Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Odontología
Unidad de Posgrado

Precisión diagnóstica del ensayo cometa para determinar daño del ADN en células bucales de pacientes con diabetes mellitus tipo 2

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Estomatología

AUTOR

Jorge Raúl COLCHADO CARHUAVILCA

ASESOR

Dr. Gilmer TORRES RAMOS

Lima, Perú

2025



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Colchado J. Precisión diagnóstica del ensayo cometa para determinar daño del ADN en células bucales de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 [Tesis de doctorado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Odontología, Unidad de Posgrado; 2025.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Jorge Raúl Colchado Carhuavilca
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	07972950
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-2227-0381
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Gilmer Torres Ramos
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10194229
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-2590-6736
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Víctor Manuel Chumpitaz Cerrate
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10677759
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Daniel Guillermo Suárez Ponce
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10054920
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Teresa Angélica Evaristo Chiyong
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09638747
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	Gilmer Torres Ramos

Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10194229
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.3.2.3. Patologías y alteraciones bucales y maxilofaciales
Grupo de investigación	Avances Científicos en Odontología y Biotecnología - ACOB
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento.
Ubicación geográfica de la investigación	Universidad Nacional Mayor de San Marcos Coordenadas geográficas: 12°03′24″S 77°05′06″O Edificio: Laboratorio de Bioquímica Facultad de Odontología País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Abril 2022 – Octubre 2024
URL de disciplinas OCDE	Tecnología para la identificación y funcionamiento del ADN http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.04.03 Genética, Herencia http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.07 Bioquímica, Biología molecular http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03

Facultad de Odontología
Universidad Nacional Mayor de San Marcos
UNIDAD DE POSGRADO

"Año de la recuperación y consolidación de la economía peruana"

ACTA N° 0014-FO-UPG-2025

ACTA DE SUSTENTACIÓN PRESENCIAL DEL TRABAJO ACADÉMICO PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN ESTOMATOLOGÍA

Siendo las 12:00 horas, del lunes 12 de mayo de dos mil veinticinco, en el Auditorio "Horacio Wells" de la Facultad de Odontología, el Jurado de Sustentación conformado por los docentes:

- **Presidente** : Dr. Victor Manuel Chumpitaz Cerrate
- **Miembro** : Dr. Daniel Guillermo Suárez Ponce
- **Miembro** : Dra. Teresa Angélica Evaristo Chiyong
- **Miembro Asesor** : Dr. Gilmer Torres Ramos

Se reunieron para la sustentación de la tesis titulada: **"PRECISIÓN DIAGNÓSTICA DEL ENSAYO COMETA PARA DETERMINAR DAÑO DEL ADN EN CÉLULAS BUCALES DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2"** presentado por el **Mg. Jorge Raúl Colchado Carhuavilca**, egresado del Programa de Doctorado en Estomatología, desarrollado en la Unidad de Posgrado de la Facultad de Odontología.

Concluida la sustentación, los miembros del jurado procedieron a formular sus preguntas las que fueron absueltas por el titulando. Acto seguido se procedió con la evaluación correspondiente. En forma colegiada, el jurado asigno la calificación de:

Letras	Número	Escala
Diecinueve	19	Aprobado por destacado

Habiendo sido aprobada la sustentación del trabajo académico, el Jurado de Sustentación recomienda al Consejo de Facultad apruebe el otorgamiento del Grado Académico de Doctor a **Don Jorge Raúl Colchado Carhuavilca.**

Siendo las 13:10 horas, se levanto la sesión. Se deja constancia del acto, mediante las firmas del Jurado de Sustentación y Asesor del Trabajo Académico en la presente acta.

Dr. Victor Manuel Chumpitaz Cerrate
Presidente

Dr. Daniel Guillermo Suárez Ponce
Miembro

Dra. Teresa Angélica Evaristo Chiyong
Miembro

Dr. Gilmer Torres Ramos
Miembro Asesor

Nota: La calificación se consigna en letras, números y nivel, de acuerdo con el Reglamento General de Estudios de Posgrado.

El resultado de la calificación de la sustentación de tesis corresponderá a uno de los siguientes niveles

- 20 Aprobado por excelencia
- 18 – 19 Aprobado por destacado
- 16 – 17 Aprobado por logro
- 14 - 15 Aprobado
- 0 – 13 Desaprobado

El promedio de la calificación con fracción de 0.5 o más, se redondea al entero inmediato superior.

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE
SAN MARCOS
(Universidad del Perú, Decana de América)

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, **Gilmer Torres Ramos**, en mi condición de asesor acreditado con el **Dictamen N° 0164-FO-UPG-2020** de la Tesis, cuyo título es **"PRECISIÓN DIAGNOSTICA DEL ENSAYO COMETA PARA DETERMINAR DAÑO DEL ADN EN CÉLULAS BUCALES DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2"** presentado por el **Mag. Jorge Raúl COLCHADO CARHUAVILCA**, para obtener grado académico de Doctor en Estomatología.

CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de **9% de similitud**, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado/ título/ especialidad correspondiente.

Lima, 15 de mayo del 2025



Huella digital

Firma del Asesor _____

DNI N° 10194229

Nombres y apellidos del asesor: Gilmer TORRES RAMOS

Dedicatorias:

A Dios Todopoderoso quien me acompaña e ilumina dia a dia para seguir el paso correcto.

A mis padres Delia y Francisco por sus sabios consejos y ejemplo de vida.

A mi querida esposa Dilma por ser el motor que me impulsa a ser el mejor.

A mi hijo Jorge Francisco por ser la razón de mi vida

Agradecimientos

A mi asesor el Dr. Gilmer Torres Ramos
por sus consejos, su valiosa ayuda académica y por ser un buen amigo.

A la Dra. Carmencita Bardales Hidalgo, endocrinóloga,
Jefa del Departamento de Endocrinología del
HN LNS PNP, por su apoyo incondicional.

Al Blgo. Esp. Josmar Chávez Chuquipuima y su equipo, por el apoyo en el procesado de las muestras para esta investigación.

A los miembros de Jurado:
Dra. Teresa Evaristo Chiyong, Dr. Víctor Chumpitaz Cerrate y
Dr. Daniel Suarez Ponce, por sus valiosos consejos, críticas constructivas y ayuda para la realización de esta investigación.

A todo el personal del Departamento de
Endocrinología del HN LNS PNP.

A todos muchas gracias.

INDICE GENERAL

Página

Lista de tablas		VI
Lista de figuras		VI
Resumen		VII
Abstract		VIII
I.	CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Situación problemática	1
1.2.	Formulación del problema	2
1.3	Justificación de la investigación	3
II.	CAPÍTULO 2. REVISIÓN DE LA LITERATURA	5
2.1.	Antecedentes de investigación	5
2.2.	Bases Teóricas	11
2.2.1.	Pruebas de Genotoxicidad	11
2.2.1.1.	Prueba de Micronúcleos	11
2.2.1.2.	Ensayo Cometa	12
2.2.2.	Daño del ADN	14
2.2.2.1.	Daño en el ADN según su origen	14
2.2.2.2.	Daño en el ADN desde el punto de vista estructural	14
2.2.3.	Diabetes mellitus	15
2.2.3.1.	Signos y síntomas de la diabetes mellitus	15
2.2.3.2.	Clasificación de la diabetes mellitus	15
2.2.3.3.	Diagnóstico de la diabetes mellitus	15
2.2.4.	Niveles glicémicos	16
2.2.4.1.	Paciente diabético controlado	16
2.2.4.2.	Hiperglicemia (paciente diabético no controlado).	17
2.2.4.3.	Objetivos recomendados para el control glicémico	17
2.2.5.	Precisión diagnóstica	18
2.2.5.1.	Sensibilidad	18
2.2.5.2.	Especificidad	18
2.2.5.3.	Valor Predictivo Positivo (VPP	18
2.2.5.4.	Valor Predictivo Negativo (VPN).	19

2.2.5.5. Área bajo la curva ROC 19
2.2.5.6. Calculadora de pruebas diagnósticas 19
2.2.5.7. Nomograma de Fagan 19
2.2.5.8. Razón de verosimilitud (LR) 19
2.3. Marco conceptual 20
III. CAPÍTULO 3. PROPUESTA 23
3.1. Objetivo General 23
3.2. Objetivos Específicos 23
3.3. Hipótesis 23
3.4. Identificación de variables 24
3.5. Operacionalización de variables 25
3.6. Matriz de consistencia 26
IV. CAPÍTULO 4. MATERIAL Y MÉTODO 27
4.1. Comité de ética 27
4.2. Diseño del estudio 27
4.3. Casuística 27
4.3.1. Población de estudio 27
4.3.2. Unidad de análisis 28
4.3.3. Tamaño de muestra 28
4.3.3.1. Tipo de Muestreo 29
4.3.3.2. Diseño Muestral 29
4.3.4. Selección de la Muestra 30
4.4. Método 31
4.4.1. Técnicas de recolección de datos 31
4.4.1.1. Procedimiento 31
4.4.1.2. Lugar de recolección de datos y procesamiento de la muestra 33
4.4.1.3. Condiciones de recolección de datos 33
4.4.1.4. Codificación de datos 33
4.4.1.5. Técnica de recolección de datos 34

4.4.1.6.	Instrumentos en la recolección de datos	34
4.5.	Análisis Estadístico	34
V.	CAPÍTULO 5. RESULTADOS	36
5.1.	Estadística descriptiva	36
5.2.	Estadística inferencial	37
5.2.1	Valores de hemoglobina glicosilada según niveles de daño del ADN de células bucales por el ensayo Cometa y tipo de paciente	37
5.2.2.	Longitud del Cometa (um) según niveles de daño del ADN de células bucales por el ensayo Cometa y tipo de paciente	39
5.2.3.	Valores de hemoglobina glicosilada según niveles de daño en el ADN de células bucales por la prueba de MN y tipo de paciente	40
5.2.4.	Número de micronúcleos según niveles de daño del ADN en células bucales por la prueba de micronúcleos y tipo de paciente	42
5.3.	Sensibilidad y especificidad del ensayo Cometa	43
5.3.1.	Curva ROC del ensayo Cometa y área bajo la curva	43
5.3.2.	Puntos de corte de coordenadas de la curva ROC ensayo Cometa	44
5.3.3.	Sensibilidad y especificidad del ensayo Cometa	45
5.4.4.	Valores predictivos para el ensayo cometa	46
VI.	CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN	48
VII.	CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES	51
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
	ANEXOS	59

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla N° 1	Tamaño de la muestra para pruebas diagnósticas.	28
Tabla N° 2	Características de los grupos de pacientes	36
Tabla N° 3	Área bajo la curva	43
Tabla N° 4	Coordenadas de la curva del ensayo Cometa (µm)	44
Tabla N° 5	Número de pacientes con y sin daño en el ADN con resultado positivo y negativo al ensayo Cometa.	45
Tabla N° 6	Valores predictivos para el ensayo cometa según el nomograma de Fagan	46

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura N° 1	Valores de hemoglobina glicosilada (%) según niveles de daño del ADN de células bucales por el ensayo Cometa y tipo de paciente	38
Figura N° 2	Longitud del Cometa (µm) según niveles de daño del ADN de células bucales por el ensayo Cometa y tipo de paciente	39
Figura N° 3	Valores de hemoglobina glicosilada (%) según niveles de daño en el ADN de células bucales por la prueba de MN y tipo de paciente	41
Figura N° 4	Número de micronúcleos según niveles de daño del ADN en células bucales por la prueba de micronúcleos y tipo de paciente	42
Figura N° 5	Curva ROC del Ensayo Cometa	43
Figura N° 6	Número de pacientes con y sin daño en el ADN con resultado positivo y negativo al ensayo Cometa	45
Figura N° 7	Nomograma de Fagan para el ensayo Cometa	47

RESUMEN

Objetivos. Determinar la precisión diagnóstica de la prueba Cometa en la determinación del daño del ADN en células bucales de pacientes con diabetes mellitus tipo 2. **Materiales y métodos**. Se realizó un estudio observacional, transversal, que evaluó la exactitud diagnóstica de la prueba Cometa. La muestra estuvo conformada por 128 participantes, 64 con diabetes mellitus tipo 2 y 64 controles sanos. A cada uno de ellos se les evaluó los valores de hemoglobina glicosilada. Se les tomó una muestra de células bucales para la evaluación del daño del ADN por medio de la prueba Cometa en comparación con el ensayo de referencia la prueba de micronúcleos. Se calculó los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de la prueba Cometa. **Resultados**. A una HbA1c media de 5.50% IC 95% [5.51-5.54]% los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 presentaron daño leve del ADN y a una HbA1c media de 10.98% IC 95% [10.66-11.30]% presentaron daño severo del ADN. Existe diferencias estadísticamente significativas entre los valores de HbA1c y los niveles de daño del ADN ($p<0.001$). Existe una muy buena y fuerte correlación entre los valores de la HbA1c y los niveles de daño en el ADN ($rho=0.873$, $p<0.0001$). Se halló una sensibilidad del 81.8%, una especificidad del 89.3%, un valor predictivo positivo del 82.00%, y un valor predictivo negativo del 11.00% para determinar el daño del ADN. **Conclusiones.** La precisión diagnóstica de la prueba Cometa fue del 93.1% y puede ser considerada como una prueba diagnóstica de una buena utilidad clínica para identificar daño severo en el ADN en células bucales de pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

Palabras clave: daño del ADN, genotoxicidad, micronúcleos, ensayo cometa, diabetes mellitus tipo 2.

ABSTRACT

Objectives. To determine the diagnostic accuracy of the Cometa test in determining DNA damage in buccal cells of patients with type 2 diabetes mellitus. **Materials and methods**. An observational, cross-sectional study was carried out to evaluate the diagnostic accuracy of the Cometa test. The sample consisted of 128 participants, 64 with type 2 diabetes mellitus and 64 healthy controls. Each of them was evaluated for glycosylated hemoglobin values. A sample of buccal cells was taken for the evaluation of DNA damage by means of the Comet test compared to the reference assay, the micronucleus test. The sensitivity, specificity, positive and negative predictive value values of the Cometa test were calculated. **Results**. At a mean HbA1c of 5.50% 95% CI [5.51-5.54]%, patients with type 2 diabetes mellitus had mild DNA damage and at a mean HbA1c of 10.98% 95% CI [10.66-11.30]% had severe DNA damage. There are statistically significant differences between HbA1c values and DNA damage levels ($p<0.001$). There is a very good and strong correlation between HbA1c values and levels of DNA damage ($rho=0.873$, $p<0.0001$). A sensitivity of 81.8%, a specificity of 89.3%, a positive predictive value of 82.00%, and a negative predictive value of 11.00% were found to determine DNA damage. **Conclusions**. The diagnostic accuracy of the Cometa test was 93.1% and it can be considered a diagnostic test of good clinical utility to identify severe DNA damage in buccal cells of patients with type 2 diabetes mellitus.

Keywords. DNA damage, genotoxicity, micronuclei, comet assay, type 2 diabetes mellitus.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Situación problemática

La diabetes mellitus tipo 2 se caracteriza por la presencia de un aumento crónico de la glucemia debido a una gluconeogénesis y glucogenólisis inadecuadas, lo que resulta en hiperglucemia (Sacks et al., 2023); es considerada como una de las importantes causas de mortalidad a nivel mundial y afecta a todo individuo independientemente del sexo, edad o nacionalidad (GBD 2021 Diabetes Collaborators, 2023). Se ha estimado que actualmente la padecen alrededor de 451 millones de adultos en todo el mundo y que esta cifra aumentará a 693 millones para el 2045, debido a cambios en el estilo de vida, la dieta y la falta de ejercicio (Lin et al., 2020). Sólo el 37% de diabéticos tienen una enfermedad controlada (Wang et al., 2018). En el Perú, esta patología presenta una prevalencia que oscila en el 7 % y solo en Lima alcanza cifras del 8%, además el 10% de la población no ha sido diagnosticada con diabetes, pero tienen la condición prediabética (Carrillo-Larco & Bernabé-Ortiz, 2019).

Por otro lado, el daño en el ADN ocurre en diferentes formas y mecanismos, como la rotura de hebras y modificación de bases nitrogenadas, las cuales están relacionadas con factores fisiopatológicos como los generados por un mal control glucémico (Rahmoon et al., 2023). Las complicaciones generadas por estos cambios en la glucemia promueven una sobreproducción de elementos tóxicos que causan daños al material genético, ADN y de todos los componentes celulares que se encuentran relacionados con la función y comportamiento de los cromosomas. A nivel bucal las complicaciones micro y macrovasculares generadas por la hiperglucemia diabética conllevan a xerostomía, caries atípicas, recesión gingival, abscesos dentales y otras. (Rohani, 2019).

Muchos eventos fisiológicos dependen de la coordinación de las roturas/reparaciones del ADN (Huang & Zhou, 2021). La hiperglucemia en la diabetes genera desestabilización de la homeostasis metabólica celular, lo que conlleva a una interrupción o desregulación de las vías de reparación del

ADN provocando una inestabilidad del genoma (Mallik et al., 2024). Además, las altas concentraciones de glucemia promueven la mutación celular y reduce la capacidad de reparación, conduciendo a incrementar la susceptibilidad de la célula al daño del ADN (Cosmin Stan & Paul, 2024). Esta serie de daños a nivel del material genético son contemplados como sucesos tóxicos para el ADN, los cuales son bio-monitoreados por ensayos *in vivo* como *in vitro (Phillips & Arlt, 2009; Rohani, 2019)*. El test de micronúcleos y el Comet assay son biomarcadores de genotoxicidad, considerados como pruebas útiles para determinar el daño en el ADN, pero a diferencia de la prueba Cometa, el test de micronúcleos es considerada como el "Gold standard" en la determinación del daño del ADN (Conway et al., 2020; Wills et al., 2021). Ambas pruebas evalúan la inestabilidad genética tanto en células sanguínea como en células epiteliales, la eficacia de una prueba sobre la otra aún no está definida concretamente, sin embargo, el beneficio de utilizar células epiteliales bucales para determinar el daño del ADN es considerada como una alternativa no invasiva, no costosa y que no requiere de cultivos celulares a diferencia de las células sanguíneas (Fenech et al., 2021).

Por todo lo anteriormente señalado, el objetivo de la presente investigación fue determinar la precisión diagnóstica del ensayo Cometa en la determinación del daño del ADN en células bucales de pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema General

¿Cuál es la precisión diagnóstica del ensayo Cometa en la determinación del daño del ADN en células bucales de pacientes con diabetes mellitus tipo 2?

1.2.2 Problemas Específicos

¿Cuáles son los valores de la hemoglobina glicosilada de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 según los niveles de daño en el ADN células bucales por medio del ensayo Cometa?

¿Cuáles son los valores de la hemoglobina glicosilada de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 según los niveles de daño en el ADN en células bucales por medio de la prueba de micronúcleos?

¿Cuál será la sensibilidad y especificidad del ensayo Cometa en la determinación del daño del ADN en células bucales de pacientes con diabetes mellitus tipo 2?

¿Cuáles son los valores predictivos positivos y negativos del ensayo Cometa para determinar el daño del ADN en células bucales de pacientes con diabetes mellitus tipo 2?

1.3 Justificación de la investigación

1.3.1 Justificación Teórica.

Los resultados del estudio proporcionaron información relevante respecto al test Cometa como biomarcador de genotoxicidad en la determinación del daño en el ADN de células bucales, específicamente en poblaciones diabéticos tipo 2, tanto controladas como no controladas, teniendo en cuenta que la genotoxicidad y la diabetes mellitus presentan un punto en común la hiperglicemia, que puede ser un indicio de predisposición a eventos oncológicos (Cosmin Stan & Paul, 2024).

1.3.2 Justificación práctica.

En el Perú, aproximadamente el 8% de su población padece de diabetes mellitus tipo 2, cifra que aumenta cada año(Carrillo-Larco & Bernabé-Ortiz, 2019); la importancia de los hallazgos de la investigación resultan vitales en salud pública, sobre todo en la toma de decisiones referidas a la prevención, disminución y tratamiento de esta patología; además el estudio permite establecer, la precisión diagnostica de la prueba Cometa para hallar el daño del ADN en células bucales en comparación con la prueba de micronúcleos, considerado el “Gold estándar” de las pruebas de

genotoxicidad, de esta manera obtendremos una prueba alternativa y práctica para la lectura e identificación del daño en el material genético.

1.3.3 Justificación metodológica.

La metodología de la investigación servirá de base para futuras investigaciones en nuestro ámbito, puesto que la mucosa bucal es un epitelio de fácil acceso, siendo la toma de la muestra no invasiva y genera un mínimo estrés. Así, la mucosa oral es ideal para aplicar pruebas de genotoxicidad sin necesidad de realizar cultivos celulares, para evaluar el daño del ADN que puede presentarse. En ese sentido la cavidad bucal puede reflejar el estado de salud de todo individuo, así la mucosa que la recubre puede evidenciar micro y macroscópicamente cambios propios de patologías locales y/o sistémicas o por exposición a toxinas, así como efectos colaterales por tratamientos requeridos.

1.3.4 Justificación económica social.

La presente investigación busca ser útil y beneficiosa directamente a toda persona con diabetes mellitus tipo 2 y de manera indirecta al familiar del paciente, así como a todo personal de salud, a la comunidad y entidades gubernamentales de la sanidad pública; para la implementación de estudios epidemiológicos en poblaciones vulnerables, como aquellos que padecen de diabetes mellitus, lo que conduciría a una reducción en el gasto público. Además de considerar al ensayo Cometa como un biomarcador accesible, no invasivo y económico de medir la toxicidad que pueda generarse a nivel genético.

CAPÍTULO 2: REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1 Antecedentes de investigación

Kawaguchi et al., en el 2010 desarrollaron una investigación para evaluar la sensibilidad de la prueba Cometa como ensayo de genotoxicidad. La metodología consistió en comparar la sensibilidad de la prueba Cometa con el test de micronúcleos, mediante la exposición de células linfoblástoides humanas a mutágenos como el metil metano sulfonato, la metilnitrosourea, el etil metano sulfonato, la etilnitrosourea, la bleomicina o la luz ultravioleta tipo C, se consideró como patrón de evaluación una cantidad menor de genotóxico a la que un mutágeno puede resultar en una prueba positiva de genotoxicidad. Los resultados obtenidos mostraron que para una dosis genotóxica baja el ensayo cometa detectó mayor o igual presencia de mutágenos en comparación con la prueba de micronúcleos, excepto para la bleomicina donde el ensayo cometa fue menor o igual en la detección de mutágenos que la prueba de micronúcleos. Finalmente concluyeron que la prueba Cometa presentó una precisión diagnostica menor en comparación con la prueba de micronúcleo, sin embargo, a pesar de la baja potencia de la prueba Cometa para hallar un nivel reducido de potencial genotóxico, una de las fortalezas más importantes de la prueba Cometa es que el daño a nivel del material genético (ADN) puede ser medido en una variedad de células distintas (Kawaguchi et al., 2010).

Binici et al., en el 2013, llevaron a cabo un estudio con el objetivo de determinar la frecuencia de micronúcleos e intercambio de cromátides hermanas en diabéticos tipo 2 en comparación con controles sanos. El estudio fue de tipo transversal y estuvo conformado por 30 controles sanos, 22 mujeres y 8 hombres, así como por 50 diabéticos tipo 2, 35 mujeres y 15 hombres; que oscilaban entre los 32 a 83 años y que fueron atendidos en el Hospital de Erzurum, Turquía. A cada paciente diabético se le evaluó la hemoglobina glicosilada, y se les tomó muestras de hemocultivos para la evaluación de micronúcleos. Los resultados del estudio mostraron que los pacientes diabéticos presentaban una frecuencia de intercambio de

cromátides hermanas mayor 7.11 ± 1.14 en comparación con los controles 4.96 ± 0.92 y que el intercambio de cromátides hermanas se correlacionan con la hemoglobina glicosilada; además los diabéticos presentaban una mayor frecuencia de micronúcleos 3.45 ±1.01 comparado con los pacientes sanos 1.79 ± 0.67, sin embargo, la frecuencia de micronúcleos no se correlacionaba con la hemoglobina glicosilada. La conclusión de la investigación fue que la diabetes mellitus tipo 2 es una patología caracterizada por un desequilibrio genómico que conlleva a un incremento en el número de intercambio de cromátides hermanas, así como en la frecuencia de MN. El aumento de la glucemia conlleva a estrés oxidativo, considerado un factor subyacente en la presencia de daño en las hebras del ADN, el cual se expresa con un mayor número de intercambio de cromátides hermanas y MN (Binici et al., 2013).

De Beer & Liebenberg, en el 2014 realizaron una revisión sistemática para hallar si el riesgo de cáncer aumenta la hemoglobina glicosilada independientemente de la diabetes. La metodología utilizada fue la búsqueda de artículos desde 1960 al 2014 en la base de datos de Science Direct y Scopus, solo fueron incluidos aquellos artículos que presentaban relación entre la hemoglobina glicosilada y cáncer. Los resultados obtenidos en la revisión indican que el riesgo de padecer diversos tipos de cáncer estaba muy relacionado con la hiperglucemia crónica, excepto el cáncer de próstata; además proporcionaron evidencia de que el riesgo ya está aumentado en los rangos normales de glucemia y de prediabetes para varios tipos de cáncer. Finalmente concluyeron que, resulta necesario un control glucémico estricto en todo tipo de paciente sea o no diabético, con la finalidad reducir el riesgo e incidencia/mortalidad por eventos oncológicos (de Beer & Liebenberg, 2014).

Anand et al., en el 2014 elaboraron un estudio para determinar si la diabetes mellitus aumenta el riesgo de cáncer por medio de las aberraciones cromosómicas. La metodología consistió en un estudio transversal, mediante la evaluación de 50 diabéticos: 25 tipo 1 y 25 tipo 2, además de 25 controles sanos; según sus hábitos y/o estilos de vida se les clasificó en fumadores/no fumadores y alcohólicos/no alcohólicos; para la evaluación de micronúcleos a

cada integrante del estudio se les tomó muestras de sangre. Los resultados hallados mostraron un incremento significativo en el número de aberraciones cromosómicas en el diabético tipo 1 fumador/alcohólico 1.4 ± 0.42, en el diabético tipo 2 fumador/alcohólico 2.48 ± 1.16 en comparación con el control sano 0.22 ± 0.14 y los diabéticos no fumadores 1.0 ± 0.33 y diabéticos no alcohólicos 1.2 ± 0.31. Concluyeron que, las aberraciones cromosómicas aumentadas en la diabetes mellitus puede ser como consecuencia del incremento del estrés oxidativo que conlleva a daño del ADN e inestabilidad genómica, contribuyendo a un mayor riesgo oncológico(Anand et al., 2014).

Le Hégarat et al., en el 2014 elaboraron una investigación para evaluar el rendimiento de las pruebas de genotoxicidad in vivo como el Comet assay y el test de micronúcleos en células Hepa RG. Su metodología consistió en la evaluación de la genotoxicidad humana mediante un modelo adecuado como las células Hepa RG, las cuales expresan las mismas funciones que los hepatocitos humanos, el rendimiento de la prueba Cometa y el test de micronúcleos en células Hepa RG fueron evaluados mediante la especificidad y sensibilidad de la prueba de 20 compuestos de la lista de publicada por el Centro Europeo para la validación de métodos alternativos; en las células Hepa RG durante 24 hrs. Los resultados obtenidos mostraron que la prueba Cometa tenía una alta especificidad (100%) comparada con el test de MN (80%), mientras que la prueba de MN presentaba una mayor sensibilidad (73%) que el ensayo cometa (44%). Los investigadores concluyeron que el ensayo cometa tuvo una precisión del 72% en comparación con la prueba de micronúcleos que tuvo una precisión del 75%(Le Hégarat et al., 2014).

Van der Leede et al., en el 2014, realizaron una encuesta a 147 empresas cuyos laboratorios habían realizado ensayos Cometas; con la finalidad de evaluar la incidencia de resultados positivos, negativos, equívocos o no concluyentes, así como la justificación para realizar el ensayo cometa in vivo y la aceptación regulatoria de dos ensayos in vivo negativos como la prueba Cometa y el test de MN. Se solicitó a los laboratorios en estudio que proporcionaran información detallada sobre el tipo de órganos evaluados, si se encontraron positivos, si los resultados positivos estaban asociados con

toxicidad orgánica y qué método se utilizó para evaluar la toxicidad. Finalmente concluyeron que el ensayo Cometa puede realizarse en cualquier tejido con suspensión celular única y como segundo ensayo in vivo puede ser utilizado la prueba de MN realizado en médula ósea o sangre periférica (van der Leede et al., 2014).

Morita et al., en el 2015, llevaron a cabo un estudio de prevalidación y validación de la prueba Cometa de pH alcalino in vivo en roedores, para calcular su capacidad para identificar correctamente carcinógenos químicos genotóxicos como alternativa a la prueba de síntesis de ADN (UDS) no programada de hígado de roedores. Para ello, se seleccionaron 40 sustancias químicas que sean carcinógenos genotóxicos, no carcinógenos genotóxicos, carcinógenos no genotóxicos, y sustancias no genotóxicas ni carcinógenas. Hallaron resultados positivos para los 19 carcinógenos genotóxicos seleccionados y negativos para las otras 21 sustancias químicas pertenecientes a las otras categorías (especialmente, carcinógenos no genotóxicos y no carcinógenos no genotóxicos). Finalmente concluyeron que el ensayo Cometa presenta capacidad predictiva frente a carcinógenos químicos genotóxicos y la capacidad alternativa del ensayo frente al ensayo UDS de hígado de roedores (Morita et al., 2015).

Grindel et al., en el 2017 elaboraron una investigación para analizar la inestabilidad genómica en diabéticos en relación con la hemoglobina glicosilada. Realizaron un estudio transversal, para lo cual evaluaron a 15 mujeres sanas como grupo control y 146 mujeres con diabetes mellitus, divididos en 2 grupos según su hemoglobina glicosilada: 74 con valores menores a 7.5 % y 72 mayores a 7.5 %; a cada participante se les evaluó el peso, la talla, la circunferencia de cintura y la presión arterial; la evaluación de micronúcleos se realizó mediante un frotis de la mucosa bucal en un portaobjetos, tincionadas con Schiff, contra teñidas con Light Green y observadas al microscopio. Los resultados obtenidos mostraron un incremento significativo de micronúcleos en diabéticos tipo 2 comparados con controles sanos y esta número de micronúcleos se duplicó en diabéticos con una hemoglobina glicosilada mayor a 7,5%; se presentó una correlación

positiva entre número de MN, HbA1c y glucemia en ayunas; las personas que fueron tratadas con insulina presentaron un incremento de hasta dos veces más en el número de MN que los sujetos bajo medicación de primera línea, ya sea sin medicamentos o con monoterapia sin uso de insulina. Los investigadores concluyeron que, la gravedad de la diabetes mellitus aparentemente se acompaña de un aumento de micronúcleos; como consecuencia del daño del ADN(Grindel et al., 2017).

Bhagat, en el 2018, llevaron a cabo un artículo de revisión con la finalidad de resumir los resultados de la prueba Cometa tanto in vivo como in vitro frente a carcinógenos del grupo 1 seleccionados de la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer y discutir la utilidad del ensayo cometa junto con otros ensayos genotóxicos. Los resultados hallados indicaron que el ensayo Cometa alcalino detectó una amplia gama de daños genéticos, incluyendo roturas monocatenarias y bicatenarias, roturas inducidas por reparación, lesiones álcalilábiles, y dio positivo para la mayoría de los carcinógenos que fueron negativos en otras pruebas. Hallaron que el ensayo Cometa in vivo presentaba una sensibilidad del 90% e in vitro del 86.9%, siendo la mejor combinación del ensayo Cometa con aberraciones cromosómicas, juntos presentaron una sensibilidad del 96.7 %. Finalmente, el estudio concluyó que, la mayoría de los datos accesibles que tenemos sobre sustancias químicas provienen de pruebas con animales y que existe una gran necesidad de recopilar todos los datos epidemiológicos existentes de toxicidad química humana para generar una central de datos que pueda servir de referencia para la evaluación de riesgos en humanos (Bhagat, 2018).

Jiang et al., en el 2019 llevaron a cabo una pesquisa para comparar la precisión diagnóstica y la utilidad del análisis de microarrays cromosómicos (CMA) y el cariotipo en el diagnóstico de anomalías cromosómicas. El estudio comprendió la evaluación de muestras clínicas de mujeres embarazadas tales como vellosidades, muestras de líquido amniótico y de sangre del cordón umbilical, con la finalidad de detectar anomalías cromosómicas. Los resultados hallados indican que el análisis de la curva ROC mostró que el área bajo la curva del cariotipo en el diagnóstico de anomalías cromosómicas fue

del 90.0%, así mismo, la sensibilidad y especificidad fueron del 87.56 % y el 91.22 %, respectivamente. Mientras que, el área bajo la curva de la CMA para determinar el diagnóstico de anomalías cromosómicas fue de 93.0%, con una sensibilidad del 90.68 % y una especificidad del 94.40 %. Finalmente concluyeron que, la CMA tiene mayor valor diagnóstico para la detección de anomalías cromosómicas, especialmente en embarazadas con cariotipos normales (Jiang et al., 2019).

Pfuhler et al., en el 2021, llevaron a cabo un estudio multicéntrico con la finalidad de validar el ensayo Cometa de piel reconstruida 3D (RS), sin la participación de animales, como una alternativa de seguimiento de resultados positivos de ensayos de genotoxicidad; la muestra estuvo células del tejido epitelial conformada por queratinocitos y fibroblastos los que fueron expuestos a electroforesis. Los hallazgos muestran que la prueba Cometa tuvo una sensibilidad del 77% y una especificidad del 88%. Esto, reflejó una aparente idoneidad para este ensayo, con un daño de fondo del ADN reproduciblemente bajo y una capacidad metabólica suficiente para activar promutágenos. Los investigadores concluyeron que la validación respalda el uso del ensayo Cometa para el seguimiento de resultados positivos de ensayos de genotoxicidad in vitro estándar cuando la vía de exposición prevista es el tejido epitelial. Estos hallazgos permitieron que el ensayo Cometa pueda ser aceptado en el programa de desarrollo de directrices de ensayos de sustancias químicas (Pfuhler et al., 2021).

OECD en el 2023, redactó la directriz N° 487, para el ensayo de sustancias químicas, donde establece a la prueba de MN como la prueba de genotoxicidad de referencia (Gold standard) para la detección de la actividad clastogénica y aneugénica en células que hayan experimentado división celular durante o después de la exposición de la genotoxina. Esta guía de ensayo también permite el uso de protocolos de la prueba de micronúcleos con y sin bloqueo de la citocinesis siempre que haya evidencia de que la población celular analizada ha experimentado mitosis (OECD, 2023).

2.2 Bases Teóricas

2.2.1 Pruebas de Genotoxicidad

2.2.1.1 Prueba de Micronúcleos (MN). Es un ensayo de genotoxicidad, empleado para evaluar efectos mutagénicos y aberraciones cromosómicas (Farabaugh et al., 2023), quiebre de cromosomas, necrosis, apoptosis, inadecuada reparación del ADN, pérdida de cromosomas, no disyunción (Akhmadullina, 2025). Es fácil de puntuar y requieren de menos tiempo que otras pruebas cromosómicas (Fenech et al., 2020). Esta prueba es importante para evaluar la genotoxicidad celular, la detección de anomalías cromosómicas como clastogenicidad o roturas de cromosomas y aneugesia o pérdida de cromosomas completos (Kuo et al., 2022). Según el tipo de célula a estudiar la prueba de micronúcleos (MN) puede ser:

Prueba de MN en linfocitos por Bloqueo de Citocinesis (CBMN). Se caracteriza principalmente por la puntuación de células binucleadas, donde la citocinesis se detiene mediante la adición de citocalasina B (Sioen et al., 2020). Utiliza linfocitos o diferentes líneas celulares de primates, conejos, perros, peces e incluso de humanos, con la finalidad de determinar el daño citogenético (Ruiz-Ruiz et al., 2020).

Prueba de MN de médula ósea de mamíferos. Prueba de micronúcleos que se caracteriza porque se lleva a cabo en eritrocitos de la médula ósea de roedores jóvenes, sin embargo, cuando se realiza en el biomonitoreo de poblaciones humanas, esta debe realizarse en sangre periférica considerando la selección esplénica (Jain & Pandey, 2019). El ensayo de micronúcleos de médula ósea de mamíferos utiliza eritrocitos inmaduros de roedores, conejos, perros, primates, etc., con la finalidad de detectar el daño químico a nivel cromosómico o en el aparato mitótico de los eritrocitos policromáticos micronucleadas de mamíferos, y de esta forma biomonitorear y hallar la toxicidad del ADN generada por exposición a sustancias tóxicas, productos químicos y drogas (Hayashi, 2016).

Prueba de MN en células bucales (BMM). Se utilizan ampliamente en la actualidad para investigar la exposición a carcinógenos genotóxicos (Wultsch et al., 2024). Se caracteriza porque las células son tomadas de la cavidad oral de humanos, considerando que los MN se forman en este tejido epitelial, donde se divide rápidamente (Bolognesi et al., 2017). Es utilizada con la finalidad de determinar el impacto genotóxico y la exposición citotóxica, en diversos eventos que implique daño de los componentes del núcleo de la célula, como al fumar, beber alcohol, ciertos tipos de cáncer y enfermedades degenerativas del sistema nervioso (González-Santiago et al., 2021). Esta prueba se caracteriza por ser un ensayo no invasiva y tolerado por toda persona (Wei et al., 2025).

Prueba de MN en otros tipos de células. Ensayos que se caracterizan porque pueden llevarse a cabo en diversas zonas tisulares como células de la mucosa nasal (Drummond et al., 2024), en células derivadas del tracto urinario; para determinar la genotoxicidad y poder monitorear ciertos tipos de cáncer (Kökenek Ünal & Aksoy Altınboğa, 2025).

2.2.1.2 Ensayo Cometa. Prueba de genotoxicidad que mide las roturas de la cadena del ADN (Cordelli et al., 2021). Permite la visualización del ADN fragmentado y proporciona una forma sencilla de evaluar cuantitativamente el daño genético (Langie et al., 2015). La prueba Cometa se puede realizar utilizando células individuales de líneas celulares para cualquier tipo de tejido que pueda dispersarse en una suspensión de células individuales (Gajski et al., 2020). El ensayo cometa está basada en la electroforesis en gel unicelular, es utilizado para determinar daño en el ADN (Lu et al., 2017), así como roturas del ADN que provocan la relajación del ADN superenrollado que luego se extiende para formar colas parecidas a cometas bajo electroforesis, la intensidad relativa del ADN en la cola se puede cuantificar e indica la frecuencia de rotura del ADN (Fabbrizi et al., 2021; Lu et al., 2017). El ensayo cometa representa una forma rápida, sensible, confiable, robusta y relativamente económica para poder estudiar el daño del ADN, la oxidación y la reparación del ADN en diferentes tipos celulares (Gajski et al., 2020). La prueba Cometa se basa en la incrustación de células en el gel de agarosa

colocada en láminas portaobjetos, se lisan mediante detergentes y son tratadas con un alto contenido de sal, siendo así la cromatina liberada, la cual se somete a electroforesis en condiciones determinadas de pH; posteriormente el ADN es tincionado mediante fluorocromos, dando como resultado un cometa con cabeza y cola (Karbaschi et al., 2019). Tiene la capacidad de identificar daños en el ADN a nivel de una sola célula, requiere de pequeñas cantidades de células por muestra, es de bajo costo, de fácil aplicación y flexibilidad del método para detectar diversos tipos de daño en el ADN (Dusinska et al., 2017).

Por otro lado, el ensayo cometa puede ser:

Ensayo Cometa neutro. Este ensayo mantiene las cadenas dobles de ADN y es utilizado para detectar roturas de ADN de doble cadena (Roy et al., 2021).

Ensayo Cometa alcalino. Este ensayo se realiza a un pH 8 e incluye un paso de desnaturalización. Es utilizado para detectar daños en el ADN más pequeños como las roturas de cadena simple y doble, el entrecruzamiento de proteínas de ADN, sitios lábiles a los álcalis, así como roturas de cadena simple de ADN asociadas con sitios de reparación de escisión incompleta (Dunkenberger et al., 2022).

Además, tenemos:

Ensayo Cometa en células bucales. Es un procedimiento que mide el daño del ADN en células individuales. Es sensible, rápido y puede ser utilizado para evaluar el daño al ADN causado por una variedad de factores. Aquí las células bucales se recogen de forma no invasiva y son procesadas por la electroforesis a un pH alcalino (Ladeira et al., 2024). El principio de la prueba Cometa se basa en medir el tamaño de la cabeza y la cola del ADN en forma de cometa (Russo et al., 2020).

2.2.2. Daño del ADN

2.2.2.1. Daño en el ADN según su origen

Daño en el ADN por causa endógena. Es el daño generado a nivel intracelular por procesos metabólicos celulares (Katerji & Duerksen-Hughes, 2021), formación de especies reactivas de oxígeno, predisponiendo del ADN al desarrollo de enfermedades hereditarias y cánceres esporádicos(Nilsson & Liu, 2020) e inexactitud en la replicación del ADN (Bhawsinghka et al., 2023).

Daño en el ADN por causa exógena. Es el daño en el ADN generado por agentes ambientales como radiación ionizante, radiación ultravioleta (UV) y diversos agentes químicos (Katerji & Duerksen-Hughes, 2021), además por el estilo de vida como fumar (Heilbrun et al., 2025), asimismo exposición a pesticidas y metales (Aguilar-Bañuelos et al., 2025).

2.2.2.2. Daño en el ADN desde el punto de vista estructural

Daño en el ADN por roturas de la cadena de ADN. Daño en el material genético como resultado de la radiación (Ballisat et al., 2025); si la rotura es de una sola cadena de ADN, la reparación en la mayoría de los casos es con precisión, en contraste con las roturas de doble cadena donde no hay plantilla (Cannan & Pederson, 2016).

Daño en el ADN por alteraciones de la base. Daño en el ADN que presenta mutaciones, es decir, la hebra del ADN ya no transcribe correctamente, siendo el resultado ilegible y lectura incorrecta, llamada mutación sin sentido (Li et al., 2025).

Daño en el ADN por entrecruzamiento de las hebras de ADN. Daño en el ADN generado cuando las especies reactivas de oxígeno provocan un enlace entre las hebras complementarias, lo que resulta en la incapacidad de separarse y por tanto de hacer una nueva copia (Sun et al., 2025)

2.2.3 Diabetes Mellitus

Es un grupo de alteraciones metabólicas del metabolismo de los hidratos de carbono en los que la glucosa se subutiliza como fuente de energía y se genera un incremento debido a una glucogenólisis y gluconeogénesis inadecuadas, conllevando a una hiperglucemia (Sacks et al., 2023).

2.2.3.1 Signos y síntomas de la diabetes mellitus. Generalmente la diabetes mellitus se presenta de forma asintomática, pero cuando se desarrollan síntomas, los pacientes suelen presentar poliuria, polidipsia y pérdida de peso (Nentwich & Ulbig, 2015; Ortiz-Martínez et al., 2022). Otra característica clínica para considerar en el diabético es el sobrepeso u obesidad, así como la presencia de signos de resistencia a la insulina, como la acantosis nigricans, es decir presencia de piel aterciopelada e hiperpigmentación en el cuello, axilas o pliegues inguinales (Videira-Silva et al., 2019).

2.2.3.2 Clasificación de la diabetes mellitus

Diabetes mellitus tipo 1. Patología generada por la destrucción autoinmune de las células β de los islotes de Langerhans del páncreas, que conlleva a una deficiencia absoluta de insulina (American Diabetes Association Professional Practice Committee, 2024).

Diabetes mellitus tipo 2. Patología generada por una pérdida progresiva no autoinmune de la secreción de insulina de las células β, frecuentemente en el contexto de resistencia a la insulina y síndrome metabólico (American Diabetes Association Professional Practice Committee, 2024).

Diabetes mellitus gestacional. Diabetes diagnosticada en el 2do o 3er trimestre del embarazo que conlleva a macrosomía fetal (American Diabetes Association Professional Practice Committee, 2024).

***Diabetes mellitus por otras causas*.** (American Diabetes Association Professional Practice Committee, 2024).

2.2.3.3 Diagnóstico de la diabetes mellitus. Además de los antecedentes familiares, enfermedades autoinmunes, resistencia a la insulina (de Candia et al., 2019), signos y síntomas, para determinar el diagnóstico de la DM2 se requiere el dosaje de pruebas de laboratorio como:

Dosaje Hemoglobina glicosilada (HbA1c). Prueba que mide los niveles de la glicemia promedio durante los últimos tres meses, tiene como ventaja que no requiere de ayunas para su dosaje. La diabetes se diagnostica con un valor mayor a 6.5%; siendo los valores normales menores a 5.7%, considerándose como prediabetes valores entre 5.7 a 6.4% (American Diabetes Association Professional Practice Committee, 2024).

Glucosa plasmática en ayunas (FPG). Prueba que mide los niveles de la glicemia en ayunas, sin ingesta de alimentos de 8 a 10 horas; se realiza a primera hora de la mañana. Se diagnostica como DM2 con una glucemia mayor o igual a 126 mg/dL, los valores normales de glucemia comprenden entre los 70 a 99 mg/dL. Se considera como prediabetes a una glucemia entre 100 a 125 mg/dL (American Diabetes Association Professional Practice Committee, 2024).

Prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT). Prueba de glucemia realizada antes y después de dos horas de tomar 75 gr. de glucosa anhidra o un desayuno mediterráneo glicémico. Se considera como una posible DM a un valor de glucemia mayor o igual a 200 mg/dL, siendo los valores normales menores a 140 mg/dL, se considera como prediabetes valores entre 140 a 199 mg/dL (American Diabetes Association Professional Practice Committee, 2024).

Prueba aleatoria de glucosa plasmática. Prueba que mide los niveles de la glicemia en cualquier momento del día, cuando el paciente presente síntomas de diabetes. La DM2 se diagnostica con un valor mayor o igual a 200 mg/dL (American Diabetes Association Professional Practice Committee, 2024).

2.2.4 Niveles glicémicos

2.2.4.1 Paciente diabético controlado. Es el objetivo primordial en el manejo de la diabetes mellitus para evitar daño orgánico y complicaciones propias de la diabetes. El control glicémico se logra mediante la evaluación de la HbA1c, el monitoreo continuo de la glucemia y el autocontrol de glucosa en sangre (Aloke et al., 2022). El autocontrol de glucosa en sangre se utiliza generalmente para ajustar la terapia con medicamentos, teniendo énfasis en las personas insulino requirientes. El monitoreo continuo de glucosa es importante para el éxito del tratamiento, en diabéticos tipo 1, en donde previene la hipoglicemia, y en la DM2 que recibe regímenes intensivos de insulina y regímenes asociados con hipoglicemia, mientras que la HbA1c es la métrica utilizada hasta la fecha para determinar el buen control glicémico***;*** *los v*alores. HbA1c. son 6.5 a 7.0 % (American Diabetes Association Professional Practice Committee, 2024).

2.2.4.2 Hiperglicemia (paciente diabético no controlado). Son las concentraciones de la glucosa sanguínea mayores a 125 mg/dL en ayunas y superiores a 180 mg/dL después de 2 horas de la ingesta de alimentos. Si los valores de la glucemia se encuentran entre los 100 a 125 mg/dL se considera como intolerancia a la glucosa o prediabetes (Hammer et al., 2019, Kashyap et al., 2023). Los valores de hiperglicemia están expresados por *una* HbA1c mayor a 7.0 %, una glicemia en ayunas mayor de 126 mg/dL, un test de tolerancia oral a la glucosa igual o mayor de 200 mg/dL (Association & American Diabetes Association, 2021c).

2.2.4.3 Objetivos recomendados para el control glicémico. *Una* HbA1c igual a 6.5 %, es considerado cuando los adultos con diabetes tipo 2 pueden reducir el riesgo de enfermedad renal crónica y retinopatía si el riesgo de hipoglucemia es bajo. Si el paciente presenta una HbA1c igual a 7.0 %, estos valores se presentan en la mayoría de los adultos con diabetes tipo 1 o tipo 2; una HbA1c entre 7.1 a 8.0 %, es un paciente que funcionalmente es dependiente; una HbA1c entre 7.1 a 8.5%.presenta una hiperglucemia severa recurrente y/o inconsciencia de hiperglucemia; una HbA1c entre 7.1 a 8.5 %, presenta una esperanza de vida limitada, asimismo está presente en ancianos

frágiles y/o con demencia; se debe evitar niveles altos de HbA1c para minimizar el riesgo de hiperglucemia sintomática y complicaciones agudas y crónicas (American Diabetes Association Professional Practice Committee, 2024).

2.2.5. Precisión diagnóstica

Es la idoneidad de un ensayo para reconocer correctamente la presencia o ausencia de una patología (Faizi & Alvi, 2023). Se asocia con la idoneidad de un test para diferenciar entre la condición objetivo y la salud (Santini et al., 2021). Se caracteriza por su repetibilidad, usando el mismo instrumento y operador durante un período corto. Además, se caracteriza por su reproducibilidad, utilizando el mismo proceso de medición entre diferentes instrumentos y operadores, durante períodos de tiempo más largos (Hazra & Gogtay, 2017).

La precisión diagnóstica está constituida por medidas como la sensibilidad y especificidad, valores predictivo positivo (VPP) y predictivo negativo (VPN) y el área bajo la curva ROC (Faizi & Alvi, 2023).

2.2.5.1. ***Sensibilidad.*** Es la probabilidad que un ensayo identifique como enfermo aquel que efectivamente lo está (Santini et al., 2021). Es la probabilidad de obtener un resultado positivo en la prueba en sujetos con enfermedad (Faizi & Alvi, 2023). La sensibilidad se expresa en porcentaje y se define como la proporción de sujetos verdaderos positivos con la enfermedad en un grupo total de sujetos con la enfermedad (verdaderos positivos/verdaderos positivos + falsos negativos) (Trevethan, 2017).

2.2.5.2. ***Especificidad***. Es la probabilidad que un ensayo identifique como no enfermo a aquel que efectivamente no lo está (Santini et al., 2021). Es la probabilidad de obtener un resultado negativo en la prueba en sujetos sin la enfermedad (Šimundić, 2009). La especificidad es la proporción de sujetos sin enfermedad con resultado negativo en el total de sujetos sin enfermedad (verdaderos negativos / verdaderos negativos + falsos positivos) (Trevethan, 2017). Tanto la sensibilidad como la especificidad no están influenciadas por

la prevalencia de la enfermedad, por lo tanto, los resultados de una investigación podrían transferirse fácilmente a otro entorno con una prevalencia diferente de la enfermedad en la población (Šimundić, 2009).

2.2.5.3. Valor Predictivo Positivo (VPP). Es la probabilidad que una persona con un resultado positivo en una prueba verdaderamente tenga la enfermedad en estudio (Monaghan et al., 2021). El VPP es la proporción de sujetos que dan un resultado positivo en la prueba y tienen la enfermedad (Santini et al., 2021). El VPP representa una proporción de pacientes con resultado de prueba positivo en el total de sujetos con resultado positivo (verdaderos positivos / verdaderos positivos + falsos positivos) (Safari et al., 2015).

2.2.3.4 Valor Predictivo Negativo (VPN). Es la probabilidad que una persona con un resultado negativo en una prueba verdaderamente no este afectada o no tenga la enfermedad en estudio (Monaghan et al., 2021). El VPN es la proporción de sujetos que dan un resultado negativo en la prueba y no tienen la enfermedad (Santini et al., 2021). El VPN es la proporción de sujetos sin la enfermedad con un resultado de prueba negativo en el total de sujetos con resultados de prueba negativos (verdaderos negativos/ verdaderos negativos + falsos negativos) (Safari et al., 2015).

2.2.5.5 Área bajo la curva ROC (AUC). Es considerado el mejor indicador global de la precisión de una prueba diagnóstica (Parodi et al., 2022a). El AUC se utiliza para evaluar el rendimiento de las pruebas diagnósticas. Cuanto más cerca esté la curva ROC de la esquina superior izquierda del gráfico, mayor será la precisión de la prueba porque en la esquina superior izquierda, la sensibilidad es = 1 y la tasa de falsos positivos es = 0, es decir la especificidad es = 1 (Nahm, 2022).

2.2.5.6 **Calculadora de pruebas diagnósticas.** Esta calculadora determina las características de la prueba diagnóstica (sensibilidad, especificidad, razones de probabilidad) y/o la probabilidad de enfermedad posterior a la prueba, dada la probabilidad previa a la prueba y las características de la prueba (Schoonjans, 2025).

2.2.5.7 **Nomograma de Fagan.** Es una herramienta que ayuda a determinar la probabilidad de enfermedad posterior a la prueba en función de la razón de verosimilitud (LR) de la prueba diagnóstica particular (Safari et al., 2016).

2.2.5.8 **Razón de verosimilitud (LR).** Los LR permiten a los investigadores determinar en qué medida la utilización de una prueba en particular alterará la probabilidad (Bolin & Lam, 2013). Los cocientes de verosimilitud no se ven afectados por la prevalencia de la enfermedad (Parikh et al., 2009).

LR positivo (+). Es la probabilidad de veces que una persona tenga una enfermedad cuyo resultado de la prueba es positivo (Bolin & Lam, 2013).

LR negativo (-). Es la probabilidad de veces que una persona no tenga la enfermedad cuyo resultado de la prueba es negativo (Bolin & Lam, 2013).

2.3. Marco conceptual

Biomarcador*.* Cualquier sustancia, estructura o proceso que pueda ser monitoreado en tejidos o fluidos y que prediga o influya en la salud(Davis & Milner, 2007).

Células epiteliales de la mucosa bucal. Son células del epitelio estratificado, forman parte de dos capas dentro de la mucosa bucal, la primera conformada por células epiteliales con una membrana basal y la segunda de un tejido conectivo subyacente, conocida como lámina propia (Squier & Kremer, 2001).

Células germinales. Son células que proporcionan el linaje o información genética y epigenética a las siguientes generaciones de un organismo multicelular (Saitou & Yamaji, 2012); este linaje es la fuente de

totipotencia, proporcionando para la creación de nuevos organismos(Ohinata et al., 2009).

Células somáticas. Son células diploides en humanos, cuyas mutaciones de ADN puede afectar a un individuo, pero no puede transmitirse a su descendencia(Hockemeyer et al., 2009).

Daño del ADN. Es toda lesión o modificación del ADN que cambia sus propiedades de codificación o su función normal en la transcripción o replicación(Nilsson & Liu, 2020).

Genotoxina. Es todo agente o sustancia que puede generar daño en el material genético o en cromosomas. Si el daño generado es una célula germinal, puede causar un rasgo alterado hereditario o mutación en la línea germinal, pero si el daño generado es en una célula somática, puede causar una mutación somática, la cual a su vez puede conducir a un evento maligno, como el cáncer(Phillips & Arlt, 2009, Choudhuri et al., 2021).

Hemoglobina glicosilada (HbA1c). Son compuestos estables formados por la unión de la hemoglobina con la glucosa en un proceso no enzimático irreversible (Chen et al., 2022). La HbA1c refleja la glucosa unida a la hemoglobina durante la vida del eritrocito (aproximadamente 120 días) y, por lo tanto, es un promedio ponderado que se ve más afectado por la exposición reciente a la glucosa en sangre, esto significa que se pueden observar cambios clínicamente significativos en la HbA1c en menos de 120 días (American Diabetes Association Professional Practice Committee, 2024).

Micronúcleos. Son cromosomas completos o fragmentos cromosómicos que se generan durante el anafase y que quedan rezagados cuando el núcleo se divide. Estos fragmentos, después de la telofase, pueden no incluirse en los núcleos de las células hijas, formando MN únicos o múltiples en el citoplasma(Fenech, 2000).

Mutación. Alteración en la secuencia del ADN(Poduri et al., 2013).

Pruebas de genotoxicidad. Son pruebas que evalúan el comportamiento biológico de una enfermedad, pero no es considerado una medida de la enfermedad, trastorno o condición de salud en sí misma(Schulte & Mazzuckelli, 1991). Son test in vitro e in vivo diseñadas para detectar sustancia, estructura o proceso que inducen daño genético por diversos mecanismos, permitiendo la identificación y fijación del daño del ADN (Hsieh et al., 2019).

Pruebas de genotoxicidad in vitro. Son utilizadas para investigar el posible efecto genotóxico de insumos médicos, así como productos de la industria farmacéutica, productos cotidianos, factores físicos, químicos y tóxicos (Vasdev et al., 2022). Como la prueba de Ames, el ensayo de linfoma de ratón, el análisis de la frecuencia de aberraciones cromosómicas, el ensayo de intercambio de cromátidas hermanas, la prueba de MN con bloqueo de citocinesis y la prueba Cometa (Moore et al., 2019).

Pruebas de genotoxicidad in vivo. Las pruebas *in vivo* permiten investigar cambios asociados a diversas enfermedades, así como el entorno laboral y el impacto de los factores ambientales (Ladeira & Smajdova, 2017); las más importantes son, la prueba Cometa, el test de aberración cromosómica y las pruebas de MN (Turkez et al., 2017).

CAPÍTULO 3: PROPUESTA

3.1.- Objetivo General

Determinar la precisión diagnóstica del ensayo Cometa en la determinación del daño del ADN en células bucales de pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

3.2.- Objetivos Específicos

Determinar los valores de hemoglobina glicosilada de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 según los niveles de daño en el ADN células bucales por medio del ensayo Cometa.

Determinar los valores de hemoglobina glicosilada de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 según los niveles de daño en el ADN en células bucales por medio de la prueba de micronúcleos.

Determinar la sensibilidad y especificidad del ensayo Cometa en la determinación del daño del ADN en células bucales de pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

Determinar los valores predictivos positivos y negativos del ensayo Cometa para determinar el daño del ADN en células bucales de pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

3.3.- Hipótesis

H_0 = El ensayo Cometa no es preciso como prueba diagnóstica para determinar el daño del ADN en células bucales de pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

H_1 = El ensayo Cometa es preciso como prueba diagnóstica para determinar el daño del ADN en células bucales de pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

3.4. Identificación de variables

3.4.1. Precisión diagnóstica

Es la idoneidad de un ensayo para reconocer correctamente la presencia o ausencia de una patología (Faizi & Alvi, 2023). Se asocia con la idoneidad de un test para diferenciar entre la condición objetivo y la salud (Santini et al., 2021). Está constituida por medidas como la sensibilidad y especificidad, valores predictivos positivos y negativos, así como por el área bajo la curva ROC (Faizi & Alvi, 2023).

3.4.2. Pruebas para la identificación del daño en el ADN de células bucales.

Son pruebas que evalúan el comportamiento biológico de una enfermedad. Son las pruebas que detecta toda lesión o modificación del ADN de las células epiteliales de la mucosa bucal, que genera cambios en sus propiedades de codificación o en su función normal en la transcripción o replicación(Groeger & Meyle, 2019). Este tipo de ensayo son denominadas pruebas de genotoxicidad elaboradas para hallar el daño del ADN por diversos mecanismos, permitiendo la identificación y fijación del daño generado (Hsieh et al., 2019).

3.5.- Operacionalización de Variables

PRECISIÓN DIAGNÓSTICA DEL ENSAYO COMETA PARA DETERMINAR DAÑO DEL ADN EN CÉLULAS BUCALES DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIÓN	INDICADOR	VALORES	TIPO	ESCALA
PRECISIÓN DIAGNÓSTICA	Capacidad de una prueba para producir los mismos resultados cada vez que se aplica en similares condiciones		Sensibilidad	0 a 100 %	Cuantitativa	Continua
			Especificidad	0 a 100 %		
			Área bajo curva AUC	0 a 100 %		
			Valor Predictivo Positivo	0 a 100 %		
			Valor Predictivo Negativo	0 a 100 %		
PRUEBAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN DE CÉLULAS BUCALES	Pruebas que detectan toda lesión o modificación en el ADN de células epiteliales bucales, que genera cambios en su función normal transcripción o replicación	Prueba de Micronúcleos (MN)	Visualización del nivel de daño en el ADN según micronúcleos	Prueba de MN Positivo (daño moderado daño severo)	Cualitativo	Nominal
				Prueba de MN Negativo (ausente de daño daño leve)		
		Ensayo Cometa	Visualización del nivel de daño en el ADN según Cometa	Ensayo Cometa Positivo	Cualitativo	Nominal
				Ensayo Cometa Negativo		

3.6.- Matriz de Consistencia

PRECISIÓN DIAGNÓSTICA DEL ENSAYO COMETA PARA DETERMINAR DAÑO DEL ADN EN CÉLULAS BUCALES DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES			
			VARIABLES	DIMENSIÓN	INDICADOR	VALOR
¿Cuál es la precisión diagnóstica del ensayo Cometa en la determinación del daño del ADN en células bucales de pacientes con DM2? ***PROBLEMAS ESPECÍFICOS*** ¿Cuáles son los valores de la HbA1c de los pacientes con DM2 según los niveles de daño en el ADN células bucales por medio del ensayo Cometa? ¿Cuáles son los valores de la HbA1c de los pacientes con DM2 según los niveles de daño en el ADN en células bucales por medio de la prueba de micronúcleos? ¿Cuál será la sensibilidad y especificidad del ensayo Cometa en la determinación del daño del ADN en células bucales de pacientes con DM2? ¿Cuáles son los valores predictivos positivos y negativos del ensayo Cometa para determinar el daño del ADN en células bucales de pacientes con DM2?	Determinar la precisión diagnóstica del ensayo Cometa en la determinación del daño del ADN en células bucales de pacientes con DM2. ***OBJETIVOS ESPECÍFICOS*** Determinar los valores de HbA1c de los pacientes con DM2 según los niveles de daño en el ADN células bucales por medio del ensayo Cometa Determinar los valores de HbA1c de los pacientes con DM2 según los niveles de daño en el ADN en células bucales por medio de la prueba de micronúcleos Determinar la sensibilidad y especificidad del ensayo Cometa en la determinación del daño del ADN en células bucales de pacientes con DM2 Determinar los valores predictivos positivos y negativos del ensayo Cometa para determinar el daño del ADN en células bucales de pacientes con DM2.	H_0 = El ensayo Cometa no es preciso como prueba diagnóstica para determinar el daño del ADN en células bucales de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 H_1 = El ensayo Cometa es preciso como prueba diagnóstica para determinar el daño del ADN en células bucales de pacientes con diabetes mellitus tipo 2	**PRECISIÓN DIAGNÓSTICA**		Sensibilidad	0 a 100 %
					Especificidad	0 a 100 %
					Área bajo la curva AUC	0 a 100 %
					Valor Predictivo Positivo	0 a 100 %
					Valor Predictivo Negativo	0 a 100 %
			PRUEBAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN DE CÉLULAS BUCALES	Prueba de Micronúcleos (MN)	Visualización del nivel de daño en el ADN según micronúcleos	Prueba de MN Positivo
						Prueba de MN Negativo
				Ensayo Cometa	Visualización del nivel de daño en el ADN según Cometa	Ensayo Cometa Positivo
						Ensayo Cometa Negativo

CAPÍTULO 4: MATERIAL Y MÉTODO

4.1. Comité de ética

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Nacional PNP “Luis N. Sáenz” N°01-2023-DIRSAPOLPNP./CH.PNP.LNS/COMTINV (anexo 1) además cuenta con el permiso del Dirección de Sanidad Policial mediante Decreto N°0237-2023-DIRSAPOL/HN.PNP”LNS”-SEC-UNITRDOC (anexo 2); la investigación se realizó de acuerdo a los Principios de la Declaración de Helsinki, adoptada por la 18ava Asamblea Médica Mundial (World Medical Association, 2013) y modificada en la 64° Asamblea General Fortaleza, Brasil, octubre 2013; para lo cual, la población seleccionada para el estudio previamente firmó de manera voluntaria el consentimiento informado para salvaguardar los cuatro pilares de la bioética en investigación, el principio de no maleficencia, beneficencia, autonomía y justicia (anexo 3). La investigación garantizó la originalidad, como pilar fundamental ético, en la estructura de la investigación. Contó con el rigor científico requerido; cada integrante del estudio decidió de forma voluntaria pertenecer a la investigación firmando un consentimiento informado. Se garantizó la privacidad, el bienestar físico y psicológico de cada una de las integrantes de la investigación.

4.2. Diseño del estudio

La presente investigación fue un estudio observacional, transversal (Pallás, 2019); que evaluó la precisión como prueba diagnóstica del ensayo Cometa mediante los valores de sensibilidad, especificidad valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para la determinación del daño del ADN en células bucales de pacientes con DM2.

4.3 Casuística

4.3.1 Población de estudio

Estuvo conformado por 1500 pacientes que padecían solo de DM2, comprendidos entre los 35 y 74 años, los cuales se encontraban citados y acudían a atenderse en el Departamento de Endocrinología y Enfermedades Metabólicas del (DEEM) del HNPNP-LNS, desde el 11 de febrero al 12 de abril del 2024. El grupo de pacientes sanos estuvo conformado por un familiar

acompañante de cada paciente diabético tipo 2, según edad y sexo del paciente seleccionado.

4.3.2 Unidad de análisis

La unidad de análisis de la investigación fueron las células epiteliales de la mucosa oral de los pacientes con DM2.

4.3.3 Tamaño de muestra

Estuvo conformada por 128 pacientes, para ello se utilizó como programa estadístico el software EPIDAT 4.2, donde la sensibilidad esperada para la prueba de Micronúcleos (prueba 1 o de referencia) fue 73.00% y la sensibilidad esperada para el ensayo Cometa (prueba 2) fue 44.00%, mientras que la especificidad esperada para el test de MN fue 80.00% y para la prueba Cometa fue 99.00% (Le Hégarat et al., 2014), ambas con un nivel de confianza de 95.0 %, y una razón de no enfermos/enfermos de 1.00. Se obtuvo un total de 62 enfermos (pacientes con DM2) y 56 no enfermos (pacientes sanos) a una potencia del 90.00 %, motivo por el cual para aumentar la probabilidad de detectar diferencias significativas entre grupos se optó por considerar en aumentar la cifra a 64 el número de pacientes con DM2 y 64 el número de pacientes sanos, teniendo un total de 128 participantes, ver tabla 1.

Tabla 1. Tamaño de la muestra para pruebas diagnósticas. Grupos emparejados.

Sensibilidad esperada			
Prueba 1			73.000%
Prueba 2			44.000%
Especificidad esperada			
Prueba 1			80.000%
Prueba 2			99.000%
Nivel de confianza			95.00%
Resultados			
Potencia (%)	**Tamaño de la muestra**		
	Enfermos	No enfermos	TOTAL
80.00	47	43	90
90.00	62	56	118
	64	64	128

Fuente: Base de datos del investigador

4.3.3.1 Tipo de Muestreo. El muestreo fue probabilístico, así todos los integrantes del estudio tuvieron la probabilidad de ser incluidos en la muestra. El muestreo aleatorio y estratificado, se realizó mediante el software estadístico SPSS (los detalles se explican en la selección de la muestra), la muestra fue dividida en estratos por edad y el sexo (Pallás, 2019), para asegurar que la muestra presente la misma distribución que la población.

Criterios de inclusión. Pacientes que padecían de DM2 de ambos sexos, con edades entre los 35 a 74 años, que acudieron a atenderse al DEEM del HNPNP-LNS, con una duración de la enfermedad mayor de cinco años, considerando que el mayor riesgo de eventos oncogénicos ocurre después de 5 a 8 años de diagnosticado la DM2 (Hu et al., 2021). Los pacientes acudieron con sus resultados de HbA1c expedidos por el Departamento de Laboratorio de Análisis Clínicos y Anatomía Patológica del HNPNP-LNS con una antigüedad no mayor de 15 días previos a la evaluación, así de esta manera se homogenizó los resultados de la HbA1c.

Criterios de exclusión. Se excluyó a todo paciente con tratamientos de radioterapia, quimioterapia (Katerji & Duerksen-Hughes, 2021), pacientes que por su actividad laboral se encuentren expuestos a pesticidas, sustancias tóxicas (Aguilar-Bañuelos et al., 2025), fumadores y/o alcohólicos (Heilbrun et al., 2025), con antecedente de cáncer o tratamiento oncológico (Nihira et al., 2025), diabéticos tipo 1, diabéticas embarazadas, y todo participante que no presente resultados de HbA1c o que presenten resultados de HbA1c de laboratorios clínicos ajenos al HNPNP-LNS.

4.3.3.2 Diseño Muestral. Con la finalidad de aumentar la eficiencia estadística y disminuir el sesgo asociado a factores de confusión conocidos, se realizó el emparejamiento o matching de la muestra, en función de la edad y el sexo, con la finalidad de asegurar la homogeneidad de los pacientes en estudio (Lazcano-Ponce et al., 2001).

4.3.4 Selección de la Muestra

Se solicitó al DEEM del HNPNP-LNS, la relación de pacientes citados del 11 de febrero al 12 de abril del 2024, a cada paciente DM2 de la lista se le asignó un número específico. Con la relación de los datos generales de los pacientes se elaboraron 02 listas en Excel: una lista solo con pacientes de sexo femenino y otra lista con pacientes de sexo masculino, las cuales fueron posteriormente trasladadas al software estadístico SPSS versión 27 para el proceso de aleatorización. En la casilla de datos del SPSS, se seleccionó "selección de casos", a continuación "muestra aleatoria de casos" y en tamaño de la muestra se consignó "exactamente" 32 pacientes diabéticos del total de pacientes de sexo femenino, del mismo modo se procedió con los 32 pacientes diabéticas de sexo masculino, con un total de 64 diabéticos tipo 2 seleccionados.

La selección de los participantes sanos estuvo ligada en razón del paciente diabético tipo 2 así fueron considerados todo familiar que acompañaba al paciente con diabetes tipo 2 seleccionado, confeccionándose una relación pre clasificatoria con datos como edad y sexo, de dos familiares por cada uno de los pacientes con diabetes tipo2. Se respetó los criterios de exclusión. Una vez seleccionados los 64 participantes sanos, se le solicitó a cada uno de ellos, previa coordinación con el endocrinólogo, el examen en sangre de la HbA1c, con la finalidad de descartar hiperglucemia.

Es importante enunciar, que antes del inicio de la evaluación, a todo paciente seleccionado, se le informó si deseaba participar en la investigación **"**Precisión diagnóstica del ensayo cometa para determinar daño del ADN en células bucales de pacientes con diabetes mellitus tipo 2", si la respuesta fue afirmativa se procedió con la lectura del Consentimiento Informado respectivo (anexo 3), el cual fue llenado y firmado por el mismo paciente, después de aclarar sus dudas o preguntas sobre el estudio. Es importante añadir que el Consentimiento Informado fue redactado conforme al formato de "Consentimiento Informado para las actividades de docencia durante la atención de salud" según la Norma Técnica de Salud para la Gestión de la Historia Clínica, NTS N°139-MINSA/2018/DGAIN (anexo 4), y según "La Guía

para la Elaboración del Documento de Consentimiento Informado" del Instituto Nacional de Salud-INS (anexo 5).

4.4 Método

4.4.1 Técnicas de recolección de datos

4.4.1.1. Procedimiento*.* La recolección de los datos generales del paciente como nombres y apellidos, documento de identidad, dirección y número telefónico, fueron llenados en un registro aparte en donde se le asignó un "código" a cada paciente con la finalidad de conservar la confidencialidad del paciente. Una vez obtenido el código, se procedió a llenar la ficha de recolección de datos (anexo 6), cumpliendo con el protocolo de atención del DEEM-HNPNP-LNS. Se solicitó a cada paciente los resultados de su HbA1c, con una antigüedad no mayor de 15 días previos a la evaluación, conforme a lo establecido (anexo 7). Los resultados de la HbA1c permitieron clasificar al paciente en diabético no controlado, si presentó una HbA1c mayor a 7 %, y en diabético controlado, si el paciente presentó una HbA1c menor o igual a 7 % (Sherwani et al., 2016). Solo se aceptaron los resultados de HbA1c emitidos por el Laboratorio de Análisis Clínicos y Anatomía Patológica del HNPNP-LNS. Para la toma de las muestras de células bucales, se solicitó al participante que se enjuagara la boca dos veces, con 100 ml de agua destilada, para eliminar el exceso de restos de alimentos que pudiesen quedar en la cavidad oral. Se preparó dos microtubos eppendorf de 1.5 ml, etiquetados con el código correlativo. Cada microtubo contenía 1.5 ml de buffer para células bucales (Buffer Tris, 0.01 M; EDTA, 0.0007 M; NaCl 0.01 M; pH 7.0) (Belmans et al., 2020). Se tomó la muestra por medio de cepillos interdentales. Se colocó la cabeza de cada cepillo en el microtubo y se giró en varias ocasiones, para que las células sean desalojadas libremente en el buffer. Los cepillos utilizados fueron descartados.

Cada microtubo estaba registrado con un código asignado a cada participante, con la finalidad de conservar el anonimato de este. Los microtubos con las muestras de células bucales fueron trasladados en un cooler con dirección al Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de

Odontología de la UNMSM. Se procedió a homogeneizar y centrifugar cada muestra a 2.000 rpm por 5 minutos. Se realizaron 02 lavados secuenciales con solución buffer para células bucales.

Ensayo Cometa. Se prepararon portaobjetos con agarosa bajo punto de fusión, donde fueron colocadas las células de la mucosa bucal recolectadas. Estas láminas fueron colocadas en una solución de lisis alcalina, a pH=10, por 24 horas a 4ºC. Después, las láminas fueron lavadas y llevadas a tratamiento alcalino para permitir que las roturas de hebra del ADN se pudieran detectar durante la electroforesis (pH 9.1). Posteriormente, las láminas fueron teñidas con SYBR-GREEN y evaluadas en un microscopio de fluorescencia Biobase, de campo amplio convencional con una excitación 450-490 nm, una emisión mayor a 590 nm y espejo dicromático 505 nm. Se cuantificaron los cometas identificables por campo visual, en función a los criterios de Speit y Collins: categoría 0 o células sin daño del ADN de hasta 5 µm, categoría I o células con nivel leve o bajo daño del ADN de 6 a 20 µm, categoría II o células con nivel medio o moderado daño del ADN de 21 a 40 µm, categoría III o células con alto nivel de daño del ADN de 41 a 95 µm y categoría IV o células con severo daño del ADN de 96 µm a más (Collins, 2004; Speit & Hartmann, 1999).

Prueba de Micronúcleos. Se realizaron frotices en láminas portaobjetos para la evaluación del daño del ADN mediante la prueba de MN. Para cuantificar el daño del ADN, se estableció una categoría de daño celular en función a la presencia de MN por cada 1000 células epiteliales observadas según los criterios de Tolbert (Tolbert et al., 1992) y fueron reportados en niveles según los criterios de Hagmar: no presenta daño del ADN o no se observan MN/1000 células, daño del ADN leve de 1 a 2 MN/1000 células, daño del ADN moderado de 3 a 4 MN/1000 células, daño del ADN alto de 5 a 6 MN/1000 células y daño del ADN muy alto de 7 MN/1000 células a más (Hagmar et al., 1998).

Los resultados sobre la longitud del cometa y la frecuencia de micronúcleos fueron reportados en la ficha de recolección de datos (anexo 6).

4.4.1.2. Lugar de la recolección de datos y del procesamiento de la muestra.

La recolección de los datos generales del paciente se realizó en los consultorios del DEEM-HNPNP-LNS. La toma de la muestra de células bucales fue llevada a cabo en un ambiente acondicionado del DEEM-HNPNP-LNS. El procesamiento y la lectura de las muestras se realizó en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Odontología de la UNMSM.

4.4.1.3. Condiciones de recolección de datos. Una condición fundamental para iniciar la recolección de datos fue la aceptación y firma del consentimiento informado por parte del paciente (anexo 3). A cada uno se le solicitó, como requisito indispensable, la presentación de sus resultados de HbA1c, con una antigüedad máxima de 15 días. Los resultados de HbA1c permitieron clasificar al paciente en diabético no controlado con una HbA1c mayor a 7.0 % y como diabético controlado con una HbA1c menor o igual a 7.0 % (Sherwani et al., 2016). Para evitar cualquier sesgo, solo fueron aceptados los resultados de HbA1c reportados por el Departamento de Laboratorio de Análisis y Patología Clínica del HNPNP-LNS, los pacientes con resultados de otro laboratorio no fueron aceptados para el estudio.

4.4.1.4. Codificación de datos. La recolección de los datos generales del paciente como sus nombres y apellidos, documento de identidad, dirección y número telefónico, fueron llenados en un registro aparte. Se asignó un código a cada paciente para conservar la confidencialidad de este. Este código fue registrado en la ficha de recolección de datos, la cual presentó una zona desglosable, con la finalidad de dividir la ficha en dos partes una donde se consignarán los datos generales y otra parte donde se registran los datos referidos a las variables en estudio; este código también fue registrado en los microtubos que contendrán buffer para células de la mucosa bucal para el análisis del daño del ADN. El transporte de la muestra hacia el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Odontología de la UNMSM. estuvo acompañado solo con la parte desglosada de la ficha de recolección de datos que solo contiene los datos de las variables en estudio; con la finalidad de guardar la privacidad y confidencialidad de los datos del paciente.

4.4.1.5. Técnica de recolección de datos. Se realizó la técnica observacional directa, para tener contacto personal al realizar la entrevista, la evaluación clínica y la toma de la muestra a todo participante del estudio. Toda esta información fue anotada en la ficha de recolección de datos (anexo 6).

4.4.1.6. **Instrumentos en la recolección de datos**

Evaluación del daño en el ADN. Se utilizó como instrumento de medida, las dos pruebas de genotoxicidad: la prueba de MN como "Gold Standard" y la prueba Cometa. La prueba de micronúcleos, cuyo instrumento de medida está basado en función a la presencia de MN por cada 1000 células epiteliales observadas según los criterios de Tolbert y reportada en niveles según los criterios de Hagmar (Tolbert et al., 1992, Hagmar et al., 1998), ver procedimiento. Estos resultados posteriormente fueron categorizados de forma dicotómica en *negativo* (sin daño o daño leve del ADN de 0 a 3 MN/1000 células) y *positivo* (con daño moderado a severo del ADN de 4 MN/1000 células a más). El ensayo Cometa, cuyo instrumento de medida está basado en función de la longitud del cometa, fue reportado en función a los criterios de Speit y Collins (Collins, 2004; Speit & Hartmann, 1999), ver procedimiento. Estos resultados posteriormente fueron categorizados de forma dicotómica en *negativo* (sin daño en el ADN) y *positivo* (con daño severo del ADN) según lo hallado en la evaluación estadística.

4.5 Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron trasladados a un archivo Excel y llevados para el análisis estadístico en el software SPSS (versión 27). Se realizó la estadística descriptiva para hallar la media ± desviación estándar y porcentajes. El daño del ADN en células de la mucosa oral fue evaluado mediante la longitud del cometa por medio de la prueba Cometa y el número de MN por medio de la prueba de micronúcleos. Se consideró a la longitud del Cometa y al número de MN, como variables cuantitativas. Los valores promedio de la HbA1c fueron calculados con un intervalo de confianza del 95% (IC 95%) y fueron evaluados según el nivel de daño en el ADN. Para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa entre los valores

de HbA1c y los niveles de daño en el ADN se utilizó la prueba de Kruskall Wallis para los resultados medidos por las pruebas Cometa y micronúcleos. La precisión del ensayo Cometa se determinó calculando el área bajo la curva (AUC). Además, se calcularon la sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN). Se utilizaron los intervalos de confianza (IC) del 95% del AUC, la sensibilidad y la especificidad para cuantificar la incertidumbre. La sensibilidad del ensayo Cometa se calculó dividiendo el número de verdaderos positivos entre el número total de personas que fueron positivos según la prueba de MN. La especificidad del ensayo Cometa se calculó dividiendo el número de verdaderos negativos entre el número total de personas que fueron negativos según la prueba de MN. Para obtener la curva ROC, se calculó la tasa de verdaderos positivos y la tasa de falsos positivos según los intervalos seleccionados. Fue necesario hallar el área bajo la curva (AUC) y los puntos de corte de la curva ROC, para determinar los valores de sensibilidad y falsos positivos (1-especificidad). Así, la variable longitud del cometa fue categorizada en una variable dicotómica, positivo (con daño en el ADN) y negativo (sin daño en el ADN). Para fortalecer la evaluación, se utilizó la calculadora para pruebas diagnósticas, se obtuvo el valor predictivo positivo (probabilidades que realmente presente daño severo en el ADN) y el valor predictivo negativo del ensayo Cometa (probabilidades que realmente no presente daño en el ADN), así como su impacto en la utilidad clínica (ver anexo 8). Para la prueba de hipótesis sobre la precisión diagnostica se tomó el valor del área bajo la curva ROC (AUC), considerado como el mejor indicador global de la precisión de una prueba diagnóstica (Parodi et al., 2022). Si el área bajo la curva ROC es mayor a 0,5 y un p-valor < 0,05 se acepta la hipótesis alterna y se rechaza la hipótesis nula y se considera al ensayo Cometa como una prueba diagnóstica precisa para determinar el daño del ADN en células bucales de pacientes con diabetes mellitus tipo 2; pero si área bajo la curva es igual a 0,5 y un p-valor es mayor o igual al nivel de significancia se rechaza la hipótesis alterna y se concluye con la hipótesis nula.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS

5.1. Estadística descriptiva

El estudio estuvo conformado por una muestra de 128 pacientes, 64 con DM2 y 64 pacientes del grupo control; el 46.9 % eran mujeres mientras que el 53.1 % fueron hombres. La media de la edad de los pacientes en estudio fue 57.74 ± 11.08 años. La media de la HbA1c en el grupo con DM 2 fue 8.15 ± 2.21 % mientras que en el grupo control/sanos fue 5.16 ± 0,16 %. La frecuencia media de MN en células bucales en el grupo con DM2 fue 03 veces mayor en relación con el número de MN del grupo control. La longitud del Cometa en el grupo con DM2 fue 59.91 ± 27.64 um., mientras que en el grupo control fue 23.55 ± 14.91um. La caracterización de cada grupo en estudio se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2. **Características de los grupos de pacientes**.

			GRUPO SANOS	GRUPO DM2	TOTAL
CARACTERÍSTICAS			**(n=64)**	**(n=64)**	**(n=128)**
Edad (años)		ẍ ± DS	56.19 ± 12.27	59.30 ± 9.59	57.74 ± 11.08
HbA1c (%)		ẍ ± DS	5.16 ± 0,16	8.15 ± 2.21	6.65 ± 2.16
MN x 1000 células		ẍ ± DS	0.63 ± 0.78	4.05 ± 2.15	2.34 ± 2.35
Long. Cometa (um)		ẍ ± DS	23.55 ± 14.91	59.91 ± 27.64	41.73 ± 28.68
Sexo	**Masculino**	N (%)	32 (25.0%)	36 (28.1%)	68 (53.1%)
	Femenino	N (%)	32 (25.0%)	28 (21.9%)	60 (46.9%)
		N (%)	64 (50.0%)	64 (50.0%)	128 (100.0%)

N: número de pacientes, ẍ: promedio, DS: desviación estándar, MN: Micronúcleos, HbA1c: Hemoglobina glicosilada, *u*m: micrómetros

Fuente: Base de datos del investigador

5.2. Estadística inferencial

5.2.1. Valores de hemoglobina glicosilada según niveles de daño del ADN de células bucales por el ensayo Cometa y tipo de paciente

Los pacientes sanos (celeste) presentaron una HbA1c media de 5.00% en ausencia de daño en el ADN, una HbA1c media de 5.07 IC 95% [5.00-5.14]% presentaron daño leve, una HbA1c media de 5.23 IC 95% [5.20-5.26]% presentaron daño moderado y una HbA1c media de 5.50 IC 95% [5.43-5.51]% presentaron daño alto del ADN. Los pacientes con DM2 (rojo) presentaron una HbA1c media de 5.50 IC 95% [5.51-5.54]% con daño leve, una HbA1c media de 6.13 IC 95% [5.70-6.56]% presentaron daño moderado, una HbA1c media de 8.17 IC 95% [7.50-8.84]% presentaron daño alto y una HbA1c media de 10.98 IC 95% [10.66-11.30]% presentaron daño severo del ADN. Según la prueba de Kruskall Wallis, existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de HbA1c y los niveles de daño del ADN según el ensayo Cometa ($p<0.001$), se evidencia que a medida que aumentan la HbA1c aumentan los niveles de daño en el ADN en pacientes sanos y con DM2. Además, existe una muy buena y fuerte correlación entre los valores de la HbA1c y los niveles de daño en el ADN ($rho=0.873$, $p<0.0001$) en los pacientes con DM2 mientras que en los pacientes sanos la correlación es buena ($rho=0.789$, $p<0.001$) al ser medidos por el ensayo Cometa, ver Fig. 1 y Anexo 9 y 10.

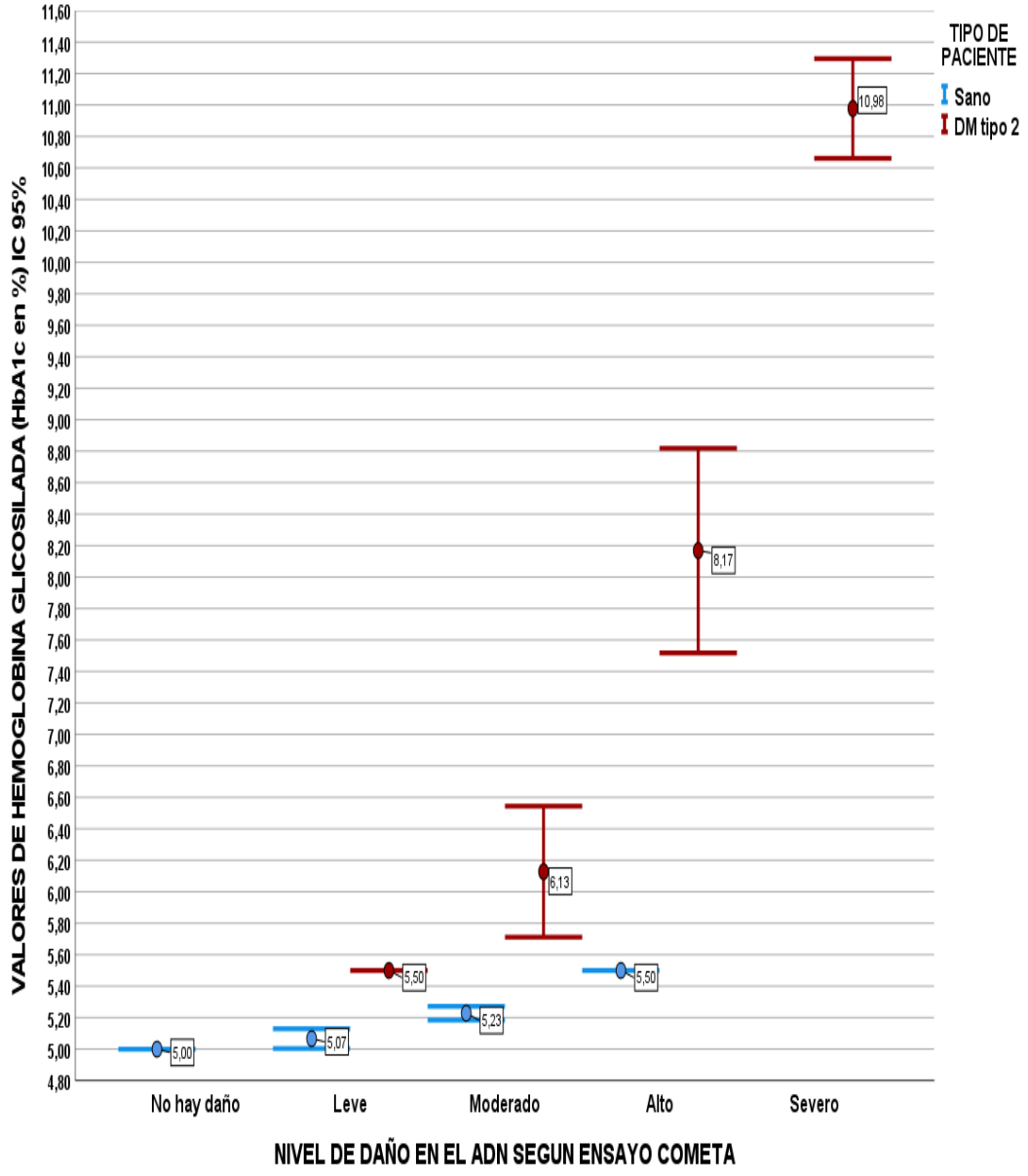


Figura 1. **Valores de la HbA1c (%) según los niveles de daño del ADN de células bucales por medio del ensayo Cometa y el tipo de paciente**
Fuente: Base de datos del investigador

5.2.2. Longitud del Cometa (um) según niveles de daño del ADN de células bucales por el ensayo Cometa y tipo de paciente

Los pacientes sanos (celeste) a una longitud del Cometa media de 5.00 *µm* no presentaron daño en el ADN, a una longitud del Cometa media de 11.25 IC 95% [9.98-12.52] *µm* presentaron daño leve, a una longitud del Cometa media de 32.49 IC 95% [30.02-34.96] *µm* presentaron daño moderado y a una longitud del Cometa media de 55.00 *µm* presentaron daño alto del ADN. Los pacientes con DM2 (rojo) a una longitud del Cometa media de 20.00 *µm* presentaron un daño leve, a una longitud del Cometa media de 31.30 IC 95% [28.02-34.58] *µm* presentaron daño moderado, a una longitud del Cometa media de 62.42 IC 95% [56.04-68.70] *µm* presentaron daño alto y a una longitud del Cometa media de 96.56 IC 95% [96.00-97.12] *µm* presentaron daño severo del ADN, ver Fig. 1.

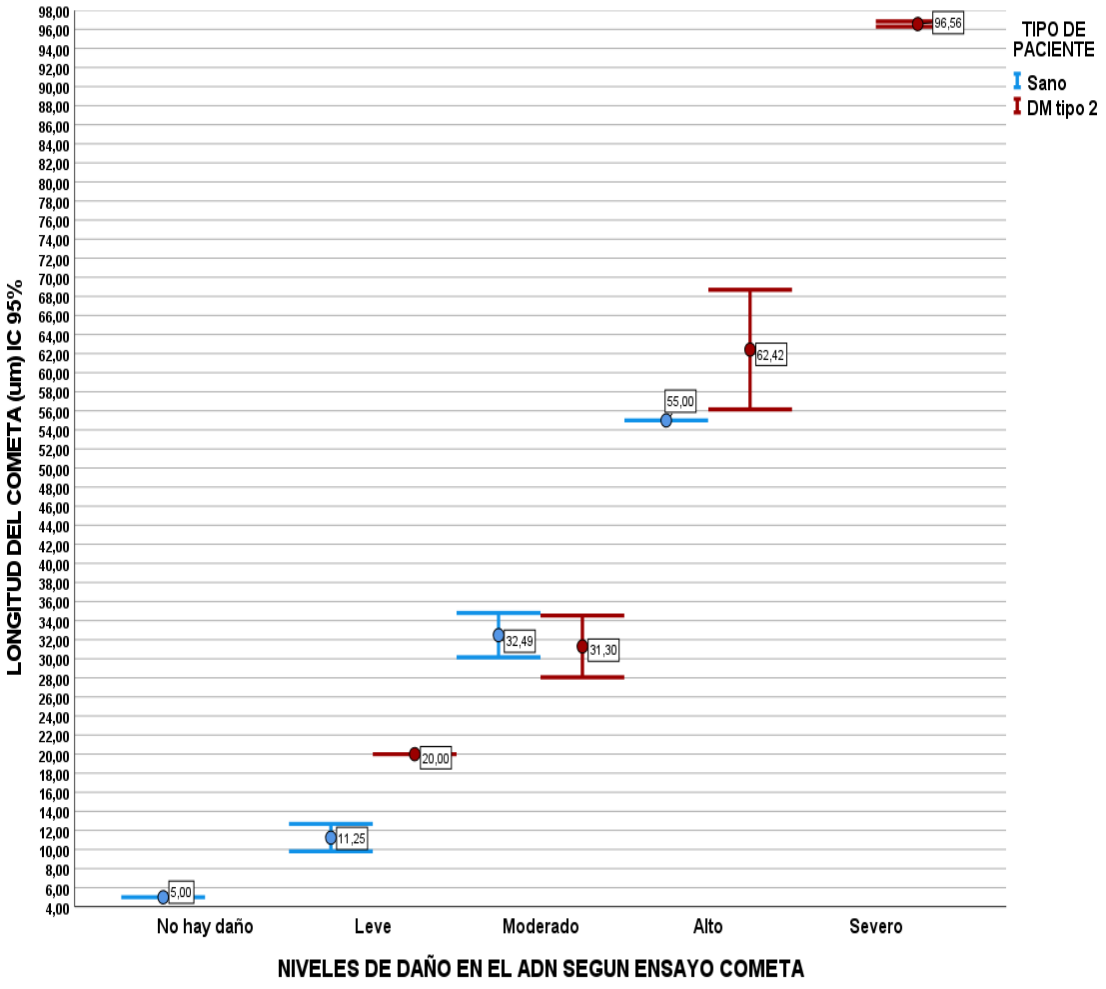


Figura 2. **Longitud del Cometa (µm) según los niveles de daño del ADN de células bucales por el ensayo Cometa y el tipo de paciente**

Fuente: Base de datos del investigador

5.2.3. Valores de hemoglobina glicosilada según niveles de daño en el ADN de células bucales por la prueba de MN y tipo de paciente

Los pacientes sanos (celeste) presentaron a una HbA1c media de 5.13 IC 95% [5.07-5.18]% ausencia de daño y a una HbA1c media de 5.20 IC 95% [5.15-5.25]% daño leve en el ADN. Los pacientes con DM2 (rojo) presentaron a una HbA1c media de 5.79 IC 95% [5.65-5.93]% daño leve, a una HbA1c media de 7.03 IC 95% [6.50-7.56]% presentaron daño moderado, a una HbA1c media de 9,88 IC 95% [9.66-10.10] % presentaron daño alto y a una HbA1c media de 11.18 IC 95% [10.82-11.54]% presentaron daño severo del ADN. Según la prueba de Kruskall Wallis, existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de HbA1c y los niveles de daño del ADN medidos por la prueba de micronúcleos ($p<0.001$) en los pacientes con DM2, se evidencia que a medida que aumenta la HbA1c aumentan los niveles de daño en el ADN mientras que en los pacientes sanos no existe diferencias significativas entre los valores de HbA1c y los niveles de daño del ADN medidos por la prueba de micronúcleos ($p=0.057$). Además, existe una muy buena y fuerte correlación entre la HbA1c y los niveles de daño en el ADN ($rho=0.966$, $p<0.0001$) en los pacientes con DM2 mientras que en los pacientes sanos la correlación es baja ($rho=0.240$, $p<0.001$) al ser medidos por la prueba de micronúcleos, ver Fig.3, Anexo 9 y 10.

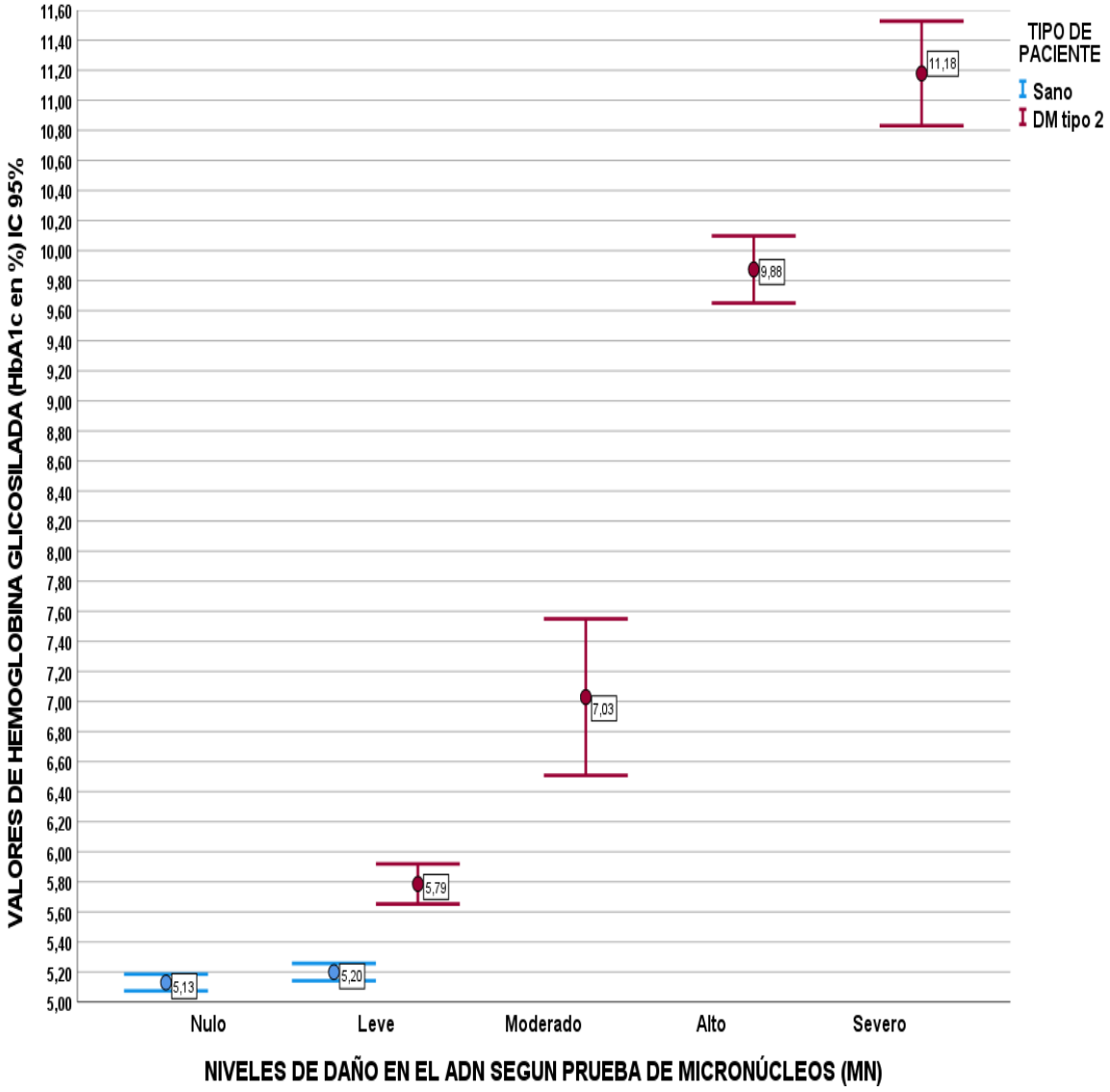


Figura 3. **Valores de HbA1c según los niveles de daño en el ADN de células bucales por la prueba de MN y el tipo de paciente**
Fuente: Base de datos del investigador

5.2.4. Número de micronúcleos según niveles de daño del ADN en células bucales por la prueba de micronúcleos y tipo de paciente

Los pacientes sanos (celeste) no presentaron micronúcleos en ausencia de daño y a un valor de MN medio de 1.43 IC 95% [1.22-1.64] micronúcleos/1000 células presentaron daño leve en el ADN. Los pacientes con DM2 (rojo) a un valor de MN medio de 1.37 IC 95% [1.14-1.60] micronúcleos/1000 células presentaron daño leve, a un valor de MN medio de 3.59 IC 95% [3.36-3.82] micronúcleos/1000 células presentaron daño moderado, a un valor de MN medio de 5.50 IC 95% [5.20-5.80] micronúcleos/1000 células presentaron daño alto, y a un valor de MN medio de 7.00 micronúcleos/1000 células presentaron daño severo, ver Fig. 4.

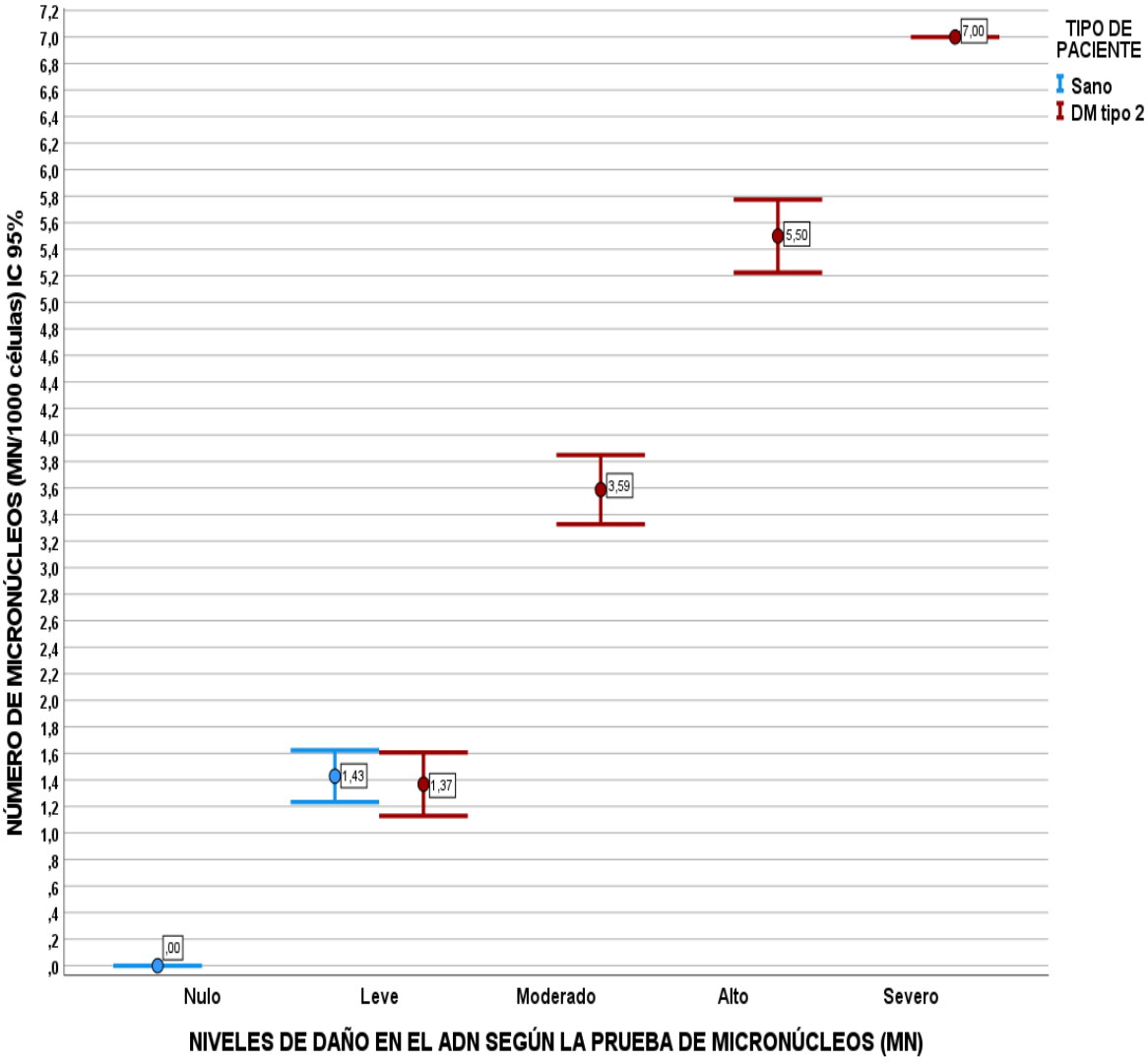


Figura 4. **Número de MN según los niveles de daño del ADN en células bucales por la prueba de micronúcleos y el tipo de paciente**
Fuente: Base de datos del investigador

5.3. Sensibilidad y especificidad del ensayo Cometa

5.3.1. Curva ROC del ensayo Cometa

El área bajo la curva (AUC) fue 0.931 ± 0.021 (0.890 - 0.972) con una significancia menor a 0,05, lo que indica que el ensayo Cometa tienen una precisión diagnóstica del 93.1%. Se acepta la hipótesis alterna que el ensayo Cometa es preciso como prueba diagnóstica para determinar el daño del ADN en células bucales de pacientes con DM 2, ver Tabla 3 y Fig. 5.

Tabla 3. **Área bajo la curva**

Variables de resultado de prueba: COMETA (um)				
			95% de intervalo de confianza asintótico	
Área	Desv. Error[a]	Significación asintótica[b]	Límite inferior	Límite superior
,931	,021	,000	,890	,972
a. Bajo el supuesto no paramétrico				
b. Hipótesis nula: área verdadera = 0,5				

Fuente: Base de datos del investigador

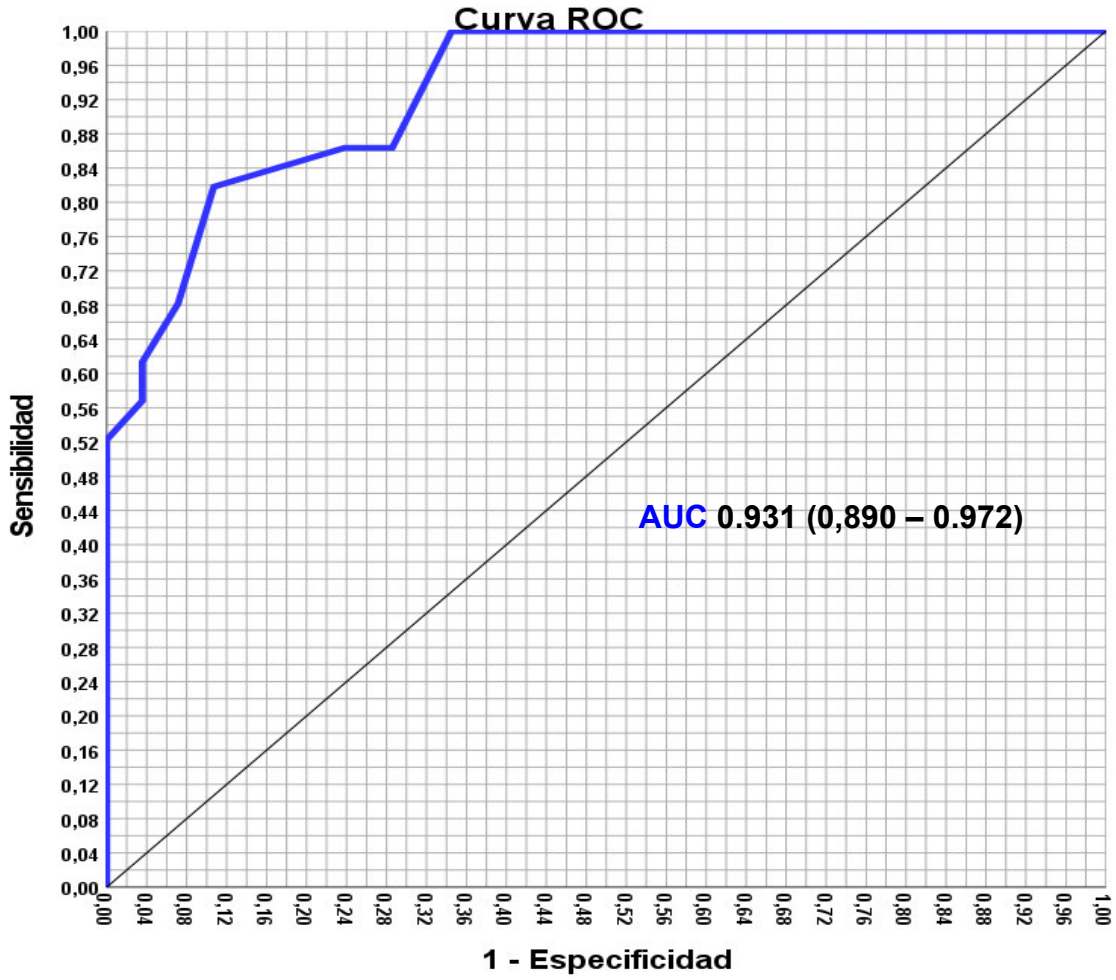


Figura 5. **Curva ROC del Ensayo Cometa.**
Fuente: Base de datos del investigador

5.3.2. Puntos de corte de coordenadas de la curva ROC ensayo Cometa

Las coordenadas de la curva ROC nos indican que la mayor sensibilidad con el menor valor de falsos positivos es con 45.0 *µm* lo que equivale a una sensibilidad del 81.8% y a un 10.7% de falsos positivos, es decir que el ensayo Cometa considera como ***positivo*** o que ***presentan daño en el ADN*** a una longitud del cometa es igual o mayor a 45.0 *µm* y se considera como negativo o que ***no presenta daño en el ADN*** a una longitud del cometa es menor a 45.0 *µm*, ver Tabla 4.

Tabla 4. ***Coordenadas de la curva del ensayo Cometa (µm) puntos de corte***

Coordenadas de la curva		
Variables de resultado de prueba: COMETA (um)		
Positivo si es mayor o igual que[a]	Sensibilidad	1 - Especificidad
4,00	1,000	1,000
7,50	1,000	,833
12,50	1,000	,726
17,50	1,000	,690
21,00	1,000	,667
23,00	1,000	,560
24,50	1,000	,536
27,50	1,000	,440
32,00	1,000	,417
34,50	1,000	,345
36,00	,864	,286
38,50	,864	,238
45,00	,818	,107
52,50	,682	,071
57,00	,614	,036
59,50	,568	,036
65,00	,523	,000
82,50	,455	,000
95,50	,364	,000
96,50	,205	,000
98,00	,000	,000
Las variables de resultado de prueba: COMETA_um tienen, como mínimo, un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo.		
a. El valor de corte más pequeño es el valor mínimo de prueba observado menos 1 y el valor de corte más grande es el valor máximo de prueba observado más 1. Todos los demás valores de corte son los promedios de los dos valores de prueba observados solicitados consecutivos.		

Fuente: Base de datos del investigador

5.3.3. Sensibilidad y especificidad del ensayo Cometa

Una vez obtenidos como punto de corte, en las coordenadas de la curva del ensayo Cometa, el valor de 45.0 um, la variable cuantitativa (longitud del Cometa en um) fue convertida en variable dicotómica (positivo, negativo). La sensibilidad hallada para el ensayo Cometa fue del 81.8 % y la especificidad fue del 89.3 %. Además, el 64.8% de los participantes evaluados presentaron daño en el ADN mientras que el 35.2% no presentaron daño en el ADN, según el ensayo Cometa, ver Tabla 5 y Fig. 6.

Tabla 5. **Número de pacientes con y sin daño en el ADN con resultado positivo y negativo al ensayo Cometa**

Daño en el ADN MICRONÚCLEOS		*Daño en el ADN COMETA* Positivo ≥ 45 µm	Negativo ≤ 45 µm	*TOTAL*
Positivo	*Recuento*	*36*	*8*	*44*
	% MN	***81.8%***	*18.2%*	***100.0%***
Negativo	*Recuento*	*9*	*75*	*84*
	% MN	*10,7%*	***89.3%***	***100.0%***
TOTAL	*Recuento*	*83*	*45*	*128*
	% MN	*64.8%*	*35.2%*	*100.0%*

Fuente: Base de datos del investigador

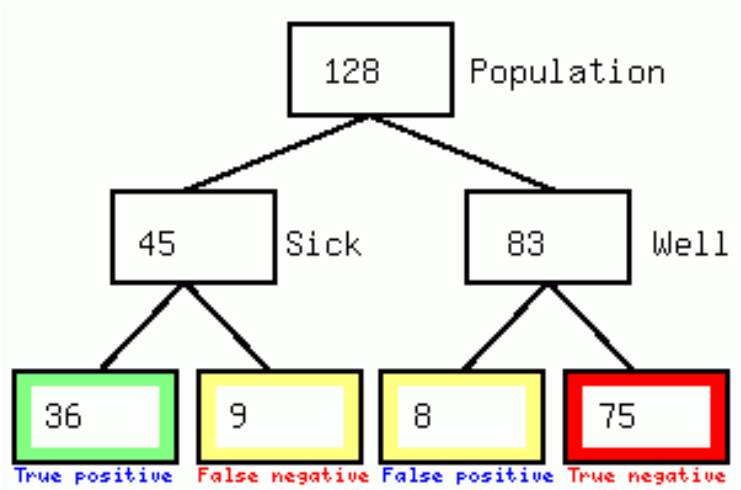


Figura 6. **Número de pacientes con y sin daño en el ADN con resultado positivo y negativo al ensayo Cometa**
Fuente: Base de datos del investigador

*5.3.4. V*alores predictivos para el ensayo cometa

Según la calculadora de pruebas diagnósticas, la prueba Cometa obtuvo +LR = 8.3 y - LR = 0.22. Un +LR = 8.3 significa que un paciente con DM2 que da positivo al ensayo Cometa tiene 8.3 veces más probabilidades de tener daño severo en el ADN que alguien que da positivo en el ensayo Cometa, pero no padece DM2. Un - LR = 0.22 significa que un paciente con DM2 que da negativo al ensayo Cometa tiene 0.22 veces más probabilidades de no tener daño severo en el ADN que alguien que da negativo en el ensayo Cometa, pero no padece DM2. En resumen, la prueba Cometa puede ser considerada como una prueba de buena utilidad clínica; ver tabla 6 y anexo 8.

Según el *nomograma de Fagan*, la prueba Cometa obtuvo un valor predictivo positivo del 82.00 % y un valor predictivo negativo del 11.00%. Significa que un paciente con DM2 con resultado positivo a la prueba Cometa tiene un 82.00 % de probabilidades que realmente presente daño severo en el ADN y un paciente con DM2 con resultado negativo a la prueba Cometa tiene un 11.00% de probabilidades que realmente no presente daño en el ADN, ver Fig. 7.

Tabla 6**. Valores predictivos para el ensayo Cometa según el Nomograma de Fagan**:

PRUEBA POSITIVA:	
Razón de verosimilitud positiva	**+ LR = 8.3**
Intervalo de confianza del 95%:	[4.23, 16]
Probabilidad posterior (Odds):	**82% (4.5)**
Intervalo de confianza del 95%:	[70%, 90%]
(~ 1 en 1.3 con prueba positiva están enfermos)	
PRUEBA NEGATIVA:	
Razón de verosimilitud negativa:	**- LR = 0.22**
Intervalo de confianza del 95%:	[0.12, 0.40]
Probabilidad posterior (Odds):	**11% (0,1)**
Intervalo de confianza del 95%:	[6%, 18%]
(~ 1 en 1.2 con prueba negativa están bien)	
PREVALENCIA.	0.351562
Probabilidad = Probabilidad / (1-Probabilidad)	
+LR = Sensibilidad / (1 - Especificidad)	
-LR = (1 - Sensibilidad) / Especificidad	
probabilidades posteriores = probabilidades anteriores x LR	

Fuente. Base de datos del investigador

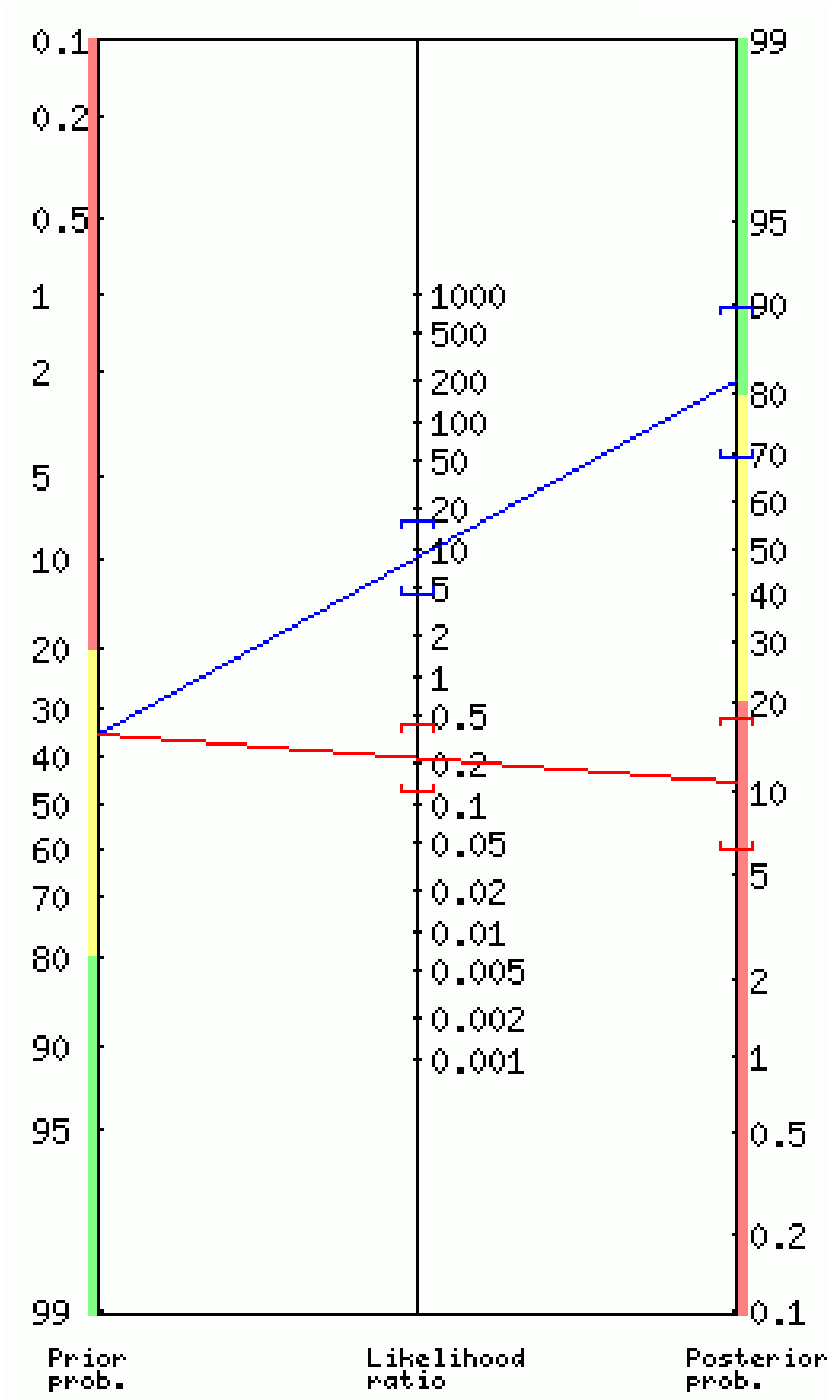


Figura 7. Nomograma de Fagan para el ensayo Cometa.
Fuente: Base de datos del investigador

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN

El objetivo de la investigación fue hallar la precisión diagnostica del ensayo Cometa para determinar el daño del ADN en células bucales de pacientes con diabetes mellitus tipo 2. El ensayo Cometa y la prueba de micronúcleos son pruebas de genotoxicidad que evalúan el daño en el material genético. Como método diagnóstico, el ensayo Cometa mostró una precisión del 93.1% para detectar daño en el ADN en células bucales dentro de la misma categoría establecida por la prueba de micronúcleos (positivo y negativo). Este hallazgo es similar a lo hallado por Nicopoullos et al., al evaluar el daño del ADN en espermatozoides con la finalidad de aumentar su utilidad en el diagnóstico de la infertilidad masculina obteniendo la prueba Cometa una precisión diagnóstica mayor al 90.0 % (Nicopoullos et al., 2019).

El ensayo Cometa y la prueba de MN se basan en principios diferentes y, por lo tanto, podrían diferir en su capacidad para detectar daño en el ADN en células bucales (Bankoglu et al., 2021). Así, el ensayo Cometa se basa en analizar la cantidad de ADN que migra fuera del núcleo celular y forma una estructura similar a una cola, mediante electroforesis en gel (Moller et al., 2025). En la investigación, la tasa general de daño en el ADN por medio del ensayo Cometa de los participantes, así como la longitud del Cometa promedio fue superior a la de varios estudios recientes (Russo et al., 2020). Un hallazgo importante en los pacientes con DM2 fue que presentaron a una HbA1c media de 10.98 IC 95% [10.66-11.30]%, daño severo del ADN en células bucales. Este daño severo a nivel del material genético podría ser como consecuencia de la hiperglucemia generada (Rahmoon et al., 2023) además del estrés oxidativo y la inflamación (Yang et al., 2022). Por otro lado, de todas las muestras evaluadas de mucosa bucal por la prueba Cometa, el 64.8% de los participantes presentaron daño en el ADN, mientras que el 35.2% no presentaron daño alguno. Este daño del ADN en la población con DM2 conllevaría a una posible formación de aductos, roturas de cadenas de ADN y una consecuente inestabilidad genómica (Ciminera et al., 2021).

Por el contrario, la prueba de micronúcleos se basa en la detección de daño del ADN mediante el hallazgo de pequeñas partículas citoplasmáticas compuestas de cromosomas o fragmentos de estos (Hadi & Stopper, 2025). De los resultados hallados por la prueba de micronúcleos, los pacientes con DM2 presentaron a una HbA1c media de 11.18 IC 95% [10.66-11.30] % daño severo del ADN en células bucales, todo esto se fundamenta en que la hiperglucemia crónica de la DM2 acumula daño en el material genético que conduce a inestabilidad genómica (Liu et al., 2025). Así, el aumento constante de la glucemia incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS formadas pueden degradar lípidos, proteínas y ADN (Cacace et al., 2025). Esta deterioro del ADN persiste por existir deficiencia de enzimas antioxidantes e inhibición de la vía de reparación por escisión de nucleótidos (Ciminera et al., 2021), conllevando a roturas de la cadena de ADN y aumento de los niveles de genotoxicidad (Rahmoon et al., 2023), lo que a su vez puede conducir a un posible evento oncogénico (Tseng et al., 2025).

Por otro lado, los resultados obtenidos muestran aumento en la proporción de células bucales con daño del ADN, mostrando el ensayo Cometa una sensibilidad del 81.8% y una especificidad del 89.3% comparado con la prueba de micronúcleos como test de referencia (OECD, 2023). Estas cifras halladas reflejan idoneidad del ensayo Cometa para detectar daño del ADN para ser reproducible, hallazgo similar a los estudios realizados en células epiteliales de piel reconstruida, donde la sensibilidad y especificidad fueron del 77% y 88% respectivamente (Pfuhler et al., 2021). Además, los resultados muestran una mayor sensibilidad a pesquisas que evaluaron el rendimiento del ensayo Cometa y micronúcleos en células HepaRG metabólicamente competentes donde obtuvieron una sensibilidad del 44% mientras que la especificidad mostrada por el ensayo Cometa fue del 100% comparado con la prueba de micronúcleos (Le Hégarat et al. 2014).

Otro resultado importante del estudio fue que el ensayo Cometa presentó un valor predictivo del 82.00 %. Este alto valor hallado ayuda a determinar la probabilidad que un paciente con DM2 presente daño en el ADN en células bucales después de dar positivo. El hallazgo encontrado es

considerablemente comparable al 90.00% hallado por la prueba Cometa alcalino cuando se evaluó a 67 carcinógenos (Tug et al., 2024). Los resultados hallados resultan de gran importancia al ser comparado con el 38.5 % del valor predictivo positivo hallado por la prueba Cometa al evaluar roturas del ADN en 105 sujetos con sospecha clínica de cáncer de vejiga (Fracasso et al., 2004).

Por otro lado, el ensayo Cometa como prueba diagnóstica tiene una buena utilidad clínica por su alta probabilidad de identificar daño severo en el ADN y que realmente presentan daño en el ADN. Además, la prueba Cometa presentó un valor predictivo negativo del 11.00 %, esto significa que sólo el 11.0 % de los pacientes con DM2 que presentan resultado negativo en el ensayo Cometa en realidad no presentan daño en el ADN de células bucales resultado que difieren con un estudio que al evaluar la utilidad clínica en identificar células uroteliales con mayor daño del ADN hallaron un valor predictivo negativo del 97.80 % por parte del ensayo cometa alcalino para la evaluación de marcadores indicativos de cáncer de vejiga (Islam & Kabir, 2019).

Una limitación del estudio fue el tamaño de la muestra en una patología como la DM2, motivo por el cual resultaría adecuados estudios con un mayor número de participantes, con la finalidad de generalizar los resultados del estudio a la población en que padece de esta patología, reduciendo de esta manera el posible margen de error. Una de las fortalezas de la investigación es que es el primer estudio en evaluar la precisión diagnostica de la prueba Cometa en células bucales, iniciando una nueva línea de investigación. Además, los resultados obtenidos por medio de la prueba Cometa son importantes de considerar ya que existe un 82.00% de probabilidad que los pacientes evaluados con DM2 presentan daño en el ADN antes de realizarse esta prueba de genotoxicidad.

El ensayo Cometa en células bucales puede ser considerado como un método útil para el diagnóstico de daño en el ADN en pacientes con DM2, principalmente cuando la recolección de la muestra debe realizarse de forma

remota y en comunidades desfavorecidas que no pueden asistir a instalaciones de pruebas de diagnóstico o pronóstico más costosas.

Resulta importante considerar el uso de células de la mucosa bucal, como un método para evaluar el daño del ADN de fácil acceso, no invasivo y que genera un mínimo estrés, sin necesidad de realizar cultivos celulares.

CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES

La precisión diagnóstica de la prueba Cometa es del 93.1 % para determinar el daño del ADN en células bucales de los pacientes con DM2.

El ensayo Cometa puede ser considerada como una prueba diagnóstica de una buena utilidad clínica para identificar daño severo en el ADN en células bucales de pacientes con DM2.

En el ensayo Cometa, los pacientes con DM2 a una HbA1c media de 5.50% presentaron daño leve del ADN y a una HbA1c media de 10.98% presentaron daño severo del ADN

En la prueba de MN, los pacientes con DM2 a una HbA1c media de 5.79% presentaron daño leve del ADN y a una HbA1c media de 11.18% presentaron daño severo del ADN.

Existe una correlación fuerte entre los valores de HbA1c y los niveles de daño en el ADN. A medida que aumentan los valores de HbA1c aumentan los niveles de daño en el ADN.

El ensayo Cometa presentó una sensibilidad del 81.8% y una especificidad del 89.3% para determinar el daño del ADN en células bucales de los pacientes con DM2.

El ensayo Cometa presentó un valor predictivo positivo del 82.00 %, y un valor predictivo negativo del 11.00 % para determinar el daño del ADN en células bucales de los pacientes con DM2.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar-Bañuelos, J. A., Bernal-Hernández, Y. Y., Medina-Díaz, I. M., Ruiz-Arias, M. A., Herrera-Moreno, J. F., Barrón-Vivanco, B. S., González-Arias, C. A., Agraz-Cibrián, J. M., Zambrano-Zaragoza, J. F., Verdín-Betancourt, F. A., Ruiz, N. P., Flores-Alfaro, E., & Rojas-García, A. E. (2025). Environmental exposure to pesticides is associated with oxidative stress, oxidative DNA damage, and elevated interleukin-8 in a child population. Environmental Toxicology and Pharmacology, 114, 104656.

Anand, S., Nath, B., & Saraswathy, R. (2014). Diabetes--increased risk for cancers through chromosomal aberrations? Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP, 15(11), 4571–4573.

Bankoglu, E. E., Schuele, C., & Stopper, H. (2021). Cell survival after DNA damage in the comet assay. Archives of Toxicology, 95(12), 3803–3813.

Belmans, N., Gilles, L., Vermeesen, R., Virag, P., Hedesiu, M., Salmon, B., Baatout, S., Lucas, S., Lambrichts, I., Jacobs, R., Moreels, M., & DIMITRA Research Group. (2020). Quantification of DNA Double Strand Breaks and Oxidation Response in Children and Adults Undergoing Dental CBCT Scan. Scientific Reports, 10(1), 2113.

Bhagat, J. (2018). Combinations of genotoxic tests for the evaluation of group 1 IARC carcinogens. Journal of Applied Toxicology : JAT, 38(1), 81–99.

Binici, D. N., Karaman, A., Coşkun, M., Oğlu, A. U., & Uçar, F. (2013). Genomic damage in patients with type-2 diabetes mellitus. Genetic Counseling , 24(2), 149–156.

Cacace, J., Luna-Marco, C., Hermo-Argibay, A., Pesantes-Somogyi, C., Hernández-López, O. A., Pelechá-Salvador, M., Bañuls, C., Apostolova, N., de Miguel-Rodríguez, L., Morillas, C., Rocha, M., Rovira-Llopis, S., & Víctor, V. M. (2025). Poor glycaemic control in type 2 diabetes compromises leukocyte oxygen consumption rate, OXPHOS complex content and neutrophil-endothelial interactions. Redox Biology, 81, 103516.

Carrillo-Larco, R. M., & Bernabé-Ortiz, A. (2019). Diabetes mellitus tipo 2 en Perú: una revisión sistemática sobre la prevalencia e incidencia en población

general. Revista peruana de medicina experimental y salud pública, 36(1), 26–36.

Ciminera, A. K., Shuck, S. C., & Termini, J. (2021). Elevated glucose increases genomic instability by inhibiting nucleotide excision repair. Life Science Alliance, 4(10).

Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. Molecular Biotechnology, 26(3),249-261.

Conway, G. E., Shah, U.-K., Llewellyn, S., Cervena, T., Evans, S. J., Al Ali, A. S., Jenkins, G. J., Clift, M. J. D., & Doak, S. H. (2020). Adaptation of the in vitro micronucleus assay for genotoxicity testing using 3D liver models supporting longer-term exposure durations. Mutagenesis, 35(4), 319–330.

Cosmin Stan, M., & Paul, D. (2024). Diabetes and Cancer: A Twisted Bond. Oncology Reviews, 18, 1354549.

de Beer, J. C., & Liebenberg, L. (2014). Does cancer risk increase with HbA1c, independent of diabetes? British Journal of Cancer, 110(9), 2361–2368.

Faizi, N., & Alvi, Y. (2023). Validity. In Biostatistics Manual for Health Research (pp. 149–169). Elsevier.

Fenech, M., Knasmueller, S., Knudsen, L. E., Kirsch-Volders, M., Deo, P., Franzke, B., Stopper, H., Andreassi, M.-G., Bolognesi, C., Dhillon, V. S., Laffon, B., Wagner, K.-H., & Bonassi, S. (2021). “Micronuclei and Disease” special issue: Aims, scope, and synthesis of outcomes. Mutation Research-Reviews in Mutation Research, 788(108384), 108384.

Fracasso, M. E., Franceschetti, P., Doria, D., Talamini, G., & Bonetti, F. (2004). DNA breaks as measured by the alkaline comet assay in exfoliated cells as compared to voided urine cytology in the diagnosis of bladder cancer: a study of 105 subjects. Mutation Research, 564(1), 57–64.

GBD 2021 Diabetes Collaborators. (2023). Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. Lancet (London, England), 402(10397), 203–234.

Grindel, A., Brath, H., Nersesyan, A., Knasmueller, S., & Wagner, K.-H. (2017). Association of Genomic Instability with HbA1c levels and Medication in Diabetic Patients. Scientific Reports, 7, 41985.

Groeger, S., & Meyle, J. (2019). Oral Mucosal Epithelial Cells. Frontiers in Immunology, 10, 208.

Hadi, N. S. A., & Stopper, H. (2025). Micronuclei as genotoxicity endpoint applied in the co-culture of two mammalian cell lines. Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 901, 503839.

Hagmar, L., Bonassi, S., Strömberg, U., Brøgger, A., Knudsen, L. E., Norppa, H., & Reuterwall, C. (1998). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). Cancer Research, 58(18), 4117–4121.

Heilbrun, E. E., Tseitline, D., Wasserman, H., Kirshenbaum, A., Cohen, Y., Gordan, R., & Adar, S. (2025). The epigenetic landscape shapes smoking-induced mutagenesis by modulating DNA damage susceptibility and repair efficiency. Nucleic Acids Research, 53(4).

Hsieh, J., Smith-Roe, S., Huang, R., Sedykh, A., Shockley, K. R,, Auerbach, S., Merrick, B. A., Xia, M., Tice, R. R., & Witt, K. L. (2019). Identifying Compounds with Genotoxicity Potential Using Tox21 High-Throughput Screening Assays. Chemical Research in Toxicology, 32(7), 1384–1401.

Huang, R., & Zhou, P.-K. (2021). DNA damage repair: historical perspectives, mechanistic pathways and clinical translation for targeted cancer therapy. Signal Transduction and Targeted Therapy, 6(1), 254.

Hu, Y., Zhang, X., Ma, Y., Yuan, C., Wang, M., Wu, K., Tabung, F. K., Tobias, D., Hu, F. B., Giovannucci, E., & Song, M. (2021). Incident Type 2 Diabetes Duration and Cancer Risk: A Prospective Study in Two US Cohorts. Journal of the National Cancer Institute, 113(4), 381–389.

Islam, J., & Kabir, Y. (2019). Measurement of DNA damage in bladder cancer patients by alkaline comet assay. Annals of Urologic Oncology, 51–57.

Jiang, H., Panda, S., & Gekara, N. O. (2019). Comet and micronucleus assays for analyzing DNA damage and genome integrity. Methods in Enzymology, 625, 299–307.

Katerji, M., & Duerksen-Hughes, P. J. (2021). DNA damage in cancer development: special implications in viral oncogenesis. American Journal of Cancer Research, 11(8), 3956–3979.

Kawaguchi, S., Nakamura, T., Yamamoto, A., Honda, G., & Sasaki, Y. F. (2010). Is the comet assay a sensitive procedure for detecting genotoxicity? Journal of Nucleic Acids, 2010, 541050.

Lazcano-Ponce, E., Salazar-Martínez, E., & Hernández-Avila, M. (2001). Estudios epidemiológicos de casos y controles. Fundamento teórico, variantes y aplicaciones. Salud Publica de Mexico, 43(2), 135–150.

Le Hégarat, L., Mourot, A., Huet, S., Vasseur, L., Camus, S., Chesné, C., & Fessard, V. (2014). Performance of comet and micronucleus assays in metabolic competent HepaRG cells to predict in vivo genotoxicity. Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology, 138(2), 300–309.

Lin, X., Xu, Y., Pan, X., Xu, J., Ding, Y., Sun, X., Song, X., Ren, Y., & Shan, P.-F. (2020). Global, regional, and national burden and trend of diabetes in 195 countries and territories: an analysis from 1990 to 2025. Scientific Reports, 10(1), 1–11.

Liu, C., Chen, H., Ma, Y., Zhang, L., Chen, L., Huang, J., Zhao, Z., Jiang, H., & Kong, J. (2025). Clinical metabolomics in type 2 diabetes mellitus: from pathogenesis to biomarkers. Frontiers in Endocrinology, 16, 1501305.

Mallik, S., Paria, B., Firdous, S. M., Ghazzawy, H. S., Alqahtani, N. K., He, Y., Li, X., & Gouda, M. M. (2024). The positive implication of natural antioxidants on oxidative stress-mediated diabetes mellitus complications. Journal, Genetic Engineering & Biotechnology, 22(4), 100424.

Moller, P., Collins, A., Rodriguez-Garraus, A., Langie, S., Godschalk, R., & Azqueta, A. (2025). Slightly increased level of DNA migration in the comet assay: does statistical significance equal biological significance? Mutagenesis1

Morita, T., Uno, Y., Honma, M., Kojima, H., Hayashi, M., Tice, R. R., Corvi, R., & Schechtman, L. (2015). The JaCVAM international validation study on the in vivo comet assay: Selection of test chemicals. Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 786-788, 14–44.

Nicopoullos, J., Vicens-Morton, A., Lewis, S. E. M., Lee, K., Larsen, P., Ramsay, J., Yap, T., & Minhas, S. (2019). Novel use of COMET parameters of sperm DNA damage may increase its utility to diagnose male infertility and predict live births following both IVF and ICSI. Human Reproduction (Oxford, England), 34(10), 1915–1923.

Nihira, N., Kudo, R., & Ohta, T. (2025). Inflammation and tumor immune escape in response to DNA damage. Seminars in Cancer Biology, 110, 36–45.

OECD. (2023). Test no. 487: In vitro mammalian cell micronucleus test. OECD.

Pallás, J. (2019). Métodos de investigación clínica y epidemiológica.

Parodi, S., Verda, D., Bagnasco, F., & Muselli, M. (2022). The clinical meaning of the area under a receiver operating characteristic curve for the evaluation of the performance of disease markers. Epidemiology and Health, 44, e2022088.

Pfuhler, S., Pirow, R., Downs, T. R., Haase, A., Hewitt, N., Luch, A., Merkel, M., Petrick, C., Said, A., Schäfer-Korting, M., & Reisinger, K. (2021). Validation of the 3D reconstructed human skin Comet assay, an animal-free alternative for following-up positive results from standard in vitro genotoxicity assays. Mutagenesis, 36(1), 19–35.

Phillips, D. H., & Arlt, V. M. (2009). Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. EXS, 99, 87–110.

Rahmoon, M. A., Elghaish, R. A., Ibrahim, A. A., Alaswad, Z., Gad, M. Z., El-Khamisy, S. F., & Elserafy, M. (2023). High Glucose Increases DNA Damage and Elevates the Expression of Multiple DDR Genes. Genes, 14(1).

Rohani, B. (2019). Oral manifestations in patients with diabetes mellitus. World Journal of Diabetes, 10(9), 485–489.

Russo, C., Acito, M., Fatigoni, C., Villarini, M., & Moretti, M. (2020). B-Comet Assay (Comet Assay on Buccal Cells) for the Evaluation of Primary DNA Damage in Human Biomonitoring Studies. International Journal of Environmental Research and Public Health, 17(24).

Sacks, D. B., Arnold, M., Bakris, G. L., Bruns, D. E., Horvath, A. R., Lernmark, Å., Metzger, B. E., Nathan, D. M., & Kirkman, M. S. (2023). Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. Diabetes Care, 46(10), e151–e199.

Santini, A., Man, A., & Voidăzan, S. (2021). Accuracy of Diagnostic Tests. Journal of Critical Care Medicine (Universitatea de Medicina Si Farmacie Din Targu-Mures), 7(3), 241–248.

Sherwani, S. I., Khan, H. A., Ekhzaimy, A., Masood, A., & Sakharkar, M. K. (2016). Significance of HbA1c Test in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Patients. Biomarker Insights, 11, 95–104.

Speit, G., & Hartmann, A. (1999). The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. Methods in Molecular Biology , 113, 203–212.

Tolbert, P. E., Shy, C. M., & Allen, J. W. (1992). Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. Mutation Research-Environmental Mutagenesis and Related Subjects, 271(1), 69–77.

Tseng, Y.-H., Tsan, Y.-T., & Chen, P.-C. (2025). Association between severity of diabetic complications and risk of cancer in middle-aged patients with type 2 diabetes. Journal of Diabetes Investigation, 16(1), 16–24.

Tug, T., Duda, J. C., Menssen, M., Bruce, S. W., Bringezu, F., Dammann, M., Frötschl, R., Harm, V., Ickstadt, K., Igl, B.-W., Jarzombek, M., Kellner, R., Lott, J., Pfuhler, S., Plappert-Helbig, U., Rahnenführer, J., Schulz, M., Vaas, L., Vasquez, M., … Ziemann, C. (2024). In vivo alkaline comet assay: Statistical considerations on historical negative and positive control data. Regulatory Toxicology and Pharmacology : RTP, 148, 105583.

Van der Leede, B.-J., Doherty, A., Guérard, M., Howe, J., O'Donovan, M., Plappert-Helbig, U., & Thybaud, V. (2014). Performance and data interpretation of the in vivo comet assay in pharmaceutical industry: EFPIA survey results. Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 775-776, 81–88.

Wang, C.-Y., Neil, D. L., & Home, P. (2018). 2020 vision - An overview of prospects for diabetes management and prevention in the next decade. Diabetes Research and Clinical Practice, 143, 101–112.

Wills, J. W., Halkes-Wellstead, E., Summers, H. D., Rees, P., & Johnson, G. E. (2021). Empirical comparison of genotoxic potency estimations: the in vitro DNA-damage ToxTracker endpoints versus the in vivo micronucleus assay. Mutagenesis, 36(4), 311–320.

World Medical Association. (2013). World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. JAMA: The Journal of the American Medical Association, 310(20), 2191–2194.

Yang, X., Zhang, R., Jin, T., Zhu, P., Yao, L., Li, L., Cai, W., (2022). Stress Hyperglycemia Is Independently Associated with Persistent Organ Failure in Acute Pancreatitis. Digestive Diseases and Sciences, 67(5), 1879–1889.

ANEXOS

ANEXO 1. Certificado Comité de Ética

POLICIA NACIONAL DEL PERU
DIRECCIÓN DE SANIDAD POLICIAL
HOSPITAL NACIONAL PNP LNS
COMITÉ DE ETICA E INVESTIGACION

CERTIFICADO N°01-2023-DIRSAPOLPNP./CH.PNP.LNS/COMTINV

El Comité de Ética, del Hospital Nacional PNP "Luis N. Sáenz", en sesión realizada el 13 de abril, ha acordado aprobar el Proyecto de Investigación "PRECISION DIAGNOSTICA DEL ENSAYO COMETA PARA DETERMINAR DAÑO DEL ADN EN CELULAS BUCALES DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2", incluyendo el Consentimiento Informado, presentado por el Mg. C.D. Jorge Raúl, Colchado Carhuavilca, el cual cumple con los procedimientos de manejo de seres humanos establecidos en el Reglamento del Comité de Ética para la Investigación.

Se expide el presente a los 13 días del mes de abril de 2023.

POLICIA NACIONAL DEL PERU
COMPLEJO HOSPITALARIO

OS-282302
COSIO OBLITAS, Ysabel
CRNL SPNP
COMITÉ DE ETICA E INVESTIGACION
CH PNP LNS

ANEXO 2. Permiso de la DIRSAPOL

POLICIA NACIONAL DEL PERU
DIRECCION DE SANIDAD POLICIAL
H. NACIONAL PNP
LUIS SAENZ
UNIDAD DOCUMENTARIA

REF

a. SOLICITUD de fecha 20MAR23 con HT N° 2023105/244
b. Carta del 06MAR23
c. DEV N° 025-2023-DIRSAPOL/AIN PNP LNS/UNIDOCAP (ref. Q7ABR23)
d. OFICIO N° D-1335-2023-DIRSAPOL/AIN PNP LNS/SEC-UNITRDOC (05JUL23)
e. **DECRETO N° 221-2023-DIRSAPOL/OFAD-AREGESP.EI - (19JUL23).**

➢ Relacionado a la solicitud del Magister Jorge Raúl COLCHADO CARHUAVILCA, para realizar proyecto de investigación en el Hospital Nacional PNP Luis N. SÁENZ.- (Folios 15)

DECRETO Nro.0237-2023-DIRSAPOL/HN. PNP "LNS"-SEC-UNITRDOC

Visto los documentos signados en la referencia, la **Coronel SPNP Evelyn del Pilar APONTE ASCAZIBAR, JEFE DE LA UNIDAD DE DOCENCIA Y CAPACITACIÓN DEL HOSPITAL NACIONAL PNP Luis N. SÁENZ**, deberá tomar conocimiento lo dispuesto por la Superioridad, mediante el Decreto N° 221-2023-DIRSAPOL/OFAD-AREGEPSP.EI del 19JUL23, donde el Director de Sanidad Policial **AUTORIZA** al Mg. Jorge Raul **COLCHADO CARHUAVILCA,** realizar sin costo para el Estado, **el proyecto de investigación titulado "PRECISIÓN DIAGNÓSTICA DEL ENSAYO COMETA PARA DETERMINAR DAÑO DEL ADN EN CELULAS BUCALES DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2"**, con fines académicos, a fin de que se brinde facilidades necesarias para la aplicación de instrumentos de investigación; debiendo disponer por quien corresponda que, su jefatura a su cargo comunique al profesional en mención, que debe presentar a dicha unidad una copia del estudio realizado al término de su investigación, disponiendo la supervisión y monitoreo de dicha actividad, informando de su resultado. **DANDO CUENTA**

Jesús María, 21 de julio de 2023.

MGRAYAG
(02 folios 16)
(Fecha: 21/07/2023)
(ARCHIVO DECRETO)

POLICIA NACIONAL DEL PERU
DIRECCION
HOSPITAL NACIONAL PNP "LNS"

FIRMADO DIGITALMENTE
CG - 00231737
Moisés Salvador ROJAS ARCOS
GENERAL S PNP
DIRECTOR DEL H.N PNP "L.N.S"

FIRMA DIGITAL
Firmado digitalmente por: ROJAS ARCOS Moises Salvador FAU 20504995877 hard
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 21/07/2023 16:12:26-0500

ANEXO 3.

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIDAD DE POSGRADO
HOSPITAL NACIONAL P.N.P. LUIS N. SÁENZ

Consentimiento Informado

"PRECISIÓN DIAGNÓSTICA DEL ENSAYO COMETA PARA DETERMINAR DAÑO DEL ADN EN CÉLULAS BUCALES DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2"

Responsable de la investigación: Mg. Colchado Carhuavilca Jorge Raúl. DNI: 07972950
Selección. Usted ha sido seleccionado(a) en la investigación, por formar parte de la población en estudio, ya sea por presentar diabetes mellitus tipo 2 o por no (persona sana).
Propósito del estudio: Evaluar la precisión diagnóstica del ensayo cometa para determinar daño del ADN en células bucales de pacientes con diabetes mellitus tipo 2.
Procedimiento: Todo paciente será evaluado de manera conjunta con el endocrinólogo. Se le asignará un código con la finalidad de conservar la confidencialidad. Luego, se le solicitará la presentación de sus resultados de hemoglobina glicosilada, para poder categorizarla según su valor de glicemia. A continuación, se le realizará una entrevista sobre su estilo de vida. Se le pedirá que se enjuague la boca dos veces con agua destilada, para eliminar detritos y/o desechos que pudiesen quedar en su boca. Luego se procederá a la toma de la muestra de sus carrillos derecho e izquierdo, mediante un cepillo interdental, en forma circular, unas 30 veces aproximadamente. A continuación, se colocará la muestra obtenida en microtubos. Las muestras obtenidas serán rotuladas según el código que figura en la ficha de datos, con la finalidad de conservar su anonimato. Sus muestras serán trasladadas y procesadas en el Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo de la UNMSM. Los resultados obtenidos serán reportados posteriormente al Departamento de Endocrinología y Enfermedades Metabólicas del Hospital Nacional PNP "Luis N. Sáenz".
Riesgos y beneficios: Al tratarse de un procedimiento no invasivos no existe riesgo alguno. Los procedimientos y evaluaciones serán totalmente gratuitos.
Compensación: Tú participación es voluntaria, no incurrirá en gastos personales, no recibirás ningún tipo de beneficio económico, ni resarcimiento o indemnización por esta participación.
Confidencialidad de la información: Los datos obtenidos serán exclusivamente para fines científicos y de investigación, de conformidad a lo establecido en la ley N°29733 ("ley de protección de datos personales") y su reglamento sustentado en el Decreto supremo N° 003-2013-JUS. Los nombres de cada pacientes serán almacenados en un archivo en la nube con una clave de acceso que sólo el investigador dispondrá. Los resultados de la presente investigación se podrán presentar en congresos y/o documentos científicos.
Después de haber leído y haber sido informado efectivamente respecto de sus dudas, le solicitamos su CONSENTIMIENTO si así usted lo considera, además que usted tiene derecho de retirarse de la investigación sin que ello pueda ocasionar ningún perjuicio.
EXPRESION DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
Yo ....., de ..... años con DNI ..... e Historia Clínica ....., declaro haber sido informado (a) de las actividades que se realizaran durante mi atención en el Departamento de Endocrinología y Enfermedades Metabólicas del Hospital Nacional P.N.P. Luis N. Sáenz, y resueltas todas mis inquietudes y preguntas al respecto, consciente de mis derechos y en forma voluntaria, en cumplimiento del artículo N°119 del Decreto Supremo N°013-2006-SA, SI ( ) NO ( ) doy mi consentimiento para participar en el estudio en mención.
SI consiento que sea grabado: Video ( ) Audio ( ) Toma fotográfica ( )
NO consiento que sea grabado: Video ( ) Audio ( ) Toma fotográfica ( )

_____
Firma

Lima, …. de ..... del 202...

Nota. Se emiten dos (02) copias de este documento, uno para el participante y otro para el investigador.

ANEXO 4


PERÚ
Ministerio de Salud
NTS N° 139-MINSA/2018/DGAIN:
"NORMA TÉCNICA DE SALUD PARA LA GESTIÓN DE LA HISTORIA CLÍNICA"
R.M. N° 214-2018/MINSA
Y SU MODIFICATORIA APROBADA CON
R.M. N° 265-2018 / MINSA

ANEXO 5.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

GUÍA PARA LA ELABORACIÓN DEL DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

1. El investigador debe obtener el consentimiento informado de los seres humanos que se incluirán en la investigación.

2. El investigador debe obtener dicho consentimiento bajo circunstancias que permitan al sujeto o su representante legal la oportunidad de considerar si participa o no en el estudio, libre de coerción o alguna otra influencia indebida. La información debe ser proporcionada en un **lenguaje claro** y asequible al sujeto o su representante.

3. La siguiente información deberá ser proporcionada a cada sujeto (CONTENIDO DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO):

3.1. La explicación de que la investigación involucra "investigación", los propósitos de ella, la duración prevista de la participación del sujeto y el número de sujetos participantes. Una descripción de los procedimientos a seguir y la identificación de cualquier procedimiento de carácter experimental a utilizarse.
3.2. La descripción de cualquier riesgo o molestia razonablemente previsible para el sujeto.
3.3. La descripción de cualquier beneficio razonablemente previsible para el sujeto u otras personas.
3.4. La información sobre cualquier procedimiento o terapéutica alternativa y si alguno de ellos pudiese ser ventajoso para el sujeto.
3.5. La descripción del grado de confidencialidad de la información obtenida.
3.6. Para investigaciones que involucren un riesgo no mínimo, se debe establecer las compensaciones o tratamientos disponibles, en qué consisten y cómo acceder a ellas.
3.7. Establecer las circunstancias bajo las cuales la participación del sujeto pueden ser terminada sin requerir su consentimiento, las consecuencias de la decisión del sujeto de abandonar el estudio y los procedimientos a seguir para su retiro formal de la investigación.
3.8. Establecer que cualquier información nueva obtenida durante la investigación y que pueda afectar la disposición del sujeto a continuar su participación le será proporcionada.
3.9. La explicación de quién o quiénes pueden responder preguntas pertinentes a la investigación (Nombre y Teléfono), a los derechos del sujeto (Nombre del Presidente del Subcomité de Ética del Instituto Nacional de Salud, y su Teléfono: (051-1)471-9920 Anexo 148) y ante quién acudir en caso de presentarse algún daño relacionado con la investigación (Nombre y Teléfono).
3.10. Establecer que la participación del sujeto es **voluntaria** y que la negativa a participar está libre de castigos o recorte de sus derechos y establecer que el sujeto puede abandonar el estudio en cualquier momento bajo las mismas condiciones.

4. El consentimiento informado será documentado mediante el uso de un formato escrito aprobado por el Subcomité de Ética del Instituto Nacional de Salud, y firmado por el sujeto o su representante, y de ser necesario, la de un testigo. Sugerimos que dicho consentimiento no sea redactado de manera continua, sino separado en secciones:

- Título del proyecto.
- Equipo de Investigadores (nombres, cargo en el proyecto, institución, teléfonos).
- Introducción / Propósito
- Participación

Comité de Etica
Instituto Nacional de Salud
Capác Yupanqui 1400, Lima –Perú
Telf.: (0511) 4719920 Anexo 148

CONSENTIMIENTO INFORMADO

- Procedimientos
- Riesgos / incomodidades
- Beneficios
- Alternativas
- Compensación
- Confidencialidad de la información
- Problemas o preguntas
- Consentimiento / Participación voluntaria
- Nombres y firmas del participante o responsable legal

5. En el caso de menores de 18 años o de sujetos que tengan alguna limitación mental que los incapacite para firmar el consentimiento informado, se reconocerá como su representante al padre, la madre o algún otro familiar o apoderado. Los analfabetos podrán utilizar su huella digital (dedo índice) en lugar de la firma. Una copia del documento de consentimiento informado siempre debe ser entregado al firmante.

6. Los menores de edad (de 10 a 18 años) además deberán dar su **asentimiento de participación** en la investigación. Si se niegan no podrá realizarse la investigación en ellos, así su representante legal esté de acuerdo con firmar el documento de consentimiento informado.

ANEXO 6

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIDAD DE POSGRADO
HOSPITAL NACIONAL P.N.P. LUIS N. SÁENZ

FICHA DE DATOS
"PRECISIÓN DIAGNÓSTICA DEL ENSAYO COMETA PARA DETERMINAR DAÑO DEL ADN EN CÉLULAS BUCALES DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2"

Código ☐

Apellidos y nombres: .....
DNI: ..... **Teléfono:** ..... **Distrito:** .....

.....

Código ☐

I.- EDAD

años		35 a 44		45 a 54		55 a 64		65 a 74

II.- SEXO

1.	masculino	2.	femenino

III.- NIVEL DE GLUCEMIA

	Glucosa (mg/dL)	**HbA1c** (%)
No diabético		
Diabético		

IV.- DAÑO DEL ADN

NIVELES DE DAÑO DEL ADN				**medida (um)**
TEST COMETA	Categoría 0	**5 um a menos**	No presenta	
	Categoría 1	**6 a 20 um**	Bajo	
	Categoría 2	**21 a 40 um**	Medio	
	Categoría 3	**41 a 95 um**	Alto	
	Categoría 4	**96 um a más**	Severo	

NIVELES DE DAÑO DEL ADN			**medida (um)**
PRUEBA DE MICRONÚCLEOS	**No se observa MN**	No presenta	
	1 a 2 MN	Bajo	
	3 a 4 MN	Medio	
	5 a 6 MN	Alto	
	7 MN a más	Severo	

1 Sherwani, S. I., Khan, H. A., Ekhzaimy, A., Masood, A., & Sakharkar, M. K. (2016). Significance of HbA1c test in diagnosis and prognosis of diabetic patients. *Biomarker Insights*, *11*, 95–104.

2 Nuttall, F. Q. (2015). Body mass index: Obesity, BMI, and health: A critical review. *Nutrition Today*, *50*(3), 117–128. h

3 López-Carmona, J. M., Ariza-Andraca, C. R., Rodríguez-Moctezuma, J. R., & Munguía-Miranda, C. (2003). Construcción y validación inicial de un instrumento para medir el estilo de vida en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Salud Pública de México*, *45*(4), 259–268.

4 Speit, G., & Hartmann, A. (1999). The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *113*, 203–212. https://doi.org/10.1385/1-59259-675-4:203

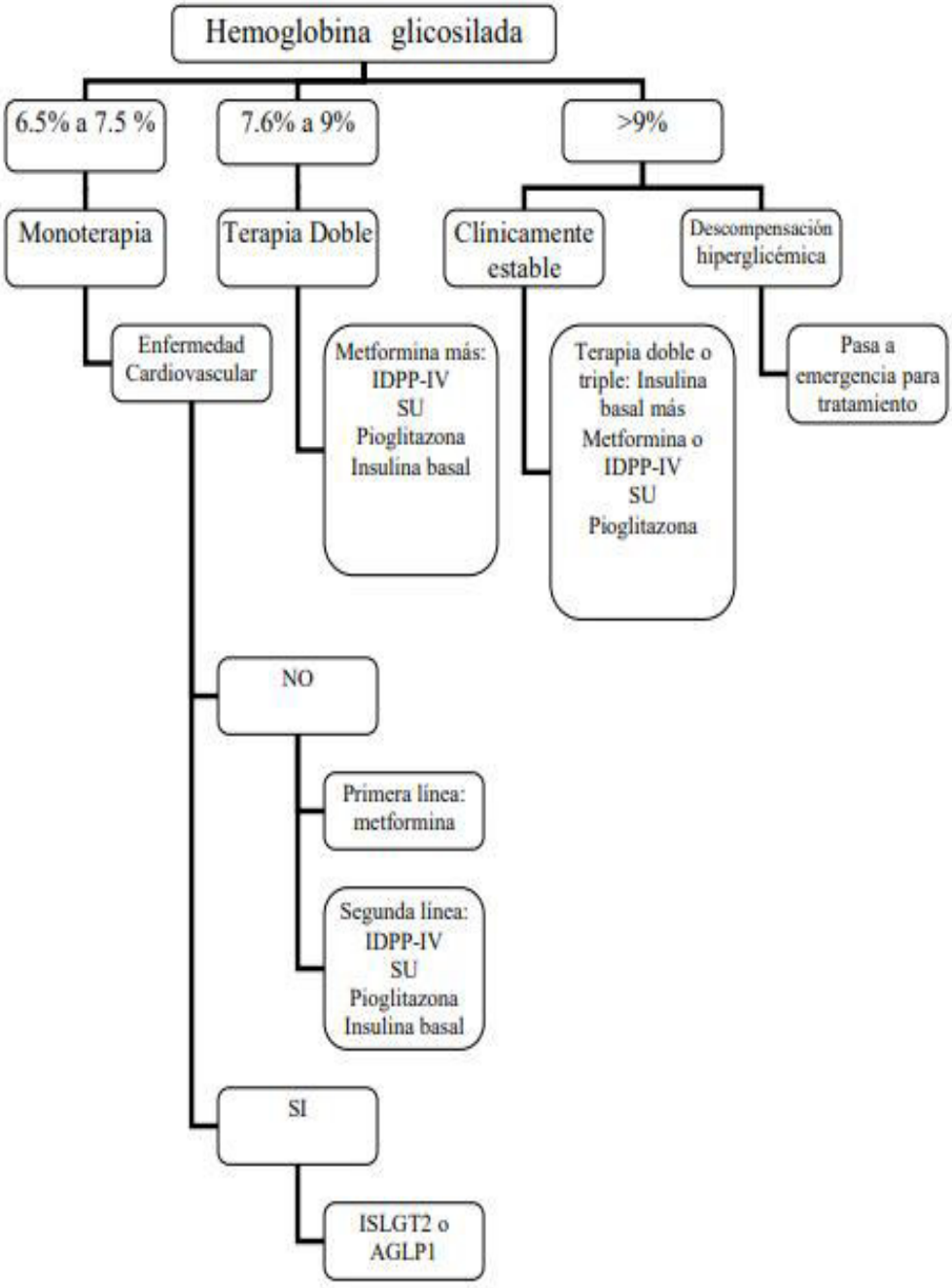
ANEXO 7

POLICÍA NACIONAL DEL PERÚ
DIRECCIÓN DE SALUD DE LA PNP

GUÍA DE PRÁCTICA CLÍNICA DE DIABETES
DEPARTAMENTO DE ENDOCRINOLOGÍA
HOSPITAL NACIONAL P.N.P.-LNS

2022

Diagrama 2
Algoritmo de tratamiento de Diabetes Mellitus tipo 2 al inicio de la enfermedad



Si en tres meses, no se logra la meta de hemoglobina glicosilada, intensificar el control a terapia doble o triple.

IDPP-IV	Inhibidor DPP-IV
SU	Sulfonilurea
EVC	Enfermedad Cardiovascular

ESQUEMA DE TRATAMIENTO

1) De acuerdo a los niveles de **Hemoglobina Glicosilada al inicio**, se recomiendan los siguientes esquemas: (diagrama 2)

a) Hemoglobina glicosilada 6.5-7.5%:

- **Monoterapia:** al diagnóstico de diabetes, iniciar terapia con metformina, salvo que este contraindicado.
- **Como segunda línea en monoterapia**: inhibidor DPP-IV, sulfonilureas, pioglitazona, insulina basal (NPH, Glargina).
- En caso de usar insulina o sulfonilureas se puede reajustar la dosis si presenta hipoglicemia o hiperglicemia, como se menciona en el punto 5)

b) Hemoglobina glicosilada 7.6-9.0%

- **Terapia doble:** Metformina más pioglitazona, inhibidor DPP-IV, sulfonilureas, insulina basal.

c) Hemoglobina glicosilada > 9%

- Paciente estable clínicamente: Insulina basal más metformina o inhibidor DPP-IV, sulfonilurea, pioglitazona.
- Paciente con signos de descompensación diabética: Transferir a emergencia para estabilizar con insulina, y posteriormente continuar con insulina basal más metformina u otro fármaco no insulínico

2) Si en 3 meses la meta de HbA1C no se cumple:
- Incrementar la dosis de metformina si es posible a dosis de 1700 mg/día en dos dosis (o del medicamento alternativo), o
- Iniciar terapia doble: Metformina con inhibidor DPP-IV, sulfonilurea, pioglitazona o insulina basal.

3) Si en 3 meses la meta de HbA1C no se cumple iniciar terapia triple:
- Metformina más otro antidiabético oral más insulina basal.

4) Si en 3 meses la meta de HbA1C no se cumple:
- Insulina basal más insulina rápida antes de la comida más importante (uno o dos- esquema basal plus), más antidiabéticos orales.

5) Si en 3 meses la meta de HbA1C no se cumple:

- Insulina basal más insulina rápida antes de las comidas (uno o dos, Esquema basal bolo), más antidiabéticos orales.
- Incrementar progresivamente las dosis de insulina basal hasta lograr las metas, según el siguiente esquema:

ANEXO 8

Rangos de Likelihood ratio (+LR y -LR)

Tabla 1

Rangos de valores de likelihood ratio y su impacto en utilidad clínica

LR positivo	LR negativo	Utilidad
10	<0,1	Altamente relevante
5-10	0,1-0,2	Buena
2-5	0,5-0,2	Regular
<2	> 0,5	Mala

Fuente tomados de Silva Fuente-Alba & Molina Villagra, 2017.

ANEXO 9

Prueba de Kruskall Wallis.

Valores de HbA1c según nivel de daño en el ADN por el ensayo Cometa

Rangos				
TIPO DE PACIENTE		**Nivel de daño ADN (Cometa)**	N	Rango promedio
SANO	**HbA1c**	No hay daño	14	12,50
		Leve	12	21,33
		Moderado	35	41,84
		Alto	3	61,50
		Total	64	
DM2	**HbA1c**	Leve	2	4,00
		Moderado	20	15,23
		Alto	26	33,25
		Total	64	
		Severo	16	56,44

Estadísticos de prueba[a,b]		
TIPO DE PACIENTE		**HbA1c**
SANO	H de Kruskal-Wallis	**39,383**
	gl	**3**
	Sig. asin.	**< ,000**
DM2	H de Kruskal-Wallis	**48,594**
	gl	**3**
	Sig. asin.	**< ,000**
a. Prueba de Kruskal Wallis		
b. Variable de agrupación: Nivel Daño Cometa		

Prueba de Kruskall Wallis.

Valores de HbA1c según nivel de daño en el ADN por la prueba de MN

Rangos				
TIPO DE PACIENTE		**Nivel Daño ADN (MN)**	N	Rango promedio
Sano	**HbA1c**	Nulo	36	28,74
		Leve	28	37,34
		Total	64	
DM2	**HbA1c**	Leve	19	10,00
		Total	64	
		Moderado	17	28,06
		Alto	16	44,56
		Severo	12	58,33

Estadísticos de prueba[a,b]		
TIPO DE PACIENTE		**HbA1c**
SANO	H de Kruskal-Wallis	**3,622**
	gl	**1**
	Sig. asin.	**,057**
DM2	H de Kruskal-Wallis	**58,775**
	gl	**3**
	Sig. asin.	**< ,000**
a. Prueba de Kruskal Wallis		
b. Variable de agrupación: Nivel Daño MN		

ANEXO 10

CORRELACIONES

Correlaciones entre los valores de HbA1c y los niveles de daño del ADN medido por el ensayo Cometa					
	TIPO DE PACIENTE			**HbA1c**	**Nivel de daño ADN** ensayo Cometa
Rho de Spearman	**SANO**	HbA1c	Coeficiente de correlación	1,000	**,789****
			Sig. (bilateral)	.	,000
			N	64	64
		Nivel daño ADN por Cometa	Coeficiente de correlación	,789**	1,000
			Sig. (bilateral)	,000	.
			N	64	64
	DM2	HbA1c	Coeficiente de correlación	1,000	**,873****
			Sig. (bilateral)	.	,000
			N	64	64
		Nivel daño ADN por Cometa	Coeficiente de correlación	,873**	1,000
			Sig. (bilateral)	,000	.
			N	64	64
**. La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).					

Correlaciones entre los valores de HbA1c y los niveles de daño del ADN medido por la prueba de micronúcleos					
	TIPO DE PACIENTE			**HbA1c**	**Nivel de daño ADN** prueba de MN
Rho de Spearman	**SANO**	HbA1c	Coeficiente de correlación	1,000	,240
			Sig. (bilateral)	.	,056
			N	64	64
		Nivel daño ADN por MN	Coeficiente de correlación	,240	1,000
			Sig. (bilateral)	,056	.
			N	64	64
	DM2	HbA1c	Coeficiente de correlación	1,000	,966**
			Sig. (bilateral)	.	,000
			N	64	64
		Nivel daño ADN por MN	Coeficiente de correlación	,966**	1,000
			Sig. (bilateral)	,000	.
			N	64	64
**. La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).					