteración de adhesión al endotelio, migración al sitio de inflamación, quimiotaxis, actividad bactericida, fagocitosis y producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Aira y Díaz, 1999; Alba-Loveiro y cols., 2006).

El recientemente descubierto estrés oxidativo (EO) en los diabéticos, producido por un incremento de la generación de radicales libres (RL), o una disminución de la eficacia del sistema barredor de estas moléculas, juega un papel fundamental en la patogenia de la diabetes y sus subsecuentes complicaciones crónicas como la retinopatía, nefropatía y neuropatías, así como el establecimiento y progresión de procesos ateroscleróticos (Annstrong y cols., 1992; Kakkar y cols., 1995).

Los elevados niveles de glucosa en sangre conducen a la activación de varias vías

metabólicas no muy usuales en el organismo, los cuales generan otros metabolitos, tales como los RL de oxígeno. Se han descrito varias rutas metabólicas vinculadas con el EO e implicadas en las complicaciones de la DM 2, entre ellas las más estudiadas son: la autooxidación de la glucosa, la ruta del sorbitol (o de la aldosa reductasa) y la glucosilación no enzimática de proteínas (Rosado y Mendoza, 2007).

Durante la autooxidación de la glucosa se generan productos oxidantes a partir de la enolización de la glucosa, entre ellos se ha demostrado que el gliceraldehído, en presencia de metales de transición, como el  $\text{Fe}^{+2}$ , puede formar el radical anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), y éste puede ser convertido en agua, a través de las enzimas antioxidantes o generar otros radicales más dañinos (Feldman, 2003). En cuanto a la vía del sorbitol, se propone que por efecto del exceso de glucosa presente en el tejido, la enzima aldosa reductasa reduce la glucosa a sorbitol, consumiendo el cofactor nicotinamida adeninucleótido fosfato (NADPH), el cual es necesario para que la enzima glutatión reductasa mantenga los niveles del antioxidante intracelular, glutatión reducido (GSH) (Gugliucci, 2000).

Por otro lado, la glicosilación no enzimática de proteínas, también denominada glicatación o reacción de Maillard, químicamente hablando, es una reacción que sucede en tres etapas, la primera se da por la adición de un grupo amino primario (de una proteína o de fosfolípidos) al grupo carbonilo del azúcar, formándose una base de Schiff; éste es un compuesto poco estable, pero si no disminuye la concentración de glucosa circulante puede avanzar hacia la segunda etapa de la reacción con la formación de un compuesto que se ha llamado genéricamente como “compuesto de Amadori”, en el cual se da nuevamente una reordenación interna para mayor estabilidad, pero que genera más carbonilos reactivos. Hasta este punto la reacción es todavía reversible y puede regresar hacia la base de Schiff e incluso hasta la parte inicial si disminuye la concentración de glucosa; sin embargo, si la reacción no se revierte, los grupos carbonilos de los productos de Amadori son capaces de reaccionar nuevamente con grupos amino de proteínas y originar moléculas más grandes por el entrecruzamiento del azúcar con otras

proteínas (tercera etapa), los compuestos así generados se han denominado productos finales de glicosilación no enzimática o AGEs (del inglés *Advanced Glycosylation End Products*), los cuales son estructuras que se forman lentamente en reacciones fuertemente desplazadas hacia la derecha; es decir, hacia la formación de los productos y que se ven propiciadas por la presencia de oxígeno y metales reductores. Esta reacción puede afectar la funcionalidad de las células, ya que la glicosilación afecta la actividad biológica de las proteínas, por medio de tres mecanismos generales: la modificación de proteínas extracelulares (de bajo recambio), el desencadenamiento de procesos intracelulares por unión a receptores extracelulares y alteraciones de proteínas intracelulares. En los sujetos diabéticos, donde se asocian las condiciones para que se generen los AGEs, se ha descrito la unión de éstos a receptores específicos del tipo de las gammaglobulinas, en la superficie celular de macrófagos, monocitos y células endoteliales, desencadenando la liberación de RL de oxígeno y finalmente EO. Es así como la hiperglucemia crónica se ha vinculado con el EO en los pacientes diabéticos, en los cuales se han descrito niveles elevados de marcadores de oxidación, además de asociación con el control glucémico y los AGEs (Flecha y cols., 2000).

Las especies reactivas de oxígeno generadas por el exceso de glucosa, principalmente el  $O_2^\bullet$ ,  $OH^\bullet$ , el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el óxido nítrico (NO), y peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), son capaces de oxidar a las macromoléculas, alterando la estructura y función de las mismas, y disfunción celular (Clahsen y cols., 1992; Augustin y cols., 1993; Barr y cols., 2002). El incremento de las ERO, hace que los sistemas antioxidantes primarios del organismo, tales como alfa tocoferol y glutatión reducido (GSH), reaccionen con las ERO para neutralizarlos, pero ésto desencadena el agotamiento o disminución en la concentración de tales antioxidantes. De hecho, los pacientes diabéticos presentan una disminución del GSH en plasma y en glóbulos rojos (Murakami y cols., 1989). Además, las ERO generadas son capaces de inducir las síntesis de otras barreras defensivas, como las enzimas antioxidantes Cu/Zn-SOD, CAT, GPx; no obstante cuando la explosión de altas concentraciones de glucosa es mantenida durante mucho tiempo, como es el caso de los pacientes diabéticos, la situación parece

cambiar. Varios autores han demostrado una disminución en la actividad de la catalasa, superóxido dismutasa, glutatióna peroxidasa en plasma de pacientes diabéticos (Mamposo-Solano y cols., 1999; Clapés y cols., 2001) y que esta disminución es aún más pronunciada en pacientes con retinopatía y nefropatía diabética (Baynes y Thorpe, 1999; Mamposo-Solano y cols., 1999). Esto pudiera deberse a que la hiperglicemia crónica mantiene también un estrés oxidativo crónico capaz de dañar múltiples moléculas de importancia biológica, como las enzimas anteriormente señaladas, proteínas, lípidos de membrana y ADN (Curcio y cols., 1995; Barr y cols., 2002).

En la molécula de ADN, los grupos nucleofílicos de la desoxirribosa y de las bases nitrogenadas quedan expuestos al ataque electrofílico de las ERO, que llegan al interior del núcleo celular, ya sean generadas como consecuencia de un agente externo o por procesos metabólicos celulares, los cuales producirán una peroxidación y consiguiente modificación química de sus bases nitrogenadas; es por ello, que se estudian intensamente los agentes y mecanismos del daño por ERO, porque su esclarecimiento va parejo a la elucidación de la patogenia de enfermedades de gran morbilidad y mortalidad (Augustin y cols., 1993).

Las ERO producen modificación en las bases del ADN, incluyendo la oxidación de residuos de guanina a 8-oxo, 2'-deoxiguanosina (8-oxodG) y rompimiento en las hebras. La cuantificación de la 8-oxodG y la medida del rompimiento en las hebras del ADN, a través de electroforesis en gel de células aisladas (ensayo cometa), se han utilizado como biomarcadores de daño oxidativo del ADN en diversos tejidos de animales de experimentación y humanos (Hinokio y cols., 1999; Mozaffarieh y cols., 2008). En ratas diabéticas se ha encontrado aumentada la concentración de la 8-oxodG en el riñón y orina. En pacientes diabéticos tipo I y II se han reportado incrementos de 8-oxodG en células mononucleares y en la orina y este aumento se ha correlacionado con niveles elevados de la hemoglobina glicosilada (Dandona y cols., 1996; Hinokio y cols., 1999).

El ensayo cometa, con el cual se pueden detectar rupturas de simple cadena y

sitios del ADN lábiles a pH alcalino, presenta muchas ventajas: es una prueba rápida, de bajo costo y con una sensibilidad que supera en más de 100 veces a las pruebas citogenéticas, además de que permite el análisis de diferentes tipos celulares en un mismo individuo (Ramalho y cols., 1988).

Otton y cols. (2004) demostraron una elevada ocurrencia (81%) de fragmentación de ADN en linfocitos obtenidos de ratas diabéticas, inducido por la administración de alloxan. Estos autores sugieren que los pacientes diabéticos pobremente controlados pueden padecer de un aumento en la muerte de linfocitos y en la prevalencia de infecciones.

El incremento en la generación de radicales libres y la disminución de la eficacia del sistema barredor de estas moléculas en los pacientes diabéticos, juega un papel fundamental en la patogénesis de la diabetes y sus subsecuentes complicaciones crónicas como la retinopatía, nefropatía, neuropatías, infecciones recurrentes y amputaciones, así como el establecimiento y progresión de procesos ateroscleróticos (Annstrong y cols., 1992; Kakkar y cols., 1995).

En la ciudad de Cumaná existe una alta prevalencia de pacientes diabéticos con mal control glucémico y no se tiene información sobre los daños oxidativos a nivel celular y genético. Por este motivo, se realizó un estudio para evaluar daño genético y lípidos de membrana en los glóbulos blancos de pacientes diabéticos no insulino dependientes, controlados y no controlados, que asistieron a la Unidad de diabetes Dra. Iris García de Mota del Hospital Especial “Dr. Julio Rodríguez”, Cumaná, estado Sucre. Esto con el propósito de detectar alteraciones a nivel génico y celular, los cuales permitirán tener un diagnóstico temprano de la severidad de la patología oxidativa y aportar información crucial para un tratamiento preventivo con antioxidantes, y así minimizar o evitar el avance de complicaciones macro y microvasculares en estos pacientes.



## **METODOLOGÍA**

### **Población**

La muestra evaluada estuvo constituida por un grupo de 40 pacientes adultos con edades comprendidas entre 25 y 50 años, incluyendo ambos sexos, con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 (DM 2) y evolución de la enfermedad menor o igual a 5 años, provenientes de la consulta de la Unidad de Diabetes Dra. Iris García de Mota del Hospital Especial “Dr. Julio Rodríguez”, Cumaná, estado Sucre. Conjuntamente se analizaron 30 muestras de individuos aparentemente sanos, sin antecedentes familiares o personales de diabetes, que fueron utilizados como grupo control.

### **Criterios de selección de la muestra**

Los pacientes que participaron en esta investigación tuvieron un diagnóstico previo de DM2 como única patología. Para la selección de los pacientes se les realizó una revisión de sus historias médicas. Además, se les aplicó una encuesta de datos clínico-epidemiológicos para conocer los antecedentes médicos, evolución de la enfermedad, que involucra el tiempo de duración de la diabetes, tratamiento aplicado y complicaciones secundarias (Anexo 1). La población de pacientes con DM 2 fue dividida en 2 grupos: diabéticos controlados integrados por 20 pacientes, con un buen control glicémico establecido por los valores de hemoglobina glicosilada  $<7,2\%$  y diabéticos no controlados, conformado por 20 individuos con un escaso control glicémico, establecido por los valores de hemoglobina glicosilada  $>7,2\%$ .

### **Criterios de exclusión**

Se excluyeron del estudio a los pacientes con DM 2 con más de 5 años de tratamiento, a todos los que estuvieron recibiendo tratamiento con antioxidantes, como por ejemplo vitamina C o vitamina E, a los que refirieron en el interrogatorio, afecciones de hígado, riñón, pulmón, tiroides y la presencia de factores de riesgo cardíaco, como hipertensión

arterial e hiperlipidemias. Se tomaron como criterios de exclusión para la selección del grupo control la presencia de cualquier patología; es decir, los individuos debían estar aparentemente sanos.

### **Normas de bioética**

La investigación se realizó siguiendo los lineamientos establecidos en la declaración de Helsinki, entre los cuales se destacan que todo trabajo de investigación debe estar sólo a cargo de personas con debida preparación científica y bajo vigilancia de los profesionales de la salud, respetando los derechos de cada individuo participante en la investigación a salvaguardar su integridad personal. Se aplicaron todas las precauciones necesarias para respetar la intimidad, la integridad física y mental del sujeto, siguiendo el criterio de ética publicado por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) (2000), conforme al artículo 46 numeral 3, de la Constitución de la República Bolivariana de Venezuela. Al paciente se le dio por escrito las indicaciones necesarias para la toma de muestra sanguínea y se les informó de la importancia, objetivos del estudio, métodos y procedimiento a utilizar y la finalidad de la investigación (Anexo 2).

### **Obtención de la muestra**

Previa asepsia de la región del pliegue del codo a nivel de la vena cubital media por punción venosa se extrajeron 14 ml de sangre con jeringas estériles descartables, a cada paciente, en ayunas. De los 14 ml extraídos, 10 ml fueron transferidos, en porciones de 5 ml, a 2 tubos de ensayo estériles que contenían, cada uno, una gota de ácido etilendiaminotetracético disódico (EDTA- $\text{Na}_2$ ) al 10%, como anticoagulante y se mantuvieron en cavas refrigeradas hasta llegar al laboratorio. Estos tubos se utilizaron para la determinación de hemoglobina glicosilada, el aislamiento y conteo de glóbulos blancos, detección de daños oxidativos en el ADN y peroxidación de los lípidos de membrana en los glóbulos blancos. Los 4 ml restantes de sangre fueron transferidos a tubos de ensayos secos, se dejaron coagular a temperatura ambiente y una vez formado

el coágulo se centrifugaron a 500 g, durante 10 minutos, a temperatura ambiente, utilizando una centrífuga clínica marca Memmert. Los sueros sobrenadantes se recogieron en tubos de ensayo estériles, para luego realizar las determinaciones de glicemia (Fichbach, 1997).

### **Determinación de glicemia**

Se empleó un método enzimático colorimétrico, basado en la reacción de la glucosa con el reactivo enzimático que contiene una mezcla de las enzimas glucosa-oxidasa (GOD) y peroxidasa (POD). En la primera etapa, la glucosa es oxidada a ácido glucónico por acción de la enzima GOD, liberándose peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el cual, en una reacción mediada por la enzima POD reacciona con el ácido-p-hidroxibenzoico (P-HBA) y la 4-amino antipirina (4-AAP), produciéndose un compuesto coloreado con un máximo de absorción a 505 nm, en cantidad proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra (Trinder, 1969). Valores de referencia para glicemia: deseable 70-110 mg/dl, alto riesgo  $\geq 110$ .

### **Determinación de hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1c</sub>)**

La determinación de HbA<sub>1c</sub> se basó en el ensayo inmunoturbidimétrico de inhibición (TINIA) para sangre completa hemolizada (kit HbA<sub>1c</sub> II, Tinia-quant), utilizando para ello el analizador de química sanguínea automatizado la marca Hitachi 902, de la casa Roche. El método emplea bromuro de tetradeciltrimetilamonio (TTAB) como detergente en el reactivo hemolizante para eliminar interferencias por leucocitos, ya que el TTAB impide la lisis de éstos. Este ensayo determina todas las variantes de la hemoglobina glicosilada en el grupo N- terminal de la cadena  $\beta$ , cuya región reconocida por el anticuerpo sea idéntica a la HbA<sub>1c</sub>. La determinación se basa en que la HbA<sub>1c</sub> es reconocida por el anticuerpo anti-HbA<sub>1c</sub>, formando un complejo antígeno-anticuerpo soluble. Debido a que en la molécula HbA<sub>1c</sub> existe solamente un sitio de fijación

específico para el anticuerpo anti-HbA<sub>1c</sub>, no se forman estructuras más complejas, por lo que la reacción se inicia al agregar los polihaptenos, los cuales forman, con los anticuerpos anti-HbA<sub>1c</sub> excedentes, un complejo anticuerpos-polihaptenos insolubles que se mide turbidimétricamente. La concentración de la hemoglobina total es determinada en un segundo canal de medición. La hemoglobina liberada de la muestra hemolizada es transformada a un derivado con un espectro de absorción característico que se mide bicromáticamente (Goldstein y Little, 1994). Los valores de referencia por este método en pacientes sanos son de 4 a 6%. Para determinar la concentración % de HbA<sub>1c</sub> se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{HbA}_{1c} = 91,5 \times \frac{\text{HbA}_{1c} \text{ (g/dl)}}{\text{Hb (g/dl)}} + 12,5$$

### **Aislamiento y conteo de glóbulos blancos**

La muestra de sangre con EDTA-Na<sub>2</sub> fue centrifugada a 250 g durante 10 minutos. El plasma fue descartado y se aspiró la capa de glóbulos blancos, el cual fue lavado con solución amortiguadora de fosfato salino (PBS) 0,1 mol.l<sup>-1</sup> a pH 7,2 y centrifugado nuevamente a 250 g por 10 minutos. El precipitado con los glóbulos blancos fue resuspendido en PBS. Para el conteo de glóbulos blancos, la pipeta de Thomas se llenó con la suspensión de glóbulos blancos bien mezclados hasta la marca de 0,5 ml, se aforó con solución de Turk (ácido acético glacial 3%) hasta la marca de 11 y se agitó la pipeta durante 3 minutos. Luego se llenó la cámara de Neubauer y se observó en un microscopio Nikon, usando el objetivo de 10X, se contaron los leucocitos presentes en los cuatro cuadrados grandes de los extremos (Mc Kenzie, 1996).

Los valores de referencia en el adulto oscilan 4,5 a 11 x10<sup>9</sup>/l

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

Esta técnica permite detectar daños en el ADN de una célula en condiciones experimentales de pH alcalino, y permite revelar la presencia de rompimiento en una hebra simple o doble del ADN en los sitios lábiles a la alcalinidad. Las células en estudio son colocadas en agarosa, lisadas y luego sometidas a electroforesis bajo condiciones específicas. En la lisis, la célula pierde sus proteínas y no son capaces de reparar ADN dañado. Durante la electroforesis, el ADN dañado y fragmentado migra dentro del gel desde el núcleo hacia la dirección del ánodo. La cantidad de ADN migrado es una medida de la extensión del daño. La observación del ADN se realizó a través de la tinción con el colorante bromuro de etidium y examinado por la fluorescencia de emisión con un filtro de excitación de 515 y emisión de 560 nm. Las células que contienen ADN dañado aparecen después de la electroforesis con una apariencia de cometa con una cabeza brillante y una cola; por el contrario, las células que contienen un ADN sin lesión, aparecen con un núcleo intacto y sin cola (Patton y cols., 1999).

De 1 000 a 5 000 células se mezclaron con 100  $\mu$ l de agarosa bajo punto de fusión al 0,5% y después, se colocaron en láminas portaobjetos previamente cubiertas con una fina capa de agarosa; inmediatamente la suspensión celular se tapó con cubreobjetos y se dejaron en reposo a 4°C por 10 minutos para permitir la solidificación del gel. Luego de removido los cubreobjetos, las láminas se cubrieron con una tercera capa de agarosa y se colocaron nuevamente a 4°C. Después de la solidificación de la última capa del gel que cubre las láminas, éstas se sumergieron durante una hora en una solución de lisis (sarcosina de sodio al 1%, cloruro de sodio (NaCl) 2,5 mol.l<sup>-1</sup>, EDTA- Na<sub>2</sub> 100 mmol.l<sup>-1</sup>, Tris 10 mmol.l<sup>-1</sup> y tritón X-100, al 1%, pH 10,0). Posteriormente, se colocaron en una unidad de electroforesis horizontal, que contenía solución amortiguadora (EDTA-Na<sub>2</sub> 1 mmol.l<sup>-1</sup>, hidróxido de sodio (NaOH) 300 mmol.l<sup>-1</sup> pH 12,6) y allí permanecieron por 10 minutos a 4°C para permitir el desenrollamiento del ADN antes de la electroforesis, la

cual se realizó a voltaje constante de 0,25 V y a 30 mA, durante 20 minutos (Singh y cols., 1988).

Las láminas que representan el control positivo de cada uno de los individuos, estuvieron expuestas por 30 minutos a peróxido de hidrógeno  $30 \mu\text{mol.l}^{-1}$  para inducir el daño al ADN. Luego se procedió con la lisis y la electroforesis.

Después de la electroforesis, las láminas lavadas suavemente con solución amortiguadora Tris  $0,4 \text{ mol.l}^{-1}$  pH 7,5 permanecieron refrigeradas hasta su observación. Se realizó la tinción con el colorante bromuro de etidium  $20 \mu\text{g.ml}^{-1}$ . Para las observaciones se usó un microscopio de fluorescencia Zeiss West Axioskop Mc 100, equipado con filtro de excitación de 515 y emisión de 560 nm. La migración del ADN se determinó por medición de la longitud ( $\mu\text{m}$ ) de la cola del cometa en 20 células tomadas al azar por cada lámina preparada y los cometas observados se clasificaron en cinco clases: 0; 1 ( $2 \mu\text{m}$ ); 2 ( $5 \mu\text{m}$ ); 3 ( $30 \mu\text{m}$ ) y 4 (más de  $30 \mu\text{m}$ ); donde 0 no representa daño y 4 representa la máxima lesión en el ADN (Wilson y cols., 1998).

### **Detección de daños a nivel de las membranas celulares a través de la peroxidación de lípidos**

El nivel de peroxidación de lípidos fue medido por el método fotolorimétrico, a través de la reacción del malondialdehído (MDA) con el ácido tiobarbitúrico (TBA) (Nusetti y cols., 2001). El principio de este ensayo consiste en medir la producción de uno de los principales productos de la peroxidación de lípidos, el MDA. La descomposición de los hidroperóxidos genera MDA, el cual puede reaccionar con el TBA para formar el complejo TBA-MDA-TBA que tiene un pico de absorbancia a 532-535 nm.

En tubos Eppendorf de 1,5 ml, se colocó una alícuota de la suspensión de glóbulos blancos ( $250 \mu\text{l}$ ), se llevaron a baño de María por 10 minutos, a  $37^\circ\text{C}$ , y después a un baño de hielo, adicionándoseles a cada uno  $250 \mu\text{l}$  de stock mixto frío (ácido

tricloroacético al 20%, ácido clorhídrico 1 mol.l<sup>-1</sup>) y 500 µl de TBA, al 1%. Seguidamente, los tubos se agitaron y llevaron a baño de María a 90°C, durante 10 minutos, con agitación suave y constante. Pasado este tiempo, los tubos se colocaron nuevamente en un baño de hielo por 10 minutos y posteriormente fueron centrifugados 500 g a 4°C, por 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a una celda del espectrofotómetro y se leyó la absorbancia a 532 nm. La concentración de MDA se calculó usando un estándar de MDA y fue expresado en µmoles MDA/cél (Nuseti y cols., 2001).

### **Análisis estadístico**

Para los resultados de peroxidación de membranas, glucosa y hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1c</sub>) fueron analizadas por un análisis de varianza (ANOVA) modelo I de una sola vía para analizar las diferencias de las variables, y se aplicó la prueba a posteriori de Tukey-Kramer (TK). Para los resultados de daños en el ADN de glóbulos blancos se utilizó el análisis estadístico no paramétrico Kruskal Wallis (KW) y para establecer las comparaciones, entre los diferentes grupos, se utilizó el análisis a posteriori de Dunn. Los análisis se realizaron a un nivel mínimo de confiabilidad del 95% (Sokal y Rohlf, 1979).

## RESULTADOS

### Niveles de glucosa y hemoglobina glicosilada en diabéticos controlados y no controlados e individuos sanos

Los pacientes diabéticos no controlados mostraron los niveles más altos de glucosa en sangre ( $246,83 \pm 16,50$  mg/dl), diferenciándose significativamente de los pacientes diabéticos controlados ( $112,67 \pm 15,30$  mg/dl) y de los individuos sanos ( $81,48 \pm 10,50$  mg/dl),  $p < 0,001$ ,  $F = 902,74$ . Los niveles de glucosa en sangre de los diabéticos controlados se diferenciaron significativamente de los individuos sanos,  $p < 0,001$  (Tabla 1).

Tabla 1. Niveles de glucosa en sangre (mg/dl) de diabéticos controlados y no controlados e individuos sanos, que asistieron a la Unidad de Diabetes Dra. Iris García de Mota del Hospital Especial “Dr. Julio Rodríguez”, Cumaná, estado Sucre.

Grupos	n	$\bar{\chi}$	S	F	Valor de p
Sanos	30	81,48	10,50		
DC	20	112,66	15,30	902,74	$p < 0,001$
DNC	20	246,8	16,50		

DC: diabéticos controlados, DNC: diabéticos no controlados, n: tamaño de la muestra;  $\bar{\chi}$ : media; S: error estándar; F: valor de Fisher.

En la tabla 2 se puede observar niveles de hemoglobina glicosilada de los distintos grupos estudiados. Los pacientes diabéticos no controlados exhibieron un aumento significativo de hemoglobina glicosilada ( $9,46 \pm 2,10\%$ ), diferenciándose significativamente de los pacientes diabéticos controlados ( $5,74 \pm 1,46\%$ ) y de los individuos sanos ( $5,10 \pm 1,35\%$ ),  $p < 0,001$ ,  $F = 52,82$ , ANOVA. El contenido de



hemoglobina glicosilada de los diabeticos controlados fue similar al de los individuos sanos.

Tabla 2. Niveles de hemoglobina glicosilada (%) en sangre de diabéticos controlados y no controlados e individuos sanos, que asistieron a la Unidad de Diabetes Dra. Iris García de Mota del Hospital Especial “Dr. Julio Rodríguez”, Cumaná, estado Sucre.

Grupos	n	$\bar{\chi}$	S	F	Valor de p
Sanos	30	5,00	1,35		
DC	15	5,74	1,46	52,82	p<0,001
DNC	15	9,49	2,10		

DC: diabéticos controlados, DNC: diabéticos no controlados, n: tamaño de la muestra;  $\bar{\chi}$ : media; S: error estándar; F: valor de Fisher.

### **Tipos y números de cometas inducidos en glóbulos blancos por la exposición a diferentes concentraciones de peróxido de hidrogeno en individuos sanos:**

Los glóbulos blancos de individuos sanos no expuestos a  $H_2O_2$  presentaron principalmente cometas tipo 0 ( $19,96 \pm 0,18$ ), seguido por cometas tipo 1 ( $0,33 \pm 0,18$ ). Al exponer las células a  $17 \mu\text{mol.l}^{-1} H_2O_2$ , los cometas 0 disminuyeron significativamente ( $18,82 \pm 0,65$ ) con respecto a las células no expuestas ( $p < 0,001$ , KW: 66,71), y los cometas 1 aumentaron significativamente ( $1,13 \pm 0,63$ ) con respecto a los cometas 1 de las células no expuestas ( $p < 0,001$ , KW: 64,91; Apéndice 1). Las células tratadas con  $30 \mu\text{mol.l}^{-1}$  de  $H_2O_2$  presentaron menor número de cometas tipo 0 ( $16,40 \pm 1,30$ ), aumentaron significativamente los cometas 1 ( $2,6 \pm 1,27$ ) diferenciándose estos significativamente de los expuestos a 0 y  $17 \mu\text{mol.l}^{-1} H_2O_2$  ( $p < 0,001$ , KW: 66,71 y  $p < 0,001$ , KW: 64,91 respectivamente), además aparecieron los

cometas tipo 2 ( $1 \pm 0,83$ ), (Figura 1; Apéndice 1). A partir de estos resultados se planteó la utilización de la concentración de  $30 \mu\text{mol.l}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$  como control positivo de los ensayos cometas en los glóbulos blancos de los pacientes diabéticos.

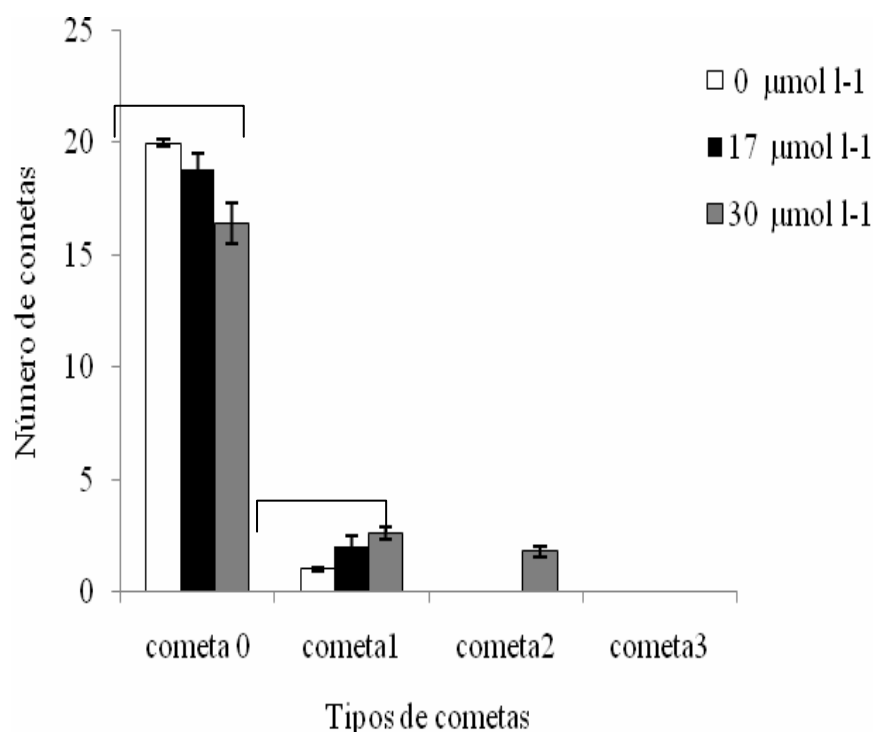


Figura 1: Tipos de cometas presentes en los glóbulos blancos de individuos sanos expuestos a concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). \* $p < 0,01$  entre las concentraciones de peróxido de hidrógeno.

### **Tipos y números de cometas inducidos en glóbulos blancos, expuestos y no a peróxido de hidrogeno: pacientes diabéticos controlados**

Los glóbulos blancos, no expuestos a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , de los pacientes diabéticos controlados presentaron cometas tipo 0 ( $5,66 \pm 2,38$ ), cometas tipo 1 ( $9,86 \pm 3,66$ ) y cometa tipo 2 ( $3,33 \pm 1,68$ ), además aparecieron los cometas tipo 3 en menor número ( $1,21 \pm 0,80$ ), diferenciándose significativamente de los cometas tipo 0, 1 y 2,  $p < 0,001$ , KW: 44,93 (Figura 2; Apéndice 2). Al exponer las células a  $30 \mu\text{mol.l}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$  la longitud de las colas aumentó significativamente, predominando los cometas 2 ( $9,33 \pm 2,52$ ) y 3

(5,60±2,26), los cometas tipo 0 (1,4±1,18) y 1 (3,93±2,05) disminuyeron significativamente con respecto a las células no expuestas a peróxido  $p < 0,001$ , KW: 83,29 (Figura 3; Apéndice 2).

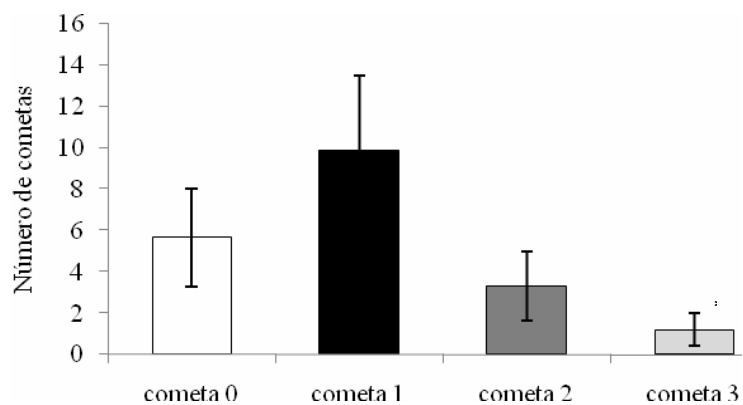


Figura 2: Tipos de cometas presentes en glóbulos blancos no expuestos a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) de pacientes diabéticos controlados. \* $p < 0,001$  con respecto a cometa 1, \*\* $p < 0,001$  respecto a cometa 2.

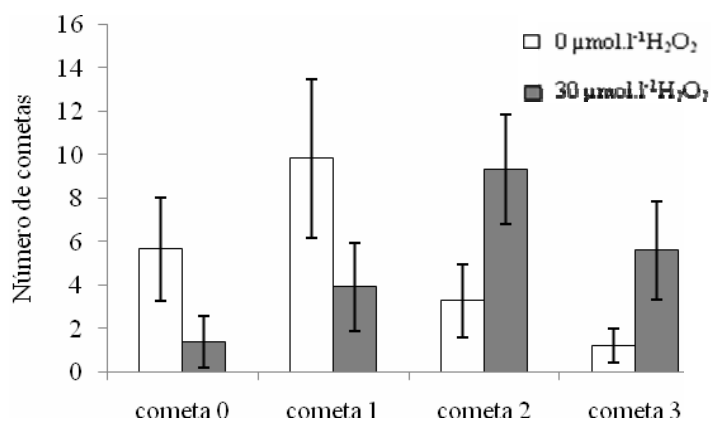


Figura 3: Tipos de cometas presentes en glóbulos blancos, expuestos a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), de pacientes diabéticos controlados. \* $p < 0,001$  con respecto al mismo tipo cometa de las células no expuestas a peróxido, \*\* $p < 0,001$  respecto a cometas tipo 0 y 1 de las células expuestas a peróxido.

### **Tipos y números de cometas inducidos en glóbulos blancos, expuestos y no a peróxido de hidrogeno: pacientes diabéticos no controlados**

Los glóbulos blancos, no expuestos a  $H_2O_2$ , de los pacientes diabéticos no controlados presentaron cometas tipo 0 ( $1,66 \pm 0,72$ ), cometa tipo 1 ( $5,28 \pm 1,26$ ), cometa tipo 2 ( $7,73 \pm 3,53$ ) y cometa tipo 3 ( $5,33 \pm 1,87$ ). Estos tres últimos tipos de cometas se diferenciaron cuantitativamente de los cometas tipo 0,  $p < 0,01$ , KW= 28,04 (Figura 4). Al exponer las células a  $30 \mu\text{mol.l}^{-1} H_2O_2$  la longitud de las colas aumentó significativamente con respecto a las células no expuestas a peróxido; no hubo cometas tipo 0, los cometas tipo 1 disminuyeron significativamente ( $1,53 \pm 0,74$ ), los cometas tipo 2 permanecieron similares ( $7,07 \pm 2,85$ ) y los cometas tipo 3 aumentaron significativamente ( $12,4 \pm 3,58$ )  $p < 0,01$ , KW: 58,43 (Figura 5; Apéndice 3).

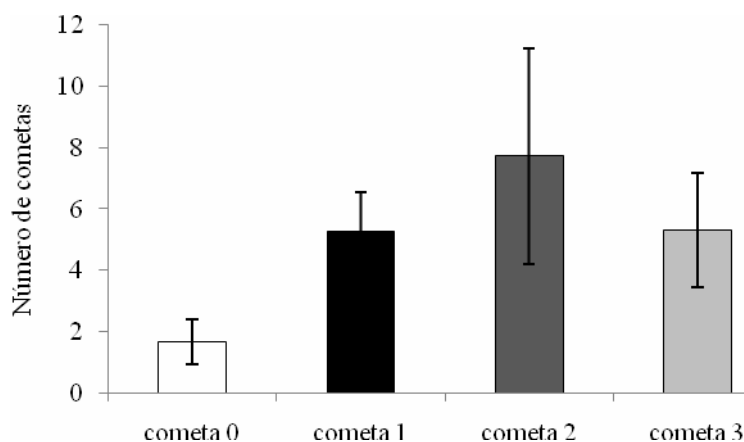


Figura 4: Tipos de cometas presentes en glóbulos blancos no expuestos a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) de pacientes diabéticos no controlados. \* $p < 0,001$  respecto a cometas tipo 0.

### **Daños en el ADN de los glóbulos blancos no expuestos a peróxido de hidrogeno de individuos sanos, pacientes diabéticos controlados y no controlados**

Los glóbulos blancos no expuestos a peróxido de hidrógeno (Figura 6), de los individuos sanos, presentaron la mayor cantidad de cometas tipo 0 ( $19,96 \pm 0,18$ ) diferenciándose significativamente de los obtenidos por los diabéticos controlados ( $5,66 \pm 2,38$ ) y diabéticos no controlados, con la menor cantidad de cometas, ( $1,66 \pm 0,72$ ).

Entre los grupos de diabéticos hubo diferencias significativas  $p < 0,001$ , KW: 54,70 (Apéndice 4). Los cometas tipo 1 predominaron en los diabéticos controlados ( $9,86 \pm 3,66$ ), seguido por los diabéticos no controlados ( $5,28 \pm 1,26$ ) y luego por los individuos sanos ( $0,33 \pm 0,18$ )  $p < 0,01$ , KW: 37,63. Los diabéticos no controlados mostraron la mayor cantidad de cometas tipo 2 ( $7,73 \pm 3,53$ ), seguido por los diabéticos controlados ( $3,33 \pm 1,67$ ) y los individuos sanos no presentaron estas cometas,  $p < 0,01$ , KW: 34,22. Los diabéticos no controlados exhibieron la mayor cantidad de cometa tipo 3 ( $5,33 \pm 1,87$ ), luego los diabéticos controlados ( $1,21 \pm 0,89$ ); no se evidenció la presencia de estas cometas en individuos sanos  $p < 0,01$ , KW: 37,07 (Apéndice 4).

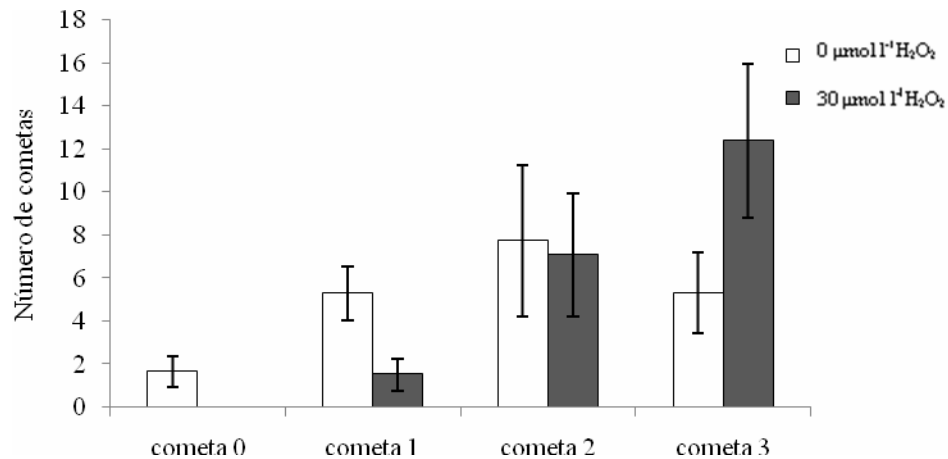


Figura 5: Tipos de cometas presentes en glóbulos blancos, expuestos a peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), de pacientes diabéticos no controlados.  $*p < 0,001$  con respecto al mismo tipo cometa de las células no expuestas a peróxido,  $**p < 0,001$  respecto a cometa 0 y 1 de las células expuestas a peróxido.

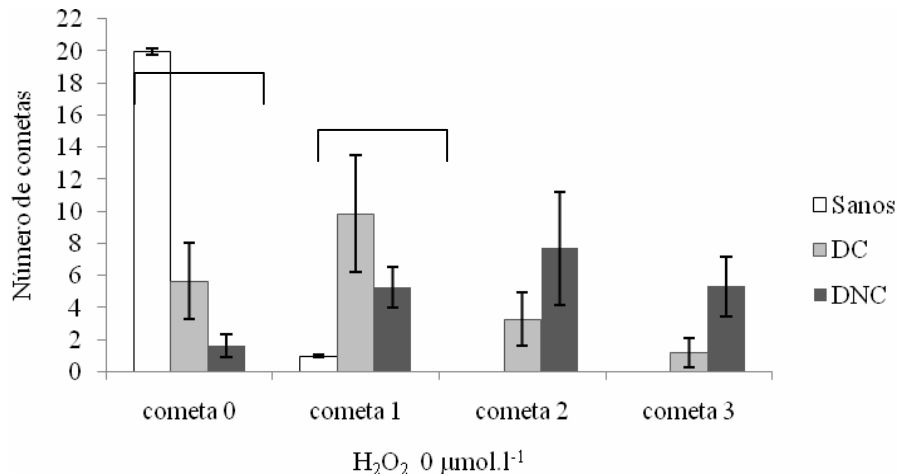


Figura 6: Daño oxidativo del ADN en glóbulos blancos, no expuestos a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), de los distintos grupos. \* $p < 0,01$  entre los grupos en estudio.

### **Daños en el ADN de los glóbulos blancos expuestos a una dosis de peróxido de hidrógeno de individuos sanos, pacientes diabéticos controlados y no controlados**

Los glóbulos blancos, expuestos a  $30 \mu\text{mol.l}^{-1}$  de peróxido de hidrógeno (Figura 7), de los individuos sanos presentaron la mayor cantidad de cometas tipo 0 ( $16,40 \pm 1,30$ ), seguido por los diabéticos controlados ( $1,40 \pm 1,18$ )  $p < 0,000$ , KW: 50,22; los diabéticos no controlados no presentaron este tipo de cometa. Los individuos sanos, los diabéticos controlados y no controlados presentaron cantidades similares de cometas tipo 1. Los diabéticos controlados y no controlados mostraron cometas tipo 2 ( $9,33 \pm 2,53$ ;  $7,07 \pm 2,86$ ) diferenciándose significativamente de los individuos sanos con la menor cantidad ( $1,03 \pm 0,83$ )  $p < 0,01$ , KW: 44,51. Los individuos sanos no presentaron cometa tipo 3, los diabéticos no controlados mostraron la mayor cantidad ( $12,4 \pm 3,58$ ), en comparación con los diabéticos controlados ( $5,60 \pm 2,26$ )  $p < 0,01$ , KW: 39,96 (Apéndice 5).

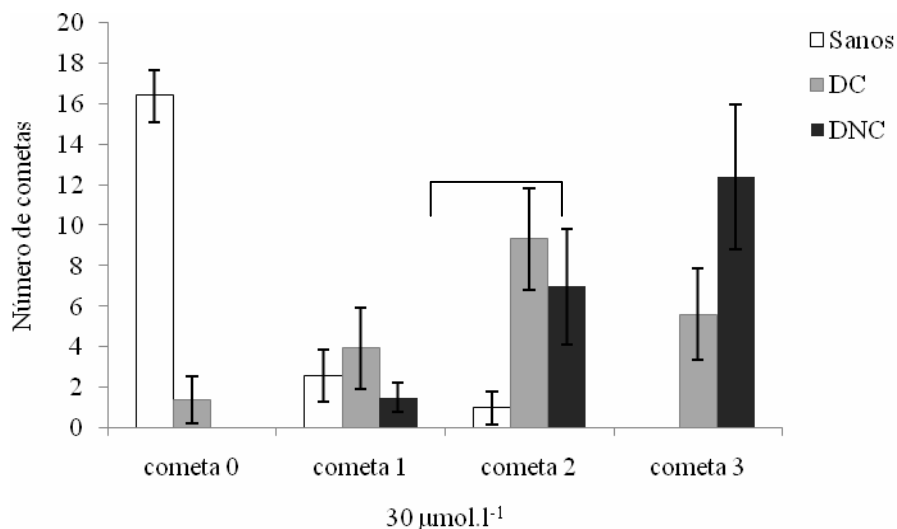


Figura 7: Daño oxidativo del ADN en glóbulos blancos, expuestos a una dosis de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), de los distintos grupos. \* $p < 0,01$  entre los grupos en estudio.

#### **Peroxidación de membranas lipídicas en globulos blancos de individuos sanos, diabeticos controlados y diabeticos no controlados**

Los niveles de MDA (nmoles MDA/cél) en los diabeticos controlados no presentaron diferencia significativa ( $0,08 \pm 0,02$ ) con respecto a los individuos sanos ( $0,07 \pm 0,03$ ). Sin embargo, los diabeticos no controlados presentaron un aumento significativo ( $0,12 \pm 0,03$ ) diferenciandose de los pacientes diabéticos controlados y de los individuos sanos,  $p < 0,001$ ,  $F = 13,98$  (Figura 8).

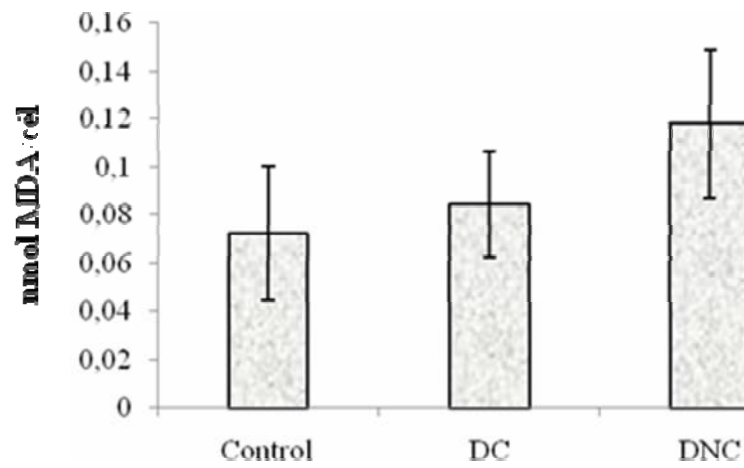


Figura 8: Niveles de malondialdehído en glóbulos blancos de individuos sanos, diabéticos controlados (DC) y no controlados (DNC). \* $p < 0,05$  con respecto al control y diabéticos controlados DC.



## DISCUSIÓN

En la actualidad existen evidencias sobre el incremento del estrés oxidativo en los diabéticos, debido a un aumento en la producción de ERO y a una disminución en la eficiencia de las defensas antioxidantes (Maritim y cols., 2003; Ramos y cols., 2006). En el presente estudio se demuestran daños oxidativos en la molécula de ADN y peroxidación de lípidos en los glóbulos blancos de dos subgrupos de pacientes con DM 2 (un grupo de pacientes controlados y el otro grupo no controlado), los resultados sugieren daños oxidativos diferenciales entre los grupos en estudio, manifestándose el mayor daño en los diabéticos no controlados. Presumiblemente, la capacidad antioxidante está disminuida con respecto a los controles, pero la deficiencia antioxidante parece ser más marcada en los diabéticos no controlados.

El ensayo cometa evidenció mayor fragmentación del ADN en los glóbulos blancos de los DM 2, en comparación a los individuos sanos, y esta lesión es mayor en los DM 2 con pobre control glicémico. Los pacientes con DM 2, especialmente los no controlados, presentan mayor daño en el ADN, acompañado con un incremento de la peroxidación lípídica, lo que indica un incremento del estrés oxidativo (Figuras 6, 7, 8). Los pacientes no controlados manifestaron hiperglicemia crónica y aumentos significativos HbA<sub>1c</sub>, los cuales son factores que promueven el desarrollo de alteraciones oxidativas (Dincer y Akcay, 2003; Díaz, 2006).

Previos estudios han demostrado que la hiperglicemia crónica genera un aumento en la producción del O<sub>2</sub><sup>•</sup> en plasma y en glóbulos blancos de pacientes diabéticos; la exposición prolongada a este radical puede alterar la estructura y función de las macromoléculas y de las células (Maritim y cols., 2003; Kurtul, 2005). En linfocitos y en polimorfonucleares de pacientes con DM 1 y DM 2 con mal control glicémico, y en linfocitos de ratas diabéticas se ha reportado una mayor vulnerabilidad al daño oxidativo del ADN debido al incremento en la generación de RL inducido por la hiperglicemia crónica (Anderson y cols., 1998; Collins y cols., 1998; Pitozzi y cols., 2003; Ortiz y

Zinzato, 2007).

Los experimentos *in vitro*, de exposición de las células a una dosis de peróxido de hidrogeno, mostraron mayor daño oxidativo en el ADN de los pacientes no controlados, en comparación a los controlados e individuos sanos (Figura 7). Estos resultados son indicativos de anomalías en los sistemas de defensa antioxidante de los glóbulos blancos de estos pacientes. En plasma, eritrocitos y glóbulos blancos de DM 1 se ha encontrado una disminución en la actividad de enzimas antioxidantes; tales como la superóxido dismutasa, glutatona peroxidasa y catalasa (Dincer y Akcay, 2003). La alteración de estas enzimas se ha atribuido principalmente a una desactivación por glicosilación no enzimática (Akkus y Kalak, 1996; Muchova y Liplakova, 1999; Kurtul, 2005). La pérdida funcional de estas enzimas permite la acumulación del  $O_2^{\bullet}$  y  $H_2O_2$ , el último puede reaccionar con metales de transición como el cobre y el hierro, a través de reacciones de Fenton, y generar al  $OH^{\bullet}$ , considerado como uno de los radicales más reactivos capaces de atravesar membranas celulares y oxidar a proteínas, ADN y lípidos (Ceriello, 2005).

Los mecanismos inductores de oxidaciones en el ADN por los RL son múltiples. La modificación oxidativa de esta macromolécula es consecuencia de la interacción con especies reactivas oxidantes, tales como el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno, el oxígeno singlete, el radical hidroxilo y su forma protonada, el radical hidroperóxido. Uno de los mecanismos más propuestos consiste en que el radical superóxido puede remover al hierro de proteínas ricas en cluster de hierro-sulfuro (abundantes en el núcleo), el metal liberado puede unirse al ADN, reaccionar con el  $H_2O_2$  y generar al  $OH^{\bullet}$ , responsable de mediar la oxidación sitio específico del ADN (Jackson, 2001; Cooke y cols., 2003). Las alteraciones que se pueden inducir incluyen: modificación química de las bases y los azúcares, pérdida de bases, ruptura de las cadenas y/o trastornos estructurales, incluyendo aberraciones cromosómicas o pérdida parcial o total de determinados cromosomas (Cooke y cols., 2003).

El radical  $OH^{\bullet}$  reacciona con el ADN, a través de la adición de dobles enlaces a

las bases del ADN y por la sustracción de átomos de hidrógeno del grupo metilo de la timina y de cada enlace C-H de la 2' desoxirribosa. El radical hidroxilo puede adicionar hidrógenos en los dobles enlaces de la timina y citosina a nivel de los carbonos C-5 y C-6, o bien sustraerlos del grupo metilo. Ello dará lugar a una serie de productos activados, oxidantes los primeros y reductores los segundos, de mayor o menor estabilidad. La oxidación de la timidina y citosina genera una variedad de productos, entre los cuales están la timidina glycol, 5-hidroximetiluracil, citosina glycol y uracil (consecuencias mutagénicas). Las bases púricas se pueden oxidar en distintos lugares, en las posiciones de los carbonos C-4, C-5, C-8 generando productos hidroxilados y desaminados, tales como 8-hidroxiguanina (8-OH-Gua), 8-hidroxiadenina (8-OH-A), 2,6 diamino-4-hidroxi-5-formamidopyrimidina (FapyGua) y otras bases modificadas (Tudek y cols., 2010).

Estudios recientes han utilizado la cuantificación de 8-OH-Gd y el ensayo cometa como marcadores de estrés oxidativo en pacientes y ratas con padecimientos de diabetes. En orina y en glóbulos blancos de pacientes DM 1 y 2 y en diferentes tejidos de ratas diabéticas, se han encontrado alterados estos parámetros y se ha asociado con el mal control glicémico y la presencia de complicaciones secundarias propias de la enfermedad (Hinokio y cols., 1999; Pitozzi y cols., 2003; Cunha y cols., 2008).

Los niveles elevados de 8-oxodG en pacientes diabéticos se ha atribuido a la elevada producción de RL por la hiperglicemia y a una disminución en la capacidad de reparación del ADN, ya que los valores reflejan la velocidad de su generación y reparación (Simone y cols., 2008). En relación al presente estudio, es probable que el incremento en el rompimiento en las hebras del ADN en los pacientes diabéticos, sobre todo los diabéticos no controlados, esté relacionado, al menos parcialmente, con una disminución en la capacidad de reparación del ADN. Simone y cols. (2008) evidenciaron la disminución en la expresión de la enzima 8-oxoG-ADN glicosilasa (OGG1) y aumento de 8-oxodG en células de riñón de ratas diabéticas. La deficiencia de la enzima puede comprometer la habilidad de las células de reparar al ADN, y en

consecuencia generar mutaciones. Hasta los momentos existe una limitada información sobre los mecanismos de reparación de ADN en pacientes diabéticos.

En relación a los niveles de MDA y su asociación con alteraciones génicas en los leucocitos de los grupos bajo estudio, se evidenció que los diabéticos controlados presentaron valores similares de MDA a los obtenidos por los individuos sanos, pero mayor daño en el ADN. Aparentemente, el tratamiento para el control glicémico no fue lo suficientemente efectivo para prevenir el efecto de la patogénesis oxidativa de la diabetes, especialmente a nivel del ADN. Más aún, los pacientes diabéticos no controlados presentaron altos niveles de MDA y mayor daño en el ADN, en comparación a los individuos sanos. Este producto de peroxidación de lípidos propaga el proceso oxidativo causando daños a las estructuras membranosas y al ADN (Koh y cols., 1997; Cunha y cols., 2008).

Los productos de peroxidación de los ácidos grasos insaturados también juegan un papel importante en la oxidación del ADN, en la inducción de daños cromosómicos, disfunción celular y cáncer (Cunha y cols., 2008). Durante la peroxidación de los lípidos de las membranas biológicas se producen diversas especies reactivas como hidroperóxidos y compuestos carbonilos capaces de reaccionar con el ADN y otros componentes celulares. La descomposición de hidroperóxidos mediados a través de reacciones con metales de transición genera productos más tóxicos, tales como alkoxy radical ( $RO^{\bullet}$ ), peroxil radical ( $ROO^{\bullet}$ ) y aldehídos, incluyendo malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (HNE). Estos productos presentan mayor estabilidad que el  $OH^{\bullet}$  (vida media de nanosegundos), por lo tanto, su acción citotóxica es más prolongada. Los aldehídos pueden formar aductos con el ADN favoreciendo el rompimiento de las hebras, enlaces cruzados entre ADN-ADN y ADN-proteínas (Tudek y cols., 2010).

Está claro que la alteración de forma individual o colectiva en la función de cualquiera de las macromoléculas, proteínas (moléculas ejecutoras de una infinidad de funciones celulares), lípidos (esenciales para el mantenimiento de la viabilidad celular) y

los ácidos nucleicos (portadoras de la información de todas estas funciones), sea suficiente para inducir trastornos importantes en la viabilidad y función de los sistemas biológicos (Maritim y col., 2003). Varios estudios han reportado que la inmunidad está alterada en los pacientes con DM. En estos pacientes se ha evidenciado una alteración en la función y metabolismo de los neutrófilos y linfocitos, sobre todo en aquellos con mal control glicémico, lo que contribuye a la elevada incidencia y severidad de infecciones. Los cambios observados en los neutrófilos incluyen alteraciones en la adhesión al endotelio y migración al sitio de inflamación, actividad bactericida y fagocitosis. En cuanto a los linfocitos, en pacientes con DM 2 se ha detectado una marcada reducción en plasma de las inmunoglobulinas (Otton y cols., 2004; Martin y cols., 2003; Alba-Loveiro y cols., 2006).

Para finalizar, los glóbulos blancos del grupo de diabéticos estudiados presentaron mayor daño oxidativo y aumento de la susceptibilidad al mutágeno  $H_2O_2$  en el ADN, y peroxidación de membranas. La modificación de estas macromoléculas afecta las funciones de estas células y por ende la capacidad de reconocer y eliminar a los microorganismos. Un sistema inmunológico suprimido genera infecciones severas y recurrentes, lo que origina disminución drástica en la calidad de vida de estos pacientes y de sus familias. En el orden social, pueden surgir impactos de salud pública si los pacientes diabéticos no son debidamente tratados, esto representaría la posibilidad de aumento de enfermedades inmunológicas a medida que crece la población con daños en el ADN. Sería interesante considerar la posibilidad de un tratamiento a los pacientes con alimentos y medicamentos en dosis adecuadas de antioxidantes y suplementos de alta calidad para fortalecer su sistema inmunológico.

## CONCLUSIONES

El ADN de los glóbulos blancos de los pacientes diabéticos, que conformaron este estudio, presenta daño oxidativo.

El mal control glicémico en los pacientes diabéticos se asoció con un mayor daño oxidativo, tanto en el ADN como en los lípidos de membrana de los glóbulos blancos.

El ADN de los glóbulos blancos de los pacientes diabéticos con mal control glicémico exhibe mayor sensibilidad al efecto tóxico de un agente prooxidante.

El mayor grado de estrés oxidativo detectado en los pacientes diabéticos con un pobre control glicémico puede agravar las complicaciones propias de la enfermedad.

Los pacientes diabéticos no controlados pueden presentar enfermedades inmunológicas, debido al daño oxidativo del ADN y lípidos de membrana en los glóbulos blancos. Estas biomoléculas son fundamentales para el adecuado funcionamiento y metabolismo celular.

## BIBLIOGRAFÍA

Aira, M. y Díaz, O. 1999. Productos de la glicosilación avanzada y diabetes mellitus. Rev. Cubana Endocrinol., 10: 57-64.

Akkus, I. y Kalak, S. 1996. Leukocyte LPO, superoxide dismutase glutathione peroxidase and serum ad leukocyte vitamin C levels of patients with type II. Diabetes mellitus. Clin. Chem. Act., 224: 221-227.

Alba-Loveiro, T.; Hirabara, M. y Mendoca, L. 2006. Marked change in function and metabolism of rat neutrophils. J. Endocrinol., 188: 295-303.

Anderson, D.; Yu, T. y Wright, J. 1998. An examination of DNA ghand Breakage in the cometa assay and antioxidants capacity in diabetic patients. Issues, 1-2: 151-161.

Annstrong, D.; Abdella, N.; Salman, A.; Miller, N.; Rahman, E. y Byjanryzk, M. 1992. Relationship of lipid peroxides to diabetic complications. Comparison with conventional laboratory tests. J. Diab. Com., 6: 116-2.

Augustin, A.; Breipohl, W.; Boker, T.; Lutz, J. y Spitznas, M. 1993. Increased lipid peroxide levels and myeloperoxidase activity in the vitreous of patients suffering from proliferative diabetic retinopathy. Grae. Arch. Clin. Exp. Ophtalmol., 231: 647-650.

Barr, R.; Nathan, D.; Meigs, J. y Singer, D. 2002. Tests of glicemia for the diagnosis of type 2 diabetes mellitus. Ann. Intern. Med., 137(4): 263-272.

Baynes, J. y Thorpe, S. 1999. Perspectives in Diabetes. Role of Oxidative Stress in Diabetic Complications. A New Perspective on an Old Paradigm. Diabetes, 48: 1-10.

Ceriello, A. 2005. Postprandial hyperglycemia and diabetes complications. Diabetes, 54: 1-2.

Clahsen, P.; Moison, R.; Holtzer, C. y Berger, H. 1992. Recycling glutathione during oxidative stress in erythrocytes of the newborn. Pediatr. Res., 32: 399-402.

Clapés, S.; Torres, O.; Companioni, M.; Villariño, U.; Broche, F. y Céspedes, E. 2001. Peroxidación lipídica y otros indicadores de estrés oxidativo en pacientes diabéticos. Rev. Cubana Invest. Biomed., 20: 93-98.

Coll, E. 1997. Tratamiento actual de la diabetes mellitus no insulino-dependiente (tipo II). Avances contra la diabetes. Boletín de la Federación Bolivariana de Educación Diabetológica. Año IV, Vol. 1.

Collins, A.; Raslova, K.; Somorouska, M. y Petrovska, H. 1998. DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. Free Radic. Biol. Med., 25(3): 337-347.

Cooke, M.; Evans, M.; Dizdaroglu, M. y Lunec, J. 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB J., 17: 1195-1214.

Cunha, J.; Jolival, C.; Ramos, K.; Gregory, J.; Calcutt, N. y Mizisin, A. 2008. Elevated lipid peroxidation and dna oxidation in nerve from diabetic rats: effects of aldose reductase inhibition, insulin and neurotrophic factors. Metabolism, 57(7): 873-881.

Curcio, F.; Pegoraro, L.; Dello-Russo, P.; Falleti, E.; Perrella, G. y Ceriello, A. 1995. SOD and GSH inhibit the high glucose-induced damage and the PDGF increased secretion in cultured human endothelial cells. Thromb. Haemost., 74: 969-973.



Dandona, P.; Thusu, K.; Cook, S.; Snyder, B.; Makowski, J.; Armstrong, D. y Nicotera, D. 1996. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. Lancet, 347: 444-445.

Díaz, D. 2006. Hiperglicemia y estrés oxidativo en pacientes diabéticos. Rev. Cubana Invest. Biomed., 25: 3.

Dincer, Y. y Akcay, T. 2003. DNA damage and antioxidant defense in peripheral leukocytes of patients with type I diabetes mellitus. Department of Biochemical. Mutat. Resear., 527(1-2): 49-55.

Feldman, E. 2003. Oxidative stress and diabetic neuropathy: a new understanding of an old problema. J. Clin. Invest., 111: 431-433.

Fichbach, F. 1997. Manual de pruebas diagnósticas. Quinta edición. McGraw- Hill Interamerica, México.

Flecha, F.; Castello, P.; Gagliardino, J. y Rossi, J. 2000. La glucosilación no enzimática de proteínas. Mecanismo y papel de la reacción en la diabetes y el envejecimiento. Ciencia al Día Internacional, 3(2): 1-17.

Goldstein, D. y Little, R. 1994. More than you ever want ed to know (but need to know) about glycohemog lobin testing. Diabetes Care, 17: 938-939.

Gugliucci, J. 2000. Glycation as the glucose link to diabetic complications. JAOA, 100(10): 621-634.

Hernández, F.; Rabelo, A.; García, L. y García, V. 2000. Morbilidad oculta por diabetes mellitus no insulino dependiente y tolerancia a la glucosa alterada. Rev. Cubana

Med. Gen. Integr., 16(5): 480-4.

Hinokio, Y.; Suzuki, S.; Hirai, M.; Chiba, M. y Toyota, T. 1999. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus: its association with diabetic complications. Diabetología, 42: 995-998.

Jackson, L. 2001. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutation in cancer. Mutat. Resear., 47: 7-21.

Kakkar, R.; Kaira, J. y Mantha, S. 1995. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. Mol. Cell. Biochem., 151: 113-119.

Koh, Y.; Yoon, S. y Park, J. 1997. Lipid peroxidation product-mediated DNA damage and mutagenicity. J. Biochem. Mol. Biol., 30(3): 188-193.

Kurtul, N. 2005. Leukocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase and catalase activity of type diabetic patients with retinopathy. Act. Med. (Hradec Králove), 48(1): 35-38.

Mamposo-Solano, M.; León, O.; Licea, M.; Pérez, B. y Castillo, R. 1999. Especies reactivas de oxígeno en la diabetes mellitus con retinopatía diabética y sin ella. Rev. Cubana Endocrinol., 10(1): 8-15.

Maritim, R.; Sanders, A. y Watkins, J. 2003. Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. J. Biochem. Mol. Toxicol., 17: 24-38.

Martín, C.; Valles, M. y Albarrán, M. 2003. Frecuencia de infecciones en diabetes mellitus tipo 2. Rev. Semg., 52: 197-199.

Mc Kenszie, S. 1996. Hematología Clínica. Segunda edición. El manual Moderno S.A. México.

Mojena, N.; Hernández, A.; Rosales, E.; Crespo-Valdés, N. y Roura, J. 2002. Diabetes mellitus e hipertensión. Estudio en el nivel primario de salud. Rev. Cubana Med. Gen. Integr., 5: 12.

Mozaffarieh, M.; Schoetzau, A. y Sauter, M. 2008. Comet assay analysis of single-stranded DNA breaks in circulating leukocytes of glaucoma patients. Molec. Visión, 14: 1584-1588.

Muchova, J. y Liplakova, A. 1999. Antioxidants systems in polimorphonucler leukocytes of type 2 diabetic mellitus. Diabet. Med., 16(1): 74-78.

Murakami, K.; Kondo, T.; Ohtsuka, Y.; Fujiwara, Y.; Shimada, M. y Kawakami, Y. 1989. Impairment of glutathione metabolism in erythrocytes from patients with diabetes mellitus. Metabolism, 38: 753-758.

Nusetti, O.; Esclapez, M.; Salazar, G.; Nusetti, S. y Pulido, S. 2001. Biomarkers of oxidative stress in the Polychaete Eurythoe complanata (Amphinomidae) under short term copper exposure. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 66: 576-581.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2000. Bioética. Principios éticos para las investigaciones en seres humanos. Publicación Científica. OPS-OMS., 407-420.

Ortiz, P. y Zinzato, Y. 2007. Evaluación of levels of DNA damage in blood leukocytes of non-diabetic rat exposed to cigarette smoke. Mutat. Resear., 628: 117-122.

Otton, R.; Sorano, G. y Verlengia, R. 2004. Diabetes induces apoptosis in lymphocytes. J. Endocrinol., 182:145-156.

Patton, W.; Chakravarthy, U.; Davies, J. y Archer, D. 1999. Comet assay of uv-induced DNA damage in retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 40: 3268-3275.

Pitozzi, V.; Giovannelli, L. y Bardeni, G. 2003. Oxidative DNA damage in periferal blood cells in type 2 diabetes mellitus: higher vulneravility of polymorphonuclear leukocytes. *Mutat. Resear.*, 259(1-2): 129-133.

Ramalho, A.; Sinjevaric, I. y Natarajan, A. 1988. Use of the frequency of micronuclei as quantitative indicator of X ray induced chromosomal aberration in human peripheral blood lymphocytes. Comparison of two methods. *Mutat. Resear.*, 207: 141-146.

Ramos, M.; Batista, C.; Gómez, B. y Zamora, A. 2006. Diabetes, estrés oxidativo y antioxidants. *Invest. Sal.*, 8(1): 7-13.

Rosado, J. y Mendoza, V. 2007. Inflamación crónica y estrés oxidativo en la diabetes Mellitus. *Bioquimia*, 32:58-69.

Simone, S.; Gorin, Y.; Velagapudi, C.; Abboud, H. y Habib, S. 2008. Mechanism of ixidative DNA damage in diabetes. *Diabetes*, 57: 2626-2636.  
184-191.

Singh, N.; McCoy, M.; Tice, R. y Schneider, E. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individuals cells. *Exp. Cell. Res.*, 175:184-191.

Sokal, R. y Rohlf, F. 1979. Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. H. Blume. Ediciones Madrid.

Temelkora-Kurktschier, T. y Hanefeld, M. 2004. The lipid triad in type 2 diabetes-prevalence and relevance of hipertriglyceridaemia llow high- density lipoprotein syndrome in type 2 diabetes. Exp. Clin. Endocrinol. Diab., 25: 22-28.

Trinder, P. 1969. Determination of glucose in blood using oxidase with on alternate oxygen acceptor. Am. Clin. Biochem., 6: 24-27.

Tudek, B.; Winczura, A.; Janik, J. Agnieszka, S.; Foksinski, M. y Olinski, R. 2010. Involvement of oxidatively damage DNA and repair in cancer development and aging. Am. J. Transl. Res., 2(3): 254-284.

Wilson, J.; Pascoe, P.; Parry, J. y Dixon, D. 1998. Evaluating of the comet assay as a method for detection of DNA damage in the cells of marine invertebrate *Mytilus edulis* (Mollusca: Pelecypoda). Mutat. Resear., 399: 87-95.

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### 1.- Datos personales del paciente:

Fecha: Paciente N°:  
Nombres: Apellidos:  
Edad: C.I.:  
Dirección:  
Telf.:

#### 2.- Datos clínicos:

- ¿Primera consulta? Si: No:
- ¿Hace cuanto tiempo le diagnosticaron diabetes?  
Esta tratado? ¿Cual es el tratamiento? Vitaminas:
- ¿Lleva un control regular?  
Semanal: Mensual: Semestral: Anual:  
Nunca:
- ¿Además de ser diabético padece de otra enfermedad?  
Si: No: ¿Cual es la enfermedad?
- En su ultimo chequeo medico cuales fueron los valores de:  
Glicemia: Hemoglobina glicosilada:
- ¿Presenta hiperlipidemia? Si: No: ¿Desde cuando?  
Esta tratado? Si: No: Diga con qué?

## ANEXO 2

### Consentimiento válido

Bajo la coordinación de Dra. Sonia Nusetti se está realizando el proyecto de investigación titulado: DAÑO DE ADN Y LÍPIDOS DE MEMBRANA DE GLÓBULOS BLANCOS EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO-2 QUE ASISTEN A LA UNIDAD DE DIABETES DEL HOSPITAL ESPECIAL “DR. JULIO RODRIQUEZ”. CUMANÁ, ESTADO SUCRE.

Yo: \_\_\_\_\_

CI:

Nacionalidad:

Estado Civil:

Domiciliado en:

Siendo mayor de 18 años, en uso pleno de mis facultades mentales y sin que medie coacción, ni violencia alguna, en completo conocimiento de la naturaleza, forma, duración, propósito, inconveniente y riesgo relacionados con el estudio indicado, declaro mediante el presente:

1.-Haber sido informado(a) de manera clara y sencilla por parte del grupo de investigadores de este proyecto de todos los aspectos relacionados con el proyecto de investigación titulado: DAÑO DE ADN Y LÍPIDOS DE MEMBRANA DE GLÓBULOS BLANCOS EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2.

2.-Tener conocimiento claro que el objetivo del trabajo es: evaluar la susceptibilidad a daños oxidativos del ADN y lípidos de membranas en los glóbulos

blancos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 que acuden a la Unidad de Diabet Hospital Especial “Dr. Julio Rodríguez”, Cumaná, estado Sucre.

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

4.-Que las muestras de sangre que acepto donar serán utilizadas única y exclusivamente para el proyecto de investigación titulado: DAÑO DE ADN Y LÍPIDOS DE MEMBRANA DE GLÓBULOS BLANCOS EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2.

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

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

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

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



## **DECLARACIÓN DEL VOLUNTARIO**

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

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

Firma del voluntario

Nombre

Lugar

Fecha

## **DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR**

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

## APÉNDICE 1

Resumen estadístico de la prueba Kruskal-Wallis para los cometas 0, 1 y 2 presentes en glóbulos blancos expuestos a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno en individuos sanos.

Cometa	Peróxido de hidrógeno ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )	n	$\bar{\chi}$	SD	$M_e$	Min	Max	Kw
0	0	30	19,96	0,18	20	19	20	66,71
	17	30	18,82	0,65	19	17	20	
	30	30	16,40	1,24	17	15	19	
1	0	30	0,33	0,18	0	0	1	64,91
	17	30	1,13	0,63	1	0	3	
	30	30	2,60	1,27	2	1	5	
2	0	30	0,00	0,00				
	17	30	0,00	0,00				
	30	30	1,04	0,84	1	0	3	

n: tamaño de la muestra;  $\bar{\chi}$ : media; SD: desviación estándar;  $M_e$ : mediana; Min: mínimo; Max: máximo; Kw: Kruskal-Wallis.

## APÉNDICE 2

Resumen estadístico de la prueba Kruskal-Wallis para los cometas presentes en glóbulos blancos expuestos a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno en pacientes diabéticos controlados.

Cometa	Peróxido de hidrógeno ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )		$\bar{\chi}$	SD	$M_e$	Min	Max	Kw
0	0	0	5,0	2,38	0	3	0	
	30	0	1,4	1,18	0	0	0	
1	0	0	9,87	3,66	0	6	7	
	30	0	3,93	2,05	0	0	3,28	8
2	0	0	3,33	1,67	0	0	5	
	30	0	9,33	2,52	0	5	6	1
3	0	0	1,21	0,80	0	0	0	
	30	0	5,60	2,26	0	0	0	

n: tamaño de la muestra;  $\bar{\chi}$ : media; SD: desviación estándar;  $M_e$ : mediana; Min: mínimo; Max: máximo; Kw: Kruskal-Wallis.

### APÉNDICE 3

Resumen estadístico de la prueba Kruskal-Wallis para los cometas presentes en glóbulos blancos expuestos a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno en pacientes diabéticos no controlados.

Cometa	Peróxido de hidrógeno ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )	$\chi$	D	$M_e$	Min	M ax	K w
0	0	0	1,66	0,72	2	0	5
	30	0	0,00	0,00	0	0	8,04
1	0	0	5,28	1,26	5	4	8
	30	0	1,53	0,74	2	0	2
2	0	0	7,73	3,53	8	3	1
	30	0	7,07	2,85	8	3	8,41
3	0	0	5,33	1,87	2	3	1
	30	0	1,24	3,58	1	8	2

n: tamaño de la muestra;  $\bar{x}$ : media; SD: desviación estándar;  $M_e$ : mediana; Min: mínimo; Max: máximo; Kw: Kruskal-Wallis.

## APÉNDICE 4

Resumen estadístico de la prueba Kruskal-Wallis para los cometas presentes en glóbulos blancos no expuestos a peróxido de hidrógeno en los diferentes grupos.

Grupos	Cometa	$\bar{\chi}$	SD	$M_e$	Min	Max	Kw
S	0	19,97	0,18	0	0	19	5
DC		5,67	2,38	0	0	3	4,07
DNC		1,67	0,72	0	0	0	
S	1	0,33	0,18	0	0	0	3
DC		9,87	3,67	0	0	6	7,61
DNC		5,29	1,27	0	0	4	8
S	2	0,00	0,00	0	0	0	3
DC		3,33	1,68	0	0	0	4,22
DNC		7,73	3,53	0	0	3	5
S	3	0,00	0,00	0	0	0	3
DC		1,21	0,89	0,5	0	0	7,07
C		5,33	1,88	0	0	3	0

S: individuos aparentemente sanos; DC: diabéticos controlados; DNC: diabéticos no controlados; n: tamaño de la muestra;  $\bar{\chi}$ : media; SD: desviación estándar;  $M_e$ : mediana; Min: mínimo; Max: máximo; Kw: Kruskal-Wallis.

## APÉNDICE 5

Resumen estadístico de la prueba Kruskal-Wallis para los cometas presentes en glóbulos blancos expuestos a peróxido de hidrógeno en los diferentes grupos.

Grupo	Cometa	n	$\bar{\chi}$	SD	$M_e$	Min	Max	Kw
C	S	0	16,40	1,30	7	14	8	5
	DC	0	1,40	1,18	0	0	0	0,17
	DN	0	0,00	0,00	0	0	0	0
C	S	0	2,60	1,28	0	1	0	1
	DC	1	3,93	2,05	0	0	0	5,40
	DN	0	1,53	0,74	0	0	0	0
C	S	0	1,04	0,84	0	0	0	4
	DC	2	9,33	2,53	0	5	6	4,51
	DN	0	7,07	2,87	0	3	0	0
C	S	0	0,00	0,00	0	0	0	3
	DC	3	5,60	2,26	0	0	0	9,96
	DN	0	12,40	3,58	0	8	0	0

S: individuos aparentemente sanos; DC: diabéticos controlados; DNC: diabéticos no controlados; n: tamaño de la muestra;  $\bar{\chi}$ : media; SD: desviación estándar;  $M_e$ : mediana; Min: mínimo; Max: máximo; Kw: Kruskal-Wallis.

## **HOJA DE METADATOS**



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

<b>Título</b>	DAÑO DE ADN Y LÍPIDOS DE MEMBRANA EN GLÓBULOS BLANCOS DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 QUE ASISTEN A LA UNIDAD DE DIABETES DEL HOSPITAL ESPECIAL “DR. JULIO RODRÍGUEZ”. CUMANÁ, ESTADO SUCRE
<b>Subtítulo</b>	

Autor(es)

<b>Apellidos y Nombres</b>	<b>Código CVLAC / e-mail</b>	
<b>Muñoz Martha</b>	<b>CVLAC</b>	<b>8438058</b>
	<b>e-mail</b>	<b>martha@hotmail.com</b>
	<b>e-mail</b>	

Palabras o frases claves:

<b>Manual</b>
<b>Norma</b>
<b>Procedimientos</b>
<b>Servicios estudiantiles</b>

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

### Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

### Resumen (abstract):

Se evaluó el daño oxidativo a nivel genético y lípidos de membrana en los glóbulos blancos de pacientes diabéticos no insulino dependientes, controlados y no controlados que asistieron a la Unidad de diabetes Dra. Iris García de Mota del Hospital Especial “Dr. Julio Rodríguez”, Cumaná, estado Sucre. Los pacientes fueron divididos en diabéticos controlados (DC) y diabéticos no controlados (DNC) de acuerdo al grado de control glicémico. El daño de ADN se evaluó a través de electroforesis en gel de células individuales, o ensayo cometa, el cual permite detectar lesiones en el ADN en una célula en condiciones experimentales de pH alcalino, y permite revelar la presencia de rompimiento en una simple o doble hebra del ADN en los sitios lábiles a la alcalinidad. El nivel de peroxidación de membranas (MDA) a través de la cuantificación colorimétrica de las especies reactivas con el ácido tiobarbitúrico. Los pacientes DNC presentaron el mayor daño en el ADN de los glóbulos blancos, seguidos por los DC, en comparación a los individuos sanos. Cuando los glóbulos blancos de estos pacientes fueron expuestos *in vitro* a un agente prooxidante, el ADN exhibió una alta sensibilidad al efecto tóxico de la sustancia estresante, en comparación a los individuos sanos, siendo mayor en los DNC. Los niveles de MDA (nmoles/cel) en los DNC presentaron un aumento significativo con respecto a los individuos sanos ( $0,072 \pm 0,028$  vs  $0,118 \pm 0,031$ ). Los pacientes DNC exhibieron el mayor daño del ADN en los glóbulos blancos, seguido por los DC, en comparación con los individuos sanos. Estos resultados permiten inferir que en la diabetes existe un mayor grado de estrés oxidativo causado por los radicales libres, el cual está asociado a la calidad de control glicémico. El daño de ADN y peroxidación de membrana puede disminuir las funciones de los glóbulos blancos, los cuales son importantes en proteger al organismo contra infecciones, esto constituye un factor de riesgo importante en las infecciones recurrentes y propias del paciente diabético. Además, el daño oxidativo de ADN convierte al paciente diabético, sobre todo al no controlado, a ser propenso de desarrollar mutaciones que finalmente pueden conllevar a la aparición de cáncer

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
<b>NUSETTI SONIA</b>	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	<b>11380086</b>
	e-mail	snusetti@yahoo.com
<b>NUSETTI OSMAR</b>	ROL	CA <input checked="" type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	<b>626495</b>
	e-mail	onusetti@yahoo.com
	e-mail	
<b>LEMUS MAIRIN</b>	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	<b>6429405</b>
	e-mail	mlemus88@gamail.com
<b>CAMPOS MIGUEL</b>	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	<b>5861122</b>
	e-mail	miguelcampos86@hotmail.com

Fecha de discusión y aprobación:

<b>Año</b>	<b>Mes</b>	<b>Día</b>
2011	05	23

Lenguaje: SPA \_\_\_\_\_

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

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TESIS-MUÑOZM.DOC	Aplication/word

Alcance:

Espacial:                      NACIONAL                      (Opcional)

Temporal:                      TEMPORAL                      (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciada en Bioanálisis

---

Nivel Asociado con el Trabajo: licenciada

---

Área de Estudio: Bioanálisis

---

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

UNIVERSIDAD DE ORIENTE

---

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



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
CONSEJO UNIVERSITARIO  
RECTORADO

CU N° 0975

Cumaná, 04 AGO 2009

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

Estimado Profesor Martínez:

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

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

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

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

Cordialmente,

*[Firma]*  
**JUAN A. BOLANOS CUNVELO**  
Secretario

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

JABC/YGC/marija

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

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

**Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009):**

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

  
**Martha Muñoz**  
Autor

  
**Sonia Nusetti**  
Asesor

**POR LA COMISIÓN DE TESIS:**