

T/406

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

87082

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



ANGIOGÉNESIS EN PIEL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS. EFECTO
DEL TRATAMIENTO DE LESIONES ULCERATIVAS CON L-ARGININA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T A

M. EN C. VÍCTOR ARANA CONEJO

DIRECTORES DE TESIS:

DR. JOSÉ DOMINGO MÉNDEZ FRANCISCO
DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS

ASESORES:

DR. MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA
ASESOR: DRA. VICTORIA VALLES SÁNCHEZ
ASESOR: DR. FRANCISCO JAVIER ALARCÓN AGUILAR

MÉXICO D.F.

Julio, 2004

EL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA ESTÁ EN EL PADRÓN DE EXCELENCIA DEL CONACyT Y ADEMÁS CUENTA CON EL APOYO DEL MISMO CONSEJO, CON EL CONVENIO PFP-20-93.

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó:

M. en C. Víctor Arana Conejo

El día 29 de Julio de 2004

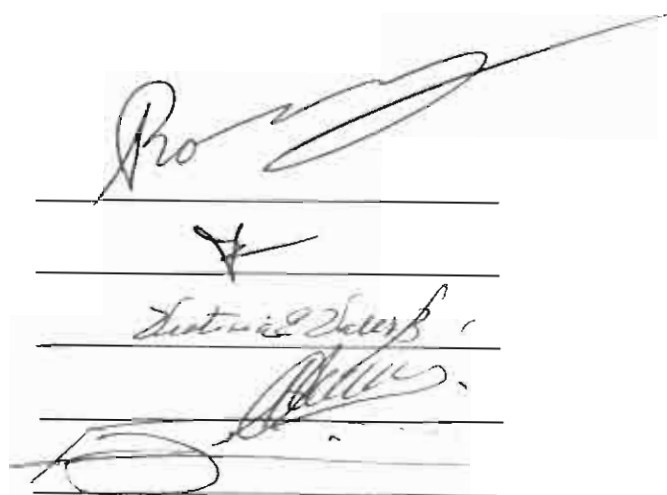
Dr. Rubén Román Ramos: Presidente

Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza: Vocal

Dra. Victoria Valles Sánchez: Vocal

Francisco Javier Alarcón Aguilar: Vocal

Dr. José Domingo Méndez Francisco: Secretario



The image shows a document with five horizontal lines, each with a handwritten signature above it. The signatures are written in black ink. The first signature is the most prominent and appears to be 'Pro'. The second signature is a stylized 'V'. The third signature is 'Victoria Valles Sánchez'. The fourth signature is 'Francisco Javier Alarcón Aguilar'. The fifth signature is 'José Domingo Méndez Francisco'.

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORES DE TESIS

DR. JOSÉ DOMINGO MÉNDEZ FRANCISCO
INVESTIGADOR TITULAR A
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES
METABÓLICAS. HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
CENTRO MÉDICO NACIONAL "SIGLO XXI" IMSS
MIEMBRO DEL SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES

DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS
PROFESOR TITULAR "C" DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA
INVESTIGADOR NIVEL II DEL SISTEMA NACIONAL DE
INVESTIGADORES

ASESORES

DR. MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
MIEMBRO DEL SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES

SINODALES

DRA. VICTORIA VALLES SÁNCHEZ
UNIDAD DE ENDOCRINOLOGÍA Y METABOLISMO
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN
MIEMBRO DEL SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES

DR. FRANCISCO JAVIER ALARCÓN AGUILAR
PROFESOR TITULAR "C" DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA
INVESTIGADOR NIVEL I DEL SISTEMA NACIONAL DE
INVESTIGADORES

VÍCTOR ARANA CONEJO RECIBIÓ UNA BECA OTORGADA
POR EL CONACYT (No. 87745) DURANTE LA REALIZACIÓN
DE SU TRABAJO DOCTORAL.

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES METABÓLICAS DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS, EN EL HOSPITAL GENERAL DE ZONA NÚMERO CUARENTA Y SIETE DEL IMSS Y EN LA UNIDAD DE MEDICINA FAMILIAR NÚMERO TREINTA Y UNO DE LA DELEGACIÓN CUATRO SURESTE DEL IMSS.

A Dios por quien existo y subsisto que me ha permitido llegar a la culminación del grado académico de doctorado, a través de las enseñanzas de mis maestros y revisores de tesis. Mi gratitud a todos ellos.

Al Dr. José D. Méndez quien ha sido mi Maestro, no sólo en el conocimiento puramente humano, donde su creatividad científica, capacidad de trabajo, apoyo y generosidad son un estímulo para seguir adelante; sino también en su actitud ante la vida.

A mi madre, quien ha vivido paso a paso cada etapa para la culminación de esta tesis.

A mis familiares y amigos, sobretodo aquellos que con su apoyo y amistad me han estimulado a no desfallecer en el logro de las metas que me he establecido.

Al Dr. Rubén Román Ramos, hombre de ciencia integro y recto, un ejemplo a seguir en la toma de decisiones difíciles, cuyo apoyo y enseñanza ha sido invaluable y siempre en el momento que lo he necesitado.

Al Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza, quien aceptó desde el primer momento participar en este proyecto, mi gratitud por su confianza.

A la Dra. María del Socorro Retana Márquez que revisó con interés, profesionalismo y apoyo esta tesis.

A la Dra. Victoria Valles Sánchez, que revisó esta tesis gracias por el tiempo dedicado y sus observaciones.

Al Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar. Muchas gracias por el interés y precisión con que revisó la tesis. Me dejó mucha enseñanza.

A la Lic. Violeta Luna en quien siempre encontré la asesoría administrativa necesaria y todo el apoyo para cualquier tipo de trámite relativo al doctorado. Su apoyo ha sido invaluable.

A Elizabeth Mravko, quien siempre ha considerado importante el trabajo desarrollado por el Dr. José D. Méndez y en consecuencia el que he desarrollado bajo su tutoría.

A la Dra. Ana María Rosales quien fungía como coordinadora cuando se inició este proyecto.

Al IMSS, Institución donde se llevó a cabo el estudio y a sus autoridades, que me otorgaron las facilidades para desarrollarlo.

A mi queridísima UAM, verdadera Casa Abierta al Tiempo; sin esa apertura, no es posible el avance de la ciencia.

A todos los que de una manera u otra me apoyaron y creyeron en mis sueños.

ABREVIATURAS USADAS EN ESTA TESIS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
ADA	Asociación Americana de Diabetes
AGEs	Productos finales de glicación avanzada
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
Ang	Angiopietina
bFGF	Factor de crecimiento fibroblástico básico
C-HDL	Lipoproteínas de alta densidad (Fracción colesterol)
C-LDL	Lipoproteínas de baja densidad (Fracción colesterol)
CO ₂	Bióxido de carbono
C-VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad (Fracción Colesterol)
DM	Diabetes mellitus
2,3 – DPG	2,3 difosfoglicerato
ELF	Campos electromagnéticos de baja frecuencia
HbA1b	Fracción A1b de la hemoglobina
HbA1c	Fracción A1c de la hemoglobina
HGZ	Hospital General de Zona
IFGH	Alteración de la glucemia en ayunas
LADA	Diabetes latente autoinmune del adulto
MIDD	Diabetes mitocondrial de herencia materna
μM	Micromolar
mM	Milimolar
MODY	Diabetes juvenil manifestada en el adulto
NO	Óxido nítrico
ODC	Ornitina descarboxilasa
rhPDGF-BB	Factor recombinante humano derivado de plaquetas
TAG	Triacilgliceroles
TOH	Terapia de oxígeno hiperbárico
V/V	Relación volumen a volumen
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VEGF-R o VEGFR	Receptor del factor de crecimiento vascular endotelial

INDICE

RESUMEN	12
ABSTRACT	14

INTRODUCCIÓN	15
DIABETES MELLITUS: ASPECTOS GENERALES Y CLASIFICACIÓN	17
COMPLICACIONES DE LA DIABETES MELLITUS	26
FISIOPATOLOGÍA DE LAS COMPLICACIONES VASCULARES DE LA DIABETES MELLITUS	29
ANGIOGÉNESIS	33
VASCULARIZACIÓN DEL PIE	36
PIE DIABÉTICO: CONCEPTOS Y CLASIFICACIÓN	36
MICROANGIOPATÍA Y PIE DIABÉTICO	39
MANEJO Y TRATAMIENTO DEL PIE DIABÉTICO	41
L-ARGININA	45
BIOSÍNTESIS DE LAS POLIAMINAS	48
FUNCIONES DE LAS POLIAMINAS	50
ÓXIDO NÍTRICO	53

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	55
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	56
HIPÓTESIS	56
OBJETIVOS	57

MATERIAL Y MÉTODOS	58
	10

Universo de trabajo	58
Identificación de las variables	58
Criterios de inclusión, de exclusión y de eliminación	58
Tamaño de la muestra	59
Aspectos éticos	59
Programa de trabajo	59
Análisis estadístico	60
Determinaciones bioquímicas: glucosa, triacilgliceroles, hemoglobina glicada, colesterol total, C-HDL, y C-LDL	61
Estudios morfológicos: histoquímicos e inmunohistoquímicos	63
<hr/>	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
Determinaciones bioquímicas:	
Determinaciones de glucosa, hemoglobina glicada, triacilgliceroles, colesterol total y C-HDL, y C-LDL	66
Análisis morfológico, histoquímicos e inmunohistoquímicos	74
Respuesta a la L-arginina	91
<hr/>	
CONCLUSIONES	101
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	102
PUBLICACIONES GENERADAS POR ESTA TESIS	122
ANEXO 1	
CARRTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	123

Resumen

Los mecanismos fisiológicos y bioquímicos que regulan el funcionamiento coordinado de la circulación sanguínea y de la pared vascular se encuentran alterados en los vasos sanguíneos grandes y pequeños en la diabetes mellitus (DM). Las alteraciones vasculares observadas en los pacientes diabéticos dan lugar a la enfermedad vascular periférica que, en estos pacientes, muestra características especiales condicionantes de una mayor predisposición a lesiones ulcerativas en el pie, con tendencia a la cronicidad y menor capacidad de reparación que en pacientes no diabéticos. Estas lesiones con frecuencia terminan en amputación de una o ambas extremidades inferiores. No obstante los esfuerzos realizados para prevenir y tratar estas complicaciones, aún no se han obtenido resultados satisfactorios.

Este estudio se realizó en 14 pacientes diabéticos seleccionados de manera consecutiva, no aleatorizada y distribuidos en los dos grupos siguientes de 7 pacientes cada uno: Grupo 1, pacientes diabéticos con lesiones ulcerativas de la piel del tercio distal de cualquiera de los miembros inferiores tratados con L-arginina y Grupo 2, pacientes diabéticos con lesiones ulcerativas del mismo sitio que el primer grupo y tratados con pentoxifilina. Los pacientes del grupo experimental fueron tratados con L-arginina 10 mM preparada en solución salina estéril por vía subcutánea con jeringa de insulina a una dosis de 50 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$. Los pacientes del grupo 2 fueron tratados con pentoxifilina vía oral.

A todos los pacientes se les tomó una biopsia utilizando sacabocado número 5 abarcando la región afectada y tejido contiguo. Las biopsias fueron examinadas por microscopía óptica y microscopía confocal, utilizando métodos histoquímicos e inmunohistoquímicos. A los dos grupos de pacientes se les tomó una muestra de sangre venosa al inicio del estudio y al final del mismo, a fin de determinar glucemia, triacilgliceroles, colesterol total, hemoglobina glicada, fracción de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) y fracción de colesterol de lipoproteínas de baja densidad (C-LDL).

Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los niveles de glucosa sérica inicial y final para los pacientes tratados con L-arginina. Las cifras séricas de hemoglobina glicada, colesterol total, C-HDL y C-LDL no mostraron diferencias significativas. A través

de los métodos de histoquímica e inmunohistoquímica se observó distinto tipo de daño vascular, de acuerdo al grado de lesión macroscópica mostrada por los pacientes. En los 7 pacientes tratados con L-arginina se observó curación total de la herida. Tres pacientes adicionales que ingresaron al grupo de pacientes tratados con L-arginina abandonaron el estudio cuando la lesión estaba curada casi en su totalidad. Estos pacientes no fueron tomados en cuenta para fines estadísticos, por ser éste un criterio de eliminación y por no contar con los resultados finales de su tratamiento. En los pacientes con pentoxifilina se observó deterioro progresivo hasta llegar a la amputación de la zona lesionada o supracondílea. Nuestras observaciones apoyan fuertemente la eficacia de la L-arginina para la curación de las lesiones ulcerativas del pie diabético.

Abstract

The interplay of biochemical and physiological mechanisms that regulate the coordinate behavior from the blood circulation are altered in the great and small blood vessels in DM. The vascular alterations observed in diabetic patients produce the peripheral vascular disease. This one has special characteristics that lead to a major predisposition to foot ulcerative lesions which can be chronic with minor capacity for reparation on the contrary to non-diabetic patients. These lesions often have as final solution the lower extremity amputation. In spite of the efforts in order to prevent and treat these complications, the results are not adequate. In this study, two groups of diabetic patients were included: one group (7 patients) was characterized by the presence of chronic ulcers from one lower limb treated with L-arginine in comparison with another group with ulcer on the same site, treated with standard method (pentoxifylin). The first group was treated with L-arginine subcutaneously (s.c.) on site of the wound, the second group was treated with the standard method. 14 patients were selected by method consecutive non-randomized and distributed into two groups: 7 with diabetic ulcers who received the experimental treatment, and 7 with diabetic ulcers treated with the standard method. Biopsy by punch number 5 on wound site comprising both ulcerative and adjacent undamaged skin were performed in all patients with ulcerative lesions. Biopsies were examined by light and confocal microscopy utilizing histochemical and immunohistochemical methods. Initial and final blood samples were collected to determine glucose, triglycerides, total cholesterol, glycated hemoglobin (HbA_{1c}), low (C-LDL), and high density lipoproteins (C-HDL).

Significant differences ($p < 0.05$) were observed between initial and final serum glucose levels for treated patients in the same group, and initial serum glucose levels between the two groups. Glycated hemoglobin, triglycerides, cholesterol, and lipoprotein levels showed no significant changes. Histochemistry and immunohistochemistry analysis have shown vascular impairment in both treated (prior to treatment) and control patients. Three additional patients who adandoned the study because of change of residence, showed relevant improvement. They were no considered for the statistical analysis. Our observations strongly support efficacy of L-arginine for successful wound healing of diabetic ulcers.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizado por hiperglucemia provocada por defectos de la insulina en su secreción, acción o ambas (Committee Report, 1997). La hiperglucemia crónica de la DM se acompaña de daño, disfunción e insuficiencia a largo plazo de diversos órganos, en especial vasos sanguíneos, corazón, piel, riñones, ojos y nervios. Aunque la deficiencia de insulina puede mejorarse por medio de dieta, inyección de insulina o hipoglucemiantes orales, el tratamiento estándar no ha evitado el desarrollo de las diversas complicaciones crónicas, como micro y macroangiopatía, nefropatía, retinopatía y neuropatía diabéticas (Brownlee M y Cerami A 1981).

Se estima la existencia de 250 millones de pacientes diabéticos en el mundo. En México, uno de cada 3 pacientes no se sabe diabético. El 8.2 % de la población mexicana padece DM (Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas no Transmisibles, 1991). Su impacto psicosocial y económico en la población es muy importante. Desde el punto de vista psicológico, los padecimientos más frecuentes a que da lugar son la depresión y la ansiedad. Es una causa importante de invalidez temporal, permanente y de mortalidad prematura. Es la segunda causa de muerte en la población derechohabiente del IMSS, la segunda causa de muerte en trabajadores del IMSS de 10 a 14 años de antigüedad y la primera en los trabajadores de 15 o más años de antigüedad laboral (Salazar B 2000).

Es poco frecuente que la enfermedad vascular periférica sea el evento precipitante de las úlceras del pie diabético; sin embargo, juega un papel primordial en la curación lenta de la herida y el desarrollo de la gangrena y es un factor contribuyente para la mitad de las amputaciones (Mayfield JA y cols., 1998). No obstante que el evento pivote o desencadenante de la úlcera es frecuentemente el trauma, la enfermedad vascular periférica es la base subyacente de la fisiopatología de estas complicaciones del pie diabético. Incluso cuando la patogénesis de la úlcera es la neuropatía, se ha postulado una etiología vascular para la neuropatía (Bloomgarden ZT 2000).

La reparación de las úlceras del pie diabético implica una secuencia de acontecimientos que van desde la inflamación inicial, la llegada de las plaquetas al sitio de la herida y la consiguiente liberación de factores plaquetarios, el reclutamiento de los macrófagos que también liberan factores de crecimiento que causan migración de células endoteliales y su

proliferación en el sitio de la herida, estimulando la angiogénesis, hasta la formación de fibroblastos y síntesis de colágena (Brem H y cols., 2000).

Las lesiones ulcerosas de la piel en los pacientes con DM son el evento final de una serie de procesos patológicos cuyo órgano blanco es el pie diabético. Entre estos procesos se incluyen: lesión y muerte celulares e inflamación que se expresan clínicamente como úlcera del pie diabético, alteraciones vasculares (del endotelio, del músculo liso vascular, aterosclerosis, trombosis), del metabolismo (de carbohidratos, lípidos y proteínas), de los sistemas de la coagulación y del complemento que al no recibir un tratamiento adecuado, perpetúan la lesión ulcerativa. La L-arginina y las poliaminas inciden prácticamente en todos los niveles de la fisiopatología de la DM, como lo han demostrado ampliamente Méndez y cols. (Méndez JD y Arreola MA 1992; Méndez JD y cols., 2000; Méndez JD y Balderas F 2001).

Este trabajo fue diseñado para estudiar el efecto de la L-arginina en los procesos de reparación y cicatrización de heridas en el pie diabético. Con la idea de comprender mejor estos procesos se describen brevemente algunos aspectos generales sobre la DM, su clasificación, sus complicaciones y se explican también de manera integrativa los mecanismos de producción de las complicaciones vasculares en los pacientes con pie diabético que presentan lesiones ulcerativas. Así mismo, se estudia el modo de acción de la L-arginina en el proceso de reparación de las heridas.

DIABETES MELLITUS: ASPECTOS GENERALES Y CLASIFICACIÓN

En las personas normales, no diabéticas, la glucemia en ayunas fluctúa de 60 a 110 mg/dL y en el período posprandial alcanza los 200 mg/dL.

La DM más que una enfermedad constituye un verdadero síndrome. La DM se reconoce por el aumento crónico de la concentración de glucosa en la sangre o hiperglucemia, que va a ser el denominador común de los distintos tipos de DM. Ésta se acompaña de sed intensa, micción profusa, pérdida de peso y estupor, que pueden culminar en coma y muerte cuando no se administra un tratamiento efectivo. En muchas ocasiones los síntomas observados son mucho menos graves y no despiertan sospechas. La glucemia elevada y otras anomalías bioquímicas son el resultado de la producción o acción deficientes de la insulina, hormona que controla el metabolismo de la glucosa, las grasas y los aminoácidos.

Este estado de hiperglucemia crónica está condicionado por factores genéticos y ambientales, afectando concomitantemente al metabolismo proteínico y lipídico que propende al ulterior desarrollo de complicaciones vasculares (macro y microangiopatía) y neurológicas.

El síndrome diabético se caracteriza finalmente por una múltiple heterogeneidad, etiológica, patogénica y clínica. Por ello, a medida que se consiguen nuevos descubrimientos y aportaciones en estos aspectos, se actualizan las clasificaciones como elemento de definición de las peculiaridades de la DM. De este modo, la clasificación inicial establecida por el National Diabetes Data Group en 1979 se modificó seis años más tarde por la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1985, quedando como diabetes tipo I o insulino dependiente y diabetes tipo II o no insulino dependiente. Esta clasificación queda revisada y actualizada desde 1997 por la elaborada por el Comité de Expertos de la American Diabetes Association (ADA), donde se modifican las cifras de glucemia basal en ayunas para establecer un diagnóstico (aparece el término de alteración de la glucosa en ayunas) y se distinguen, además de las diabetes secundarias y de otros tipos, la diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2, como se observa en el Cuadro 1.

El término glucemia indica glucosa plasmática venosa y la expresamos en mg/dL. Ésta suele ser superior en un 14 % a la glucemia en sangre total.

Puede decirse que existe DM cuando la glucemia plasmática en ayunas es igual o superior a 126 mg/dL o cuando, determinada al azar en cualquier momento del día, sea mayor de 200 mg/dL y se acompañe de los signos clínicos clásicos de la enfermedad. Si se realiza una carga oral de glucosa y la glucemia a las 2 horas se muestra igual o superior a 200 mg/dL puede afirmarse también que el paciente presenta DM (American Diabetes Association, 1998).

Después de una determinación positiva a favor de la enfermedad, debe confirmarse en los días siguientes la obtención nuevamente de un dato patológico de glucemia, mediante la realización de una nueva prueba de glucemia en ayunas, al azar o tras sobrecarga de glucosa, siempre que el paciente no presente descompensación glucémica y metabólica agudas junto con un cuadro clínico característico (Aragón FJ 2001).

Con estos nuevos criterios glucémicos puede observarse el caso de un paciente con cifras entre 110 y 126 mg/dL. Esta situación se define como una alteración de la glucemia en ayunas (*impaired fasting glicemia*, IFG), término nuevo en esta clasificación que, si bien no se considera como una entidad patológica propia (salvo en los casos de diabetes gestacional), los estudios epidemiológicos confirman que es un paciente con alto riesgo de desarrollar DM y/o alteraciones vasculares de tipo macroangiopático. Esta circunstancia es similar a la presentada por los pacientes que, a las 24 horas de la sobrecarga oral de glucosa, los valores de glucemia se encuentran entre 140 y 200 mg/dL y se define como alteración de la tolerancia a la glucosa (*impaired glucosa tolerance*, IGT). Esta situación, junto a la alteración de la glucemia en ayunas, expresa una inadecuada homeostasis de los hidratos de carbono (Committee Report, 1998; American Diabetes Association, 1998).

El hecho de reducir el nivel de glucemia en ayunas de 140 mg/dL (antigua clasificación de la OMS) a 126 mg/dL (nueva clasificación de la ADA) es importante, ya que pretende disminuir la prevalencia de DM desconocida (que en algunos países puede llegar incluso al 50 % de los pacientes). De este modo se va a tratar más precozmente la enfermedad y a prevenir o retardar sus complicaciones. Se ha comprobado mediante estudios epidemiológicos que cifras por encima de 126 mg/dL se relacionan ya directamente con la micro y macroangiopatía, complicaciones características de la enfermedad.

La nueva clasificación emplea numeración arábica 1 y 2, en lugar de la romana I y II, diferenciando más claramente los aspectos patogénicos y formas de presentación clínica de la DM, como veremos a continuación. Además, permite a los pacientes diabéticos tipo 2 el tratamiento con insulina cuando es necesario. Los nuevos criterios de la ADA prestan más atención a la determinación de la glucemia en ayunas que a la prueba de sobrecarga oral de glucosa. Por ello se ha establecido la categoría de alteración de la glucemia en ayunas que pretende censar prioritariamente a los pacientes que eran diagnosticados de intolerancia a los hidratos de carbono con la prueba de la sobrecarga de glucosa.

Si bien la nueva clasificación de la ADA deja en segundo plano la realización de esta prueba como parece insinuarse, esta prueba mantiene sus indicaciones principales en el estudio e identificación de las hipoglucemias por rebote, en las glucosurias con glucemia normal y en la detección y diagnóstico de diabetes gestacional, con sus aspectos particulares en relación con la dosis de glucosa a administrar, número de determinaciones de glucemia y criterios diagnósticos.

Además de la diabetes tipo 1 y 2 que son las principales, existen otros tipos también revisados por la ADA en 1997. La clasificación completa de la DM se detalla en el Cuadro 1.

DIABETES MELLITUS TIPO 1

La DM tipo 1 se debe a la destrucción selectiva de las células productoras de insulina (células β del páncreas) en un proceso de carácter autoinmune que se desencadena por un factor ambiental, en un sujeto predispuesto genéticamente. Esta destrucción se lleva a cabo durante varios años (fase preclínica o de prediabetes) y, una vez que el material celular destruido supera aproximadamente entre el 75 y el 80 % del total de células β , el paciente desarrolla un estado de insulinopenia con una hiperglucemia mantenida que confiere las manifestaciones clínicas típicas y de presentación tormentosa. La insulina es vital para el tratamiento y su carencia lleva al coma diabético (Teyton L y cols., 1990).

El grupo de edad en donde la incidencia de la diabetes tipo 1 es máxima se encuentra entre los 8 y 16 años (Nyström L y cols., 1992). Es una patología que afecta a grupos de población jóvenes, ya que el 50 % de los pacientes con diabetes tipo 1 se diagnostica antes

de los 20 años. La diabetes tipo 1 denominada LADA (*latent autoimmune diabetes of the adult*) se desarrolla a partir de los 60 años (Chistau B y cols., 1979).

Al definir la enfermedad hemos evocado tres situaciones: la autoinmunidad, los factores ambientales y la predisposición genética. Cada una de ellas reposa en una serie de hechos epidemiológicos y de investigación básica y clínica que intentan responder a la interrogante patogénica en la diabetes tipo 1. En relación con la predisposición genética, no se ha identificado hasta la fecha el gen propio directamente implicado en la diabetes tipo 1, definiendo esta predisposición de un modo poligénico (Field LL y Tobias R 1997).

Entre los factores ambientales más importantes hay que destacar las infecciones virales, ciertos elementos relacionados con la nutrición y las sustancias que son tóxicas selectivamente de las células productoras de insulina. Ciertos virus como el de la rubéola, Coxsackie y citomegalovirus presentan una estructura parecida a los antígenos de superficie de las células β del páncreas, de manera que cuando la infección está presente, los anticuerpos desarrollados por el organismo frente a ella pueden actuar tanto sobre el virus como sobre las células β , originando su destrucción. Además, los estudios epidemiológicos observan un pico estacional de incidencia de diabetes tipo 1 relacionado con estas infecciones virales que también son más frecuentes en la etapa de la adolescencia (Wagenknecht LE y cols., 1991, Yoon JW, 1991). Referente a los factores nutricionales, se menciona en la actualidad a la leche de vaca como un factor inmunógeno al presentar una secuencia de aminoácidos (del 152 al 168) similar al de algunos virus y a ciertas proteínas de las células pancreáticas (Gerstein H, 1994). La presencia de anticuerpos antialbúmina bovina presentes en niños que tomaron leche de vaca, en lugar de los que se alimentaron con leche materna, puede hacer sospechar esta relación. Otros elementos relacionados con la nutrición, como las nitrosaminas presentes en los pescados ahumados, se implican en la mayor tasa de incidencia de diabetes tipo 1 observada en los países nórdicos, donde esta alimentación es habitual.

Cuadro 1. Clasificación de la diabetes mellitus

Diabetes tipo 1

Diabetes tipo 2

Donde la insulinoresistencia predomina sobre la insulinopenia

Donde la insulinopenia predomina sobre la insulinoresistencia

Alteraciones de la homeostasis

de los hidratos de carbono

Alteración de la glucemia en ayunas

Alteración de la tolerancia a la glucosa

Diabetes gestacional

Otras diabetes o enfermedades secundarias

A enfermedades de carácter endocrino: Acromegalia

Hipercorticismo

Hiperaldosteronismo

Feocromocitoma

Tumor endocrino de páncreas

Hipertiroidismo

A enfermedades del páncreas:

Pancreatitis crónica

Pancreatectomía

Cáncer

Mucoviscidosis

Hemocromatosis

Pancreatitis fibrocalculosa

Por disfunción de carácter genético de las células β del páncreas:

Diabetes mitocondrial

*MODY 1: anomalía del cromosoma 20

MODY 2: anomalía del cromosoma 7

MODY 3: anomalía del cromosoma 12

Medicamentos con acción diabetógena en sujetos predispuestos:

Corticoides

Anticonceptivos orales con alto contenido en estrógenos

Diuréticos del tipo tiazidas

β -bloqueantes no selectivos

Ciclosporina

Hormona de crecimiento

Ácido nicotínico

Pentamidina

Diazóxido

Estimulantes β_2

Otros también posibles: interferón, antagonistas del Ca^{++} , somatostatina

Anomalía genética de la acción de la insulina.

Otras enfermedades genéticas que se asocian a la DM

*MODY, *maturity-onset diabetes of the young*.

La referencia clásica en relación con ciertas sustancias tóxicas confirma la aparición de diabetes tipo 1 en experimentación animal cuando se administra estreptozotocina y/o aloxana. En el ser humano, la ingesta de pentamidina o de raticidas produce el mismo efecto (Karma JH y cols., 1980).

Hablar de autoinmunidad en la diabetes tipo 1 obliga a referenciar sus aspectos más sobresalientes. El examen histológico de los islotes de Langerhans muestra los signos clásicos de una inflamación de carácter autoinmune, definida en este caso como *insulitis*: infiltrado de células linfocitarias T y B, presencia de macrófagos y reducción de las células blanco de los islotes. Además, la antigenicidad de las células (elemento fisiopatogénico no claramente determinado) desarrolla autoanticuerpos presentes en un alto porcentaje de los pacientes diabéticos tipo 1 y, de forma muy esporádica en la población general no diabética (Gepts W 1965).

El valor predictivo de estos anticuerpos es importante, ya que la presencia de varios de ellos implica un riesgo de más del 90 % de aparición de la enfermedad en los próximos 5 años.

Por último, en el 15 % de los diabéticos tipo 1 se observan asociaciones con otras enfermedades de carácter autoinmune y endocrino, fundamentalmente tiroideas (Basedow y Hashimoto) y corticosuprarrenales (Addison).

Las manifestaciones clínicas en la diabetes tipo 1 aparecen fundamentalmente sobre un sujeto de menos de 25 años, de forma brusca, con la tríada característica de poliuria, polidipsia y pérdida de peso pese a la polifagia (se asocian a menudo astenia e intolerancia gástrica). Destaca como antecedente, a veces señalado en la historia clínica, una infección ya pasada. El diagnóstico es sumamente fácil. Las pruebas complementarias aportan glucemia elevada, superior a 200 mg/dL, glucosuria, en muchas ocasiones, cetonuria insulínica y péptido-C muy bajos o negativos, que indican la no existencia de reserva insulínica (Aragón FJ 2001).

DIABETES MELLITUS TIPO 2

La DM tipo 2 es el tipo de diabetes más frecuente en el ser humano, representando aproximadamente el 90 % de los casos. Esta forma de DM constituye un grupo heterogéneo

de afecciones, no autoinmunitarias, que se caracterizan por una hiperglucemia crónica, una alteración en la secreción de insulina y una disminución en la sensibilidad de los tejidos a la insulina o insulinoresistencia.

La mayoría de los diabéticos tipo 2 tienen más de 45 años, aunque la enfermedad puede aparecer con anterioridad, sobretodo si coexisten antecedentes familiares. Su aparición es solapada, con muy pocos o ningún síntoma. Muchas veces se descubre casualmente. Es frecuente su asociación con cifras tensionales altas, el sobrepeso/obesidad y alteraciones en el metabolismo lipídico. Suele responder bien con dieta, ejercicio e hipoglucemiantes orales, siendo a veces necesaria la administración de insulina para conseguir un control adecuado. Por definición no hay tendencia a la cetosis (Aragón FJ 2001).

En relación con las complicaciones, al igual que en la diabetes tipo 1, puede aparecer la microangiopatía, neuropatía y macroangiopatía, siendo ésta en la diabetes tipo 2 mucho más frecuente y severa.

La etiopatogenia en la diabetes tipo 2 no es aún del todo conocida. Se admite que un individuo hereda una susceptibilidad a desarrollar este tipo de DM y que uno o varios factores probablemente ambientales, no genéticos, pueden eventualmente inducir la expresión de la enfermedad clínica. La participación del patrimonio genético está basada en los estudios realizados sobre gemelos y sobre familias afectadas. Entre gemelos verdaderos la concordancia llega a ser del 90 %, incluso si están expuestos a diferentes condiciones ambientales. También apoyan la teoría genética los estudios étnicos de alto nivel de consanguinidad (indios americanos, poblaciones de Micronesia, etc.), que muestran una sensibilidad notable por la DM tipo 2 y que se atenúa cuando se mezclan con otras razas. Al contrario que en la DM tipo 1, no se ha encontrado en los pacientes afectados de DM tipo 2 una asociación tipo HLA o de marcadores inmunológicos representativos (Hattersley A 1997).

La importancia de factores ambientales como el régimen, el estrés, la práctica o no de ejercicio físico y otras circunstancias ligadas al estilo de vida (como el cambio de una vida rural a un tipo de vida urbana) ha sido puesta en evidencia en diversos estudios epidemiológicos.

En la actualidad se admite la existencia de varios factores patogénicos que intervienen en el desarrollo de la enfermedad. No son excluyentes y sí complementarios, no conociéndose de

forma precisa la cronología de todos ellos. Los más estudiados y clarificados hasta hoy se relacionan con la secreción inadecuada de insulina y con la insulinoresistencia.

Con respecto a la primera, secreción inadecuada de la insulina, se ha observado que los pacientes con DM tipo 2 con hiperglucemia elevada en ayunas, pueden presentar diferentes perfiles de insulino secreción. En general, esta capacidad es inadecuada, constatando que la insulinemia en ayunas es a menudo normal o elevada (sobre todo en los diabéticos obesos), salvo cuando la tasa de hiperglucemia es francamente elevada, donde se encuentra un perfil de insulina plasmática inferior. Con cifras de glucemia inferiores a 115 mg/dL, las fases de liberación de insulina por las células β pancreáticas se encuentran dentro de límites normales. Glucemias entre 125 y 200 mg/dL pueden expresar una alteración de la fase precoz de la insulino secreción. Finalmente, cuando éstas superan los 200 mg/dL, se observa que el elemento clave reside en una alteración, tanto de la fase precoz como de la tardía, de la secreción de insulina posglucosa, aunque se detecten respuestas normales a estímulos no glucídicos (arginina, secretina, naloxona). Existe pues una alteración específica, una “ceguera selectiva a la glucosa”, como si no se reconociese la glucosa, considerada como el reflejo del efecto tóxico de la hiperglucemia permanente. En efecto, se ha descrito un efecto puramente tóxico de la glucemia (glucotoxicidad) cuando se encuentra elevada de forma mantenida, que inhibe la secreción de la insulina, consiguiendo un efecto inverso a la situación fisiológica de normoglucemia (Aragón FJ 2001).

Además, los estudios realizados sobre necropsias evidencian una destrucción de hasta el 60 % de la masa de las células secretoras de insulina, así como depósitos de sustancia amiloide extracelular. Estos depósitos están constituidos por amilina, que es un péptido de 37 aminoácidos cosecretado por las células β de forma paralela a la insulina. Parece ser que una acumulación en exceso de esta sustancia interfiere a largo plazo en la exocitosis celular de la insulina. Estos dos elementos puramente morfológicos determinan una secreción insuficiente de insulina para las necesidades de la misma por el paciente (insulinoresistencia). Otras posibilidades en vías de investigación serían las alteraciones neurógenas de las células β , como elementos patogénicos complementarios (Aragón FJ 2001).

La insulinoresistencia aparece como el otro elemento patogénico de enormes implicaciones en la diabetes tipo 2 con hiperglucemia en ayunas, con o sin obesidad, así

como en muchos casos de intolerancia a los hidratos de carbono. La primera observación de la disminución de la sensibilidad a la insulina la presentaron Himsworth y Kerr en 1942 a través de la prueba de tolerancia a la glucosa. Posteriormente, todos los trabajos en esta línea son concordantes y manifiestan la trascendencia de esta insulinoresistencia a través de:

1. Elevación de la producción hepática de glucosa en ayunas (gluconeogénesis mal reprimida) que se ve favorecida por un aumento en la secreción de glucagón.

2. Disminución del consumo de glucosa por el hígado.

3. Disminución del consumo de glucosa por los tejidos periféricos, fundamentalmente del músculo esquelético, debido a una disminución de su oxidación y/o de su almacenamiento en forma de glucógeno (DeFronzo y cols., 1987).

Estas alteraciones conllevan una hiperglucemia en ayunas, posprandial o mixta, al existir una producción exagerada por parte del hígado y un consumo periférico y hepático disminuido simultáneamente. Las alteraciones a nivel muscular podrían explicar las hiperglucemias posprandiales (Aragón FJ 2001).

La insulinoresistencia se encuentra genéticamente determinada y favorecida de forma muy especial por la obesidad. Además se suma el efecto ya mencionado de la glucotoxicidad, como situación crónica de hiperglucemia que interfiere tanto el funcionamiento de las células en el sitio secretor, como la captación periférica de la glucosa. En definitiva, un estado de insulinoresistencia responde a una inadecuada relación entre la hormona y el receptor. Si esta unidad no funciona adecuadamente, se produce una disfunción en el sistema que hace que se pierda la sensibilidad a la insulina y su capacidad de respuesta (Flier J y cols., 1979).

La insulinoresistencia es una enfermedad precoz que precede a la alteración de la glucosa en ayunas y a la DM tipo 2. Es la responsable del hiperinsulinismo que aparece inicialmente como intento de las células de amortiguar la «falsa carencia» de insulina (valores por encima del 30-40 % de la insulinemia normal cifrada entre 6 y 15 $\mu\text{U/mL}$) y que conlleva al agotamiento celular progresivo y a la insulinopenia relativa (valores inferiores entre el 20-30 % de la insulinemia normal) característica de la DM tipo 2. De entre los dos mecanismos citados, anomalías de la secreción y resistencia a la insulina, no puede establecerse todavía cuál es el factor que inicia el proceso. Parece ser que se crea un

círculo de retroalimentación entre ambos, con el denominador común de la glucotoxicidad y las anomalías ponderales por exceso (Groop LC 1997).

OTROS TIPOS DE DIABETES

Las otras formas de DM también merecen en este capítulo una pequeña reseña.

Diabetes gestacional

Es una alteración de la tolerancia a la glucosa que aparece entre la 24 y 28 semana de gestación, desapareciendo después del parto y de gravedad variable. No hay que confundirla con la gestación que acontece en una mujer ya previamente diagnosticada de DM. Debido a su frecuencia y a las complicaciones que su desconocimiento pueden ocasionar tanto en la madre como en el hijo, hay que realizar prueba de detección en todas las mujeres gestantes (Catalano y cols., 1993).

Diabetes ligadas a una disfunción de las células β

Son la anteriormente denominada *maturity-onset diabetes of the young* (MODY) y la diabetes mitocondrial. La diabetes MODY (clasificada anteriormente como una variante de DM tipo 2) presenta una expresión clínica similar a la DM tipo 2 pero que acontece en la adolescencia. Es debida a un defecto genético primario de la insulinosecreción por insensibilidad de las células β al estímulo glucídico (Yamagata K 1996). La diabetes mitocondrial (*maternaly inherited diabetes and deafness* [MIDD]) es una forma de DM transmitida exclusivamente por la madre y se debe a una mutación puntual del DNA mitocondrial en posición 3243.

COMPLICACIONES DE LA DIABETES MELLITUS

Las complicaciones crónicas de la DM se dan en el cuadro 2:

Cuadro 2. Complicaciones crónicas de la diabetes mellitus

Ojo	Retinopatía diabética (vasoproliferativa y maculopática) Hemorragia vítrea Rubeosis iridis Glaucoma Catarata
Riñón	Glomeruloesclerosis intercapilar Insuficiencia renal progresiva Necrosis papilar (medular)
Nervios periféricos	Neuropatía somática Neuropatía autonómica
Sistema cardiovascular	Enfermedad isquémica del corazón, miembros inferiores y cerebro Cardiopatía diabética
Piel y tejidos conectivos	Necrobiosis lipoídica diabetorum Xantoma diabetorum Granuloma anular Furunculosis Micosis Síndrome de la mano rígida
Embarazo	Incidencia aumentada de niño con peso mayor al nacer Mortinatos, abortos, muertes neonatales y defectos congénitos

Keen H. Diabetes Mellitus. (1988). Chapter 16:278-305.

El interés de un tratamiento eficaz de la DM consiste en retrasar la aparición de sus complicaciones. Éstas son muy variadas y de diversa índole. Unas, pueden aparecer a corto plazo, son las complicaciones agudas que requieren una terapéutica más o menos urgente. Otras, aparecen a largo plazo, son las complicaciones crónicas que se relacionan, entre otros factores, con el control metabólico de la enfermedad. Los órganos blanco de la DM en relación con sus complicaciones crónicas son los ojos, riñones, nervios y arterias; ponen en juego la vida del diabético y aumentan considerablemente la morbimortalidad de la afección. Al ser la DM una enfermedad a veces «silenciosa», resulta frecuente que su diagnóstico se realice como consecuencia de una de sus complicaciones.

Entre las complicaciones crónicas destacan la neuropatía diabética, la macroangiopatía y la microangiopatía, responsable ésta de los problemas de retina y riñón. En esta tesis se centra la atención en las complicaciones crónicas que intervienen en la patología del pie, donde se encuentran implicados elementos particulares y peculiares de los componentes patológicos neuropático, angiopático e infeccioso.

Esta situación de macro y microangiopatía es más frecuente y severa que en las personas no diabéticas. A continuación se enumeran algunos datos interesantes relacionados con las complicaciones de la DM.

1. En los países occidentales más del 50 % de los ciegos son diabéticos.
2. El 50 % de los diabéticos que comenzaron su enfermedad antes de los 20 años fallecen de insuficiencia renal.
3. El 20-30 % de los diabéticos presentan una neuropatía moderada del tipo de dolores con o sin parestesias y en el 2 % llega a ser invalidante.
4. El 75 % de los diabéticos fallece por accidente cardiovascular. De éstos, más de la mitad presentan cardiopatía isquémica.
5. El 50 % de los pacientes con amputaciones por enfermedad vascular periférica son diabéticos.
6. El 30-50 % de los diabéticos presentan hipertensión arterial (Aragón FJ 2001).

FISIOPATOLOGÍA DE LAS COMPLICACIONES VASCULARES DE LA DIABETES MELLITUS

Los mecanismos fisiológicos y bioquímicos implicados en el desarrollo de las complicaciones de la DM incluyen anomalías hematológicas que podrían conducir a una deficiente oxigenación tisular. Entre éstas están: agregación eritrocitaria incrementada con aumento de la microviscosidad y deformabilidad disminuida; niveles incrementados de hemoglobinas glicadas cuya afinidad por el oxígeno se ve alterada y niveles de 2,3 difosfoglicerato (2,3-DPG) disminuidos; anomalías en la función de las plaquetas, incluyendo adhesividad aumentada y producción acelerada de derivados trombogénicos de prostaglandinas; anomalías en las proteínas plasmáticas y de los factores de la coagulación (Brownlee M y Cerami A 1981; Colwell JA 2000; Matsuda T y col., 1996).

El incremento de la agregación eritrocitaria en la sangre de pacientes diabéticos ha llevado a postular que este fenómeno puede contribuir a los cambios microvasculares obliterativos en la retina. La deformabilidad de los eritrocitos medida por su capacidad para pasar a través de poros de 5 micras está notablemente disminuida en la diabetes. Puesto que los eritrocitos deben atravesar capilares mucho más pequeños que su propio diámetro, esta deformabilidad disminuida puede perjudicar la perfusión rápida y homogénea dentro de la microcirculación (Brownlee M y Cerami A 1981).

Se ha observado en hemolisados normales que éstos contienen varios componentes de hemoglobina además de la HbA₀. Las hemoglobinas menores juntas constituyen un 5-10 % del total en eritrocitos de adultos normales. En pacientes diabéticos se han observado elevaciones del doble al triple de estos componentes menores: HbA_{1a}, HbA_{1b} y HbA_{1c}. Se ha postulado que estas hemoglobinas cargadas negativamente están glicadas con un carbohidrato presente en la cadena beta (Brownlee M y Cerami A 1981).

La HbA_{1b} tiene una afinidad elevada mientras que la HbA_{1c} tiene una afinidad moderadamente alta por el oxígeno. Se piensa que el 2,3-DPG (derivado del metabolismo de la glucosa en los glóbulos rojos) juega un papel regulador importante en el intercambio de oxígeno por la hemoglobina. Los niveles elevados de 2,3-DPG disminuyen la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, incrementando así la liberación de oxígeno hacia los tejidos. En diabéticos, donde puede coexistir una deficiencia relativa de 2,3-DPG con niveles elevados de glicohemoglobina durante periodos de concentración cambiante de

glucosa sanguínea, puede resultar una liberación disminuida de oxígeno hacia tejidos críticos (Brownlee M y Cerami A 1981). Se ha calculado que por cada 1% de reducción en la concentración de la HbA1c hay un 35% de reducción en la enfermedad microvascular (Donnelly R y cols., 2000).

Respecto a las proteínas plasmáticas y factores de la coagulación, se han encontrado en pacientes diabéticos niveles elevados de glicoproteínas, fibrinógeno, haptoglobina, lipoproteína(a), lipoproteína beta, ceruloplasmina y macroglobulina alfa 2. Estos cambios, particularmente el fibrinógeno y la haptoglobina elevadas, aumentan la viscosidad plasmática hasta en 16%, incrementando así la resistencia al flujo sanguíneo. También se ha informado el incremento de los factores de la coagulación V, VII, VIII, IX, X y XI, así como un aumento en el complejo trombina-antitrombina (TAT) en el plasma y niveles disminuidos de activador del plasminógeno con activación del sistema fibrinolítico en pacientes diabéticos, lo cual propicia la especulación de que un estado de hipercoagulabilidad podría estar implicado en la evolución de las complicaciones vasculares (Brownlee M y Cerami A 1981; Colwell JA 2000; Matsuda T y cols., 1996).

Enfermedad vascular periférica y alteraciones de la pared arterial

La enfermedad vascular de los grandes vasos puede ser debida en parte a anomalías en los lípidos plasmáticos y quizá también a cambios en la composición y metabolismo de la pared arterial. La deficiencia de insulina puede influenciar el avance de la aterosclerosis a través de mecanismos patológicos sinérgicos que involucran dislipidemia, productos finales de glicación avanzada (AGEs), disfunción endotelial, función plaquetaria alterada y anomalías en la función arterial (Brownlee M y Cerami A, 1981; Levin ME, 1995; Colwell JA 2000; Sobenig IA y cols., 1996; Bloomgarden ZT 1997; Bloomgarden ZT 1998; Devaraj S 2000).

Observaciones secuenciales de la patología de la pared arterial en el desarrollo de aterosclerosis experimental han proporcionado un modelo conceptual para la patogénesis de la macroangiopatía, la hipótesis de respuesta al daño. En este modelo, el evento inicial es el daño al endotelio de la íntima arterial. El incremento resultante en la permeabilidad de la barrera endotelial permite a los componentes sanguíneos entrar al espacio subendotelial, lo cual crea un área de descamación focal. La descamación focal hace posible a las plaquetas

circulantes contactar con el subendotelio. Estas plaquetas adherentes liberan factores que estimulan una proliferación focal de células musculares lisas. El depósito excesivo de lípidos y la formación de tejido conectivo da como resultado finalmente una placa ateromatosa madura. En individuos normales, el proceso probablemente es reversible en una etapa temprana. En hiperlipidemia y quizá en diabetes, sin embargo, la reversión de las lesiones tempranas es impedida por el daño continuo o repetido. Las interacciones de las plaquetas con las estructuras subendoteliales pueden ser aumentadas por la adhesividad elevada, la hiperagregabilidad y la producción acelerada de derivados trombogénicos de las prostaglandinas. La actividad disminuida de prostaciclina en la pared arterial diabética puede ser un factor contribuyente posterior (Brownlee M y Cerami A 1981). Además, puede ocurrir acumulación de AGEs en la pared vascular, dándole mayor rigidez y comprometiendo su capacidad de adaptación a los cambios en el flujo sanguíneo (Colwell JA 2000). Aunado a lo anterior, los vasos sanguíneos de los pacientes diabéticos se caracterizan por la presencia de cantidades elevadas de tejido conectivo como fibronectina, colágena y glucoproteínas, así como cantidades elevadas de calcio en la túnica media de la pared vascular. Estos cambios conducen a la pérdida de la elasticidad de la pared arterial. Las grandes arterias responden a los cambios en el flujo sanguíneo ajustando su diámetro interno para el suministro sanguíneo a los tejidos. El principal mediador de este mecanismo dependiente del flujo es el óxido nítrico (NO). El paciente diabético se caracteriza por alteración de la vasodilatación mediada por la insulina y este mecanismo puede contribuir a la acción disminuida de la insulina en estas condiciones clínicas. La calcificación de la túnica media de la pared arterial se ha utilizado como predictor de riesgo para amputación de extremidad inferior en pacientes diabéticos (Lehto S y cols., 1996). Lo anterior nos lleva a las siguientes conclusiones con respecto a la aterosclerosis en el paciente diabético desde el punto de vista morfológico: la íntima se observa más engrosada y por lo tanto hay una mayor reducción de la luz del vaso, mayor proliferación de músculo liso, disminución del número de macrófagos, aumento en la matriz extracelular con predominio de compuestos glicosados, destrucción de la membrana elástica interna y la ya mencionada calcificación de la túnica media, con las consecuencias funcionales que esto implica (Aragón FJ 2001)

Aspectos clínicos de la enfermedad vascular periférica. Existen factores de riesgo para la presentación de la enfermedad vascular periférica que a continuación se mencionan: edad

avanzada, factores genéticos, tiempo de duración de la diabetes, tabaquismo, presión sanguínea sistólica, presión sanguínea diastólica, niveles de colesterol y de triacilglicérols, hiperglucemia, hiperinsulinemia y obesidad (Levin ME, 2000). Además, existen diferencias en la forma de presentación en pacientes diabéticos y no diabéticos, como se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3: Diferencias de la enfermedad vascular periférica en diabéticos y en no diabéticos

	Diabético	No diabético
Clinica	Más común	Menos común
	Más jóvenes	De más edad
	Más rápida	Menos rápida
Hombre/Mujer	H=M	H>M
Oclusión	Multisegmentaria	Segmentaria
Vasos adyacentes	Involucrados	No involucrados
Vasos colaterales	Involucrados	Normales
Extremidades inferiores	Ambas	Unilateral
Vasos afectados	Tibiales	Aorta
	Peroneos	Iliaca
		Femoral

Dislipidemia. La presencia de elevaciones aún moderadas de lípidos plasmáticos por muchos años podría ser un factor contribuyente importante para el desarrollo de macroangiopatía diabética (Brownlee M y Cerami A 1981). Desde hace tiempo se ha reconocido que los niveles de colesterol y triacilglicérols plasmáticos se encuentran elevados en pacientes diabéticos, particularmente cuando hay un pobre control metabólico. Recientemente se estableció que los niveles plasmáticos de C-VLDL y de C-LDL están elevados, mientras que los de las C-HDL están disminuidos (Colwell JA 2000). Se ha

puesto particular énfasis en el estudio de las C-LDL y el papel que juegan en la aterogénesis acelerada en el paciente diabético, tanto en la forma de C-LDL glicada como de C-LDL oxidada (Colwell JA 2000; Sobening IA y cols., 1996; Bloomgarden ZT 1997; Devaraj S 2000).

AGEs. Se ha propuesto que estos productos de glicación avanzada (AGEs) contribuyen a la patogénesis de las complicaciones diabéticas (Méndez JD 2003) y se ha sugerido que pueden inducir disfunción endotelial (Bloomgarden ZT 1998; Suzuki LA y cols., 2001); pueden ser un factor contribuyente en la patogénesis de la aterosclerosis acelerada en los pacientes diabéticos interactuando con receptores de los macrófagos (Levin ME 1995).

Disfunción endotelial. Se caracteriza por niveles elevados de factor de Von Willebrand, disminución de la síntesis de prostaciclina y de inhibidores del activador de plasminógeno, así como disminución de la liberación de lipoprotein lipasa por las células endoteliales. Es muy probable que estos cambios conduzcan al desarrollo de la macroangiopatía diabética (Colwell JA 2000; Sekiguchi N y cols., 1996).

Función plaquetaria alterada. Las plaquetas de los pacientes diabéticos liberan cantidades elevadas de prostanoïdes estimulantes de agregabilidad como el tromboxano. Además ocurren interacciones plaqueta-plasma con proteínas plasmáticas, incluyendo complejos inmunes y fibrinógeno. La sobrevivencia de las plaquetas está acortada y la velocidad de recambio es rápida. Las plaquetas liberan factor de crecimiento derivado de plaquetas que promueve la proliferación de células musculares lisas (Colwell JA 2000). También se ha sugerido que una organización alterada de la membrana plasmática de las plaquetas, caracterizada por una composición anómala de los lípidos, podría alterar la respuesta plaquetaria a los estímulos involucrados en la patogénesis de la macroangiopatía diabética (Mazzanti L y cols., 1997).

Angiogénesis

La formación de vasos sanguíneos involucra dos procesos: 1. La vasculogénesis, en la que los precursores de las células endoteliales, llamados angioblastos, forman la red vascular primitiva durante el desarrollo embrionario. 2. La angiogénesis, en la que los vasos preformados generan brotes o retoños capaces de formar nuevos vasos (Risau W 1997). Como la angiogénesis es un proceso importante y esencial para la inflamación crónica y la fibrosis, para el crecimiento tumoral y para la formación de una circulación colateral, se

han realizado muchos trabajos dirigidos a descubrir los mecanismos que regulan la formación de nuevos vasos sanguíneos (Folkman J y D'Amore PA, 1996). Actualmente se ensayan tratamientos proangiogénicos y antiangiogénicos.

El desarrollo de nuevos vasos sanguíneos durante la angiogénesis requiere las siguientes etapas (Cotran RS y col., 2000):

- 1.- La degradación proteolítica de la membrana basal del vaso progenitor, para que pueda formarse un retoño capilar y la consecutiva migración celular.
- 2.- Migración de las células endoteliales hacia el estímulo angiogénico.
- 3.- Proliferación de las células endoteliales, inmediatamente detrás del borde de avance de las células que migran.
- 4.- Maduración de las células endoteliales, que incluye también a la inhibición del crecimiento y la remodelación en forma de tubos capilares.
- 5.- Reclutamiento de las células periendoteliales (incluidos los pericitos de los pequeños capilares y las fibras musculares lisas de los vasos más gruesos) que habrán de servir de sostén a los tubos endoteliales.

Factores de crecimiento y sus receptores. Aunque hay muchos factores de crecimiento que poseen capacidad angiogénica, la mayoría de las pruebas indican que el factor de crecimiento vascular derivado de endotelio (VEGF) y las angiopietinas son las que desempeñan un papel especial en la vasculogénesis y la angiogénesis. Estos factores son secretados por muchas células mesenquimatosas y del estroma, pero sus receptores están en gran parte circunscritos al endotelio, contribuyendo al desarrollo de los vasos durante la embriogénesis y la angiogénesis durante la vida adulta. Un ejemplo de sus acciones consecutivas, obtenido en gran parte de los estudios sobre embriones, refiere que al comienzo del desarrollo vascular, el VEGF se fija a uno de sus receptores (VEGF-R2), situado en los angioblastos, estimulando la formación y proliferación de las células endoteliales (Risau W 1997; Hanahan D 1997). Después, la unión del VEGF a un segundo receptor (VEGF-R1) provoca la formación característica de los capilares. Las fases posteriores de la angiogénesis parecen estar reguladas por las angiopietinas (Ang1 y Ang2). La Ang1 interactúa con un receptor de las células endoteliales llamado Tie2 favoreciendo el reclutamiento de una serie de células periendoteliales, que sirven para estabilizar o consolidar los vasos recién formados (Davis S 1996). La interacción

Ang1/Tie2 actúa como mediadora del desarrollo vascular, haciendo que los tubos endoteliales elementales se conviertan en estructuras vasculares más elaboradas, y ayuda a mantener el endotelio en estado quiescente. En cambio, la Ang2, actuando igualmente sobre la Tie2, despliega un efecto opuesto, dejando libres a las células endoteliales y volviéndolas más capaces de responder al estímulo de los factores de crecimiento como el VEGF o, si falta éste, a los inhibidores de la angiogénesis (Maisonpierre PC 1997).

El factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) es un potente factor angiogénico, pero el VEGF destaca por ser el factor de crecimiento más importante de los tejidos del adulto que experimenta una angiogénesis fisiológica (por ejemplo la del endometrio en proliferación), y de la angiogénesis patológica que se observa en la inflamación crónica, la curación de las heridas, los tumores y en procesos como la retinopatía de la prematuridad. La expresión del VEGF es estimulada por algunas citocinas y factores de crecimiento (como factor de crecimiento transformante- β , factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento transformante- α) y especialmente por la hipoxia tisular, que desde hace mucho tiempo se ha asociado a la angiogénesis (Dvorak HF 1995).

Proteínas de la matriz extracelular como reguladoras de la angiogénesis

Un elemento esencial de la angiogénesis es la movilidad y la migración dirigida de las células endoteliales. Estos procesos son controlados por varias clases de proteínas, entre las que destacan las integrinas, especialmente la $\alpha_v\beta_3$ que es esencial para la formación y mantenimiento de los vasos sanguíneos recién formados (Brooks PC 1994); las proteínas de la matriz celular como la trombospondina 1, y la tenascina C, que desestabiliza las interacciones célula-matriz y por lo tanto favorece la angiogénesis (Bornstein P 1995) y las proteasas, como los activadores del plasminógeno y las metaloproteasas de la matriz que tienen importancia en los fenómenos de remodelación que ocurren durante la invasión endotelial (Sage EH 1997).

Angiogénesis y diabetes mellitus

En los pacientes diabéticos está severamente alterado el desarrollo de la formación de vasos colaterales en respuesta a la isquemia. La reacción de los monocitos en respuesta al factor endotelial de crecimiento vascular está atenuada. Existe evidencia de que la insulina

juega un papel importante en la función del angioblasto o de la célula endotelial derivada del angioblasto. Debido a esto, se ha sugerido que podrían utilizarse angioblastos exógenos para aumentar la vascularización en pacientes diabéticos (Rivard A y cols., 1997; Shaper W y Buschmann I 1999; Waltenberg J y cols., 2000; Schatteman GC y cols., 2000). Sin embargo, no hay evidencias concluyentes sobre su funcionalidad.

Vascularización arterial del pie

La arteria poplítea es la continuación de la arteria femoral, situada en la cara posterior del muslo. Sus arterias terminales son la arteria tibial anterior y el tronco tibioperoneo. La arteria vascular anterior vasculariza las articulaciones tibioperonea superior y rodilla, además de la musculatura anterior de la pierna. En su parte inferior se anastomosa a nivel maleolar con las arterias maleolar interna y maleolar externa. La arteria pedia es continuación de la arteria tibial anterior. Se localiza longitudinalmente en la parte interna del dorso del pie, es superficial y palpable. Se anastomosa con la pierna plantar externa y responde de la vascularización de los huesos y los músculos de la zona, gracias a sus colaterales: arteria dorsal de tarso, arteria dorsal del metatarso (de las que se desprenden las arterias interóseas, con sus ramas perforantes anteriores y posteriores que comunican la planta con el dorso del pie) y la arteria interósea dorsal del primer espacio. El tronco tibioperoneo se bifurca en la arteria peronea y la arteria tibial posterior. La arteria peronea vasculariza el plano profundo y externo de la pierna y, a través de sus ramas terminales, la articulación tibiotarsiana, el maléolo externo del tobillo y la cara posterior del calcáneo. La arteria tibial posterior discurre por el plano profundo posterior de la pierna y sus ramas terminales vascularizan la planta del pie.

PIE DIABÉTICO: Conceptos y clasificación

Dentro de las complicaciones de la diabetes, la prevención y el cuidado de las complicaciones diabéticas del pie representan un desafío mayor para el médico. La neuropatía, la infección, la deformidad y la isquemia son graves amenazas para el pie diabético y para la calidad funcional total del paciente diabético. Los costos asociados con el cuidado adecuado de estos problemas representan un impacto económico significativo para los sistemas de salud (Metha SS y cols., 1999). El manejo del pie diabético requiere un

acercamiento multidisciplinario que se dirija a los problemas componentes de los sistemas nervioso, vascular, esquelético, inmune y tegumentario (Laughlin RT 1995).

En presencia de neuropatía o isquemia, la secuencia de un trauma menor (evento pivote) que conduce a ulceración cutánea y falla de la curación de la herida, es una causa frecuente de amputaciones de las extremidades inferiores en pacientes diabéticos (Pecoraro RE y cols., 1990). Tanto la neuropatía como la vasculopatía son importantes factores de riesgo para el desarrollo de úlceras de pie diabético (McNeely MJ y cols., 1995). La ausencia del reflejo del tendón de Aquiles, insensibilidad del pie y tensión de oxígeno transcutánea de menos de 30 mm de Hg son predictores independientes de úlceras del pie (McNeely MJ y cols., 1995).

Se ha definido el pie diabético como una “alteración clínica de base etiopatogénica neuropática e inducida por la hiperglucemia mantenida, en la que con o sin coexistencia de isquemia, y previo desencadenante traumático, produce lesión y/o ulceración del pie” (Aragón FJ 2001). Es una excelente definición del pie diabético con lesiones, pero desde un punto de vista práctico y para el manejo clínico diario, resulta útil ampliar el concepto. Nos ha resultado de utilidad incluir dentro del síndrome de pie diabético el pie de riesgo, el pie diabético ulcerado o con lesión y el pie diabético complicado que amenaza la viabilidad de la extremidad. Con este enfoque, aunque pueda parecer que se sobrestima el concepto de pie diabético, se afronta el problema de una forma integral, representando una perspectiva útil para el médico general. El pie que aún no presenta lesiones, pero en el que la diabetes ha producido alteraciones estructurales o funcionales que lo colocan en riesgo de lesionarse es también un “pie diabético”. Con este enfoque, que concede la importancia que requiere la identificación del pie de riesgo, se pueden reducir las dramáticas consecuencias de la enfermedad. Armstrong y cols. (1999) compararon en un estudio a 147 pacientes, 77 diabéticos y 69 no diabéticos, que sufrieron heridas punzantes en el pie. Los diabéticos padecieron una amputación con una probabilidad 46 veces superior y requirieron múltiples intervenciones quirúrgicas (cinco veces más que los no diabéticos).

Controversias sobre la clasificación del pie diabético

Los tres factores patogénicos que hacen del pie diabético susceptible de padecer graves lesiones que, en último término, pueden llevar al paciente hasta la amputación de la

extremidad, son la neuropatía, la enfermedad vascular periférica y la infección. Cada una de ellas puede contribuir en grado variable a la producción, perpetuación o evolución desfavorable de la lesión. De esta forma, en el síndrome del pie diabético quedan englobadas distintas condiciones patológicas que tienen un comportamiento, tratamiento y pronóstico totalmente diferentes. Esto hace imprescindible el intento de lograr una clasificación que tenga efectos prácticos en el manejo del pie diabético, a fin de realizar una toma de decisiones que sea la más efectiva de acuerdo a las condiciones individuales de cada paciente.

Existe un sistema de clasificación, ampliamente aceptado y usado desarrollado por Wagner (1979), para la estadificación de las úlceras del pie diabético, (Cuadro 4).

Cuadro 4. Estadificación de las úlceras de la piel

Grado	Características
0	Las úlceras tienen la piel intacta
1	Las úlceras son superficiales con tejido subcutáneo expuesto
2	Las úlceras tienen una extensión más profunda
3	La ulceración implica la formación de absceso u osteomielitis
4	Las úlceras involucran gangrena parcial del antepie
5	Las úlceras involucran gangrena extensa

Otros tipos de clasificaciones que se han desarrollado consideran otros aspectos clínicos y de gabinete, clasificando a las úlceras de acuerdo a factores etiopatogénicos que hacen más complicada su clasificación y no consideran estadios de tipo numérico. Así, la clasificación de Wagner continúa siendo más práctica y más manejable para fines estadísticos. La figura 1 resume estos criterios (Aragón FJ 2001), representando un algoritmo útil para el diagnóstico etiopatogénico del pie diabético que muestra, en lo general, los criterios utilizados por las otras clasificaciones.

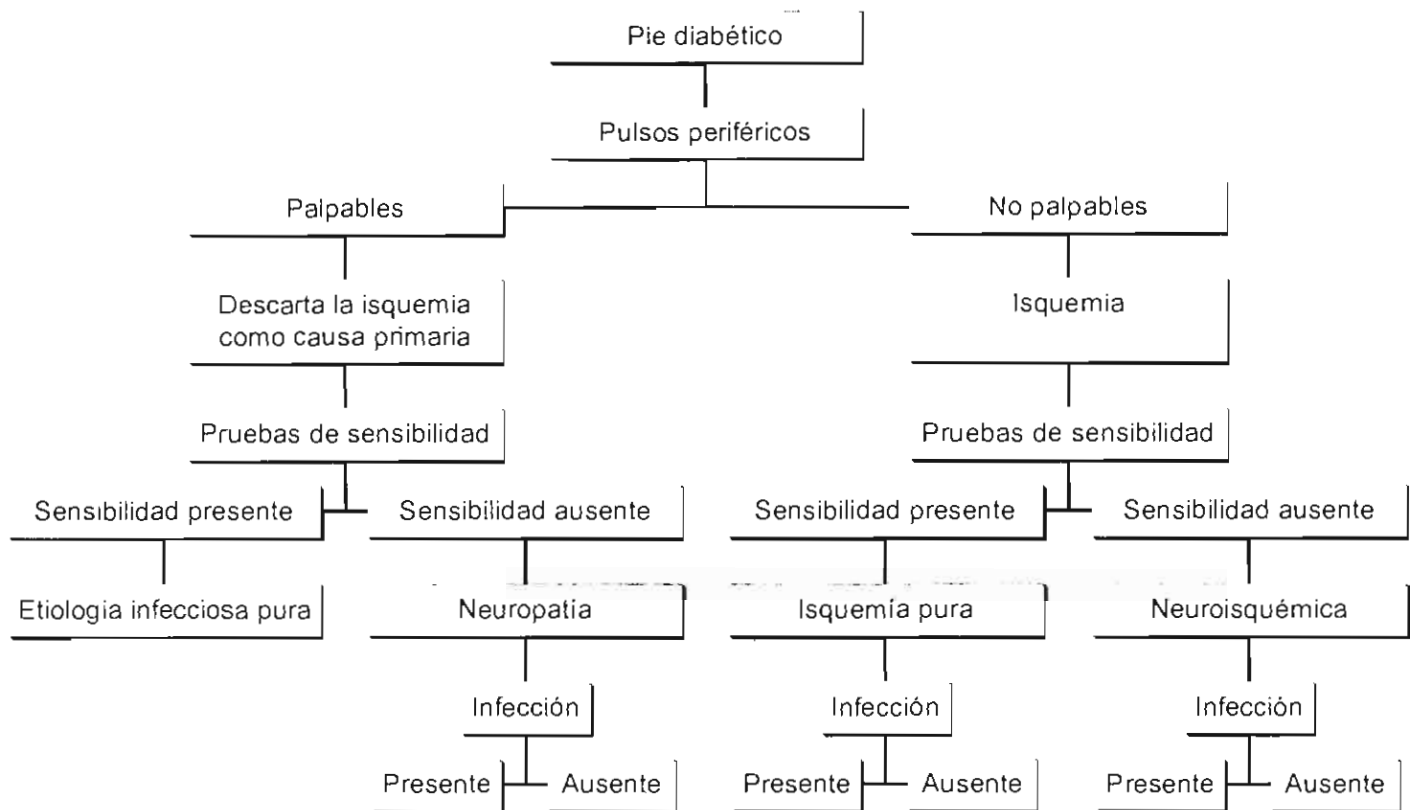


Figura 1. Algoritmo para llegar a un diagnóstico etiopatogénico del pie diabético. Tomado de Aragón FJ, 2001.

Microangiopatía y otras consideraciones fisiopatológicas en las úlceras del pie diabético

El concepto de microangiopatía como componente de la enfermedad vascular periférica en los pacientes diabéticos ha sido refutado por distintos estudios patológicos que no han encontrado evidencia de aterosclerosis en los pequeños vasos. Aunque no existe lesión oclusiva en la microcirculación, sí existen cambios patológicos que son típicos de la enfermedad. Existe un engrosamiento de la membrana basal capilar que contiene sustancia PAS positiva. El engrosamiento de la membrana basal capilar puede, teóricamente,

dificultar la migración leucocitaria necesaria como primer freno a la infección. También la máxima vasodilatación frente a la lesión se encuentra reducida en la diabetes y esto puede incrementar la susceptibilidad del pie a la infección.

Los estudios histológicos de los nervios distales revelan alteraciones estructurales de la microcirculación (engrosamiento de la membrana basal, hiperplasia de las células endoteliales, agregados plaquetarios y oclusión de los vasos) que conduce a una hipoxia tisular y a cambios celulares. Más recientemente se ha evocado además una disminución del NO endotelial como elemento de complicidad en la teoría hipóxica (Aragón FJ 2001).

La isquemia puede ser la causa de úlceras y gangrena en el paciente diabético, y la incidencia de enfermedad vascular periférica aterosclerótica está incrementada en pacientes con diabetes. La enfermedad vascular en pacientes diabéticos ocurre a una edad más joven y tiene patrones más difusos a través de la extremidad inferior (Laughlin RT y cols., 1995, Brodsky JW, 1993).

Aunque mucho se ha hablado acerca del concepto de enfermedad de los vasos pequeños (Irwin ST y cols., 1988; LoGerfo FW y Coffman JD 1984), no se ha identificado de manera concluyente una lesión patológica en el nivel subarteriolar que correlacione con niveles disminuidos de flujo y ulceración (Laughlin RT y cols., 1995).

El pie debe resistir de manera cotidiana una tremenda cantidad de fuerzas repetitivas, compresivas y de roce. La ulceración resulta de la presión repetitiva que excede el umbral de tolerancia de los tejidos blandos, conduciendo a la destrucción mecánica de los tejidos (Brodsky J 1993) Las ulceraciones plantares son secundarias a la presión de soporte del peso, al permanecer en pie o caminar, mientras que las ulceraciones laterales, mediales o dorsales casi siempre son el resultado de presión del zapato. Las ulceraciones no ocurren con un patrón aleatorio sobre o bajo el pie, sino más bien se encuentran en áreas de distribución de alta presión. El pie diabético responde a la presión excesiva con la formación de callos, los cuales pueden incrementar la presión tanto como un 30% (Young MJ y cols., 1992). La mayoría de las úlceras plantares del pie diabético se localizan bajo las cabezas metatarsales (Young MJ y cols., 1992; Veves A y cols., 1992). Las ulceraciones del antepie ocurren frecuentemente sobre la parte plantar media del dedo grueso, bajo las cabezas metatarsales y sobre el dorso de los dedos de garra. Otras localizaciones comunes incluyen las prominencias del dedo medio (Brodsky JW 1993).

Manejo y tratamiento del pie diabético

Para efectuar un tratamiento adecuado de las úlceras de los pacientes con pie diabético, es importante establecer con claridad las características de las úlceras, tomando en cuenta factores como: tamaño, etiología (neuropática, vascular, neuroisquémica), valoración clínica integral que incluya valoración de llenado capilar, coloración de tejidos adyacentes, rayos X, angiografía, estudios Doppler, valoración de atrofia o no de masas musculares relacionadas, localización, profundidad, presencia o ausencia de infección y control metabólico adecuado. Con estos datos es posible estadificar convenientemente la lesión (Aragón FJ 1998; ADA 1998; Levine ME 2000). El manejo adecuado del paciente con pie diabético incluye la educación del paciente acerca de su enfermedad, dieta, ejercicio físico, además de medicamentos hipoglucemiantes: orales e insulina, además de medicamentos hemorreológicos que mejoren el estado circulatorio integral del paciente.

El uso de la pentoxifilina que es un medicamento hemorreológico en el pie diabético es controversial. Algunos estudios sugieren un posible beneficio por este efecto, pero los estudios publicados muestran deficiencias y sesgos y sólo dos considerados como ensayos clínicos controlados no son concluyentes (De Backer TL y cols., 2000). Las variaciones metodológicas se presentan por la diversidad de propiedades y beneficios farmacológicos del medicamento. Estudios posteriores deberán precisar con claridad si se desea medir el beneficio por: sus propiedades antiinflamatorias (Nagy Z y cols., 1999); sus efectos hemorreológicos sobre la cicatrización (Ramani A y cols., 1993); su mejoría clínica en la claudicación y distancia caminada (Campbell RK 1993); o su efecto positivo sobre la glucosilación y posible control de la neuropatía (Rahbar S y cols., 2000). Por esto, aquí se comenta la utilidad de esta modalidad terapéutica en la infección, la cicatrización y la neuropatía.

La pentoxifilina es un derivado de la metilxantina, considerada recientemente como un potente inhibidor de la respuesta del factor alfa de necrosis tumoral durante el choque séptico (Marcinkiewiwick J y cols., 2000). Tiene numerosos efectos inmunológicos y dosis de 100 µg/ml suprimen la citotoxicidad natural de los linfocitos citolíticos cuando se usa de forma prolongada, por lo que debe tomarse en cuenta este efecto supresor (Nagy Z y cols., 1999). Asimismo, la pentoxifilina parece tener un efecto antioxidante y disminuye los

niveles de producción de óxido nítrico (Wanchu A y cols., 2000 y Simics E y cols., 2000). En el futuro, los estudios multicéntricos bien diseñados permitirán conocer la importancia clínica del efecto inmunológico de este medicamento en la infección del pie diabético, ya que algunos estudios muestran evidencia de que mejora la cicatrización de las úlceras y disminuyen las amputaciones; además de inhibir la glucosilación al evitar la formación de productos terminados avanzados. Esto puede tener un papel importante en la prevención y control de la hiperglucemia (Rahbar S y cols., 2000). Algunos estudios recientes apoyan un beneficio moderado de la pentoxifilina para el tratamiento de la enfermedad vascular periférica para mejorar las interacciones del flujo sanguíneo con los componentes celulares y el funcionamiento de los mismos (Gey DC y cols; 2004; Federman DG y cols; 2004).

Además de las propiedades eficaces de la pentoxifilina de uso actual para el tratamiento de las úlceras de pacientes diabéticos, existen en la actualidad otros tratamientos en uso cuya eficacia sólida no ha sido completamente confirmada. Estos son los más usados: factor recombinante humano de crecimiento derivado de plaquetas (rhPDGF-BB) (LeGrand EK, 1998), terapia de oxígeno hiperbárico (Faglia E y cols., 1996; Cianci P, 2000), tratamiento con larvas (Muncuoglu KY y cols., 1998), radiación láser de baja intensidad (Schindl A y cols., 1998), equivalente de piel humana (Brem H y cols., 2000), cirugía vascular reconstructiva de tipo bypass (Salam AA 2000) y campos electromagnéticos sistémicos de baja frecuencia (Castañedo-Dorantes y cols, 2002).

En la década de los 90s el rhPDGF-BB surgió como una promesa de tratamiento exitoso para las heridas crónicas, especialmente en las úlceras de los pacientes con pie diabético. Se efectuaron varios estudios para demostrar su eficacia en modelos animales (LeGrand EK 1998), considerando los aspectos toxicológicos (Knight EV y cols., 1998), su seguridad clínica en humanos (Smiell JM 1988) y su eficacia clínica (Wieman TJ 1988). La obtención del factor de crecimiento plaquetario tiene varias desventajas: 1) un costo elevado, 2) la imposibilidad de prepararse en centros nosocomiales pequeños y 3) el mayor riesgo de transmisión de enfermedades como SIDA, hepatitis y otras. Además, existen algunas evidencias de que la rápida actividad proteolítica que se observa en algunas úlceras condiciona una rápida destrucción de los factores de crecimiento. La reunión de consenso de la ADA en 1999, considera modesto el beneficio de este fármaco (ADA 1999).

La terapia de oxígeno hiperbárico (TOH) incrementa significativamente los niveles de oxígeno en los tejidos. Se considera que produce una actividad bactericida directa sobre los mecanismos anaerobios y mejora la angiogénesis. A pesar de informes favorables a la TOH, aún hay muchos problemas antes de considerarla como una modalidad de tratamiento recomendable. Su acceso limitado hace difícil crear una experiencia en la práctica suficientemente sólida y generalizada. Los costos de la tecnología y del saber médico que requiere la TOH han sido un impedimento para su difusión (Faglia y cols., 1996; Cianci 2000).

El uso de larvas en las úlceras de pacientes diabéticos se ha recomendado sobre todo para infecciones resistentes al tratamiento, más que como tratamiento curativo propiamente de la úlcera diabética. Se ha sugerido que actúan secretando enzimas proteolíticas que producen licuefacción del tejido necrótico, por digestión del tejido necrótico como alimento para las larvas, como lavado mecánico por el exudado seroso que propician y por cambio en el pH ácido a un pH alcalino más benéfico, entre otros factores. Sus principales desventajas son su aspecto estético y los efectos psicosociales, así como la necesidad de personal especialmente capacitado, lo que elevaría los costos que inicialmente parecerían bajos (Mumcuologu K y cols., 1998).

La irradiación láser de baja intensidad ha sido experimentada en seres por humanos (Schindl y cols., 1998). Consiste en la aplicación de irradiación láser transcutánea de baja intensidad en la región afectada por un período de tiempo corto (50 minutos) lo cual se espera mejore la microcirculación. De los cambios positivos observados en el flujo sanguíneo de la microcirculación, los autores extrapolan sus resultados y postulan la proliferación de células endoteliales a largo plazo durante la angiogénesis. Para apoyar su hipótesis, se refieren a experiencia previa de ellos y otros grupos de investigadores. Sin embargo, reconocen que por el momento su uso debe ser profiláctico y que su efecto para prevenir amputaciones y hospitalizaciones de larga duración, se requieren estudios posteriores que le den mayor solidez a sus planteamientos (Schindl A y cols., 1998).

El equivalente de piel humana es otro de los tratamientos en uso para la terapia de la úlcera diabética. Existen dos presentaciones: apligraf y dermagraft. El apligraf es una estructura con dos capas de piel viva: una capa epidérmica de queratinocitos vivos y una capa dérmica de fibroblastos vivos en una capa de matriz. Ambas capas se desarrollan a partir de tejido

extraído de prepucio de infantes. El dermagraft consiste de fibroblastos cultivado *in vitro* en una malla para producir un tejido metabólicamente activo con características histológicas similares a la dermis papilar del recién nacido. Aunque los resultados preliminares son buenos, la literatura no menciona curaciones del 100%, se ha observado que la osteomielitis reduce su eficacia y su costo elevado reduce con mucho su aplicación en grandes poblaciones. Se ha calculado que el costo de una sola aplicación de apligraf es de aproximadamente 1000 dólares (Brem H y cols., 2000).

Respecto a la revascularización la controversia continúa sin ser resuelta. La identificación mediante estudios angiográficos de un proceso obstructivo que puede ser reparado mediante un puente vascular, no resulta de beneficio para el paciente en muchos casos (Jorneskog G y cols., 1995). En contraposición, existen informes de grupos quirúrgicos que señalan los beneficios de la revascularización (Rosemblum BI y cols., 1994). Los diferentes resultados son producto de un sinnúmero de factores, siendo los más sobresalientes, la selección del paciente y las habilidades y experiencia del cirujano. Desafortunadamente, la mayoría de los pacientes con úlcera diabética presentan otros tipos de problemas de salud y condiciones socioeconómicas y psicosociales que los hacen candidatos a cirugía. Esto constituye un sesgo que promoverá en el futuro técnicas cada vez más novedosas y sofisticadas, que den la impresión de una mejoría de los resultados quirúrgicos y de su aparente superioridad sobre otros métodos. Por esta razón el cirujano no debe enfrentar sólo el problema del pie diabético que, como no nos cansamos de decirlo, es un problema multidisciplinario.

Los campos electromagnéticos de baja frecuencia (ELF) se usan en el tratamiento de las úlceras de pacientes diabéticos bajo los siguientes principios: las células autólogas mononucleares de la sangre periférica, activadas por mitógenos y aplicadas localmente sobre las úlceras, promueven la curación de la herida. Los ELF interactúan con estas células a través de canales de calcio activando cascadas de transducción de señales, promoviendo la síntesis de citocinas y modificando los patrones de proliferación celular. Los resultados obtenidos son interesantes, pero no concluyentes. Los propios autores mencionan las siguientes debilidades metodológicas: 1) la dificultad para reproducir los mismos resultados clínicos bajo las mismas condiciones experimentales, 2) el temor de efectos colaterales

subestimados y 3) el amplio espectro de mecanismos de interacción entre los campos magnéticos y los tejidos vivos.

Investigaciones recientes han mostrado la existencia de sustancias que son eficaces antiagregantes plaquetarios (Méndez JD y cols, 2000; Corona de la Peña N y cols, 1997), que funcionan como secretagogos (Méndez JD y cols, 2000), y que tienen potentes efectos vasodilatadores, además de normalizar la dislipidemia y disminuir la glucemia en modelos experimentales de diabetes (Méndez JD y cols, 2000; Méndez JD y Balderas F 2001). Estas sustancias son la L-arginina y las poliaminas, de las cuales describiremos algunos antecedentes.

Cabe señalar también que estas sustancias tienen en modelos experimentales propiedades antiaterogénicas (Cook JP 1991).

L-ARGININA

La L -arginina o ácido alfa amino-delta guanidino-valeriánico, es un aminoácido alifático que ha sido considerado como semiesencial para los mamíferos y las aves, ya que aún cuando lo sintetizan, también lo requieren en la dieta para mantener niveles adecuados en el organismo, sobretodo en las etapas tempranas del desarrollo para sostener una síntesis activa de proteínas y para la realización de múltiples procesos bioquímicos y fisiológicos. (Rodríguez AC y Núñez JC 1971).

Este aminoácido sigue varios destinos metabólicos (Figura 1), por lo que sus niveles plasmáticos pueden detectarse bajos en un momento dado. Algunos órganos y tejidos pueden requerir de un mayor aporte de L-arginina por las funciones que desempeñan, tal es el caso del hígado y del páncreas.

Metabolismo de la L-arginina

El metabolismo (Figura 2) de este aminoácido ocurre por dos mecanismos que son complementarios.

1) Hidrólisis enzimática, que ocurre por acción de la enzima arginasa, no sólo en el ciclo de la urea sino también en tejidos extrahepáticos, que lleva a la formación de ornitina y urea.

2) Desaminación oxidativa, proceso por el cual se conserva el radical guanidínico y se hace posible su utilización en la síntesis de creatina y de otros productos con gran actividad

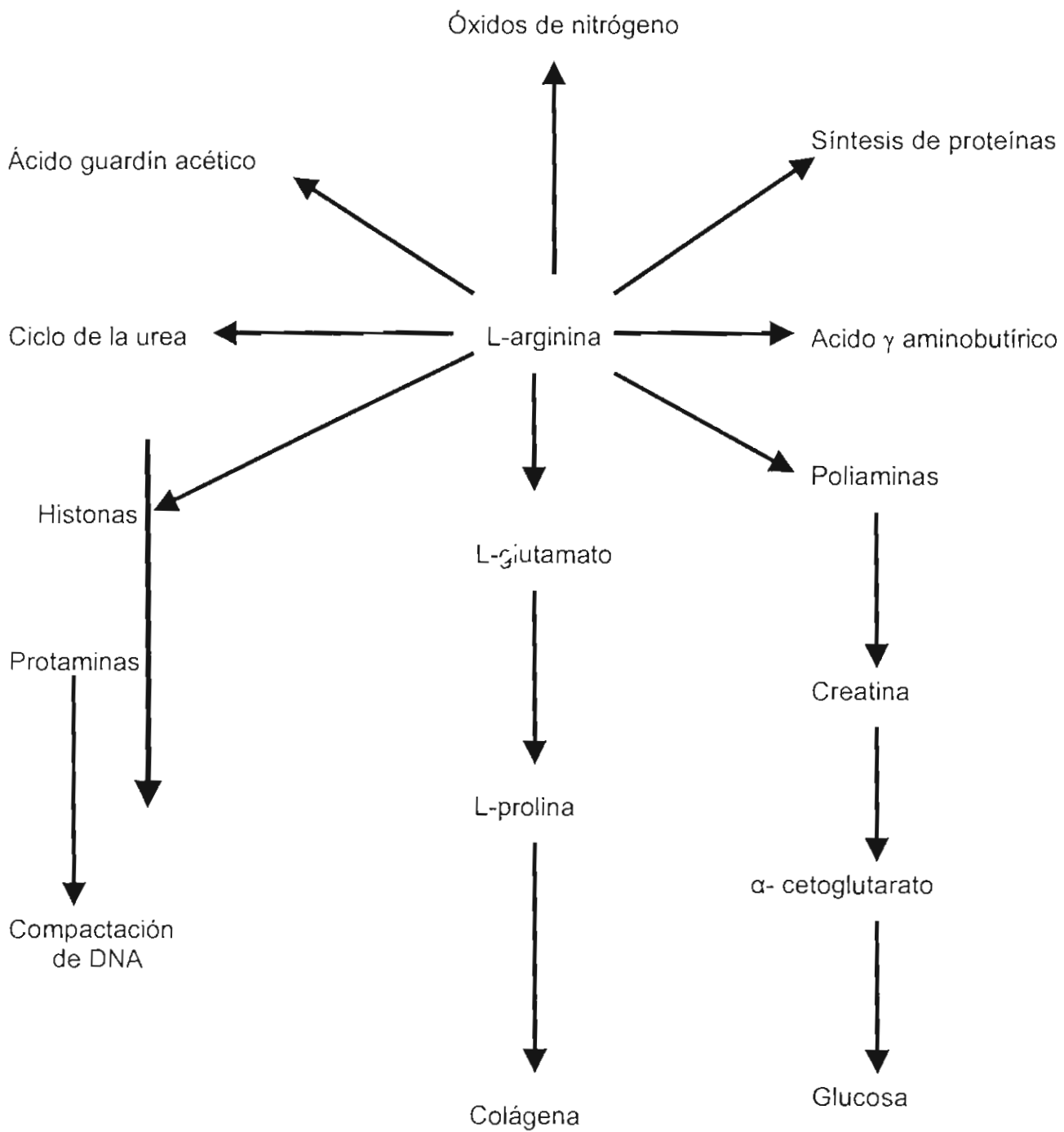


Figura 2. Destinos metabólicos de la L-arginina.

biológica, como son la prolina y la hidroxiprolina.

La importancia de la L-arginina se debe a que participa en varios procesos metabólicos. Es también un aminoácido glucogénico ya que se oxida a glutamato y éste, por oxidación, produce alfa cetoglutarato, un intermediario de la síntesis de glucosa (Rodríguez AC y Núñez JC 1971).

La L-arginina interviene en la formación de poliaminas, ya que por medio de la arginasa se forman urea y ornitina. Este último aminoácido es precursor de la síntesis de poliaminas (Caaldi AA y Algranati ID 1989; Cunningham R y Werner KM 1975).

Arginasa

La arginasa, enzima que cataliza la hidrólisis de L-arginina a ornitina y urea, fue detectada inicialmente en el hígado de mamíferos; en la actualidad diversos estudios han demostrado su presencia, aunque en cantidades menores, en otros tejidos como riñón, testículos y bazo.

En los animales la arginasa existe en la fracción soluble del citoplasma y en diversas estructuras celulares, tales como mitocondrias, lisosomas y aparato de Golgi. (Rodríguez AC y Núñez JC 1971).

La actividad de la arginasa está presente en el tejido epidérmico normal y se encuentra elevada en muchas enfermedades asociadas con hiperplasia e hiperqueratinización epidérmica.

Se piensa que la arginasa de la epidermis sirve para proveer ornitina, la cual se ha asociado con la proliferación celular mediante la ruta de poliaminas. La actividad de la arginasa se ha determinado en el músculo de animales con y sin herida, encontrándose una marcada elevación de la actividad de ésta en el tejido herido. En la epidermis la arginasa regula el aporte de L-arginina o sus productos metabólicos en el metabolismo celular; esta enzima también regula el metabolismo de la prolina, la cual es necesaria en la biosíntesis de proteínas epidérmicas.

Algunos investigadores, al estudiar la actividad de arginasa en epidermis de ratón, propusieron que la elevada actividad de esta enzima en dicho tejido puede desempeñar una función importante en la biosíntesis de poliaminas, en la producción de glutamato y prolina, así como también en la producción de proteínas queratinosas (Redmond AF y Rothberg S 1978; Verma AK y Boutwell RK 1981).

Cook JP y cols. (1991) describieron que la L-arginina puede reducir el tamaño de las lesiones ateroscleróticas en conejos Nueva Zelanda alimentados con 1% del colesterol. Los beneficios de la L-arginina se han explicado con base en la producción de NO en el tejido vascular (Cooke y cols., 1991; Bôger y cols., 1998), ya que la formación de óxido nítrico por el endotelio puede prevenir la agregación plaquetaria, la adhesión de leucocitos y promover la vasodilatación (Furchgott LF 1983; Luscher TF 1990).

BIOSÍNTESIS DE LAS POLIAMINAS

Las poliaminas, putrescina, espermidina y espermina son bases alifáticas de bajo peso molecular (Heby 1981). Se encuentran en forma libre o conjugada con fosfolípidos, carbohidratos, esteroides, péptidos y unidades subestructurales de alcaloides. Las funciones de las poliaminas deben estar determinadas entonces por su naturaleza catiónica.

Las poliaminas cumplen funciones importantes en la regulación de diversos procesos, tales como crecimiento, proliferación, multiplicación y diferenciación celulares. Estas moléculas, a semejanza de los ácidos nucleicos, aminoácidos y proteínas, se encuentran distribuidas ampliamente en los sistemas vivientes, lo que quizá sea un indicativo de que su presencia es esencial para la realización de los procesos básicos de la función celular. Las poliaminas también están presentes en tejidos de mamíferos y en fluidos corporales asociadas covalentemente, por ejemplo, con proteínas (Méndez JD 1989; Persson L y Heby O 1990).

En los mamíferos, incluyendo al hombre, la espermidina y la espermina están presentes en la mayor parte de los tejidos en una concentración aproximada de 1mM (Méndez JD 1989; Persson 1990). La putrescina se encuentra en concentraciones más bajas, excepto en tejidos que están estimulados para el crecimiento, como la medula ósea (Tabor y Tabor, 1984). Es interesante mencionar que los niveles de poliaminas se incrementan por la acción de hormonas, drogas, procesos de regeneración de tejidos y factores de crecimiento (Bethell y cols., 1982).

Los niveles intracelulares de poliaminas, particularmente espermina y putrescina, aumentan espectacularmente con el crecimiento, tanto en células normales como neoplásicas.

La putrescina es el precursor de la síntesis de la espermidina y la espermina; en las células animales esta diamina se obtiene de la ornitina (Méndez JD 1989).

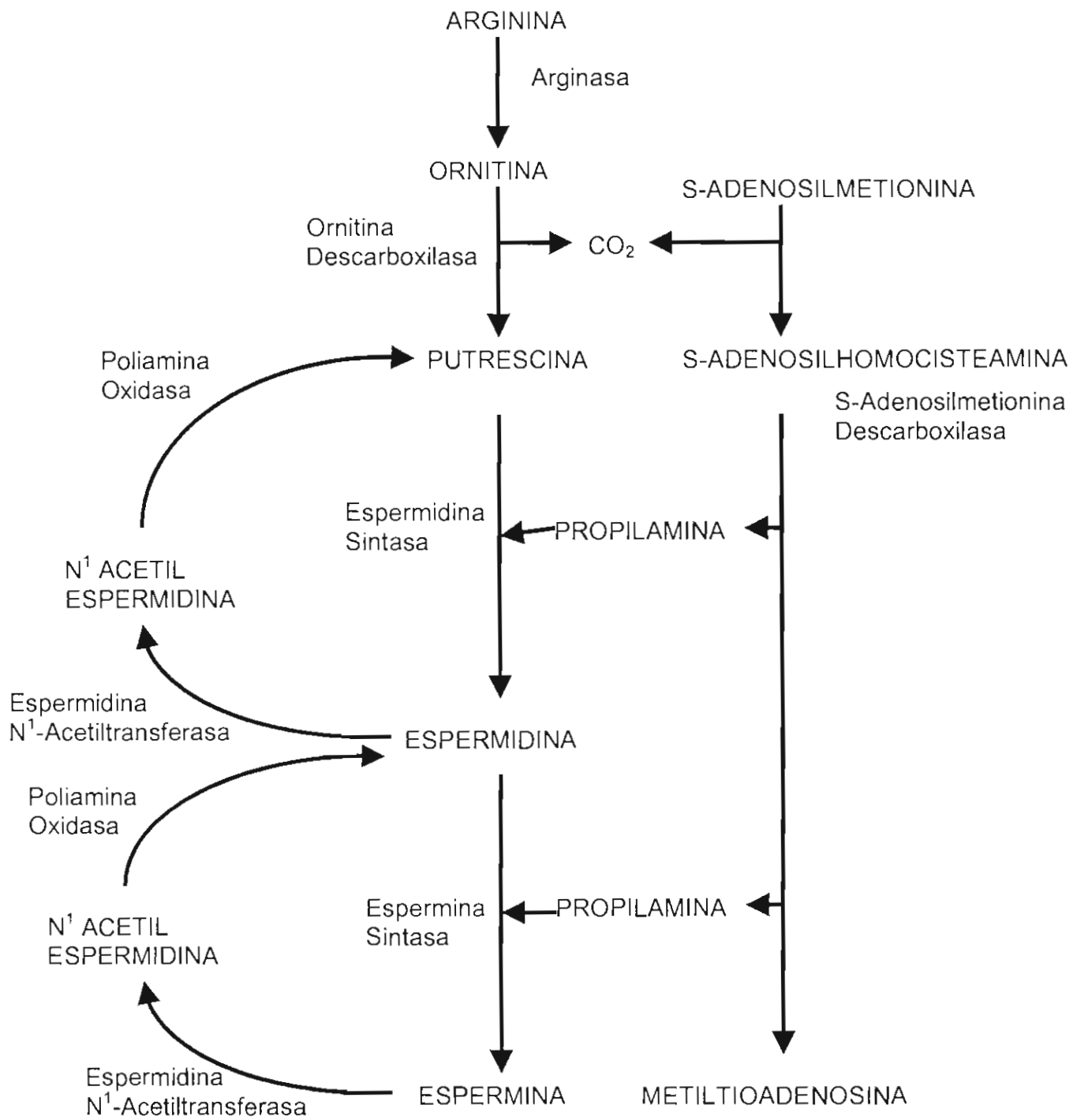


Figura 3. Biosíntesis y regulación de las poliaminas

La arginasa, que cataliza la hidrólisis de la L-arginina para producir ornitina y urea, es considerada una de las enzimas clave de la vía biosintética de poliaminas en tejidos extrahepáticos (Méndez y Arreola 1992). Produce ornitina para la subsiguiente formación de putrescina, el precursor de las otras poliaminas (espermidina y espermina).

En los mamíferos, la ornitina descarboxilasa (ODC) (Figura 2) cataliza la formación de putrescina a partir de ornitina (Bachrach 1973; Tabor y Tabor 1984); esta enzima aumenta rápidamente después de un estímulo de crecimiento.

La mayoría de las enzimas que participan en la biosíntesis de poliaminas se localizan en el citosol. En los mamíferos la ODC cataliza el paso inicial en la biosíntesis de poliaminas. Esta enzima transforma la ornitina en putrescina. La espermidina y la espermina se forman a través de la putrescina y espermidina, respectivamente, por la transferencia de un residuo de propilamina aportado por la S-adenosilhomocisteamina, el producto descarboxilado de la S-adenosilmetionina. Estas reacciones están catalizadas por las enzimas S-adenosilmetionina descarboxilasa, y espermina y espermidina sintasas (Pegg A 1986; Pegg A y McCann PP 1982) (Figura 3).

Funciones de las poliaminas

Se sabe que las poliaminas intervienen en procesos de proliferación celular y síntesis proteínica. Está bien demostrado que la disminución en la concentración de putrescina y espermidina disminuye la velocidad de proliferación celular (Mamont y cols., 1978) y que las concentraciones de poliaminas se incrementan en condiciones en la que aumenta la división celular. Las poliaminas producen inhibición reversible de la respuesta de síntesis de DNA estimulada por fibroaglutinina, concanavalina A o lipopolisacáridos bacterianos, e inducen la respuesta citolítica de linfocitos.

Las poliaminas pueden afectar significativamente a las membranas biológicas (Sehuber 1989) y de esta manera modular la transducción y la transmisión de señales mediadas por receptores (Koenig y cols., 1983). Debido a sus propiedades químicas, estas moléculas pueden cambiar la fluidez de las membranas por entrecruzamiento electrostático con diversos componentes membranales, modificando indirectamente diversas actividades membranales de manera simultánea. Hay evidencia de que las poliaminas pueden estabilizar enzimas asociadas con las membranas del retículo endoplásmico y que interactúan con los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso (Raina y Teleranta 1967).

De manera similar, las poliaminas interactúan con estructuras en la superficie celular (Cuatrecasas P 1969) involucradas en diversas funciones de la insulina, modulando de esta manera el transporte y el metabolismo intracelular de varias sustancias.

Se conocen efectos citoprotectores de las poliaminas que han sido evidenciados en un modelo de diabetes inducida por aloxana (Méndez y Arreola 1992). En presencia de poliaminas, el daño pancreático causado por aloxana, un agente utilizado para inducir diabetes en animales, es menor (Méndez y Arreola 1992). En el estadio diabético, las concentraciones de putrescina disminuyen y se restablecen cuando se administra L-arginina (Méndez y Arreola 1992), lo que indica que la L-arginina aumenta la síntesis endógena de poliaminas. La reducción en la concentración de poliaminas en ratas diabéticas está acompañada de una disminución en la actividad de arginasa. La actividad de esta enzima también se normaliza con la administración de L-arginina (Méndez y Arreola 1992).

Las poliaminas putrescina, espermidina y espermina previenen la embriotoxicidad y el desarrollo retardado causado por aloxana en ratas (Palomar y cols,1998), resultados que han sido explicados con base en las propiedades antioxidantes de las poliaminas (Lovaas E, 1997).

Las poliaminas han sido detectadas y medidas en dermis y epidermis humana. Se ha encontrado que los niveles de poliaminas entre estas dos porciones de piel varía notablemente, tanto cuantitativa como cualitativamente. Se han detectado niveles más altos de espermidina y espermina en la epidermis que en la dermis.

Estos valores reflejan las diferencias en la actividad proliferativa y diferenciación entre las dos regiones. Las concentraciones tan elevadas de espermidina y espermina en la epidermis se deben probablemente a que éstas cumplen una función importante en este tejido (El Baze P y cols., 1983). Bethell y cols. estudiaron la actividad de las enzimas que participan en la biosíntesis de poliaminas y midieron la concentración intracelular de putrescina, espermidina y espermina en fibroblastos de ratón. Sus resultados sugieren que los niveles de poliaminas están controlados por un complejo en el que participan estas enzimas. (Bethell D y cols., 1982).

Las poliaminas putrescina, espermidina y espermina previenen la embriotoxicidad y el desarrollo retardado causado por aloxana en ratas (Palomar y cols.,1998), resultados que han sido explicados con base en las propiedades antioxidantes de las poliaminas (Lobas,

1997). La L-arginina y la espermidina pueden también disminuir la acumulación de colágena en riñones de ratones diabéticos, efecto que puede deberse a la protección de compuestos carbonilo, abundantes en el estado diabético (Marx y cols., 1995).

Se ha propuesto que las poliaminas pueden ayudar a regular la interacción entre la fosfohidrolasa y las membranas celulares, lo que facilitaría la acción de los ácidos grasos y permitiría a las células aumentar su capacidad de síntesis de triacilgliceroles (TAG) cuando aumenta el aporte de ácidos grasos (Martín-Sanz y cols., 1985). Las poliaminas también son capaces de modular el grado de daño a la mucosa causado por ciertos estímulos (Thirumalai y cols., 1987).

En el tejido vascular, altas concentraciones de putrescina (10 mg/kg) pueden producir hipotensión y taquicardia (Rossi y cols., 1984). Concentraciones micromolares de poliaminas estimulan la entrada intracelular de calcio a las células endoteliales de la vena umbilical (Morgan y cols., 1990), lo que podría resultar en la liberación de sustancias vasoactivas como el factor relajante derivado de endotelio (Moncada y cols., 1991). La sensibilidad del transporte de putrescina a la falta de L-arginina pero no a la falta de L-ornitina (Bogle y cols., 1994) sugiere que la L-arginina regula el metabolismo de poliaminas y su transporte a las células endoteliales. De esta manera los factores que afectan la utilización de L-arginina también afectan el metabolismo de las poliaminas.

Los macrófagos, al liberar poliamina oxidasa cerca de otras células inflamatorias, regulan sus funciones. Se sabe que los linfocitos contienen cantidades nanomolares de espermina y, al morir estas células, liberan suficientes poliaminas para interactuar con el suero. Las células del sistema inmune son muy sensibles a poliaminas en comparación con los fibroblastos. Se ha encontrado que concentraciones de 40 μM de espermidina inhiben el movimiento de los macrófagos en presencia de suero bovino (Ferrante 1985). Todo esto indica que las poliaminas son reguladoras de la respuesta inmune.

Joseph y cols. (1987) estudiaron el efecto de las poliaminas sobre plaquetas aisladas. Estos autores utilizaron un sistema en el que se induce la agregación plaquetaria por diversos agentes inductores. En estos estudios una concentración de 10 μM de espermina fue suficiente para producir una inhibición total de la agregación plaquetaria. Por el contrario, utilizando colágena la inhibición solamente alcanzó el 50%. Méndez y cols. han descrito la inhibición de la agregación plaquetaria por L-arginina y poliaminas en ratas normales y

ratas diabéticas (Bethell y cols., 1982). La agregación plaquetaria se inhibe en mayor proporción en presencia de espermidina y también se describe una menor actividad de arginasa en la rata diabética (Bethell y cols., 1982).

La espermidina y la espermina estimulan la oxidación de glucosa a CO_2 e inhiben la lipólisis. Estos efectos de las poliaminas se observan entre 1 y 50 μM , en condiciones en las que la concentración de glucosa es menor a 30 μM en adipositos (Lockwood y cols., 1971). La espermidina inhibe la lipólisis inducida por epinefrina o teofilina pero no por dibutilil AMPc. Es decir, en las células adiposas, las poliaminas, así como la insulina, inhiben la lipólisis suprimiendo los niveles de AMPc y facilitando el transporte de glucosa. El mecanismo de acción de las poliaminas no se conoce, pero se cree que no es un efecto debido a la carga de las moléculas, ya que a la misma fuerza iónica la putrescina no tiene efecto. Como el efecto de las poliaminas es inhibido por análogos de la glucosa se cree que las poliaminas facilitan el transporte de glucosa. Concentraciones nM de poliaminas en células beta del páncreas disminuyen la cantidad de mRNA al interactuar con estas moléculas o con enzimas que lo degradan. La inhibición de la síntesis de poliaminas en las células beta disminuye la cantidad de mRNA para insulina, mientras que la glucosa puede aumentar los niveles de síntesis de poliaminas. La L-arginina también estimula la secreción de insulina (Nogowski y Norwak 1986).

La L-arginina y la espermidina tienen efecto antihiper glucémico y son capaces de normalizar los niveles de lípidos, lipoproteínas y apolipoproteínas en ratas diabéticas (Méndez y Balderas 1999). Estos efectos se han explicado por la acción antilipolítica de las poliaminas formadas a partir de L-arginina. La espermidina y la espermina aumentan la oxidación de glucosa e inhiben la lipólisis, suprimiendo la producción endógena de AMPc de manera similar a la insulina en adipocitos aislados de rata (Furie y Furie 1988).

Por la importancia de la función del óxido nítrico (NO) que es un derivado del metabolismo de la L-arginina y el papel que tiene en la interacción de mecanismos para la curación de la herida, se mencionan brevemente los aspectos más importantes del mismo.

Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es un mediador de la inflamación, que fue descrito inicialmente como un factor liberado por las células endoteliales, cuya acción principal es la vasodilatación a

través de la relajación del músculo liso de la pared vascular, denominado factor de relajación derivado del endotelio (Furchgott RF y Zawadski JV 1980). El óxido nítrico es un gas soluble producido además por otro tipo de células (macrófagos y neuronas). Su período de semieliminación *in vivo* es sólo cuestión de segundos, por lo que actúa sobre las células muy próximas al punto donde es producido. Se sintetiza a partir de L-arginina por acción de la enzima óxido nítrico sintasa (Nathan C 1997). Existen tres tipos diferentes de sintasa del NO (la endotelial, la neuronal y la inducida por citocinas). El NO es un potente vasodilatador y además desempeña funciones importantes en la inflamación: reduce la agregación y adhesión plaquetarias y actúa como regulador del reclutamiento de leucocitos. Además actúa en la respuesta del huésped frente a la inflamación. Existen alteraciones en la producción de NO por parte del endotelio en la arteriosclerosis, la diabetes y la hipertensión (Fang FC 1997).

Se ha postulado la hipótesis de que la enzima endotelial del NO modula la angiogénesis en modelos animales caracterizándola como una respuesta compensatoria a la isquemia. Esto se ha realizado administrando L-arginina a conejos normales con isquemia inducida, habiendo demostrado previamente que la L-arginina aumenta la producción endógena de NO. La vascularidad se ha estudiado mediante angiografía e índices hemodinámicos de perfusión tisular, a través de mediación del flujo sanguíneo mediante Doppler (Muroharra T y cols., 1998).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Justificación

Un gran número de personas en todo el mundo son afectadas por DM. Se considera que en nuestro país existen aproximadamente 4 654 000 pacientes diabéticos y en el año 2025 habrá alrededor de 17 684 000 (Méndez JD y cols., 2000). Una causa frecuente por la que los pacientes diabéticos solicitan consulta médica se relaciona con problemas del pie diabético, particularmente con la presencia de úlceras, las cuales si no son tratadas adecuadamente llevarán a la amputación del miembro afectado (Levin ME 1995; Bloomgarden ZT 2001, American Diabetes Association 1998; Potter PJ 1998; Hill SL y cols., 1999; Pittet D y cols., 1999; Van Gils CC y cols., 1999; Dargis y cols., 1999; Pinzur MS 1999; Colwell JA 2000; Coleman WC 2000; Levine ME 2000).

Existen diversos estudios estadísticos acerca de aspectos epidemiológicos sobre la DM en relación con la frecuencia de úlceras del pie diabético, amputaciones y morbimortalidad, con ciertas diferencias entre ellos. Sin embargo, en todos ellos resalta su importancia por las consecuencias en la calidad de vida del paciente, días de hospitalización, morbimortalidad y el impacto económico para la sociedad (Metha SS y cols., 1999). Los datos epidemiológicos indican que la mayoría de los pacientes desarrollan problemas del pie después de los 40 años y que estos problemas se incrementan con la edad (Levin ME 1995). Se ha calculado que alrededor de 15% de los individuos con DM desarrollará úlceras del pie, de las cuales 15-20% requerirán amputación de la extremidad inferior. De 9-20% de estos pacientes se ha estimado que hasta dos tercios experimentarán una segunda amputación ipsilateral o contralateral dentro de los 12 meses posteriores a la primera amputación. De todas las amputaciones relacionadas con diabetes, 70-80% son precedidas por úlceras crónicas (Ollendorf DA y cols., 1995).

En un estudio de registro de autopsias, se encontró que la gangrena como causa de muerte correspondió al 21% de pacientes diabéticos y que esta causa de muerte fue de 53 a 71 veces más frecuente en personas diabéticas que en no diabéticas. (Colwell JA 2000). En estudios hospitalarios la enfermedad vascular periférica puede alcanzar hasta el 25% de las admisiones y las estancias de hospitalización generalmente son muy largas (Colwell JA 2000). Cinco años después de una amputación inicial, 28-51% de diabéticos amputados han

sufrido una segunda amputación y hasta dos tercios de estos pacientes muere en los siguientes 5 años (Reiber GE y cols., 1995).

No obstante los esfuerzos educativos y preventivos realizados por diversos grupos de clínicos para reducir la frecuencia de presentación de úlceras del pie diabético y las amputaciones de extremidades inferiores, la meta de disminuir en un 40% la frecuencia de amputaciones en los Estados Unidos para el año 2 000 no fue alcanzada y la tendencia observada actualmente es hacia la mayor prevalencia de DM, así como hacia un aumento en las proporciones y costos de las amputaciones como consecuencia de las úlceras del pie diabético (Levin ME 1995; Ollendorf DA y cols., 1998; Mayfield JA y cols., 1998; Armstrong DG y cols., 1999; Van Gils y cols., 1999; Bloomgarden ZT 1999; Dargis V y cols., 1999; Bloomgarden ZT 2001).

Aunque ha habido avances en el tratamiento de la DM, el estado actual de las investigaciones parece indicar que, debido a la heterogeneidad de las enfermedades que están asociadas a ella, tendremos que enfrentarnos todavía durante mucho tiempo con el pie diabético como una de sus complicaciones. Aunque se han intentado diversos tipos de tratamientos y estrategias para su prevención, los resultados no han sido concluyentes.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿En los pacientes con úlceras del pie diabético, es más eficaz la reparación de la úlcera cuando son tratados con L-arginina subcutánea comparados con los pacientes tratados con pentoxifilina vía oral?
2. ¿Los pacientes diabéticos con cambios no ulcerativos en la piel del pie muestran el mismo tipo de vascularización expresada por número y distribución de vasos sanguíneos que los pacientes diabéticos con lesiones ulcerativas?

HIPÓTESIS

Los pacientes con úlceras del pie diabético sanan más eficazmente de éstas cuando son tratados con L-arginina subcutánea, que cuando son tratados con pentoxifilina vía oral.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Demostrar que en los pacientes con úlceras del pie diabético es más eficaz, para la curación de la piel ulcerada de éstos, el tratamiento con L-arginina subcutánea que el tratamiento con pentoxifilina vía oral empleado actualmente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el estado metabólico de los pacientes tratados con L-arginina y pentoxifilina, determinando la glucemia, hemoglobina glicada y perfil de lípidos.
2. Evaluar las características y calidad de los vasos sanguíneos del tejido de la zona ulcerada de una de las extremidades inferiores y de la piel adyacente de los pacientes diabéticos tratados con los fármacos mencionados, mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Universo de trabajo

Pacientes diabéticos con lesiones ulcerativas de la piel de alguno de los miembros inferiores del HGZ # 47 del IMSS, Delegación 4 Sureste.

IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIABLES

Independientes

DM.

Tipo de tratamiento de las lesiones dérmicas.

Dependientes

Curación de las lesiones ulcerativas.

Angiogénesis.

DEFINICIÓN OPERATIVA DE LAS VARIABLES

Diabetes mellitus: Grupo de enfermedades metabólicas caracterizado por hiperglucemia provocada por defectos de la insulina en la secreción, acción o ambas.

Tipo de tratamiento: Los tratamientos fueron de dos tipos: control y experimental. El primero consistió en el uso de pentoxifilina vía oral más curación diaria con isodine y solución fisiológica. El experimental consistió en L-arginina 10 mM preparada en una solución salina estéril aplicada por vía subcutánea una vez al día en una cantidad variable según el tamaño de la lesión.

Reparación de la lesión ulcerativa: Es el proceso mediante el cual la lesión ulcerativa de la piel se regenera hasta llegar a la re-epitelización total. Es una variable cualitativa que puede estar presente o ausente. En cuanto se mida el número de días necesarios para la reparación completa es una variable cuantitativa discreta.

Angiogénesis: Proceso en el que los vasos preformados generan brotes o retoños capaces de formar nuevos vasos. Variable cuantitativa discreta: presencia o ausencia.

Criterios de inclusión

Pacientes con diagnóstico de DM y con lesiones ulcerativas de la piel.

Lesiones ulcerativas de miembros inferiores: pierna, región maleolar y pie.

Edad de 25 a 80 años.

Criterios de exclusión

Pacientes que por el estadio de las lesiones ulcerativas de la piel requieran de amputación quirúrgica.

Criterios de eliminación

Abandono del tratamiento por parte del paciente (no adherencia al tratamiento).

Tamaño de la muestra

Pacientes diabéticos con lesión ulcerativa del grupo experimental (n = 7)

Pacientes diabéticos con lesión ulcerativa tratados con pentoxifilina: (n = 7)

Aspectos éticos

El presente estudio tomó en cuenta los Acuerdo de la Conferencia Internacional de Helsinki sobre estudios de investigación en seres humanos, así como las consideraciones éticas al respecto de la Ley General de Salud de los Estados Unidos Mexicanos y las del propio Instituto Mexicano del Seguro Social.

PROGRAMA DE TRABAJO

1.- Se integraron dos grupos de pacientes:

a) Pacientes diabéticos con lesiones ulcerativas del tercio distal de uno de los miembros inferiores tratados con L-arginina (tratamiento experimental). Estos pacientes fueron tratados con L-arginina 10 mM preparada en solución salina estéril por vía subcutánea con jeringa de insulina a una dosis de $50 \mu\text{l}/\text{cm}^2$.

b) Pacientes diabéticos con lesiones ulcerativas del mismo sitio tratados con pentoxifilina, 400 mg cada 8 horas vía oral.

2.- Los pacientes fueron seleccionados en la UMF No. 31 Delegación 4 Sureste del D.F. del IMSS.

3.- Cuando los pacientes con las características requeridas para el estudio fueron identificados, se les invitó a participar en el estudio; se les explicó las características de la investigación y las ventajas que podrían obtener si decidían participar.

4.- El método de selección fue no aleatorizado, consecutivo.

5.- Los pacientes fueron evaluados por los Servicios de Medicina Interna y Cirugía General del HGZ No. 47 del IMSS para asegurar que no fueran candidatos a tratamiento quirúrgico, se llenó hoja de recolección de datos, historia clínica, que incluyó domicilio y número

telefónico. Se les proporcionó el número telefónico de los responsables del estudio y dónde localizarlos las 24 horas del día.

6.- Al inicio del estudio se incluyó en la evaluación del paciente un estudio del control metabólico del padecimiento que constó de: glucemia en ayuno, hemoglobina glicada, triacilgliceroles, colesterol total, lipoproteínas de baja y alta densidad (C-LDL y C-HDL). Estos estudios se realizaron también al ser dados de alta los pacientes.

7.- Posteriormente, los pacientes fueron evaluados por el Servicio de Cirugía General del HGZ No. 47 del IMSS, que confirmó que los pacientes seleccionados reunieron los criterios de inclusión, así como la viabilidad del o los tejidos afectados. Después de esto se procedió a la toma de biopsia.

8.- Las biopsias reunieron las siguientes características: se obtuvieron por sacabocados de 0.5 cm de diámetro y 0.5 cm de longitud y estuvieron constituidas longitudinalmente por zona ulcerada y zona no ulcerada adyacente, y en profundidad de arriba hacia abajo por zona desepitelizada o epidermis según sea el caso, dermis y tejido adiposo subcutáneo.

9.- Las biopsias fueron enviadas al Servicio de Anatomía Patológica del HGZ No. 47 del IMSS donde se procesaron.

10.- Las biopsias fueron procesados mediante dos métodos: el tradicional para técnicas de histoquímica y de inmunohistoquímica para detección de actina.

11.- Previo al inicio del tratamiento y durante el desarrollo del mismo, se realizó evaluación periódica de la evolución de las lesiones mediante control fotográfico y mediciones del tamaño de las mismas.

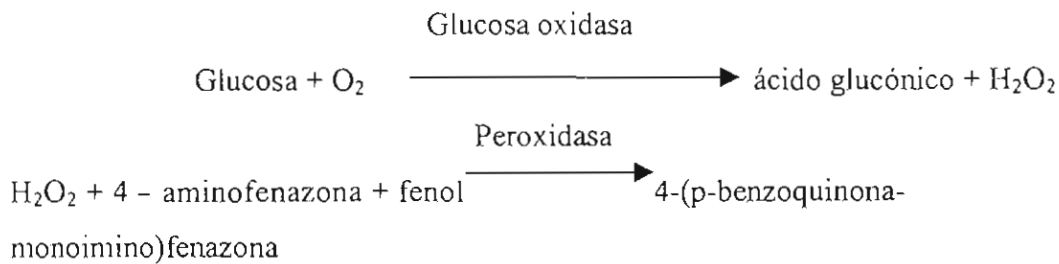
12.- Se vigiló la adherencia al tratamiento mediante visitas al área de curaciones de la UMF y citas programadas cada 8 días.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las pruebas estadísticas realizadas fueron t de Student para medias independientes en el caso de grupos independientes y t de Student pareada para la comparación de cifras antes y después del tratamiento dentro de un mismo grupo. El programa estadístico de software utilizado fue el SPSS. Para la comparación de tres variables independientes se utilizó de la prueba de Pearson.

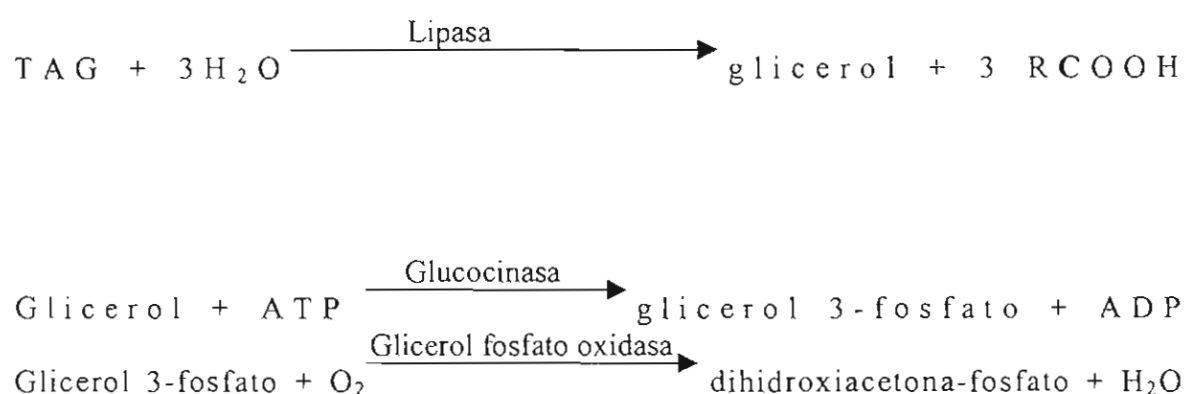
DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

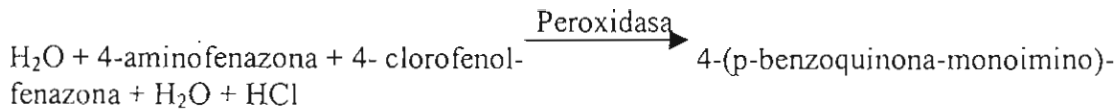
Se utilizó el método de Trinder (1969), que se basa en la oxidación de glucosa por la glucosa-oxidasa, con la subsiguiente cuantificación de peróxido de hidrógeno liberado, usando el reactivo de color 4-aminofenazona y fenol, el cual por medio de la peroxidasa forma un complejo colorido cuya absorbencia se mide a 540 nm. La concentración de este complejo es directamente proporcional a la concentración de glucosa. Las reacciones involucradas son las siguientes:



DETERMINACIÓN DE TRIACILGLICEROLES (TAG)

Se determinaron con el método de Wahlefeld (1979) basado en la hidrólisis enzimática del glicerol formado, por medio de las enzimas glicerol-cinasa, fosfoglicerol-oxidasa y peroxidasa; produciéndose peróxido de hidrógeno que forma un complejo colorido con el reactivo de color 4-aminofenazona y 4-clorofenol cuya absorbencia se mide a 620 nm, la cual es directamente proporcional a la concentración de TAG en la muestra. Las reacciones involucradas son las siguientes:



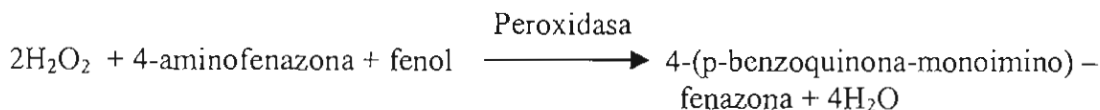
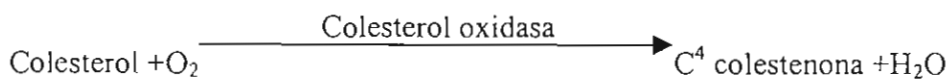
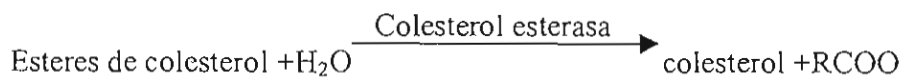


DETERMINACIÓN DE LA HEMOGLOBINA GLICADA

Se determinó con el estuche de electroforesis para HbA_{1C} Diatrac, que se utiliza para su determinación cuantitativa en hemolizados de sangre entera, utilizando geles de agarosa con regulador de pH ácido con el sistema de electroforesis Paragon Beckman. Este estuche permite la separación electroforética de la HbA_{1C} en un gel de agarosa con un regulador de pH ácido. El principio de la electroforesis está basado en el hecho de que cuando las proteínas son colocadas en un campo eléctrico se desplazan hacia uno de los polos eléctricos. El procedimiento electroforético Paragon permite la separación de la HbA_{1C}, según la carga de la molécula y el pH. Este sistema consta de geles de agarosa, reactivo hemolizador y un regulador de pH ácido.

DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL

Se cuantificó por el método de Siedel y cols. (1983) y Katterman y cols. (1984) que se fundamenta en la hidrólisis enzimática de los ésteres del colesterol por la colesterol esterasa y la oxidación del colesterol libre por la colesterol oxidasa. La concentración de colesterol es directamente proporcional a la absorbencia a 540nm, que dan el complejo formado con el reactivo de color-4-aminofenazona y fenol con el H₂O₂ que se produce al oxidarse el colesterol libre. Las reacciones involucradas son las siguientes:



DETERMINACIÓN DE COLESTEROL-HDL

Se determinó por el método modificado por López-Virella y cols. (1977). Este método se basa en la adición de los iones magnesio y ácido fosfotúngstico a la muestra, lo que provoca la precipitación de los quilomicrones, las C-VLDL y las C-LDL. El sobrenadante de la centrifugación a 1500 x g durante 10 min contiene las C-HDL cuya concentración de colesterol es determinada enzimáticamente, como se describió anteriormente.

DETERMINACIÓN DE COLESTEROL-LDL

Se calculó el contenido de colesterol de las C-LDL por medio de la fórmula de Friedewald y cols. (1972) y Warnic y cols. (1990), que involucra la medición de colesterol total, TAG y C-HDL.

$$LDL = CT - \frac{TG}{5} - HDL$$

Donde C-LDL es la concentración de colesterol-LDL, CT es la concentración de colesterol total. TAG es la concentración de triacilgliceroles y C-HDL es la concentración de colesterol C-HDL. El cálculo de colesterol-LDL se considera válido solamente cuando los valores de triacilgliceroles se encuentran por debajo de 300 mg/dL.

ANÁLISIS MORFOLÓGICO

PROCESAMIENTO DE LOS TEJIDOS PARA MICROSCOPIA ÓPTICA

Las muestras fijadas en formol se procesaron tratándolas durante 2 horas con cada uno de los siguientes reactivos: formol 10%, alcohol 96°, alcohol absoluto y xilol. Las muestras procesadas se incluyeron en parafina formando bloques que se dejaron solidificar. Los bloques se mantuvieron a 4°C y se hicieron cortes de aproximadamente 4 µm, en un microtomo. Los listones obtenidos se desparafinaron poniéndolos sobre un baño de agua con gelatina a 56-60°C y se recolectaron en portaobjetos. Posteriormente se desparafinaron en una estufa a 60°C durante 2 horas y se hidrataron para teñirlos. Los tejidos en las laminillas se hidrataron tratando con los siguientes reactivos: xilol, alcohol absoluto y alcohol 96°. Después de teñir los tejidos se deshidrataron con alcohol 96°, alcohol absoluto y xilol.

TINCIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA

Esta técnica tiñe de azul los núcleos y el citoplasma de color rosa. Los tejidos se desparafinaron e hidrataron, posteriormente se colocaron en solución de hematoxilina durante 1 min. Se lavaron a chorro en agua de la llave, sin desprender el tejido. Se diferenció en alcohol ácido lavándose a chorro en agua de la llave, se viró con agua amoniacal, después se lavó en agua destilada para enseguida teñir con eosina durante 30 seg. Se trataron con alcohol de 96 grados durante 1 min. Se deshidrataron y en seguida se montaron en laminillas con resina sintética.

TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON

Esta técnica tiñe de azul la colágena (que se tiñe con colorantes ácidos de anilina). Da color rojo para músculo, rosa claro para citoplasma y tiñe de azul oscuro los núcleos. Los tejidos se desparafinaron e hidrataron, posteriormente se colocaron en la solución de Bouin (ácido pícrico 75 ml/100ml, formaldehído 25ml/100ml y ácido acético glacial 5 ml/100ml) 1 hora a 60°C. Se lavaron bajo el chorro de agua sin desprender el tejido hasta quitar el color amarillo. Se tiñeron en hematoxilina férrica o de Weigerts (preparada en el momento mezclando partes iguales de una solución de 2 g hematoxilina/200 ml de etanol y una

solución de cloruro férrico 29% y ácido clorhídrico 1 ml/200 ml) durante 10 min. Se lavaron en agua corriente hasta quitar el color café (y que los núcleos estuvieran contrastados), se lavaron con agua destilada, se tiñeron en escarlata de Biebrich (escarlata de Biebrich 1%, 360 ml/400 ml, fucsina ácida 1% 40 ml/400 ml, ácido acético 1 ml/ 400 ml) durante 15 min., se lavaron con agua destilada, luego se trataron con ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico (ácido fosfotúngstico 10 g/200 ml, ácido fosfomolibdico 10 g/200 ml) 15 min. Se lavaron con agua destilada, se tiñeron en azul de anilina (azul de anilina 5 g/200 ml, ácido acético 8 ml/200 ml) 15-20 min, se lavaron con agua destilada y luego en ácido acético 1% 1 min. Los tejidos se deshidrataron y se montaron las laminillas.

TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA PARA IDENTIFICACIÓN DE ACTINA POR INMUNOFUORESCENCIA Y MICROSCOPIA CONFOCAL

Se obtuvo la biopsia en sacabocado de 0.5 cm³ que incluyó tejido lesionado y tejido adyacente a la piel ulcerada del paciente diabético. Se profundió en paraformaldehído al 4%. Se lavó la muestra de tejido con solución amortiguadora de fosfato/sacarosa al 30% mediante tres lavados de 15 min cada uno. Se efectuaron cortes por congelación de 4 μ de espesor en el criostato. Se realizó incubación en solución metanol/acetona (V/V) durante 30 min a 4°C. Se incubó en suero normal de cabra. Posteriormente, se efectuó incubación durante toda la noche con el anticuerpo primario, la anti α actina para músculo liso vascular. Se lavaron los cortes de tejido con amortiguador de fosfatos y se incubaron con anticuerpo biotinilado durante 60 min. Se efectuó lavado con amortiguador de fosfatos durante 30 min y se incubaron con avidina fluoresceínada durante 40 min. Se lavaron con amortiguador de fosfatos durante 30 min y posteriormente fueron incubados con azul de Evans durante 15 min. Se montaron las laminillas con vectashield y se observaron con un microscopio confocal láser de fluorescencia marca BIO-RAD modelo MCR-600. Se hicieron cortes seriados de 1-2 micras de espesor, el filtro verde para el canal de azul de Evans y el filtro azul para el canal de fluoresceína. La fluoresceína fluoresce verde y el azul de Evans, rojo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo primordial de este estudio fue demostrar el efecto de la L-arginina en el tratamiento de las lesiones ulcerativas del pie diabético, así como confrontarlo con el efecto producido por el tratamiento habitual (pentoxifilina y aseo). Una de nuestras hipótesis es que un mecanismo probable de acción es la promoción de la angiogénesis, mejorando de esa manera la circulación sanguínea del miembro pélvico afectado con la consiguiente mejoría en la oxigenación del tejido dañado y la activación en cascada de los mecanismos de reparación de la herida.

Los resultados se analizan y discuten de manera integral con la idea de facilitar su comprensión.

Concentraciones de glucosa y Hemoglobina glicada

Todos los pacientes tratados con L-arginina mostraron hiperglucemia al inicio del estudio. La media inicial de glucemia para los pacientes tratados con L-arginina fue de 229 ± 62.91 mg/dL (Tabla 2). La media de los valores finales de los mismos pacientes fue 143 ± 59.86 mg/dL (Tabla 3). Al finalizar el estudio, dos de ellos (28.57%) alcanzaron niveles séricos de glucosa normales. El resto de los pacientes tratados con L-arginina mostró niveles disminuidos de glucosa, sin llegar a la normalidad. La diferencia fue significativa entre las concentraciones iniciales y finales ($p < 0.05$). Los pacientes control tratados con pentoxifilina mostraron valores de glucosa significativamente inferiores ($p < 0.05$) que los pacientes tratados con L-arginina (Cuadros 5 y 6). Esto puede explicarse en parte a la cooperación que los pacientes mostraron en el control de su glucemia. La media inicial de glucemia para los pacientes tratados con pentoxifilina fue de 167.57 ± 102.94 mg/dL y la final fue de 196.14 ± 64.71 mg/dL (Cuadros 5 y 6).

Respecto a la HbA1c, los valores iniciales y finales tanto en el grupo tratado con L-arginina como con pentoxifilina, no mostraron diferencias significativas, en la concentración por grupos de medias independientes ni en la comparación de cifras antes y después de un tratamiento ($p < 0.05$) (Cuadros 6-8).

Cuadro 5. Concentraciones séricas iniciales de glucosa, HbA1c y perfil de lípidos en pacientes diabéticos tratados con L-arginina

Paciente No.	Glucosa mg/dL	HbA1c (%)	CT mg/dL	C-HDL mg/dL	C-LDL mg/dL	TAG mg/dL
1	169	7.60	150	38	87	123
2	274	8.50	296	39	nm	675
3	247	13.20	200	33	77	451
4	342	10.60	168	32	112	122
5	192	11.00	226	38	154	171
6	173	7.30	212	42	142	142
7	206	11.40	166	43	68	189
Suma	1603	69.6	1418	265	640	1873
Media	229	9.94	202.57	37.86	106.67	214.95
DE	62.92	2.19	49.45	4.14	35.44	213.31

Valores de referencia: HbA_{1c} = hemoglobina glicada: 4.8 – 6.0%; CT = colesterol total: 0–200 mg/dL; C-HDL = lipoproteínas de alta densidad: 35–85 mg/dL; C-LDL = lipoproteínas de baja densidad: 50–130 mg/dL; TAG = triacilglicerolos: 50–200 mg/dL; nm = no medido; DE = desviación estándar

Cuadro 6. Concentraciones séricas finales de glucosa, HbA_{1c} y perfil de lípidos en pacientes diabéticos tratados con L-arginina

Paciente No.	Glucosa mg/dL	HbA _{1c} (%)	CT mg/dL	C-HDL mg/dL	C-LDL mg/dL	TAG mg/dL
1	88	8.00	141	41	77	117
2	177	11.40	323	nm	nm	825
3	240	15.70	192	42	100	249
4	188	13.90	161	32	101	141
5	110	7.00	243	58	156	144
6	77	6.50	209	46	134	143
7	122	9.20	167	36	94	189
Suma	1002	71.7	1436	255	662	1808
Media	143.14	10.24	205.14	36.42	94.57	258.29
DE	59.86	3.54	61.95	18.05	49.42	253.68

Valores de referencia: HbA_{1c} = hemoglobina glicada: 4.8 – 6.0%; CT = colesterol total: 0–200 mg/dL; C-HDL = lipoproteínas de alta densidad: 35–85 mg/dL; C-LDL = lipoproteínas de baja densidad: 50–130 mg/dL; TAG = triacilgliceroles: 50–200 mg/dL; nm = no medido; DE = desviación estándar

Cuadro 7. Concentraciones séricas iniciales de glucosa, HbA1c y perfil de lípidos en pacientes diabéticos tratados con pentoxifilina

Paciente No.	Glucosa mg/dL	HbA1c (%)	CT mg/dL	C-HDL mg/dL	C-LDL mg/dL	TAG mg/dL
1	67	6.30	72	72	115	92
2	272	11.40	321	39	228	272
3	342	10.60	168	32	112	122
4	140	8.10	211	40	149	166
5	126	7.80	195	29	100	189
6	156	13.20	218	48	128	331
7	70	5.80	137	38	66	167
Suma	1002	63.20	1322	298	898	1339
Media	143.14	9.02	188.86	42.57	128.28	191.29
DE	56.84	2.76	77.05	14.33	50.81	83.59

Valores de referencia: HbA_{1c} = hemoglobina glicada: 4.8 – 6.0%; CT = colesterol total: 0–200 mg/dL; C-HDL = lipoproteínas de alta densidad: 35–85 mg/dL; C-LDL = lipoproteínas de baja densidad: 50–130 mg/dL; TAG = triacilglicerolos: 50–200 mg/dL; nm = no medido; DE = desviación estándar

Cuadro 8. Concentraciones séricas finales de glucosa, HbA1c y perfil de lípidos en pacientes diabéticos tratados con pentoxifilina

Paciente No.	Glucosa mg/dL	HbA1c (%)	CT mg/dL	C-HDL mg/dL	C-LDL mg/dL	TAG mg/dL
1	164	6.20	161	32	101	141
2	282	11.40	146	32	102	62
3	164	6.20	166	43	109	68
4	208	7.90	142	30	83	144
5	201	7.40	269	33	182	289
6	263	9.10	181	39	122	101
7	91	6.70	214	28	122	321
Suma	1373	54.90	1264	237	822	1047
Media	196.14	7.84	180.57	33.85	117.42	149.57
DE	64.91	1.88	46.59	5.27	31.47	110.46

Valores de referencia: HbA_{1c} = hemoglobina glicada: 4.8 – 6.0%; CT = colesterol total: 0–200 mg/dL; C-HDL = lipoproteínas de alta densidad: 35–85 mg/dL; C-LDL = lipoproteínas de baja densidad: 50–130 mg/dL; TAG = triacilgliceroles: 50–200 mg/dL; nm = no medido; DE = desviación estándar

Triacilgliceroles (TAG)

No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes diabéticos estudiados (Cuadros 5 y 7). Tampoco se observaron diferencias significativas en los exámenes antes y después del tratamiento dentro de un mismo grupo ($p < 0.05$). Para los pacientes diabéticos tratados con L-arginina la media fue de 214.95 ± 213.31 mg/dL para los valores iniciales y de 258.29 ± 253.68 mg/dL para los valores al finalizar el estudio. En el grupo de pacientes diabéticos tratados con pentoxifilina (Cuadros 7 y 8), la media inicial fue de 191.29 ± 83.59 mg/dL y la media final de 149.57 ± 110.46 mg/dL. En todos los grupos se observaron dos pacientes (28.57%) con valores más elevados a las cifras normales. Este porcentaje observado es muy similar a lo que refiere la literatura. Kcisberg menciona que sólo 30 a 40% de los pacientes diabéticos tienen hipertigliceridemia con valores mayores a 200 mg/dL y sólo 10% muestran valores de triacilgliceroles mayores a 400 mg/dL. También menciona que cuando la hipertrigliceridemia es notoriamente elevada, casi siempre está indicando la presencia de otros factores predisponentes como: deficiencia crónica de insulina, edad, obesidad, estilo de vida sedentario, medicamentos utilizados para padecimientos concomitantes y la expresión tardía de otros trastornos genéticos. La multiplicidad de factores influenciando los niveles de triacilgliceroles indican que es poco probable que el control de la hipertigliceridemia por sí solo corrija la dislipidemia cuando ésta se encuentra en el paciente diabético. Otros aspectos de los triacilgliceroles serán discutidos en conjunto con la discusión de los resultados del colesterol total y de las lipoproteínas debido a la estrecha relación de su metabolismo.

Colesterol total y Lipoproteínas

De los pacientes diabéticos tratados con L-arginina tres pacientes mostraron cifras de colesterol total superiores a 200 mg/dL (42.85%) al inicio del estudio. La media fue de 202.57 ± 49.45 mg/dL. Los valores finales para el mismo grupo de pacientes mostraron el mismo porcentaje de resultados arriba de los valores normales, siendo la media de 205.4 ± 61.95 mg/dL. En el grupo de pacientes tratados con pentoxifilina los valores iniciales de colesterol total estuvieron por arriba de los niveles normales en un 42.85%, la media fue de 188.86 ± 77.05 mg/dL. En las mediciones finales de este mismo grupo, dos pacientes

mostraron valores elevados (28.58%). La media para este grupo fue de 180.57 ± 46.59 mg/dL.

No se observaron diferencias significativas entre los pacientes tratados con L-arginina y los tratados con pentoxifilina (Cuadros 5 y 7), ni entre los valores dentro de un mismo grupo con una $p < 0.05$ (Cuadros 5-8).

Para las lipoproteínas las medias fueron como sigue: valores iniciales de C-HDL para pacientes tratados con L-arginina, 38.76 ± 4.14 mg/dL; valores finales para el mismo grupo, 36.42 ± 18.05 mg/dL. Para el grupo tratado con pentoxifilina las medias fueron las siguientes: para los valores iniciales 42.47 ± 14.33 mg/dL; valores finales, 33.85 ± 5.27 mg/dL. En el grupo tratado con L-arginina el 28.58% mostró valores por debajo de lo normal al inicio del estudio y también 28.58% al final del estudio. En el grupo tratado con pentoxifilina al inicio del estudio 28.58% mostró valores por debajo de lo normal y 71.42% al final del estudio. No se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) ni entre diferentes grupos de pacientes ni antes y después del estudio intragrupos. En el caso de las C-LDL la distribución de medias se menciona enseguida: para el grupo tratado con L-arginina, valores iniciales de 106.67 ± 35.44 mg/dL; valores finales, 94.57 ± 49.42 mg/dL. Grupo tratado con pentoxifilina: valor inicial de 128.28 ± 50.81 mg/dL; valores finales, 117.42 ± 31.47 mg/dL. En el grupo tratado con L-arginina tanto al inicio como al final del estudio, 28.58% de los pacientes diabéticos mostraron cifras por arriba de lo normal, siendo los mismos pacientes (5 y 6). En el grupo de los pacientes tratados con pentoxifilina, al inicio 28.58% tuvieron valores por arriba de lo normal y al final del estudio sólo un paciente (14.28%) tuvo C-LDL por arriba de lo normal.

La DM es una enfermedad metabólica que trastorna no sólo el metabolismo de los carbohidratos, sino también el de las proteínas y los lípidos. El efecto más importante del metabolismo anormal de los lípidos es la aterosclerosis acelerada (Brown WV, 1982). En general los hallazgos más consistentes en pacientes con diabetes son: aumento en las concentraciones de los triacilgliceroles, valores séricos normales o ligeramente elevados del colesterol total y de las C-LDL y concentraciones disminuidas, normales o elevadas de C-HDL (Brunzell JD y Bieman CA, 1985). Esta información indica que al igual que en caso de la glucemia y su relación con la HbA1c se requieren de estudios longitudinales, de

cohortes con un seguimiento prolongado para llegar a criterios más concluyentes. En este estudio, los resultados obtenidos para colesterol total y lipoproteínas no difirió respecto a lo mencionado en la literatura. Lo relativamente inesperado fue la elevada proporción de amputaciones a diferente nivel en alguno de los miembros (según el lado afectado y en un caso el lado contralateral) en los pacientes tratados con pentoxifilina. Además de que permanece como tema a ser estudiado con más profundidad, el de la relación del control lipídico y su relación con el número de amputaciones, es importante considerar aquí el factor jugado por el tratamiento con L-arginina en los pacientes diabéticos que recibieron el tratamiento experimental. Valenzuela concluye que los trastornos lipídicos asociados con la diabetes (aumento de las lipoproteínas de baja densidad y triacilgliceroles, así como disminución de las lipoproteínas de alta densidad) se han asociado claramente con el desarrollo de enfermedad vascular periférica. Sin embargo, igual que con la hipertensión, aún no hay suficientes evidencias que demuestren que el buen control de la dislipidemia diabética disminuya el número de amputaciones (Valenzuela Roldán A 2003).

Análisis morfológico

Microscopía óptica

A continuación se muestran las imágenes de microscopía óptica y confocal representativas de los pacientes estudiados. Simultáneamente se discuten las micrografías presentadas para intentar hacer un análisis plausible de los resultados obtenidos.

En los cortes histológicos efectuados y analizados, tanto en los pacientes diabéticos tratados con L-arginina como en los tratados con pentoxifilina, se observaron las siguientes alteraciones morfológicas desde la superficie hasta el tejido adiposo subcutáneo (técnicas de hematoxilina y eosina y tricrómica de Masson):

1. Hiperqueratosis. El epitelio de la piel está cubierto por una capa de queratina que actúa como barrera entre la piel y el medio interno y conserva la humedad normal de la piel entre otras funciones. Esta capa llamada estrato córneo tiene un espesor variable de acuerdo al sitio del cuerpo. El aumento de su espesor se conoce como hiperqueratosis. En la figura 5A corresponde a la capa amorfa, acelular de color rosado, que se observa por arriba de la epidermis (E), localizada en el lado izquierdo.
2. Aumento en el espesor de la capa más superficial de la piel conocida como epidermis, cuyo epitelio consta de cuatro capas. Este fenómeno se conoce como acantosis y ocurre por proliferación celular del epitelio. Esta proliferación está relativamente desorganizada, ya que no permite delimitar con claridad una capa de la otra.
3. Ausencia de epitelio en la porción ulcerada (U) como se observa en las figuras 5A y 5B.
4. Destrucción total de la arquitectura de la dermis y del tejido subcutáneo. Ésta, se caracteriza por la sustitución de los elementos normales propios de la dermis, tanto celulares, vasculares y de matriz extracelular, por la presencia de un proceso inflamatorio agudo (polimorfonucleares) (Figura 5D) y crónico (células mononucleares monocitos, linfocitos y macrófagos) (Figuras 5A a 5D) y fibroblastos (FB). Las células mononucleares corresponden a las células de núcleo redondo rodeado de una cantidad variable de citoplasma, desde muy escaso (linfocitos) hasta un citoplasma de tipo espumoso más evidente (macrófagos). Aunque pueden observar en las figuras mencionadas no están señaladas, ya que su identificación precisa requiere de métodos inmunohistoquímicos específicos. Además de lo anterior, se observaron depósitos de fibrina (F) y adyacentes a

ellos, detritus celulares procedentes de la lisis del tejido normal, así como, tejido de granulación inmerso dentro del proceso inflamatorio, caracterizado por la presencia de vasos sanguíneos cuya arquitectura será descrita cuando se discutan los hallazgos de la microscopía confocal.

5. Proliferación mayor a lo normal de tejido colágeno (C) de una manera desordenada (Figuras 6A y 6B) caracterizada por su distribución anárquica en diversas direcciones. Con tinción tricrómica de Masson las fibras colágenas se observan de color azul. Esta producción de fibras colágenas es tan abundante que invade al tejido adiposo subcutáneo (AST) y produce destrucción de anexos de la piel, los cuales estuvieron ausentes en los cortes observados (glándulas sebáceas y sudoríparas).

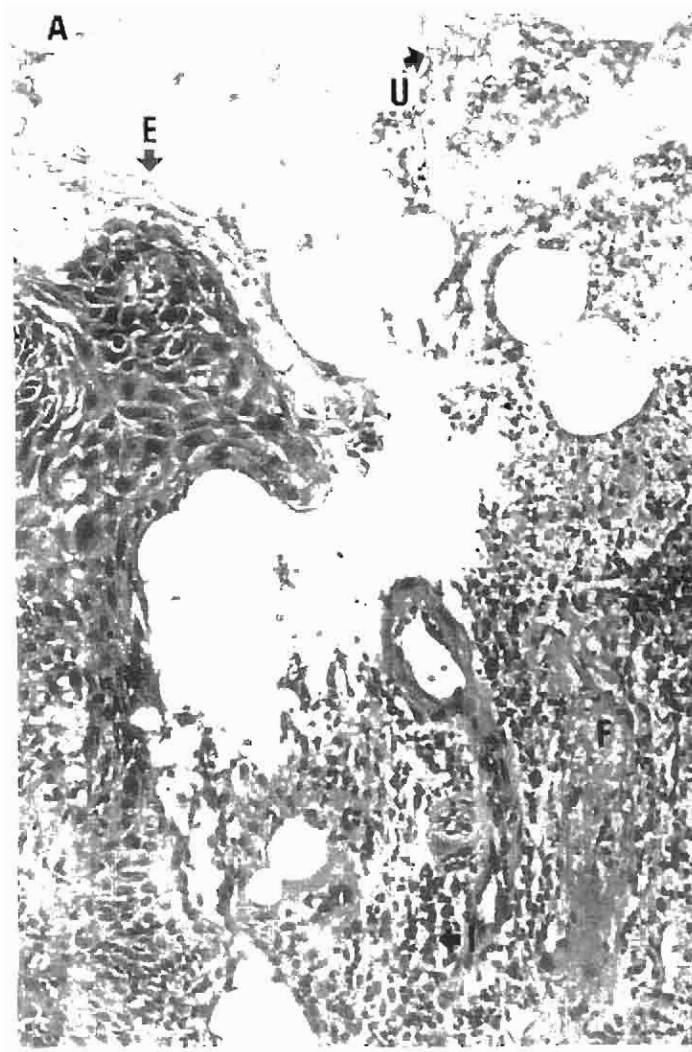
6. Áreas de tejido conectivo laxo alternando con las áreas de tejido colágeno excesivo. Estas áreas son indicativas de edema.

7. Ruptura de la pared de los vasos sanguíneos sobre todo de arteriolas con extravasación de elementos sanguíneos (Figuras 5C y 5D).

8. Neovascularización a partir de la pared obturada (Figura 5C).

Los resultados de este estudio muestran ciertas semejanzas básicas y diferencias con otros estudios (Piagessi A y cols., 2003). Las estructuras analizadas son las mismas. La diferencia estriba en que Piagessi estudia únicamente úlceras neuropáticas plantares en pacientes diabéticos donde su grupo experimental es el de los pacientes sometidos a presión y el grupo control corresponde a pacientes con las mismas características, pero libres de presión plantar durante 20 días. A ambos grupos se les tomó biopsia de la lesión por el método quirúrgico tradicional (resección relativamente amplia de elipse de piel ulcerada con bisturí) el cual es más agresivo que la biopsia por sacabocados relativamente noble. Además, las lesiones ulcerativas (que midieron de 4.6 ± 1.2 a 4.4 ± 1.1 cm²) fueron resecadas en su totalidad, lo cual es aún más agresivo, aunque se tomaron medidas postoperatorias estrictas. Aunque el Comité de Ética aprobó el protocolo, existen reservas éticas respecto a esto, ya que se considera que un pie diabético debe protegerse al máximo de cualquier agente lesivo. En el estudio aquí realizado se intentó formar un grupo control de pacientes diabéticos sin úlcera y tomarles biopsia por sacabocado (de 5 mm). Un paciente diabético sin úlcera, médico de profesión, solicitó le fuera tomada la biopsia y mostró tendencia a desarrollar úlcera, requiriendo del tratamiento con L-arginina para evitar

su desarrollo, razón por la cual no se continuó con esa parte proyectada en el protocolo por no considerarlo ético. Se le realizó a esa biopsia estudio para microscopía confocal y se discutirán más adelante los resultados.



Figuras 5 A. Corte histológico de la piel con lesión ulcerativa de un paciente con pie diabético (hematoxilina y eosina) antes del tratamiento. En este corte se observa el epitelio (E) engrosado (acantosis) e hiperqueratosis (parte superior del epitelio) de la piel adyacente a la úlcera (U), el infiltrado inflamatorio agudo y crónico (I) y depósitos de fibrina (F). Entre la fibrina y el proceso inflamatorio se observa tejido de granulación caracterizado por algunos vasos sanguíneos en las partes superior e inferior y, a la izquierda de la fibrina, la presencia de detritus celulares (20X).

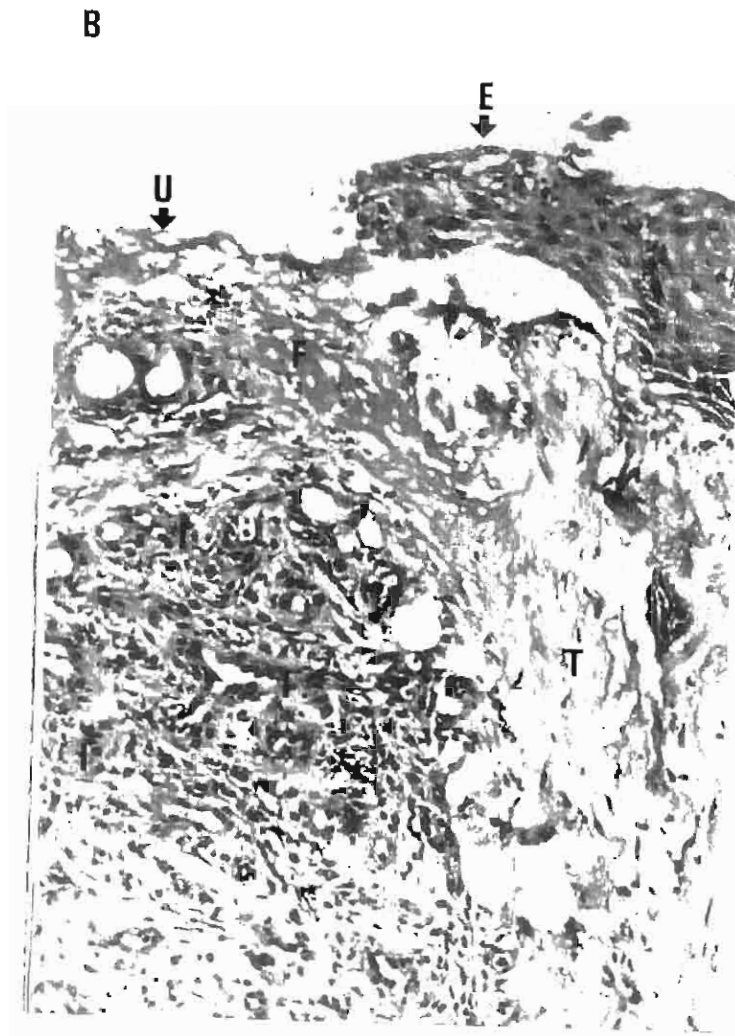


Figura 5 B. La úlcera muestra, además del epitelio adyacente (E), los depósitos de fibrina (F) y el proceso inflamatorio (I), así como la presencia de tejido conectivo laxo que indica la presencia de edema (20X)

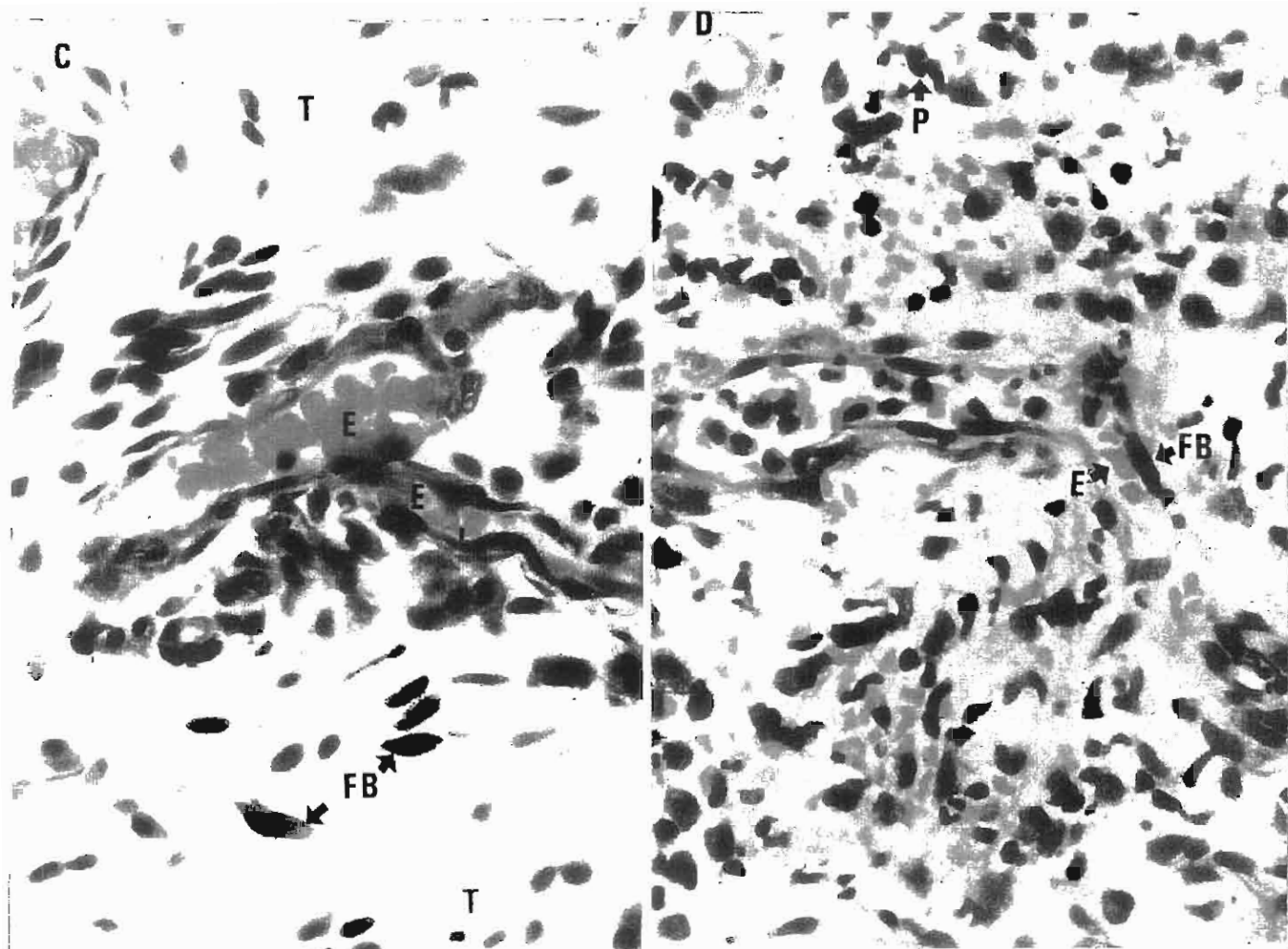


Figura 5 C y 5 D. Corte histológico de la piel con lesión ulcerativa de un paciente con pie diabético (tinción hematoxilina y eosina) antes del tratamiento. La micrografía está tomada a mayor aumento y muestra un vaso sanguíneo localizado en la región de la dermis, en el cual se observa de manera relevante la extravasación de eritrocitos (E) y las células de inflamación aguda y crónica caracterizada por polimorfonucleares (P), fibroblastos (FB) y la presencia de tejido conectivo laxo (T) (40X).

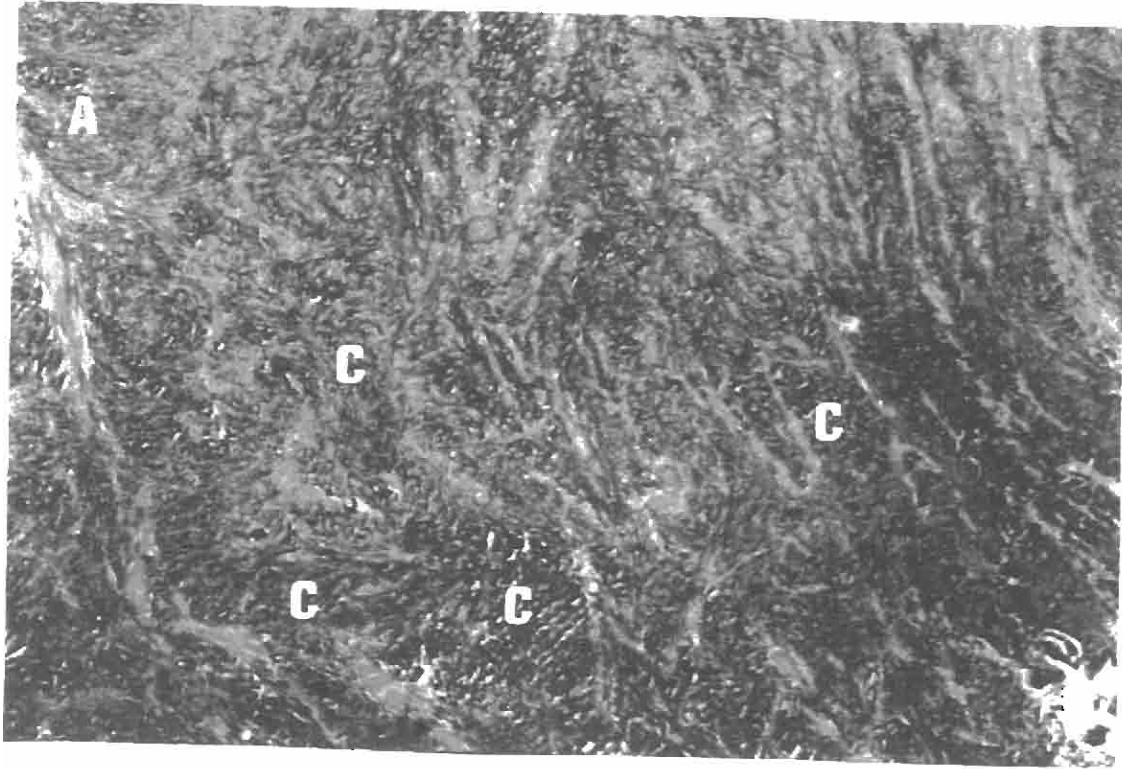


Figura 6 A. Corte histológico de la piel de la lesión ulcerativa teñida de un paciente con pie diabético (técnica tricrómica de Masson), previa al tratamiento. Se observan proliferación de fibras colágenas teñidas de color azul mostrando un patrón de distribución irregular con direcciones diversas. (40X).

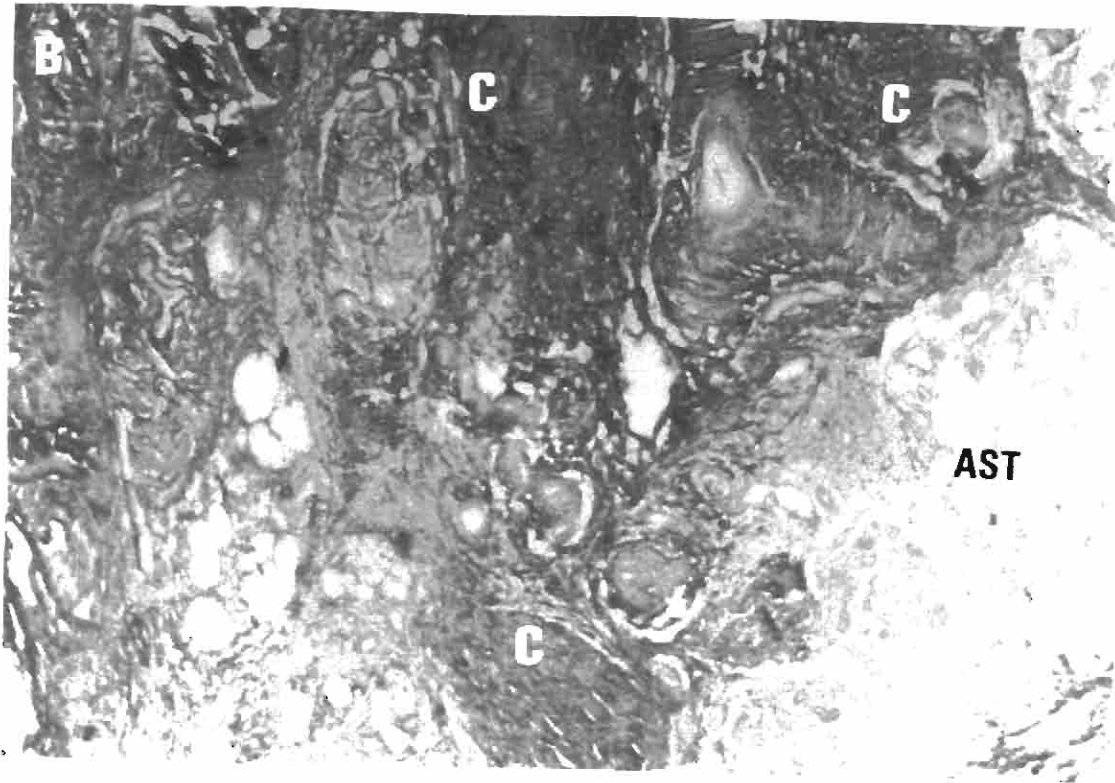
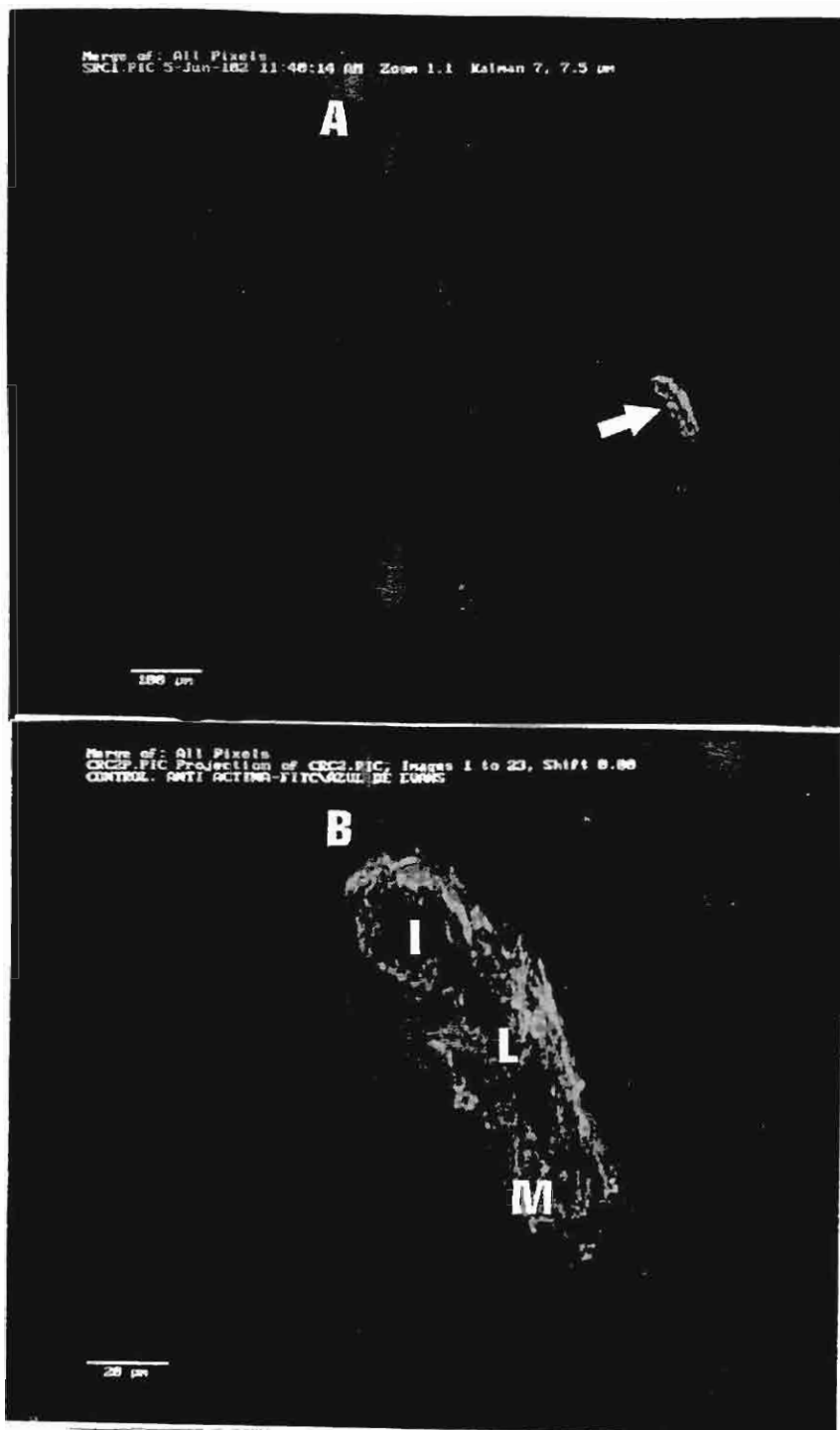
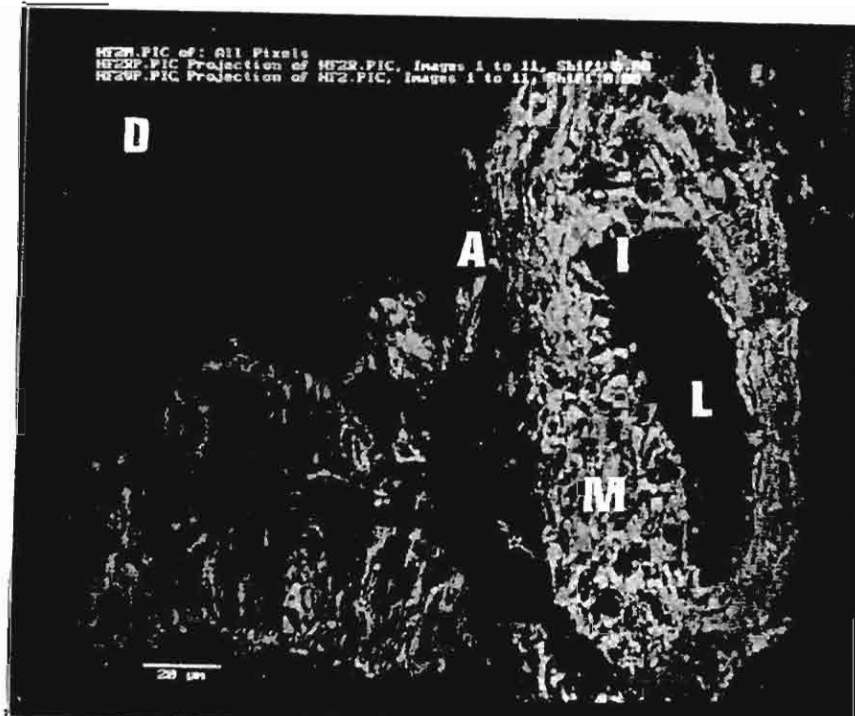
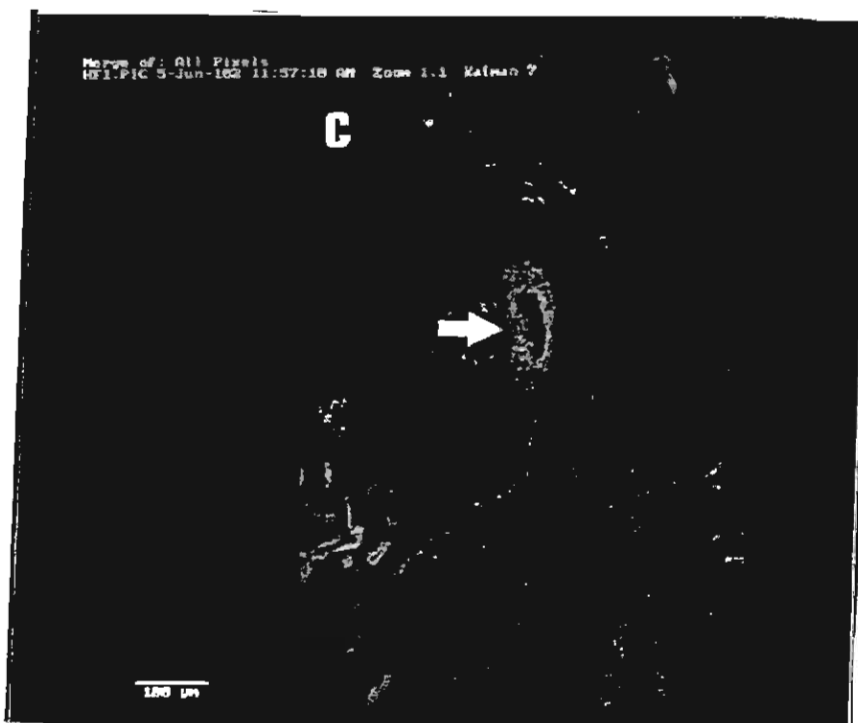


Figura 6 B. Corte histológico de la lesión ulcerativa de un paciente con pie diabético previa al tratamiento (tinción tricrómica de Masson). Además de la distribución irregular de las fibras colágenas, se observa la presencia de tejido adiposo subcutáneo (AST), mostrando la profundidad de la lesión.



Figuras 7A y 7B.. A. Lesión ulcerativa de la piel de un paciente con pie diabético previa al tratamiento (técnica de microscopía confocal) que muestra escasez de vasos sanguíneos (flecha). B. La luz (L) del vaso está ocluida casi en su totalidad. La túnica íntima está engrosada y la túnica media muestra la positividad de las células musculares lisas a la anti α actina específica para músculo liso vascular. Se observa escasez de células musculares lisas y ruptura de la pared vascular.



Figuras 7C y 7D. Lesión ulcerativa de paciente con pie diabético antes de ser tratado con pentoxifilina. Técnica de tinción para microscopía confocal con anti alfa actina positiva. C. Hay escasez de vasos sanguíneos (flecha). D. La túnica íntima (I) está engrosada y en la luz (L) del vaso se observa la ausencia de eritrocitos. El vaso observado corresponde a una arteriola.

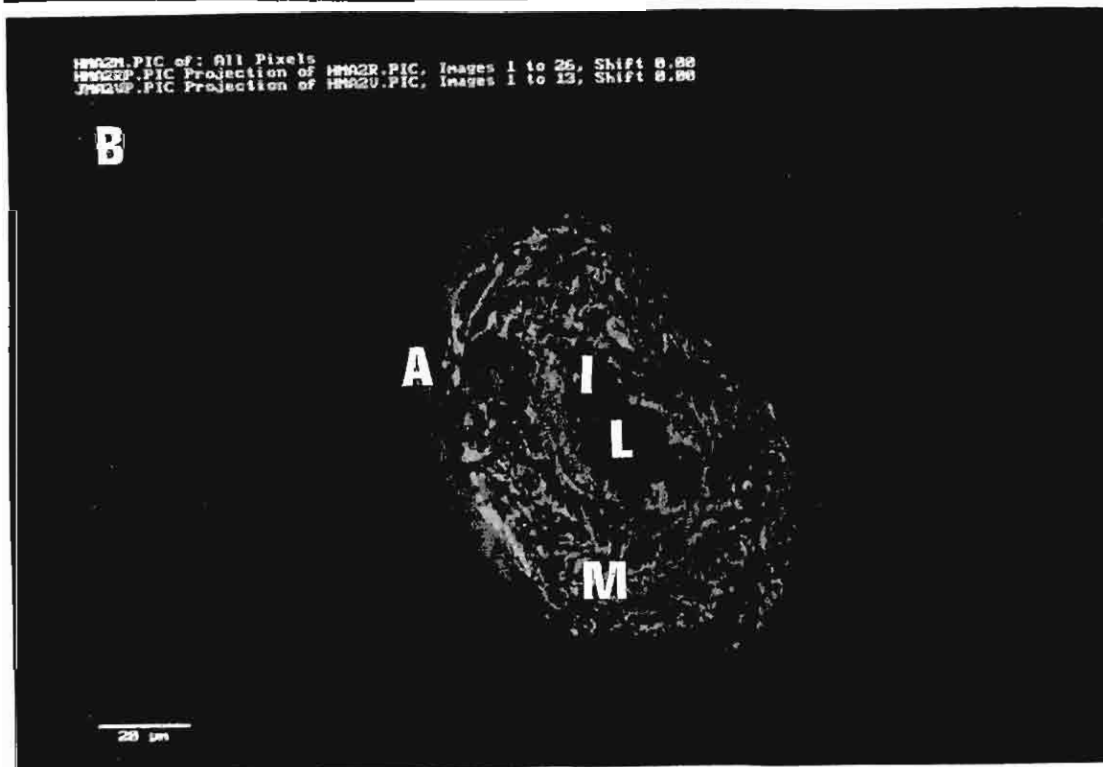
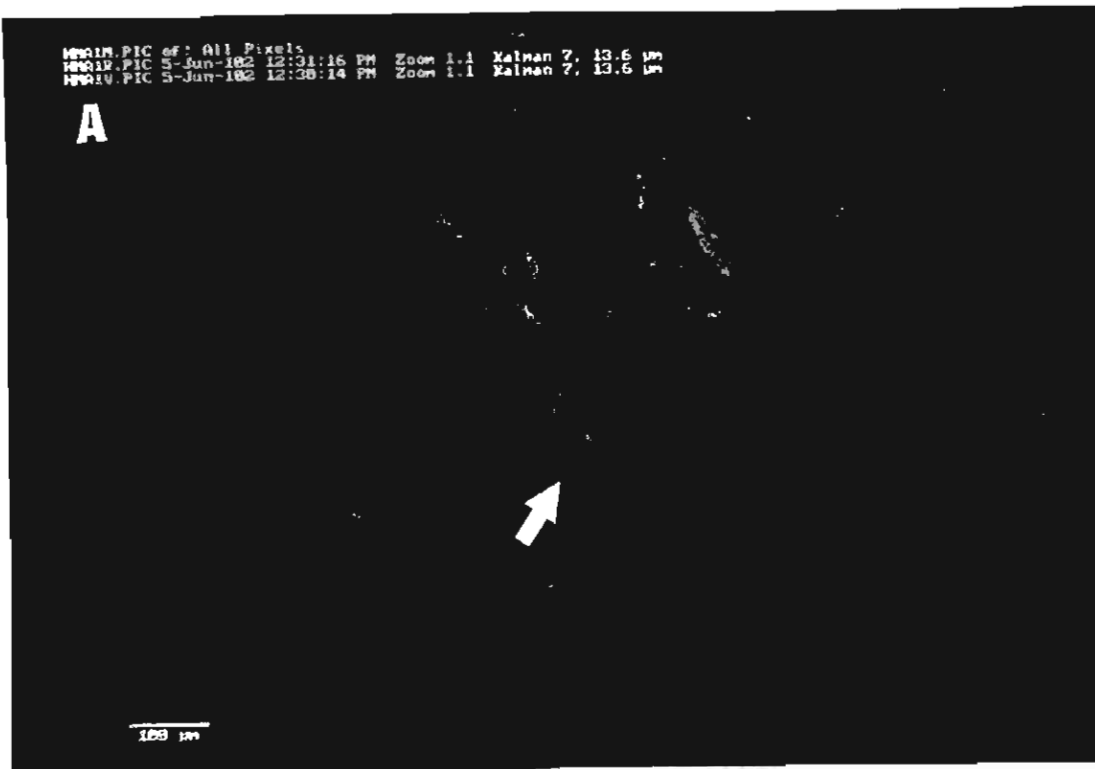


Figura 8. A. Piel ulcerada de paciente con pie diabético sin lesión ulcerativa pero clínicamente con daño vascular con técnica de tinción para microscopía confocal. B. Hay escasez de vasos sanguíneos (flecha) y el vaso observado muestra la luz (L) trombosada.

En el estudio de Piagessi, se utilizó como criterios de eliminación, la presencia de isquemia (aunque reconoce que no difieren los hallazgos histopatológicos según la etiología), enfermedades sistémicas, insuficiencia renal, osteomielitis, episodios recientes de cetoacidosis y padecimientos malignos. Su estudio no menciona qué tipo de tinción se utilizó (puede suponerse que fue sólo hematoxilina-cosina) y prácticamente fue realizado únicamente para evaluación histopatológica por microscopía óptica de campo claro. En el estudio aquí presentado no se utilizaron estos criterios de eliminación porque lo que se pretendió fue dar el beneficio a todo tipo de pacientes a fin de mejorar su calidad de vida. Lo único que demostró Piagessi en su estudio fue que las alteraciones mostradas por el grupo control estaban significativamente disminuidas en el grupo experimental.

Otro estudio que toma en cuenta los aspectos histopatológicos es el realizado por Altavilla y cols., 2001) en ratones genéticamente diabéticos, encontrando además edema, que también fue observado por nosotros. Su descripción histológica es más breve y no agrega nada nuevo a lo ya mencionado.

Ahora se tratará de dar una breve explicación de los cambios histológicos observados en nuestro estudio; pero antes debemos considerar que la reparación de la herida implica varias etapas que son, en orden cronológico, desde que ocurre el daño tisular: inflamación, formación de tejido y remodelación, incluyendo la epitelización. En todas estas etapas interactúan de una manera compleja factores de crecimiento (factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento vascular derivado de endotelio, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento fibroblástico básico, factor de crecimiento transformante β , etc.) con factores quimiotácticos específicos, quimiocinas, citocinas, óxido nítrico (NO), migración celular, factores de la coagulación, hemostasia y trombosis (Singer AJ y cols., 1999), cuya explicación completa va más allá de los objetivos de esta tesis. Aquí se concretará a explicar lo observado en los cortes histológicos.

1. La hiperqueratosis se observó sobre todo en las úlceras plantares. Esto puede estar relacionado con la presión frecuente sobre ellas al caminar, no obstante el reposo recomendado a estos pacientes. Tal vez se trate de un mecanismo de compensación ante el estímulo lesivo continuo y crónico.

2. La acantosis probablemente se deba al estímulo de los factores de crecimiento que propician proliferación celular, en este caso de los queratinocitos y que ante el estímulo lesivo produzcan un mayor índice mitótico.
3. La úlcera (destrucción del epitelio) es producida por el agente lesivo ya sea externo (en el caso neuropático) o interno (la isquemia) o ambos.
- 4 y 5. La destrucción de la arquitectura normal de la piel es el resultado del proceso inflamatorio como respuesta a la lesión. Cabe preguntarse por qué tratándose de úlceras crónicas, existe un componente inflamatorio agudo, además del crónico. Estudios realizados en úlceras crónicas (Loots MAM y Lamme EN 1995), incluyendo úlceras diabéticas, han encontrado que úlceras hasta con más de 8 meses de evolución contenían células inflamatorias características de la fase aguda y matriz extracelular provisional e interpretaron este dato como una incapacidad de la úlcera de progresar de la fase aguda a la fase de reparación. Esto tal vez debido al estímulo lesivo continuado. Sin embargo, en este estudio sí se observaron elementos de inflamación crónica e intentos de fenómenos reparativos como la presencia de monocitos, linfocitos, macrófagos, fibroblastos y fibras colágenas. Por lo tanto la explicación anterior es relativa y se postula que la causa es que permanecen estímulos recientes que implican una continuada respuesta inflamatoria aguda, además de que todos los mecanismos de reparación de la herida se llevan a cabo sobre un terreno ya de por sí patológico, producido por la diabetes, y esto implica que haya cierto descontrol en la coordinación de la cascada normal de un proceso reparativo característico de los sujetos sanos. Por lo tanto, todos los elementos morfológicos de la reparación de la úlcera diabética serán de características especiales o francamente anormales, como: el tipo de queratinas, el tipo de colágena en la fibrosis, el tipo de vasos sanguíneos neoformados, la desorganización de la colágena en diversas direcciones, cuando lo normal es que se dispongan de manera paralela a la superficie epidérmica. La ausencia de anexos de la piel se debe a la destrucción de la arquitectura normal que borra prácticamente todos los elementos presentes en el tejido sano.
6. La presencia de edema es también parte de un proceso agudo. Las explicaciones anteriormente mencionadas son aplicables también a este fenómeno.
7. Es probable que la ruptura de la pared vascular sobre todo de las arteriolas esté relacionada con neoformación de vasos sanguíneos.

8. Formación de nuevos vasos sanguíneos. La angiogénesis es necesaria para sostener la formación del tejido de granulación. Es un proceso complejo que se lleva a cabo en la matriz extracelular del lecho de la úlcera. La serie de eventos que conduce a la angiogénesis parece ser como sigue: el agente lesivo causa destrucción de tejido e hipoxia. Los factores de crecimiento tales como factores de crecimiento fibroblástico básico y ácido son liberados de los macrófagos destruidos, y la producción de factor de crecimiento vascular derivado de endotelio es estimulada por la hipoxia. Las enzimas proteolíticas liberadas en el tejido conectivo degradan las proteínas de la matriz extracelular. Los fragmentos de estas proteínas reclutan monocitos de la sangre periférica al sitio del daño donde son activados y transformados en macrófagos activados que liberan factores de angiogénesis. Ciertos factores de angiogénesis de los macrófagos, tales como el factor de crecimiento fibroblástico básico, estimulan a las células endoteliales a liberar activador del plasminógeno y procolagenasa. El activador de plasminógeno transforma el plasminógeno a plasmina y la procolagenasa a colagenasa activa. Estas dos proteasas coordinadas digieren las membranas basales. Los fragmentos de las membranas basales permiten a las células endoteliales estimuladas por los factores angiogénicos formar nuevos vasos sanguíneos en el sitio dañado. Una vez que la herida es reparada, la angiogénesis cesa y muchos de los nuevos vasos sanguíneos pueden desintegrarse por apoptosis (muerte celular programada). La apoptosis es regulada por una variedad de moléculas de matriz, tales como trombospondinas 1 y 2, y factores de angiogénesis como angiostatina, endostatina y angiopoietina 2 (Singer AJ y Clark RAF 1999).

Microscopía confocal

Los resultados obtenidos en este estudio fueron los siguientes (figuras 7A a 7D y 8A y 8B):

1. Como ya se mencionó anteriormente, se utilizó el método de inmunohistoquímica, usándose como anticuerpo secundario la anti α actina para músculo liso vascular. Con este anticuerpo se detectan específicamente las células musculares lisas de la túnica media de los vasos sanguíneos por contener actina en su citoesqueleto. El citoplasma fluoresce de color verde y el núcleo se observa como un centro oscuro de forma

esférica rodeado por el citoplasma verde. La túnica íntima, el contenido de la luz del vaso (cuando existe flujo sanguíneo), la túnica adventicia y todas las estructuras que son negativas a la α actina fluorescen de color rojo. Cuando no hay estructuras tisulares el fondo es de color negro.

2. Tanto en los pacientes tratados con L-arginina como en los pacientes tratados con pentoxifilina se observó escasez de vasos sanguíneos, especialmente arteriolas, observándose únicamente una por campo de bajo poder.
3. Se observaron escasos vasos capilares con luz muy estrecha, que estuvo prácticamente ausente.
4. La epidermis mostró acantosis.
5. Las arteriolas de la piel de la zona ulcerada de los pacientes tratados con L-arginina mostraron los siguientes aspectos morfológicos (Figuras 7A y 7B):
 - La luz del vaso (arteriola) mostró un fondo negro lo que indica ausencia de elementos sanguíneos que probablemente se deba a la oclusión por trombosis o por aterosclerosis de las arterias que les dan origen.
 - La túnica íntima se observa desorganizada con áreas en las que su espesor está aumentado.
 - La lámina elástica interna, que debería observarse entre la túnica íntima y la túnica media como una línea ondulada continua de color rojo, ha desaparecido.
 - La túnica media se observa completamente desorganizada y no se pueden delimitar sus capas entre sí; presenta un espesor variable en diferentes regiones cuando lo normal es que sea uniforme. En algunas regiones casi ha desaparecido y se observa ruptura. En otras regiones podemos ver entre sus capas zonas de color rojo que probablemente correspondan a depósitos de matriz extracelular.
6. Los pacientes tratados con pentoxifilina mostraron la misma escasez de vasos que los pacientes del grupo anteriormente descrito, tratándose de arteriolas; pero ligeramente mayor número de capilares con un diámetro un poco más amplio (Figuras 7C y 7D):
 - La luz de las arteriolas no mostró elementos sanguíneos.
 - La túnica íntima, aunque incompleta y con zonas de ruptura, mostró mayor tendencia a la continuidad y también se observó aumentada de espesor.
 - La lámina elástica interna no estuvo presente.

- La túnica media, a pesar de mostrar áreas de desorganización, presentó cierta tendencia a la organización de sus capas musculares de una forma paralela en aproximadamente un 40% de su extensión. En algunas áreas se observó proliferación desorganizada de células musculares lisas y zonas de material negativo a la anti actina. Estas últimas tal vez correspondientes a depósitos de matriz extracelular.
7. En un paciente diabético sin úlcera se tomó biopsia solicitada por él mismo y, por motivos éticos, no se tomó biopsia a ningún otro paciente con estas características. Esto se debió a que la zona de la biopsia tuvo tendencia al desarrollo de una lesión ulcerativa. Este riesgo se evitó administrándole tratamiento con L-arginina. A la biopsia obtenida se le efectuaron estudios inmunohistoquímicos con los siguientes resultados (Figura 8):
- Se observaron dos arteriolas en un campo de bajo poder. La arteriola que se pudo observar con mayor detalle mostró una luz estrecha con elementos sanguíneos en su interior. Sin embargo éstos no pudieron distinguirse unos de otros y se aglomeraron como una masa amorfa que probablemente correspondió a aglutinación y trombosis.
 - La túnica íntima no se pudo distinguir claramente.
 - La lámina elástica interna estuvo ausente.
 - La túnica media mostró mayor organización en capas de células musculares lisas distribuidas en forma paralela y mejor delimitadas. Las células musculares lisas mostraron de una manera más clara su núcleo y citoplasma mejor definidos. El espesor de esta túnica fue más uniforme. No obstante, se observaron escasas zonas de desorganización con depósitos amorfos que tal vez correspondieron a matriz extracelular.

Paavonen y cols. (2000), en un estudio acerca de linfangiogénesis en la curación de la herida, estudiaron al receptor-3 para el factor de crecimiento vascular del endotelio (VEGF), a través de métodos inmunohistoquímicos, en heridas experimentales de cerdos y en úlceras crónicas de seres humanos. Utilizó como marcadores para el estudio de la angiogénesis de vasos sanguíneos la laminina, anticuerpos monoclonales anti-VEGFR-3,

PAL-E monoclonal (antígeno específico del endotelio para vasos sanguíneos, excepto arteriolas y arterias). Además utilizó anti actina para músculo liso, pero esta última la usó para marcar vasos linfáticos donde obtuvo resultados negativos. La mayoría de los anticuerpos los trabajó con la finalidad de estudiar la linfagiogénesis. La laminina aunque no lo menciona probablemente la utilizó porque es la glucoproteína que más abunda en las membranas basales (Timp RR y Brown JC 1994) y su ruptura es necesaria para la neovascularización Su hipótesis, que fue confirmada de acuerdo a sus resultados, era que la linfagiogénesis ocurre en forma paralela con la angiogénesis en la curación de las heridas, incluidas las úlceras diabéticas. No obstante que esta hipótesis es interesante y novedosa los resultados de positividad para los anticuerpos utilizados fueron muy irregulares ya que la positividad no fue del 100%. Un problema metodológico consiste en que los vasos linfáticos en la piel son muy difíciles de identificar, de hecho con las técnicas histoquímicas habituales no son observables. Por lo tanto, es necesario el desarrollo y la búsqueda muy cuidadosa de los anticuerpos idóneos para su localización de una manera inequívoca.

Respuesta a la L-arginina

Las úlceras midieron de 0.5-38 cm² (un promedio de 7.59 ± 13.79 cm²) (Tabla 1). La cronicidad de las úlceras fue de 25-180 días (un promedio de 80.71 ± 52 días) (Tabla 5). El tiempo del tratamiento varió de 9-202 días (un promedio de 94.57 ± 63.87 días) (Tabla 1). Todos los pacientes tratados con L-arginina mostraron curación de la úlcera diabética (Figuras 9 y 10). Tres pacientes tuvieron mejorías de 95, 90 y 85%, respectivamente. Estos tres pacientes, abandonaron el estudio debido a cambio de residencia. Por ser este un criterio de eliminación no fueron considerados para el análisis estadístico. Sin embargo, se considera digno de mención por el grado de mejoría alcanzado.

Cuadro 9. Cronicidad de la úlcera y curación después del tratamiento con L-arginina

Paciente No.	Tamaño inicial (cm ²)	Cronicidad (días)	Tratamiento (días)	Curación (días)
1	4.0	90	59.00	100
2	0.5	90	125.00	100
3	2.8	30	115.00	100
4	0.8	60	42.00	100
5	0.5	180	9.00	100
6	6.0	25	110.00	100
7	38.5	90	202.00	100
Suma	53.1	565	662	
Media	7.59	80.71	94.57	
DE	13.79	52.00	63.87	

DE = Desviación estándar

Se efectuó correlación de Pearson para comparar simultáneamente la correlación entre el tamaño de las úlceras, el tiempo de evolución y el tiempo de tratamiento. No se observó una correlación significativa de las variables mencionadas.

La suplementación de L-arginina mejora la curación de la herida tanto en modelos animales como humanos. El aminoácido L-arginina, el cual puede ser sintetizado a partir de la L-citrulina y L-aspartato, fue clasificado como “semi-esencial” hace más de 65 años. La base para esta clasificación fue la observación de que la L-arginina de la dieta es necesaria para el crecimiento óptimo en animales. La L-arginina también es crítica en situaciones de ayuno, daño o estrés.

Estudios realizados en animales, en pacientes y en voluntarios sanos han confirmado que la suplementación de L-arginina conduce a mayor resistencia de la herida y a aumento de contenido de hidroxiprolina y de colágena. Se ha informado que las respuestas linfocitarias y la mitogénesis fueron mejoradas con la suplementación de L-arginina. Es posible que los efectos benéficos de la suplementación de L-arginina en la curación de la herida estén asociados con la expresión alterada de citocinas.

La L-arginina ha sido investigada en modelos experimentales de curación de la herida. Las concentraciones del aminoácido y las actividades de las enzimas que metabolizan la L-arginina han sido medidas en el líquido de la herida. Los resultados han mostrado activación temprana de la vía generadora de NO y L-citrulina después de la herida, seguida por activación de la arginasa que se asocia con un descenso significativo en la concentración de L-arginina local y un aumento en la concentración de L-ornitina en el fluido de la herida. Se piensa que la actividad aumentada de arginasa en la curación de la herida proporciona L-ornitina, el sustrato de la síntesis de poliaminas y de L-prolina y depleta la L-arginina del microambiente, suprimiendo de esa manera la vía L-arginina-NO potencialmente dañina. Así, es probable que los efectos benéficos de la suplementación de L-arginina en la reparación de la herida resulte de la disponibilidad aumentada de sustrato para la síntesis de poliaminas y colágena (Ketteler M 1994).

Otro mecanismo por el cual la L-arginina podría favorecer la curación de la herida sería, que este aminoácido estimulando la liberación de hormona del crecimiento. Estudios recientes sugieren que la vía de la L-arginina-NO, está involucrada en la regulación de la

liberación de la hormona hipofisiaria. La liberación aumentada de hormona del crecimiento puede conducir a la activación de la ODC. La suplementación de L-arginina en la dieta falla para mejorar la curación de la herida en ratas hipofisectomizadas. Sin embargo, la infusión de una mezcla control de aminoácidos da como resultado niveles más altos de hormona del crecimiento pero menos mejoría en la curación de la herida que la infusión de L-arginina. Así, la liberación aumentada de la hormona del crecimiento puede contribuir a los efectos benéficos de la suplementación de L-arginina en la reparación de la herida (Ketteler M 1994).

La isquemia y la neuropatía, dos complicaciones comunes de la DM son factores de riesgo primarios para el desarrollo de úlceras del pie y sus complicaciones. La mayoría de las úlceras del pie tienen etiología mixta isquémica y neuropática (Laing P 1998). Sin embargo, una etiología vascular ha sido postulada, incluso cuando la neuropatía se ha identificado como el factor determinante productor de la úlcera. Este punto de vista ha sido controvertido (Irwin ST y cols., 1988).

En general, la isquemia ha sido considerada un enemigo global para la curación de la herida (Bulat y cols., 1995). La curación de la herida es un proceso complejo que involucra intrincadas interacciones entre una gran variedad de tipos celulares, proteínas estructurales, factores de crecimiento y proteinasas que juegan un importante papel en la inflamación aguda y crónica y en la reparación del tejido. Las heridas agudas y crónicas sanan en una progresión ordenada a través de fases artificialmente definidas de: dilatación vascular, coagulación, inflamación, síntesis y depósito de matriz, angiogénesis, fibroplasia, epitelización, contracción y remodelación (Stadelman KS y cols., 1998). Estos procesos implican la participación de células polimorfonucleares y mononucleares, monocitos, linfocitos, fibroblastos, macrófagos y una miríada de factores de crecimiento, de coagulación y angiogénicos, así como de las citocinas por ellas producidas.

Los efectos adversos de la malnutrición y la DM sobre la curación de la herida han justificado el tratamiento nutricional. La evidencia para involucrar a la L-arginina como un componente clave en los efectos benéficos de una dieta baja en proteínas (Narita I y cols., 1995), puede ser ampliamente explicada, debido a que este aminoácido participa en varias vías metabólicas, actuando como precursor para la síntesis no solo de proteínas sino también de NO, urea, glutamato, creatina, poliaminas, prolina y otras moléculas

involucradas en la regulación de la homeostasis celular (Wu G y cols., 1998). El papel del NO sobre la función plaquetaria, evitando tanto su agregación (Radomski y cols., 1990) y su adhesión a las células endoteliales, es bien conocido (Radomski y cols., 1987). Además, la L-arginina es un poderoso secretagogo de insulina en los humanos (Menchini M y cols., 1980).

Por otro lado, las propiedades antiaterogénicas de la L-arginina han sido demostradas (Cook JP y cols., 1991). Adicionalmente la normalización de la glucosa, lípidos, lipoproteínas y apoproteínas se ha observado en ratas con diabetes experimental (Méndez JD y cols., 2001). Experimentos previos han demostrado que las poliaminas putrescina, espermidina y espermina derivadas de la L-arginina tienen un efecto antiagregante sobre las plaquetas en conejos hipercolesterolémicos (Méndez JD y cols., 1997; Corona de la Peña y cols., 2000). Las poliaminas son mediadores importantes del crecimiento celular y la L-prolina formada también a partir de la L-arginina es un sustrato para la síntesis de colágena. Ambas vías, la síntesis de poliamina y la formación de prolina, una vez activadas pueden ser importantes en los procesos reparativos.

En este estudio no observamos diferencias significativas entre el tamaño de la úlcera, el tiempo de evolución de las lesiones y el tiempo del tratamiento requerido para lograr la curación de la herida. Este resultado se puede deber a varios factores tales como localización de la úlcera, calidad del control metabólico, función renal, neuropatía, aspectos psicosociales y psicológicos.

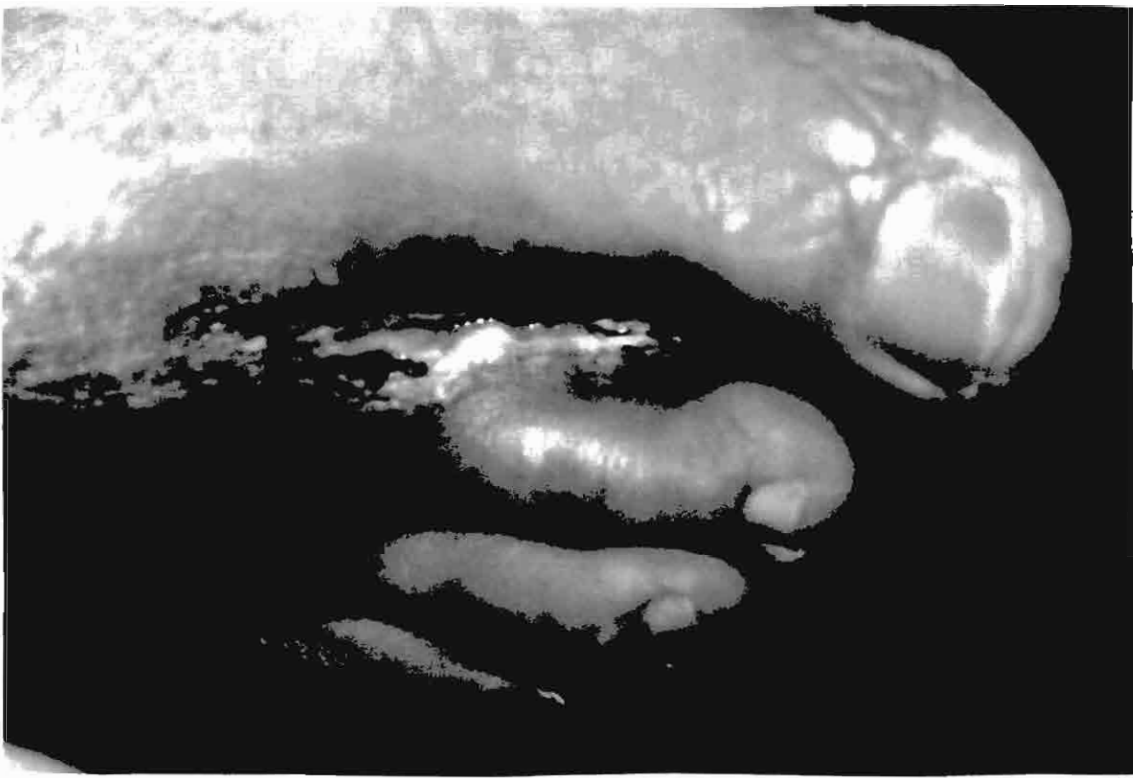


Figura 9. Lesión ulcerativa en paciente con pie diabético antes (A) y después (B) de ser tratada y reparada. Ver explicación en el texto.

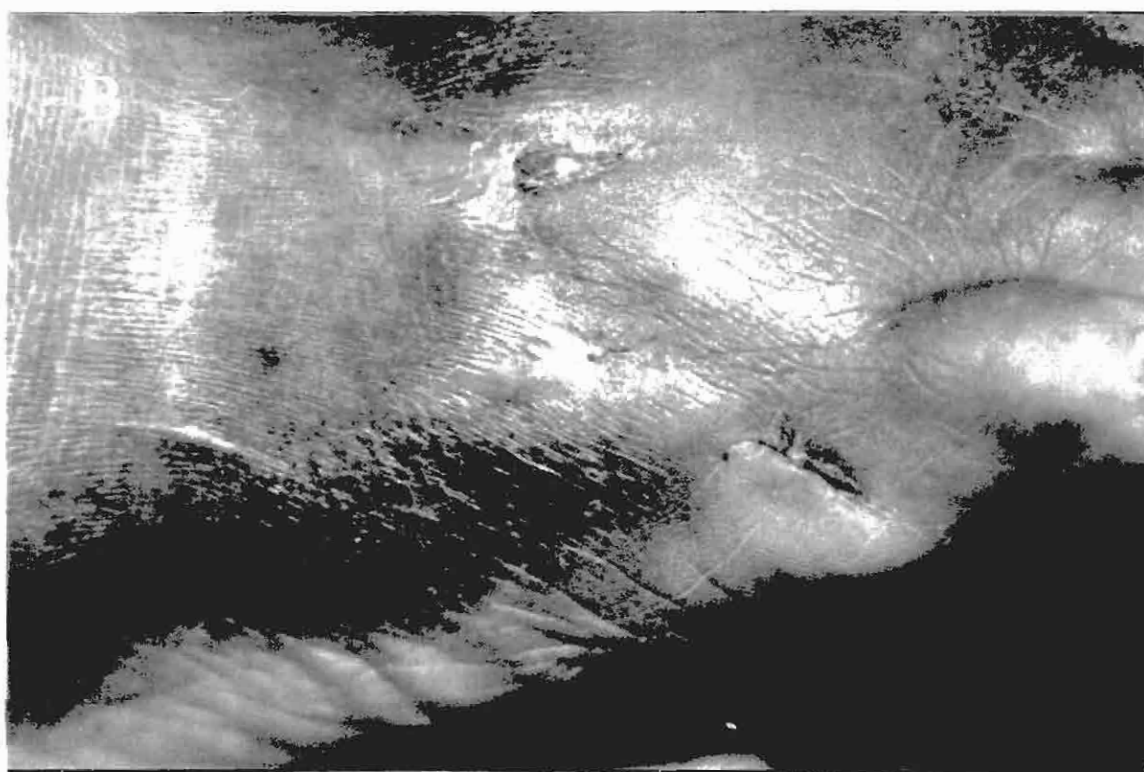
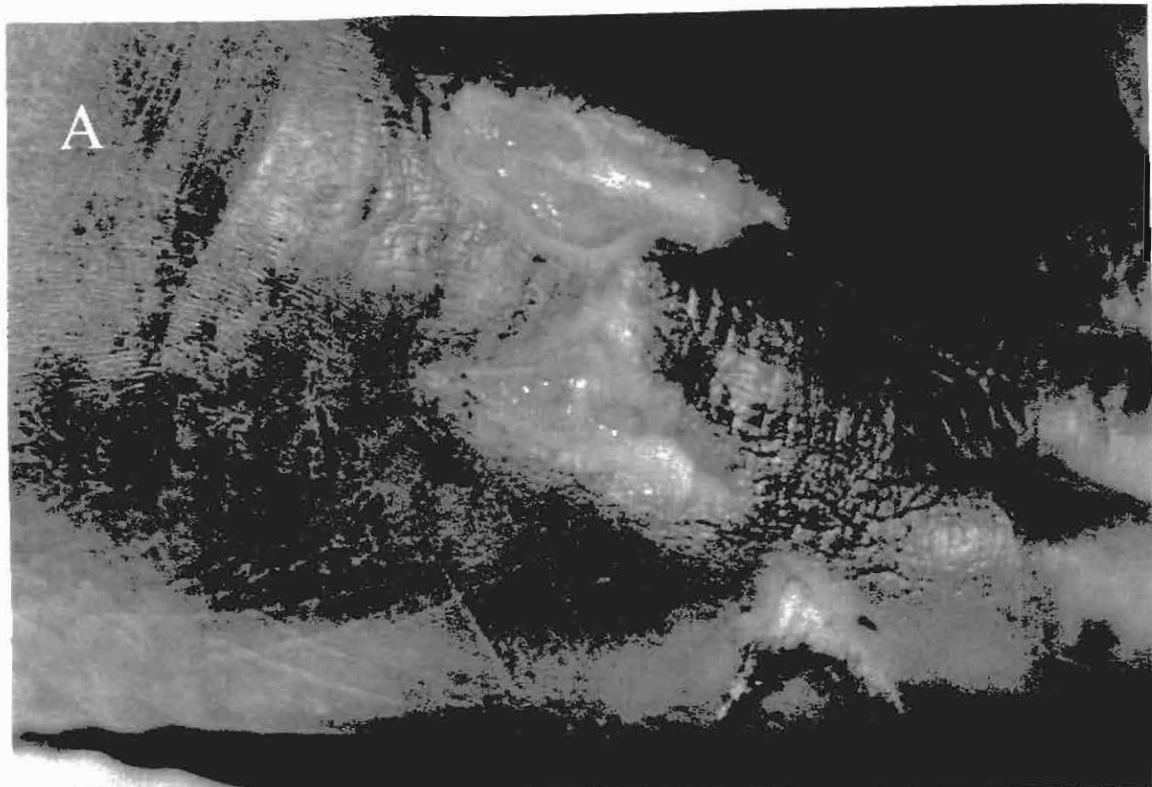


Figura 10. Lesión ulcerativa en paciente con pie diabético antes del tratamiento (A) y cuando ha sido curada (B). Ver explicación en el texto.

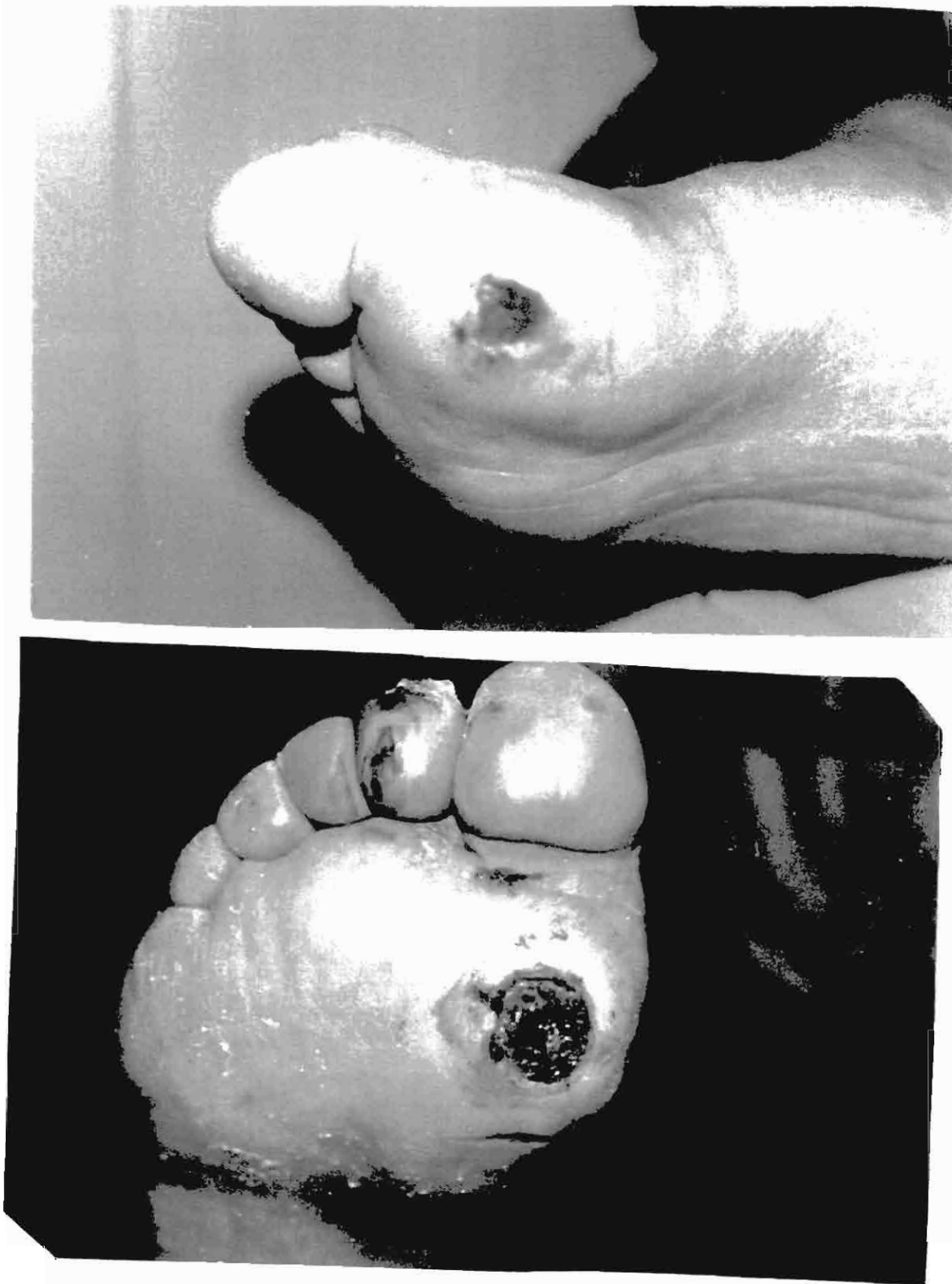


Figura 11. Paciente diabético con lesión ulcerativa plantar antes del inicio del tratamiento con pentoxifilina (fotografía superior) y cuatro meses después (fotografía inferior)

Como parte culminante de este estudio presentamos las imágenes de dos de los pacientes que recibieron los beneficios del tratamiento con L-arginina. Se colocan en ese sitio porque la finalidad principal de los estudios biomédicos es una mejor calidad de vida para el ser humano. La figura nueve corresponde a un paciente masculino de treinta y seis años de edad, diez años de evolución de diabetes, dos meses después de la amputación del segundo orjejo del pie derecho con presencia de lesión ulcerativa rebelde al tratamiento cuya extensión iba en aumento al momento de ingresar al estudio. En la parte superior se muestra la lesión al inicio del tratamiento y en la parte inferior la zona de la cicatrización de la úlcera al final del tratamiento. En la figura diez, las fotografías presentan a un paciente del sexo masculino de cincuenta y cuatro años de edad, quince años de evolución de la diabetes y tres meses de tratamiento de sus lesiones en el dorso del pie derecho con exposición de tejidos blandos, tendones y profundidad hasta el quinto metatarsiano el cual mostraba osteolisis y osteomielitis a los rayos X. En la parte superior se muestra la lesión al momento de su ingreso al estudio y en la parte inferior la zona de piel re-epitelizada que incluyó curación de la osteomielitis y reparación del hueso afectado. En la figura 11 se muestra la fotografía de un paciente de 28 años de edad, con lesión plantar en el pie derecho, pie en garra y dos meses de cronicidad de la úlcera antes de ingresar al protocolo. Fue ingresado en el grupo de tratamiento con pentoxifilina. Cuatro meses después la lesión ulcerativa mostró aumento de tamaño y la región plantar de los cuatro primeros orjejos mostraron el inicio de nuevas lesiones ulcerativas además de afectación por hongos.

El mecanismo preciso por el cual la L-arginina ejerce sus efectos sobre el proceso reparativo de la lesión ulcerativa no es bien conocido, sin embargo puede ser parcialmente explicado por su conversión a ornitina semialdehído glutámico vía la prolina, como se ha establecido previamente (Zinker S y cols, 1992), aunque la contribución de las poliaminas sintetizadas a partir de la L-arginina no puede ser descartada.

En este estudio nosotros observamos efectos benéficos de la administración de L-arginina sobre las lesiones ulcerativas en las extremidades inferiores en pacientes diabéticos, aunque estos pacientes mostraron niveles alterados pero disminuidos en la medición de valores finales de glucemia y de HbA1c. Las concentraciones de glucosa disminuyeron significativamente.

En este estudio de efecto de la L-arginina sobre la angiogénesis, por razones éticas, no fue posible tomar otra biopsia para estudiar la angiogénesis una vez que las lesiones ulcerativas fueron sanadas. Este aspecto permanece pendiente de ser estudiado. Finalmente, este estudio mostró efectos benéficos de la L-arginina en la curación de las heridas, evitando la amputación del miembro inferior y mejorando el tiempo de curación de la úlcera crónica en pacientes diabéticos. Estos resultados apoyan las observaciones sobre la suplementación de arginina en la dieta de la población de edad avanzada que han resultado en sobre-regulación de la actividad de las células T e incremento de proteínas y depósito de colágena en heridas experimentales (Barbul A y cols., 1990). La L-arginina administrada diariamente no tuvo efectos tóxicos y fue bien tolerada a la dosis farmacológica utilizada por lo que se considera que puede ser usada como un tratamiento auxiliar par úlceras del pie diabético, además de otros tratamientos convencionales.

En este estudio se logró demostrar la eficacia mayor de la L-arginina (tratamiento experimental) en comparación con la pentoxifilina (tratamiento estándar) administrada al grupo control, en la reparación de las úlceras del pie diabético, complicación que cuando no es tratada adecuadamente, con frecuencia lleva a la pérdida de una o ambas extremidades inferiores de los pacientes diabéticos, incapacitándolos laboralmente en forma irreversible con la disminución de la calidad de vida personal y familiar, así como el alto costo social y económico.

Las determinaciones bioquímicas efectuadas para evaluar el control metabólico de los carbohidratos en los pacientes con pie diabético permitieron convalidar, desde el punto de vista clínico, la disminución estadísticamente significativa de la hiperglucemia característica de la DM en el grupo tratado con L-arginina administrada por vía subcutánea. Existen fuertes evidencias en estudios previos (Zinker S y cols, 1992; Barbul A y cols, 1980) que la L-arginina actúa tanto localmente como desde un punto de vista sistémico en diversos aspectos de la fisiopatología de la diabetes.

En el tema que se está tratando hay estudios consistentes que apoyan la participación de la L-arginina en la reparación de la piel dañada por la úlcera del pie diabético y, uno de los mecanismos probables, es la promoción de la angiogénesis, además de las diversas vías

metabólicas incluyendo la de las poliaminas, que promueven proliferación celular y otras vías que llevan a la formación de colágeno y fibrosis, entre otras consecuencias.

La heterogeneidad de las úlceras del pie diabético, así como la influencia sobre ellas de la edad de los pacientes, la mayor o menor participación de un entorno psicosocial adecuado, la diferencia entre el componente neuropático o isquémico o ambos; hace difícil establecer el papel exacto de la L-arginina, pero sí se puede afirmar, con un alto grado de certeza, su papel positivo en la curación de la herida. Estos criterios funcionan también para los otros tratamientos que están compitiendo por ocupar el lugar del estándar de oro y para la evaluación histológica, sin embargo, la mayoría de la bibliografía consultada no toma en cuenta estos aspectos, y sólo se encontró un artículo (Piaggese A y cols., 2003) que reconoce, con toda honestidad, esta debilidad metodológica.

El estudio metodológico ideal requiere los siguientes aspectos: estratificación de los pacientes de acuerdo a edad, sexo, tamaño, estadificación, localización, cronicidad, tejidos afectados, tipo de diabetes, tiempo de evolución de la diabetes, características del control metabólico, factores psicosociales; esto para evitar al máximo las variables de confusión y aislar en la medida de lo posible la variable experimental cuya eficacia se quiere demostrar.

La mayoría de los estudios publicados proponiendo nuevos medicamentos o métodos de tratamiento para las úlceras de pacientes diabéticos tratan de acercarse a esta metodología ideal, acercándose sólo de una manera parcial y muchas veces sin reconocer, explícitamente, esas debilidades metodológicas que son comprensibles debido a la complejidad del tema tratado. Lo más probable es que ningún tratamiento por sí solo logre la curación de la herida y, como ya se ha mencionado, lo que se debe de hacer es un tratamiento integral del paciente, dirigido al control metabólico del paciente diabético con medidas asociadas para el control de las complicaciones características de la enfermedad.

Otros métodos mencionados previamente requieren de personal con mayor capacitación y de mayores períodos de hospitalización de los pacientes. Todo esto hace urgente la realización de estudios de costo-beneficio. En cambio, el tratamiento con L-arginina, además de ser altamente efectivo, es un tratamiento ambulatorio y requiere un mínimo de adiestramiento del personal médico y paramédico, lo que repercute en un menor costo, haciéndolo accesible para su aplicación masiva.

CONCLUSIONES

1. La L-arginina fue más eficaz que la pentoxifilina en la curación de la piel con úlceras del pie diabético.
2. Se observó una asociación entre el control glucémico y el proceso de curación de los pacientes tratados con L-arginina.
3. Se comprobó que hay diferencias en el estado de la vasculatura entre los pacientes tratados con L-arginina y los pacientes tratados con pentoxifilina.
4. Así mismo, es muy probable que la angiogénesis juegue un papel importante en la mejoría y curación de las lesiones ulcerativas del pie diabético.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Ahroni JH, Boyko EJ, Forsberg RC 1999. Clinical correlates of plantar pressure among diabetic veterans. *Diabetes Care* 22: 965-972.

Altavilla D, Saitta A, Cucinotta D, Galeano M, Deodato B, Colonna M, Torre V, Russo G, Sardella A, Urna G, Campo GM, Cavallari V, Squadrito G, Squadrito F (2001). Inhibition of lipid peroxidation restores impaired vascular endothelial growth factor expression and stimulates wound healing and angiogenesis in the genetically diabetic mouse. *Diabetes* 50: 667-674.

American Diabetes Association (1998). Preventive foot care in people with diabetes. *Diabetes Care* 21: 2178-2179.

American Diabetes Association (1998). Screening for Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 21: Suppl. 1):S20-S22.

Aragón FJ (2001). En: El pie diabético. Editorial Masson. Barcelona.

Armstrong DG, Stacpoole-Shea SB, Nguyen H, Harkless LB (1999). Lengthening of the achilles tendon in diabetic patients who are at high risk for ulceration of the foot. *J Bone Joint Surg Am* 81-A: 535-538.

Bachrach U (1973). Function of the naturally occurring polyamines. Bachrach (Ed). Academic Press NY pp. 220-232.

Barbul A (1986). Arginine, biochemistry, physiology, and therapeutic implication. *J Parenter Enteral Nutr* 10: 227-238.

Barbul A, Lazarou SA, Efron DT, Wasserkrug HL, Efron G (1990). Arginine enhances response wound healing and lymphocyte immune responses in humans. *Surgery* 108:331-337

Bethell DR, Hibasami, H, Pegg, AE (1982). Regulation of polyamine content in cultured fibroblasts. *Am. Phys Soc* C262-269.

Bloomgarden ZT (1997). The 32nd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes: Macrovascular disease. *Diabetes Care* 20: 1198-1201

Bloomgarden ZT (1998). American European Association Annual Meeting, 1997: Endothelial dysfunction, neuropathy and the diabetic foot, diabetic mastopathy, and erectile dysfunction. *Diabetes Care* 21: 183-189.

Bloomgarden ZT (1999). The European Association for the Study of Diabetes Annual Meeting, 1998:Complications of diabetes. *Diabetes Care* 22: 1364-1370.

Bloomgarden ZT (2000). European Association for the Study of Diabetes Annual Meeting, 1999: Complications of diabetes. *Diabetes Care* 23:1423-1428.

Bloomgarden ZT (2001). American Diabetes Association 60th Scientific Sessions, The diabetic foot. *Diabetes Care* 24: 946-951.

Bôger RH, Bode-Bôger SM, Kienke S, Stain AC, Nofe R, Frolich JC (1998). Dietary L-arginine decreases myointimal cell proliferation and vascular monocyte accumulation in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 136:67-77.

Bogle RG, Mann GE, Pearson JD, Morgan DML (1994). Endothelial polyamine uptake: selective stimulation by L-arginine deprivation of polyamine depletion. *Am J Physiol* 266 (Cell Physiol 35), C776-C783.

Brem H, Balledux J, Bloom T, Kerstein M, Hollier L (2000). Healing of diabetic foot ulcers and pressure ulcers with human skin equivalent: A new paradigm in wound healing. *Arch Surg* 135: 627-634.

Brodsky J (1993). The diabetic foot. *In* Mann RA., Coughlin MJ (eds): Surgery of the foot and Ankle, 6th ed. St. Louis, Mosby-Year Book, pp 877-958.

Brodsky JW (1993). Outpatient diagnosis and care of the diabetic foot. *In* Heckman J.D. (ed):Instructional Course Lectures. Park Ridge, Ill., American Academy of Orthopaedic Surgeons, pp 121-131.

Brooks PC (1994). Requirement of vascular integrin $\alpha v \beta 3$ for angiogenesis. *Science* 264:569.

Brownlee M, Cerami A (1981). The biochemistry of the complications of DM. *Annu Rev Biochem* 50:385-432.

Caaldi AA, Algranati ID (1989). Polyamines and regulation of ornithine biosynthesis in *E. coli*. *J. Bacteriol* 171: 1998-2002.

Cañedo-Dorantes L, Garcia-Cantú R, Barrera R, Méndez-Ramirez I, Navarro VH, Serrano G (2002). Healing of chronic arterial and venous leg ulcers with systemic electromagnetic fields. *Arch Med Res* 33: 281-289.

Catalano PM, Tyzbit ED, Wolfw RR (1993). Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational diabetes. *Am J Physiol* 264:E60-E67.

Cianci P (2000). Consensus development conference on diabetic foot wound care: A randomized controlled trial does supporting use of adjunctive hyperbaric oxygen therapy. *Diabetes Care* 23: 873.

Campbell RK (1993). Clinical update on pentoxifylline therapy for diabetes-induced peripheral vascular disease. *Ann Pharmacother* 27:1099.

Coleman WC (2000). The diabetic foot. In: Clinical Diabetes Mellitus. A Problem-oriented Approach. John KD (Edit) Thieme, Third Edition, Chapter 31, pp 571-580.

Colwell JA (2000). Peripheral vascular disease in diabetes mellitus. In: Clinical Diabetes Mellitus. A Problem-oriented Approach. John KD (Edit) Thieme, Third Edition, Chapter 30, pp 561-570.

Consensus Development Conference on Diabetic Foot Wound Care: 7-8 Abril 1999 O American Diabetes Association (1999). *Diabetes Care* 22: 1354

Cook JP, Singer AH, Tsao P, Zera P, Rowan RA, Billingham ME (1991). Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest* 90, 1168-1172.

Corona de la Peña N, Sosa-Melgarejo JA, Méndez JD (1999). Atherosclerosis experimental. Cambios bioquímicos y vasculares. *Rev Med IMSS* 37:337-338.

Cotran RS, Kumar V, Collins T (2000). Reparación de los tejidos: proliferación celular, fibrosis y curación de las heridas. En: Robbins Patología estructural y funcional, capítulo 4, sexta edición, McGraw-Hill Interamericana, México, pp 110-120.

Christau B, Kromann H, Chisty M (1979). Incidence of insulin-dependent diabetes mellitus (0-29 years at onset) in Denmark. *Acta Med Scand* 624:54-60.

Cuatrecasas P (1969). Interaction of insulin with the cell membrane: the primary action of insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 63:450-457.

Cunningham R, Werner KM (1975). Isolation, characterization and mapping of *E. coli* mutants blocked in the synthesis of ornithine decarboxylase. *J Bacteriol* 124: 791-799,

Dargis V, Olga P, Jonushaite A, Vileikyte L, Boulton AJ (1999). Benefits of a multidisciplinary approach in the management of recurrent diabetic foot ulceration in Lithuania: A prospective study. *Diabetes Care*; 22: 1428-1431.

Davis S (1996). Isolation of angiopoietin-1 a ligand for the TIE2 receptor by secretion-trap expression cloning. *Cell* 87:1161.

De Backer TL, Vander Stichele RH, Warie HH (2000). Oral vasoactive medication in intermittent claudication: utile or futile?. *Eur J Clin Pharmacol* 56: 199

DeFronzo RA, Ferrannini E (1987). Regulation of hepatic glucose metabolism in humans. *Diabetes/Metabolism Reviews* 3: 415-459.

Derr R, Garrett E, Stacy GA, Saudek CD (2003). Is HbA_{1c} affected by glycemic instability? *Diabetes Care* 26: 2728-2733.

Devaraj S (2000). Low-density lipoprotein postsecretory modification, monocyte function, and circulating adhesion molecules in type 2 diabetic patients with and without macrovascular complications: The effect of tocopherol supplementation. *Circulation* 102: 191-196.

Donnelly R, Emslie-Smith A, Alistaer M, Gardner I, Morris AD (2000). Vascular complications of diabetes. *BMJ*, 320: 1062-1066

Dvorak H.F (1995). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hypermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*;146:1029.

El Baze P, Milano G, Verrando P, Reneé N, Ortome JP (1983). Polyamine levels in normal human skin. *Arch. Dermatol- Res* 275:218-221.

Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas no Transmisibles, 1991.

Faglia E, Favales F, Aldeghi A, Calia P, Quarantiello A, Oriani G, Michael M, Campagnoli P, Morabito A. (1996). Adjunctive systemic hyperbaric oxygen therapy in treatment of severe prevalently ischemic diabetic foot ulcer: A randomized study. *Diabetes Care*; 19: 1338-1343

Fang FC (1997). Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J. Clin Invest* 99:2818-2825.

Federman DG, Bravata DM, Kirsner RS (2004). Peripheral arterial disease. A systemic disease extending beyond the affected extremity. *Geriatrics* 59:29-30.

Ferrante A (1985). Inhibition of human neutrophil locomotion by the polymine oxidase-polyamine system. *Immunology* 54: 785-90.

Field LL, Tobias R (1997). Unraveling complex trait: The genetics of insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Invest Med* 20:41-47.

Flier J, Kahn C, Roth J (1979). Receptors, antireceptor antibodies, and mechanisms of insulin resistance. *N Engl J Med* 300: 413.

Folkman J, D'Amore PA (1996). Blood vessel formation: what is its molecular basis. *Cell* 87:1153.

Friedewald WJ, Levy FI, Fredrickson DS (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18, 499-502.

Furchgott RF (1983). Role of endothelium in response to vascular smooth muscle. *Circ Res* 53, 557-572.

Furchgott RF, Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373.

Furie B, Furie BC (1988). The molecular basis of blood coagulation. *Cell* 53, 505-518.

Gepts W (1965): Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes* 14:619-633.

Gerstein H (1994). Cow's milk exposure and type I diabetes. *Diabetes Care* 17:13.

Gey DC, Lesho EP, Manngold J (2004) Management of peripheral arterial disease. *Am Fam Physician* 69, 525-32

Hanahan D (1997). Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 277:48.

Hattersley A (1997). Genetic factors in the aetiology of non-insulin-dependent diabetes. *Front Horm Res* 22:157.

Heby O (1981). Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation* 14:1-20.

Heldin CH (1992). Structural and functional studies of platelet-derived growth factor. *EMBO J* 11:4251.

Hill SL, Holtzman GI, Buse R (1999). The effects of peripheral vascular disease with Osteomyelitis in the Diabetic Foot. *Am J Surg* 177: 282-286.

Hobgood E (2000). Conservative therapy of foot abnormalities, infections, and vascular insufficiency. In: Clinical Diabetes Mellitus. A Problem-oriented Approach. John KD (Edit) Thieme, Third Edition, Chapter 31, pp 599-609.

Irwin, ST, Gilmore J, McGrann S (1988). Blood flow in diabetics with lesions due to small vessel disease. *Br J Surg* 75:1201-1206.

Jorneskog G, Brismar K, Fagrell B (1995). Skin capillary circulation is more impaired in the toes of diabetic than non-diabetic patients with peripheral vascular disease. *Diabetic Medicine* 12: 36-41.

Joseph S, Krishamurth S, Kakkar U (1987). Effect of the polyamine-spermine on angonist-induced human platelet activation-specific inhibition of "aggregation-independent" event induced by thrombin, but not by collagen, thromboxane mimetic, phorbol ester on calcium ionophore. *Thromb Haemost* 57:191-195.

Karam JH, Lewitt PA, Young CW (1980). Insulinopenic diabetes after rodenticide (Vactor) ingestion. A unique model of acquired diabetes in man. *Diabetes* 29:971-978.

Kattermann R (1984). Rapid determination of total and free cholesterol in serum. *Clin Chem Biochem* 22, 245-249.

Ketteler M, Border WA, Noble NA (1994). Cytokines and L-arginine in renal injury and repair. *Am J Physiol* 267:F197-F207.

Kiyama T, Witte MB, Thornton FJ (1998). The route of nutrition support affects the early phase of wound healing. *J Parenter Enteral Nutr* 22:276.

Knight EV, Oldham JW, Mohler MA, Liu S, Dooley J (1998). A Review of nonclinical toxicology studies of becaplermin (rhPDGF-BB). *Am J Surg* 176 (Suppl 2A): 55S-60S.

Koenig H, Goldstone A, Lu CY (1983). Polyamines regulate calcium fluxes in a rapid plasma membrane response. *Nature* 305, 530-534.

Kreisberg RA (1998). Diabetic dyslipidemia. *Am J Cardiology* 82: 67U-73U.

Laing P (1998). The development and complications of diabetic foot ulcers. *Am J Surg* 176 (Suppl 2A):11S-19S.

Laughlin RT, Calhoun JH, Mader JT (1995). The diabetic foot. *Am Acad Orthop Surg* 3:218-225.

LeGrand EK (1998). Preclinical promise of becaplermin (rhPDGF-BB) in wound healing. *Am J Surg* 179 (suppl 2A): 48S-54S.

Lehto S, Niskanen L, Suhonen M, Ronnema T, Laakso M (1996). Medial artery calcification: A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Biol* 16: 978-983.

Leslie CA (1998). Randomized controlled trial of topical hyperbaric oxygen for treatment of diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 11:111-115.

Levin ME (1995). Preventing amputation in the patient with diabetes. *Diabetes Care* 18:1383-1394.

Levin ME (2000). Pathophysiology of diabetic foot lesions In: Clinical Diabetes Mellitus. A Problem-oriented Approach. John KD (Edit) Thieme, Third Edition, Chapter 31, pp 581-598.

Lockwood DH, Lipsky JJ, Meronk F, East LE (1977). Actions of polyamines on lipid and glucose metabolism of fat cells. *Biochem Bioph Res Co* 44, 601-607.

LoGerfo FW, Coffman JD (1984). Current concepts: Vascular and microvascular disease of the foot in diabetes: Implications for foot care. *N Engl J Med* 311:1615-1619.

Loots MAM, Lamme EN, Leegelaar J, Mekkes JR, Bos JD, Middelkoop E (1995). Difference in filtrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. *J Invest Dermatol* 104: 850-857.

Lopez-Virella MF, Stone P, Ellis S, Colwell JA (1977). Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods. *Clin Chem* 23, 882-884.

Lovaas E (1997). Antioxidative and metal-chelating effects of polyamines. *Adv Pharmacol* 38, 119-149.

Lowry DH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275

Luscher TF (1990). Imbalance of endothelium-driven relaxing and contracting factor. A new concept of hypertension? *Am J Hypertens* 3:317-330.

Maisonpierre PC (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for TIE2 that disrupts *in vivo* angiogenesis. *Science*; 277:55.

Marcinkiewiicz J, Grabowska A, Lauterbach R (2000). Differential effects of pentoxifylline, a nonspecific phosphodiesterase inhibitor, on the production of IL-10, IL-12, p40 p35 subunits by murine peritoneal macrophages. *immunopharmacology* 49: 335

Martin-Sanz P, Hopewell R, Brindley DN (1985). Spermine promotes the translocation of phosphatidate phosphohydrolase from the cytosol to the microsomal fraction of rat liver and it enhances the effects of oleate in this respect. *FEBS Lett* 179, 262-266.

Matsuda T, Morishita E, Jokaji H, Asakura H, Saito M, Yoshida T, Takemoto K (1996). Mechanism on disorders of coagulation and fibrinolysis in diabetes. *Diabetes* 45: 109S-110S.

Mayfield JA, Reiber GE, Sanders LJ, Janisse D, Pogach LM (1998). Preventive foot care in people with diabetes. *Diabetes Care* 21:2161-2177.

Mazzanti L, Rabini RA, Fumelli P, Martarelli D, Staffolani R, Salvolini E, Curatola G (1997). Altered platelet membrane dynamic properties in type I diabetes. *Diabetes* 46: 2069-2074.

McMahon M, Rizza R (1996). Nutrition support in hospitalized patients with DM. *Mayo Clin Proc* 71: 587-594

McNeely MJ, Bokyo EJ, Ahroni JH (1995). The independent contributions of diabetic neuropathy and vasculopathy in foot ulceration: How great are the risks? *Diabetes Care* 18:216-219.

Menchini M, Meschi F, Lambiase R, Puzzovio M, Del Guercio MJ, Chiumelo G (1980). C-Peptide response to arginine stimulation in diabetic children. *J Pediatr* 96: 362-366

Méndez JD (1989). Poliaminas. En: Bioquímica e Inmunología. Vol. II Hicks JJ y Díaz-Zagoya CC (Eds) Facultad de Medicina, UNAM. pp. 365-385.

Méndez JD (1989). Polyamines and human reproduction. In: The Physiology of Polyamines. Vol.1. Bachrach, U and Heimer Y (eds). C.R.C. Press, Inc., Florida, U.S.A. pp 23-36.

Méndez JD, Arreola MA (1992). Effect of L-arginine on pancreatic arginase activity and polyamines in alloxan treated rats. *Biochem Int* 28:569-575.

Méndez JD, Balderas F (2001). L-arginine effect and lipoprotein metabolism in rats with induced diabetes. *Biochimie* May; 83:453-458.

Méndez JD, Balderas FG, Corona de la Peña N, Morales ME, Palomar MM, De Haro HR (2000). La investigación en DM y aterosclerosis. Efecto de la L-arginina y las poliaminas. En: Aguirre GH (ed): Actualidades Médico-Quirúrgicas Vol II. Editorial Prado, S.A. de C.V. México, D.F. pp 277-298. ISBN -968-6899-34-0.

Méndez JD, Ramos HG (1994). Animal models in diabetes research. *Arch Med Res*, 25:367-75.

Méndez JD, Zarzoza E (1997). Inhibition of platelet aggregation by L-arginine and polyamines in alloxan treated rats. *Biochem Mol Biol Int* 43:311-318.

Metha SS, Suzuki S, Glick HA, Schulman KA (1999). Determining an episode of care using claims data: diabetic foot ulcer. *Diabetes Care* 22: 1110-1115.

Morgan BP (1995). Complement Regulatory molecules: application to therapy and transplantation. *Immunol Today* 16:257-259.

Morgan DML, Coade SB, Person JD (1990). Polyamines stimulate calcium uptake by human vascular endothelial cells. *Biochem Soc T* 18:1080-1084.

Morgan DO (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* 274:131.

Muncuoglu KY, Ingber A, Gilead L, Stessman J, Friedmann R, Schulman H, Bichucher H, Ioffe-Uspensky I, Miller J, Galun R, Raz I (1998). Maggot therapy for the treatment of diabetic foot ulcer. *Diabetes Care* 21: 2030-2031

Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JM (1998). Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 101: 2567-2578.

Nagy Z, Sipka R, Ocsovski I (1999). Suppressive effect of pentoxifylline on natural killer cell activity experimental and clinical studies. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 359: 228.

Narita I, Border WA, Ketteler M, Ruoslahti E, Noble NA (1995). L-arginine may mediate the therapeutic effects of low protein diets. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4552-4556.

Nathan C (1997). Inducible oxide synthase. *J Clin Invest* 100:2417.

National Diabetes Data Group, (1997). Classification and diagnosis of DM and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 28:1029-1057.

Nogowski L, Nowak KW (1986). Arginine, administered in various ways, as a stimulator of insulin secretion in the rabbit. *Horm Metab Res* 18, 730-733.

Nyström L, Dahlquist G, Ostman J (1992). Risk of developing insulin-dependent DM (IDDM) before 35 years of age: Indications of climatological determinants for age at onset. *Int Epidemiol* 21:352-358.

Ollendorf, DA, Kotsanos J, James G, Wishner WJ, Friedman M, Cooper, T, Bittoni, M, Oster G (1998). Potential economic benefits of lower-extremity amputation prevention strategies in diabetes. *Diabetes Care*; 21:1240-1245.

Paavonen K, Poulakkainen P, Jussila L, Jahkola T, Alitalo K (2000). Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *Am J Pathol* 156: 1499-1504.

Palomar-Morales M, Baiza LA, Verdín-Terán L, Román-Ramos R, Altamirano-Lozano M y Méndez JD (1998). Fetal development in alloxan-treated rats. *Reproductive Toxicology* 12:659-665.

Pecoraro RE, Reiber GE, Burgess EM (1990). Pathways to diabetic limb amputation: Basis for prevention. *Diabetes Care*;13:513-521.

Pegg A (1986). Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes, *Biochem J* 234: 249-262,

Pegg A, McCann PP (1982). Polyamine metabolism and function, *Am J Physiol*, 2 y 3: C212-C221.

Persson L, Heby O (1990). Molecular genetic of polyamines synthesis in eukaryotic cells. *Elsevier Science Publisher. LTD April*, 15:153-158.

Piaggese A, Viacava P, Rizzo L, Naccarato G, Baccetti F, Romanelli M, Zampa V, Del Prato S (2003). Semiquantitative analysis of the histopathological features of the neuropathic foot ulcer. *Diabetes Care* 26: 3123-3128.

Pinzur MS (1999). American orthopaedic foot and Ankle Society Diabetic Shoe Survey. *Diabetes Care*; 22: 2099-2100.

Pittet D, Wyssa B, Herter-Clavel C, Kursteiner K, Vaucher J, Lew PD (1999). Outcome of diabetic foot infections treated conservatively: A retrospective cohort study with long-term follow up. *Arch Intern Med* 159: 851-856.

Potter PJ (1998). Watch your step! *Can Med Ass J* 159:218-219.

Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S (1987). Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*; ii: 1057-1058.

Rahbar S, Natarjan R, Yernei K (2000). Evidence that oliglitazone, metformin and pentoxifylline are inhibitors of glycation. *Clin Chim Acta* 301: 65.

Ramani A, Kundaje GN, Nayak MN (1993). Hemorheologic approach in the treatment of diabetic foot ulcer. *Angiology* 44:623.

Redmond AF, Rothberg S (1978). Arginase activity and other cellular events associated with epidermal hyperplasia. *J. Cell. Physiol* 94:99-104.

Reiber GE, Bokyo EJ, Smith DG (1995). Lower extremity foot ulcers and amputations in diabetes. In Harris M.I., Cowie C.C., Stern, MP (eds): Diabetes in America, ed (DHHS Publication No. 95-1468). Washington, DC, US Government Printing Office, pp 409-428.

Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of DM (1997). *Diabetes Care* 20:1183-1197.

Risau W (1997). Mechanism of angiogenesis. *Nature*: 386:671-674.

Rivard A, Silver M, Fabre JE, Magner M, Kearney M, Isner JM (1997). Diabetes impairs angiogenesis in limb ischemia. *Circulation*; 96: 175-L

Roberts AB, Sporn MB (1990): The transforming growth factor- β . In Sporn MD, Roberts AB (eds): Handbook of Experimental Pharmacology: Peptide Growth Factors and Their Receptor. New York. Springer-Verlag p 419.

Rodan GA (1995). Osteopontin overview. *Ann N Y Acad Sci* 760:1.

Rodríguez, AC, Núñez JC (1971). La enzima arginasa: Bioquímica general, metabolismo, interés de la determinación sérica en patología hepática, *Rev. Clín. Esp.*, 123: 213-219.

Roseblum BI, Pomposelli FB Jr, Giurini JM, Gibbons GW, Freeman DV, Chrazan JS, Campbell DR, Habershaw GM, Lo Gerfo FW (1994). Maximizing foot-salvage by a combined approach to foot ischemic and neuropathic ulceration in patients with diabetes. A 5-year experience. *Diabetes Care* 17: 983-987.

Rosenbloom J, Abrams WR, Mecham R. (1993). Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *FASEB J* 7:1208-1218.

Ross R (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801-809.

Rossi F, Nistico G, De Marco G, Berrino L, Matera C, Bile G, Marmo E (1984). Cardiovascular effects of putrescine in dogs after systemic, intra-arterial vertebral and intraventricular injection. *Res Commun Chem Phat* 46:43-52.

Sage EH (1997). Pieces of eight: bioactive fragments of extracellular proteins as regulators of angiogenesis. *Trends Cell Biol* 7:182.

Salam AA (2000). The role of vascular surgery in the management of arterial insufficiency in diabetes. In: Clinical DM. A Problem-oriented Approach. John KD (Edit) Thieme, Third Edition, Chapter 34, pp. 611-620.

Salazar B (2000). Impacto socioeconómico de la diabetes mellitus. En: Diabetes Mellitus. Islas S y Lifshitz A (Eds), McGraw-Hill Interramericana, Segunda edición, cap. 3, pp.29-37.

Sánchez CJE, Islas AS (2000). Pie del diabético. En Islas AS, Lifshitz, GA (eds): Diabetes mellitus, 2a. Ed. McGraw-Hill Interamericana pp 277-293.

Schatteman GC, Hanlon HD, Jiao C, Dodds SG, Christy BA (2000). Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice. *J Clin Invest*; 106: 571-578.

Schindl A, Schindl M, Schon H, Knobler R, Havelec L, Schindl L (1998). Low-intensity laser irradiation improves skin circulation in patients with diabetic microangiopathy. *Diabetes Care* 21: 580-584.

Sekiguchi N, Sano T, Ono Y, Hashimoto T, Kuroki T, Iwashige K, Sako Y, Nawata H Umeda F (1996). Reduced prostacyclin-stimulating factor expression by vascular smooth muscle cells in diabetes. *Diabetes*; 45: 126A.

Shaper W, Buschmann I (1999). Collateral circulation and diabetes. *Circulation*; 99: 2224-2226.

Siedel J, Hagele EO, Ziegenhorn J, Wahlefeld AW (1983). Reagent for the enzymatic determination of serum total cholesterol with improved lipolytic efficiency. *Clin Chem* 29: 1075-1080.

Simics E, Mahunka M, Horkay I (2000). Effects of pentoxifylline on sunburn cell formation in a novel supravital human skin model. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 16: 278

Singer AJ, Clark RAF (1999). Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 341: 738-746

Smiell JM (1988). Clinical safety of becaplermin (rhPDGF-BB) gel. *Am J Surg* 176 (Suppl 2A): 68S-73S.

Sobening IA, Tertov VV, Orekhov AN (1996). Atherogenic modified C-LDL in diabetes. *Diabetes*; 45:35S-39S

Sporn MB, Roberts AB (1992). Autocrine secretion-10 years later. *Ann Intern Med* 117:408.

Stadelman KS, Digenis AG, Tobin GR (1998). Physiology and healing dynamics and chronic cutaneous wounds. *Am J Surg* 179 (suppl 2A): 26S-38S

Suzuki LA, Poot M, Gerrity RG, Bornfeldt KE (2001). Diabetes accelerates smooth muscle accumulation in lesions of atherosclerosis: Lack of direct growth-promoting effects of high glucose levels. *Diabetes* 50: 851-860.

Tabor CW, Tabor H (1984). Polyamines *Annu Rev. Biochem* 53:749-790.

Teyton L, O'Sullivan D, Dickson PW (1990). Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways. *Nature* 348:39-44,1990.

Thirumalai CH, Tseng CC, Tabata K, Fitzpatrick LR, Johnson LR (1987). Relationship between ornithine decarboxylase activity and gastric damage. *Am J Physiol* 253: G1-G6.

Timpl R, Brown JC (1994). The laminins. *Matrix Biol* 14:275-281.

Trinder P (1969). Determination of glucose in blood using oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem* 6, 24-25.

U.S. Department of health and human services (2003). Use of glycosylated hemoglobin and microalbuminuria in the monitoring of DM. *Agency for healthcare research and quality* 84: 1-6.

Van Gils CC, Wheeler LA, Mellstrom M, Brinton EA, Mason S, Wheeler CG (1999). Amputation prevention by vascular surgery and podiatry collaboration in high-risk diabetic and nondiabetic patients: The operation desert foot experience. *Diabetes Care*; 22: 678-683.

Verma AK, Boutwell, RK (1981). Characterization of arginase activity from mouse epidermis and its relation to ornithine decarboxylase induction by the tumor-promoting agent, 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate, *Bioph. Act.*, 677:189-189,

Veves A, Murray HJ Young MJ (1992). The risk of foot ulceration in diabetic patients with high foot pressure: A prospective study. *Diabetologia*;35:660-663.

Wagenknecht LE, Roseman JM, Herman WH (1991). Increased incidence of insulin-dependent DM following an epidemic of coxsackie virus B5. *Am J Epidemiol* 132:1024-1031.

Wagner FW Jr (1979). A classification and treatment program for diabetic, neuropathic, and dysvascular foot problems. *In: Instruccion Course Lectures*. St. Louis, CV Mosby, American Academy of Orthopaedic Surgeons, pp 143-165.

Wahlefeld AW (1979). Total lipids. En: Bergmeyer, Methoden der enzymatischen analyse. Bergmeyer HU (Ed) Verlag Chemie Weinheim, pp.1878.

Waltenberg J, Lange J, Kranz A (2000). Vascular endothelial growth factor a induced chemotaxis of monocytes is attenuated in patients with DM: a potential predictor for the individual capacity to develop collaterals. *Circulation*; 102:185-190

Wanchu A, Khullar M, Bhatnagar A (2000). Pentoxifylline reduce oxide production among patients with VIH infection. *Immunol Lett* 74: 121

Warnic GR, Knopp FH, Branson L (1990). Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald equation is adequate for classifying patients on the basis of Nationally Recommended Cutpoints. *Clin Chem* 36, 15-19.

Wieman TJ (1998). Clinical efficacy of becaplermin (rhPDGF-BB) gel. *Am J Surg* 176 (Suppl 2A): 74S- 79S.

Wu G, Morris SM (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 336: 1-17.

Yamagata K (1996). Mutations in the hepatocyte nuclear factor- 1 α gene in maturity onset diabetes of the young (MODY 1). *Nature* 384:485.

Yoon JW (1991). Role of viruses in the pathogenesis of IDDM. *Ann Med* 23:437-45.

Young MJ, Cavanagh PR, Thomas G (1992). The affect of callus removal on dynamic plantar foot pressures in diabetic patients. *Diabet Med* 9:55-57.

Zinker S, Rodkin M (1972). Collagen biosynthesis in the chick embryo, I. The source of free proline and collagen hydroxyproline. *Connect Tissue Res* 275-281.

PUBLICACIONES GENERADAS POR ESTA TESIS

Arana-Conejo V y cols. (2003) Fisopatología de las complicaciones vasculares del pie diabético, Gac Méd Méx 139 (3):255-264.

Arana V y cols. (2004). Healing of Diabetic Ulcers in L-arginine-treated patients. Biomedicine and Pharmacoterapy. (En prensa).



DIRECTIVA 2001

Presidente
Julio Sotelo

Vicepresidente
Juan Ramón de la Fuente

Secretario General
Emilio García Procel

Tesorero
Manuel Cardoso

Secretario Adjunto
Marco A. Zenteno

Editor
Luis Benítez Bribiesca

Coeditor
Fabio Salamanca Gómez

Consejo Editorial
Antonio Alarcón Segovia
María Elena Anzures
Hugo Aréchiga
Carlos Campillo
Alejandro Cravioto
Juan Ramón de la Fuente
Alberto Lifshitz
Rubén Lisker
Adolfo Martínez Palomo
Jaime Sepúlveda
Arturo Zárate

Comité Editorial
José María Cantú
Manuel de la Lita
Alfonso Escobar
Ana Flisser Steinbrun
Adolfo García Sainz
Luis González Bárcena
José Halabe Cheren
Carlos Ibarra
Roberto Kretschmer
Luis Ondarza Vidaurreta
Fidel Ramón
Roberto Rivera Luna
Guillermo Robles Díaz
Luis J. Ruiz Argüelles
Ramón Ruiz Maldonado
Salvador Said
José Ignacio Santos
Roberto Tapia Conyer
Alfredo Ulloa Aguirre
Fermín Valenzuela
Enrique Wolpert

Corrección Inglés
Maggie Brunner

Estilo
Guadalupe Campos Lara

Revisión
Silvia Rivas Vera

Diseño y Formación
María R. Fuentes Portagas
Liliana Vega Gutiérrez

Auxiliar Editorial
Dármén P. de la Calleja

26 de octubre del 2001

Dr. Victor Arana Conejo
Presente

Distinguido Dr. Arana Conejo:

Por la presente le comunicamos que el artículo: **"Fisiopatología de las complicaciones vasculares del pie diabético"** ha sido aceptado y aparecerá en el número 3 del volumen 139, (2003) de la *Gaceta Médica de México*.

Atentamente,

Dr. Luis Benítez Bribiesca
Editor

Dr. Fabio Salamanca Gómez
Co-editor.



Artículos Originales

- 199 Mediastinitis necrosante descendente. Resultados del tratamiento médico-quirúrgico en 17 casos. *Abel Pérez-R, y cols.*
- 205 Mapeo linfático y biopsia del ganglio centinela en pacientes con cáncer de mama. *José Francisco Gallegos-Hernández, y cols.*
- 209 Neuroblastoma: factores pronósticos y sobrevida. Experiencia en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI y revisión de la literatura. *Enrique López-Aguilar, y cols.*
- 215 *Tinea pedis* y onicomicosis en niños de una comunidad indígena Mazahua. *Julieta Ruiz-Esmenjaud, y cols.*
- 221 Prevalencia de fluorosis dental y caries en escolares de la ciudad de México. *María Lilia Adriana Juárez-López, y cols.*
- 227 Niveles altos de RNA VIH-1, asociados a glomerulopatía temprana, en pacientes con infección por VIH. *Héctor Manuel Madrigal-Jiménez, y cols.*

Simposio

- 234 Perspectivas del genoma humano en las malformaciones congénitas. *Antonio Fuente-del Campo. Coordinador*

- I. Aspectos moleculares del genoma humano. *Simón Kawa-Karasik*
- II. Aspectos clínicos en craneosinostosis. *Ma. Dolores Saavedra-Ontiveros, y col.*
- III. Aspectos nutricionales en las malformaciones craneofaciales. *Óscar C Thompson-Chagoyán, y col.*
- IV. Genes involucrados en craneosinostosis sindrómicas. *Laura Rosa Cornejo-Roldán*
- V. Tratamiento quirúrgico de las craneodisostosis. *Antonio Fuente-del Campo*
- VI. Resumen y conclusiones. *Antonio Fuente-del Campo*

Artículo de Revisión

- 255 Fisiopatología de las complicaciones vasculares del pie diabético. *Víctor Arana-Conejo, y cols.*

Ejercicio Clínico Patológico

- 265 Mujer de 57 años de edad con dolor torácico continuo, acompañado de tos, fiebre, disnea progresiva y pérdida de peso. *Margarita Salazar-Flores, y cols.*

Casos Clínicos

- 270 Histoplasmosis cutánea y SIDA. *Miguel Reyes, y cols.*
- 276 Ruptura hepática como complicación de enfermedad hipertensiva del embarazo y síndrome de HELLP. *Arturo Juárez-Azpiicueta, y cols.*

Historia y Filosofía de la Medicina

- 281 De academias y académicos. Bosquejo histórico. *Alfredo de Micheli-Serra*

Las Imágenes en Medicina

- 286 Enfermedad renal poliquistica. *Raúl Carrillo-Esper, y cols.*

Biología Molecular y Medicina

- 288 El papel de las técnicas de biología molecular en el diagnóstico y control de tuberculosis. *Verónica Loera-Castañeda, y cols.*

Bioética

- 291 Los médicos especialistas y el problema de honorarios y seguros médicos. *Octavio Rivero-Serrano, y cols.*

Opinión

- 294 La pretendida supremacía de lo natural. *Alberto Lifshitz*

Carta al editor y noticias

- 299 El dermatólogo ante la explosión televisiva de los productos milagrosos. *Juan Pablo Castanedo-Cázares, y cols.*



Volumen 139 No. 3

Mayo - Junio 2003

ISSN 0016 3813

www.medigraphic.com/gacetamedica/

Fisiopatología de las complicaciones vasculares del pie diabético

Víctor Arana-Conejo,* José Domingo Méndez-F.

Recepción 22 de agosto del 2001; aceptación 26 de octubre del 2001

Resumen

Objetivo: Revisar la literatura sobre los avances de la investigación científica en el área de las complicaciones vasculares del pie diabético con especial atención en las lesiones ulcerativas y los enfoques de su prevención y tratamiento.

Materiales: Se hizo una revisión de los artículos más relevantes sobre este tema publicados entre 1980 y 2001, que se obtuvieron por una búsqueda en la base de datos MEDLINE.

Resultados: Los mecanismos fisiológicos y bioquímicos que regulan el funcionamiento coordinado de la circulación sanguínea y de la pared vascular se encuentran alterados en los vasos sanguíneos grandes y pequeños en la diabetes mellitus. Las alteraciones vasculares observadas en los pacientes diabéticos dan lugar a la enfermedad vascular periférica que en estos pacientes muestra características especiales y que condicionan una mayor predisposición a lesiones ulcerativas en el pie con tendencia a la cronicidad y una menor capacidad de reparación que en pacientes no diabéticos. Estas lesiones con frecuencia terminan en amputación de la extremidad inferior. No obstante los esfuerzos realizados para prevenir y tratar estas complicaciones, no se han obtenido resultados satisfactorios.

Conclusiones: Es necesario investigar nuevos enfoques de prevención y tratamiento de las complicaciones vasculares del pie diabético que den especial importancia a los mecanismos fisiológicos y bioquímicos alterados de la diabetes mellitus.

Palabras clave: Pie diabético, complicaciones vasculares, lesiones ulcerativas, reparación, prevención, tratamiento.

Summary

Objective: To review the literature on vascular complications of diabetic foot with special interest in ulcerative lesions and their prevention and treatment.

Materials: Representative papers were selected through a computer MEDLINE search from 1980 to 2001.

Results: In diabetes mellitus, physiologic and biochemical mechanisms that regulate coordinated behavior between blood circulation and vessel wall are damaged, both in small and large vessels. Vascular alterations observed in patients with diabetes result in peripheral vascular disease with special characteristics in these patients that produce a greater tendency in diabetic than non-diabetic patients for chronic ulcerative lesions of foot and lesser capacity for healing. These lesions frequently result in amputation of the lower limb. Nevertheless efforts made for preventing and healing ulcerative complications, results are unsatisfactory.

Conclusions: It is necessary to research new methods for preventing and healing vascular complications of diabetic foot with special attention to improving damaged physiologic and biochemical mechanisms in diabetes mellitus.

Key words: Diabetic foot, vascular complications, ulcerative lesions, repair, prevention, treatment.

* Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Metabólicas 4º. Piso. Hospital de Especialidades. Centro Médico Nacional "Siglo XXI", IMSS. Tel. 56-27-69-00 ext. 1400.

Introducción

La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizado por hiperglucemia provocada por defectos de la insulina en su secreción, acción o ambas.¹ La hiperglucemia crónica de la diabetes se acompaña de daño, disfunción e insuficiencia a largo plazo de diversos órganos, en especial ojos, nervios, corazón, piel y vasos sanguíneos. Aunque la deficiencia de insulina puede mejorarse por medio de dieta, inyección de insulina o hipoglucemiantes orales, el tratamiento estándar no ha evitado el desarrollo de las diversas complicaciones crónicas.²

Un gran número de personas en todo el mundo son afectadas por diabetes mellitus. Se considera que en nuestro país actualmente existen aproximadamente 4 654,000 diabéticos, y en el año 2,025 habrá un promedio de 17 684,000.³ Una causa frecuente por la que los pacientes diabéticos solicitan consulta médica se relaciona con problemas del pie diabético, particularmente con la presencia de úlceras, las cuales si no son tratadas adecuadamente llevarán a la amputación del miembro afectado.⁴⁻²¹

Existen diversos estudios estadísticos sobre aspectos epidemiológicos de la diabetes mellitus, en relación con la frecuencia de úlceras del pie diabético, amputaciones y morbi-mortalidad que muestran ciertas diferencias entre ellos. Sin embargo, en todos ellos resalta su importancia por las consecuencias en la calidad de vida del paciente, días de hospitalización, morbi-mortalidad y el impacto económico para la sociedad.²² Los datos epidemiológicos indican que la mayoría de los pacientes desarrollan problemas del pie después de los 40 años y que estos problemas se incrementan con la edad.⁴ Se ha calculado que alrededor de 15% de los individuos con diabetes mellitus desarrollará úlceras del pie, de las cuales 15-20% requerirán amputación de la extremidad inferior. Se ha estimado que de ellos hasta dos tercios experimentarán una segunda amputación ipsilateral o contralateral, dentro de los 12 meses posteriores a la primera amputación. De todas las amputaciones relacionadas con diabetes, 70-80% son precedidas por úlceras crónicas.^{5,23}

En un estudio de registro de autopsias, se encontró que la gangrena había sido la causa de muerte en el 21% de pacientes diabéticos y que esta causa de muerte fue de 53 a 71 veces más frecuente en diabéticos que en no diabéticos.¹⁷ En estudios hospitalarios, la enfermedad vascular periférica puede alcanzar hasta el 25% de las admisiones con estancias generalmente muy largas.¹⁷ Cinco años después de una amputación inicial, 28-51% de diabéticos amputados han sufrido una segunda amputación y hasta dos tercios de estos pacientes muere en ese lapso.²³

No obstante los esfuerzos educativos y preventivos realizados por diversos grupos de clínicos para reducir la frecuencia de presentación de úlceras del pie diabético y las amputaciones de extremidades inferiores,^{4,5,7,11,12,14,15,21} no se ha alcanzado la meta de disminuir en un 40% la frecuencia de amputaciones en los Estados Unidos para el año 2000 y la tendencia observada actualmente es hacia la mayor prevalencia de diabetes mellitus y hacia un aumento en las proporciones y costos de las amputaciones como consecuencia de las úlceras del pie diabético.²¹

Es poco frecuente que la enfermedad vascular periférica sea el evento precipitante de las úlceras del pie diabético; sin embargo, juega un papel primordial en la curación de la herida y el desarrollo de la gangrena y es un factor contribuyente para la mitad de las amputaciones.⁷ No obstante que el evento fundamental o desencadenante de la úlcera es frecuentemente el trauma, la enfermedad vascular periférica es la base subyacente de la fisiopatología de esta complicación del pie diabético. Incluso cuando la patogénesis de la úlcera es la neuropatía, se ha postulado una etiología vascular para la neuropatía.²⁴

La reparación de las úlceras del pie diabético implica una secuencia de acontecimientos que van desde la inflamación inicial, la llegada de las plaquetas al sitio de la herida y la consiguiente liberación de factores plaquetarios, el reclutamiento de los macrófagos que también liberan factores de crecimiento que causan migración de células endoteliales y su proliferación en el sitio de la herida, estimulando la angiogénesis, hasta la síntesis de fibroblastos y colágena.²⁵

Aunque ha habido avances en el tratamiento para la diabetes mellitus, el estado actual de las investigaciones parece indicar que debido a la heterogeneidad de las enfermedades que están asociadas en la diabetes, tendremos que enfrentarnos todavía durante mucho tiempo con las complicaciones del pie diabético. Se han intentado diversos tipos de tratamientos y estrategias para la prevención de las complicaciones con resultados no concluyentes. En este artículo describimos los procesos vasculares alterados en la diabetes mellitus, los mecanismos fisiológicos y bioquímicos implicados en estos procesos, y su importancia para la patogénesis de las complicaciones del pie diabético.

Se describe brevemente sobre los tratamientos actuales y sobre los estudios que a este respecto estamos realizando en nuestro laboratorio.

Mecanismos fisiológicos y bioquímicos

Los mecanismos fisiológicos y bioquímicos implicados en el desarrollo de las complicaciones de la diabetes mellitus incluyen anomalías hematológicas que

podrían conducir a una deficiente oxigenación tisular. Entre éstas están: agregación eritrocitaria incrementada con aumento de la microviscosidad y deformabilidad disminuida; niveles incrementados de hemoglobinas glicadas cuya afinidad por el oxígeno se ve alterada y niveles de 2,3 difosfoglicerato (2,3-DPG) disminuidos;² anormalidades en la función de las plaquetas, incluyendo adhesividad aumentada y producción acelerada de derivados trombogénicos de prostaglandinas²; y anormalidades en las proteínas plasmáticas y en los factores de la coagulación.^{2,17,26}

Se ha observado incremento de la agregación eritrocítica en la sangre de pacientes diabéticos y se ha postulado que este fenómeno puede contribuir a los cambios microvasculares obliterativos en la retina. La deformabilidad de los eritrocitos medida por su capacidad para pasar a través de poros de 5 micras está notablemente disminuida en la diabetes. Puesto que los eritrocitos deben atravesar capilares mucho más pequeños que su propio diámetro, esta deformabilidad disminuida puede perjudicar la perfusión rápida y homogénea dentro de la microcirculación.²

En hemolisados normales se ha observado que contienen varios componentes menores de hemoglobina además del componente mayor Hb Ao. Las hemoglobinas menores juntas constituyen un 5-10 % del total en eritrocitos de adultos normales. En pacientes diabéticos se han observado elevaciones del doble al triple de estos componentes menores: Hb A1a, Hb A1b y Hb A1c. La Hb A1a se ha separado en dos componentes: Hb A1a1 y Hb A1a2. Se ha postulado que estas cuatro hemoglobinas cargadas negativamente están glicadas con un carbohidrato presente en la cadena beta. Adicionalmente al carbohidrato, la Hb A1a1 y la Hb A1a2 contienen fosfato.²

Comparadas a la Hb Ao, la Hb A1a1 y la Hb A1a2 tienen afinidad baja por el oxígeno, la Hb A1b tiene una afinidad elevada mientras que la Hb A1c tiene una afinidad moderadamente alta. La remoción del fosfato incrementa las afinidades de Hb A1b, Hb A1c y Hb Ao, mientras que las afinidades de Hb A1a1 y Hb A1a2 permanecen bajas. Se piensa que el 2,3-DPG (derivado del metabolismo de la glucosa en los glóbulos rojos) juega un papel regulatorio importante en el intercambio de oxígeno por la hemoglobina. Los niveles elevados de 2,3-DPG disminuyen la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, incrementando así la liberación de oxígeno hacia los tejidos. Sin embargo, aún en presencia de altas concentraciones de fosfato orgánico todas las glicohemoglobinas están saturadas al 50% con oxígeno a presiones parciales en las que la Hb Ao ya ha cedido la mayor parte de su oxígeno. En diabéticos, puede coexistir una deficiencia relativa de 2,3-DPG con niveles elevados de glicohemoglobina durante periodos de concentración

cambiante de glucosa sanguínea y esto puede resultar en una liberación disminuida de oxígeno hacia tejidos críticos.² Se ha calculado que por cada 1% de reducción en la concentración de la Hb A1c hay un 35% de reducción en la enfermedad microvascular.²⁷

Respecto a las proteínas plasmáticas y factores de la coagulación se han encontrado en pacientes diabéticos niveles elevados de glicoproteínas, fibrinógeno, haptoglobina, lipoproteína(a), lipoproteína beta, ceruloplasmina y macroglobulina alfa 2. Estos cambios, particularmente el fibrinógeno y la haptoglobina elevadas aumentan la viscosidad plasmática hasta en 16% incrementando así la resistencia al flujo sanguíneo. También se ha informado el incremento de los factores de la coagulación V, VII, VIII, IX, X y XI, así como un aumento en el complejo trombina-antitrombina (TAT) en el plasma y niveles disminuidos de activador del plasminógeno con activación del sistema fibrinolítico en pacientes diabéticos, lo cual propicia la especulación de que un estado de hipercoagulabilidad podría estar implicado en la evolución de las complicaciones vasculares.^{2,17,26}

Enfermedad vascular periférica

La enfermedad vascular de los grandes vasos puede ser debida en parte a anormalidades en los lípidos plasmáticos y quizá también a cambios en la composición y metabolismo de la pared arterial. La deficiencia de insulina puede influenciar el avance de la aterosclerosis a través de mecanismos patológicos sinérgicos que involucran dislipidemia, productos finales de glicación avanzada (AGEs), disfunción endotelial, función plaquetaria alterada y anormalidades en la función arterial.^{2,4,17,28-32}

Dislipidemia

Las anormalidades en el metabolismo de lípidos y lipoproteínas se asocian con aterosclerosis en no diabéticos, y la presencia de elevaciones, aún moderadas, de lípidos plasmáticos por muchos años podría ser un factor contribuyente importante para el desarrollo de macroangiopatía diabética.² Desde hace tiempo se ha reconocido que los niveles de colesterol y triglicéridos plasmáticos se encuentran elevados en pacientes diabéticos, particularmente cuando hay un pobre control metabólico. Recientemente se estableció que los niveles plasmáticos de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de lipoproteínas de baja densidad (LDL) están elevados, mientras que los de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) están disminuidos.¹⁷ Se ha puesto particular énfasis en el estudio de las LDL y el papel que juegan en la aterogénesis acelerada en el paciente

diabético tanto en la forma de LDL glicada como en la de LDL oxidada.^{17,28,29,31}

AGEs. Se ha propuesto que estos productos de glicación avanzada contribuyen a la patogénesis de las complicaciones diabéticas.³³ Se ha sugerido que pueden inducir disfunción endotelial^{30,32} y que pueden ser un factor contribuyente en la patogénesis de la aterosclerosis acelerada en los pacientes diabéticos interactuando con receptores de los macrófagos y las células endoteliales e induciendo cambios que promueven sobreproducción de matriz y trombosis focal.⁴

Disfunción endotelial

Se caracteriza por niveles elevados de factor de Von Willebran, disminución de la síntesis de prostaciclina y de inhibidores del activador de plasminógeno y disminución de la liberación de lipoprotein lipasa por las células endoteliales. Es muy probable que estos cambios conduzcan al desarrollo de la macroangiopatía diabética.^{17,34}

Función plaquetaria alterada

Las plaquetas de los pacientes diabéticos liberan cantidades elevadas de prostanoides estimulantes de agregabilidad como el tromboxano. Además ocurren interacciones plaquetas-plasma con proteínas plasmáticas, incluyendo LDL glicada, complejos inmunes y fibrinógeno. La sobrevivencia de las plaquetas está acortada y la velocidad de recambio es rápida. Las plaquetas liberan factor de crecimiento derivado de plaquetas que promueve la proliferación de células musculares lisas.¹⁷ También se ha sugerido que una organización alterada de la membrana plasmática de las plaquetas caracterizada por una composición anómala de los lípidos podría alterar la respuesta plaquetaria a los estímulos involucrados en la patogénesis de la macroangiopatía diabética.³⁵

Anormalidades en la función arterial

Observaciones secuenciales de la patología de la pared arterial en el desarrollo de aterosclerosis experimental han proporcionado un modelo conceptual para la patogénesis de la macroangiopatía, la hipótesis de respuesta al daño. En este modelo, el evento inicial es el daño al endotelio de la íntima arterial. El incremento resultante en la permeabilidad de la barrera endotelial permite a los componentes sanguíneos entrar al espacio subendotelial, lo cual crea un área de descamación focal. La descamación focal permite a las plaquetas circulantes contactar con el subendotelio. Estas plaquetas adherentes liberan factores que estimulan la proliferación focal de células musculares lisas. El depósito excesivo de lípidos y la formación de tejido conectivo da como

resultado final una placa ateromatosa madura. Sin embargo, en individuos normales, el proceso probablemente es reversible en una etapa temprana. En hiperlipidemia y quizá en diabetes, sin embargo, la reversión de las lesiones tempranas es impedida por el daño continuo o repetido. Las interacciones de las plaquetas con las estructuras subendoteliales pueden ser aumentadas por la adhesividad elevada, la hiperagregabilidad y la producción acelerada de derivados trombogénicos de las prostaglandinas. La actividad disminuida de prostaciclina en la pared arterial diabética puede ser un factor contribuyente posterior.² Además, puede ocurrir acumulación de AGEs en la pared vascular dándole mayor rigidez y comprometiendo su capacidad de adaptación a los cambios en el flujo sanguíneo.¹⁷ Aunado a lo anterior, los vasos sanguíneos de los pacientes diabéticos se caracterizan por la presencia de cantidades elevadas de tejido conectivo como fibronectina, colágena y glucoproteínas así como cantidades elevadas de calcio en la túnica media de la pared vascular. Estos cambios conducen a la pérdida de la elasticidad de la pared arterial. Las grandes arterias responden a los cambios en el flujo sanguíneo ajustando su diámetro interno para el suministro sanguíneo a los tejidos. El principal mediador de este mecanismo dependiente del flujo es el óxido nítrico. El paciente diabético se caracteriza por alteración de la vasodilatación mediada por la insulina y este mecanismo puede contribuir a la acción disminuida de la insulina en estas condiciones clínicas. La calcificación de la túnica media de la pared arterial se ha utilizado como predictor de riesgo para amputación de extremidad inferior en pacientes diabéticos.³⁶

Aspectos clínicos de la enfermedad vascular periférica

Los factores de riesgo para la presentación de la enfermedad vascular periférica se mencionan a continuación: edad, factores genéticos, tiempo de duración de la diabetes, tabaquismo, presión sanguínea sistólica, presión sanguínea diastólica, niveles de colesterol y de triglicéridos, control de la hiperglucemia, hiperinsulinemia y obesidad.¹⁹ Además, existen diferencias en la forma de presentación entre los pacientes diabéticos y no diabéticos como se muestra en el cuadro I.

Pie diabético

Dentro de las complicaciones de la diabetes, la prevención y el cuidado de las complicaciones diabéticas del pie representan un desafío mayor para el médico. La neuropatía, la infección, la deformidad y la isquemia son graves amenazas para el pie diabético y para la calidad funcional total del paciente diabético. Los costos asociados con el cuidado adecuado de estos problemas repre-

sentan un impacto económico significativo para los sistemas de salud.²² El manejo del pie diabético requiere un acercamiento multidisciplinario que se dirija a los problemas componentes de los sistemas nervioso, vascular, esquelético, inmune y tegumentario.³⁷

En presencia de neuropatía o isquemia, la secuencia de un trauma menor (evento desencadenante) que conduce a ulceración cutánea y falla de la curación de la herida es una causa frecuente de amputaciones de las extremidades inferiores en pacientes diabéticos.³⁸ Tanto la neuropatía como la vasculopatía son importantes factores de riesgo para el desarrollo de úlceras de pie diabético.³⁹ La ausencia del reflejo del tendón de Aquiles, insensibilidad del pie y tensión de oxígeno transcutánea de menos de 30 mm de Hg son predictores independientes de úlceras del pie.³⁹

Cuadro I. Diferencias de la enfermedad vascular periférica en diabéticos y en no diabéticos

	Diabético	No diabético
Clinica	Más común	Menos común
	Más jóvenes	De más edad
	Más rápida	Menos rápida
Hombre/Mujer	H=M	H>M
Oclusión	Multisegmentaria	Segmentaria
Vasos adyacentes	Involucrados	No involucrados
Vasos colaterales	Involucrados	Normales
Extremidades inferiores	Ambas	Unilateral
Vasos afectados	Tibiales	Aorta
	Perineos	Iliaca
		Femoral

Úlceras

La isquemia puede ser la causa de úlceras y gangrena en el paciente diabético, y la incidencia de enfermedad vascular periférica aterosclerótica está incrementada en pacientes con diabetes. La enfermedad vascular en pacientes diabéticos ocurre a una edad más joven y tiene patrones más difusos a través de la extremidad inferior.^{37,40} Aunque mucho se ha avanzado acerca del concepto de enfermedad de los vasos pequeños,^{41,42} no se ha identificado de manera concluyente una lesión que en el nivel subarteriolar correlacione con niveles disminuidos de flujo y ulceración.³⁷

El pie debe resistir de manera cotidiana una tremenda cantidad de fuerzas repetitivas, compresivas y de roce. La ulceración resulta de la presión repetitiva que excede el umbral de tolerancia de los tejidos blandos y conduce a la destrucción mecánica de los tejidos.⁴³ Las ulceraciones plantares son secundarias a la presión de

soporte del peso al permanecer en pie o caminar, mientras que las ulceraciones laterales, mediales o dorsales casi siempre son resultado de presión del zapato. Las ulceraciones no ocurren con un patrón aleatorio sobre o bajo el pie, más bien se encuentran en áreas de distribución de alta presión. El pie diabético responde a la presión excesiva con la formación de callos, los cuales pueden incrementar la presión hasta en un 30%.⁴⁴ La mayoría de las úlceras plantares del pie diabético se localizan bajo las cabezas metatarsales.^{44,45} Las ulceraciones del antepié ocurren frecuentemente sobre la parte plantar media del dedo grueso, bajo las cabezas metatarsales y sobre el dorso de los dedos de garra. Otras localizaciones comunes incluyen las prominencias del dedo medio.⁴⁰

Existe un sistema de clasificación desarrollado por Wagner⁴⁶ para la estadificación de las úlceras del pie diabético, que ha sido ampliamente aceptado (Cuadro II).

Cuadro II. Estadificación de úlceras de piel

Grado 0:	las úlceras tienen la piel intacta.
Grado 1:	las úlceras son superficiales con tejido subcutáneo expuesto.
Grado 2:	las úlceras tienen una extensión más profunda.
Grado 3:	la ulceración implica la formación de absceso u osteomielitis.
Grado 4:	las úlceras involucran gangrena parcial del antepié.
Grado 5:	las úlceras involucran gangrena extensa.

Angiogénesis

La formación de vasos sanguíneos involucra dos procesos: 1. La vasculogénesis, en la que los precursores de las células endoteliales, llamados angioblastos, forman la red vascular primitiva durante el desarrollo embrionario, y 2. La angiogénesis, en la que los vasos preformados generan brotes o retoños capaces de formar nuevos vasos.⁴⁷ Como la angiogénesis es un proceso importante y esencial para la inflamación crónica y la fibrosis, para el crecimiento tumoral y para la formación de una circulación colateral, se han realizado muchos trabajos dirigidos a descubrir los mecanismos que regulan la formación de nuevos vasos sanguíneos.⁴⁸ Actualmente se ensayan tratamientos proangiogénicos y antiangiogénicos.

El desarrollo de nuevos vasos sanguíneos durante la angiogénesis requiere de varias etapas:⁴⁹

1. La degradación proteolítica de la membrana basal del vaso progenitor, para que pueda formarse un retoño capilar y la consecutiva migración celular.
2. Migración de las células endoteliales hacia el estímulo angiogénico.

3. Proliferación de las células endoteliales, inmediatamente detrás del borde de avance de las células que migran.
4. Maduración de las células endoteliales, que incluye también a la inhibición del crecimiento y la remodelación en forma de tubos capilares.
5. Reclutamiento de las células periendotheliales (incluidos los pericitos de los pequeños capilares y las fibras musculares lisas de los vasos más gruesos) que habrán de servir de sostén a los tubos endoteliales.

Factores de crecimiento y sus receptores

Aunque hay muchos factores de crecimiento que poseen capacidad angiogénica, la mayoría de las pruebas indican que el factor de crecimiento vascular derivado de endotelio (VEGF) y las angiopoyetinas son las que desempeñan un papel especial en la vasculogénesis y la angiogénesis. Estos factores son secretados por muchas células mesenquimatosas y del estroma, sus receptores están en gran parte circunscritos al endotelio y contribuyen al desarrollo de los vasos durante la embriogénesis y la angiogénesis durante la vida adulta. Los estudios con embriones sugieren que al comienzo del desarrollo vascular, el VEGF se fija a uno de sus receptores (VEGF-R2) situado en los angioblastos y estimula la formación y proliferación de las células endoteliales.^{47,50} Después, la unión del VEGF a un segundo receptor (VEGF-R1) provoca la formación característica de los capilares. Las fases posteriores de la angiogénesis parecen estar reguladas por las angiopoyetinas (Ang1 y Ang2). La Ang1 interactúa con un receptor de las células endoteliales llamado Tie2 favoreciendo el reclutamiento de una serie de células periendotheliales que sirven para estabilizar o consolidar los vasos recién formados.⁵¹ La interacción Ang1/Tie2 sirve como mediadora del desarrollo vascular, haciendo que los tubos endoteliales elementales se conviertan en estructuras vasculares más elaboradas, y ayuda a mantener el endotelio en estado quiescente. En cambio, la Ang2 actúa también sobre la Tie2 y despliega un efecto opuesto dejando libres a las células endoteliales y volviéndolas más capaces de responder al estímulo de los factores de crecimiento como el VEGF o, si falta éste, los inhibidores de la angiogénesis.⁵²

El factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) es un potente factor angiogénico, pero el VEGF destaca por ser el factor de crecimiento más importante de los tejidos del adulto que experimenta una angiogénesis fisiológica (por ejemplo la del endometrio en proliferación), y de la angiogénesis patológica que se observa en la inflamación crónica, la curación de las heridas, los tumores y en procesos como la retinopatía de la prema-

durez. La expresión del VEGF es estimulada por algunas citocinas y factores de crecimiento (como TGF- β , PDGF, TGF- α) y especialmente por la hipoxia tisular que, desde hace mucho tiempo se ha asociado a la angiogénesis.⁵³

Proteínas de la matriz extracelular como reguladoras de la angiogénesis

Un elemento esencial de la angiogénesis es la movilidad y la migración dirigida de las células endoteliales. Estos procesos son controlados por varias clases de proteínas, entre las que destacan: las integrinas, especialmente la $\alpha v \beta_3$ que es esencial para la formación y mantenimiento de los vasos sanguíneos recién formados;⁵⁴ las proteínas de la matriz celular como la trombospodina 1, la SPARC y la tenascina C que desestabiliza las interacciones célula-matriz y por lo tanto favorece la angiogénesis⁵⁵ y las proteasas, como los activadores del plasminógeno y las metaloproteasas de la matriz que tienen importancia en los fenómenos de remodelación que ocurren durante la invasión endotelial.⁵⁶

Angiogénesis y diabetes mellitus

En los pacientes diabéticos está severamente alterado el desarrollo de la formación de vasos colaterales en respuesta a la isquemia. La respuesta de los monocitos en respuesta al factor endotelial de crecimiento vascular está atenuada. Existe evidencia de que la insulina juega un papel importante en la función del angioblasto o de la célula endotelial derivada del angioblasto. Podrían utilizarse angioblastos exógenos para aumentar la vascularización en pacientes diabéticos.⁵⁷⁻⁶⁰

Manejo y tratamiento del pie diabético

Las manifestaciones clínicas del pie diabético guardan relación con las alteraciones neuropáticas y vasculares. Las manifestaciones de insuficiencia arterial en las extremidades inferiores se clasifican en cuatro grados: 1. asintomático, 2. claudicación intermitente, 3. claudicación intermitente grave, además de dolor isquémico de reposo y 4. además de lo anterior, gangrena. Otros hallazgos son: hipotermia distal, llenado capilar retardado, atrofia de masas musculares en pierna, pérdida del vello, uñas gruesas e hiperemia reactiva. Es básico corroborar a la exploración física la ausencia de pulsos distales para establecer el probable sitio anatómico de obstrucción arterial. Esto puede ser determinado por métodos no invasivos tales como oscilometría y toma de presiones segmentarias con Doppler. De manera secundaria, puede agregarse una infección en el pie afectado, por lo que antes de iniciar el tratamiento conviene consi-

derar algunos factores que favorecen la infección en las extremidades inferiores del paciente diabético tales como: cambios en el pH cutáneo, alteración en la concentración de ácidos grasos, disminución o aumento en la humedad de la piel y lesiones micóticas en uñas, ortijos y espacios interortijos que son vía de entrada de las infecciones bacterianas, así como la isquemia (macrocirculación y microcirculación) que es el principal factor predisponente de infección.⁶¹

Para el manejo y tratamiento del pie diabético deben tomarse en consideración las siguientes medidas que serán individualizadas según el paciente:¹⁹

1. Evaluación del paciente: apariencia clínica, estadiificación de las lesiones.
2. Laboratorio y gabinete: cultivo, biopsia, rayos X, presencia de gas subcutáneo, descartar osteomielitis, evaluar el flujo sanguíneo.
3. Desbridación radical.
4. Control metabólico.
5. Antibioticoterapia temprana.
6. No mojar los pies.
7. Disminuir el edema.
8. No ejercer peso sobre la extremidad: inmovilización y reposo.
9. Mejorar la circulación: medicamentos hemorreológicos.

El efecto fundamental de los medicamentos hemorreológicos es favorecer la deformabilidad eritrocitaria en el capilar, disminuir la viscosidad sanguínea y tener un efecto antiagregante plaquetario. Su acción es sistémica y tienen como desventaja su costo elevado. Los de mayor uso son la pentoxifilina y el blufomedilo.⁶¹ Otros tratamientos que se han usado de forma experimental son: terapia de oxígeno hiperbárico,^{62,63} tratamiento con gusanos,⁶⁴ radiación láser de baja intensidad,⁶⁵ sustituto equivalente de piel humana,²⁵ líquido de silicón inyectado⁶⁶ y cirugía vascular reconstructiva de tipo bypass.⁶⁷

Investigaciones recientes han mostrado la existencia de sustancias que son eficaces antiagregantes plaquetarios,^{3,68,69} funcionan como secretagogos³ y tienen potentes efectos vasodilatadores, además de normalizar la dislipidemia y disminuir la glucemia en modelos experimentales de diabetes.^{3,70} Estas sustancias son la L-arginina y las poliaminas, de las cuales describiremos algunos antecedentes.

L-arginina

La L-arginina es un aminoácido básico que está implicado en varias vías metabólicas: La L-arginina es el precursor en la síntesis de poliaminas, moléculas que se sintetizan a partir de la ornitina, la cual a su vez se

produce por hidrólisis de la arginina catalizada por arginasa tanto en el hígado como en tejidos extrahepáticos.⁷¹ La L-arginina es también el precursor de la síntesis de óxido nítrico, el cual participa entre otros múltiples procesos fisiológicos en la regulación funcional de los vasos sanguíneos y tiene efectos sobre la función plaquetaria.³ Las poliaminas son un grupo de pequeñas moléculas alifáticas (no cíclicas) que poseen dos o más grupos amino en su estructura y juegan un papel muy importante en la regulación del crecimiento, proliferación y diferenciación celulares.³ La biosíntesis de las poliaminas se lleva a cabo a partir de la ornitina a través de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC).⁷² Es posible que el factor 1 de crecimiento parecido a la insulina juegue un papel en la activación de la ODC.⁷³ Las citocinas como el factor de crecimiento transformante b1 (TGF- β 1) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la interleucina-4 (IL-4) son inhibidores potentes de la síntesis de óxido nítrico (NO), sin embargo, poco se sabe de sus efectos sobre la expresión o actividad de arginasa.⁷³ Se ha observado en ratas Sprague-Dawley, a las que se les ha inducido diabetes con aloxana, que el tratamiento diario con L-arginina causa una normalización de la hiperglucemia y la dislipidemia del cuadro diabético inducido.⁷⁰

Se ha demostrado que las poliaminas putrescina, espermidina y espermina inhiben la agregación plaquetaria en sueros de conejos hipercolesterolémicos^{68,69} y restablecen también el nivel de glucosa y de lípidos séricos en ratas diabéticas.³ También se ha discutido el papel fisiológico de las poliaminas en el sistema reproductor⁷⁴ y se ha observado que la administración de poliaminas a ratas diabéticas gestantes previene parcialmente los efectos embriotóxicos de la diabetes mellitus.⁷⁵

Metabolismo de la L-arginina y citocinas en la reparación de heridas

Mucho del conocimiento actual sobre la regulación de citocinas, así como del metabolismo de la L-arginina se ha derivado de estudios sobre curación de heridas.⁷³

El TGF- β y el PDGF son promotores importantes de la curación normal de heridas. Ambas citocinas son liberadas inicialmente por desgranulación de plaquetas en sitios de daño tisular. Ya liberado el TGF- β es capaz de inducir su propia expresión y la de PDGF en las células residentes en el sitio del daño. Tanto el TGF- β como el PDGF son quimiotácticos potentes que posibilitan el flujo de macrófagos, neutrófilos y fibroblastos. Mientras que el PDGF promueve predominantemente la mitogénesis, el TGF- β es fibrogénico. El TGF- β induce la expresión de fibronectina, colágena y proteoglicanos *in vivo* e *in vitro*.

La aplicación exógena de TGF- β mejora significativamente la curación de la herida. Esto puede observarse usando aplicación tanto tópica como sistémica. La mejoría se refleja por aumento de la fuerza tensil, aumento en el contenido de colágena y formación de nuevos vasos sanguíneos en el tejido afectado. La aplicación de TGF- β también mejora la curación de la herida en una variedad de modelos animales tratados con glucocorticoides y expuestos a radiación.

La suplementación con L-arginina mejora la curación de la herida tanto en modelos animales como humanos. El aminoácido L-arginina el cual puede ser sintetizado a partir de la L-citrulina y L-aspartato, fue clasificado como "semi-esencial" hace más de 65 años. La base para esta clasificación fue la observación de que la L-arginina de la dieta es necesaria para el crecimiento óptimo en animales. La L-arginina también es crítica en situaciones de ayuno, daño o estrés.

Estudios realizados en animales, en pacientes y en voluntarios sanos han confirmado que la suplementación con L-arginina conduce a mayor resistencia de la herida y a aumento de contenido de hidroxiprolina y de colágena, características similares a las logradas con la administración de TGF- β . Se ha informado que las respuestas linfocitarias y la mitogénesis mejoraron con la suplementación con L-arginina. Es posible que los efectos benéficos de la suplementación con L-arginina en la curación de la herida estén asociados con la expresión alterada de citocinas.

La L-arginina ha sido investigada en modelos experimentales de curación de la herida. Las concentraciones del aminoácido y las actividades de las enzimas que lo metabolizan han sido medidas en el líquido de la herida. Los resultados han mostrado activación temprana de la vía generadora de NO y L-citrulina después de la herida, seguida por activación de la arginasa que se asocia con un descenso significativo en la concentración de L-arginina local y un aumento en la concentración de L-ornitina en el fluido de la herida. Se piensa que la actividad aumentada de arginasa en la curación de la herida proporciona L-ornitina que es el sustrato para la síntesis de poliamina y de L-prolina, y depleta la L-arginina del microambiente, suprimiendo de esa manera la vía L-arginina-NO potencialmente dañina. Así, es probable que los efectos benéficos de la suplementación con L-arginina en la reparación de la herida resulte de la disponibilidad aumentada de sustrato para la síntesis de poliaminas y colágena.⁷³

Otro mecanismo por el cual la L-arginina favorece la curación de la herida puede ser porque estimule la liberación de hormona del crecimiento. Estudios recientes sugieren que la vía de la L-arginina-NO está involucrada en la regulación de la liberación de la hormona hipofisiaria. La liberación aumentada de hormona del crecimiento puede conducir a la activación de la ODC. La

suplementación con L-arginina en la dieta falla para mejorar la curación de la herida en ratas hipofisectomizadas. Sin embargo, la infusión de una mezcla control de aminoácidos da como resultado niveles más altos de hormona del crecimiento pero disminuye la mejoría en la curación de la herida en comparación con la infusión de L-arginina. Así, la liberación aumentada de la hormona del crecimiento puede contribuir a los efectos benéficos de la suplementación con L-arginina en la reparación de la herida.⁷³

En conclusión, existe información sobre el efecto benéfico de la L-arginina en la reparación de heridas. Esta información ha sido obtenida fundamentalmente en animales sanos. Con base en los resultados que hemos obtenido de estudios previos sobre el efecto de la L-arginina en algunas de las complicaciones de la diabetes utilizando modelos experimentales, estamos en posibilidades de iniciar estudios sobre la reparación de lesiones ulcerativas, así como sobre su prevención en humanos.

Referencias

1. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997;20:1183-1197.
2. **Brownlee M, Cerami A.** The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Annu Rev Biochem* 1981;50:385-432.
3. **Méndez JD, Balderas FG, Corona de la Peña N, Morales ME, Palomar MM, De Haro HR.** La investigación en diabetes mellitus y aterosclerosis. Efecto de la L-arginina y las poliaminas. En: Aguirre GH (ed): *Actualidades Médico-Quirúrgicas Vol II*. Editorial Prado. S.A. de C.V. México, D.F. 2000 pp 277-298. ISBN -968-6899-34-0.
4. **Levin ME.** Preventing amputation in the patient with diabetes. *Diabetes Care* 1995;18(10):1383-1394.
5. **Ollendorf, DA, Kotsanos J, James G, Wishner WJ, Friedman M, Cooper, T, Bittoni, M, Oster G.** Potential economic benefits of lower-extremity amputation prevention strategies in diabetes. *Diabetes Care* 1998;21(8):1240-1245.
6. **Potter PJ.** Watch your step! *Can Med Ass J* 1998;159(3):218-219.
7. **Mayfield JA, Relber GE, Sanders LJ, Janisse D, Pogach LM.** Preventive foot care in people with diabetes. *Diabetes Care* 1998; 21(12):2161-2177.
8. American Diabetes Association. Preventive foot care in people with diabetes. *Diabetes Care* 1998;21(12): 2178-2179.
9. **Hill SL, Holtzman GI, Buse R.** The effects of peripheral vascular disease with osteomyelitis in the diabetic foot. *Am J Surg* 1999;177 (4):282-286.
10. **Pittet D, Wyssa B, Herter-Clavel C, Kursteiner K, Vaucher J, Lew PD.** Outcome of diabetic foot infections treated conservatively: a retrospective cohort study with long-term follow up. *Arch Intern Med* 1999;159(8):851-856.
11. **Armstrong DG, Stacpoole-Shea SB, Nguyen H, Har-kless LB.** Lengthening of the Achilles tendon in diabetic patients who are at high risk for ulceration of the foot. *J Bone Joint Surg Am* 1999;81-A(4):535-538.

12. **Van Gils CC, Wheeler LA, Mellstrom M, Brinton EA, Mason S, Wheeler CG.** Amputation prevention by vascular surgery and podiatry collaboration in high-risk diabetic and nondiabetic patients: the operation desert foot experience. *Diabetes Care* 1999;22(5):678-683.
13. **Ahroni JH, Boyko EJ, Forsberg RC.** Clinical correlates of plantar pressure among diabetic veterans. *Diabetes Care* 1999;22(6):965-972.
14. **Bloomgarden ZT.** The European Association for the Study of Diabetes Annual Meeting, 1998: Complications of diabetes. *Diabetes Care* 1999;22(8):1364-1370.
15. **Dargis V, Olga P, Jonushaite A, Vileikyte L, Boulton AJ.** Benefits of a multidisciplinary approach in the management of recurrent diabetic foot ulceration in Lithuania: A prospective study. *Diabetes Care* 1999;22(9):1428-1431.
16. **Pinzur MS.** American Orthopedic Foot and Ankle Society Diabetic Shoe Survey. *Diabetes Care* 1999;22(12):2099-2100.
17. **Colwell JA.** Peripheral vascular disease in diabetes mellitus. In: *Clinical Diabetes Mellitus. A Problem-oriented Approach.* John KD (Edit) Thieme, Third Edition, 2000, Chapter 30, pp 561-570.
18. **Coleman WC.** The diabetic foot. In: *Clinical Diabetes Mellitus. A Problem-oriented Approach.* John KD (Edit) Thieme, Third Edition, 2000, Chapter 31, pp 571-580.
19. **Levin ME.** Pathophysiology of diabetic foot lesions In: *Clinical Diabetes Mellitus. A Problem-oriented Approach.* John KD (Edit) Thieme, Third Edition, 2000, Chapter 31, pp 581-598.
20. **Hobgood E.** Conservative therapy of foot abnormalities, infections, and vascular insufficiency. In: *Clinical Diabetes Mellitus. A Problem-oriented Approach.* John KD (Edit) Thieme, Third Edition, 2000, Chapter 31, pp 599-609.
21. **Bloomgarden ZT.** American Diabetes Association 60th Scientific Sessions, 2000: The diabetic foot. *Diabetes Care* 2001;24(5):946-951.
22. **Metha SS, Suzuki S, Glick HA, Schulman KA.** Determining an episode of care using claims data: diabetic foot ulcer. *Diabetes Care* 1999;22(7):1110-1115.
23. **Reiber GE, Bokyo EJ, Smith DG.** Lower extremity foot ulcers and amputations in diabetes. In Harris M.I., Cowie C.C., Stern, M.P., et al (eds): *Diabetes in America*, ed. (DHHS Publication No. 95-1468). Washington, DC, US Government Printing Office, 1995, pp 409-428.
24. **Bloomgarden ZT.** European Association for the Study of Diabetes Annual Meeting, 1999: Complications of diabetes. *Diabetes Care* 2000;23(4):1423-1428.
25. **Brem H, Balledux J, Bloom T, Kerstein M, Hollier L.** Healing of diabetic foot ulcers and pressure ulcers with human skin equivalent: A new paradigm in wound healing. *Arch Surg* 2000;135(6):627-634.
26. **Matsuda T, Morishita E, Jokaji H, Asakura H, Saito M, Yoshida T, Takemoto K.** Mechanism on disorders of coagulation and fibrinolysis in diabetes. *Diabetes* 1996;45(3S):109S-110S.
27. **Donnelly R, Emslie-Smith A, Alistair M, Gardner I, Morris AD.** Vascular complications of diabetes. *Br Med J* 2000;320(7241):1062-1066.
28. **Sobening IA, Tertov VV, Orekhov AN.** Atherogenic modified LDL in diabetes. *Diabetes* 1996;45(3S):35S-39S.
29. **Bloomgarden ZT.** The 32nd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes: Macrovascular disease. *Diabetes Care* 1997;20(7):1198-1201.
30. **Bloomgarden ZT.** American European Association Annual Meeting, 1997: Endothelial dysfunction, neuropathy and the diabetic foot, diabetic mastopathy, and erectile dysfunction. *Diabetes Care* 1998;21(1):183-189.
31. **Devaraj S.** Low-density lipoprotein postsecretory modification, monocyte function, and circulating adhesion molecules in type 2 diabetic patients with and without macrovascular complications: The effect of tocopherol supplementation. *Circulation* 2000;102(2):191-196.
32. **Suzuki LA, Poot M, Gerrity RG, Bornfeldt KE.** Diabetes accelerates smooth muscle accumulation in lesions of atherosclerosis: Lack of direct growth-promoting effects of high glucose levels. *Diabetes* 2001;50(4):851-860.
33. **Méndez JD.** Productos finales de glicación avanzada y complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Gaceta Médica de México.* 2003;139(1):49-55.
34. **Sekiguchi N, Sano T, Ono Y, Hashimoto T, Kuroki T, Iwashige K, Sako Y, Nawata H, Umeda F.** Reduced prostacyclin-stimulating factor expression by vascular smooth muscle cells in diabetes. *Diabetes* 1996;45(2S):126A.
35. **Mazzanti L, Rabini RA, Fumelli P, Martarelli D, Staffolani R, Salvolini E, Curatola G.** Altered platelet membrane dynamic properties in type I diabetes. *Diabetes* 1997;46(12):2069-2074.
36. **Lehto S, Niskanen L, Suhonen M, Ronnema T, Laakso M.** Medial artery calcification: A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Biol* 1996;16(8):978-983.
37. **Laughlin RT, Calhoun JH, Mader JT.** The diabetic foot. *Am Acad Orthop Surg* 1995;3:218-225.
38. **Pecoraro RE, Reiber GE, Burgess EM.** Pathways to diabetic limb amputation: Basis for prevention. *Diabetes Care* 1990;13:513-521.
39. **McNeely MJ, Bokyo EJ, Ahroni JH.** The independent contributions of diabetic neuropathy and vasculopathy in foot ulceration: How great are the risks? *Diabetes Care* 1995;18:216-219.
40. **Brodsky JW.** Outpatient diagnosis and care of the diabetic foot. In Heckman J.D. (ed): *Instructional Course Lectures.* Park Ridge, Ill., American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1993, pp 121-131.
41. **Irwin ST, Gilmore J, McGrann S.** Blood flow in diabetics with lesions due to small vessel disease. *Br J Surg* 1988;75:1201-1206.
42. **LoGerfo FW, Coffman JD.** Current concepts: Vascular and microvascular disease of the foot in diabetes: Implications for foot care. *N Engl J Med* 1984;311:1615-1619.
43. **Brodsky J.** The diabetic foot. In Mann R.A., Coughlin M.J. (eds): *Surgery of the foot and Ankle*, 6th ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1993, pp 877-958.
44. **Young MJ, Cavanagh PR, Thomas G.** The affect of callus removal on dynamic plantar foot pressures in diabetic patients. *Diabet Med* 1992;9:55-57.
45. **Veves A, Murray HJ, Young MJ.** The risk of foot ulceration in diabetic patients with high foot pressure: A prospective study. *Diabetologia* 1992;35:660-663.
46. **Wagner FW Jr.** A classification and treatment program for diabetic, neuropathic, and dysvascular foot problems. In *Instructional Course Lectures.* St. Louis, CV Mosby, American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1979, pp 143-165.
47. **Risau W.** Mechanism of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-674.
48. **Folkman J, D'Amore PA.** Blood vessel formation: What is its molecular basis. *Cell* 1996;87:1153.

49. **Cotran RS, Kumar V, Collins T.** Reparación de los tejidos: proliferación celular, fibrosis y curación de las heridas. En: Robbins Patología estructural y funcional, capítulo 4, sexta edición, McGraw-Hill Interamericana, México, 2000, pp 110-120.
50. **Hanahan D.** Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 1997;277:48.
51. **Davis S.** Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996;87:1161.
52. **Maisonpierre PC.** Angiopoietin-2, a natural antagonist for TIE2 that disrupts *in vivo* angiogenesis. *Science* 1997;277:55.
53. **Dvorak HF.** Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hypermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029.
54. **Brooks PC.** Requirement of vascular integrin $\alpha v \beta_3$ for angiogenesis. *Science* 1994;264:569.
55. **Bornstein P.** Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *J Cell Biol* 1995;130:503.
56. **Sage EH.** Pieces of eight: bioactive fragments of extracellular proteins as regulators of angiogenesis. *Trends Cell Biol* 1997;7:182.
57. **Rivard A, Silver M, Fabre JE, Magner M, Kearney M, Isner JM.** Diabetes impairs angiogenesis in limb ischemia. *Circulation* 1997;96(8S):175-L.
58. **Shaper W, Buschmann I.** Collateral circulation and diabetes. *Circulation* 1999;99(17):2224-2226.
59. **Waltenberg J, Lange J, Kranz A.** Vascular endothelial growth factor α induced chemotaxis of monocytes is attenuated in patients with diabetes mellitus: a potential predictor for the individual capacity to develop collaterals. *Circulation* 2000;102(2):185-190.
60. **Schatteman GC, Hanlon HD, Jiao C, Dodds SG, Christy BA.** Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice. *J Clin Invest* 2000;106(4):571-578.
61. **Sánchez CJE, Islas AS.** Pie del diabético. En: Islas AS, Lifshitz, GA (eds): Diabetes mellitus, 2a. Ed. McGraw-Hill Interamericana 2000 pp 277-293.
62. **Faglia E, Favales F, Aldeghi A, Calia P, Quarantiello A, Oriani G, Michael M, Campagnoli P, Morabito A.** Adjunctive systemic hyperbaric oxygen therapy in treatment of severe prevalently ischemic diabetic foot ulcer: A randomized study. *Diabetes Care* 1996;19(12):1338-1343.
63. **Cianci P.** Consensus development conference on diabetic foot wound care: A randomized controlled trial does support use of adjunctive hyperbaric oxygen therapy. *Diabetes Care* 2000;23(6):873
64. **Muncuoglu KY, Ingber A, Gilead L, Stessman J, Friedmann R, Schulman H, Bichucher H, Ioffe-Uspensky I, Miller J, Galun R, Raz I.** Maggot therapy for the treatment of diabetic foot ulcer. *Diabetes Care* 1998;21(11):2030-2031-65. **Schindl A, Schindl M, Schon H, Knobler R, Havelec L, Schindl L.** Low-intensity laser irradiation improves skin circulation in patients with diabetic microangiopathy. *Diabetes Care* 1998;21(4):580-584.
66. **Van Schie C, Whalley A, Vileikyte L, Wignall T, Hollis S, Boulton A.** Efficacy of injected liquid silicone in the diabetic foot to reduce risk factors for ulceration: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Diabetes Care* 2000;23(5):634-638.
67. **Salam AA.** The role of vascular surgery in the management of arterial insufficiency in diabetes. In: Davidson JK (ed): Clinica Diabetes Mellitus. A Problem-Oriented Approach, 3rd ed. Thieme 2000. pp. 611-620.
68. **Corona de la Peña N, Sosa-Melgarejo JA, Méndez JD.** Aterosclerosis experimental. Cambios bioquímicos y vasculares. *Rev Med IMSS*, 1999;37(5):337-338.
69. **Méndez JD, Zarzoza E.** Inhibition of platelet aggregation by L-arginine and polyamines in alloxan treated rats. *Biochem Mol Biol Int*, 1997;43:311-318.
70. **Méndez JD, Balderas F.** Regulation of hyperglucemia and dyslipidemia by exogenous L-arginine in diabetic rats. *Biochimie* 2001 May; 83(5):453-458.
71. **Méndez JD, Arreola MA.** Effect of L-arginine on pancreatic arginase activity and polyamines in alloxan treated rats. *Biochem Int*, 1992;28:569-575.
72. **Méndez JD.** Poliaminas. En: Bioquímica e Inmunología. Vol. II Hicks JJ y Díaz Zagoya CC (Eds) Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México; 1989 pp 365-85.
73. **Ketteler M, Border WA, Noble NA.** Cytokines and L-arginine in renal injury and repair. *Am J Physiol* 1994;267(36):F197-F207.
74. **Méndez JD.** Polyamines and human reproduction. In: The Physiology of Polyamines. Vol.1. Bachrach, U and Heimer Y (eds). C.R.C. Press, Inc., Florida, U.S.A. 1989 pp 23-36.
75. **Méndez JD, Ramos HG.** Animal models in diabetes research. *Arch Med Res*, 1994;25:367-75.

MEDICINE PHARMACOTHERAPY

ng Editor : G Mathé (France)
s-in-chief : H Tapiero (France), KD Tew (USA), P O'Dwyer (USA)

J Méndez
Medical Research Unit in Metabolic
Diseases
Twentieth Century National Medical
Center
Mexican Institute of Social Security
P.O. Box A-047
Mexico City 06703
Mexico

03-mai-04

Ref : MS 24038 "Healing of diabetic foot ulcers in L-arginine-treated patients"

Dear Doctor J Méndez.

Thank you for your recent submission of the above manuscript. I am pleased to inform you that it has been accepted for publication in BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY. I anticipate the appearance of this paper in n° 10 issue 2004.

You should hear directly from the publisher in a not too distant future. Of course, should you have other manuscripts or have colleagues who wish to submit manuscripts, I would like to emphasize that the journal is in need of continued submission of quality manuscripts

Sincerely Yours,

H. Tapiero, Editor in Chief



Editorial Secretary : MC Feuillet - Hôpital Paul-Brousse, Bât André Lwoff
14 av Paul-Vaillant-Couturier, 94800 Villejuif, France

tel: 01 40 50 44 53 fax: 01 47 38 80 07

Healing of Diabetic Foot Ulcers in L-Arginine-treated Patients

Victor Arana¹, Yolanda Paz², Angélica González³, Verna Méndez⁴, and José D. Méndez

**Autonomous Metropolitan University
Iztapalapa Campus
Biological and Health Sciences Division
Doctorate in Biological Sciences Program**

Medical Research Unit in Metabolic Diseases. Twentieth Century National Medical Center
Mexican Institute of Social Security (IMSS), P.O. Box A-047, México City 06703, México

¹ Department of Pathological Anatomy, Hospital General de Zona # 47, IMSS, México City, México.

² Department of Internal Medicine, Hospital General de Zona # 47, IMSS, México City, México.

³ Department of Surgery, Hospital General de Zona # 1A, IMSS, México City, México.

⁴ Department of Internal Medicine, Hospital General de Zona / MF # 2, IMSS, San Luis Potosí, México.

Address reprints requests to: Dr. José D. Méndez,
Medical Research Unit in Metabolic Diseases, Twentieth Century National Medical Center,
Mexican Institute of Social Security, P.O. BOX A-047, México City, 06703, México.
Email: mendezf@servidor.unam.mx
Phone: +52- 56 27 69 00, ext. 1400; Fax: + 52 57 61 09 52

SUMMARY

Experimentally, we demonstrated the beneficial effects of L-arginine on regulation of hyperglycemia and dyslipidemia in experimental diabetes, in addition to a positive anti-aggregating effect in platelets in animals and humans. Here, the effect of L-arginine on foot ulcers from diabetic patients was studied.

Three groups of diabetic patients were included: 11 patients without ulcer received neither treatment and served as controls. 11 patients with diabetic ulcer received the standard treatment. This group served as diabetic control with diabetic ulcer. 11 remain patients with diabetic ulcer received 10 mM L-arginine subcutaneously on the site of the wound. Biopsy with punch number 5 on wound site comprising both ulcerative and contiguous undamaged skin were performed in all patients with ulcerative lesions before any treatment. Patients with intact skin had biopsy performed with punch number 5 on external malleolar region of right lower limb. Biopsies were examined by light and confocal microscopy utilizing histochemical and immunohistochemical methods. Initial and final blood samples were collected to determine glucose, triglycerides, total cholesterol, glycated hemoglobin (HbA_{1c}), low (LDL), and high density lipoproteins (HDL).

Significant differences ($p < 0.05$) were observed between initial and final serum glucose levels for treated patients, and initial serum glucose levels between treated and control patients without diabetic ulcer. Glycated hemoglobin, triglycerides, cholesterol, and lipoprotein levels showed no significant changes. Eight patients treated with L-arginine reached total wound healing and the remaining three who abandoned the study because of change of residence showed relevant improvement. Histochemistry and immunohistochemistry methods have shown vascular impairment in both patients with diabetic ulcer (prior to treatment) and control patients without diabetic ulcer. Our observations strongly support efficacy of L-arginine for successful wound healing of diabetic ulcers.

Keywords Wound healing, Diabetic foot, L-Arginine, Chronic ulcers.

INTRODUCTION

Cellular and biochemical interplay that comprises normal wound healing response is complex and implies intricate interactions among a variety of different cell types, structural proteins, growth factors, and proteinases (1). According to metabolic situation and patient conditions, these interactions will lead to quick healing through acute inflammation and its resolution in a reasonable time or to establishment of a perpetuated chronic ulcer. Chronic wounds and their treatment are an enormous burden on the health care system, both in terms of cost and intensity of care required (1). There exists a diversity of predisposal factors such as vascular alterations, infections, cancer, positional ulcers, alterations of immunity, pressure, and altered metabolism such as diabetes mellitus. Perhaps the latter is the most important due to the great number of diabetic patients throughout the world.

Diabetic patients frequently ask advice of the physician because of problems related to diabetic foot, especially appearance of ulcers, which if not properly treated will produce amputation of the damaged lower limb (2-19). Despite educational and preventive efforts to decrease both, frequency of diabetic ulcers and lower limb amputations caused by chronic ulcers in diabetic patients (2,3,5,10,12,13,19), the target of a 40% decrease in amputation rates at year 2000 in the U.S. and Europe was not reached as has stated (19), and rates have actually increased.

In the 1990s, recombinant human platelet-derived growth factor (rhPDGF-BB) emerged as a promise of successful treatment of chronic wounds, especially in diabetic patients. Several studies were effected to prove its efficacy in animal models (20), toxicology aspects (21), effects of chronic wound fluid on structure and biologic activity (22), clinical safety in humans (23) and clinical efficacy (24). However, no conclusive results have been obtained and diabetic foot and its complications continue as a major problem in public health.

Other treatments have been assayed, such as low-density irradiation (25), human skin equivalent (26), blood-derived angioblasts (27), hyperbaric oxygen therapy (28), inhibition of lipid peroxidation (29), and systemic electromagnetic fields (30). All attempted improvement of the vascular network involved in the ulcerative lesion. Recent investigations seem to support the beneficial effect of the role of nutrition on wound healing. Adequate process of scar formation has been observed when enteric nutrition is provided, especially in arterial occlusive disease and chronic ulcers of diabetic foot (31). Thus, a diet containing 1.5–3g/kg protein has been recommended, depending severity of lesion and metabolic condition of the patient.

L-arginine is one of the most versatile amino acids in animal cells. There is evidence to implicate this amino acid as a key component in beneficial effects of low protein diet (32). It has also been shown to possess other numerous unique and potentially useful pharmacologic effects (33). L-arginine is a precursor of nitric oxide (34) and polyamine biosynthesis (34,35). In extrahepatic tissues L-arginine is metabolized to L-ornithine and urea by arginase. L-ornithine is also metabolized to L-proline which is a substrate for collagen biosynthesis (34,35). In extrahepatic tissues, L-arginine is

metabolized into L-ornithine and urea by arginase. L-ornithine is also metabolized into L-proline, which is a substrate for collagen biosynthesis (34, 35). Previously, it was suggested that L-arginine may be of clinical benefit in improving wound healing and immune responses in healthy humans (37,38).

This paper was designed to study the effect of L-arginine on wound healing in diabetic patients with chronic ulcerative lesions on the foot.

MATERIALS AND METHODS

Patients. Thirty three diabetic patients were consecutively selected to participate in the study. Of these, 22 patients showed chronic ulcers of one of the lower limbs and 11 corresponded to diabetic patients without ulcerative lesions. We did not consider age or sex as exclusion criteria. After signing informed consent form, patients were distributed into three groups: 11 patients without ulcer received neither treatment and served as non-treated control. 11 patients with diabetic ulcer received the standard treatment available at the hospital. This treatment was based on the use of soap, water and iodine. This group served as diabetic control with ulcer. 11 remain patients with diabetic ulcer were administered daily 10 mM L-arginine dissolved in sterile 0.154 M NaCl around the ulcer (experimental treatment). By ethical reasons when all the patients were selected the patients with diabetic ulcer received information about the experimental treatment, and they decided by consensus the assimilation to a group; treated or non-treated group. So that, the design of the experimental study was nonrandomized between-group. Initial size of the ulcerative lesion was calculated by multiplying length by width. Biopsies were performed with Biopsy punch No. 5 (Fray Products Corp., Buffalo, NY USA) comprising ulcerated and non-ulcerated skin in patients with diabetic ulcer and on skin of external maleolar zone in control patients. Tissue samples were processed by light and confocal microscopy. It is important to mention that neither patients with non-treated diabetic ulcer nor patients with treated diabetic ulcer were not previously submitted to any surgery before to the beginning of the study.

Biochemical Determinations

Blood sample collection. To make initial and final biochemical determinations in serum, blood samples were taken from forearm vein. Glycated hemoglobin (HbA_{1c}) was determined by means of Paragon Beckman electrophoresis. Total cholesterol (39), glucose (40), and triglycerides (41) were assayed enzymatically. In addition, high density lipoproteins (HDL) were measured by precipitation method (42), and low density lipoproteins (LDL) were calculated by Friedewald formula (43). During time of study, patients were under metabolic control, receiving medical attention when necessary.

Histological evaluation. Samples were fixed in 10% buffered formalin for light microscopic examination. After fixation, sections of the wound were dehydrated with graded ethanols and embedded in paraffin. Sections 5 μ -thick of paraffin-embedded tissues were mounted on glass slides, rehydrated with distilled water, and stained with hematoxylin and eosin. In addition, specimens were stained with Masson trichrome method according to Bancroft and Cook technique (44) to demonstrate collagen fibers.

Immunofluorescence. Specimens were fixed in 4% buffered paraformaldehyde, then washed with phosphate/sucrose buffer. Subsequently, 6–8 μ -thick frozen sections were effected and placed on slides previously prepared with gelatine. Sections were incubated in methanol/acetone solution. Prior to labeling, non-specific binding sites were blocked for 1 h in horse normal serum (Equitech-Bio, Inc., Kerville, TX). They were incubated at room temperature overnight with primary antibody monoclonal anti- α smooth muscle actin (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA). Sections were then washed with phosphate-buffered saline (PBS)-brij and incubated for 1 h with secondary biotin-goat anti-mouse antibody (Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA, USA) diluted 1:200 in PBS. Then, sections were washed in PBS for 30 min, and incubated for 40 min in fluorescein isothiocyanate-avidin, washed in PBS for 30 min, and stained with Evans blue. Samples were then mounted in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) (45-50).

Confocal microscopy. Samples were observed with confocal laser microscope BIO-RAD model MCR-600. Serial 1-2 μ -thick sections were performed, with green filter for Evans blue channel and blue filter for fluorescein channel; fluorescein has green fluorescence, while Evans blue has red fluorescence.

Statistical analysis. Mean \pm SD was calculated from data obtained from treated and control group without diabetic ulcer. Statistical significance between experimental and control groups was calculated by Student *t*-test for related and independent samples. Size of ulcers and time of evolution together with time of treatment were analyzed by Pearson test correlation. Odds ratio was utilized in order to show the association between the treatment or non-treatment from the diabetic ulcer and the outcome (wound healing or non-wound healing).

RESULTS

Glucose Levels

All the treated patients were under initial hyperglycemia. At the end of the study, two patients reached normal serum levels, the others showed decreasing levels. Significant variations ($p < 0.05$) were observed between initial and final glucose levels. Control patients showed lower values of glucose ($p < 0.05$) than treated patients (Table I).

Glycated Hemoglobin

Both treated and control groups showed altered levels of HbA1c. Initial and final values in treated group did not present significant variations (Tables II and III).

Triglycerides

No significant differences were observed between groups (Tables II and III). Both groups showed certain tendency to increased levels.

Cholesterol

Approximately one third of patients in both groups had serum high cholesterol levels without significant differences between groups (Tables II and III).

Lipoproteins

No significant change was observed in control and treated groups (Table II and III).

Histological Evaluation

Histological sections obtained from all the patients with or without ulcers showed little dermal and epidermal organization (Figure 2). The tissue obtained from the ulcerative lesions of the patients with diabetic ulcer showed acute and chronic inflammatory processes characterized by polymorphonuclear (PMN) and mononuclear (MN) cells, fibroblasts, and macrophages (Figure 1). Extracellular matrix (ECM) was characterized by loose connective tissue in an irregular fashion with collagen fibers distributed in different directions (Figure 2). In addition, prominent edema, extravasation of erythrocytes, and interstitial fibrin were observed, probably related to vascular damage (Figure 1). Little vessels were observed in both groups of patients, and when vessels were seen diameter of lumen was narrow or occluded and absence of erythrocytes was noted. In addition, we observed basement membrane thickening (Figures 3 and 4).

Response to L-arginine

The ulcers measured from 0.5–38.5 cm² (6.55 ± 10.8 cm², mean \pm SD) (Table IV). Chronicity of ulcers varied from 25–1825 days (269 ± 523 days, mean \pm SD) (Table IV). Time of treatment varied from 9–284 days (101.27 ± 80.25 days, mean \pm SD) (Table IV). All patients treated with L-arginine showed improvement. Eight treated patients reached total wound healing, three had rates of 95, 90, and 85% of improvement, respectively. The latter patients mentioned dropped out the study due to change of residence. One patient who improved 85% re-entered the study due to appearance of new ulcers, which showed healing during the following 8 days. Thereafter, the patient left the study definitely (Table IV).

Table V summarize the values of biochemical parameters from the group of non-treated diabetic patients with diabetic ulcer obtained at the beginning of the study. Because several patients suffered amputation during the study, they went out themselves the study and was not possible to make the final determination of biochemical parameters in serum.

The follow-up from the patients with non-treated diabetic ulcer showed the deterioration of the ulcerative lesion in all of them. These patients underwent surgical interventions which consisted since amputation of one toe until amputation of the lower limb. One patient was subject of amputation of the contralateral limb too.

No correlation was observed when Pearson correlation test was carried out to compare simultaneously variable size of ulcers, time of evolution, and time of treatment.

DISCUSSION AND CONCLUSION

In diabetic patients, deficiency of insulin can influence development of atherosclerosis through synergism of pathologic mechanisms that involve dyslipidemia, advanced glycation end-products (AGEs), altered platelet function, abnormalities in erythrocyte deformability, and abnormalities of arterial wall function (2,15,51,52-56). These mechanisms result in peripheral vascular disease that produces ischemia.

Ischemia and neuropathy, two common complications of diabetes mellitus, are primary underlying risk factors for development of foot ulcers and their complications. The majority of diabetic foot ulcers have mixed ischemic and neuropathic etiology (57). However, a vascular etiology has been postulated, including when neuropathy has been identified as determinant factor producing the ulcer (58).

In general, ischemia is considered a global enemy of healing (59). Wound healing is a complex process involving intricate interactions among a variety of different cell types, structural proteins, growth factors, and proteinases that play an important role in acute and chronic inflammation and tissue repair. Acute and chronic wounds heal in an orderly progression through artificially defined phases of vascular dilation, coagulation, inflammation, matrix synthesis and deposition, angiogenesis, fibroplasia, epithelization, contraction, and remodeling (1). These processes imply participation of polymorphonuclear and mononuclear cells, monocytes, lymphocytes, fibroblasts, macrophages, and myriad growth, coagulation and angiogenic factors, and the cytokines produced by these.

Adverse effects of malnutrition and diabetes mellitus on wound healing have justified nutritional treatment. Evidence to implicate L-arginine as a key component in the beneficial effects of a low-protein diet (32), can be widely explained, because this aminoacid participates in several metabolic pathways serving as a precursor for synthesis not only of proteins but also of nitric oxide (NO), urea, glutamate, creatine, polyamines, proline, and other molecules involved in regulating cellular homeostasis (34). The role of NO on regulation of the platelet function, preventing both its aggregation (60) and its adhesion to endothelial cells, is well known (61). Furthermore, L-arginine is a powerful insulin secretagog in humans (62).

On the other hand, antiatherogenic properties of L-arginine have been demonstrated (63). Additionally, normalization of glucose, lipid, lipoprotein and apoprotein has been observed in rats with induced diabetes (64). Previous experiments have demonstrated that polyamines putrescine, spermidine, and spermine derived from L-arginine have an anti-aggregating effect on platelets in hypercholesterolemic rabbits (65,66). Polyamines are important mediators of cell growth and L-proline formed also from L-arginine is a substrate for collagen synthesis. Both pathways –polyamine synthesis and proline formation– once activated may be important in reparative processes.

In this study we observed beneficial effects of administration of L-arginine on ulcerative lesions in diabetic patients although patients showed impaired levels of glucose and HbA1c. Glucose concentrations significantly decreased probably as a result of an educational program conducted for these patients, despite the fact that the observation did not have correlation between levels of glycated hemoglobin and wound healing. We

observed correlation between control of hyperglycemia and healing according to previous reports supporting the importance of controlling hyperglycemia that results in improving immune abnormalities related to chemotaxis, phagocytosis, and production of superoxide anion radical by neutrophils and macrophages of diabetic patients (67).

We did not observe significant differences between size of ulcer, time of evolution of lesions and time of treatment to achieve wound healing. This result can be due to several factors such as localization of ulcer, degree of metabolic control, renal function, neuropathy, and psychosocial and psychological aspects. In our study, these variables were not considered because they could produce skewed conclusions.

Our observations with light and confocal microscopy (Figures 3 and 4) showing scarcity of blood vessels in both treated and control patients supported the hypothesis of underlying vascular damage. Absence of erythrocytes can be due to occlusion of leg artery, which causes ischemia.

In this study we observed that dark ischemic tissue adjacent to the ulcer changed in color with L-arginine treatment, recovering similar characteristics to normal skin, which was associated with improvement in local blood circulation.

The precise mechanism by which L-arginine exerts its effects on reparative processes of ulcerative lesion is not known; however, it can be partially explained by: L-arginine ornithine glutamic semialdehyde proline pathway, as stated previously (68), although the contribution of polyamines synthesized from L-arginine is not discarded. For ethical reasons was not possible to take another biopsy to study angiogenesis once ulcerative lesions were healed. This aspect remains to be studied.

In conclusion, our study showed that L-arginine was a potentially successful treatment to prevent lower limb amputation and improve time of healing of chronic ulcer in diabetic patients. These results support those observations on dietary arginine supplementation in elderly population that resulted in up-regulation of T-cell activity and increased protein and collagen deposition in experimental wound (37). L-arginine administered daily was nontoxic and well-tolerated at this pharmacologic dosage, and therefore can be safely used as auxiliary therapy for diabetic foot ulcers, in addition to other available treatments.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Ma. de Lourdes Esquivel Guzmán, Head of the Central Laboratory of the Specialities Hospital, Twentieth Century National Medical Center, Mexican Institute of Social Security (IMSS) for performing biochemical assays, Dr. Raúl Mena for use of facilities at the Department of Confocal Microscopy and for access to his Neuroscience Laboratory of the Advanced Studies and Research Center (CINVESTAV), IPN, Mexico City, Mexico.

V. Arana is a CONACYT doctoral fellow (No. 87745).

REFERENCES

- 1 Stadelman KS, Digenis AG, Tobin GR. Physiology and healing dynamics and chronic cutaneous wounds. *Am J Surg* 1998; 176 (Suppl 2A): 26S–38S.
- 2 Levin ME. Preventing amputation in the patient with diabetes. *Diabetes Care* 1995; 18(10): 383–394.
- 3 Ollendorf DA, Kotsanos J, James G, Wishner WJ, Friedman M, Cooper T, Bittoni M, Oster G: Potential economic benefits of lower-extremity amputation prevention strategies in diabetes. *Diabetes Care* 1998; 21(8): 1240–1245.
- 4 Potter PJ. Watch your step!. *Can Med Assoc J* 1998; 159(3): 218–219.
- 5 Mayfield JA, Reiber GE, Sanders LJ, Janisse D, Pogach LM. Preventive foot care in people with diabetes. *Diabetes Care* 1998; 21(12): 2161–2177.
- 6 American Diabetes Association: Preventive foot care in people with diabetes. *Diabetes Care* 1998; 21(12): 2178–2179.
- 7 Hill SL, Holtzman GI, Buse R. The effects of peripeheral vascular disease with osteomyelitis in the diabetic foot. *Am J Surg* 1999; 177(4): 282–286.
- 8 Pittet D, Wyssa B, Herter-Clavel C, Kursteiner K, Vaucher J, Lew PD. Outcome of diabetic foot infections treated conservatively: A retrospective cohort study with long-term follow up. *Arch Intern Med* 1999; 159(8): 851–856.
- 9 Armstrong DG, Stacpoole-Shea SB, Nguyen N, Harkless LB. Lengthening of the achilles tendon in diabetic patients who are at high risk for ulceration of the foot. *J Bone Joint Surg Am* 1999; 81-A(4): 535–538.
- 10 Van Gils CC, Wheeler LA, Mellstrom M, Brinton EA, Mason S, Wheeler CG. Amputation prevention by vascular sugery and podiatry collaboration in high-risk diabetic and nondiabetic patients: the Operation Desert Foot experience. *Diabetes Care* 1999; 22(5): 678–683.
- 11 Ahroni JH, Boyko EJ, Forsberg RC. Clinical correlates of plantar pressure among diabetic veterans. *Diabetes Care* 1999; 22(6): 965–972.
- 12 Bloomgarden ZT. The European Association for the Study of Diabetes Annual Meeting 1998. Complications of diabetes. *Diabetes Care* 1999; 22(8): 1364–1370.
- 13 Dargis VP, Olga A, Jonushaite L, Vileikyte, Boulton AJ. Benefits of a multidisciplinary approach in the management of recurrent diabetic foot ulceration in Lithuania: a prospective study. *Diabetes Care* 1999; 22(9): 1428–1431.
- 14 Pinzur MS. American Orthopaedic Foot and Ankle Society Diabetic Shoe Survey. *Diabetes Care* 1999; 22(12): 2099–2100.
- 15 Colwell JA. Peripheral vascular disease in diabetes mellitus. In: Davidson JK, Ed. *Clinical diabetes mellitus. A problem-oriented approach*. NY: Thieme; 2000. p. 560-561.
- 16 Coleman WC. The diabetic foot. In: Davidson JK. Ed. *Clinical diabetes mellitus. A problem-oriented approach*. NY: Thieme; 2000. p. 571–580.
- 17 Levin ME. Pathophysiology of diabetic foot lesions. In: Davidson JK. Ed. *Clinical diabetes mellitus. A problem-oriented approach*. NY: Thieme; 2000. p. 581–598
- 18 Hobgood E. Conservative therapy of foot abnormalities, infections, and vascular insufficiency. In: Davidson JK. Ed. *Clinical diabetes mellitus. A problem-oriented approach*. NY: Thieme; 2000. p. 599–609.
- 19 Bloomgarden ZT. American Diabetes Association 60th Scientific Sessions, 2000.

- The diabetic foot. *Diabetes Care* 2001; 24 (5): 946–951.
- 20 LeGrand EK. Preclinical promise of becaplermin (rhPDGF-BB) in wound healing. *Am J Surg* 1998; 176 (Suppl 2A): 48S–54S.
 - 21 Knight EV, Oldham JW, Mohler MA, Liu S, Dooley JA. Review of nonclinical toxicology studies of becaplermin (rhPDGF-BB). *Am J Surg* 1998; 176 (Suppl 2A): 55S–60S.
 - 22 Castronuovo JJ Jr, Ghobrial I, Giusti AM, Rudolph S, Smiell JM. Effects of chronic wound fluid on the structure and biological activity of becaplermin (rhPDGF-BB) and becaplermin gel. *Am J Surg* 1988; 176 (Suppl 2A): 61S–67S.
 - 23 Smiell JM. Clinical safety of becaplermin (rhPDGF-BB) gel. *Am J Surg* 1988; 176 (Suppl 2A): 68S–73S.
 - 24 Wieman TJ. Clinical efficacy of becaplermin (rhPDGF-BB) gel. *Am J Surg* 1998; 176 (Suppl 2A): 74S–79S.
 - 25 Schindl A, Schindl M, Schon H, Knobler R, Havelec L, Schindl L. Low-intensity laser irradiation improves skin circulation in patients with diabetic microangiopathy. *Diabetes Care* 1998; 21(4): 580–584.
 - 26 Brem H, Balledux J, Bloom T, Kerstein M, Hollier L. Healing of diabetic foot ulcers and pressure ulcers with human skin equivalent: a new paradigm in wound healing. *Arch Surg* 2000; 135(6): 627–634.
 - 27 Schatteman GC, Hanlon HD, Jiao C, Dodds SG, Christy BA. Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetes mice. *J Clin Invest* 2000; 106 (4): 571–578.
 - 28 Leslie CA. Randomized controlled trial of topical hyperbaric oxygen for treatment of diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 1998; 11: 111–115.
 - 29 Altavilla D, Saitta A, Cucinotta D, Galeano M, Deodato B, Colonia M, Torre V, Russo G, Sardella A, Urna G, Campo GM, Cavallari V, Squadrito G, Squadrito F. Inhibition of lipid peroxidation restores impaired vascular endothelial growth factor expression and stimulates wound healing and angiogenesis in the genetically diabetic mouse. *Diabetes* 2001; 50 (3): 667–674.
 - 30 Cañedo-Dorantes L, García-Cantú R, Barrera R, Méndez-Ramírez I, Navarro VH, Serrano G. Healing of chronic arterial and venous leg ulcers with systemic electromagnetic fields. *Arch Med Res* 2002; 33: 281–289.
 - 31 Kiyama, T, Witte MB, Thornton FJ. The route of nutrition support affects the early phase of wound healing. *J Parenter Enteral Nutr* 1998; 22 (5): 276.
 - 32 Narita I, Border WA, Ketteler M, Ruoslahti E, Noble NA. L-arginine may mediate the therapeutic effects of low protein diets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4552–4556.
 - 33 Barbul, A. Arginine, biochemistry, physiology, and therapeutic implication. *J Parenter Enteral Nutr* 1986; 10: 227–238.
 - 34 Wu G, Morris SM. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 1998; 336: 1–17.
 - 35 Pegg AE. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem J* 1986; 234: 249–262.
 - 36 Shih, V.E: Regulation of ornithine metabolism. *Enzyme* 1981; 26: 254–258.
 - 37 Barbul A, Lazarou SA, Efron DT, Wasserkrug HL, Efron G. Arginine enhances response wound healing and lymphocyte immune responses in humans. *Surgery* 1990;

- 108: 331–337.
- 38 Kirk SJ, Hurson M, Regan MC, Holt DR, Wasserkrug HL, Barbul A. Arginine stimulates wound healing and immune function in elderly human beings. *Surgery* 1993; 114: 155–60.
 - 39 Katterman R. Rapid determination of total and free cholesterol in serum. *Clin Chem Clin Biochem* 1984; 22: 245.
 - 40 Trinder P. Determination of glucose in blood using oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem* 1969; 6: 24.
 - 41 Wahlefeld AM. Triglycerides, determination after enzymatic hydrolysis. In: Bergmeyer HU, Ed. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press; 1974. p. 1831.
 - 42 Friedewald WT, Levy FI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein-cholesterol in plasma without the use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499.
 - 43 Warnick GR, Knopp RH, Branson L. Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald equation is adequate for classifying patients on the basis of Nationally Recommended Cutpoints. *Clin Chem* 1990; 36: 15.
 - 44 Bancroft JD, Cook HC. Connective tissues. In: *Manual of histological techniques and their diagnostic application*. New York: Churchill-Livingstone; 1994. p.42-43.
 - 45 Hermoso M, Sáez JC, Villalón M. Identification of gap junctions in the oviduct and regulation of connexins during development and by sexual hormones. *Eur J Cell Biol* 1997; 74: 1–9.
 - 46 Taylor CR, Shi SR. Fixation, processing, special applications. In: Taylor CR, Cote RJ Eds. *Immunomicroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologist*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, p. 42–70 (1994).
 - 47 Van der Loos CM. In: Boshier A Ed. *Immunoenzyme multiple staining methods*. New York: BIOS Scientific Publishers Limited; 1999 p. 1–10.
 - 48 Jasani B, Schmid KW. Role and scope of immunocytochemistry in routine histopathological analysis. In: Horne T, Ed. *Immunocytochemistry in diagnostic histopathology*. New York: Churchill-Livingstone; 1993 p. 23–27.
 - 49 Brandtzaeg P, Halstensen TS, Huitfeldt HS, Valnes KN. Immunofluorescence and immunoenzyme histochemistry. In: Johnstone AP, Turner MW, Eds. *Immunochemistry 1*. London: Oxford University Press; 1997. p. 71–130.
 - 50 Hsu SM. The use of the Avidin-Biotin interaction in immunocytochemistry. In: Cuello AC, Ed. *Immunohistochemistry II*. Chichester: John Wiley and Sons; 1993. p. 169–180.
 - 51 Brownlee M, Cerami A.: The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Annu Rev Biochem* 1981; 50:385–432.
 - 52 Sobcning IA, Tertov VV, Orekhov AN. Atherogenic modified LDL in diabetes. *Diabetes* 1996; 45(3S): 35S–39S.
 - 53 Bloomgarden ZT. The 32nd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes: Macrovascular disease. *Diabetes Care* 1997; 2(7): 1198–1201.
 - 54 Bloomgarden ZT. American European Association Annual Meeting, 1997: Endothelial dysfunction, neuropathy and the diabetic foot, diabetic mastopathy, and erectile dysfunction. *Diabetes Care* 1998; 21(1): 183–189.
 - 55 Devaraj S. Low-density lipoprotein postsecretory modification, monocyte function, and circulating adhesion molecules in type 2 diabetic patients with and without macrovascular complications: the effect of tocopherol supplementation. *Circulation*

2000; 102(2): 191–196.

- 56 Suzuki LA, Poot M, Gerrity RG, Bornfeldt KE. Diabetes accelerates smooth muscle accumulation in lesions of atherosclerosis: lack of direct growth-promoting effects of high glucose levels. *Diabetes* 2001; 50(4): 851–860.
- 57 Laing P. The development and complications of diabetic foot ulcers. *Am J Surg* 1998; 176 (Suppl 2A): 11S–19S.
- 58 Irwin ST, Gilmore J, McGrann S. Blood flow in diabetics with foot lesions due to "small vessel disease". *Br J Surg* 1988; 75: 1201–1206.
- 59 Bulat T, Kosinski M. Diabetic foot: strategies to prevent and treat common problems. *Geriatrics* 1995; 50(2): 46–55.
- 60 Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Characterization of the L-arginine: nitric oxide pathway in human platelets. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 325–328.
- 61 Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987; ii: 1057–1058.
- 62 Menchini M, Meschi F, Lambiase R, Puzzovio M, Del Guercio MJ, Chiumelo G. C-Peptide response to arginine stimulation in diabetic children. *J Pediatr* 1980; 96(3): 362–366.
- 63 Cook JP, Singer AH, Tsao P, Zera P, Rowan RA, Billingham ME. Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest* 1992; 90: 1168–1172.
- 64 Méndez J.D. F. Balderas: Regulation of hyperglycemia and dyslipidemia by exogenous L-arginine in diabetic rats. *Biochimie* 2001; 83(5): 453–458.
- 65 Méndez JD, Zarzoza E. Inhibition of platelet aggregation by L-arginine and polyamines in alloxan treated rats. *Biochem Mol Biol Int* 1997; 43:311–318.
- 66 Corona de la Peña N, Sosa-Melgarejo J, Ramos RR, Méndez JD. Inhibition of platelet aggregation by putrescine, spermidine, and spermine in hypercholesterolemic rabbits. *Arch Med Res* 2000; 31: 546–550.
- 67 McMahon M, Rizza R. Nutrition support in hospitalized patients with diabetes mellitus. *Mayo Clin Proc* 1996; 71: 587–594.
- 68 Zinker S, Rodkind M. Collagen biosynthesis in the chick embryo, I. The source of free proline and collagen hydroxyproline. *Connect Tissue Res* 1972; 275–281.

Table I. Serum glucose levels in treated with diabetic ulcer and non-treated diabetic patients without ulcer

No	Treated patients			Non-treated patients	
	Name	Glucose (mg/dl)		Name	Glucose (mg/dl)
		Initial	Final		
1	RPB	169	88	VHJ	67
2	RPE	274	177	PRJ	205
3	MTA	247	240	IFM	207
4	OGG	342	188	RGMM	140
5	RFF	178	129	BMA	244
6	RMJ	159	nm	HRG	254
7	FRF	192	110	RBD	126
8	GCJ	173	77	PMR	156
9	HMA	206	122	PMJ	70
10	CAA	282	280	HCC	96
11	CGJ	141	nm	RPH	44
Mean		214.81	156.77		133.54
SD		62.92	69.6		73.43

nm = not measured.

Table II. Initial and final serum levels of glyated hemoglobin (HbA1c) and lipid profiles in treated diabetic patients with diabetic ulcer

Patient	Initial					Final				
	HbA1c	TC	HDL	LDL	TG	HbA1c	TC	HDL	LDL	TG
1 RPB	7.6	150	38	87	123	8	141	41	77	117
2 RPE	8.5	296	39	nm	675	11.4	323	41	117	825
3 MTA	13.2	200	33	77	451	15.7	192	42	100	249
4 OGG	10.6	168	32	112	122	13.9	161	32	101	141
5 FRF	9.2	167	36	94	189	nm	Nm	nm	nm	nm
6 RMJ	5.5	182	50	117	73	nm	Nm	nm	nm	nm
7 FRH	11	226	38	154	171	7	243	58	156	144
8 GCJ	7.3	212	42	142	142	6.5	209	46	134	143
9 HMA	9.1	181	39	122	101	nm	Nm	nm	nm	nm
10 CAA	11.4	166	43	109	68	nm	Nm	nm	nm	nm
11 CGJ	nm	148	nm	nm	nm	nm	Nm	nm	nm	nm
Mean	9.34	191	39	113	212	10.4	212	43	114	270
SD	2.26	42.7	5.2	24.9	196	3.84	65.3	8.5	28	276

Values of reference: HbA_{1c} = glyated hemoglobin: 4.8 – 6.0%; TC = total cholesterol: 0–200 mg/dl; HDL = high density lipoproteins: 35–85 mg/dl; LDL = low density lipoproteins: 50–130 mg/dl; TG = triglycerides: 50–200 mg/dl; nm = not measured.

Table III. Serum levels of HbA_{1c} and lipid profile of the control without ulcer and treated patients

	Cholesterol (mg/dl)		HbA _{1c} (%)		LDL (mg/dl)		HDL (mg/dl)		TG (mg/dl)	
	Non-Treated	Treated	Non-Treated	Treated	Non-treated	Treated	Non-treated	Treated	Non-treated	Treated
	72	150	17	7.6	115	87	72	38	123	117
	158	296	9.9	8.5	nm	nm	nm	39	675	825
	321	200	11.4	13.2	228	77	39	33	451	249
	176	168	9.9	10.6	nm	112	nm	32	122	141
	183	167	8.2	9.2	nm	94	nm	36	189	nm
	211.5	182	nm	5.5	149	117	40	50	73	nm
	198	226	nm	11	nm	154	43	38	171	144
	195	212	nm	7.3	100	142	29	42	142	143
	218	181	13.2	9.1	128	122	48	39	101	nm
	201	166	nm	11.4	124	109	38	43	68	nm
	228	148	12.1	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm
Mean	196.5	190.5	11.5	9.3	140.7	112.7	44.1	39.0	211.5	269.8
SD	59.0	42.7	2.9	2.3	45.7	24.9	13.6	5.2	196.4	275.9

Values of reference: HbA_{1c} = glycated hemoglobin: 4.8–6.0 %; TC = total cholesterol: 0–200 mg/dl; HDL = high density lipoproteins: 35–85 mg/dl; LDL = low density lipoproteins: 50–130 mg/dl; TG = triglycerides: 50–200 mg/dl; nm = Not measured.

Table IV. Ulcer chronicity and healing after L-arginine treatment

	Name	Initial size (cm ²)	Chronicity (days)	Treatment (days)	Healing (%)
1	RPB	4	90	59	100
2	RPE	0.5	90	125	100
3	MTA	2.8	30	115	100
4	OGG	0.8	60	42	100
5	FRF	0.5	180	9	100
6	RMJ	6	25	110	100
7	FRH	38.5	90	202	100
8	GCJ	3	330	284	100
9	HMA	6	90	57	95
10	CAA	4	150	62	85
11	CGJ	6	1825	49	90
	Mean	6.55	269	101.27	
	SD	10.8	523.01	80.25	

¹Patients who with drew from the study due to ehange of residence; ²patient re-entered the study due to the development of new ulcers that showed improvement after 8 days.

TABLE V. Serum levels of glucose, glycated hemoglobin and lipid profile from non-treated diabetic patients with diabetic ulcer

No.	Name	Glucose (mg/dl)	HbA _{1c} (%)	TC (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)	TG (mg/dl)
1	ACL	294	17.7	249	nm	nm	236
2	MLL	262	15.2	149	nm	nm	60
3	GRM	267	16	191	43	nm	247
4	MHM	387	12.7	406	75	329	213
5	VMR	264	13.1	172	nm	nm	75
6	ZEJ	83	8.9	180	68	97	751
7	AGM	117	Nm	271	36	165	352
8	LRM	370	Nm	193	70	90	167
9	PCJ	164	10.6	168	32	112	122
10	LRE	208	7.9	142	30	83	144
11	EAE	72	5.8	137	38	66	167
Σ		2488	107.9	2011.49	392	942	2534
Mean		226.18	9.81	182.86	35.64	85.64	230.36
SD		107.66	3.99	97.74	18.72	91.29	191.54

Values of reference: HbA_{1c} = glycated hemoglobin: 4.8-6.0 %; TC = total cholesterol: 0-200 mg/dl; HDL = high density lipoproteins: 35-85 mg/dl; LDL = low density lipoproteins: 50-130 mg/dl; TG = triglycerides: 50-200 mg/dl; nm = Not measured. Σ = summa; SD = standard deviation.

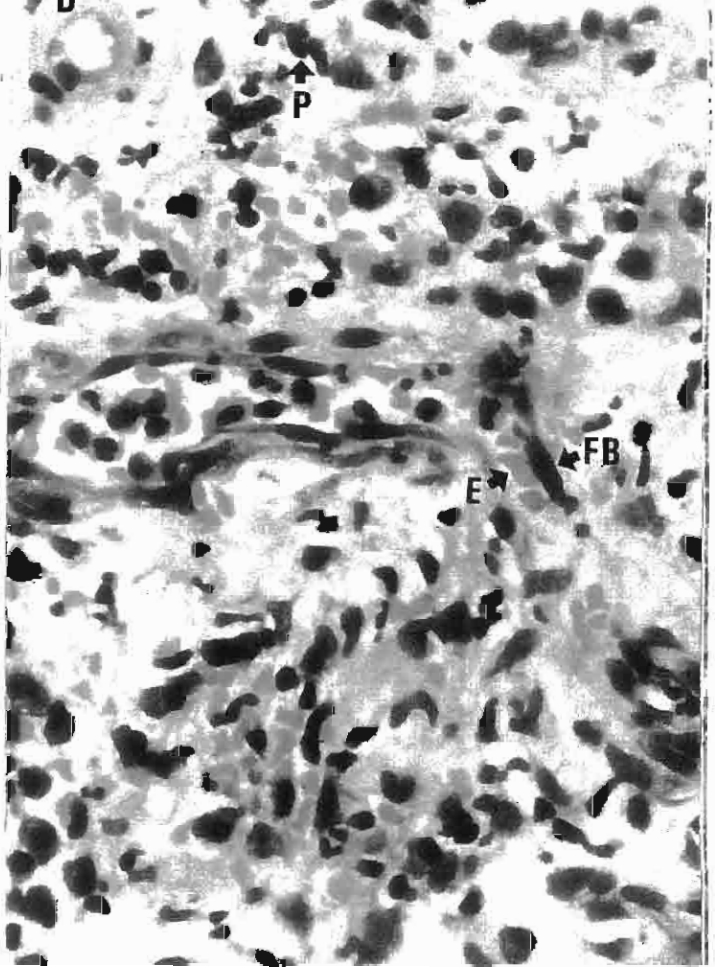
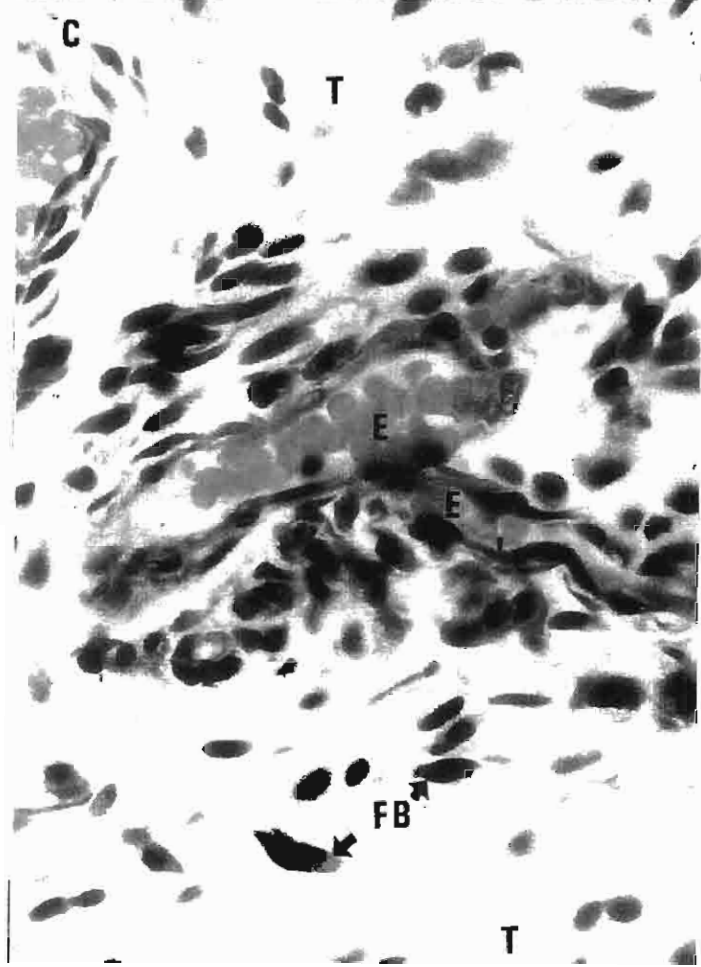
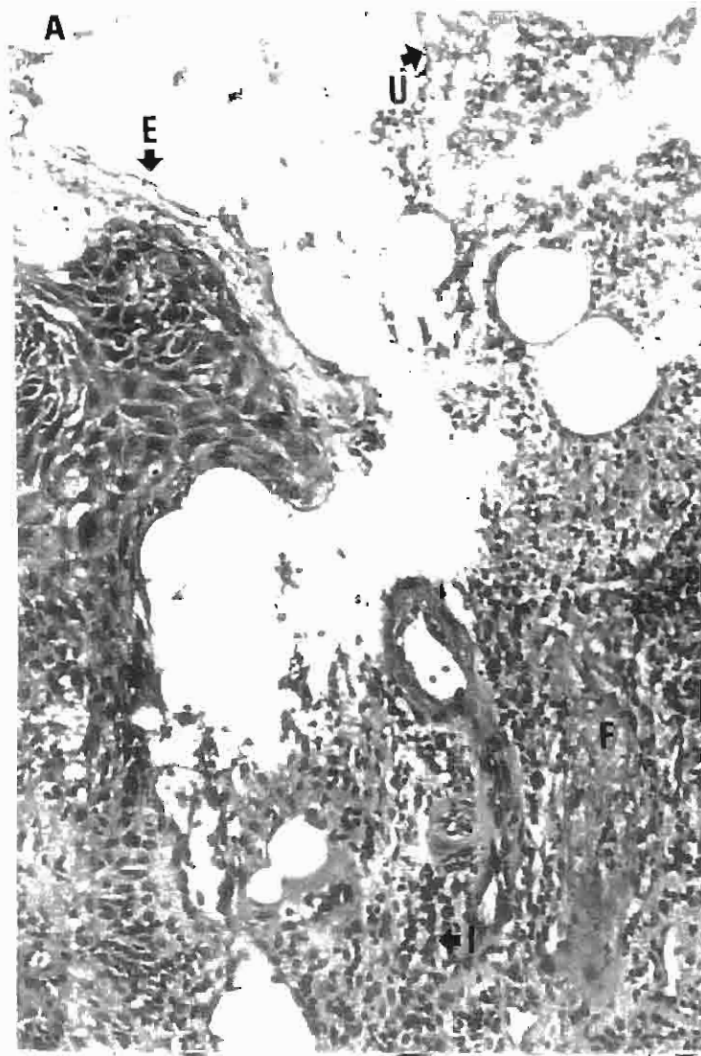
Figure legends

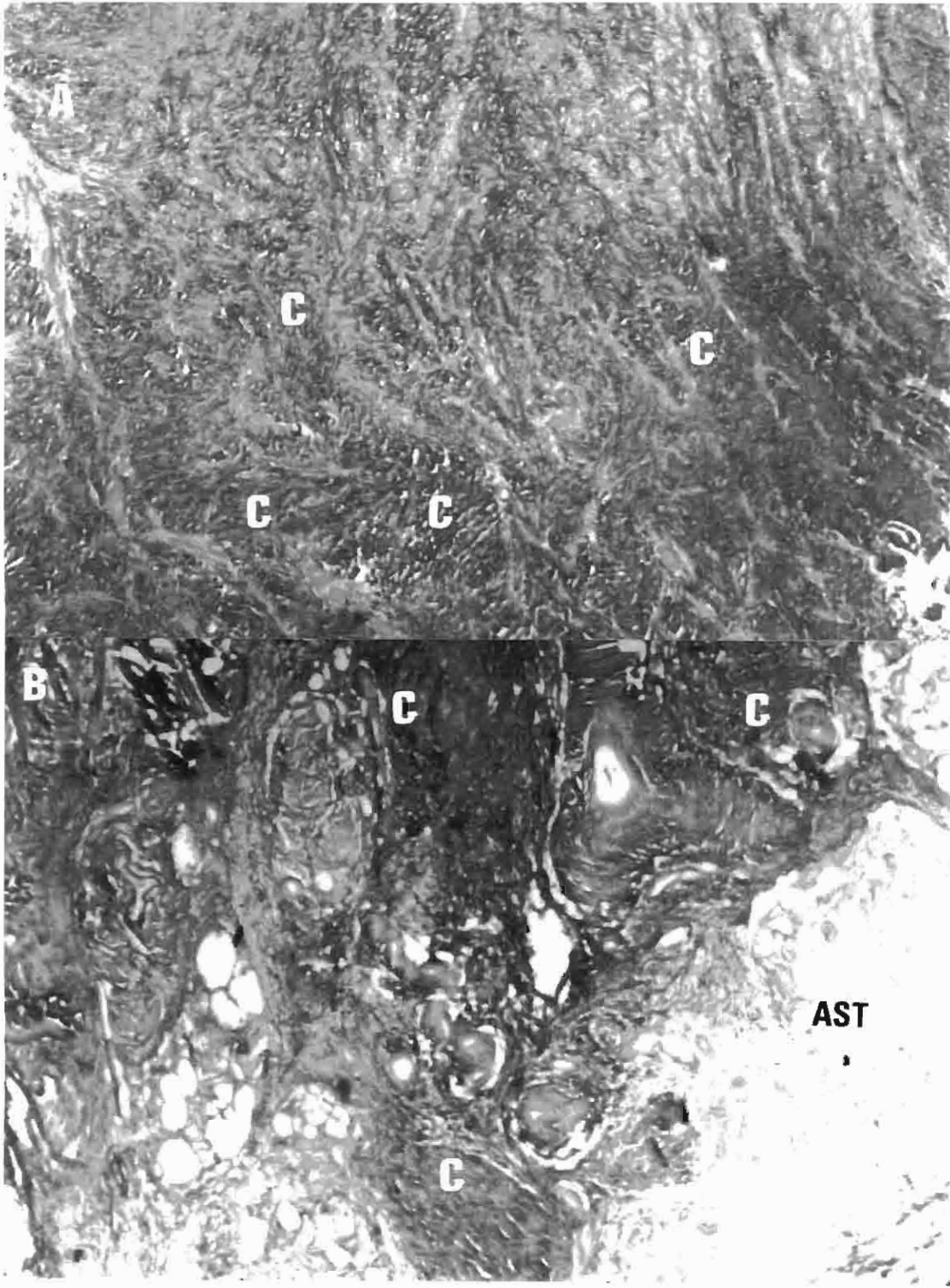
Figure 1. Sections from skin of diabetic foot ulcers stained by H-E prior to treatment. A. In this section is observed on the left side the epithelium (E), on the right side the ulcer (U), the inflammatory process below the ulcer (I), and fibrin deposits (F) 20X. B. The ulcer is shown (U), in addition to surface epithelium (E), fibrin deposits (F), inflammatory process (I), and loose connective tissue (T) 20X. C and D. Relevant here are presence of extravasation of erythrocytes (E) and elements from acute and chronic inflammation characterized by polymorphonuclear cells (P), fibroblasts (FB), and loose connective tissue (T) 40X.

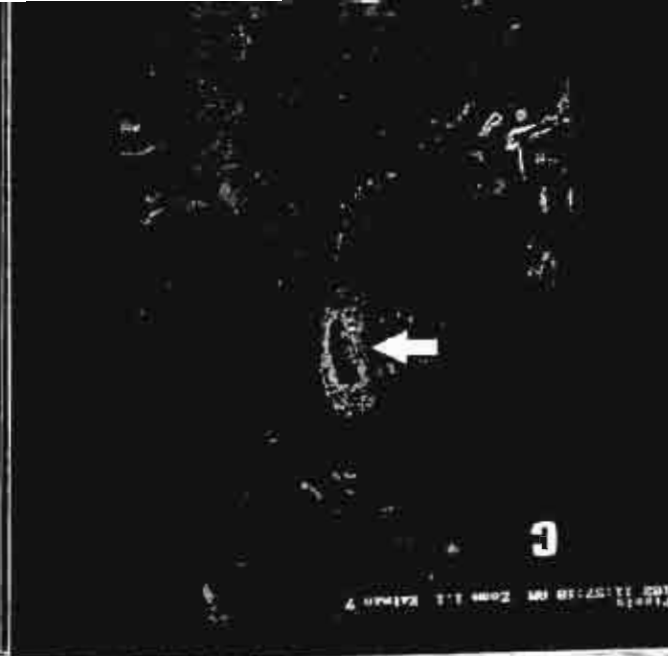
Figure 2. Skin from diabetic patients without ulcer (A) and diabetic ulcer (B) stained by trichrome Masson technique. A. Collagen fibers (C), showing an irregular pattern 40X. B. Presence of adipose subcutaneous tissue (AST), next to collagen fibers (C), showing depth of lesion 40X.

Figure 3. Sections from ulcerative lesions of skin marked with anti α actin by confocal microscopy prior to treatment. A and B. Scarce blood vessels (arrow). C and D. There are thickening of intima (I), absence of erythrocytes in narrow lumen (L), and smooth muscle cells positive to anti α actin in media tunic (M).

Figure 4. Non-ulcerative skin from control diabetic patient. A. Section shows scarcity of blood vessels (arrow). B. Lumen (L) is narrow and nearly occluded. Intima (I) layer is thickened, and media tunic (M) is positive to anti α actin.







HM010.PIC of: All Pixels
HM010.PIC 5-Jun-82 12:31:16 PM Zoom 1.1 Kalman 7, 13.6 μ m
HM010.PIC 5-Jun-82 12:38:14 PM Zoom 1.1 Kalman 7, 13.6 μ m

A



100 μ m

HM020.PIC of: All Pixels
HM020.PIC Projection of HM020.PIC, Images 1 to 26, Shift 0.00
HM020.PIC Projection of HM020.PIC, Images 1 to 13, Shift 0.00

B

A **I** **L** **M**

20 μ m

ANEXO

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN TITULADO "ANGIOGENESIS EN PIEL EN DIABETES MELLITUS: EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LESIONES ULCERATIVAS CON L-ARGININA".

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación cuyo título se menciona arriba y cuyo objetivo es comprobar la efectividad del tratamiento de las lesiones ulcerosas en la piel que se presentan como complicaciones de la diabetes mellitus. El tratamiento consiste en la infiltración local de L-arginina, además de la administración por vía oral de pentoxifilina. Se espera que mediante este tratamiento la lesión ulcerosa que presento en alguna de las extremidades inferiores se obtenga la curación en un plazo menor al que se observa en pacientes que no han recibido este tratamiento. Al ser aplicado el medicamento local mediante jeringa de insulina, puedo sentir una leve molestia que consiste en sensación de ardor que será transitoria. En caso de no tener lesión ulcerosa de la piel y participar en el estudio será únicamente para toma de biopsia por punch de la piel del tercio distal de una de las extremidades inferiores.

Si acepto participar en el estudio, se me realizarán los estudios necesarios para evaluar el estado de control metabólico de mi padecimiento y se me efectuará biopsia de piel para evaluar el estadio de dichas lesiones antes del inicio del tratamiento. Además se realizará un control fotográfico de la evolución de las lesiones para verificar la mejoría. Los investigadores involucrados en el estudio tendrán acceso a mi expediente clínico y podrán responder a todas las dudas que yo tenga en cualquier momento del estudio.

También estoy informado de que no existen riesgos adicionales a los inherentes a la toma de una biopsia de piel y de que ésta será efectuada por personal médico especialmente capacitado para la toma de la misma.

Los beneficios que se obtendrán del presente estudio consistirán en un mayor conocimiento de los mecanismos de producción de las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus del tipo de pie diabético y serán de mayor utilidad para el tratamiento, control y prevención de las mismas en mi propia persona así como en otros pacientes diabéticos que muestren este tipo de complicaciones.

Si yo decidiera no participar en el estudio, esto no afectará la calidad de tratamiento que yo reciba en el IMSS cuando así lo requiera.

Toda la información obtenida en este estudio será considerada confidencial incluida mi identidad personal.

Consentimiento

Consiento participar en este estudio, he recibido copia de este impreso, se me ha explicado el contenido del mismo y he tenido oportunidad de leerlo con detenimiento.

PACIENTE

TESTIGO

NOMBRE: _____ NOMBRE: _____

FIRMA: _____ FIRMA: _____

México, D.F. Fecha _____