



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
POSTGRADO EN BIOLOGÍA APLICADA
MENCION MICROBIOLOGÍA

EVALUACIÓN DE DIABETES MELLITUS TIPO 2 CON PARÁMETROS
BIOQUÍMICOS, FACTORES GENÉTICOS E INFECCIONES POR
Staphylococcus aureus Y *Pseudomonas aeruginosa* EN
INDIVIDUOS DE CUMANÁ, ESTADO SUCRE

LCDA. NEILY RENGEL SÁNCHEZ

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE *Magister Scientiarum* EN BIOLOGÍA APLICADA
MENCION MICROBIOLOGÍA APLICADA

CUMANÁ, 2012

EVALUACIÓN DE DIABETES MELLITUS TIPO 2 CON PARÁMETROS BIOQUÍMICOS, FACTORES GENÉTICOS E INFECCIONES POR *Staphylococcus aureus* Y *Pseudomonas aeruginosa* EN INDIVIDUOS DE CUMANÁ, ESTADO SUCRE.

APROBADO POR:

Dr. Marcos De Donato
Asesor

Dra. Merlyn Vivenes
Jurado Principal

M.Sc. Hectorina Rodulfo
Jurado Principal

INDICE

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTO	II
LISTA DE TABLAS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
RESUMEN	V
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	11
MUESTRA POBLACIONAL	11
ASPECTOS ÉTICOS.....	11
RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	11
DETERMINACIÓN DEL PERFIL LIPÍDICO	12
Colesterol total	12
Triglicéridos	12
Lipoproteína de alta densidad (HDL)	13
Lipoproteína de baja densidad (LDL colesterol)	13
Lipoproteína de muy baja densidad (VLDL colesterol)	14
DETERMINACIÓN DE CREATININA (MÉTODO DE JAFFÉ).....	14
DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ÚRICO.....	14
DETERMINACIÓN DE UREA	14
DETERMINACIÓN DE GLUCOSA	15
DETERMINACIÓN DE INSULINA	15
ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS	16
Extracción del ADN genómico.....	16
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	16
Polimorfismo conformacional de hebra simple (SSCP)	17
Secuenciación	18
DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO	19
Recolección y transporte de las muestras	19

Estudio Microscópico	19
Siembra	19
Caracterización morfológica de las colonias sugestiva de <i>S. aureus</i>	20
Identificación bioquímica de <i>S. aureus</i>	20
Siembra y caracterización morfológica de las colonias sugestiva de <i>P. aeruginosa</i>	21
Identificación bioquímica de <i>P. aeruginosa</i>	23
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	24
RESULTADOS.....	25
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	42
ANEXOS	52
HOJA DE METADATOS	54

DEDICATORIA

A

Dios todopoderoso, quien me regala los dones de la sabiduría y el entendimiento.

Mis padres, que me han apoyado en todo momento y que me siguen animando día a día y en quienes he tenido un ejemplo de responsabilidad y generosidad. Gracias por sus oraciones.

Mi esposo, Jairo Cova, por su colaboración y apoyo incondicional, para así poder culminar esta investigación.

Mis hermanas, Niurka, Jenny, Isaelis y Evelyn, quienes aún en la distancia siempre han estado conmigo incentivándome en cada proyecto y que siempre me desean lo mejor.

Todas las personas que formaron parte de este estudio, así como los profesionales doctores, enfermeras y bioanalistas de la unidad de Diabetes del Hospital Dr. Julio Rodríguez, por la colaboración prestada durante todo el desarrollo de la toma de muestras.

Todos mil gracias, de todo corazón, que Dios los bendiga, porque han sido una bendición en mi vida.

AGRADECIMIENTO

A Dios, esa fuerza superior en quienes muchos no creen y se respeta, pero a ese ser que es omnipotente, quien me regala cada amanecer y por sobretodo quien me regala el entendimiento para realizar cada reto de vida.

Al Ph.D. Marcos De Donato, asesor de esta Tesis, por su continua enseñanza y estímulo en mi formación, por sus críticas para mejorar, su buen humor siempre con una sonrisa. Todo un ejemplo de entusiasmo hacia el trabajo científico.

A mis compañeras de Laboratorio: Lcda. Numirin Carreño, Lcda. María Eugenia Rodríguez y la M.Sc. Hectorina Rodulfo, por sus valiosos aportes, dedicación constante, confianza depositada en mí y porque en muchas oportunidades el tiempo transcurre muy rápidamente, pero descubres que no solo hay conocimiento, sino también hay lazos de amistad y personas de gran calidad humana. Gracias por todo.

A los profesores Antonio Maldonado, Mariolga Berrizbeitia, Militza Guzmán y Merlyn Vivenes, y a todos los docentes del Postgrado de Biología Aplicada, quienes con sus valiosos conocimientos y apreciables asesorías, han aportados grandes beneficios para la realización de esta investigación y en mi formación como profesional, que hacen de la vida un sabor especial y una experiencia enriquecedora en cada vivencia.

A las personas que han constituido la población estudiada, por su ayuda anónima.

A mis Amigos y compañeros del postgrado David Pereda, Cecilia Naranjo, Elena Marcano, Aldo Polo, Alejandra Veliz, Noris García, Yilamry González, por sus palabras de aliento, ánimo, su ayuda incondicional y por sobre todo su amistad durante la realización de esta investigación.

Este es el esfuerzo de un gran equipo de trabajo, a cada uno de ellos, Gracias.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencia de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , en pacientes con pie diabético (CPD), de acuerdo a su sexo, provenientes del Hospital “Dr. Julio Rodríguez”, de Cumaná, Estado Sucre.	25
Tabla 2. Frecuencias de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de acuerdo a los grupos etarios, en pacientes con pie diabético (CPD) provenientes del Hospital “Dr. Julio Rodríguez”, de Cumaná, Estado Sucre.	26
Tabla 3. Valores medios, desviación estándar y rango de las variables bioquímicas estudiadas en pacientes con pie diabético (CPD), sin pie diabético (SPD) y del grupo control (GC), de Cumaná, estado Sucre.	27
Tabla 4. Frecuencia de individuos con pie diabético (CPD), sin pie diabéticos (SPD) y grupo control (GC), con valores de variables bioquímicas superiores a los valores de referencias establecidos para cada variable.	28
Tabla 5. Número de individuos con los genotipos del polimorfismo Pro12Ala determinados por secuenciación y las frecuencias alélicas de Pro y Ala en los grupos estudiados de Cumaná, estado Sucre.	32
Tabla 6. Estudios poblacionales reportados en la literatura donde se han determinado las frecuencias alélicas de la variante Ala del polimorfismo Pro12Ala y se ha estudiado su asociación clínica a factores de riesgo del síndrome metabólico.	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relación de los niveles de insulina con las infecciones por <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en pacientes con pie diabético provenientes del Hospital “Dr. Julio Rodríguez”, de Cumaná, Estado Sucre.....	29
Figura 2. Amplificación por PCR de un fragmento del exón 4 del gen <i>PPARγ</i>	30
Figura 3. Gel de poliacrilamida mostrando el polimorfismo conformacional de hebras simples (SSCP) del exón 4 del gen <i>PPARγ</i> ,.....	30
Figura 4. Secuencias de los alelos encontrados en el estudio para el fragmento de 243 pb, donde se resalta el cambio del alelo Pro→Ala. La región codificante comienza en la base 132 con el codón ATG.....	31
Figura 5. Comparación del electroferograma de una secuencia heterocigota para el polimorfismo Pro12Ala del exón 4 del gen <i>PPARγ</i> con la secuencia homocigota.....	31

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la diabetes mellitus tipo 2 con respecto a los parámetros bioquímicos, factores genéticos e infecciones por *S. aureus* y *P. aeruginosa* en individuos de Cumaná, estado Sucre. Se estudiaron 100 pacientes diabéticos (50 con pie diabético (CPD) y 50 sin pie diabético (SPD)) y 100 individuos aparentemente sanos, de ambos sexos y con edades entre 40 a 70 años. A los pacientes CPD se le aplicó estudio bacteriológico para identificar *S. aureus* y *P. aeruginosa*. A todos los individuos se les determinó concentraciones de glicemia, perfil lipídico, urea, creatinina y ácido úrico empleando métodos enzimáticos, además de insulina por enzimoimmunoanálisis. Se les extrajo ADN genómico a partir de sangre con EDTA y se amplificó por PCR el exón 4 del gen *PPAR γ* que amplifica un fragmento característico de 243 pb, luego a estos productos de PCR se les aplicó la técnica de Polimorfismo Conformacional de Hebra Simple (SSCP) en condiciones no desnaturalizantes. Por otro lado, se llevó a cabo la secuenciación del producto de PCR en ocho muestras de los tres grupos de individuos en estudio. Los resultados permitieron demostrar que las infecciones por *S. aureus* y *P. aeruginosa* ocurren con la misma frecuencia (24%), de las cuales, siete pacientes (14%) presentaron infecciones por ambas especies. Además, se aislaron cepas de Enterobacterias infectando (38%) de los pacientes, cepas de otras especies grampositivas en (8%) y levaduras en (4%) de los pacientes. En cuanto al sexo y estas infecciones, se determinó mayor frecuencia de las mismas en hombres (50%), en comparación con las mujeres (26%). Los valores promedios del perfil lipídico, ácido úrico, glicemia, insulina y HOMAIR mostraron valores más bajos en los pacientes CPD al compararlos con los pacientes SPD, excepto en los valores de creatinina y urea que estuvieron elevados en ambos grupos, mientras que los triglicéridos, HDL-colesterol, urea y creatinina, mostraron diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) con respecto al grupo control, mientras que los valores de colesterol fueron significativos ($p < 0,01$). Además las dislipidemias se presentaron en el 37% de los pacientes CPD, seguido de 29% en los SPD y 32% en individuos controles. Las frecuencias para los valores de triglicérido $>150\text{mg/dl}$ en estos grupos de individuos fueron de 32%, 52% y 18% respectivamente, así como la frecuencia de HDL colesterol $\geq 35\text{ mg/dl}$, en 54%, 18% y 17%. Sin embargo, los controles presentaron dislipidemias, su riesgo cardiovascular se encontró dentro del rango normal, mientras que tanto los individuos CPD como los SPD mostraron valores de 4,4 y 4,0; respectivamente. Por otro lado, se evidenció disminución en las infecciones de *P. aeruginosa* en pacientes CPD con altos niveles de insulina, mientras que las infecciones por *S. aureus* no se afectaron por esta hormona. Finalmente, los diabéticos tipo 2 evaluados en esta investigación se caracterizaron por presentar dislipidemias, aumento de glicemia, insulina y HOMAIR. La PCR amplificó el fragmento característico de *PPAR γ* , no obstante, la técnica de SSCP, no permitió detectar variantes alélicas del gen presentes en la población evaluada, el uso de la secuenciación permitió la detección del polimorfismo Pro12Ala del exón 4 del gen *PPAR γ* con una frecuencia alélica de 2,08%, demostrando ser la técnica definitiva para evaluar variantes alélicas de este gen en la población evaluada de la ciudad de Cumaná.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad endocrina crónica y compleja que se caracteriza por deficiencia absoluta o relativa de insulina, hiperglicemia crónica y otras alteraciones del metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas; que puede originar múltiples complicaciones microvasculares en los ojos, el riñón y las extremidades inferiores, así como neuropatías periféricas y, frecuentemente, lesiones macrovasculares y coronarias (López y López, 1998).

La DM es clasificada en dos tipos: la diabetes tipo 1, frecuentemente encontrada en pacientes jóvenes e insulino pénicos. Este tipo de diabetes está asociada a factores genéticos, ambientales y autoinmunes, con frecuencia los pacientes presentan anticuerpos antiisletos. Sin embargo, en la DM tipo 2, los pacientes pueden ser obesos o no, en esta el factor hereditario (autosómico dominante) ha sido más evidente, puede aparecer a cualquier edad, está asociada a factores ambientales y obesidad, como factor diferencial de la DM tipo 1 y no es dependiente de insulina (Groop, 2000; American diabetes association, 2008).

La DM tipo 2 ha sido definida como una enfermedad vascular, presentando riesgo cardíaco de 2 a 4 veces superior al de la población general, por lo que el ATP III (Adult Treatment Panel III) considera a la DM, “equivalente a enfermedad coronaria”, más que como un factor de riesgo aislado. Las dislipidemias constituyen uno de los mecanismos fisiopatológicos que explican el riesgo, junto a la disfunción endotelial, trombogénesis, estrés oxidativo y neuropatía. El patrón común de dislipidemia en pacientes con DM tipo 2 muestra niveles elevados de triglicéridos y disminuidos de colesterol-HDL (CHDL) con una concentración de colesterol-LDL (CLDL) similar a los no diabéticos. Los pacientes diabéticos tienen típicamente un predominio de partículas LDL, las cuales posiblemente incrementen la aterogenicidad por su mayor susceptibilidad a la oxidación, aunque la concentración absoluta de CLDL no esté significativamente aumentada, pueden presentar elevación del colesterol total (Bonneau *et al.*, 2007)

Por otro lado, existe una estrecha correlación entre obesidad, hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia, debido a que en el metabolismo lipídico normal los adipocitos liberan ácidos grasos a la sangre que son transportados al hígado y músculo esquelético. En el hígado se almacenan como triglicéridos. Este órgano, aparte de servir como almacén, metaboliza los lípidos y sintetiza ácidos grasos a partir de otras moléculas (glucosa y proteínas) que por esterificación forman triglicéridos que serán enviados al tejido adiposo a través de las VLDL (lipoproteína de muy baja densidad). Las LDL llevan los triglicéridos a los tejidos periféricos, mientras que las HDL los transportan al hígado, para ser metabolizadas nuevamente. Por tanto, en condiciones patológicas como la obesidad, la cantidad de ácidos grasos y por consiguiente de triglicéridos, será mayor, conformando una reserva energética excesiva en forma de adipocitos grandes que tienden a acumularse en los tejidos periféricos, volviéndose éste refráctil a la acción de la insulina. La resistencia a la insulina aumenta el flujo de ácidos grasos libres al hígado, incrementándose así la síntesis de triglicéridos e impidiendo una correcta actuación de la lipoproteinlipasa (LPL) causando que los triglicéridos se deriven a las HDL, aumentando el catabolismo de las mismas y disminuyendo sus niveles sanguíneos. Esto hace que las LDL se enriquezcan de colesterol, formándose LDL pequeñas y densas que se depositan en los vasos sanguíneos, favoreciendo de esta manera el desarrollo de aterosclerosis (Gil, 2008).

Al respecto, la resistencia a la insulina, según Rodríguez *et al.* (2002), se define como una condición caracterizada por la incapacidad que tiene la insulina, endógena o exógena, para aumentar la entrada y utilización de la glucosa por los tejidos periféricos. Los mecanismos de resistencia a la insulina pueden ser múltiples y cambiar de un sujeto a otro. Las alteraciones más frecuentes que producen la resistencia a la insulina se dan a nivel post-receptor, algunas de ellas pueden ser: por defectos en las vías de transmisión de señales generadas por la unión de la insulina al receptor; antagonismo a la acción de la insulina por adipocitocinas derivadas del tejido adiposo, antagonismo por ácidos grasos no esterificados o

ácidos grasos libres, cuyas concentraciones plasmáticas están notablemente aumentadas en la diabetes mellitus tipo 2 y en la obesidad; o aumento del estrés oxidativo (Alcaraz, 2006).

Estudios realizados sobre DM tipo 2, establecen que la insulina controla un gran número de procesos metabólicos que van desde la regulación de intermediarios del metabolismo hasta el control del transporte de iones a través de la membrana celular, promoviendo la captura de glucosa en músculo y adipocitos e inhibiendo la producción de glucosa hepática; este último proceso se debe a la reducción en la expresión de genes claves que codifican las enzimas responsables de la gluconeogénesis, por lo que numerosos factores que interfieren con el mecanismo de acción de la insulina pueden conducir al desarrollo de insulino resistencia (Reaven, 1998; Fernández *et al.*, 2006). La valoración de la resistencia a la insulina puede llevarse a cabo por diversos procedimientos, sin embargo, el más utilizado para estudios epidemiológicos es el método homeostasis model assessment (HOMA), basado en modelos matemáticos estructurales que proporciona una medida semicuantitativa de la sensibilidad a la insulina y la función de las células beta (Matthews *et al.*, 1985).

Los pacientes con DM tipo 2 con un pobre control glicémico, favorecen las posibilidades de complicaciones crónicas, tales como las infecciones cutáneas, bacterianas y micóticas a nivel de extremidades inferiores. Todas estas afecciones se conocen como pie diabético, proceso en el cual en muchas ocasiones se desarrollan infección, ulceración y destrucción de los tejidos profundos, asociadas con anormalidades neurológicas y vasculopatía periférica de diversa gravedad en las extremidades inferiores, considerándose como una de las causas más importantes de morbilidad y una de las razones más comunes de hospitalización por largos periodos de tiempo (Abdulrazak *et al.*, 2005), además el riesgo de amputaciones en los diabéticos supera 15 veces el de la población general, donde los principales factores de riesgo del son: edad, tiempo de evolución de la enfermedad, herida crónica y deficiencias en la dieta (Touceda *et al.*, 2010).

En este sentido, la neuropatía simétrica distal que compromete vías sensitivas, motoras y autonómicas, es la forma más común de anormalidades neurológicas diabética y factor patogénico más importante para su inicio. Una piel reseca, pérdida de dolor y disminución de movilidad articular que en conjunto, favorecen el riesgo de ulceración inducida por una lesión no percibida originada por el zapato u otro trauma menor. También la colonización de bacterias provenientes de la microflora de la piel, aprovecha las condiciones inmunodeficientes del paciente diabético para proliferar, ya sea en presencia de los factores anteriores aislados o en conjunto, acelerando la infección y por ende extiende el daño tisular (Iribarren *et al.*, 2007).

En algunos casos, las infecciones no sólo son causadas por una sola especie de bacteria (monomicrobianas), como por ejemplo *Streptococcus* β -hemolítico grupos A, B, C y G, y *Staphylococcus aureus*, entre otros, sino que pueden intervenir dos especies (polimicrobianas), y a pesar de que los microorganismos grampositivos siguen siendo los más frecuentes aislados, a menudo están presentes junto con los bacilos gramnegativos, como *E.coli*, *Proteus* spp, *Klebsiella* spp y *Pseudomonas* spp, estos son los reportados con mayor frecuencia (Kanafani *et al.*, 2006).

Uno de los microorganismos grampositivos que frecuentemente se aíslan en úlceras por pie diabético es *S. aureus* (Omar *et al.*, 2008), La patogenicidad de *S. aureus* se atribuye a su capacidad de producir varias enzimas (coagulasa, lipasa, estafiloquinasa, hialuronidasa y penicilinasas) y a los componentes de la pared celular formada por ácido teicoico, peptidoglicanos y proteína A, los cuales en conjunto actúan convirtiendo tejidos del huésped en nutrientes requeridos para el crecimiento de la bacteria (Koneman *et al.*, 2004). Sin embargo, *P. aeruginosa*, es un patógeno intrahospitalario tres veces más común en pacientes diabéticos, que en individuos no diabéticos (Dhanasekaran *et al.*, 2003). La patogenicidad de este microorganismo está basada en su habilidad para producir una variedad de toxinas y proteasas, además de resistir la fagocitosis. Comúnmente es resistente a muchos antimicrobianos, lo que la hace un patógeno muy

peligroso, debido a que la alteración de la integridad de las barreras físicas (piel y mucosas), así como la inmunosupresión son los factores más frecuentes de los cuales se vale éste bacilo para la colonización bacteriana (Singh *et al.*, 2005). Por lo tanto, *P. aeruginosa* puede causar graves daños en los tejidos de los diabéticos, por lo que nunca debe ser ignorada en pacientes diabéticos con pie diabético y tampoco considerarse como un contaminante o flora normal; ya que al ser calificado como patógeno, puede resultar en sepsis y amputación (Mike, 2004).

En este sentido, Abdulrazak *et al.* (2005), al determinar los principales agentes etiológicos causantes de infecciones en pie diabético, identificaron con mayor frecuencia aislados en úlceras *Staphylococcus aureus* (38,4%), seguido de *Proteus mirabilis* (18%), *P. aeruginosa* (17,5%) y otros con menor frecuencia como, *Bacteroides fragilis* (10,5%). Tanto en este estudio como en otros, los pacientes que padecen de pie diabético desconocen la existencia de medidas preventivas para la aparición de las úlceras y se ven afectados de manera importante por procedimientos radicales como amputaciones, que los limita para su desenvolvimiento en la sociedad, implicando altos costos para el sistema de salud (Unachukwu *et al.*, 2005; Omar *et al.*, 2008). El riesgo de una persona diabética para desarrollar una úlcera en sus extremidades inferiores se sitúa en torno al 25% y se ha calculado que cada treinta segundos se amputa una extremidad inferior en el mundo a causa de la diabetes (Singh *et al.*, 2005).

Las infecciones de pie diabético constituyen una causa frecuente de descompensación de la diabetes, ya que aumentan los requerimientos de la insulina, a pesar de que el paciente ingiera menos cantidad de alimentos. En tal sentido, la falta de acción, resistencia o destrucción en la producción de la insulina, altera la modulación de algunas citocinas inflamatorias que producirían alteraciones en la respuesta al proceso infeccioso por parte del paciente carente de insulina. Cabe destacar que este proceso se lleva a cabo gracias a la acción de la insulina sobre el tejido adiposo; porque este es un órgano secretor que produce leptinas, en proporción a la cantidad de tejido adiposo total; también sintetiza y segrega la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa

(TNF), que podría producir insulinoresistencia sistémica incrementando la lipólisis; constituyendo la fuente principal de angiotensinógeno, de adiposina y de la proteína estimulante de la acilación (ASP), y además produce el inhibidor-1 del activador del plasminógeno (PAI-I). Por ende, el tejido adiposo dispone de receptores, cuya importancia e implicaciones en el ser humano aún se desconocen en muchos aspectos, como los receptores β -3-adrenérgicos y el receptor nuclear activado por sustancias estimuladoras de la proliferación de los peroxisomas (*PPAR*) (Alleyne *et al.*, 2000).

La publicación realizada por Isseman y Green (1990), describió por primera vez al receptor nuclear activado por proliferadores de peroxisoma o *PPAR* (del inglés, peroxisome proliferator-activated receptor). Este receptor se clonó y agrupó dentro de la superfamilia de receptores de hormonas de ubicación nuclear, identificándose luego otros subtipos de *PPAR* en varias especies. Además se ha demostrado la presencia de elementos de respuesta específicos para este receptor en los promotores de varias enzimas y a sus efectos pleiotrópicos, estableciéndose, de esta manera, su participación directa en el control de la expresión genética (Michalik *et al.*, 2006).

Los receptores *PPARs*, en respuesta a la unión de sus ligandos, regulan la transcripción de genes, la cual puede llevarse a cabo a través de dos mecanismos: el primero mediante la formación de heterodímeros con el receptor de retinoide X (RXR), que reconocen elementos de respuesta específicos (PPREs), localizados en las regiones promotoras de los genes diana, estos elementos están formados por una repetición directa (DR) imperfecta de la secuencia AGGTCA, separada por 1 ó 2 nucleótidos (DR-1 ó DR-2), y el segundo mecanismo de regulación es por reclutamiento de correpresores, o por interferencia con otras vías (Marx *et al.*, 2004). En tal sentido, en el primer mecanismo induce la expresión de genes que reaccionan a la insulina y la de una proteína inductora de lipogénesis. El segundo mecanismo a través de la interferencia con la vía de señalización proinflamatoria del factor de transcripción nuclear NF- κ B (Chinetti *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003).

Se han descrito tres subtipos de *PPARs*: alfa (α), beta (β) y gamma (γ) (Braissant *et al.*, 1996). De éstos, los *PPAR α* y los *PPAR γ* están relacionados con la enfermedad cardiovascular. En general, *PPAR α* activa la oxidación de los ácidos grasos, controla la expresión de algunos de los genes reguladores de las lipoproteínas, y tiene efectos antiinflamatorios en las células del sistema vascular, por lo que se le asigna una acción protectora frente al desarrollo de aterosclerosis en humanos (Duez *et al.*, 2002). Los *PPAR β* , de acuerdo a diversos estudios con modelos animales y con agonistas sintéticos intervienen en el metabolismo lipídico de los tejidos adiposos y en el control del peso corporal, por lo que, a los agonistas sintéticos de *PPAR β* se les considera como una posible diana terapéutica para el tratamiento de la obesidad. Los receptores *PPAR γ* , cuyos genes se encuentran localizados en el cromosoma 3 (región p25.2), tienen un tamaño de 50 Kb, contiene 10 exones y se expresan principalmente en el endotelio, células del músculo liso vascular, macrófagos, páncreas y tejido adiposo. Son activados por ligandos naturales (ácidos grasos y prostanoides) y farmacológicos como las tiazolidinedionas (glitazonas), que están indicadas en el tratamiento de la diabetes del tipo II. Por lo tanto, regulan la expresión de múltiples genes involucrados en el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono, así como en la inflamación (Willson *et al.*, 2000; Bajaj *et al.*, 2004).

Se han identificado dos isoformas diferentes del *PPAR γ* , 1 y 2. Esta última, difiere de *PPAR γ -1* en un segmento adicional de 28 aminoácidos en su región NH₂-terminal, codificada por el exón 4. *PPAR γ -1*, se expresa en diversos tejidos, incluyendo el tejido adiposo, músculo esquelético, corazón e hígado, mientras que *PPAR γ -2* es expresada casi exclusivamente en el tejido adiposo (Auwerx, 1999).

Se han descrito diversos polimorfismos del gen *PPAR γ* , y dentro de las variaciones más comunes que experimentan estos genes, están los denominados polimorfismos mononucleótidos (SNP, del inglés single nucleotide polymorphism), originados por la sustitución de una sola base nitrogenada en la molécula de ADN, llegando a alcanzar

frecuencias mayores al 1% en la población en general. También se puede emplear el método polimorfismo de conformación de cadena individual de ADN (SSCP, del inglés Single Strand Conformational Polymorphism), para identificar un segmento de ADN, (fragmentos menores de 200 pares de bases), el cual se basa en que bajo condiciones no desnaturalizantes una hebra individual de ADN adopta una conformación espacial que es específica de la composición de su secuencia nucleotídica. Esta conformación es dependiente de la hibridación entre distintas regiones de un segmento de ADN replegado sobre sí mismo y la configuración diferente es provocada por el cambio de una sola base, entonces podría ser detectada en algunas condiciones de migración electroforética en una matriz de poliacrilamida, dichas circunstancias están relacionadas con la composición del gel, el tamaño del fragmento de ADN, los aditivos como el glicerol, la concentración de ADN y el contenido de guanina/citosina (G+C) del ADN (Sheffield *et al.*, 1993).

En consecuencia, se ha demostrado que las concentraciones altas de glicerol proporcionan las mejores condiciones de sensibilidad en las muestras analizadas (Humphries *et al.*, 1997) y que una sustitución en regiones ricas en G+C pueden tener un mayor efecto en su movilidad, por ende, ser fácilmente resueltos por SSCP a temperatura ambiente (Nataraj *et al.*, 1999). En condiciones ideales el rango de sensibilidad del SSCP varía entre 80% a 90% para detectar mutaciones (Sheffield *et al.*, 1993).

En cuanto a los polimorfismos en el gen del *PPAR* γ , como el Pro12Ala y el Pro115Gln, están relacionados con diabetes, obesidad y dislipemias (Stumvoll y Haring, 2002), describiéndose en los Estados Unidos en el año 2001, la interacción entre el gen *PPAR* γ y la ingesta de ácidos grasos en la dieta, demostrando que cuando el cociente ácidos grasos poliinsaturados/saturados procedentes de la dieta es bajo, la media del índice de masa corporal (IMC) en los portadores de genotipo heterocigoto Pro/Ala (polimorfismo Pro12Ala del receptor *PPAR* γ 2) es mayor, que en los individuos con otro tipo de genotipo, sugiriendo un posible efecto modulador de la dieta (Luan *et al.*, 2001). González *et al.* (2002), han asociado este genotipo como factor protector de la diabetes y

además se ha relacionado el alelo Ala12 con mejor sensibilidad insulínica en las mujeres, observando un efecto protector de este alelo contra el desarrollo de la diabetes en población norteamericana.

En Venezuela, en un estudio genético realizado en Maracaibo, en individuos con síndrome metabólico el porcentaje de portadores del alelo Ala fue de 13,6%, mientras que en el grupo sin síndrome metabólico fue de 32,14%. La frecuencia para el alelo Ala del polimorfismo Pro12Ala fue de 12% y para el alelo Pro fue de 88%, concluyendo los autores que la presencia del alelo Ala tiene un efecto protector sobre el perfil lipídico y disminuye el riesgo para el desarrollo de síndrome metabólico (Fernández *et al.*, 2009). Esto también fue reportado en un estudio de gemelos con tolerancia a la glucosa normal, realizado en Europa, específicamente en la población de Dinamarca (Poulsen *et al.*, 2003), y en una población española de 464 sujetos entre 35 y 64 años de edad, con diabetes tipo 2, sus resultados coinciden que el polimorfismo Pro12Ala del gen *PPAR γ 2* tiene una alta frecuencia del alelo Ala, evidenciándose así la asociación entre este alelo y una disminución del riesgo para DM tipo 2, debido a que promueve la deposición periférica de tejido adiposo, disminuye la inflamación e incrementa la sensibilidad a la insulina (González *et al.*, 2002).

Dado que los genes que codifican las proteínas implicadas en la señalización intracelular de la insulina, como el gen sustrato del receptor de insulina (IRS-2), es un gen diana del *PPAR γ* en los adipocitos humanos, los efectos del *PPAR γ* sobre la sensibilidad a la insulina podrían ser mediados, al menos en parte, por un efecto directo del *PPAR γ* sobre la secreción de insulina (Smith *et al.*, 2001). Jahoor *et al.* (2008), demostraron que las infecciones bacterianas por *P. aeruginosa*, afectan la expresión del gen *PPAR γ* utilizando 3-oxododecanoyl hemoserine lactone (3OC12-HSL), como un autoinductor de genes de virulencia en la bacteria y disminuye la expresión de citocinas inflamatorias en el hospedador.

El riesgo de padecer DM tipo 2 se ha relacionado a la presencia de diversos factores genéticos y metabólicos, siendo de gran utilidad investigar con relación a los genes que participan en la regulación, expresión y control de la glicemia, metabolismo lipídico, tono vascular e inflamación, entre otros, tal es el caso del polimorfismo Pro12Ala en el gen *PPAR-γ*, considerado como una de las variantes genéticas con amplio impacto en la diabetes mellitus tipo 2. En este sentido, la aplicación de técnicas de biología molecular en medicina, han permitido la incorporación de las bases genéticas en el estudio de la DM tipo 2, con el fin de establecer su relación con la etiología de la enfermedad. Sin embargo, el estado Sucre no existen investigaciones donde se relacionen los aspectos genéticos, metabólicos e infecciosos en individuos diabéticos, por ello esta investigación propone evaluar la diabetes mellitus tipo 2 con respecto a los parámetros bioquímicos, factores genéticos e infecciones por *S. aureus* y *P. aeruginosa* en individuos de Cumaná, estado Sucre, con la finalidad de entender y relacionar estos diferentes aspectos que influyen los diferentes cuadros clínicos en individuos con DM tipo 2, permitiendo valorar los mecanismos que originan las complicaciones del pie diabético en individuos de la ciudad de Cumaná, y poder aplicar medidas profilácticas que eviten la progresión y complicaciones de esta enfermedad.

METODOLOGÍA

MUESTRA POBLACIONAL

Para esta investigación se evaluaron individuos de ambos sexos (38 femeninos y 62 masculino), agrupados de la siguiente manera: El grupo 1 constituido por 100 pacientes diabéticos, con edades comprendidas entre 40 y 70 años, provenientes del área de Endocrinología del Hospital “Dr. Julio Rodríguez” de Cumaná, estado Sucre. Divididos en dos subgrupos: 50 pacientes con pie diabético (CPD) y 50 pacientes sin pie diabéticos (SPD). El grupo 2 estuvo constituido por 100 individuos aparentemente sanos, con edades comprendidas entre 40 y 70 años, considerados grupo control. El criterio de inclusión fue: haber nacido en la ciudad de Cumaná y cursar con diabetes tipo 2. Fueron excluidos del estudio aquellos individuos que presentaron hipertiroidismo, enfermedades hepáticas crónicas, renal crónica y hematológica.

ASPECTOS ÉTICOS

Todos los individuos que formaron parte de este estudio, fueron entrevistados para recopilar información personal, así como características clínicas y epidemiológicas, a través de una encuesta (ANEXO 1). El estudio se llevó a cabo guardando especial atención en el cumplimiento de declaración de Helsinski (Lasagna, 1995) y de los requerimientos de las buenas prácticas clínicas. Todos los pacientes firmaron su consentimiento para la inclusión en el estudio (ANEXO 1). También se le informó al paciente sobre el tipo de estudio a realizar, sus objetivos, los métodos utilizados, riesgos para el paciente y los beneficios esperados. Además se aseguró la confidencialidad de los datos y de los derechos que protegen su vida privada, cumpliendo con las normas de Bioéticas sugeridas por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Organización Mundial de la Salud (OMS).

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

A cada paciente se le dió por escrito las indicaciones necesarias para la toma de muestra sanguínea, donde se le indicó que debía ingerir alimentos de digestión ligera el

día anterior y presentarse con un tiempo de 12 horas de ayuno, para la determinación de los parámetros bioquímicos. Tomando en cuentas las medidas higiénicas y de bioseguridad pertinentes, se procedió a realizar una punción venosa en la fosa antecubital, para obtener 9 ml de sangre con una jeringa descartable, agregando 6 ml a un tubo de ensayo seco y 3 ml a un tubo con EDTA como anticoagulante, (proporción de 0,1 ml de EDTA 1% para 1 ml de sangre), estos tubos con anticoagulantes fueron utilizados para la extracción de ADN genómico y luego ser guardados a -20 °C. Posteriormente, el tubo seco se dejó en reposo por un tiempo de 20 a 30 minutos, necesarios para la refracción del coágulo. Luego estas muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 10 minutos, en una centrífuga (DINAC Clay Adams). El suero obtenido se separó con una pipeta automática y se transfirió a tubos tipo eppendorf de 1,5 ml estériles, para la determinación de los parámetros bioquímicos, a través de un analizador semiautomático (Biosystem modelo BTS-310).

DETERMINACIÓN DEL PERFIL LIPÍDICO

Colesterol total

Esta determinación se realizó por el método enzimático del colesterol esterasa y colesterol oxidasa (Biosystem SA), fundamentado en que la enzima colesterol esterasa hidroliza a los ésteres de colesterol presentes en suero, originándose colesterol libre y ácidos grasos. En la segunda etapa, la enzima colesterol oxidasa, en presencia de oxígeno, oxida el colesterol a colesterol -4eno-3ona y peróxido de hidrógeno. En la reacción subsiguiente, catalizada por la peroxidasa, la 4-amino-antipirina y el hidroxibenzoato de sodio son oxidados por el peróxido de hidrógeno para producir una coloración roja de quinoneimina, cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de colesterol total en la muestra cuando es medida a 600 nm (Bernard, 2004).

Triglicéridos

Se aplicó por el método enzimático de la glicerol fosfato oxidasa/peroxidasa, (Biosystem SA), que se fundamenta en que los triglicéridos presentes en la muestra son

hidrolizados, por una lipasa, en ácidos grasos libres y glicerol. Este último es fosforilado en glicerol-3-fosfato en una reacción catalizada por glicerol kinasa (GK) convirtiendo la adenosina-5-trifosfato (ATP) en adenosina-5-difosfato (ADP). El glicerol-3-fosfato se oxida a fosfato dihidroxiacetona en una reacción catalizada por la enzima glicerol fosfato oxidasa, produciéndose peróxido de hidrógeno en una concentración equimolar al nivel de los triglicéridos presentes en la muestra. Luego, ocurre una reacción en donde el peróxido de hidrógeno oxida al cromógeno compuesto de TOOS (sal sódica de N-etil-N-sulfohidroxipropilo-m-toluidina) y 4-aminoantipirina en una reacción catalizada por la peroxidasa; el resultado es una quinoneimina de color morado, cuya absorbancia es proporcional a la concentración de triglicéridos y glicerol libre en la muestra y es medida a una longitud de onda de 540 nm (Bernard, 2004).

Lipoproteína de alta densidad (HDL)

Se determinó mediante el método directo. El reactivo de HDL-colesterol está compuesto de una solución detergente diseñada para solubilizar partículas de HDL y un componente de polianiones que inhibe la reacción de las LDL, VLDL y quilomicrones con las enzimas de colesterol, distribuido por Biosystem SA. Esto permite que sólo las fracciones de HDL colesterol reaccionen con la enzimas colesterol esterasa (CHE) y colesterol oxidasa (CHO) para producir un derivado del colesterol (colest-4-en-3-ona) y peróxido (H₂O₂). El desarrollo de color resulta de la reacción entre el peróxido, N-etil-N-(2-hidroxi-3-sul-fopropil)-3-toluidina disódica (TOOS) y 4-aminoantipirina (4-AAP) en presencia de la enzima peroxidasa (POD). La intensidad del color, medida a 600 nm, es directamente proporcional a la concentración de HDL colesterol en la muestra (Bernard, 2004).

Lipoproteína de baja densidad (LDL colesterol)

Este parámetro se determinó por el método indirecto según Friedewald (Bernard, 2004):

$$\text{LDL-C} = \text{colesterol total} - \text{triglicérido}/5 - \text{HDL-C}$$

Lipoproteína de muy baja densidad (VLDL colesterol)

Se realizó según el método indirecto de Rifking, en donde la relación entre triglicéridos y la VLDL-C es constante (1:5), lo cual ha permitido desarrollar la siguiente ecuación (Bernard, 2004).

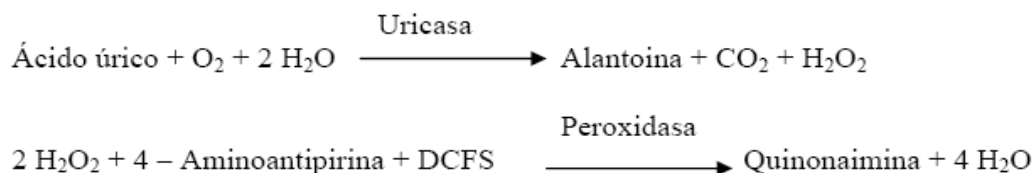
$$\text{VLDL-C} = \text{triglicérido}/5$$

DETERMINACIÓN DE CREATININA (MÉTODO DE JAFFÉ)

Esta determinación se realizó por el método del picrato alcalino (Biosystem SA), cuyo principio se basa en que la creatinina en la muestra reacciona con el ácido pícrico en medio alcalino para formar un complejo de creatinina-picrato, el cual es un compuesto de color naranja cuya intensidad se mide fotométricamente a 510 nm. La cantidad de cromógeno que se forma es directamente proporcional a la concentración de creatinina en la muestra (Kaplan y Pesce, 1991; Bernard, 2004).

DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ÚRICO

Esta determinación se efectuó por el método enzimático uricasa/peroxidasa, (Biosystem SA), que se fundamenta en que el ácido úrico presente en la muestra sanguínea, según reacciones acopladas origina los siguientes compuestos:



formando un complejo coloreado que se cuantificó por espectrofotometría a 540 nm y la intensidad del color producido es proporcional a la concentración de ácido úrico en la muestra (Kaplan y Pesce, 1991).

DETERMINACIÓN DE UREA

Esta determinación se basó en un método cinético-enzimático ureasa/salicilato, (Biosystem SA), en el cual, la urea es hidrolizada por la ureasa para producir amonio y agua. El amonio liberado reacciona con delta-ketoglutarato en presencia de NADH para

dar glutamato. Una cantidad equimolar de NADH oxidado durante la reacción resulta en una disminución de la absorbancia que es directamente proporcional a la concentración de urea nitrogenada en la muestra (Ióvene y Selva, 1975).

DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

Se cuantificó por el método de glucosa oxidasa/peroxidada (Biosystem SA), el cual se fundamenta en la oxidación de la β -D-glucosa a peróxido de hidrógeno y ácido glucónico, reacción catalizada por la enzima glucosa oxidasa. El peróxido de hidrógeno, a su vez, oxida al cromógeno 4-AAP para producir una coloración roja de quinoneimina, mediante una reacción catalizada por la peroxidasa. La intensidad de color de la reacción fue medida a 520 nm y es directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra (Kaplan y Pesce, 1991).

DETERMINACIÓN DE INSULINA

Se cuantificó por el ensayo inmunoenzimático (ELISA, de la marca Biosystem SA), el cual se fundamenta en que los anticuerpos anti-insulina presentes en el suero se unen a los antígenos adsorbidos a la superficie de los pocillos de la microplaca. A continuación, se incubó con anticuerpos anti-IgG humana, conjugados con peroxidasa. Finalmente, se añade el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) en presencia de H_2O_2 , que al ser degradado por la peroxidasa da lugar a un producto de color azul, la reacción enzimática se detiene con una solución de ácido clorhídrico y la formación de producto amarillo se leyó espectrofotométricamente en un microlector de ELISA a una longitud de onda de 450 nm. La concentración de anticuerpos en la muestra es proporcional a la absorbancia del producto de la reacción (Murray y Granner, 2001).

En este estudio se utilizó el método HOMA-IR (*Homeostasis model assessment of insulin resistance*), con concentraciones de glucosa e insulina basal (Matthews *et al.*, 1985), de acuerdo a la fórmula:

$$\text{HOMA} = \text{Insulina } (\mu\text{U/mL}) \times \text{Glucosa (mmol/L)} / 22.5$$

Los valores de referencias de todas las pruebas bioquímicas aplicadas en esta investigación se encuentran descritos en el ANEXO 2.

ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Extracción del ADN genómico

El ADN fue extraído de sangre total con anticoagulante EDTA por medio del kit de extracción de ADN genómico Wizard (Promega, Madison, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante. Inicialmente, se agregó 3 ml de sangre total en un tubo, se centrifugó a 14000 rpm durante 2 minutos, luego se transfirió la capa de glóbulos blancos que está en el tope del paquete globular a un tubo eppendorf estéril de 1,5 ml. Posteriormente, se agregó 900 µl de lisante de células, se invirtió el tubo de sangre de 5-6 veces para mezclar, se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente (invirtiendo 2-3 veces durante la incubación). Seguidamente, se centrifugó a 14000 rpm por 2 minutos, a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante sin llegar a perturbar el precipitado blanco visible y se agregó 600 µl de solución de lisante de núcleos agitando en vortex. Seguidamente, se agregaron 200 µl de solución precipitante de proteínas, se agitó en vortex por 10 segundos, se incubó a -20°C por 5 min. Posteriormente, se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos y se trasvasó a un tubo eppendorf estéril de 1,5 ml, que contenía 500 µl de isopropanol a temperatura ambiente, nuevamente se centrifugó a 14000 rpm por 20 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se añadió 500 µl de etanol al 70% centrifugando a 14000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Luego se descartó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado de ADN, finalmente, se añadió 100 µl de solución rehidratante, guardando el ADN a -20°C hasta su uso.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se procedió a amplificar un fragmento de 243 pb correspondiente a la región del exón 4 del gen *PPARγ*. Para esto se usaron los oligonucleótidos (Valve *et al.*, 1999):

Sentido 5`TGATGTCTTGACTCATGGGTGT3`

Antisentido 5`CCCAATAGCCGTATCTGGAA3`

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 μ l, utilizando 2 μ l de ADN purificado, buffer Taq (10 mmol/l de Tris-HCl, pH 8.8, 50 mmol/l de KCl, 0.1% de Triton X-100, 1,5 mmol/l de $MgCl_2$), 100 μ mol/l de cada desoxirribonucleótido trifosfato, 200 nmol/l de cada oligonucleótido y 25 U de *Taq* polimerasa (Promega). El programa de amplificación fue el siguiente: 1 ciclo a 95°C por 5 minutos para la desnaturalización inicial, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación de los oligonucleótidos a 55°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos, con una extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos amplificados fueron corridos en electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X (Tris-Acido Borico-EDTA) coloreado con Gel Red Nucleic Acid (marca Phenix Reserch Product), a 80 Voltios por 45 minutos. En cada corrida electroforética se utilizó marcador de peso molecular de 100 bp de Promega para estimar el tamaño de los fragmentos obtenidos por PCR. Los geles fueron visualizados en un transluminador de luz U.V (Marca UVB) y los resultados fueron documentados fotográficamente.

Polimorfismo conformacional de hebra simple (SSCP)

Este tipo de electroforesis permite la discriminación con alta resolución de fragmentos de ADN de tamaños menores a 200 pares de bases, con diferencia en su secuencia. Se realizó la siguiente metodología:

Una electroforesis en gel de poliacrilamida al 9%, empleando 9 ml de TBE 10X, 18 ml de glicerol al 50%; 48,5 ml de agua; 13,5 ml de acrilamida/bis; 600 μ l de persulfato de amonio y 60 μ l de N,N,N,N'-tetrametilen-diamina (TEMED). Una vez preparada esta solución, se procedió a cargarla entre dos vidrios utilizando un espaciador de 2 mm de una cámara marca C.B.S. Scientific Company, INC; dejándola polimerizar por al menos una hora. El gel se colocó en la cámara, se realizó una precorrida por 15 minutos y se cargaron 8 μ l de cada una de las muestras digeridas en cada uno de los pozos del gel, agregando marcadores de peso molecular de 100 pb (Promega), para medir el tamaño de los fragmentos. La corrida electroforética se realizó en buffer TBE 1X a 1000 Voltios, 50 W, durante 8-10 horas.

Para la tinción del gel se empleó la coloración de plata que es muy sensible y tiene la característica de producir generalmente coloraciones carmelita o negro (Sulbaran *et al.*, 2000); para esto se emplearon las siguientes soluciones:

- SOLUCIÓN DE NITRATO DE PLATA: 2.04 g de AgNO_3 con 1 ml de agua.
- SOLUCIÓN REVELADORA: 30 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3), 980 ml de agua y 514 μl de formol.
- SOLUCIÓN FIJADORA: 50 ml de ácido acético glacial con 950 ml de agua.

En primer lugar se realizó varias lavadas con agua destilada durante 30 minutos, luego se agregó la solución de nitrato de plata, esperando 30 minutos, lavando varias veces con agua destilada. Se agregó la solución reveladora por 5 minutos, luego, se agregó la solución fijadora durante 5 minutos, se sacó el gel de la solución y se observó los resultados. Todo este procedimiento de tinción se realizó removiendo constantemente el gel de poliacrilamida sumergido en dichas soluciones.

Secuenciación

Los productos de la PCR de 8 individuos aparentemente sanos y 16 pacientes (8 diabéticos con pie diabético y 8 diabéticos sin pie diabético) y fueron purificados usando el Kit QI Aquick Qiagen. Para lograr dicha purificación se procedió de la siguiente forma: en una columna se agregó 50 μl de producto de PCR y 500 μl de amortiguador PBI. Posteriormente, se centrifugó a 3000 rpm durante 2 minutos; luego se descartó la solución que se depositó en la parte inferior de la columna y se añadió 750 μl de amortiguador PE (Protein Extraction) y se centrifugó a 3000 rpm durante 2 minutos. Se descartó la solución que pasó por la columna y se centrifugó nuevamente a 3000 rpm durante 2 minutos, se descartó el tubo inferior de la columna y en su lugar se colocó un eppendorf limpio. Para eluir el ADN, se agregó 30 μl de agua libre de nucleasas en el centro de la columna, finalmente se centrifugó a 20000 rpm durante 5 min. El ADN depositado en el tubo eppendorf fue enviado al Servicio del Centro de Secuenciación y

Análisis de Ácidos Nucleicos (CeSAAN) del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), para su secuenciación.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

Recolección y transporte de las muestras

Se procedió a recolectar muestras de secreciones de las lesiones o de las úlceras presentes en el pie de los pacientes diabéticos evaluados en este estudio, previamente se limpió la zona con jabón antiséptico eliminando todo tejido necrótico. Se friccionó suficientemente como para realizar una limpieza mecánica (usando guantes estériles), iniciando en el centro, extendiéndose en círculos crecientes, y se lavó con solución fisiológica estéril para eliminar el exceso jabón. Se repitió este procedimiento varias veces utilizando una gasa estéril cada vez. Seguidamente, se dejó secar la zona y con un hisopo estéril se tomó la muestra de interés. En aquellos casos de infecciones que involucraron gran cantidad de tejido, se tomó la muestra en la región más profunda y en casos de úlceras menores en la periferia (Koneman *et al.*, 2005). Cada muestra se colectaron con dos hisopos estériles, uno fue utilizado en la realización de extendidos sobre láminas portaobjetos y el otro hisopo colocado en medios de transporte Stuart. Posteriormente, las muestras fueron trasladadas al área de Bacteriología del Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas (IIBCA) de la Universidad de Oriente, para su análisis inmediato.

Estudio Microscópico

El extendido de las muestras, fueron coloreados por el método de tinción de Gram, para observar la morfología (cocos o bacilos), tinción (grampositivos y gramnegativos) y disposición (cadenas, tétradas o racimos y pares) de bacterias observadas y la presencia de polimorfos nucleares indicativos de un proceso infeccioso (Koneman *et al.*, 2005).

Siembra

Seguidamente las muestras colectadas fueron sembradas en agar sangre y agar MacConkey a 37°C por 24 horas, para evaluar las características de las colonias que

estaban presentes en los diferentes medios de cultivos, y en aquellas que presentaron morfología sugestivas a *S. aureus* y *P. aeruginosa* fueron procesadas como se indica a continuación:

Caracterización morfológica de las colonias sugestiva de *S. aureus*

Las colonias sugestivas fueron repicadas en agar nutritivo incubando a 37°C por 24 horas. Este medio simple contiene los nutrientes necesarios para el desarrollo de la mayor parte de los microorganismos no exigentes, permitiendo realizar la prueba de catalasa y observar la morfología de las colonias sugestiva de *S. aureus* (regulares, de color crema a amarillo, bordes lisos, convexas). Mientras que el agar sangre es un medio enriquecido que permite el crecimiento de todo tipo de bacterias, observando las morfologías de las colonias sospechosas de tamaño mediano, color crema a amarillo, cremosas y brillantes; así como la formación de beta β -hemólisis.

Identificación bioquímica de *S. aureus*

A las colonias características se les realizaron pruebas bioquímicas, siguiendo los procedimientos y esquemas de identificación establecidos para cocos grampositivos propuesta por Koneman *et al.* (2005).

Prueba de la catalasa: se utilizó para diferenciar los géneros *Staphylococcus* (catalasa positiva) de otros cocos grampositivos (catalasa negativa). Para detectar la producción de esta enzima, se tomó del agar nutritivo una colonia presuntiva de *Staphylococcus* con un palillo de madera y se colocó en la superficie de una lámina portaobjeto que contenía una gota de peróxido de hidrógeno al 3%. La reacción positiva se indicó con la formación de burbujas.

Prueba de la coagulasa en tubo: se empleó para diferenciar *S. aureus* (coagulasa positiva) de otras especies de *Staphylococcus*. Para evaluar la capacidad del microorganismo de transformar el fibrinógeno en fibrina, se colocó 1 ó 2 colonias de un cultivo de 18 a 24 horas de incubación en 0,5 mL de caldo nutritivo, al estar turbio se

trasvasa 0,5 ml a un tubo estéril que contiene 0,5 ml de solución salina fisiológica e igual proporción de plasma liofilizado Sigma con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para coagulasa (Difco) y se incubó a 37°C. Se consideró la prueba positiva, cuando dentro de las 4 horas de incubación se forma un coágulo. En caso contrario, se reincubó a temperatura ambiente por 18 a 24 horas, haciendo una nueva lectura antes de descartarlos.

Fermentación del manitol salado: para evaluar la capacidad del microorganismo de crecer en presencia de altas concentraciones de cloruro de sodio y la degradación del manitol con la consecuente formación de ácido, estos eventos se van a relacionar con la patogenicidad de *S. aureus*, por lo tanto, sirve para indicar la presencia de dicha bacteria. Para determinar la degradación del manitol se procedió a inocular por estrías una colonia presuntiva de *S. aureus* en una placa de Petri, que contiene agar de manitol salado y se incubó por 24 horas a 37°C en aerobiosis. Finalmente, se observó la fermentación del manitol (1%), se evidenció por un cambio de color del indicador rojo fenol a amarillo y por el crecimiento del organismo en altas concentraciones de cloruro de sodio (7,5%). Un resultado positivo fue detectado por la presencia de colonias amarillas, que indica la producción de ácido a partir de manitol.

Prueba de ADNasa: *S. aureus* es la única especie del género que produce la enzima ADNasa que hidroliza el ácido desoxirribonucleico (ADN). La ADNasa se detectó sembrando en forma de estría, colonias del microorganismo identificado como presuntivo *S. aureus*, en medio ADNasa, el cual contiene ADN. Después de 24 horas de incubación a 37°C, se agregó a la colonia de *Staphylococcus* una gota de ácido clorhídrico 1 mol/L. En el caso de formarse, alrededor de la colonia un halo transparente, se considera la prueba como positiva (producto de la hidrólisis del ADN), si por el contrario permanece opaco, se considera negativa.

Siembra y caracterización morfológica de las colonias sugestiva de *P. aeruginosa*

Las colonias característica fueron repicadas en agar nutritivo incubando a 37°C por 24 horas, así como también en agar cetrimide a 42°C por 24 horas, esta última

temperatura es una prueba que permite diferenciar *P. aeruginosa* de otras especies de *Pseudomonas*, por su capacidad de sobrevivir a altas temperaturas. Una vez culminada la incubación se procedió a observar las características morfológicas de las colonias y la producción de pigmento.

Agar nutritivo: se trata de un medio muy simple que contiene los nutrientes necesarios para el desarrollo de la mayor parte de los microorganismos no exigentes, permitirá la realización de la prueba de la oxidasa.

Agar MacConkey: por la presencia de las sales biliares y el cristal violeta se inhibe el crecimiento de las bacterias grampositivas. Por la presencia de la lactosa, las bacterias capaces de fermentarla acidifican el medio, cambiando el color del rojo neutro y formando colonias rojas o rosadas. Las bacterias lactosa negativas dan colonias incoloras. *P. aeruginosa* crecerá sin fermentar la lactosa (colonia clara).

Agar cetrimide: actúa como elemento inhibidor de una amplia variedad de microorganismos; de tal manera, que no inhibe el crecimiento de las *P. aeruginosa*, pero sí lo hace con otras especies de *Pseudomonas*. Además, su acción tensioactiva produce la liberación del fósforo y del nitrógeno a las células bacterianas distintas de *P. aeruginosa*. Por la presencia de magnesio, cloruro y potasio se favorece, la producción de piocianina que dará al medio una coloración azul verdosa o marrón, por lo tanto, permitirá evidenciar claramente la producción del pigmento por parte de la bacteria. La observación, en estos medios de cultivo, de colonias planas, grandes, mucoides o secas en algunos casos, con pigmentación verdosa, azulada o marrón, serán sugestivas de *P. aeruginosa*, procediendo a realizar las pruebas bioquímicas correspondientes a las cepas características de esta especie.

Identificación bioquímica de *P. aeruginosa*

A las colonias características se les realizaron pruebas bioquímicas, siguiendo los procedimientos y esquemas de identificación establecidos para bacilos gramnegativos no fermentadores de glucosa, propuesta por Koneman *et al.*, (2005).

Prueba de la oxidasa: se utilizaron discos que contienen oxalato de dimetil-para-fenilendiamina, el cual es el sustrato de la enzima oxidasa. El género *Pseudomonas* produce la enzima oxidasa que en presencia de oxígeno atmosférico y citocromo C, se oxida el sustrato presente en los discos y se evidencia por la formación de un compuesto de color rojo-fucsia.

Fermentación de azúcares: este medio permitió estudiar la capacidad de producción de ácido y gas a partir de glucosa y lactosa en un único medio. Para el género *Pseudomonas*, su crecimiento se observó como pico de flauta alcalino y profundidad alcalina, ya que no fermenta la lactosa ni la glucosa, tampoco produce gas ni ácido sulfhídrico.

Prueba de oxidación fermentación (O/F): la oxidación de los azúcares glucosa, manitol y maltosa se evidenció mediante la inoculación por duplicado en tubos que contenían medio basal oxidación-fermentación (O/F) con 1% de carbohidratos, de los cuales, se selló uno con parafina líquida estéril. Esta prueba se incubó a 35°C durante 24 horas. Las reacciones oxidativas se evidenciaron por el cambio de color del indicador azul de bromotimol de verde a amarillo por la presencia del ácido y en el caso de los microorganismos oxidativos como el género *Pseudomonas*, el viraje del indicador se evidenció en la superficie del tubo, por la utilización de carbohidratos en presencia de oxígeno atmosférico.

Prueba de licuefacción de la gelatina: se usó para valorar la licuefacción o licuación de la gelatina por acción de las gelatinasas bacterianas producidas por *P. aeruginosa*, la reacción permite que el medio permanezca líquido después de la incubación, aún después

de dejarse en refrigeración durante media hora.

Sensibilidad a la polimixina B: las polimixinas destruyen las membranas celulares de las bacterias al reaccionar con los fosfolípidos de las membranas e incrementar la permeabilidad, debido a cambios en la membrana externa. Todas las *Pseudomonas* se caracterizan por ser sensibles a este antibiótico.

Hidrólisis de arginina: el sistema arginina dihidrolasa, consiste en que un grupo amino es removido de la arginina para formar citrulina que es convertida en ornitina, la que es descarboxilasa para formar putrescina. *P. aeruginosa* son capaces de hidrolizar el aminoácido arginina a través del sistema arginina dihidrolasa. Para esta prueba se utilizó la base de BHI, a la cual se le adicionó L-arginina al 1%. Posteriormente, se inoculó el medio arginina con el microorganismo de interés, se agregó parafina líquida para proporcionar las condiciones de anaerobiosis y se incubó a 37°C por 24 horas. La reacción positiva, se observó con un viraje del color de amarillo a púrpura en el medio (como consecuencia de la producción de aminas y alcalinización del medio) y la reacción negativa, se evidenció por un color amarillo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron expresados en tablas y figuras, calculando frecuencias simples para indicar las infecciones por *S. aureus* y *P. aeruginosa* en pacientes con pie diabético, y en los cálculos de parámetros bioquímicos y polimorfismo del gen ~~PPA~~ además para la evaluación de los parámetros bioquímicos obtenidos en los grupos de individuos estudiados, se les aplicó análisis de varianza simple (significativa con $p < 0,05$). Para asociar la diabetes mellitus tipo 2 con los niveles de infecciones y las anomalías en los parámetros bioquímicos evaluados en los diferentes grupos de estudios, se les aplicó un análisis de regresión logística binaria (Sokal y Rohlf, 1981).

RESULTADOS

Este estudio demostró que en los 50 pacientes con pie diabético (CPD) evaluados bacteriológicamente *S. aureus* y *P. aeruginosa*, las mismas se presentaron con una frecuencia de 24,0% (12/50) en infecciones únicas. Sin embargo, hay que resaltar que en 7 pacientes (14%) presentaron infecciones mixtas por ambas especies bacterianas 3 de los cuales fueron mujeres y 4 hombres (Tabla 1). Asimismo, se encontró que las infecciones en este grupo de pacientes fueron sólo ligeramente más frecuentes en hombres con un 63.3% (19/30), mientras que las mujeres representaron el 60% (12/20) de los mismos (Tabla 1). Además, se aislaron cepas de Enterobacterias infectando 38% (19/50) de los pacientes, cepas de otras especies grampositivas en 8% (4/50) y levaduras en 4% (2/50) de los pacientes.

Tabla 1. Frecuencia de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, en pacientes con pie diabético (CPD), de acuerdo a su sexo, provenientes del Hospital “Dr. Julio Rodríguez”, de Cumaná, Estado Sucre.

BACTERIAS	FEMENINO	MASCULINO	TOTAL (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	7	12 (24.0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	9	12 (24.0)
Infección mixta	3	4	7 (14.0)
Total	12 (60.0)	19 (63.3)	31 (62.0)

Estos mismos pacientes CPD, al ser evaluados de acuerdo a la presencia de infecciones por *S. aureus* y *P. aeruginosa*, en relación al rango de edades, se obtuvo menor frecuencia de infecciones en el grupo de 40 a 50 años con un 54.5% (6/11), mientras que los grupos de 51-60 y 61-70 mostraron similar frecuencia de infecciones (Tabla 2), con 63.6% (7/11) y 64.3% (18/28), respectivamente. Las infecciones por *S. aureus* y *P. aeruginosa* tuvieron frecuencias muy similares.

La evaluación de los diferentes parámetros bioquímicos evaluados en pacientes CPD, sin pie diabético (SPD) e individuos aparentemente sanos (GC), se indican en la tabla 3,

Tabla 2. Frecuencias de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* de acuerdo a los grupos etarios, en pacientes con pie diabético (CPD) provenientes del Hospital “Dr. Julio Rodríguez”, de Cumaná, Estado Sucre.

RANGO DE EDADES	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	TOTAL (%)
40-50	4	3	6 (54.5)
51-60	4	4	7 (63.6)
61-70	11	12	18 (64.3)
TOTAL	19	19	31 (62.0)

observando, que en general, los valores promedios del perfil lipídico, ácido úrico, glicemia, insulina y HOMAIR mostraron valores más bajos en los pacientes CPD al compararlos con los pacientes SPD, excepto en los valores de creatinina y urea. No obstante, todos los grupos evaluados mostraron valores promedio dentro de los rangos de referencia establecidos para cada una de las pruebas bioquímicas, a pesar de que algunos pacientes mostraran valores bastante elevados en los diferentes parámetros bioquímicos evaluados, lo cual puede evidenciarse en los rangos establecidos para cada uno de los grupos en estudio (Tabla 3).

Los valores promedios de triglicéridos en los pacientes SPD se encontraron ligeramente aumentados, mientras que los valores de glicemia, insulina y HOMAIR estuvieron significativamente elevados tanto en los pacientes CPD como en los SPD al compararlos con el grupo control (Tabla 3). Los pacientes CPD y SPD mostraron diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) en triglicéridos, HDL-colesterol, urea y creatinina, al compararlos con el grupo control. Por su parte, los valores de colesterol mostraron diferencias significativas ($p < 0,01$).

Al comparar estos grupos de individuos evaluados en base a los valores superiores al valor de referencia establecido para cada una de las pruebas bioquímicas (Tabla 4) se pudo determinar que la dislipidemia se presentó en un 37% en los pacientes CPD, seguido de un 29% en los SPD y 32%, en aquellos del GC. Además se determinaron

Tabla 3. Valores medios, desviación estándar y rango de las variables bioquímicas estudiadas en pacientes con pie diabético (CPD), sin pie diabético (SPD) y del grupo control (GC), de Cumaná, estado Sucre.

VARIABLE	(CPD) (N= 50) $\bar{X} \pm DE$	Rango	(SPD) (N= 50) $\bar{X} \pm DE$	Rango	(GC) (N=100) $\bar{X} \pm DE$	Rango
Triglicéridos (mg/dl)*	140,6 ± 8,82	62,0 - 355,0	158,9 ± 9,22	63,0 - 430,0	104,8 ± 4,11	37,0 - 210,0
Colesterol total (mg/dl)*	174,1 ± 7,93	79,0 - 403,0	185,60 ± 6,18	89,0 - 278,0	165,19 ± 2,86	89,0 - 229,0
HDL-colesterol (mg/dl) *	35,4 ± 1,46	15,4 - 59,0	41,68 ± 1,15	30,0 - 61,0	41,67 ± 0,71	30,0 - 69,0
LDL- colesterol (mg/dl)	110,58 ± 7,75	26,4 - 314,0	112,13 ± 5,51	16,2 - 193,0	102,57 ± 2,64	44,6 - 163,4
Urea (mg/dl)*	34,54 ± 3,67	11 - 150	26,54 ± 1,87	8,0 - 56,0	24,19 ± 0,61	11 - 38
Creatinina (mg/dl) *	1,18 ± 0,11	0,5 - 4,7	0,93 ± 0,04	0,50 - 1,70	0,86 ± 0,02	0,50 - 1,10
Ácido úrico (mg/dl)	4,41 ± 0,19	2,0 - 8,50	4,88 ± 0,23	2,3 - 10,90	4,34 ± 0,14	1,9 - 7,80
Glicemia (mg/dl)	174,64 ± 7,57	110,0 - 346,0	185,28 ± 9,82	108,0 - 387,0	87,33 ± 0,69	72,0 - 99,0
Insulina (μIU/ml)	14,31 ± 0,85	4,54 - 27,78	18,59 ± 0,72	10,21 - 28,49	2,92 ± 0,09	1,96 - 5,95
HOMAIR	6,40 ± 0,58	1,28 - 21,20	9,23 ± 0,83	2,98 - 27,17	0,63 ± 0,02	0,29 - 1,38
Riesgo aterogénico*Tg/HDL	4,37 ± 0,35	1,24 - 13,00	4,01 ± 0,27	1,11 - 11,94	2,59 ± 0,11	0,59 - 5,74

N: tamaño de muestra, M/F: masculino/femenino, \bar{x} : promedio, DE: desviación estándar, col.: colesterol HDL: lipoproteína de alta densidad, LDL: Lipoproteína de baja densidad, VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad, CPD: con pie diabético, SPD: sin pie diabético, GC: grupo control, HOMA: Modelo de valoración homeostático, * Variables con diferencias significativas (p < 0,050).

frecuencias para valores de triglicérido >150mg/dl en estos grupos de individuos de 32%, 52% y 18%, respectivamente, así como la frecuencia de HDL-colesterol, <35 mg/dl, en 54%, 18% y 17% en pacientes de CPD, SPD y GC, respectivamente. Sin embargo, a pesar de que los controles presentaron dislipidemias, el riesgo cardiovascular se encontró dentro del rango normal en la mayoría (89%), mientras que alrededor de la mitad de los individuos tanto CPD como SPD (48 y 54%, respectivamente) mostraron valores por encima de lo normal (Tabla 4).

Tabla 4. Frecuencia de individuos con pie diabético (CPD), sin pie diabéticos (SPD) y grupo control (GC), con valores de variables bioquímicas superiores a los valores de referencias establecidos para cada variable.

VARIABLES	CPD (%) (N= 50)	SPD (%) (N= 50)	C (%) (N=100)
Urea >39mg/dl	12 (24%)	10 (20%)	0 (0%)
Creatinina >1,3mg/dl	9 (18%)	4 (8%)	0 (0%)
Triglicéridos >150mg/dl	16 (32%)	26 (52%)	18 (18%)
Colesterol total >200mg/dl	14 (28%)	17 (34%)	11 (11%)
HDL-colesterol <30mg/dl	27 (54%)	9 (18%)	17 (17%)
LDL-colesterol ≥129mg/dl	15 (30%)	13 (26%)	16 (16%)
Ácido úrico ≥7,2mg/dl	1 (2%)	5 (10%)	2 (2%)
Dislipidemia	37 (74%)	29 (58%)	32 (32%)
Riesgo aterogénico	24 (48)	27 (54)	11 (11)

Por otro lado, al establecer relación entre los valores de insulina encontrados en los pacientes CPD con respecto a las infecciones por *S. aureus* y *P. aeruginosa*, se observa que los pacientes CPD infectados con *P. aeruginosa* mostraron valores más bajos que los que no estaban infectados por esta especie bacteriana (Figura 1). Los pacientes con altos niveles de insulina mostraron un riesgo 4,35 veces menor de presentar infecciones por *P. aeruginosa* ($\chi^2 = 4,529$, $p < 0,05$). Sin embargo, no se encontró asociación de la presencia de infecciones por esta bacteria con los niveles de glucosa en la sangre de los pacientes. Estos resultados podrían inferir que la insulina puede estar promoviendo una mejor respuesta inmunológica para el control o disminución de infecciones por

P. aeruginosa. No obstante, los pacientes que presentaron infecciones por *S. aureus* mostraron valores de insulina muy similares (Figura 1) por lo que no se encontraron relaciones significativas entre la insulina y las infecciones por *S. aureus* ($\chi^2= 0,806$, $p>0,05$).

Por otro lado, a toda la población en estudio se le realizó extracción de ADN, con el fin de poder estudiar los posibles alelos presentes en el exón 4 del gen *PPAR γ* , realizando para ello la optimización del diagnóstico molecular por PCR de esta región del gen, evidenciando con esta técnica un producto amplificado de 243 pb en todas las muestras sanguíneas evaluadas, tal como se observa en la figura 2.

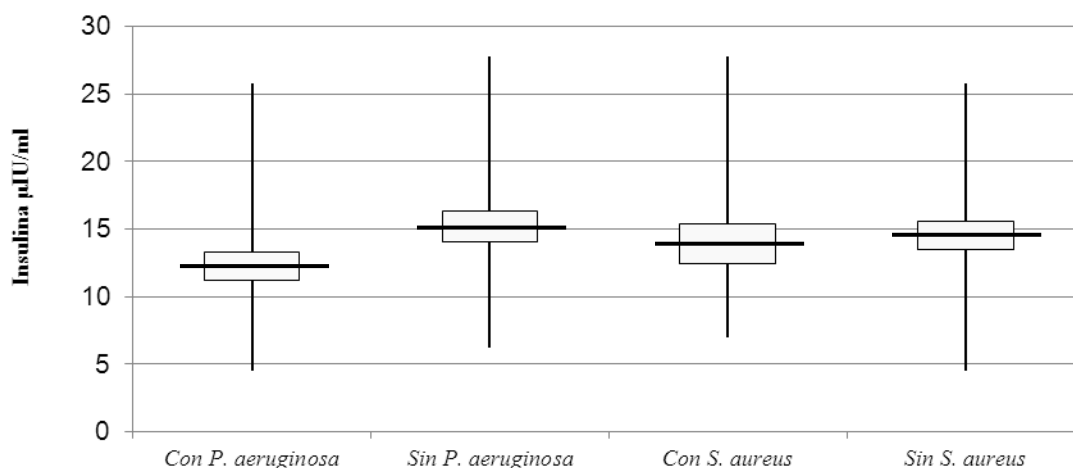


Figura 1. Relación de los niveles de insulina con las infecciones por *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con pie diabético provenientes del Hospital “Dr. Julio Rodríguez”, de Cumaná, Estado Sucre.

Gráfico mostrando el promedio (línea horizontal), el error (cuadrado) y el rango (línea vertical).

Estas mismas muestras analizadas por PCR para el exón 4 del gen *PPAR γ* se analizaron por polimorfismo conformacional de hebras simples (SSCP), observando en la figura 3 que todas las muestras evaluadas mostraron el mismo patrón de corrida, por lo que no se pudo determinar con esta técnica las posibles variantes alélicas del gen *PPAR γ* presentes en la población evaluada. Por ello, se seleccionaron 8 muestras de los pacientes CPD, SPD y del grupo control para realizar la secuenciación del fragmento de 243pb



Figura 2. Amplificación por PCR de un fragmento del exón 4 del gen *PPARγ*.
 M: marcador de peso molecular de 100 pb (Axygen). Pozos del 1 al 38 donde se observa el fragmento de 243 pb, en muestras sanguíneas de pacientes con (pozos 1 al 10) o sin pie diabético (pozos 11 al 20) e individuos aparentemente sanos (pozos 21 al 38), de Cumaná, estado Sucre. Gel de Agarosa 2% coloreado con Gel Red Nucleic Acid (marca Phenix Research Product).

correspondiente al exón 4 del gen *PPARγ* amplificado por PCR, observando en la figura 4, la secuencia con un 100% de homología para este exón. Con esta técnica se evidenció que una de las 8 muestras de los pacientes SPD era heterocigota para el polimorfismo Pro12Ala, como se puede observar en la figura 5, mientras que no se encontraron alelos en los pacientes CPD ni los individuos sanos y la frecuencia alélica de la variante Pro12Ala encontrada en este estudio es de 2,08% (Tabla 5).

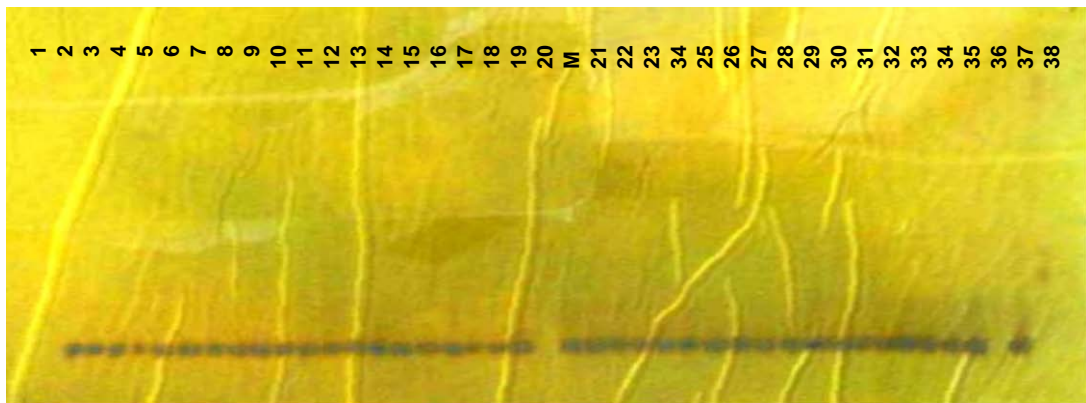


Figura 3. Gel de poliacrilamida mostrando el polimorfismo conformacional de hebras simples (SSCP) del exón 4 del gen *PPARγ*, en pacientes con diabetes (pozos 1 al 10) o sin pie diabético (Pozos 11 al 20) e individuos aparentemente sanos (Pozos 21 al 38), de Cumaná, estado Sucre. M: Marcador de peso molecular

de 100 pb (Promega). Gel al 9% coloreado con nitrato de plata.

Normal	TGATGTCTTGACTCATGGGTGTATTTCACAAATTCTGTTACTTCA
Mutación	TGATGTCTTGACTCATGGGTGTATTTCACAAATTCTGTTACTTCA
Normal	AGTCTTTTTCTTTTAACGGATTGATCTTTTGCTAGATAGAGACAA
Mutación	AGTCTTTTTCTTTTAACGGATTGATCTTTTGCTAGATAGAGACAA
Normal	AATATCAGTGTGAATTACAGCAAACCCCTATTCCATGCTGTTATG
Mutación	AATATCAGTGTGAATTACAGCAAACCCCTATTCCATGCTGTTATG M M
Normal	GGTGAAACTCTGGGAGATTCTCCTATTGACCCAGAAAGCGATTCC
Mutación	G E T L G D S P I D P E S D S GGTGAAACTCTGGGAGATTCTCCTATTGAC C CAGAAAGCGATTCC G E T L G D S P I D A E S D S
Normal	TTCACTGATACACTGTCTGCAAACATATCACAAGGTAAAGTTCCT
Mutación	F T D T L S A N I S Q E M T M TTCACTGATACACTGTCTGCAAACATATCACAAGGTAAAGTTCCT F T D T L S A N I S Q E M T M
Normal	TCCAGATACGGCTATTGG
Mutación	V D T E M P TCCAGATACGGCTATTGG V D T E M P

Figura 4. Secuencias de los alelos encontrados en el estudio para el fragmento de 243 pb, donde se resalta el cambio del alelo Pro→Ala. La región codificante comienza en la base 132 con el codón ATG.

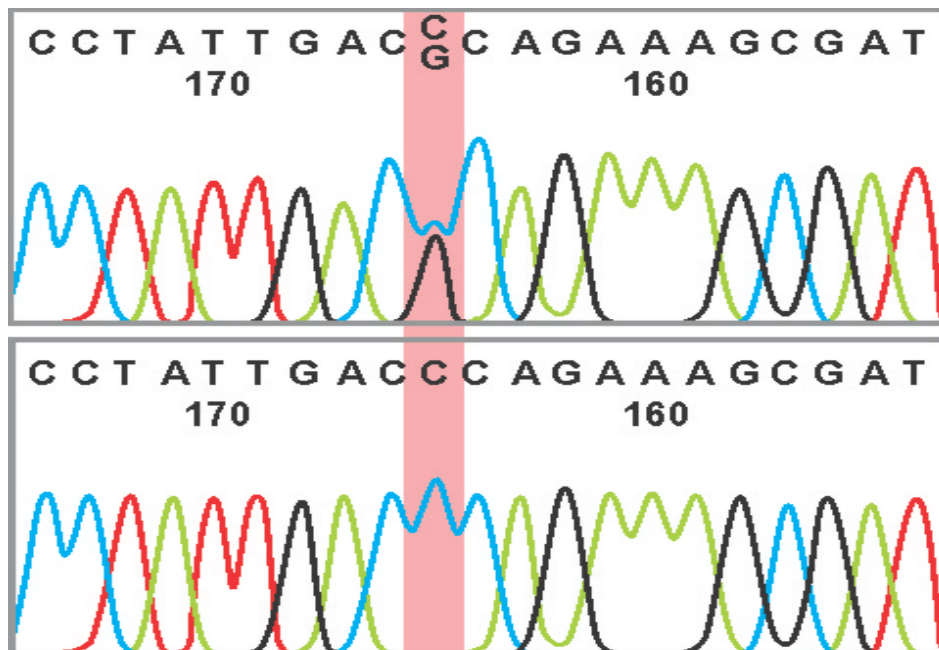


Figura 5. Comparación del electroferograma de una secuencia heterocigota para el polimorfismo Pro12Ala del exón 4 del gen *PPARγ* con la secuencia homocigota.

Tabla 5. Número de individuos con los genotipos del polimorfismo Pro12Ala determinados por secuenciación y las frecuencias alélicas de Pro y Ala en los grupos estudiados de Cumaná, estado Sucre.

Grupos	Genotipos		Frecuencia Alelos	
	Pro/Pro n	Pro/Ala n	Pro %	Ala %
Diabéticos con Pie	8	0	100,00	0
Diabéticos Sin Pie	7	1	93,75	6,25
Controles	8	0	100,00	0
Total	24	1	97,92	2,08

n= número de individuos

DISCUSIÓN

Según diferentes investigaciones, *S. aureus* y *P. aeruginosa* son las bacterias más frecuentemente aisladas en infecciones de pie diabético (Anandi *et al.*, 2004; Abdulrazark *et al.*, 2005; Kanafani y Fowler, 2006), lo cual coincide con los resultados hallados en esta investigación, donde se determinó 24,0% de frecuencia para ambas bacterias en pacientes con pie diabético (CPD), resaltando un 14% de infecciones por ambas especies. Esto probablemente esté asociado a que la mayoría de los casos evaluados de pie diabético se inician por mínimos traumatismos, que son favorecidos por la presencia de la vasculopatía periférica y la neuropatía diabética, lo que permite la colonización de bacterias patógenas u oportunistas, que se aprovechan de las condiciones inmunodeficientes del paciente diabético para proliferar, lo que al combinarse con neuropatía, hipoxia y deficiencias inespecíficas del sistema inmune, probablemente favorecen la aparición y rápida progresión de la infección en el pie diabético (Lechleitner *et al.*, 2004).

Por su parte, la edad es un factor importante en favorecer infecciones por *S. aureus* y *P. aeruginosa*, por que se conoce que en la diabetes mellitus tipo 2 y su complicación, el pie diabético es una afección de pacientes ancianos y de la tercera edad (Martínez y Sosa, 2001), coincidiendo esto con los resultados de esta investigación donde el grupo etario más afectado fue mayor de 50 años de edad en pacientes CPD infectados con *P. aeruginosa* y por *S. aureus*, lo que pudiera conllevar en algunos casos, a que estas infecciones propicien la colonización de varias especies (infecciones polimicrobianas). Además, se conoce que la enfermedad vascular es una de las complicaciones más frecuentes causante de la diabetes, ya sea a nivel central o a nivel periférico (pie diabético, entre otros), provocada por la oclusión de las arterias que llevan la sangre de brazos o piernas, disminuyendo o aboliendo la perfusión sanguínea. Esta insuficiencia vascular y la neuropatía, favorece un mayor riesgo de aparición de lesiones en los pies, y una vez establecida la infección supone mayor gravedad y mala respuesta al tratamiento. La extremidad isquémica no responde a la infección con incremento de la perfusión

local, formación de edema e infiltración leucocitaria de la misma forma que la extremidad bien vascularizada. Tampoco los antibióticos por vía sistémica llegan al lugar de la infección en una concentración adecuada por la incorrecta perfusión tisular (Touceda *et al.*, 2010).

Por otro lado, el predominio de aislamientos de bacterias gramnegativas como *P. aeruginosa*, se les atribuye al hecho de haber utilizado antibióticos previamente y tener hospitalizaciones prolongadas (Carvalho *et al.*, 2004). Sin embargo, el pie diabético continúa siendo una complicación grave de la diabetes mellitus y se mantiene como un reto a los servicios de salud. Sólo la prevención y detección precoz de los factores de riesgo, así como su corrección, pueden disminuir la alta morbilidad y la mortalidad de esta complicación, siendo imprescindible que el equipo de salud, los pacientes y sus familiares dominen los aspectos educativos sobre el cuidado de los pies del diabético, así como también, a mejorar las alteraciones metabólicas presentes, como la insulinemia para lograr disminuir significativamente esta complicación. (Aragón y Lázaro, 2004; Bowker y Pfeifer, 2008).

La DM, define a las alteraciones metabólicas de múltiples etiologías caracterizadas por hiperglicemia crónica y trastornos en el metabolismo de los hidratos de carbono, las grasas y las proteínas, resultado de defectos en la secreción de insulina, en la acción de la misma o en ambas (American diabetes association, 2008). Al respecto, la población de diabéticos evaluada en esta investigación evidenciaron un número importante de pacientes con valores de los diferentes parámetros bioquímicos dentro de los rangos de referencia (perfil lipídico y ácido úrico). Estos resultados probablemente se asocien a que la mayoría de los pacientes CPD estaban hospitalizados, lo que proporciona al paciente una mejor vigilancia en los hábitos alimenticios y, principalmente, el control de laboratorio que se le realiza a diario. No obstante, la dislipemia se presentó con mayor frecuencia en los pacientes CPD en comparación con los SPD, lo que coincide con el mayor riesgo cardíaco encontrado en los pacientes CPD. Al respecto, se reporta que la dislipidemia afecta a un alto porcentaje de los diabéticos tipo 2 y las alteraciones de las

lipoproteínas más características son el aumento de triglicéridos y VLDL, el descenso del HDL y el aumento de las LDL. Sin embargo, en el caso específico de los pacientes CPD pudieran estar más afectados por que las infecciones constituyen una causa frecuente de descompensación de la diabetes, debido a que aumentan de manera franca los requerimientos de insulina, a pesar de que el paciente ingiera menos cantidad de alimentos, este incremento se debe fundamentalmente al aumento de la secreción de cortisol y glucagón (Acevedo y Aguillón, 2004).

Tanto en los pacientes CPD como en los sin pie diabético (SPD) se observaron niveles altos de glicemia, insulina, HOMAIR, urea y creatinina. Estos dos últimos, los triglicéridos y el HDL-colesterol fueron altamente significativos con respecto al grupo control. La hiperglicemia es un factor agravante en la evolución de un paciente diabético, tanto en su estado agudo como en el crónico, las cifras altas de glicemia son consecuencia de uno o varios factores perturbadores de la acción de la insulina en diversos sitios de acción y por diferentes estirpes celulares (White y Meyers, 2001). Al respecto, Auwerx (1999) demostró que aquellos pacientes, diabéticos o no, que mantuvieron cifras de glicemia elevadas tenían mayor número de complicaciones, estadía, y mayor gasto hospitalario, además de asociarse con mayor mortalidad, estas condiciones se agravaban en máxima expresión si el paciente era portador de una infección aguda.

Por su parte, la hipertrigliceridemia, en los diabéticos, guarda una estrecha relación con la presencia de macroangiopatía (López y López, 1998). El patrón común de dislipidemia en pacientes con DM tipo 2 muestra niveles elevados de triglicéridos y disminuidos de HDL con una concentración de LDL similar a los no diabéticos. Los pacientes diabéticos tienen típicamente un predominio de moléculas LDL, las cuales, posiblemente incrementen la aterogenicidad por su mayor susceptibilidad a la oxidación, aunque la concentración absoluta de LDL no esté significativamente aumentada. También pueden presentar niveles elevados de colesterol (Georg y Ludvik, 2000; Krauss, 2004).

Los resultados de esta investigación concuerdan con investigaciones previas donde se ha establecido que en los pacientes diabéticos los niveles de colesterol en suero son superiores a los referenciales, esto es debido a que en ellos existe una movilización de grasas mayor a causa de la falta de utilización de glucosa como fuente de energía (Acevedo y Aguillón, 2004), esto se vio reflejado al encontrar los valores de colesterol significativos estadísticamente al compararlos con el grupo de individuos controles. Es bien conocido que los indicadores del perfil lipídico se encuentran muy estrechamente relacionados con otros parámetros de DM tipo 2, esta relación determina el riesgo de aterosclerosis y enfermedad vascular e incluye a los pacientes con diagnóstico reciente de esta enfermedad, en los cuales la afectación de la capa íntima y media de la carótida común se relaciona con los niveles de colesterol total y la aparición de varias complicaciones (Djik *et al.*, 2006).

En relación a los niveles de HDL en suero entre los dos grupos de diabéticos e individuos sanos, los resultados indican que existen diferencias estadísticas altamente significativas. Estos resultados están asociados a las dificultades metabólicas que presentan los diabéticos, promoviendo el catabolismo de las proteínas ya existentes, pero disminuyen la formación de más de ellas, decreciendo su disponibilidad, por lo que, tomando en cuenta la gran cantidad de proteínas que contienen las lipoproteínas de alta densidad, seguidas de colesterol y triglicéridos, su elaboración se dificulta y se traduce en una disminución de los valores de HDL (Acevedo y Aguillón, 2004); también las lipoproteínas de alta densidad, pueden experimentar glucosilación y oxidación, lo que permite que pierdan su habilidad de captar el colesterol de los tejidos periféricos por deterioro de su capacidad para unirse a receptores y/o de depurar los ésteres de colesterol de los macrófagos (Guerra *et al.*, 2005).

En cuanto a los niveles séricos de triglicéridos para los grupos en estudio, los resultados indican diferencias altamente significativas ($p < 0,001$), entre los pacientes según su condición; los individuos sanos presentaron los valores más bajos, mientras que los dos grupos de diabéticos muestran valores más altos, aunque en los pacientes con pie

diabético es menos acentuado. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Pastromas *et al.* (2008), quienes señalan elevada producción de triglicéridos en pacientes diabéticos, ya que por efecto de la deficiencia de insulina, se produce una intensa activación de la lipasa tisular que promueve la salida de los ácidos grasos desde el tejido adiposo hasta la circulación sanguínea, estos cambios en el patrón de los lípidos séricos constituyen un riesgo importante desde el punto de vista vascular, originando el proceso aterosclerótico que es la complicación más común en los diabéticos tipo 2.

Al respecto, Zeman y Zac (2004), al realizar un estudio del perfil lipídico en 495 pacientes diabéticos en Tacna, encontraron que el 43.6% de los pacientes presentaron niveles aceptables de colesterol total (<200mg/dl) y el 56.4% presentó hipercolesterolemia (>200mg/dl), el 29.3 % evidenciaron triglicéridos normales (<160 mg/dl) y el 70.7 % presentan hipertrigliceridemia; esto aunado a niveles disminuidos de HDL y niveles aumentados de LDL tanto en aquellos con niveles de colesterol aceptable como en los que presentaron niveles de riesgo; demostrando que a mayor nivel de colesterol total, los niveles LDL eran mucho mayores.

En el mismo orden de ideas, Guerra *et al.* (2005), al realizar un estudio en Bogotá sobre el perfil lipídico en 60 sujetos diabéticos tipo 2, no controlados (n=20), controlados (n=20) y sanos (n=20), reportaron que en los no controlados, los niveles de colesterol total, LDL, VLDL y triglicéridos fueron significativamente más altos, con HDL más bajos, comparados con los niveles de los grupos de sujetos con DM tipo 2 controlados y sanos, además señalan que los pacientes con regular o pobre control glucémico presentan un perfil lipídico anormal.

En relación a los valores de urea y creatinina reportados entre los dos grupos de diabéticos muestran un claro incremento de estos parámetros y al comparar con los individuos sanos, los resultados indican diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0,001$). Estos resultados están asociados con la nefropatía diabética, producto de las alteraciones en la filtración de los riñones, desarrollándose, generalmente la enfermedad

renal diabética en la edad avanzada, considerándose que mientras progresa el daño renal, frecuentemente aumenta la presión arterial (Rodríguez y Rodríguez, 2009).

Además de las complicaciones renales y alteraciones del perfil lipídico, estos pacientes diabéticos también presentaron altos niveles de insulina que al relacionar con las infecciones bacterianas se evidenció menor riesgo de ocurrencia de infecciones por *P. aeruginosa* en pacientes CPD que presentaban elevada insulina, pero no se encontró efecto en las infecciones por *S. aureus*.

Al respecto, Gerd *et al.* (2010) demostraron que el uso de insulina en ratas quemadas e infectadas con *P. aeruginosa*, mejoró significativamente la supervivencia y recuperación de la infección. Aquí, el tratamiento de insulina se asoció a alteraciones en la respuesta de los linfocitos B y T. En este sentido, se pudiera considerar aplicar tratamiento con dosis de insulina en infecciones por *P. aeruginosa* en diabéticos para disminuir la respuesta inflamatoria temprana de una lesión o infección en el pie diabético y aunque los mecanismos por los que la insulina protege contra infección por *P. aeruginosa* no se conocen, los datos sugieren que las respuestas inmunológicas a las infecciones pueden ser alteradas por los tratamientos con esta hormona (Deng y Chai, 2009).

Los diabéticos de tipo 2, con frecuencia tienen mayor probabilidad de tener infecciones, dado que no son capaces de utilizar correctamente la glucosa. Existen diferentes evidencias sobre una acción antiinflamatoria de la insulina a través de la represión de diferentes citokinas; es decir la falta de acción, resistencia o destrucción en la producción de la insulina, altera la “modulación” de algunas citokinas inflamatorias que producirían alteraciones en la respuesta al proceso infeccioso por parte del paciente carente de insulina. En tal sentido, el estudio de la fisiopatología de la insulinoresistencia es mediado por el *PPAR γ* que tiene un efecto directo sobre la secreción de insulina, dado que los genes que codifican a las proteínas implicadas en la señalización intracelular de la insulina, son genes diana (IRS-2) del *PPAR γ* en los

adipocitos humanos (Smith *et al.*, 2001).

Un estudio realizado en ratones que presentaban quemaduras severas y con infección por *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando 3-oxododecanoyl hemoserine lactone (3OC12-HSL), afectan la expresión del gen *PPAR γ* , activándolo, para que el gen actúe como un autoinductor de genes de virulencia y disminuye la expresión de citocinas inflamatorias (Jahoor *et al.*, 2008, Gerd *et al.*, 2010).

Por otro lado, el gen *PPAR γ* se ha asociado como un mediador en muchos procesos metabólicos y por ende sus variaciones pueden estar asociadas a un mayor riesgo de obesidad, hiperglicemia y otros componentes del síndrome metabólico, sin embargo, esta investigación reveló que sólo una muestra fue heterocigota para los alelos Pro/Ala del exón 4 del gen *PPAR γ* , la cual fue detectada por secuenciación, esto permite inferir que probablemente esto se relacione con la baja frecuencia del alelo Ala en la población evaluada. La presencia de variantes alélicas de un sólo nucleótido que no pudo ser visualizado por la técnica de SSCP, debido a que el cambio de C→G no implica un cambio en el número de enlaces de hidrógeno y por ello se requiere de pruebas más específicas como la secuenciación, que indiquen definitivamente si el polimorfismo está presente o no en una muestra determinada.

La técnica de SSCP es eficiente para la detección de cambios en la estructura de autoapareamiento de las hebras de ADN, producidas por cambios en la secuencia, pero estudios previos han demostrado que una sustitución en regiones bajas en contenido G+C pueden no afectar significativamente su movilidad. Nataraj *et al.* (1999), al comparar fragmentos de 100-300 nucleótidos de longitud conteniendo 60% de G+C, que difirieron por una base, fueron fácilmente resueltos por SSCP a temperatura ambiente, mientras que variaciones en otras secuencias de similar tamaño con un contenido de 40% de G+C no pudieron ser detectados, probablemente debido a que los enlaces de hidrógeno influyen la complejidad de la estructura terciaria de una hebra individual de ADN en un gel no desnaturizante.

La frecuencia de este estudio fue menor a las previamente reportadas para las poblaciones de Venezuela, México y Brasil, mucho menor que las reportadas para las poblaciones de Europa pero similares a las reportadas en China. El polimorfismo Pro→Ala ha sido asociado con un menor índice de masa corporal (IMC) tanto en diabéticos, no diabéticos o individuos saludables, pero la asociación es compleja (Deeb *et al.*, 1998; Doney *et al.*, 2004; He, 2009; Gouda *et al.*, 2010). En Afroamericanos se encontró que el alelo Ala estaba asociada a menor IMC pero a mayor IMC en caucásicos americanos (Fornage *et al.*, 2005). Sin embargo, numerosos estudios sugieren una asociación de Ala con un incremento del riesgo a la obesidad en México-americanos (Cole *et al.*, 2000), españoles (González-Sánchez *et al.*, 2002; Ochoa *et al.*, 2004), franceses (Meirhaeghe *et al.*, 2005), italianos (Morini *et al.*, 2008), Franco-canadienses (Robitaille *et al.*, 2003), brasileños descendientes de europeos (Mattevi *et al.*, 2007) y chinos (Li *et al.*, 2008) (Tabla 6). Adicionalmente, un Meta-análisis de 57 estudios en individuos no diabéticos mostró que los caucásicos con por lo menos un alelo Ala tenían un riesgo mayor de obesidad, aunque no se observó diferencia en la población general (Tonjes *et al.*, 2006). Sin embargo, en esta investigación la baja frecuencia de este alelo influyó en que no estuviera asociado a la diabetes, infecciones de pie diabético o a los parámetros bioquímicos de los pacientes evaluados.

En países de origen anglosajón el alelo Ala del gen *PPAR γ 2* presenta una frecuencia entre 0,11 y 0,15 (Swarbrick, 2001; Li *et al.*, 2000). No obstante, los países asiáticos son los que presentan menor variabilidad para este polimorfismo, entre 0,004 a 0,04 (Lei *et al.*, 2000; Iwata *et al.*, 2003). En Europa, parece existir un gradiente norte-sur para la variante Ala según describe el grupo de Poirier *et al.* (2000), en un trabajo realizado en 11 países europeos, pasando desde una frecuencia alélica de 0,21 en países bálticos a 0,07 en los países mediterráneos; por lo tanto las frecuencias de los alelos del polimorfismo Pro12Ala del gen *PPAR γ 2* varía según las zonas geográficas y el tipo de etnia o población. No obstante, las variaciones en el *PPAR γ* sí parecen estar asociadas a un mayor riesgo DM tipo 2, obesidad y otras alteraciones metabólicas (Sheffield *et al.*, 1993; Luan *et al.*, 2001; González *et al.*, 2002).

Tabla 6. Estudios poblacionales reportados en la literatura donde se han determinado las frecuencias alélicas de la variante Ala del polimorfismo Pro12Ala y se ha estudiado su asociación clínica a factores de riesgo del síndrome metabólico.

Referencia	Tipo de Población	Frecuencia	Asociación Clínica
Yen <i>et al.</i> (1997)	Caucásicos americanos	12,0%	No asociación.
	México-Americano	10,0%	No asociación.
	Afro-Americano	3,0%	No asociación.
	Chinos	1,0%	No asociación.
Altshuler <i>et al.</i> (2000)	Suecia y Finlandia	16,0%	Menor riesgo de diabetes.
Cole <i>et al.</i> (2000)	México-americanos	12,2%	Mayor riesgo de obesidad.
González-Sánchez <i>et al.</i> (2002)	España	8,9%	Mayor riesgo de obesidad en hombres pero no en mujeres. Menor riesgo de hipertrigliceridemia.
Robitaille <i>et al.</i> (2003)	Canadá	9,9%	Mayor riesgo de obesidad.
Doney <i>et al.</i> (2004)	Escocia	14,3%	Menor riesgo de diabetes.
Ochoa <i>et al.</i> (2004)	España	10,1%	Mayor riesgo de obesidad.
Barbieri <i>et al.</i> (2005)	Italia	8,4%	Menor obesidad, resistencia a la insulina y hipertrigliceridemia
Fornage <i>et al.</i> (2005)	Afroamericanos	2,1%	Menor riesgo de obesidad.
	Caucásicos	12,8%	Mayor riesgo de obesidad.
Ghoussaini <i>et al.</i> (2005)	Francia	11,7%	Menor riesgo de diabetes.
Meirhaeghe <i>et al.</i> (2005)	Francia	11,5%	Mayor riesgo de obesidad y LDL-colesterol elevado.
Mattevi <i>et al.</i> (2007)	Brasil	8,5%	Mayor riesgo de obesidad en hombres pero no en mujeres.
Bouhaha <i>et al.</i> (2008)	Túnez	6,5%	Menor riesgo de obesidad pero no efecto en diabetes.
Li <i>et al.</i> (2008)	China	9,2%	Mayor riesgo de obesidad.
Morini <i>et al.</i> (2008)	Italia	5,8%	Mayor riesgo de obesidad en hombres pero no en mujeres.
Fernández <i>et al.</i> (2009)	Venezuela	12,0%	No asociación con el síndrome metabólico.
García-Escalante <i>et al.</i> (2009)	México	6,3%	No asociación con el tratamiento con sulfonilurea y metformina.
Gao <i>et al.</i> (2010)	China	1,9%	Menor riesgo de hipertensión.
Al-Jarallah <i>et al.</i> (2011)	Kuwait	4,4%	No asociación.
Namvaran <i>et al.</i> (2011)	Iran	7,0%	No asociación.

CONCLUSIONES

Se demostró que las infecciones por *P. aeruginosa* y *S.aureus* son las más frecuentes en pacientes con pie diabético evaluados.

Los diabéticos tipo 2 evaluados presentaron mayor disposición a desarrollar otros problemas metabólicos.

La insulina se relacionó a infecciones por *P. aeruginosa* pero no a los niveles de glucosa, lo que pudiera estar relacionado al efecto de esta hormona a la respuesta inmune contra infecciones.

La técnica de polimorfismo conformacional de hebras simples (SSCP), no permitió detectar variantes alélicas del gen *PPAR γ* presentes en la población evaluada, mientras que la secuenciación evidenció ser la técnica definitiva para detectar los alelos del polimorfismo Pro12Ala del exón 4 en el gen *PPAR γ* .

BIBLIOGRAFÍA

Abdulrazak, A.; Bitar, Z. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Al-Shamali%20AA%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstract Mobasher, L. 2005. Bacteriological study of diabetic foot infections. *Diabetes Complication*, 19(3): 138-141.

Acevedo, S. y Aguillón, R. 2004. Manejo de dislipidemia en pacientes diabéticos tipo II. *MediUNAB*, 20:35-40.

Alcaraz, A. 2006. Resistencia a la insulina y síndrome metabólico. Asociación con riesgo cardiovascular: factores hormonales y estilo de vida. Trabajo de grado. Departamento de Medicina. Universidad Complutense de Madrid, España.

Alleyne, W.; Hill, V.; Allsopp, E.; Greenwood, B. y Kwaitkowski, D. 2000. Variation in the promoter region associated with susceptibility to infection pulmonary in diabetic. *Nature*, 371: 508-511.

Al-Jarallah, K.; Shehab, D. y Haider, M. 2011. Prevalence of the Pro12Ala missense mutation in the PPAR γ 2 gene in Kuwaiti patients with primary knee osteoarthritis. *Ann Saudi Medical*, 31(1): 35–39.

Altshuler, D.; Hirschhorn, J.; Klannemark, M.; Lindgren, C.; Vohl, M.; Nemesh, J.; Lane, C.; Schaffner, S.; Bolk, S.; Brewer, C.; Tuomi, T.; Gaudet, D.; Hudson, T.; Daly, M.; Groop, L. y Lander, E. 2000. The common PPAR γ Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nature Genetic*, 26(1): 76-80.

American diabetes association. 2008. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 31: S55-S60.

Anandi, C.; Alaguraja, D.; Natarajan, V.; Ramanathan, M.; Subramaniam, C. y Thulasiram, S. 2004. Bacteriology of diabetic foot lesions. *Medical Microbiology*, 22: 175-178.

Aragón, F.; y Lázaro, J. 2004. Atlas del manejo práctico del pie diabético, 1ª ed. Madrid: Autoedición, 323 pp.

Auwerx, J. 1999. PPAR γ the ultimate thrifty gene. *Diabetología*, 42: 1033-1049.

Bajaj, M.; Suraamornkul, S.; Piper, P.; Hardies, L.; Glass, L. y Cersosimo, E. 2004. Decreased plasma adiponectin concentrations are closely related to hepatic fat content and hepatic insulin resistance in pioglitazone-treated type 2 diabetic patients. *Journal Clinical Endocrinology Metabolic*, 89: 200-6.

Bowker, J. y Pfeifer, M. 2008. El pié diabético, 7ª ed. Barcelona: Elsevier Mosby, 520pp

Barbieri, M.; Rizzo, M.; Papa, M.; Acampora, R.; De Angelis, L.; Olivieri, F.; Marchegiani, F.; Franceschi, C. y Paolisso, G. 2005. Role of interaction between variants in the PPAR γ and interleukin-6 genes on obesity related metabolic risk factors. *Experimental Gerontology*, 40(7): 599-604.

Bernard, J. 2004. Diagnóstico y Tratamiento Clínico del Laboratorio. 9na Edición. Editorial Masson Salvat Medicina. México, DF.

Bonneau, G.; Castillo, A.; Rascón, M.; Sánchez, R.; Pedrozo, A. y Castro, C. 2007. IDL-cholesterol and lipidic parameters in diabetic patients type 2. *Endocrinology Metabolic*, 44: 215-222.

Bouhaha, R.; Meyre, D.; Kamoun, H.; Ennafaa, H.; Vaillant, E.; Sassi, R.; Baroudi, T.; Vatin, V.; Froguel, P.; Elgaied, A. y Vaxillaire, M. 2008. Effect of ENPP1/PC-1-K121Q and PPAR γ -Pro12Ala polymorphisms on the genetic susceptibility to T2D in the Tunisian population. *Diabetes Review Clinical Practic*, 81(3): 278-83.

Braissant, O.; Foufelle, F.; Scotto, C.; DauçA, M. y Wahli, W. 1996. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR alfa, beta y gamma in the adult rat. *Endocrinology*, 137: 354-366.

Carvalho, C.; Neto, R.; Aragao, L.; Oliverira, M. y Nogueira, M. 2004. Pie diabético: análisis bacteriológico de 141 casos. *Endocrinology Metabolic*, 48: 398-405.

Chinetti, G.; Fruchart, J. y Staels, B. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflammation Review*, 49: 497-505.

Cole, S.; Mitchell, B.; Hsueh, W.; Pineda, P.; Beamer, B.; Shuldiner, A.; Comuzzie, A.; Blangero, J. y Hixson, J. 2000. The Pro12Ala variant of peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 (PPAR- γ 2) is associated with measures of obesity in Mexican Americans. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, vol. 24, no. 4, pp. 522-524.

Deeb, S.; Fajas, L.; Nemoto, M.; Pihlajamäki, J.; Mykkänen, L.; Kuusisto, J.; Laakso, M.; Fujimoto, W. y Auwerx, J. 1998. A Pro12Ala substitution in PPAR γ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nature Genetic*, 20(3): 284-7.

Deng, H. y Chai, J. 2009 The effects and mechanisms of insulin on systemic inflammatory response and immune cells in severe trauma, burn injury, and sepsis. *Int Immunopharmacology*, 9(11): 1251-1259.

- Dhanasekaran, G.; Sastry, N. y Mohan, V. 2003. "Microbial pattern of soft-tissue infections in diabetic patients in South India," *Asian Journal of Diabetology*, 5(6): 8-10.
- Djik, J.; Bots, M.; Grobee, D. y Algira, A. 2006. Carotid intima-media thickness and risk of new vascular events in patients with manifest atherosclerotic disease: the smart study. *European Heart Journal*, 27: 12-24.
- Doney, A.; Fischer, B.; Cecil, J.; Boylan, K.; McGuigan, F.; Ralston, S.; Morris, A. y Palmer, C. 2004. Association of the Pro12Ala and C1431T variants of PPARG and their haplotypes with susceptibility to Type 2 diabetes. *Diabetologia*, 47(3): 555-8.
- Duez, H.; Chao, Y.; Hernández, M.; Torpier, G.; Poulain, P. y Mundt, S. 2002. Reduction of atherosclerosis by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist fenofibrate in mice. *Journal Biology Chemistry*, 277(48): 39-42.
- Fernández, V.; Clavel, E.; Villasmil, J.; Calmón, G.; Raleigh, X.; Morales, M.; Campos, G.; Ryderl, E. y Silva, E. 2006. Niveles basales de insulina en una población del estado Zulia, Venezuela. *Investigación Clínica*, 47: 2-4.
- Fernández, E.; Morales, M.; Vargas, R.; Sandra, L.; Molero, S.; Fernández, V.; Zambrano, L.; Campos, G. y Aranguren, J. 2009. Polimorfismo Pro12Ala del gen *PPAR- γ 2* y síndrome metabólico: Estudio preliminar. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 43(1): 3-9.
- Fornage, M.; Steffes, M.; Gross, M.; Bray, M. y Schreiner, P. 2005. Inverse effects of the *PPAR γ 2* Pro12Ala polymorphism on measures of adiposity over 15 years in African Americans and whites: the CARDIA study. *Metabolism Clinical and Experimental*, 54(7): 910-917.
- Gao L, Wang L, Yun H, Su L, Su X. 2010. Association of the *PPARgamma2* gene Pro12Ala variant with primary hypertension and metabolic lipid disorders in Han Chinese of Inner Mongolia. *Reviews Genetic Molecular*, 6; 9(3): 1312-20.
- García-Escalante, M.; Suárez-Solís, V.; López-Avila, M.; Pinto-Escalante, C. y Laviada-Molina, H. 2009. Efecto de los polimorfismos Gly972Arg del gen *IRS1*, SNP43 del gen *CAPN10* y Pro12Ala del gen *PPARG2* sobre la falla secundaria a sulfonilureas y metformina en pacientes con diabetes tipo 2 de Yucatán, México. *Investigación Clínica*, 50(1): 65-76.
- Gerd, G.; Gauglitz, M.; Tracy, E.; Toliver-Kinsky, M.; Felicia, N.; Williams, M.; Juquan, M.; Weihua, M.; Herndon, M.; Jeschke, M. 2010. Insulin increases resistance to burn wound infection-associated sepsis. *Care Medical*, 38:202-208.
- Georg, P. y Ludvik, B. 2000. Lipids and Diabetes. *Reviews Clinical Basic Cardiology*, 3: 159-162.

Germain, P.; Staels, B.; Dacquet, C.; Spedding, M. y Laudet, V. 2006. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacology Review*, 58 (4): 685-704.

Ghoussaini, M.; Meyre, D.; Lobbens, S.; Charpentier, G.; Clément, K.; Charles, A.; Tauber, M.; Weill, J. y Froguel, P. 2005. Implication of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma 2 gene in type 2 diabetes and obesity in the French population. *Medical Genetic*, 22 (6):11.

Gil, M. 2008. Obesidad, marcadores inflamatorios y síndrome metabólico en niños de la zona de Úbeda (Jaén). Tesis doctoral. Departamento de bioquímica, biología molecular e inmunología 3. Universidad de Granada. España.

González-Sánchez, J.; Serrano-Rios, C.; Fernandez-Perez, M.; Laakso, y Martinez-Larrad, M. 2002. Effect of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor γ -2 gene on adiposity, insulin sensitivity and lipid profile in the Spanish population. *European Journal of Endocrinology*, 147(4): 495-501.

González, J.; Serrano, M.; Fernández, C.; Laakso, M. y Martínez, M. 2002. Effect of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 gene on adiposity, insulin sensitivity and lipid profile in the Spanish population. *Endocrinology*, 147: 495-501.

Gouda, H.; Sagoo, G.; Harding, A.; Yates, J.; Sandhu, M. y Higgins, J. 2010. The association between the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 (PPARG2) Pro12Ala gene variant and type 2 diabetes mellitus: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiology*, 15;171(6): 645-55.

Gronemeyer, H.; Gustafsson, J. y Laudet, V. 2004. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nature Review Drug Disco*, 3 (11): 950-964.

Groop, L. 2000. Genetics of the metabolic syndrome. *Nutrition and aging*, 83(1):39-48.
Guerra, M.; Luján, D.; Alvarado, M.; Moreno, D. y Silva, M. 2005. Estudio del perfil lipídico en sujetos con diabetes mellitus tipo 2 de Bogotá. *Universitas Scientiarum*, 10: 81-89.

He W. 2009. PPARgamma2 Polymorphism and Human Health. *PPAR Res*, 538.

Humphries, S.; Gudnadson, R. y Whitall, D. 1997. Single strand conformation polymorphism analysis with high throughput modifications and its use in mutation detection in familial hypercholesterolemia. *Clinical Chemistry*, 43: 427-435.

Ióvene, E. y Selva, A. 1975. El laboratorio en la Clínica. Médica Panamericana, Buenos Aires. 751pp.

Iribarren, O.; Passi G.; Aybar, N.; Ríos, P.; González, L.; Rojas, M. y Saavedra F. 2007. Pie diabético: Evolución en una serie de 121 pacientes. *Revista Chilena de Cirugía*, 59(5): 337-341.

Isseman, I. y Green, S. 1990. Activation of a number of the steroid receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 347: 645-650.

Iwata, E.; Yamamoto, I.; Motomura, T.; Tsubakimori, S.; Nohnen, S.; Ohmoto, T.; Igarashi, T. y Azuma, J. 2003. The association of Pro12Ala polymorphism in PPAR γ 2 with lower carotid artery IMT in Japanese. *Diabetes*, 62(1): 5-59.

Jahoor, A.; Patel, R.; Bryan, A.; Do, C.; Krier, J.; Watters, K.; Wahli, W.; Li, G.; Williams, S. y Rumbaugh, K. 2008. Peroxisome Proliferator Activated Receptors Mediate Host Cell Pro-inflammatory Responses to *P. aeruginosa* Autoinducer. *Bacteriology*, 190(13): 4408-4415.

Kaplan, L. y Pesce, A. 1991. Química Clínica Técnicas de laboratorio, fisiopatología, métodos de análisis. Editorial Médica Panamericana, S.A. México.

Kanafani Z. y Fowler G. 2006. *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. *Microbiology Clinical*, 24: 182-193.

Koneman, E.; Allen, S.; Janda, W.; Scherckenberger, P. y Winn, W. 2005. Diagnóstico Microbiológico. 5ta Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1432 pp.

Krauss, R. 2004. Lipids and lipoproteins in Patients with type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 27: 1496-1504.

Lasagna, L. 1995. The Helsinki Declaration: timeless guide or irrelevant anachronism. *Clinical Psychopharmacol*, 15: 96-98.

Lechleitner, M.; Francesconi, M. y Abrahamian, H. 2004. The diabetic foot. *Acta Medical Austriaca*, 31(5): 173-4.

Lee, C.; Chawla, A.; Urbiztondo, N.; Liao, D.; Boisvert, W.; Evans, R. y Curtiss, L. 2003. Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPAR γ . *Science*, 302: 453-457.

Lei, H.; Chen, M.; Yang, W.; Chiu, M.; Chen, M.; Tai, T. y Chuang, L. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 Pro12Ala gene variant is strongly associated with larger body mass in the Taiwanese. *Metabolism*, 49 (10): 1267-70.

Li, L.; Ma, X.; Ran, J.; Sun, X.; Xu, L.; Ren, J. y Mao X. 2008. Genetic polymorphism of peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 Pro12Ala on ethnic susceptibility to

diabetes in Uygur, Kazak and Han subjects. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 35(2): 187–191.

Li, W.; Lee, J. y Price, R. 2000. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 Pro12Ala mutation is associated with early onset extreme obesity and reduced fasting glucose. *Molecular Genetic Metabolism*, 70: 159–161.

López, A. y López, F. 1998. Diabetes mellitus y lesiones del pie. *Salud pública*, 40(3): 281-292.

Luan, J.; Browne, P.; Harding, A.; Halsall, D.; O'Rahilly, S.; Chatterjee, V. y Wareham, N. 2001. Evidence for gene-nutrient interaction at the PPAR gamma locus. *Diabetes*, 50: 686-689.

Martínez, F. y Sosa, A. 2001. Amputaciones secundarias por pie del diabético. *Medical IMSS*, 39(5):445-452.

Marx, N.; Duez, H.; Fruchart, J. y Staels, B. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. *Circulation Response*, 94: 1168-1178.

Matthews, D.; Hosker, J.; Rudenski, A.; Naylor, B.; Treacher, D. y Turner, R. 1985. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetología*, 28: 412-419.

Mattevi, V.; Zembruski, V. y Hutz, M. 2007. Effects of a PPARG gene variant on obesity characteristics in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40(7): 927–932.

Meirhaeghe, A.; Tanck, M.; Fajas, L.; Janot, C.; Helbecque, N.; Cottel, D.; Auwerx, J.; Amouyel, P. y Dallongeville, J. 2005. Study of a new PPAR γ 2 promoter polymorphism and haplotype analysis in a French population. *Molecular Genetics and Metabolism*, 85(2): 140–148.

Michalik, L.; Auwerx, J.; Berger, J.; Chatterjee, V.; Glass, C. y Gonzalez, F. 2006. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Review*, 58(4): 726-741.

Mike, E. 2004. The use of antibiotics in the diabetic foot. *American Journal of Surgery*, 187; 5(1): S25–S28.

Morini, E.; Tassi, V.; Capponi, D.; Ludovico, O.; Dallapiccola, B.; Trischitta, V. y Prudente, S. 2008. Interaction between PPAR γ 2 variants and gender on the modulation of body weight. *Obesity*, 16(6): 1467–1470.

Murray, M. y Granner, R. 2001. Bioquímica de Harper, Editorial Manual Moderno, 15ava. Edición. México. 715pp.

Namvaran, F.; Rahimi-Moghaddam, P. y Azarpira, N. 2011. Genotyping of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) polymorphism (Pro12Ala) in Iranian population. *J Res Medical Sci.* 16(3): 291–296.

Nataraj, A.; Olivos-Glander, I.; Kusukawa, N y Highsmith, E. 1999. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis*, (20): 1117-1185.

NCEP. 2002. National cholesterol education program. Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. Adult panel III, final report (ATP III). *Circulation*, 106(25): 3143-3421.

Ochoa, M.; Marti, A.; Azcona, C.; Chueca, M.; Oyarzábal, M.; Pelach, R.; Patiño, A.; Moreno-Aliaga, M.; Martínez-González, M. y Martínez, J. Grupo de Estudio Navarro de Obesidad Infantil (GENOI). 2004. Gene-gene interaction between PPAR γ 2 and ADR β 3 increases obesity risk in children and adolescents. *International Journal of Obesity*, 28(sup 3): S37–S41.

Omar, N.; El-Nahas, M. y Gray, J. 2008. Novel antibiotics for the management of diabetic foot infections. *Medical Microbiology*, 31(5): 411-419.

Pastromas, S.; Terzi, A.; Tousoulis, D. y Koulouris, S. 2008. Postprandial Lipemia: An Under-Recognized Atherogenic Factor in Patients with Diabetes Mellitus. *International Journal of Cardiology*, 126(1): 3-12.

Poirier, O.; Nicaud, V.; Cambien, F. y Tiret, L. 2000. The Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor *PPAR* γ 2 gene is not associated with postprandial responses to glucose or fat tolerance tests in young healthy subjects: the European Atherosclerosis Research Study II. *Journal of Molecular Medicine*, 78 (6): 346-351.

Poulsen, P.; Fenger, M.; Hansen, T. y Echwald, S. 2003. Impact of two common polymorphism in the PPAR gamma gene on glucose tolerance and plasma insulin profiles in monozygotic and dizygotic twins. *Diabetes*, 52: 194-198.

Reaven, G. 1998. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37: 1595-1607.

Robitaille, J.; Després, J.; Pérusse, L; Vohl, M. y Lin, M. 2003. The PPAR-gamma P12A

polymorphism modulates the relationship between dietary fat intake and components of the metabolic syndrome: results from the Quebec Family Study. *Clinical Genetics*, 63(2): 109–116.

Rodríguez, A.; Sánchez, M. y Martínez, L. 2002. Síndrome metabólico. *Revista Cubana de Endocrinología*, 13(3): 238-252.

Rodríguez, A. y Rodríguez, B. 2009. Insuficiencia renal crónica en pacientes con diabetes mellitus de tipo 2 en un área de salud. *Medisan*, 13(6): 203-212.

Sheffield, V.; Beck, A.; Kwitek, D. y Sandstrom, E. 1993. The sensitivity of single strand conformation polymorphism analysis for detection of single base substitutions. *Genomics*, 16: 325-332.

Smith, U.; Gogg, S, Olausson, T.; Rotter, V. y Svalstedt, B. 2001. Thiazolidinediones (PPARgamma agonists) but not PPARalpha agonists increase IRS-2 gene expression in 3T3-L1 and human adipocytes. *Diabetes*, 15: 215-220.

Singh, N.; Armstrong, D. y Lipsky, B. 2005. Preventing foot ulcers inpatients with diabetes. *Diabetes Care*, 29(3): 217-228.

Sokal, R. y Rohlf, J. 1981. *Biometría, principios y Métodos Estadísticos en la Investigación Biológica*. Editorial Blume. Madrid, España, 832pp.

Stumvoll, M. y Haring, H. 2002. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala polymorphism. *Diabetes*, 51: 2341-2347.

Swarbrick, M. 2001. A Pro12Ala polymorphism in the human peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 is associated with combined hyperlipidaemia in obesity. *European journal of endocrinology*, 144(3): 277-282.

Tietz, N. 1991. *Clinical guide to laboratory tests*. 2da Edición. Editorial Saunders Co. Philadelphia, 120pp.

Tonjes, A.; Scholz, M.; Loeffler, M. y Stumvoll, M. 2006. Association of Pro12Ala polymorphism in peroxisome proliferatoractivated receptor γ with pre-diabetic phenotypes: metaanalysis of 57 studies on nondiabetic individuals. *Diabetes Care*, 29(11): 2489–2497.

Touceda, S.; Pérez, R.; Barreiro, D.; García, M.; Vázquez, R.; López D. 2010. Incidence of Diabetic Foot in the Podiatry Clinic of the University of La Coruña. *Revista Internacional de Ciencias Podológicas*, 4(2): 9-19

Unachukwu, C.; Obunge, O. y Odiya, O. 2005. The bacteriology of diabetic foot ulcers in Port Harcourt, Nigeria. *Niger Journal Medical*, 14: 173-176.

Valve, R.; Sivenius, K.; Miettinen, R.; Pihlajamaki, J.; Rissanen, A.; Deeb, S.; Auwerx, J.; Uusitupa, M. y Laakso, M. 1999. Two polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor- γ gene are associated with severe overweight among obese women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84: 3708-3012.

White, M. y Meyers, M. 2001. The molecular basis of insulinaction. Endocrinology. 4ta edition. Editorial WB Saunders Co. Philadelphia, 717pp.

Willson, T.; Brown, P. y Sternbach, D. 2000. Henke BR. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *Journal Medical Chemistry*, 43: 527-550.

World Health Organization (WHO). 2007. Definition, Diagnosis, and Classification of Diabetes Mellitus. Report of a WHO/IDF consultation. WHO Press, Ginebra, Suiza.46 pp.

Yen, C.; Beamer, B.; Negri, C.; Silver, K.; Brown, K.; Yarnall, D.; Burns, D.; Roth, J. y Shuldiner, A. 1997. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR gamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation. *Biochem Biophys Res Commun*, 241(2): 270-274.

Zerman, M. y Zac, A. 2004. Pathogenesis and significance of diabetic dislipidemia. *Cas Lek Cesk*, 2004; 143(5): 302-306.

ANEXOS

Anexo 1: encuesta del estudio de Diabetes Mellitus tipo II

Fecha: Hospitalizado: _____ Comunidad: _____ Código:

Nombres: _____ Apellidos: _____ Sexo: M
 F

Edad: _____ años Dirección: _____

Teléfono: _____

Lugar Nac: _____ Estado: _____

Qué es: _____

Qué lo causa: _____

Cómo se previene: _____

CONSENTIMIENTO PREVIA INFORMACIÓN (CPI).

El síndrome metabólico es un conjunto de varias enfermedades o factores de riesgo en un mismo individuo que aumentan el riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular o diabetes. Debido a que esta enfermedad se está haciendo cada vez más frecuente y a que no existen estudios previos en la región oriental del país, nos planteamos como objetivo: Relacionar el polimorfismo del Gen Receptor Gamma Activado por Proliferación de Peroxisomas (*PPAR- γ*) con la Diabetes Mellitus Tipo II en adultos con o sin pie diabético de Cumaná. Para esto, te hemos seleccionado para que participes con la donación de una muestra de sangre venosa y con información epidemiológica recopilada en la forma de una encuesta. La presente investigación se lleva a cabo bajo la responsabilidad de investigadores del Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas de la Universidad de Oriente (IIBCAUDO). Las muestras y datos aquí obtenidos son de uso exclusivo para esta investigación. Los datos de los participantes serán mantenidos en anónimo y la información recogida no podrá ser utilizada en perjuicio de los participantes. A los individuos participantes se les dará un resultado de los análisis realizados como retribución a su colaboración prestada. Los datos y las muestras que se generen serán almacenados y manejados por el Biobanco del IIBCA y pudieran ser utilizados para posteriores investigaciones relacionadas, que no comprometan la integridad del participante.

Yo _____ portador de la C.I.: _____ doy fe de conocer sobre el estudio y autorizo a los responsables de presente estudio a utilizar mis datos y muestras de sangre.

Firma del Participante: _____ Firma del Investigador Responsable: _____

Anexo 2: Rangos de referencia y unidades de medida de los parámetros bioquímicos evaluados en esta investigación.

Variables	Unidad de Medida	Rango de Referencia	Bibliografía
Urea	(mg/dl)	15-39	Tietz (1991)
Creatinina	(mg/dl)	0.6-1.3	Tietz (1991)
Triglicéridos	(mg/dl)	<150	NCEP-ATP III (2002)
Colesterol Total	(mg/dl)	<200	NCEP-ATP III (2002)
HDL Colesterol	(mg/dl)	<35	WHO (2007)
LDL Colesterol	(mg/dl)	<129	--
VLDL Colesterol	(mg/dl)	10-30	--
Ácido Úrico	(mg/dl)	2,6-7,2	Tietz (1991)
Glicemia	(mg/dl)	<110	NCEP-ATP III (2002)
Insulina	(μ IU/ml)	1,9-23	NCEP-ATP III (2002)
HOMAIR	--	<4,6	--

HDL: lipoproteína de alta densidad, LDL: lipoproteína de baja densidad, VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad, HOMAIR: Modelo de valoración homeostático de resistencia a la insulina, NCEP-ATP III: Programa Nacional de Educación para el Colesterol y Tercer Panel de Tratamiento para Adultos, WHO: del inglés, World Health Organization (organización mundial de la salud).

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso-1/6

Título	Evaluación De Diabetes Mellitus Tipo 2 Con Parámetros Bioquímicos, Factores Genéticos E Infecciones Por <i>Staphylococcus aureus</i> Y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> En Individuos De Cumaná, Estado Sucre.
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Rengel S. Neily del C.	CVLAC	14420652
	e-mail	neilyrs@hotmail.com.
	e-mail	

Palabras o frases claves:

<i>Diabetes</i>
<i>Pie diabético</i>
polimorfismo
<i>insulina</i>
<i>glicemia</i>

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso-2/6

Líneas y sublíneas de investigación

Área	Subárea
CIENCIAS	BIOLOGÍA
	MICROBIOLOGÍA
	BIOQUÍMICA

Resumen (abstract):

El objetivo de este estudio fue evaluar la diabetes mellitus tipo 2 con respecto a los parámetros bioquímicos, factores genéticos e infecciones por *S. aureus* y *P. aeruginosa* en individuos de Cumaná, estado Sucre. Se estudiaron 100 pacientes diabéticos (50 con pie diabético (CPD) y 50 sin pie diabético (SPD)) y 100 individuos aparentemente sanos, de ambos sexos y con edades entre 40 a 70 años. A los pacientes CPD se le aplicó estudio bacteriológico para identificar *S. aureus* y *P. aeruginosa*. A todos los individuo se les determinó concentraciones de glicemia, perfil lipídico, urea, creatinina y ácido úrico empleando métodos enzimáticos, además de insulina por enzimoanálisis. Se les extrajo ADN genómico a partir de sangre con EDTA y se amplificó por PCR el exón 4 del gen *PPAR γ* que amplifica un fragmento característico de 243 pb, luego a estos productos de PCR se les aplicó la técnica de Polimorfismo Conformacional de Hebra Simple (SSCP) en condiciones no desnaturizantes. Por otro lado, se llevó a cabo la secuenciación del producto de PCR en ocho muestras de los tres grupos de individuos en estudio. Los resultados permitieron demostrar que las infecciones por *S. aureus* y *P. aeruginosa* ocurren con la misma frecuencia (24%), de las cuales, siete pacientes (14%) presentaron infecciones por ambas especies. Además, se aislaron cepas de Enterobacterias infectando (38%) de los pacientes, cepas de otras especies grampositivas en (8%) y levaduras en (4%) de los pacientes. En cuanto al sexo y estas infecciones, se determinó mayor frecuencia de las mismas en hombres (50%), en comparación con las mujeres (26%). Los valores promedios del perfil lipídico, ácido úrico, glicemia, insulina y HOMAIR mostraron valores más bajos en los pacientes CPD al compararlos con los pacientes SPD, excepto en los valores de creatinina y urea que estuvieron elevados en ambos grupos, mientras que los triglicéridos, HDL-colesterol, urea y creatinina, mostraron diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) con respecto al grupo control, mientras que los valores de colesterol fueron significativos ($p < 0,01$). Además las dislipidemias se presentaron en el 37% de los pacientes CPD, seguido de 29% en los SPD y 32% en individuos controles. Las frecuencias para los valores de triglicérido $>150\text{mg/dl}$ en estos grupos de individuos fueron de 32%, 52% y 18% respectivamente, así como la frecuencia de HDL colesterol $\geq 35\text{ mg/dl}$, en 54%, 18% y 17%. Sin embargo, los controles presentaron dislipidemias, su riesgo cardiovascular se encontró dentro del rango normal, mientras que tanto los individuos CPD como los SPD mostraron valores de 4,4 y 4,0; respectivamente. Por otro lado, se evidenció disminución en las infecciones de *P. aeruginosa* en pacientes CPD con altos niveles de insulina, mientras que las infecciones por *S. aureus* no se afectaron por esta hormona. Finalmente, los diabéticos tipo 2 evaluados en esta investigación se caracterizaron por presentar dislipidemias, aumento de glicemia, insulina y HOMAIR. La PCR amplificó el fragmento característico de *PPAR γ* , no obstante, la técnica de SSCP, no permitió detectar variantes alélicas del gen presentes en la población evaluada, el uso de la secuenciación permitió la detección del polimorfismo Pro12Ala del exón 4 del gen *PPAR γ* con una frecuencia alélica de 2,08%, demostrando ser la técnica definitiva para evaluar variantes alélicas de este gen en la población evaluada de la ciudad de Cumaná.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail										
De Donato, Marcos		CA		AS		TU	X	JU			
	CVLAC	7259865									
	e-mail	marcosdedonato@hotmail.com									
Vivenes Merlyn	ROL	CA	<input type="checkbox"/>	AS	<input type="checkbox"/>	TU	<input type="checkbox"/>	JU	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	CVLAC	8641870									
	e-mail	merlynvivenes2@gmail.com									
Rodulfo Hectorina	ROL	CA	<input type="checkbox"/>	AS	<input type="checkbox"/>	TU	<input type="checkbox"/>	JU	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	CVLAC	11831659									
	e-mail	hrodulfo2002@yahoo.es									

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2012	03	30
-------------	-----------	-----------

Lenguaje: SPA

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

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
PG-RengelNeily.doc	APPLICATION/WORD

Alcance:

Espacial: Universal (Opcional)

Temporal: (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

MAGISTER SCIENTIARUM EN BIOLOGÍA APLICADA

Nivel Asociado con el Trabajo: MAGISTER

Área de Estudio:

BIOLOGÍA APLICADA: MICROBIOLOGÍA

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

UNIVERSIDAD DE ORIENTE –NUCLEO DE SUCRE

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



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

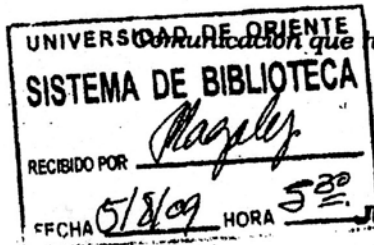
Cumaná, 04 AGO 2009

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.

Cordialmente,

JUAN A. BOLANOS CURVELO
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 / Telfs: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

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

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009): “Los trabajos de grados son de 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”.



Lcda. Neily del C. Rengel S.

Autor 1



Dr. Marcos De Donato
Asesor