



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**PAPEL DE LA APOPTOSIS EN ENDOTELIO
VASCULAR Y DAÑO TISULAR DEL PIE DIABÉTICO
INFECTADO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN MORFOLOGÍA

P R E S E N T A

Rosa María Guzmán Aguilar

Director: Dr. César Raúl González Bonilla.
Codirectora: Dra. Rosa Adriana Jarillo Luna



México, DF, Febrero 2005

Este trabajo se realizó en la **Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología del Hospital de Infectología** “Dr. Daniel Méndez Hernández”, Centro Médico “La Raza” del Instituto Mexicano del Seguro Social; y en el **Laboratorio de Inmunología celular y molecular** de la Escuela Superior de Medicina del IPN.

El proyecto de investigación, obtuvo financiamiento del CONACYT “Fondo sectorial de investigación en salud y seguridad social” con clave 136; y FOFOI, IMSS 2004/033.

La autora agradece a la Dra. Carolina Bekker Méndez, investigadora asociada del Hospital de Infectología “Dr. Daniel Méndez Hernández”, por su valiosa participación y amable instrucción en el laboratorio para la realización de este trabajo y estandarización de las técnicas histológicas; de igual manera agradezco a la Dra. Rosario Mora Campos, Anatomopatóloga clínica adscrita al CMR; por su invaluable e incondicional apoyo histopatológico; así como a la QFB Lilia Flores González, por su apreciable ayuda; a la Dra. Emma González Veyrand por su entusiasmo en la realización e interpretación de los procedimientos de radiodiagnóstico para complementar el estudio de los pacientes.

En especial al Dr. César Raúl González Bonilla y Dra. Rosa Adriana Jarillo Luna, quienes dedicaron su tiempo y esmerada dedicación para la realización y preparación del trabajo de tesis.

Dedico este trabajo a mis padres, que con el ejemplo de trabajo, honestidad y constancia siempre han guiado mi camino.

A Roberto, por su incondicional apoyo; especialmente a mi adorada Erika y a mi hermano Alfonso que incansablemente contribuyeron en la realización de este proyecto; infundiéndome paciencia y perseverancia para la culminación de una añorada meta, los amo con todo mi corazón.

Asimismo, reiterar mi respeto, afecto y agradecimiento a la Dra. Adriana Becerril Montes, Dra. Norma Estela Herrera González y Dr. Rafael Campos Rodríguez, por sus aportaciones al presente trabajo.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|----------------------------|----|
| Abreviaturas | 9 |
| Resumen | 10 |
| Summary | 11 |
| Antecedentes | 12 |
| Justificación | 25 |
| Planteamiento del problema | 26 |
| Objetivos del estudio | 26 |
| Material y Métodos | 27 |
| Resultados | 31 |
| Discusión | 49 |
| Conclusiones | 54 |
| Perspectivas del estudio | 54 |
| Anexo I | 55 |
| Anexo II | 56 |
| Anexo III | 57 |
| Anexo IV | 58 |
| Anexo V | 59 |
| Consentimiento informado | 60 |
| Bibliografía | 61 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|-----------|----|
| Figura 1 | 15 |
| Figura 2 | 17 |
| Figura 3 | 22 |
| Figura 4 | 32 |
| Figura 5 | 38 |
| Figura 6 | 39 |
| Figura 7 | 42 |
| Figura 8 | 42 |
| Figura 9 | 43 |
| Figura 10 | 43 |
| Figura 11 | 44 |
| Figura 12 | 45 |
| Figura 13 | 46 |
| Figura 14 | 47 |
| Figura 15 | 48 |

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I 34

Tabla II 35

Tabla III 36

Tabla IV 40

ABREVIATURAS

ADA: American Diabetes Association
AGEs Products : Advanced glycation end products
APAF-1: Protease activating factor-1
CARD:Death-fold caspase recruitment domain
CE: Células endoteliales.
CMR: Centro Medico "La Raza"
cPLA2: Isoforma citoplasmática de fosfolipasa A²
DM: Diabetes Mellitus
eNOS: Epithelial Nitric Oxide Synthase
ESM: Escuela Superior de Medicina
FADD: Fas associated Death Domain
Fas: Fibroblast associated (CD95)
FasL: Ligando de CD95
FT: Factor Tisular
GLUT-4: Isoforma del transportadora de glucosa-4
GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GR: Glutación reductasa
GSHPx: Glutación peroxidasa
HbA1c: Hemoglobina glicada
fMLP: N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
G-CSF: Granulocyte colony stimulating factor
IAP: Inhibitor of apoptosis protein
ICAM-1: Intercellular adhesion molecule-1
IL-1: Interleucina-1
IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social
IGF: Insulin-like growth factor-1
INF-g: Interferón gama
IPN: Instituto Politécnico Nacional
IP-3: Fosfatidil-inositol-3-fosfato
IRS-1: Insulin receptor substrate-1
LDL-ox: Lipoproteína de baja densidad oxidada
LPS: Lipopolisacárido
MCP 1: Monocyte chemotactic protein-1
MOMP: Permeabilización de la membrana mitocondrial
NADPH: Nicotinamida adeninucleótido fosfato (reducido)
NO: Óxido nítrico
OMS: Organización mundial de la salud
PKC: Proteínkinasa C
POD: Conjugado con peroxida
RAGEs: Receptor advanced glycation end products
ROS: Reactive oxygen species
Sp-1: Proteína estimulante de la transcripción (factor de transcripción-1)
TGF-b: Transforming growth factor-beta
TNF-a: Tumor necrosis factor-alfa
TUNEL: Terminal-deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end labelling
VCAM: Vascular cell adhesion molecule
VEGF: Vascular endothelial growth factor

RESUMEN

Papel de la apoptosis en endotelio vascular y daño tisular del pie diabético infectado.

La diabetes mellitus es la causa más frecuente de polineuropatía, insuficiencia renal crónica, ceguera en el paciente adulto y es responsable de 50 a 95% de amputaciones en extremidades inferiores de causa no traumática. Aunque los mecanismos de daño vascular por hiperglucemia se han estudiado ampliamente, no se ha dilucidado por completo el papel de la apoptosis en el daño tisular en estos pacientes cuando además cursan con un proceso infeccioso. El objetivo es identificar apoptosis en tejido vascular de pacientes con pie diabético infectado. Para la detección de células en apoptosis se utilizó la técnica de TUNEL *in situ*. El tamaño de la muestra fue de 10 pacientes. En 7 sujetos se documentó placas de ateroma con estenosis mayor del 50%, hemodinámicamente significativas. En los 5 pacientes en quienes se realizó amputación supracondílea se estableció una presión sistólica del pie <0.45. Los tejidos sometidos a identificación de apoptosis fueron positivos y correspondieron a pacientes con grave repercusión sistémica y proceso isquémico asociado a hipoxia tisular y acidosis metabólica. Se encontró células apoptóticas que correspondieron a polimorfonucleares, macrófagos, células endoteliales y células musculares lisas, asociadas a fibrina. Nuestras conclusiones sugieren, que la identificación de apoptosis se asocia con la magnitud del daño vascular. Posiblemente la hipoxia induce apoptosis y esta a su vez se asocia a inestabilidad de la placa ateromatosa, lo que condiciona la obstrucción aguda.

SUMMARY

Role of apoptosis of the vascular endothelium in the tissue damage of the infected diabetic foot.

Diabetes mellitus is the most frequent cause of polyneuropathy, chronic renal insufficiency, blindness in the adult patient, and is responsible for 50 to 95% of non traumatic limb amputations. Although the mechanisms of vascular damage by hyperglucemia have been extensively studied, it remains unclear the role of apoptosis in the tissue damage of patients bearing soft tissue infections. Therefore, this study was designed with the aim to identify apoptosis in vascular cells of patients with diabetic infected foot.

The TUNEL *in situ* technique was used to detect cells in apoptosis in ten patients included in this protocol. In seven individuals, the histological assessment showed atheroma plaques, which were haemodynamically significant with 50% stenosis. In five patients, which required foot amputation, a systolic blood pressure of the foot <0.45 mmHg was observed. Tissue slides from paraffin embedded biopsies demonstrated apoptotic cells in samples from patients with severe ischemic process associated with tissular hypoxia and metabolic acidosis.

It was observed, that most apoptotic cells corresponded to neutrophils, macrophages, endothelial and smooth muscular cells, and were associated with fibrin deposits. These results suggest, that apoptosis may be associated with the vascular damage extent. This process may be associated to hypoxia and may produce atheroma plaque instability and drive to the acute vascular obstruction usually observed in these patients.

ANTECEDENTES.

I DIABETES MELLITUS

Clasificación

La Asociación Americana de Diabetes (ADA) divide la diabetes mellitus (DM) en tipo 1 (deficiencia absoluta de insulina) y tipo 2 (resistencia a insulina con inadecuada respuesta compensatoria en la secreción de insulina), además de considerar a la diabetes gestacional y otros tipos específicos. La ADA define el diagnóstico de DM con cifras de glucemia en ayuno \geq a 126 mg/dl, pero debido al riesgo de enfermedad microvascular asociado a hiperglucemia algunos autores recomiendan disminuir este parámetro. También se define la DM con cifras de glucosa en sangre \geq a 200 mg/dl después de 2 horas de una carga de glucosa de 75 gramos por vía oral o mediante una glucemia causal (no en ayuno). Tanto la "alteración de tolerancia a la glucosa", (glucemia en ayunas \geq a 110 mg/dl pero $<$ a 126 mg/dl), como la "intolerancia a la glucosa" (glucemia \geq 140 mg/dl pero $<$ de 200 mg/dl post-carga de glucosa) son consideradas como factores de riesgo de diabetes y enfermedad vascular (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997). Aunque la DM tipo 1 y tipo 2 comparten el estado hiperglucémico, su fisiopatología es muy diferente. En la DM 1, la hiperglucemia se presenta por destrucción autoinmunitaria de células β y deficiencia absoluta de la secreción de insulina. En cambio, aunque en la DM 2 intervienen factores genéticos y ambientales, la resistencia a la insulina es una característica cardinal además de la función deficiente de las células β del páncreas, con la consecuente falta de acción de la insulina. Los tejidos periféricos e hígado se hacen resistentes a la acción de la hormona, además de presentarse trastornos en el metabolismo de los ácidos grasos libres que alteran el metabolismo de la glucosa intracelular (Zimmet, 1995) y que constituyen un síndrome caracterizado por enfermedad cardiovascular aterosclerosa, obesidad, hipertensión arterial, neuropatía periférica, dislipidemia e hiperinsulinemia (Reaven, 1988)

Panorama Epidemiológico

La DM es un síndrome caracterizado por hiperglucemia crónica y alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos, relacionadas con deficiencia absoluta o relativa de la secreción y/o acción de la insulina, que conducen a la aparición de trastornos en el metabolismo de la micro y macrovasculatura, lo cual afecta a la mayor parte de los órganos y las funciones que éstos desarrollan en el cuerpo humano.

La DM es la causa más frecuente de polineuropatía, insuficiencia renal crónica, ceguera en el paciente adulto y es responsable del 40% de todas las amputaciones no traumáticas (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997).

La Organización Mundial de la Salud calcula que existen alrededor de 140 millones de diabéticos en el mundo, el doble de personas afectadas actualmente en comparación con 1994; también considera que serán 220 millones los enfermos en el año 2010, cifra que se elevará a 300 millones en los próximos 25 años y que serán principalmente afectados los países en vías de desarrollo (King, 1993).

México ocupa el 9º lugar mundial en incidencia de diabetes mellitus y de seguir la tendencia actual, se ubicará en el séptimo sitio con 12 millones de enfermos en 2025. La prevalencia de diabetes en México es también de las más altas del mundo, afecta a individuos en edad productiva, si consideramos que más del 50% de los pacientes registrados en la Secretaría de Salud tienen entre 35 y 60 años de edad (Secretaría de Programación y Presupuesto, 1990).

Fisiopatología del daño vascular en la diabetes

La resistencia a la insulina puede deberse a defectos intrínsecos del receptor, a defectos en los mecanismos de transporte de la glucosa al interior celular y por alteraciones en las vías de señalización. Se describe como una respuesta biológica anormal a una determinada concentración de insulina, de hecho, es un estado de hiperinsulinemia que se presenta como mecanismo compensador de la hiperglucemia. La resistencia a la insulina puede ocurrir en cualquier punto de la vía de señalización que lleva a la introducción de la glucosa a la célula. Este proceso implica la unión de la insulina a su receptor en la membrana celular, lo que induce autofosforilación de los dominios citoplasmáticos que adquieren actividad de proteínquinasa y fosforilan otras proteínas como la IRS-1 (insulin receptor substrate-1) que se une a IP-3 (fosfatidil-inositol-3-fosfato). El complejo IRS-1/IP-3 induce a su vez la fosforilación de diversas moléculas con capacidad de señalización intracelular que llevan, entre otras acciones a la movilización de vesículas intracelulares que contienen la proteína transportadora de glucosa GLUT-4 desde el citosol a la membrana celular (Olefsky & Nolan, 1995). Cualquiera que sea el defecto en la utilización de la glucosa, como consecuencia de la hiperglucemia sostenida en el curso de la DM, se dañan diversos tejidos de manera crónica, causando microangiopatía (que afecta importantemente retina, riñones y nervios periféricos) y macroangiopatía (que altera principalmente a las arterias periféricas de las extremidades inferiores, vasos cerebrales y arterias coronarias) (Nathan, 1993).

Se han identificado 4 mecanismos que llevan al daño vascular que produce la hiperglucemia (Figura 1). Primero, el incremento en el metabolismo de la glucosa a través de la vía de los polioles, la cual depende de la enzima aldosa-reductasa y que lleva a la producción de sorbitol y fructosa,

que son compuestos con gran capacidad osmótica. Se ha propuesto que esta vía metabólica incrementa además el estrés oxidativo intracelular porque la aldosa-reductasa consume el NADPH que se requiere para regenerar el glutatión reducido.

El segundo mecanismo consistente en la formación de productos terminales de glucosilación avanzada (AGEs, advanced glycation end-products), los cuales son un grupo heterogéneo de sustratos (fundamentalmente proteínas) que se acumulan después de hiperglucemia prolongada. Anteriormente se consideraba que estos productos se generaban de manera independiente de enzimas, por la interacción de la glucosa con proteínas extracelulares, sin embargo, hoy en día se sabe que la hiperglucemia intracelular es crítica para la formación de AGEs intra y extracelulares e involucra la formación de glioxal, metilglioxal y 3-desoxiglicosa, los cuáles son capaces de reaccionar con los grupos amino libres de las proteínas. Así mismo, la glucosilación de las proteínas provoca daño por tres vías: altera su función metabólica, afecta la interacción de proteínas de las matrices extracelulares como la fibronectina y por último la interacción de AGEs con receptores en células endoteliales induce la producción de reactivos de oxígeno (ROS, reactive oxygen species) y la activación de NF- κ B con la consecuente producción anormal de varias citocinas como TNF, TGF- β , GM-CSF, IL-1, IGF-1, G-CSF.

El tercer mecanismo de daño vascular por hiperglucemia implica la activación anormal de la PKC (proteínquinasa C). La hiperglucemia intracelular aumenta la cantidad de DAG (diacilglicerol) lo cual origina la activación de 9 isoformas de PKC con consecuencias metabólicas diversas, entre las que destacan la disminución de la producción de eNOS (óxido nítrico sintasa isoforma endotelial) y el incremento de VEGF y TGF- β , lo que conduce a la disminución del flujo sanguíneo y estimulación de angiogénesis y fibrosis.

Finalmente, el cuarto mecanismo de daño vascular depende de la vía metabólica de la hexosamina. La glucosa-6-fosfato se convierte en glucosamina-6-fosfato y ésta a su vez en UDP-N-acetil glucosamina, la cual al unirse a factores de transcripción como Sp-1, incrementa su eficiencia para la transcripción de citocinas como TGF- α o TGF- β .

Estos cuatro mecanismos de daño vascular por hiperglucemia convergen en la superproducción de ROS en el sistema de transporte electrónico de las mitocondrias debido a que incrementa la producción de donadores de electrones en el ciclo del ácido tricarboxílico (Brownlee, 1992; Brownlee, 2001)

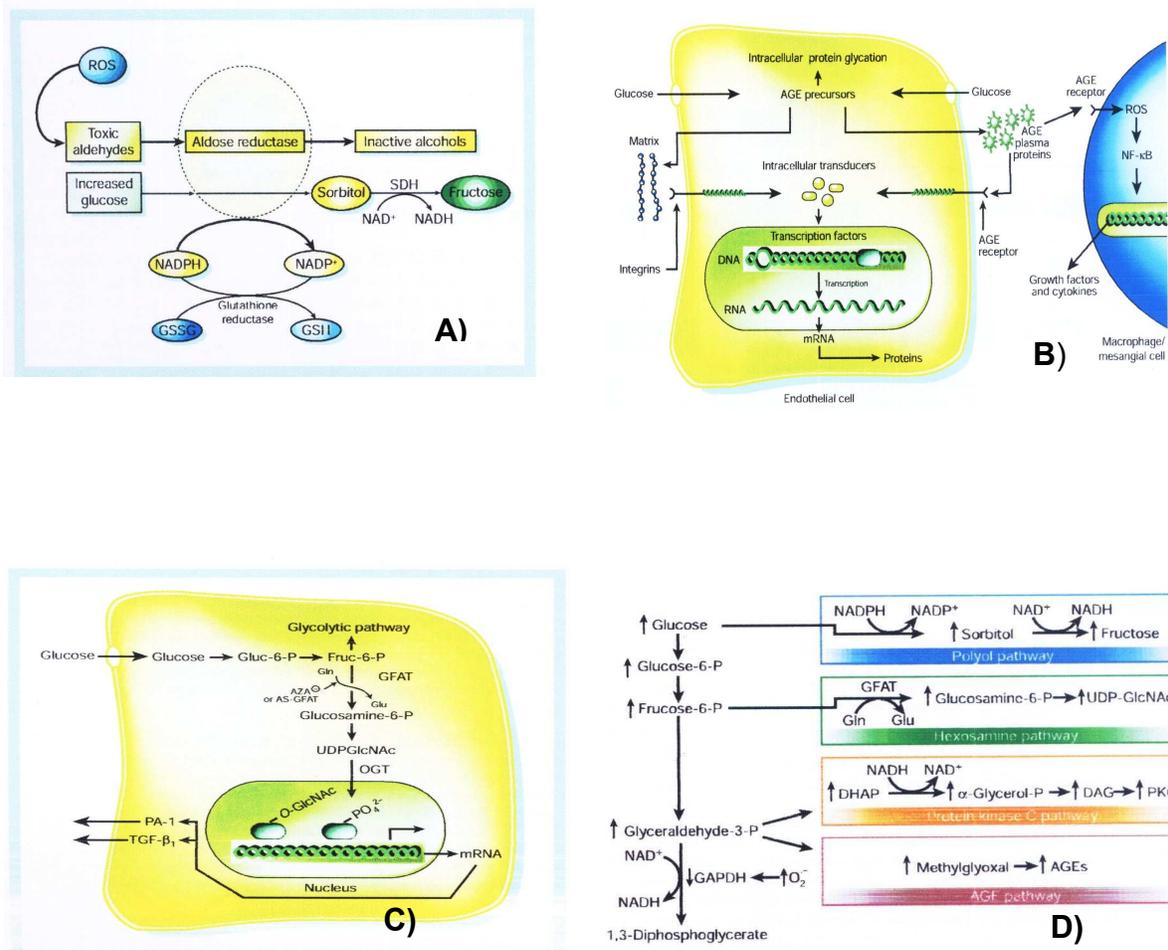


Figura 1: Mecanismos de daño vascular (Brownlee, 2001)

A) Vía de los polioles a través de la aldosa-reductasa

B) Glucosilación de proteínas

C) Activación de la vía metabólica a través de la hexosamina

D) Incremento del estrés oxidativo y resumen de los 4 mecanismos de daño

Entre las moléculas que parecen afectarse por la glicación están la antitrombina III, la hemoglobina (que genera un compuesto con movilidad electroforética distinta: hemoglobina glicada) y que se ha empleado con éxito en la vigilancia a largo plazo del control glucémico, las lipoproteínas de baja densidad LDL, el factor de crecimiento de los fibroblastos y algunas proteínas de membrana de leucocitos sufren modificaciones en su estructura confiriéndole una mayor rigidez y función disminuida en quimiotaxis, fagocitosis y potencia bactericida. (Brownlee, 1992; Cameron & Cotter, 1997)

Diabetes Mellitus y complicaciones vasculares en los miembros inferiores:

Pie diabético

Aproximadamente un 20% de los pacientes diabéticos desarrollarán úlceras del pie en algún momento de su vida. Según diferentes estudios, entre el 50 y el 95% de los casos de amputaciones de extremidades inferiores de causa no traumática, corresponden a pacientes diabéticos. La enfermedad arterial periférica oclusiva es cuatro veces más frecuente en el diabético que en el no diabético (Lee *et al.*, 1993). Este resultado se confirma por el hecho de que más de la mitad de los pacientes ingresados en un servicio de cirugía por proceso vascular sufre de DM (Donley *et al.*, 2001).

En hombres menores de 80 años, casi dos tercios de los casos de gangrena arteriosclerótica son resultado de diabetes. En un 40% de los pacientes amputados se produce una segunda amputación en los cinco años siguientes, con una mortalidad del 50% dentro de los tres primeros (Most & Sinnock, 1983).

La entidad nosológica conocida como pie diabético es un síndrome crónico y complejo de la diabetes mellitus que enfrenta problemas en su definición. La Organización Mundial de la Salud (OMS) lo define como la infección, ulceración y destrucción de tejidos profundos de la extremidad inferior asociadas con alteraciones neurológicas y diversos grados de enfermedad vascular periférica (Jeffcoate, Macfarlane & Fletcher, 1993).

Su etiología es multifactorial y muy a menudo se deriva de neuropatía sensitivomotora o autónoma, angiopatía e inmunocompromiso. La hiperglucemia persistente es el sustrato del daño neuropático del endotelio vascular, de las capas arteriales y de la actividad inmunitaria. La enfermedad microvascular es un problema significativo para los pacientes diabéticos y también coadyuva a la ulceración del pie. La oclusión arterial en miembros inferiores típicamente involucra las arterias tibial y peroneal, pero respeta la arteria pedía dorsal. Se sospecha la presencia de isquemia en la extremidad por una combinación de signos y síntomas clínicos más resultados anormales de pruebas vasculares no invasivas. Los signos y síntomas incluyen claudicación, dolor que ocurre al colocar el pie en posición de descanso ó arquearlo, ausencia de pulso poplíteo o tibial posterior, piel delgada y brillante, ausencia de vello, uñas delgadas y quebradizas, enrojecimiento del área cuando el pie se encuentra colgando, y dolor intenso y palidez de la extremidad cuando se eleva (Reiber, Pecoraro & Koepsell, 1992). La isquemia contribuye a la persistencia o incremento de la infección al impedir la adecuada oxigenación de los tejidos y el correcto flujo de elementos de defensa en el sitio de la lesión. (Figura 2)

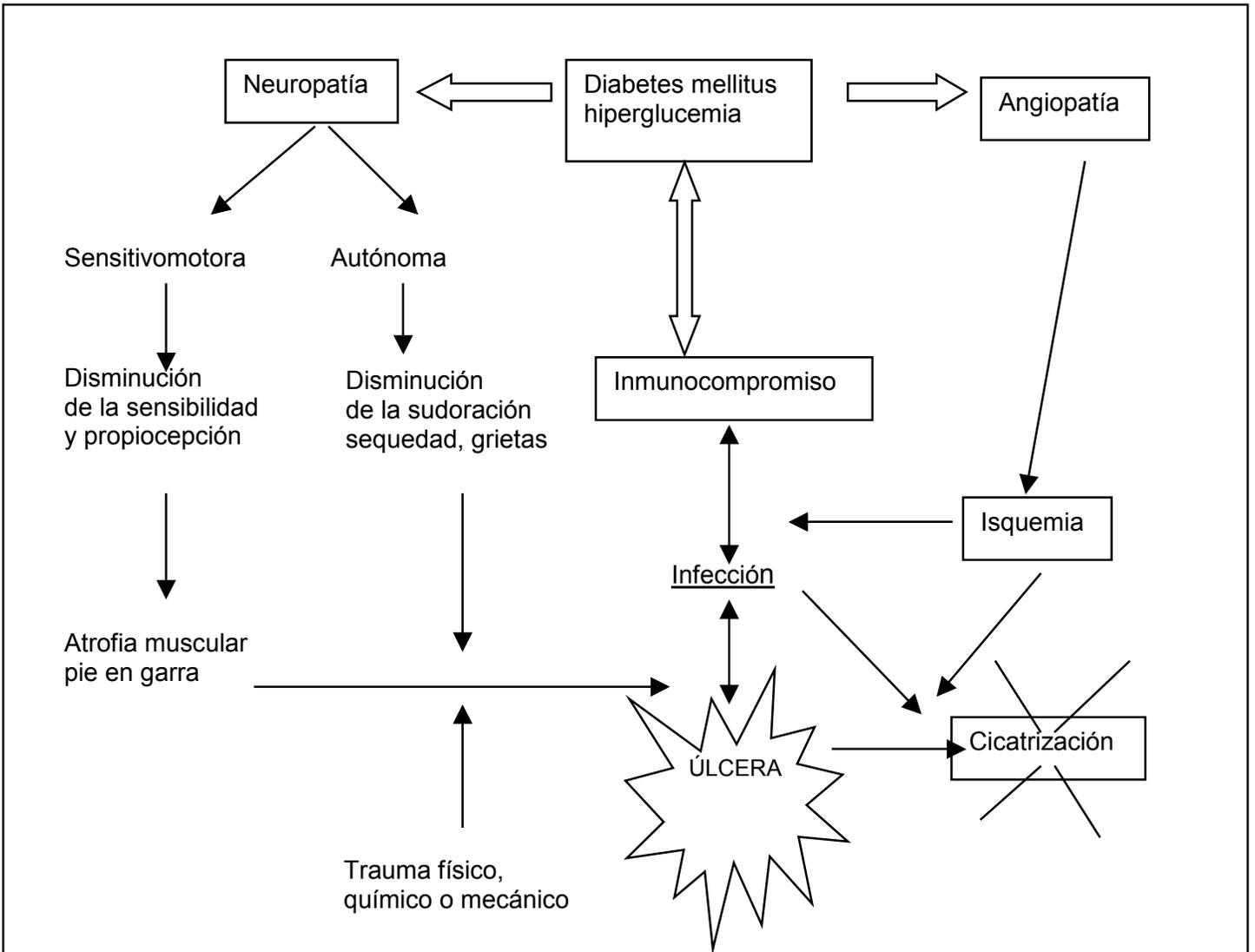


Fig. 2 Fisiopatología del pie diabético

Dr. Martínez de Jesús Fermín, (2003). Pie Diabético
Atención Integral, México: Mc Graw Hill

Entre las indicaciones frecuentes para realizar algún tipo de amputación en pacientes con pie diabético, se incluyen la existencia de dolor isquémico en reposo, úlcera isquémica o neuropatía que no cicatriza; la presencia de complicaciones que ponen en peligro la vida del paciente; las fallas en la revascularización y las lesiones graves que no se han podido controlar y que han ocasionado pérdidas extensas del tejido. El nivel de amputación se establece de acuerdo a edad, extensión y profundidad de la lesión, gravedad de la septicemia, afección vascular, afección neuropática, viabilidad hística y movilidad limitada del paciente (Reiber, Pecoraro & Koepsell, 1992).

La categorización de las lesiones es primordial para establecer y definir el grado de participación de estos factores. Para determinar la extensión en relación a superficie corporal afectada y profundidad de los tejidos afectados, se utiliza la clasificación para úlceras y lesiones pre-ulcerativas del síndrome de pie diabético, según Wagner modificada (1995) Anexo I.

Existen diferentes métodos de diagnóstico para la afección vascular que forma parte del pie diabético. La angiografía (procedimiento invasivo con penetración corporal) utiliza criterios anatómicos, como la medición del diámetro transversal de la luz arterial.

La evaluación vascular no invasiva incluye la ecografía Doppler color, que permite visualizar el vaso explorado y aporta detalles acerca de la morfología del mismo, lo que permite calcular la velocidad del flujo y es factible obtener una imagen de relleno del vaso que ayuda a distinguir la interfase de la pared, mejorando así la visualización del contorno y la morfología de la placa para proporcionar información acerca de la dirección del flujo.

La medición transcutánea de oxígeno (O_2), ayuda a predecir con mucha precisión el grado de severidad de la isquemia.

Finalmente, no existen pruebas más sencillas, y a la vez útiles en la valoración de la gravedad de la patología arterial oclusiva que la presión en el tobillo y la presión sistólica absoluta del pie, sin embargo, como dependen de la tensión arterial central, se utiliza su comparación con la presión arterial en el miembro superior para neutralizar esta influencia: el resultado, es el índice tobillo/brazo (ITB). Esta técnica ayuda a localizar, al menos aproximadamente, el nivel de la lesión y a clasificar en cuanto a su gravedad el problema. (Bacharach *et al.*, 1992; Dormandy & Rutherford, 2000) Anexos II, III, IV

Inmunidad en Diabetes Mellitus

La DM se caracteriza por un estado de activación continuo y crónico de diversas células del sistema inmunológico innato, principalmente monocitos-macrófagos y neutrófilos, que conduce a la producción de ROS (reactive oxygen species) y de citocinas proinflamatorias. De hecho, estas citocinas pueden estar elevadas aún antes de tener manifestaciones clínicas de diabetes. En un estudio prospectivo se encontró que los niveles elevados de IL-6 y proteína C reactiva son factores de riesgo para el desarrollo de diabetes (Pradhan *et al.*, 2001). En la DM se presenta una acumulación acelerada de AGEs que está muy relacionada con la hiperglucemia sostenida por la resistencia periférica a la insulina, pero que se incrementa en cuanto se ingieren grasas y proteínas, que llevan a lipoperoxidación (Wong *et al.*, 2003). La producción de AGEs incrementa el estallido respiratorio, el cual requiere de la NADPH oxidasa, de ácido araquidónico y de cPLA2 y lleva a la producción de ROS (Mohanty *et al.*, 2002). Aparentemente, los AGEs son necesarios, pero no suficientes para inducir la producción de ROS, pues *in vitro* requieren de un coestímulo como fMLP (N-formil-metionil-leucil-fenilalanina) (Wong *et al.*, 2003) y parecen depender de respuestas a estímulos a través de receptores acoplados a proteína G (Mohanty *et al.*, 2002). Además, en situaciones de hiperglucemia severa la NADPH interviene en la vía metabólica de los polioles dependiente de la aldosa reductasa que convierte la glucosa en sorbitol, lo que puede interferir con la fagocitosis mediada por opsonización (Mazade & Edwards, 2001; McManus *et al.*, 2001). Los neutrófilos contienen además RAGEs (Receptor advanced glycation end products) que pueden mediar fagocitosis de proteínas glicadas, pero este mecanismo parece interferir con la capacidad bactericida del neutrófilo (Collison *et al.*, 2002). La fluidez de su membrana (LoPresti *et al.*, 1999; Caimi *et al.*, 2000) y la movilización de calcio (Advani, Marshall & Thomas, 2004) también se encuentran disminuidas en los neutrófilos de pacientes diabéticos, por lo que son más rígidos (Athanasios *et al.*, 2000) y no pueden translocar el calcio, que permanece en el citosol. Aunque algunos autores reportan que las enzimas de los neutrófilos se encuentran incluso incrementadas en los pacientes diabéticos, (Llorente *et al.*, 2000; Piwowar, Knapik-Kordecka & Warwas, 2000); se ha descrito que las SOD (superóxido dismutasas), (Uchimura *et al.*, 1999) la GSHPx (glutación peroxidasa) y la GR (glutación reductasa) (Muchova *et al.*, 1999) presentan menor actividad en estos pacientes.

II APOPTOSIS

Las células pueden morir por cualquiera de dos mecanismos principales: necrosis o apoptosis. Necrosis es la muerte de células a través de daño extremo, usualmente mediada por destrucción de la membrana plasmática o del soporte bioquímico de su integridad, liberando sus componentes alrededor del tejido dañado y con atracción de células inflamatorias, llevando a la destrucción característica de inflamación (Willingham, 1999).

La apoptosis, también conocida como muerte celular programada, se caracteriza por condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos que son eliminados por fagocitos adyacentes, por lo que no provoca respuesta inflamatoria. Se trata de un mecanismo que permite la eliminación ordenada de células y, por tanto, participa en la morfogénesis, ontogenia y fisiología de las células, así como en la homeostasis de los aparatos y sistemas. Ocurre en el organismo adulto para controlar la masa celular de algunos órganos como el hígado, asimismo en el recambio continuo de algunos epitelios y en el funcionamiento del sistema inmunitario. Aunque el proceso se desarrolla en varias horas, la remoción de los fragmentos apoptóticos es tan rápida que raramente se identifican células apoptóticas en condiciones normales (Kerr, Wyllie & Currie, 1972).

Una de las características distintivas de la apoptosis es la fragmentación del DNA en multímeros de nucleosoma y la fragmentación del núcleo. La nucleasa que degrada al DNA internucleosomal, llamada Casp/Chc/Dff40, se activa por proteólisis mediada por caspasas (Enari *et al.*, 1998). Para desensamblar la membrana nuclear, proteínas como las láminas y NuMA (Nuclear Mitotic Apparatus Protein) se cortan también durante la apoptosis.

La apoptosis es un proceso complejo en el que participan en cascada un grupo de cistein-proteasas, con especificidad sobre residuos de aspartato, presentes en las células normales como zimógenos inactivos, conocidas como caspasas. Cuando las células inician la apoptosis, las caspasas se activan a través de cortes proteolíticos. Poseen un prodominio *N*-terminal, cuyo tamaño del varía; las caspasas con prodominio grande en general participan en la iniciación de la apoptosis, por lo que se les denomina iniciadoras (8, y 10) y poseen DED (death effector domain), esencial para la interacción con proteínas adaptadoras; mientras que las que poseen prodominios pequeños son denominadas efectoras (3,6 y 7) (Enari *et al.*, 1998).

Esta dicotomía, de hecho define dos vías por las cuales una célula puede sufrir apoptosis: la extrínseca y la intrínseca; la primera depende de receptores celulares de la familia del TNFR, entre los que se incluyen el TNFR1, DR3/TNF y Fas (Romeo *et al.*, 2002). Estos receptores forman trímeros y contienen dominios intracitoplasmáticos, llamados DD (dominios de muerte). Cuando estos receptores se unen a sus ligandos en el exterior de la célula, los DD se unen a proteínas adaptadoras FADD (Fas associated DD) a excepción del TNFR1 que primero se une a TRADD. FADD tiene un dominio efector (DED) que a su vez se une a las caspasas iniciadoras 8 y 10, formando el "complejo inductor de la señalización de muerte". La caspasa 8, una vez activada,

procesa a los zimógenos de las efectoras como procaspasas 3,6 y 7, para producir la muerte celular.

Por otro lado, en la vía intrínseca o mitocondrial, la membrana de este organelo se permeabiliza por alteraciones celulares como hipoxia (Romeo *et al.*, 2002) o disminución en el transporte de glucosa (Ramana *et al.*, 2003). Esta vía depende de caspasas iniciadoras (caspasas 9) que se unen mediante dominios denominados CARD (death-fold caspase recruitment domain) a APAF-1 (protease activating factor-1), el cual se encuentra como monómero en el citosol, pero que al activarse por acción del citocromo C, forma polímeros conocidos como apoptosomas (Figura 3).

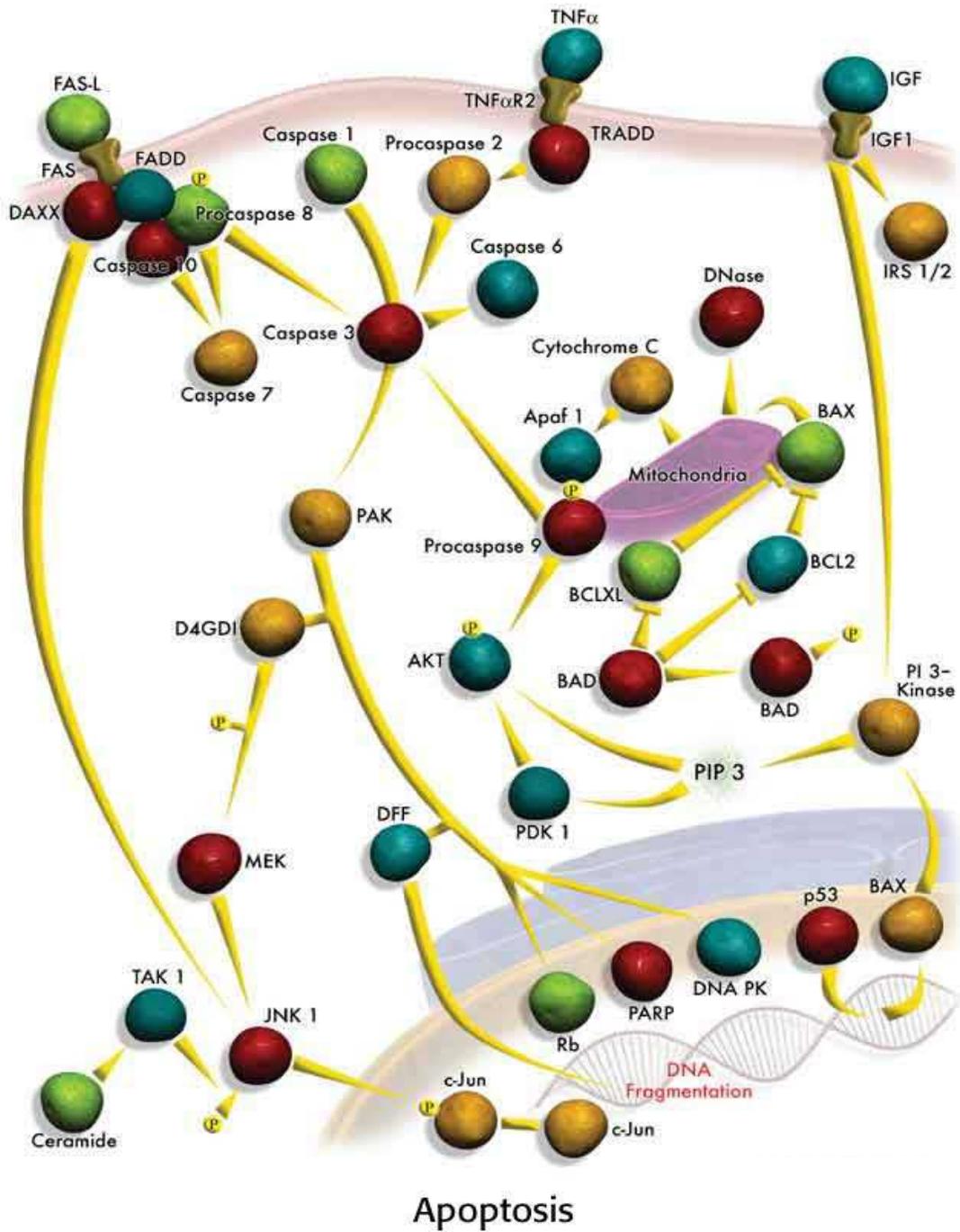
En condiciones normales APAF-1 se encuentra separado del citocromo C por la membrana mitocondrial; cuando por alguna razón esta membrana se permeabiliza, este último se libera al citosol y se inicia la cascada de eventos que lleva a la apoptosis.

El proceso de permeabilización de la membrana mitocondrial (MOMP) se encuentra regulado por proteínas pertenecientes a la familia de Bcl-2. Estas proteínas pueden dividirse en dos grupos: antiapoptóticas y proapoptóticas. Las primeras (Bcl2, Bcl-x, Bcl-xl, A1, Bcl-w y Mcl-1) previenen la permeabilización de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo C.

Las proteínas proapoptóticas, a su vez pueden dividirse en dos subgrupos, que tienen tres dominios BH (Bcl-2 homology domains) y por tanto se denominan BH123; entre las que se incluyen Bax, Bak y Bok. Aunque estas proteínas pueden mediar la permeabilización de la membrana mitocondrial por sí solas, pueden también activarse por el otro subgrupo de proteínas proapoptóticas, la familia Bcl-2, que contienen un solo dominio BH (por lo que se denominan BH3), entre las que se incluyen Bim, Bid, Bad, Bmf, BNIP-3, Puma y Noxa (Siesjo *et al.*, 1996).

Existen otras proteínas que pueden promover la muerte o la sobrevida celular, que se liberan cuando se permeabiliza la membrana mitocondrial; entre ellas se encuentran EndoG (endonuclease G) y AIF (apoptosis-inducing factor), que pueden promover muerte celular de manera independiente a la activación de caspasas y otras proteínas, como Smac/DIABLO y Omi/HTRA2 que promueven apoptosis porque interfieren con la actividad de IAP (inhibitor of apoptosis protein).

Figura 3. Vías de Señalización a través de receptores de muerte



<http://www.upstatebiotech.com/browse/categories/apoptosis.asp>

Durante el proceso de apoptosis se presentan cambios celulares morfológicos y fisiológicos desde etapas tempranas, los cuales pueden ser detectados por diversas técnicas de laboratorio. Entre los primeros cambios de una célula en apoptosis se encuentra la exposición de la fosfatidil-serina en la superficie, la cual puede determinarse por su capacidad de unir Anexina V; también el aumento de la permeabilidad celular que puede medirse por la captación de yoduro de propidio mediante citometría de flujo. La actividad de caspasas puede ser determinada directamente o mediante la detección de anticuerpos específicos contra los productos de su proteólisis. El rompimiento del DNA celular puede determinarse mediante electroforesis o bien mediante TUNEL (terminal-deoxinucleotidyl-transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end labelling) (Seghatchiana & de Sousa, 2003).

Si bien la apoptosis es un proceso normal e importante para mantener la homeostasis del organismo, se han descrito múltiples padecimientos donde se encuentra desregulada. En general, tanto la supervivencia como la muerte celular son eventos que pueden contribuir a la fisiopatología de diversos padecimientos, tanto a nivel local en tejidos como a nivel sistémico. Se ha descrito disminución de apoptosis de leucocitos de sangre periférica (linfocitos) en leucemias (Yi *et al.*, 2004; Halicka *et al.*, 1997) y aumento de células apoptóticas en padecimientos como SIDA, (Losa & Graber, 2000; Carbonari, Cibati & Fiorilli, 1995) mononucleosis infecciosa, (Taga *et al.*, 2000) asma y rinitis alérgica, (Grzegorzcyk *et al.*, 2002) sepsis, (Bilbault *et al.*, 2004; Hotchkiss, Tinsley & Karl, 2003) Lupus Eritematoso Sistémico (Ren *et al.*, 2003) e incluso se le ha relacionado con reacciones transfusionales (Seghatchiana & de Sousa, 2003). Existe la posibilidad de encontrar apoptosis “espontánea” por LPS o hipoxia en el paciente diabético. Es relevante mencionar que la hiperglucemia potencia el efecto citotóxico del LPS y la isquemia (Wang *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001). Es factible encontrar apoptosis de células en sangre periférica cuando se presenta cetoacidosis. Aunque se ha descrito que la acidificación del medio de cultivo *in vitro* induce activación de neutrófilos, sobrerregulación de CD18 y disminución de apoptosis (Hannon-Fletcher *et al.*, 2000; Trevani *et al.*, 1999), hay evidencia que en condiciones de hiperglucemia y metabolismo anaerobio con formación de cuerpos cetónicos *in vivo*, se presenta apoptosis. En ratas hiperglucémicas se presenta daño cerebral cuando hay isquemia debido a la producción de lactato que lleva a acidosis intra y extracelular, de hecho, el daño celular intrínseco que causa la isquemia, se potencia por el incremento en la producción de radicales libres, la falla mitocondrial y la activación de endonucleasas (Siesjo *et al.*, 1996). Estas observaciones concuerdan con el hecho de que los pacientes con DM 1, que cursan con cetosis y niveles elevados de cuerpos cetónicos de acetoacetato y triglicéridos, presentan daño oxidativo de células de sangre periférica y apoptosis que puede disminuir la cantidad de monocitos circulantes (Jain, Kannan & McVie, 1999). Así

mismo, se ha demostrado que las plaquetas pueden agregar fagocitos apoptóticos causando trombosis, respuesta inflamatoria y daño vascular (Hartz, Menart & Tschoepe, 2003).

Existe evidencia de que la apoptosis participa en diversos procesos fisiopatológicos en la diabetes. Se le ha relacionado a neurodegeneración, pues se ha observado que en ratas diabéticas se presenta apoptosis de neuronas productoras de vasopresina (Hartz, Menart & Tschoepe, 2003), de neuronas corticales, del hipotálamo y de ganglios espinales (Schmeichel, Schmelzer & Low, 2003). En cultivos primarios de microglia de rata se presenta apoptosis en presencia de altas concentraciones de glucosa, con un efecto sinérgico si además se agrega lipopolisacárido (LPS) (Wang *et al.*, 2001) y existe evidencia de que en pacientes diabéticos puede haber apoptosis asociada a neuropatía, pero no con la claridad que se observa en el modelo de rata diabética (Vincent, Brownlee & Russell, 2002).

Tanto en ratas diabéticas (Sugiyama *et al.*, 2004; Kowluru & Abbas, 2003) como en pacientes diabéticos se presenta apoptosis en células de endotelio capilar de retina (Romeo *et al.*, 2002; Ramana *et al.*, 2003), lo que contribuye al desarrollo de la retinopatía. También en líneas celulares epiteliales de cristalino cultivadas con altas concentraciones de glucosa se presenta apoptosis (Ramana *et al.*, 2003), observación consistente con el modelo de ratas diabéticas, en las cuales se observa apoptosis en células epiteliales de cristalino. Sin embargo, en los pacientes diabéticos aunque hay apoptosis de estas células, no parece correlacionar con el desarrollo y extensión de catarata (Takamura *et al.*, 2001). Por otro lado, en células de túbulo proximal de riñón humano cultivadas con altas concentraciones de glucosa también se presenta apoptosis (Verzola *et al.*, 2004), condición que es consistente con la nefropatía que se presenta *in vivo* en ratas diabéticas (Bamri-Ezzine *et al.*, 2003).

Análogamente *in vitro* las células mesangiales murinas y humanas (Kang *et al.*, 2003), las células endoteliales (Recchioni *et al.*, 2002) o de músculo liso (Peiro *et al.*, 2001) de aorta humana, los miocitos de corazón, (Fiordaliso *et al.*, 2001) y el miocardio de ratones diabéticos (Cai *et al.*, 2002) sufren apoptosis si se cultivan en presencia de altas concentraciones de glucosa, lo cual es consistente con el hecho de que en ratas diabéticas se encuentran células apoptóticas en la aorta (Chu *et al.*, 1997) y que la perfusión *ex vivo* de corazones de rata causa apoptosis. Por ello, se considera que la apoptosis participa en la aterogénesis (Ceriello *et al.*, 2002).

Finalmente, debe destacarse que entre los mecanismos de apoptosis que se asocian a las alteraciones arriba mencionadas, se encuentran la formación de ROS (Napoli, de Nigris & Palinski, 2001), la desestabilización de la membrana mitocondrial con liberación de citocromo C y la inducción de citocinas proinflamatorias con la activación y translocación de NF- κ B (nuclear factor κ B) (Mandrup-Poulsen, 2003).

JUSTIFICACIÓN

La DM es una de las principales causas de morbilidad en consulta externa en México y desde hace varias décadas ocupa los primeros lugares de las estadísticas de mortalidad general. Los pacientes diabéticos requieren atención médica por los síntomas relacionados con hiperglucemia, por complicaciones agudas como cetoacidosis diabética o coma hiperosmolar y frecuentemente requieren amputación y la consecuente rehabilitación.

El pie diabético es una de las complicaciones más incapacitantes y con mayor mortalidad en la DM. La complejidad del síndrome del pie diabético dificulta al clínico determinar si la preservación de una extremidad es viable y a qué nivel debe hacerse la amputación. La decisión de establecer tratamiento radical, que involucra amputación de la extremidad y frecuentemente ampliación del procedimiento quirúrgico inicial, se fundamenta en criterios clínicos que dependen de la propagación y repercusión sistémica de la infección, pero sobre todo del estado vascular de la extremidad y la experiencia del cirujano (Most & Sinnock, 1983; Lee *et al.*, 1993; Reiber, Pecoraro & Koepsell, 1992).

El estudio realizado es pertinente pues pretende identificar datos tempranos de daño vascular que pueden desencadenar apoptosis. Con ello, se podrán instituir medidas preventivas o terapéuticas que permitan el diagnóstico temprano y el tratamiento oportuno de las complicaciones de los pacientes diabéticos, lo que impactará en una mejor calidad de vida.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los pacientes que cursan con DM 2 presentan un estado de activación continua, sostenida y crónica de diversas células del sistema inmunológico que induce la producción de diversos metabolitos con actividades citotóxicas y que inducen daño vascular y aterosclerosis. La apoptosis es un fenómeno que no se ha estudiado en células endoteliales de vasos periféricos de pacientes diabéticos, y es importante señalar que el grado de apoptosis en esos pacientes podría estar relacionado al grado de control metabólico y a la presencia de complicaciones (Lach-Szyrma & Brito-Babapulle, 1999; Graber *et al.*, 1999).

Se desconoce cual es el papel de la apoptosis en el daño vascular del paciente con pie diabético complicado; por ello, se pregunta de manera general:

¿Cuál es el papel de la apoptosis en los mecanismos de daño vascular y tisular en pacientes con pie diabético infectado?

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Objetivo General

Identificar el papel de la apoptosis en los mecanismos del daño vascular y tisular en pacientes con pie diabético infectado.

Objetivos Específicos

1. Definir una cohorte de pacientes diabéticos infectados.
2. Especificar daño vascular de extremidades inferiores, mediante estudios ecográficos (Doppler color), Índice T/B y medición transcutánea de O₂
3. Obtener muestras de tejidos blandos del miembro afectado
4. Determinar diagnóstico histopatológico de cada muestra
5. Identificar apoptosis por medio inmunohistoquímico
6. Establecer si existe asociación entre apoptosis y daño vascular.

HIPÓTESIS

“En los tejidos blandos de pacientes que cursan con pie diabético, existe liberación de citocinas proinflamatorias, reclutamiento de macrófagos y polimorfonucleares en las paredes del endotelio vascular, todo ello puede inducir apoptosis. Consecuentemente, la determinación de apoptosis podría tener correlación con la magnitud del daño vascular, con las alteraciones del flujo sanguíneo y podría predecir la evolución del miembro afectado.”

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Biomédica en Inmunología e Infectología y el servicio de Cirugía General del Hospital de Infectología “Daniel Méndez Hernández” del Centro Médico la Raza, con apoyo de la Unidad de Inmunología de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.

Se reunió una cohorte de 10 casos consecutivos de pacientes con diagnóstico de pie diabético infectado ingresados a éste hospital, del período comprendido entre Febrero-Diciembre 2003.

Se obtuvieron muestras de tejidos blandos de los pacientes diabéticos con una o ambas extremidades inferiores involucradas en proceso isquémico-infeccioso.

Como controles positivos para los estudios inmunohistoquímicos, se incluyeron 10 bloques incluidos en parafina, con diagnóstico histopatológico de cáncer de colon.

Equipo y reactivos para:

- a) realizar valoración clínica y de laboratorio de los pacientes
- b) evaluación del flujo sanguíneo de extremidades afectadas
- c) procesamiento histopatológico de las muestras
- d) realización de técnicas inmunohistoquímicas

Criterios de selección

Criterios de inclusión:

Pacientes con pie diabético complicado con proceso infeccioso, incluidos bajo los siguientes criterios:

Sexo femenino o masculino, portadores de DM 2.

Mayores de 18 años.

Criterios de exclusión:

Pacientes con falla orgánica múltiple no reversible.

Método

Definición de cohorte:

A su ingreso cada paciente fue sometido a exploración clínica completa y estudios preoperatorios durante la fase aguda de la enfermedad. La selección de los pacientes se basó en criterios clínicos que indicaron su estado hemodinámico: temperatura $> 38^{\circ}\text{C}$ o $< 36^{\circ}\text{C}$., frecuencia cardiaca (FC) $> 90/\text{min}$, frecuencia respiratoria (FR) $> 20/\text{min}$., o $\text{PaCO}_2 < 32\text{mmHg}$, presión arterial media (PAM) $< 70\text{ mmHg}$; así como el grado de afectación en extremidades, de acuerdo a la clasificación de Wagner (Anexos I-III).

Se consideraron los datos de laboratorio concernientes a: biometría hemática completa, pruebas de coagulación, creatínfosfoquinasa, electrolitos séricos, pruebas funcionales hepáticas y gasometría. También se valoró: tiempo de evolución previo al inicio de tratamiento médico, superficie de área corporal afectada y localización, tratamiento quirúrgico, tipo de gérmenes aerobios y anaerobios encontrados en biopsias de tejido para cultivo y obtenidas durante los actos quirúrgicos tanto iniciales como subsecuentes, días de estancia intrahospitalaria, número y tipo de complicaciones trans y postoperatorias (Anexo IV-V).

Los pacientes fueron sometidos a cirugía durante las primeras 48 hrs. de su ingreso.

EVALUACIÓN DE FLUJO SANGUÍNEO DE EXTREMIDADES AFECTADAS

1.- ESTUDIO DOPPLER COLOR

Se practicó ultrasonografía vascular de alta resolución y registro de velocidades de flujo sanguíneo mediante Doppler color, con un equipo Sonolayer Toshiba, modelo SSA-270A, con transductor lineal de 7.5 MHz. El estudio fue realizado en posición supina con evaluación de arterias periféricas, bifurcaciones y porciones proximales. Todos los estudios de Doppler color fueron realizados e interpretados por el mismo investigador (Médico Radiólogo), con el fin de eliminar el problema de validez interobservador.

En cada paciente se investigaron los siguientes datos:

- a) Engrosamiento de las tunicas íntima y media de las arterias.
- b) Presencia y características morfológicas de placas de ateroma.
- c) Medición del flujo sanguíneo y circulación colateral.

2.- DETERMINACIÓN DE INDICE TOBILLO/BRAQUIAL: Realizada por el investigador principal. La metodología del estudio se describe en el Anexo II. Los datos colectados para el estudio se refieren en los Anexos III y IV.

3.- MEDICIÓN TRANSCUTÁNEA DE O₂: Evaluación del nivel de isquemia en extremidades inferiores a través del oxímetro de pulso colocado por el anestesiólogo sobre el pulpejo del primer o segundo artejo en forma continua durante el acto quirúrgico.

OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS:

Las muestras fueron obtenidas durante el primer procedimiento quirúrgico al que fue sometido el paciente; mediante escisión de forma triangular y aproximadamente .5 cm de lado, que incluyó piel, tejido celular subcutáneo y músculo. El sitio de la toma se estandarizó a 15 cm proximales al foco infeccioso y macroscópicamente sin datos de inflamación.

Los tejidos fueron colectados y fijados por inmersión en formol al 10% en amortiguador fosfato 0.1M pH 7.2, embebidos en parafina, cortados a espesor de 5- μ m y montados sobre portaobjetos, que se distribuyeron alternados para los métodos de coloración topográfica y detección inmunohistoquímica de marcadores de apoptosis.

Para el estudio histopatológico se realizó tinción con H-E y se analizaron en microscopio óptico marca Zeiss.

Las laminillas se trataron con 0.3% Tritón X-100 (ICN Biomedicals; Aurora, OH) en PBS 0.1M por 15 minutos a temperatura ambiente (TA) y se lavaron en PBS 0.1M, pH 7.4, tres veces por 10 minutos a TA.

La recuperación de antígeno se llevó a cabo de la siguiente manera: las laminillas se sumergieron en citrato de Na al 0.01%, pH 6.0 en olla de presión por cinco minutos en la opción "alta presión". Posteriormente se lavaron en PBS 0.1M por cinco minutos tres veces. Se bloqueó la peroxidasa endógena con metanol al 3% 20 min y se enjuagaron los cortes tres veces en PBS 0.1 M por cinco minutos.

IDENTIFICACIÓN DE APOPTOSIS:

La determinación de células en apoptosis tardía se realizó por TUNEL utilizando los reactivos de “*In Situ Cell death detection kit, POD*” (Cat No. 1 684 817 Roche Applied Science Mannheim, Germany) de acuerdo a la técnica descrita por Ansari (Ansari *et al.*, 1993), a partir de cortes de los tejidos problema y de los controles positivos.

Se incubaron los tejidos con la enzima Tdt transferasa, a 37 °C, durante una hora. Posteriormente se lavaron las laminillas con PBS al 0.1M por tres veces y se le agregó un conjugado secundario anti-fluoresceína- POD, por 30 minutos a 37° C y enseguida se reveló con diaminobenzidina (DAB).

Mediante microscopía óptica se observó una tinción color marrón en aquellas células que se encontraron en apoptosis.

Se incluyeron laminillas de tejidos con diagnóstico histológico de cáncer de colon para controles positivos de la técnica de TUNEL, en donde se demostró la presencia de células apoptóticas.

ANALISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos por métodos clínicos, de laboratorio y gabinete, así como estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos se analizaron utilizando el programa SPSS ver 10 para Windows ®. Los valores fueron expresados en medias y desviaciones estándar.

Se compararon los hallazgos de los métodos utilizados para evaluación vascular mediante correlación de Spearman considerando como diferencia significativa $p < 0,05$.

RESULTADOS

Los 10 pacientes motivo del estudio, correspondieron cinco al género femenino y cinco al masculino, con un promedio de edad de 55.6 años \pm 15 años y con diagnóstico al ingreso, de fascitis necrosante de miembro pélvico y/o necrobiosis diabética (Figura 3, Tabla 1).

El tiempo promedio de evolución de la diabetes mellitus fue \pm 9.4 años, dos pacientes se desconocían diabéticos hasta el inicio del proceso infeccioso en el miembro pélvico. El número de días del padecimiento infeccioso osciló entre 3 y 90, con un promedio de 22. El porcentaje de superficie corporal afectada fluctuó entre 3 y 25% con una media de 9% y la estancia hospitalaria con rangos de 7 a 58 y media de 24 días.

Las enfermedades concomitantes asociadas fueron: tabaquismo (7), insuficiencia renal crónica agudizada (4), alcoholismo (4) e insuficiencia hepática (3).

Los factores de riesgo asociados a la vasculopatía aguda fueron: insuficiencia renal crónica 70%, tabaquismo intenso 60%, angiopatía secundaria a dismetabolismo 50%, traumatismos 40%, alcoholismo crónico 40%, cirugía vascular 20% y cáncer 10%.

De la exploración clínica inicial se documentó como hallazgos macroscópicos: cambios morfológicos en piel con una tonalidad violácea y tumefacción de la zona afectada 90%, grandes ampollas llenas de líquido serohemático, zonas necróticas y exudado purulento 80%, solución de continuidad de la piel 50% y crepitación de la extremidad 40%.

En la figura 4, se muestran algunas de las características macroscópicas relevantes.

El 90% ingresó con datos de choque séptico, con una calificación de APACHE II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II) de 2-18 puntos.

A todos los pacientes se les realizó biopsia de músculo y aponeurosis macroscópicamente viable en la zona afectada, para cultivo de gérmenes aerobios y anaerobios durante el procedimiento quirúrgico. El total de gérmenes aislados fue catorce e incluyeron: *Estafilococo coagulasa negativa* (3), *Klebsiella sp* (3), *Streptococo beta hemolítico* (2), *Escherichia Coli* (2), *Pseudomonas aureoginosa* (2), *Enterobacter cloacae* (1) y *Cándida Albicans* (1)

No se encontró predominio de hipercolesterolemia en la población estudiada, con un máximo de 240 mg/dl y una media de 161 mg/dl, sin embargo los niveles de fibrinógeno se mantuvieron por arriba de 400 mg/dl en aquellos pacientes con mayor grado de isquemia y a los cuáles se les practicó amputación supracondílea.

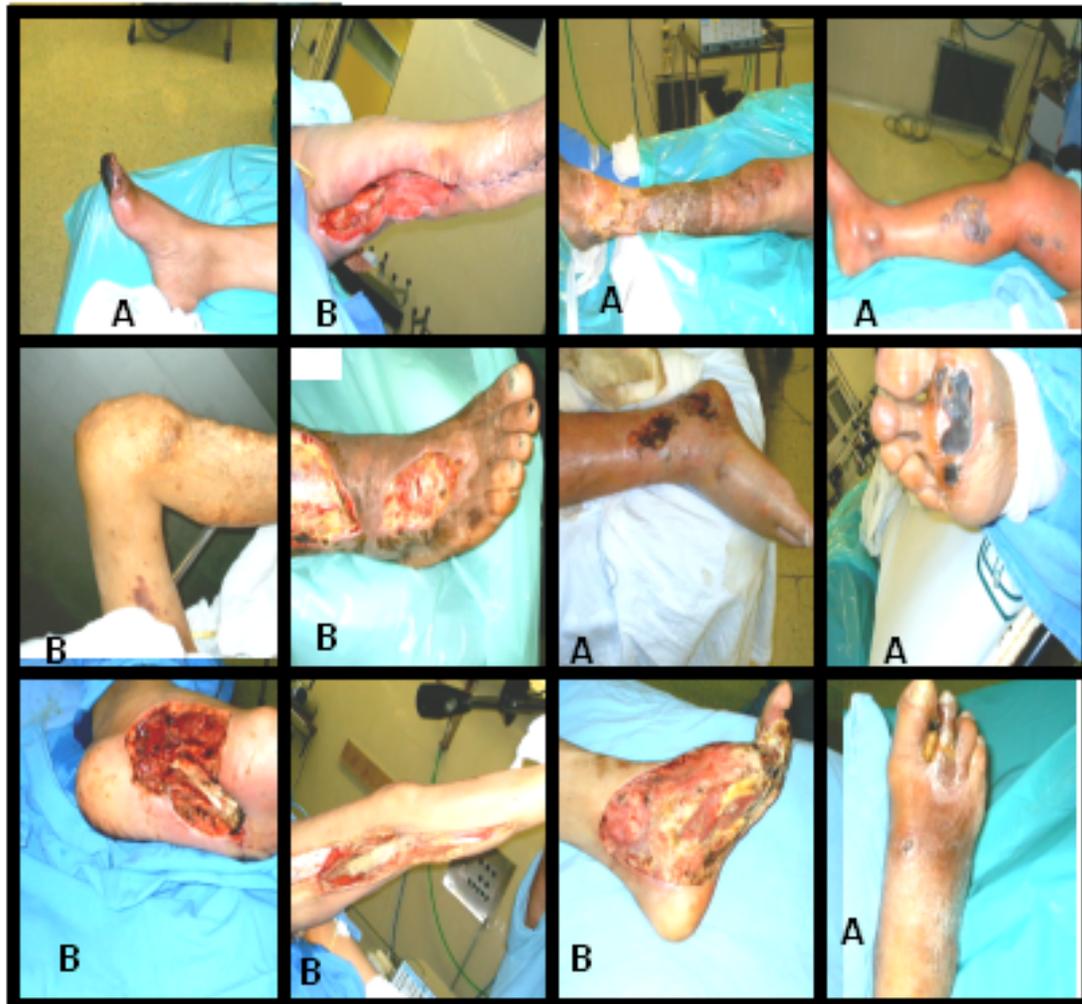


Figura 4. Fotografías de miembros con pie diabético y fascitis necrosante.

En A) zonas de necrobiosis con cambios de coloración, formación de escaras secundarias a hipoxia e isquemia y necrosis.

En B) lesiones con solución de continuidad y depósitos fibrinopurulentos en las zonas expuestas.

Se realizaron un total de cinco amputaciones supracondíleas de miembro pélvico y una de miembro torácico, una amputación infracondílea, cuatro amputaciones de artejos; en todos los pacientes se realizó exploración quirúrgica, con fasciotomía y desbridación de las zonas afectadas y en tres pacientes “Toma y aplicación de Injertos”, por el servicio de Cirugía Plástica y Reconstructiva.

La mortalidad fue del 30%, asociadas a oclusión arterial aguda, insuficiencia renal crónica agudizada, hemorragia aguda y choque séptico refractario al manejo medico-quirúrgico. Los datos descritos se resumen en la Tabla I.

Se correlacionó con mortalidad la edad, el tiempo de evolución de la DM, días de evolución de la enfermedad, nivel sérico de glucosa, leucocitos e índice de masa corporal, en donde no se encontró significado estadístico.

Un resumen de todos los datos clínicos y de laboratorio obtenidos durante su estancia hospitalaria se presenta en las Tablas II y III.

Tabla 1. Características generales de pacientes con pie diabético complicado

| Paciente | Edad (años)/ Género | Diagnóstico de ingreso | Evolución DM (años) | Duración de los síntomas (días) | Estancia hospitalaria (días) | Comorbilidad | Extensión de la infección | Procedimiento quirúrgico | Tratamiento antimicrobiano | APACHE II | Evolución |
|----------|---------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------------|------------------------------|---|--|---|---|-----------|-----------|
| 1 | GSF 46/M | PDC/FN | 10 | 15 | 28 | Angiopatia/Neuropatía/IRC/A/Dismetabolismo/ Sepsis/HA/Tabaquismo/Alcoholismo/IAA | Región ventral y dorsal de pie derecho | Amputación Supracondilea, MPP | Cefotaxima/ ciprofloxacino | 4 | Mejoría |
| 2 | ELB 56/M | IAA/PDC/FN | 24 | 60 | 22 | Angiopatia, Retinopatía/ Neuropatía/IRC/AA/Choque séptico/Tabaquismo/Alcoholismo/H/Cirugía Vascular | MPI región infracondilea; MTI mano y antebrazo | Amputación Supracondilea MTI/MPP | Cefotaxima/ ciprofloxacino | 14 | Defunción |
| 3 | LPA 46/M | PDC/FN | 17 | 30 | 15 | Angiopatia, Neuropatía/ Sepsis/Tabaquismo/Alcoholismo | MPI región infracondilea | Amputación Supracondilea MPI | Cefotaxima/ ciprofloxacino | 4 | Mejoría |
| 4 | RTA 84/F | PDC/ Neurobirosis diabética | 15 | 30 | 7 | Angiopatia, Retinopatía/ Neuropatía/Trauma | 3er. Orejo, pie izquierdo | Desarticulación de 3er. Artejo MPI | Ceftazidima | 2 | Mejoría |
| 5 | OCM 45/M | FN / Síndrome compartament al | 2 | 2 | 58 | IRC/ADismetabolismo/ Sepsis/Tabaquismo | MPP, toda la extremidad | Amputación falanges Desbridación, Fasciotomía, TAI de MPP | Ceftazidina/ ciprofloxacino | 4 | Mejoría |
| 6 | RAF 53/M | FN | Detección al inicio de PA | 6 | 28 | IRC/ADismetabolismo/ Sepsis/Tabaquismo/ Neuropatía | Pie derecho región dorsal | Amputación supracondilea de MPP | Cilindamicina/ Ceftriaxona | 11 | Mejoría |
| 7 | MRR 50/F | FN | 13 | 3 | 150 | Cáncer/IRC/HA/ Choque séptico | MPP, toda la extremidad | Amputación falanges Desbridación, Fasciotomía, TAI en MPP | Meropenem/ Ceftriaxona/ Ciprofloxacino/ Amikacina | 5 | Mejoría |
| 8 | LHT 58/F | FN | 10 | 14 | 14 | Cáncer/IRC/HA/ Choque séptico | MPP, toda la extremidad | Amputación falanges Desbridación, Fasciotomía, | Metronidazol/ Ceftriaxona | 14 | Defunción |
| 9 | MOJ 81/F | FN | 10 | 21 | 23 | Angiopatia/ Cirugía Vascular Retinopatía/ Neuropatía/IRC/OAA/ Choque Séptico/H | MPI, toda la extremidad | Amputación Supracondilea, MPI | Ceftriaxona | 18 | Defunción |
| 10 | LRL 67/F | FN | Detección al inicio de PA | 30 | 49 | Hipotiroidismo/ Obesidad/Sepsis/Trauma | MPP, toda la extremidad | Amputación falanges Desbridación, Fasciotomía, TAI de MPP | Cilindamicina/ Ceftriaxona | 4 | Mejoría |

DM, diabetes mellitus tipo 2; FN, fascitis necrosante; IRC, insuficiencia renal crónica agudizada; IH, insuficiencia hepática; IAA, insuficiencia arterial aguda; MPP, miembro pélvico derecho; MTI, miembro torácico izquierdo; OAA, oclusión arterial aguda; PA, padecimiento actual; PDC, pie diabético complicado; TAI, toma y aplicación de injertos

Tabla II Características de laboratorio de pacientes con pie diabético complicado

| Paciente | Edad (años) y Género | Hb (g/dl) | leucocitos mm ³ | linfocitos mm ³ | plaquetas mm ³ | % TP | fibrinógeno mg/dl | sodio mEq/l | K mEq/l | calcio mg/dl | CPK u/l | albúmina g/dl | proteínas totales g/l | glucosa mg/dl | creatinina mg/dl | urea mg/dl | colest mg/dl |
|----------|----------------------|-----------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|------|-------------------|-------------|---------|--------------|---------|---------------|-----------------------|---------------|------------------|------------|--------------|
| 1 | GSF 46/M | 15.5 | 24900 | 3660 | 182000 | 85 | 858 | 140 | 3.4 | 7.1 | 3 | 2.1 | 4.8 | 323 | 1 | 24 | 195 |
| 2 | ELB 56/M | 4.5 | 20200 | 2220 | 363000 | 19 | 631 | 131 | 4.2 | 6.8 | 35 | 2 | 4.5 | 83 | 5.9 | 113 | 164 |
| 3 | LPA 46/M | 13.4 | 31600 | 4424 | 322000 | 59 | 341 | 139 | 4.2 | 7.2 | 7 | 2.4 | 5.7 | 108 | 2.4 | 60 | 139 |
| 4 | RTA 84/F | 10.1 | 11400 | 1299 | 355000 | 71 | 215 | 140 | 4.8 | 6.9 | 0 | 1.9 | 4.1 | 243 | 1 | 32 | 165 |
| 5 | OCM 45/M | 14.8 | 14900 | 7599 | 1177000 | 73 | 215 | 140 | 4.8 | 6.5 | 115 | 2.6 | 6 | 167 | 1 | 32 | 145 |
| 6 | RAF 53/M | 12 | 27000 | 13500 | 43000 | 104 | 581 | 117 | 2.2 | 6.8 | 153 | 1.9 | 4 | 131 | 3.6 | 69 | 240 |
| 7 | MRR 50/F | 9 | 11900 | 2180 | 216000 | 58 | 466 | 141 | 4.2 | 7.6 | 13 | 2.5 | 4.3 | 250 | 1.4 | 124 | 110 |
| 8 | LHT 58/F | 7.7 | 11300 | 565 | 110000 | 68 | 210 | 149 | 3.2 | 7.8 | 17 | 1.6 | 3.4 | 83 | 7 | 53 | 68 |
| 9 | MOJ 81/F | 9 | 8400 | 2520 | 387000 | 71 | 310 | 144 | 2.5 | 7.7 | 2 | 2 | 4.8 | 95 | 9 | 86 | 175 |
| 10 | LRL 67/F | 8.4 | 9900 | 2178 | 419 | 85 | 677 | 140 | 2.4 | 8.3 | 17 | 2.8 | 5.3 | 141 | 0.9 | 7 | 153 |

CPK, creatinofosforinasa; TP, tiempo de protrombina; Hb, hemoglobina; K, potasio.

Valores de los parámetros de laboratorio detectados en el momento de ingreso de los 10 pacientes estudiados

Tabla III Estadística general

| Género 5F/5M | Mínimo | Máximo | Media | DE |
|--------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| Edad (años) | 40 | 84 | 55.6 | 15.2 |
| Evolución DM (años). | 1 | 24 | 9.4 | 7.2 |
| Evolución previo (días). | 3 | 90 | 22 | 25.4 |
| Superficie corporal afectado % | 3 | 25 | 9.1 | 6.0 |
| Estancia hospitalaria (días) | 7 | 58 | 24 | 15.3 |
| Hemoglobina g/dl | 4.5 | 14.8 | 10.5 | 3 |
| Linfocitos mm ³ | 565 | 13500 | 4014 | 3866 |
| Leucocitos mm ³ | 6600 | 31600 | 16820 | 8576 |
| Creatínfosfoquinasa u/l | 0 | 195 | 47 | 64.6 |
| Glucosa mg/dl | 83 | 963 | 246 | 266 |
| Fibrinógeno mg/dl | 210 | 858 | 516 | 243 |
| Trombina % | 19 | 99 | 67 | 21 |
| Plaquetas mm ³ | 43000 | 422000 | 251700 | 134668 |
| Potasio mEq/l | 2.2 | 4.8 | 3.5 | 0.8 |
| Sodio mEq/l | 117 | 149 | 138 | 8.6 |
| Creatinina mg/dl | 0.7 | 5.9 | 2 | 1.7 |
| Calcio mg/dl | 6.5 | 7.8 | 7 | 0.5 |
| Albumina g/dl | 1.6 | 2.6 | 2 | 0.3 |
| Proteínas g/dl | 3.4 | 6 | 4.6 | 0.8 |
| pH arterial | 7.29 | 7.56 | 7.38 | 0.9 |
| % O ₂ transcutáneo | 20 | 75 | 42 | 24.5 |
| Índice tobillo/ braquial (ITB) | 0.23 | 0.85 | 0.51 | 0.2 |

N=10 pacientes con diagnóstico de pie diabético complicado

Estadística general descriptiva de parámetros clínicos y de laboratorio durante la estancia hospitalaria

Resultados del estudio Doppler color

En siete sujetos se documentó placas de ateroma con estenosis mayor del 50%, hemodinámicamente significativas. Se identificaron placas de ateroma no estenosante con área asociada a mineralización (incremento de la ecogenicidad) o con protrusión focal hacia la luz arterial en tres pacientes.

Se observó en siete extremidades pélvicas disminución del calibre de arteria tibial posterior y pedia dorsal; con obstrucción parcial de arteria poplítea en seis y obstrucción total del flujo sanguíneo en una (Figura 5). La oclusión arterial dio origen a curvas anchas, de poca amplitud, en las que el tiempo de aceleración, se encontró alargado en cinco pacientes.

Resultados de la determinación de saturación de O₂ transcutánea:

Durante el transoperatorio se determinó saturación de O₂ transcutánea por medio de oximetría de pulso de la extremidad afectada, la cuál reveló únicamente en cuatro pacientes cifras iguales o mayores a 80% de saturación. Se encontró asociación significativa entre saturación de O₂ de la extremidad y mortalidad; cifras de 20 a 40 % de saturación se asociaron a isquemia severa de la extremidad por obstrucción del flujo sanguíneo ($p < .010$), amputación supracondílea y a defunción en tres pacientes (Tabla IV).

Resultados de la determinación de presión sistólica absoluta del pie:

En los cinco pacientes en quienes se realizó amputación supracondílea se estableció una presión sistólica del pie < 0.45 (Figura 6). Se determinó asociación del nivel de amputación (amputación supracondílea) y presión sistólica absoluta del pie (flujo sanguíneo), utilizando Correlación de Spearman, la cual mostró significado estadístico con $p < .010$

Resultados de la medición del Índice Tobillo-braquial (ITB):

No se identificó significado estadístico entre el tipo de procedimiento quirúrgico y el índice tobillo braquial, sin embargo se observó asociación clínica entre el ITB, amputación supracondílea y referencia de claudicación en el miembro afectado.

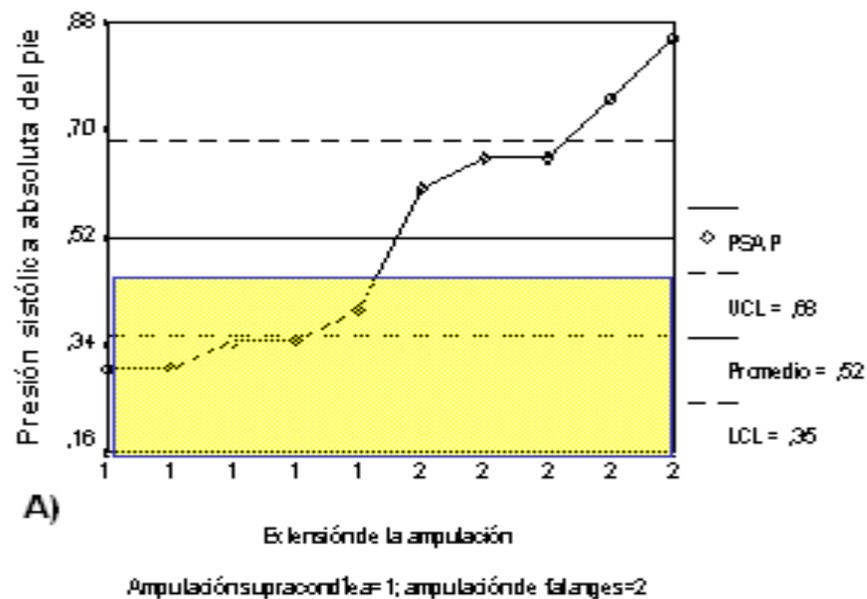


Figura 5. Estudio Doppler

- A) Del lado izquierdo, tres pies diabéticos con lesiones necrosantes en región dorsoplantar y latero-interna de pie. El manejo quirúrgico inicial incluye desbridación del material necrótico.
- B) Imagen Doppler color correspondiente: se observa disminución significativo del calibre del vaso con obstrucción aguda del flujo sanguíneo (punta de flecha).

Asociación PSAP/Procedimiento Quirúrgico

Valor anormal: <0.45



Correlación de Spearman: $p < .010$

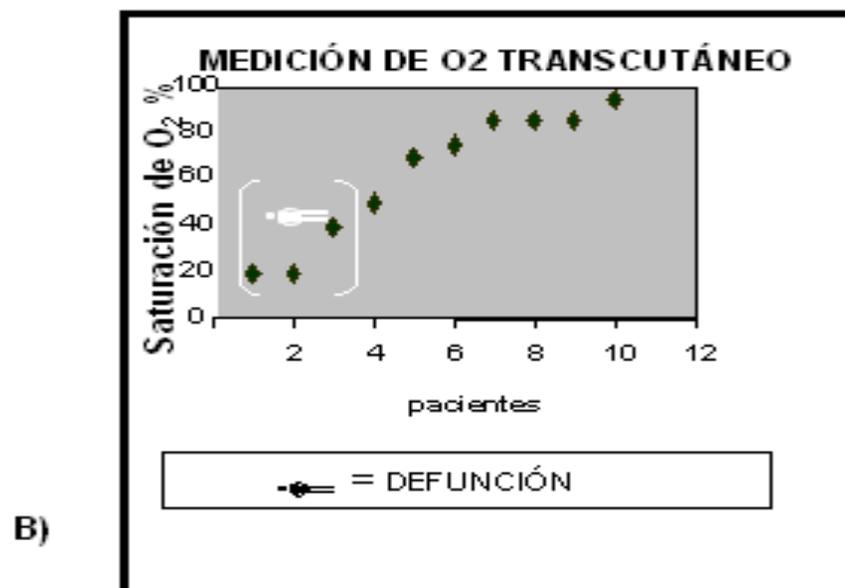


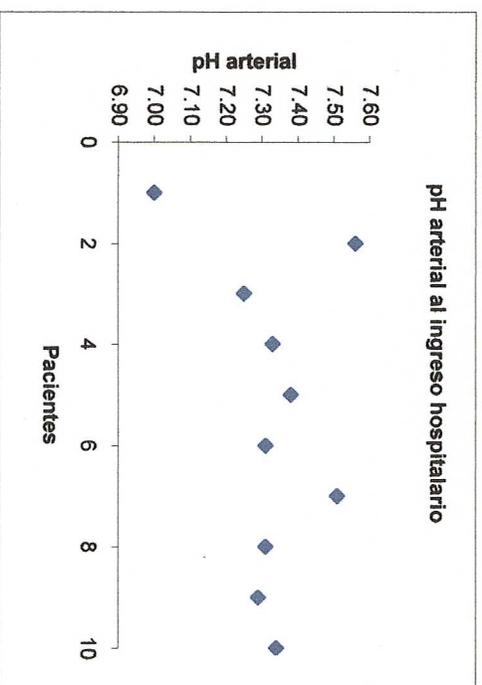
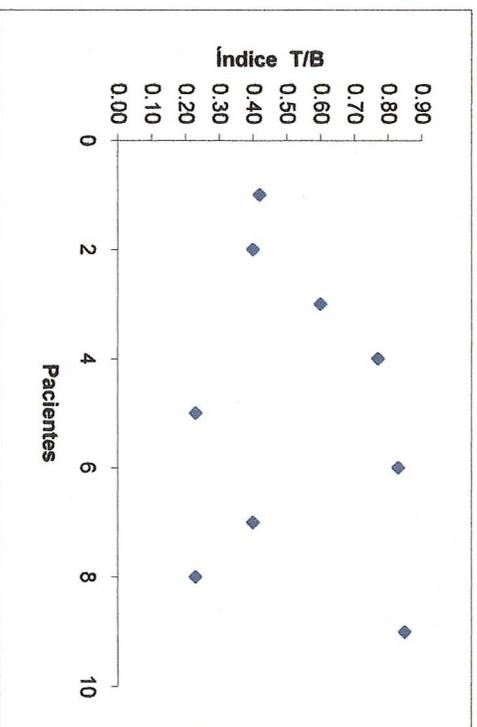
Figura 6: Correlación Estudio doppler color-Procedimiento quirúrgico.

A) Correlación procedimiento quirúrgico y presión sistólica absoluta del pie, mediante la detección del flujo sanguíneo.

B) Asociación entre obstrucción súbita del flujo sanguíneo, saturación de O₂ de la extremidad y mortalidad

Tabla IV Exploración angiológica y evolución clínica

| Paciente | Edad (años)/ Género | Tensión arterial | Presión Transcutánea de O ₂ en miembro pélvico afectado | Índice T/B | pH arterial | Claudicación intermitente | Tipo de amputación | Evolución |
|----------|------------------------|------------------|--|------------|-------------|---------------------------|--------------------|-----------|
| 1 GSF | 46/M | 100/60 | 20 | 0.40 | 7 | si | Supracondílea | Mejoría |
| 2 ELB | 56/M | 70/40 | 20 | 0.42 | 7.56 | si | Supracondílea | Defunción |
| 3 LPA | 46/M | 90/70 | 40 | 0.40 | 7.25 | si | Supracondílea | Mejoría |
| 4 RTA | 84/F | 110/60 | 55 | 0.60 | 7.33 | si | Falanges | Mejoría |
| 5 OCM | 45/M | 90/70 | 75 | 0.77 | 7.38 | no | Falanges | Mejoría |
| 6 RAF | 53/M | 130/90 | 55 | 0.23 | 7.31 | si | Supracondílea | Mejoría |
| 7 MRR | 50/F | 130/75 | 75 | 0.83 | 7.51 | no | Falanges | Mejoría |
| 8 LHT | 58/F | 90/50 | 60 | 0.40 | 7.31 | si | Falanges | Mejoría |
| 9 MOJ | 81/F | 100/60 | 50 | 0.23 | 7.29 | si | Supracondílea | Defunción |
| 10 LRL | 67/F | 110/70 | 75 | 0.85 | 7.34 | no | falanges | Mejoría |



IT/B: Índice Tobillo/Braquial
 Parámetros anormales de I T/B: <0.80
 Parámetros anormales de O₂ transcutáneo por oximetría: <40 mmHg
 Obsérvese la asociación entre parámetros anormales de I T/B y amputación supracondílea

ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Análisis macroscópico:

No hubo diferencias en la prevalencia de lesiones ateroscleróticas en relación con el género del paciente. Las lesiones condicionantes del evento agudo se localizaron en las arterias: femoral 31%, poplítea 31%, tibial 23% y pedia 15%.

Análisis microscópico:

En los tejidos analizados con microscopía de luz se identificó proceso inflamatorio agudo periarterioar, con infiltrado de polimorfonucleares, linfocitos, macrófagos y arteriolas con trombos de reciente formación (Figuras 7 y 8).

Los diagnósticos patomórficos de los vasos arteriales incluyeron: trombosis aguda parcialmente recanalizada (7), trombosis aguda (5), calcificación distrófica y calcificación de la capa media (2) (Figura 7).

La causa de obstrucción arterial aguda se produjo por disrupción de la placa entre el 60 y 80% de los casos, así como presencia de erosión endotelial en el 20-50% (Figura 9 y 10). Asimismo se encontró numerosas lesiones leves que no produjeron limitaciones al flujo sanguíneo (Figura 11 y 12).

Histológicamente, las placas ateromatosas mostraron presencia de células inflamatorias mononucleares, con focos de monocitos, macrófagos y linfocitos en las paredes vasculares. Se realizó clasificación de las placas ateroscleróticas avanzadas encontrándose el 60% ricas en células musculares lisas, y el 40% ricas en macrófagos y linfocitos.

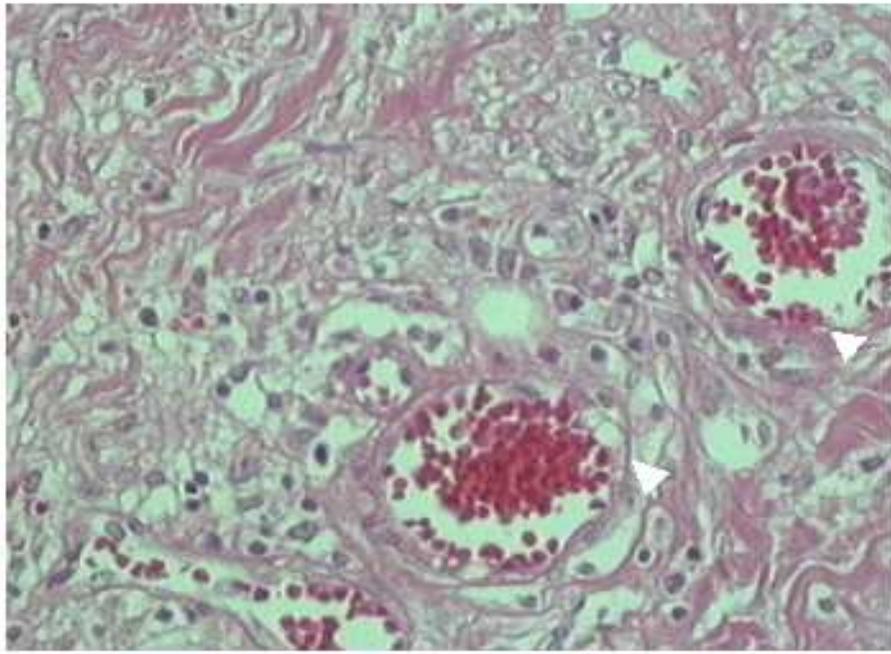


Figura 7 Proceso inflamatorio agudo, región posterior de muslo de un paciente con necrobiosis diabética; se observan abundantes polimorfonucleares y macrófagos y arteriolas con trombos de reciente formación (cabezas de flecha) 1000x

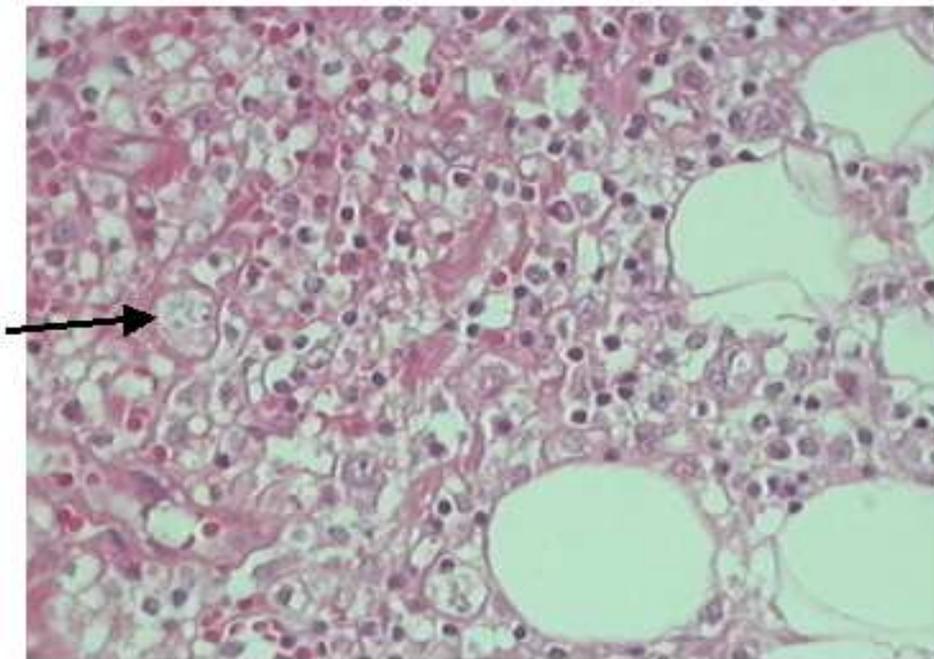


Figura 8 Proceso inflamatorio de tejido de la región plantar de un paciente con fascitis necrosante; se observan polimorfonucleares y macrófagos (flecha) 1000x

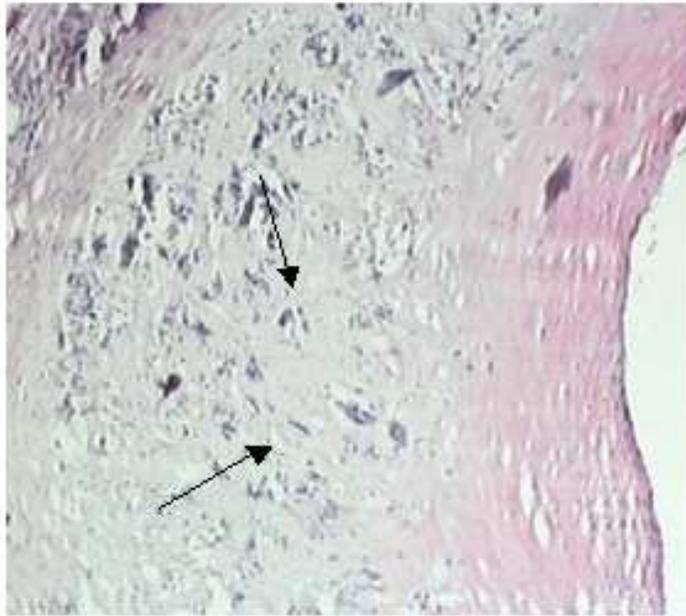


Figura 9 Corte transversal de una arteria. Se observa aterosclerosis complicada con calcificación distrófica e hiperplasia de la media

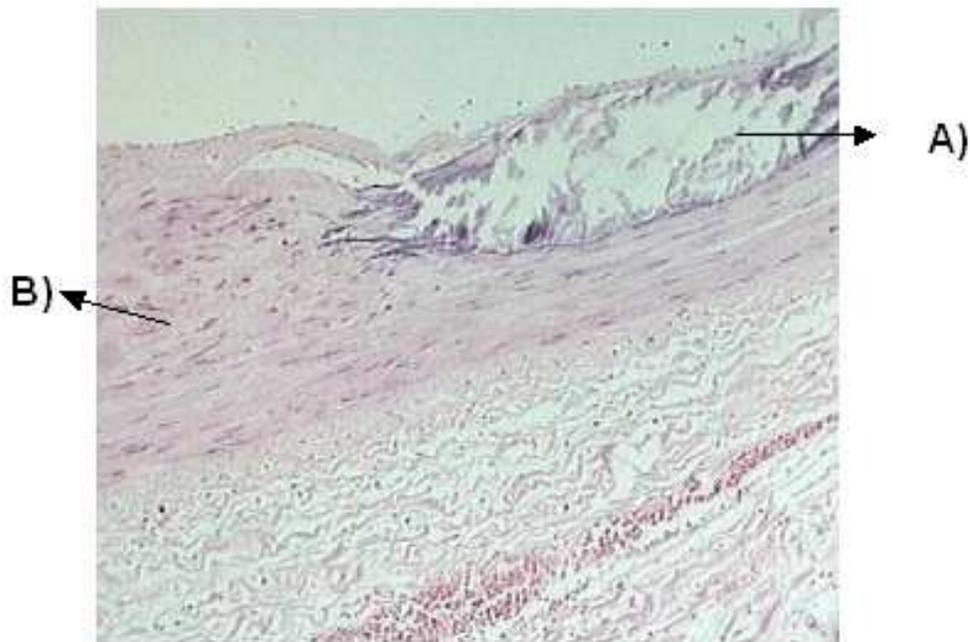


Figura 10: Corte transversal de una arteria. Se observa
disrupción de placa de ateroma, lesión de Túnica íntima (A)
hiperplasia de células musculares lisas (B) 400x

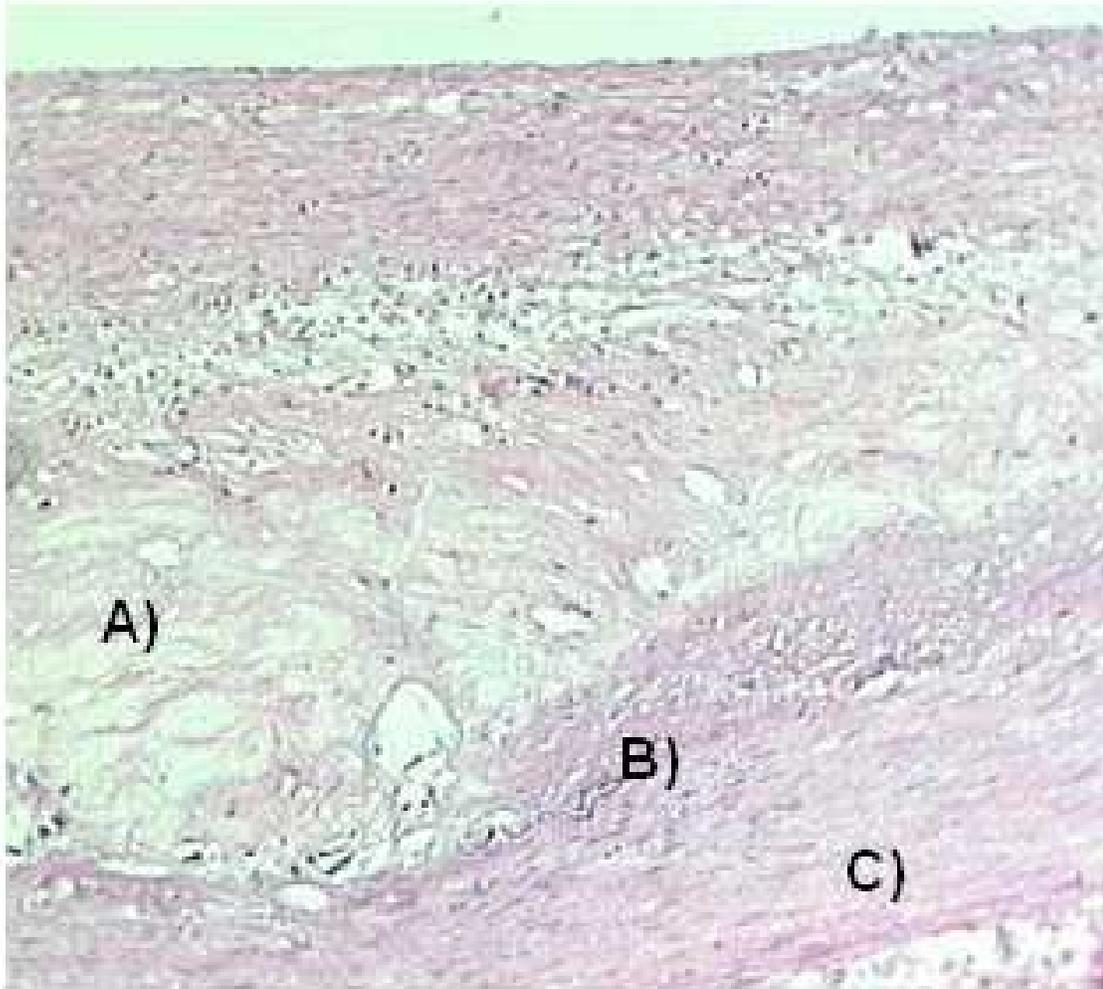


Figura 11 Corte longitudinal de arteria mediana en donde se observa: Placa de ateroma A)
Lámina elástica parcialmente destruida B)
Hiperplasia de la muscular C)

ESTUDIO INMUHISTOQUIMICO

Todos los tejidos sometidos a determinación de apoptosis mediante TUNEL *in situ* fueron positivos y correspondieron a pacientes con repercusión sistémica por proceso isquémico asociado a hipoxia tisular, demostrada por determinación de saturación de O₂ transcutánea y estudio doppler. En los vasos sanguíneos se identificaron células endoteliales y musculares lisas apoptóticas (Figura 13-15) asociadas a gran cantidad de fibrina.

En las zonas comprometidas por oclusión vascular se observó el fenómeno apoptótico en el borde y en regiones lejanas a la zona necrosada que participa en el remodelamiento postisquémico.

La identificación de apoptosis se asoció con las alteraciones vasculares y la disminución del flujo vascular.

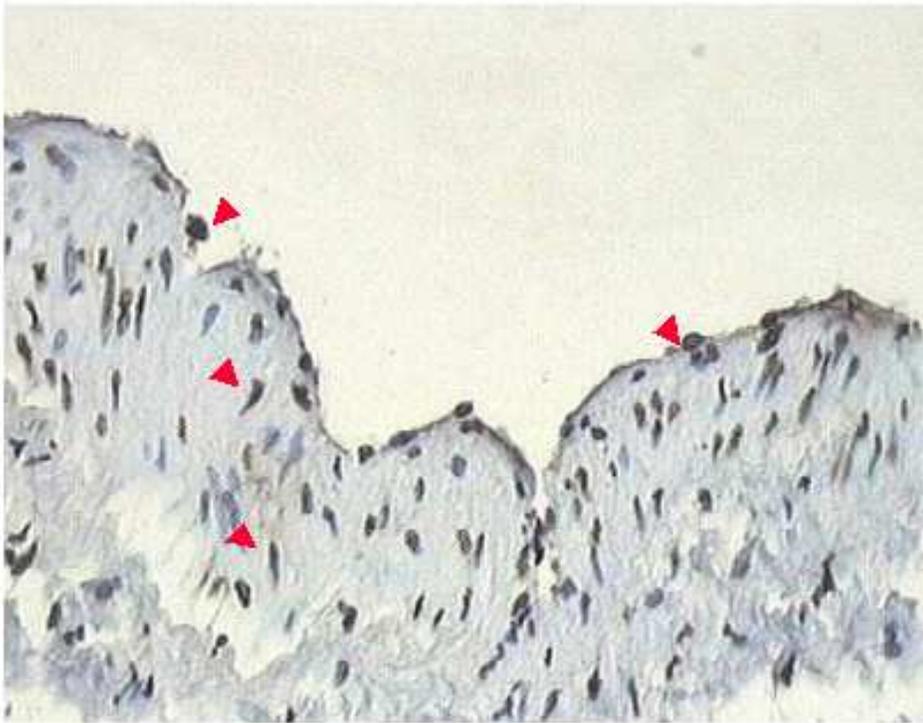


Figura 12. Sección de una arteria muscular donde se observan células musculares lisas y endoteliales apoptóticas (cabeza de flechas) 400x

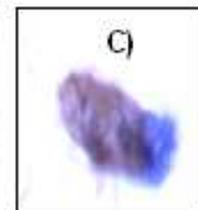
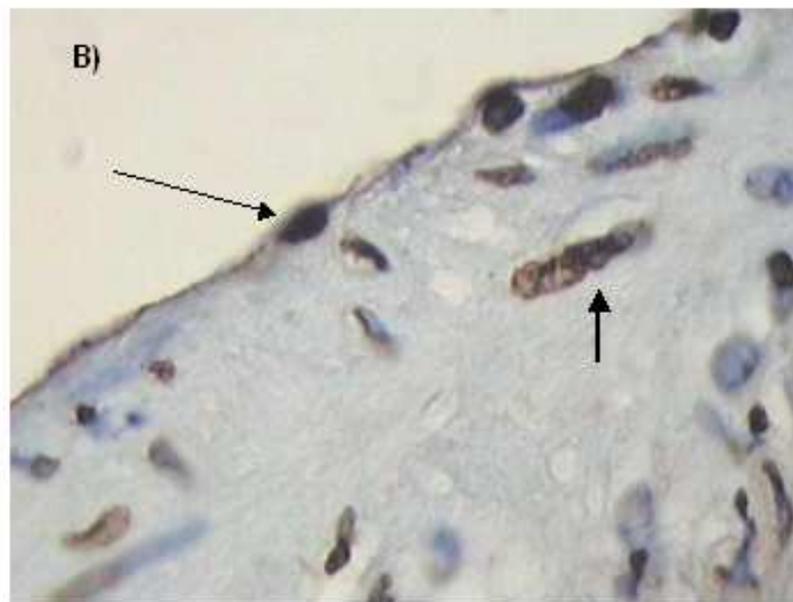
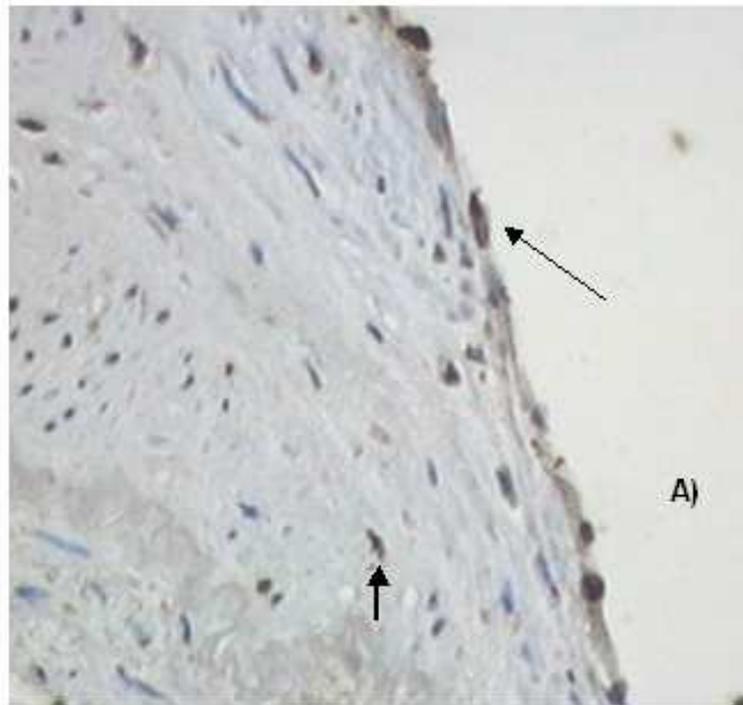


Figura 13 Arteria poplítea de un paciente con necrobiosis diabética donde se observan células endoteliales (flechas delgadas) y musculares lisas (flechas gruesas) en apoptosis: A)400x, B)1000x. C) Detalle donde se aprecia la condensación y fragmentación de la cromatina, 4000x

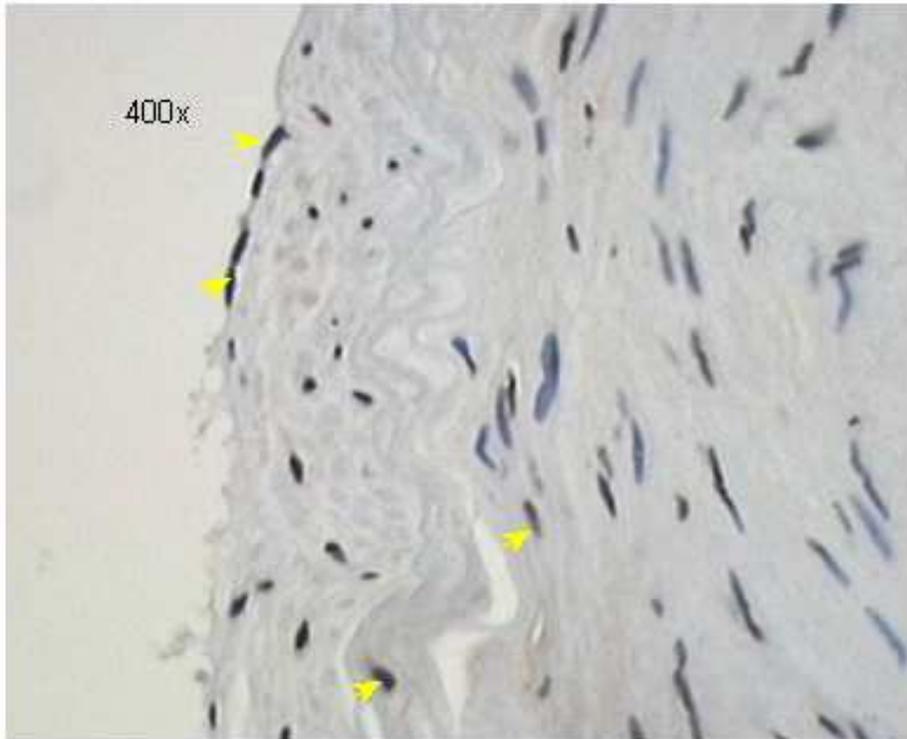
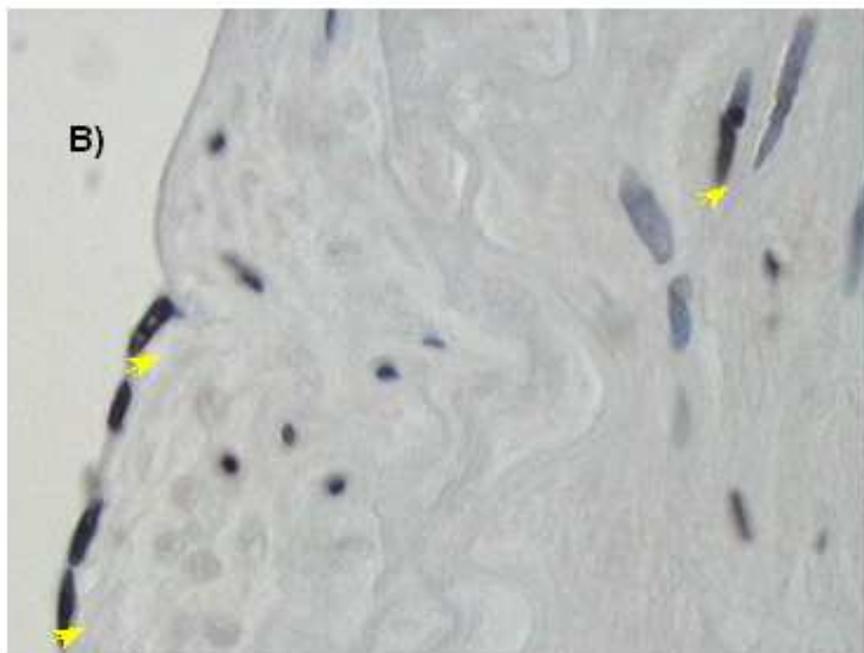


Figura 14 Corte longitudinal de arteria pedia, donde se observan células endoteliales y musculares lisas en apoptosis (puntas de flecha). Aumento en A) 400x, B) 1000x



Se identificó presencia de abundantes células epidérmicas en apoptosis de cortes realizados a nivel de piel en los tres pacientes que fallecieron y en los que se practicó amputación supracondílea (Figura 15).

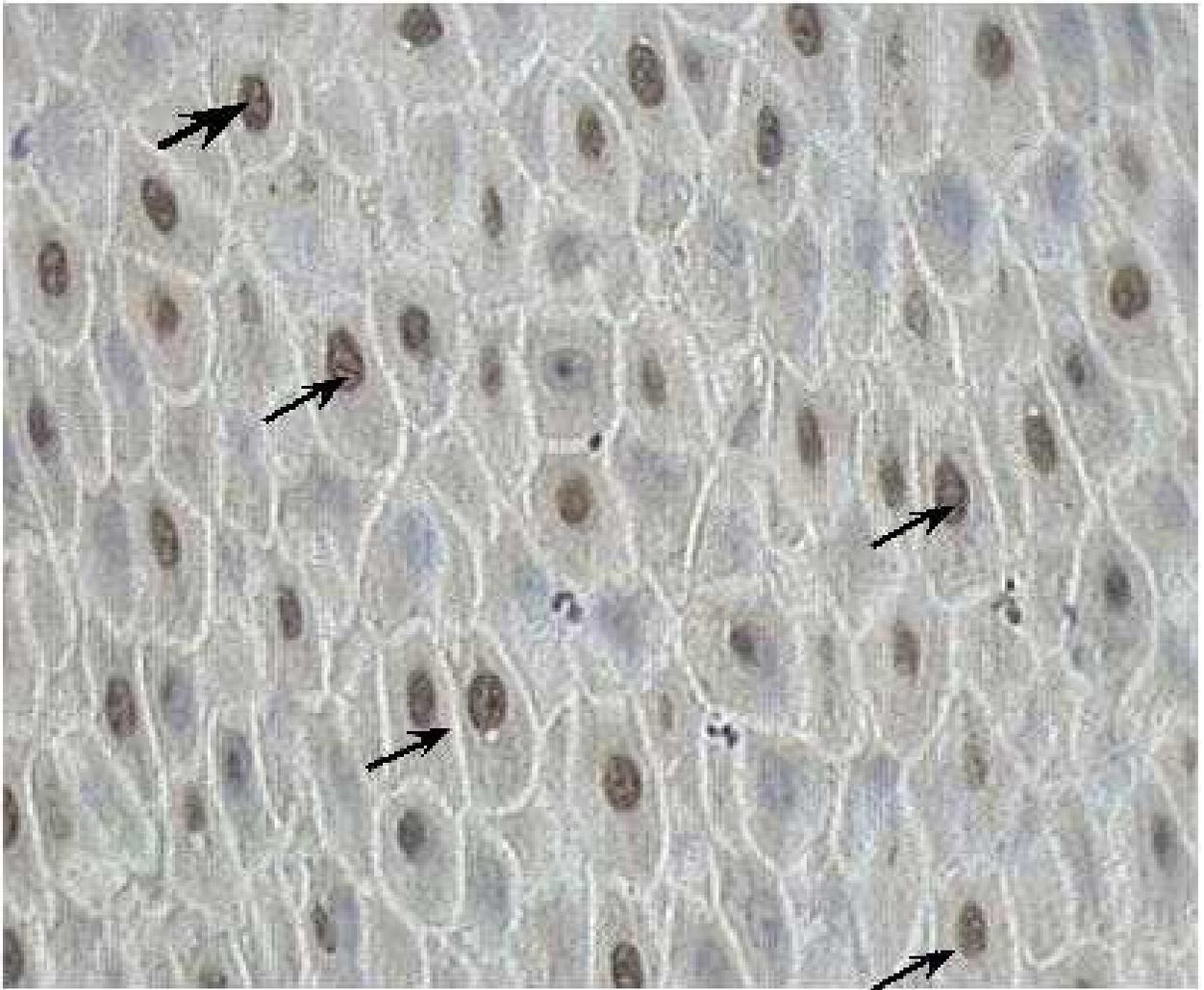


Figura 15 Corte a nivel de piel con abundantes células epidérmicas en apoptosis. 400x

DISCUSION

Si analizáramos en general las causas de muerte en los países en desarrollo, se evidencia que las enfermedades cardiovasculares van en ascenso. El aumento de la expectativa de vida en cualquier país viene acompañado de un incremento notable de la mortalidad por aterosclerosis, siendo ésta la causa fundamental dentro de las enfermedades crónicas no trasmisibles (Aguilar-Salinas *et al.*, 2001).

Los factores de riesgo cardiovascular tradicionales probablemente acontecen en no más de la mitad de los casos en la patogénesis de la enfermedad y no explican plenamente las diferencias en la prevalencia y severidad de las enfermedad vasculares. En general, la aterosclerosis es más frecuente en el sexo masculino. En el grupo de pacientes estudiados, no existió diferencia en relación al género; lo cual se puede deber al número reducido de pacientes estudiados.

Diversas líneas de investigación básica indican que la inflamación y quizás también la infección crónica, pueden estar presentes al inicio y progresión de las lesiones ateroscleróticas. En los resultados de este trabajo resalta el hecho, de que la morfología de la placa aterosclerótica subyacente a lesiones arteriales es heterogénea respecto a su arquitectura y composición celular y que el sitio de erosión siempre estuvo marcado por un proceso inflamatorio. Esto sugiere que la inflamación juega un papel de importancia en la desestabilización del endotelio y la capa de músculo liso. Una posibilidad sería que el incremento de la respuesta inflamatoria sistémica produzca una elevación de los factores de coagulación circulantes, como el fibrinógeno, el cuál mostró elevación en los pacientes con proceso isquémico extenso, y por otro lado, la función endotelial podría estar alterada, con pérdida de su capacidad vasodilatadora y de tromborresistencia. Las concentraciones elevadas de fibrinógeno, detectadas en los pacientes debido al proceso inflamatorio implicaron riesgo vascular ya que ocasiona incremento en los depósitos de fibrina que acompañan a la activación de los factores de coagulación, y un aumento de la reactividad plaquetaria (Schneider *et al.*, 1999).

Visto desde una perspectiva inmunológica, el papel de la inflamación e infección, como potenciales factores de riesgo vascular se apoya en investigaciones recientes que aportan pruebas de la existencia de un mecanismo inmunológico. La célula T se adhiere al endotelio por moléculas de adhesión como VCAM-1, y es estimulada quimiotácticamente por activación del complemento (C5a), inducido por LDL-ox. Los linfocitos se incorporan a la pared arterial en etapas muy tempranas y se encuentran junto a los macrófagos, en proporción variable 1:10-1:50, en las lesiones iniciales o estrías grasas. El 40% de las placas ateromatosas en la muestra estudiada, mostraron un patrón celular asociado a macrófagos y linfocitos.

Las características histológicas encontradas en el material estudiado no difieren de lo reportado en la literatura (Esaki *et al.*, 2000; Munro & Cotran, 1988). La composición de la placa, más que el porcentaje de estenosis, es el mayor determinante de vulnerabilidad. Las placas ateroscleróticas llamadas “vulnerables o de alto riesgo” son las más peligrosas, no sólo por su fragilidad, sino porque una vez rotas son las más trombogénicas; se caracterizan por tener una fina cápsula fibrosa, gran número de macrófagos, y un núcleo rico en lípidos con elevado contenido de factor tisular, lo que les confiere esa mayor trombogenicidad (Fernandez-Ortiz *et al.*, 1994). El Factor Tisular es generado, probablemente en parte por los macrófagos, y se activa al entrar en contacto con las células endoteliales vasculares apoptóticas. Además el trombo mural que se forma superpuesto a dichas placas libera factores de crecimiento y vasoconstrictores plaquetarios que contribuirán a la estenosis del lumen vascular y, por lo tanto, a la inducción de episodios isquémicos. Durante la apoptosis principalmente de macrófagos en la pared vascular, un fosfolípido aniónico (fosfatidilserina) se dispone en la superficie de la célula confiriendo una potente actividad procoagulante (Mallat *et al.*, 1999).

Ensayos clínicos, como GISSI 2 y GUSTO I, (Zuanetti *et al.*, 1993; Mak *et al.*, 1997) indican que los pacientes con DM tienen una mayor incidencia de episodios trombóticos agudos y peor evolución que los no diabéticos. Además también observaron que las lesiones ateroscleróticas de diabéticos están caracterizadas por una mayor densidad de material lipídico y macrófagos, así como por poseer más material de origen trombótico, que las obtenidas de pacientes no diabéticos (Moreno *et al.*, 2000).

En relación a la exploración del daño vascular en pacientes con pie diabético no existe prueba más sencilla y a la vez útil, para la valoración de la gravedad de la patología arterial oclusiva que la medición de la presión sistólica en el tobillo. Sin embargo, como depende de la tensión arterial central, se utiliza su comparación con la presión arterial en el miembro superior para neutralizar esta influencia. La mayor fuente de error en la determinación del índice tobillo/brazo es la calcificación de las arterias, que hace que no sean compresibles con el manguito a tensión. No obstante, los datos obtenidos en la muestra estudiada fueron compatibles con los registrados por el Doppler color, que además proporcionó la morfología del vaso sanguíneo. La medición de presiones sanguíneas tuvo ventajas sobre la medición del flujo, debido a que este último, se mantuvo a través de puntos estenóticos y oclusiones, gracias a una vasodilatación periférica y a una mejoría en la circulación colateral; mientras que la presión disminuyó con mayor precocidad y se convirtió, por lo tanto, en un índice más sensible; así, mientras que una lesión no produjo limitación en el flujo en reposo, si es significativa, siempre conllevó una disminución en la presión.

Si bien la apoptosis ha sido identificada en diversas situaciones patológicas como infarto, insuficiencia cardíaca, aterosclerosis etc, son muchas las interrogantes acerca del papel que

desempeña en la fisiopatología de estas entidades. Alcanzar un conocimiento terminal de los mecanismos apoptóticos y antiapoptóticos permitiría la utilización de estrategias terapéuticas que, actuando sobre distintos pasos de la cascada apoptótica, limitarían el grado de daño producido por la muerte celular.

Al respecto, en este trabajo se utilizó la técnica de TUNEL (Ansari *et al.*, 1993) porque es, a pesar de sus limitaciones, la más utilizada para cuantificar células apoptóticas ya que permite identificar también el tipo celular afectado. Esta técnica detecta la fragmentación del DNA por DNAasas endógenas, paso final de la muerte por apoptosis. Recientemente su especificidad ha sido cuestionada por el grupo de Fujiwara, (Kanoh *et al.*, 1999; Ohno *et al.*, 1998) que utilizando microscopía electrónica observó células TUNEL positivas que correspondían a miocitos necróticos o en proceso de reparación de su DNA. Los estudios que compararon la técnica de TUNEL con otra más específica que diferencia la fragmentación de DNA por necrosis o apoptosis (utilizando marcación con Taq polimerasa) (Didenko & Hornsby, 1996) mostraron índices apoptóticos casi idénticos en ambas técnicas, validando así su utilización en la etapa final de la apoptosis (Van Heerde *et al.*, 2000).

En relación a las zonas de ubicación de las células en apoptosis, en la muestra estudiada, el proceso de apoptosis involucró no sólo a las células endoteliales, sino a células musculares lisas, macrófagos, neutrófilos y células epidérmica con daño irreversible, limitando la recuperación de su estructura y la función; un estudio de autopsias de pacientes muertos por infarto agudo de miocardio mostró que los miocitos apoptóticos constituían el 12% de los ubicados en la zona periférica al infarto y el 0.74% de los miocitos alejados del área necrótica (Olivetti *et al.*, 1996; Van Heerde *et al.*, 2000).

Yaoita y cols.(2000) sugieren, que la desaparición de las células endoteliales por apoptosis acorta el tiempo de eliminación de las mismas, contribuyendo a la rápida reparación de la íntima de los vasos por nuevo endotelio. Las células infiltrantes inflamatorias (macrófagos y neutrófilos), que en un principio son útiles para eliminar el tejido necrótico, deben ser a su vez eliminadas luego por un mecanismo que no les permita liberar sus productos tóxicos. En este sentido, la muerte por apoptosis cumple ese requisito. Takemura y cols. (1998) describieron la aparición de numerosa miofibroblastos inmediata a lesión coronaria y su posterior disminución. La apoptosis de estas células limita la producción excesiva de colágeno que lleva a la fibrosis del tejido isquémico.

Ahora bien, ¿qué factores pudieron inducir apoptosis durante la isquemia?

Un factor importante en la isquemia es la hipoxia, Tanaka y cols. 1994, demostraron que los miocitos neonatales de rata sometidos a hipoxia morían por apoptosis, reduciéndose la viabilidad a un $2.4\% \pm 0.8$ a las 72 horas con respecto a los cultivos controles. Las células no miocíticas (principalmente fibroblastos) no presentaban signos de apoptosis en ese momento, siendo altamente resistentes a la hipoxia.

El papel de la reperfusión en la producción de apoptosis es controversial. Algunos autores sostienen que no hay apoptosis en la isquemia, sino luego de la reperfusión (Gottlieb *et al.*, 1996; Webster *et al.*, 1999). Otros argumentan que la reperfusión sólo acelera la apoptosis de las células que durante la isquemia fueron “comprometidas” a morir de esta forma (Fliss & Gattinger, 1996). Un estudio reciente de Freude y cols.(Freude *et al.*, 2000) evaluó la aparición de necrosis y de apoptosis en función del tiempo, luego de una isquemia global de 45 min a 90 min, seguida de 6 horas de reperfusión, concluyendo que en este modelo de isquemia, la mayoría de las células murieron por necrosis y sólo un 8% por apoptosis, la presencia de células apoptóticas se registró solo después de la reperfusión y algunos eventos moleculares, como la activación de caspasa-3 ocurrieron temprano en la isquemia, mientras que otros, como la fragmentación del DNA, se produjeron tardíamente, en la reperfusión. Es muy posible, que los pacientes que presentaron cuadros isquémicos agudos, y asociación de hipoxia severa y necrosis, cursaron con un periodo de isquemia-reperfusión, condicionando los mismos eventos.

En los pacientes estudiados se observó además en su mayoría acidosis metabólica y elevación en la producción de lactato, los que también son factores resultantes de la isquemia y que son considerados como mecanismos de daño celular.

La apoptosis es una característica de los procesos fibroproliferativos inflamatorios crónicos. Existen numerosos informes sobre apoptosis de células musculares lisas en lesiones ateromatosas y reestenóticas, tanto en humanos como en modelos animales de aterosclerosis (Bennett, Evan & Schwartz, 1995; Isner *et al.*, 1995). La frecuencia de células apoptóticas depende de la edad de la lesión. Hay predominio en las lesiones avanzadas donde las células apoptóticas se combinan con infiltrados de macrófagos (Hansson *et al.*, 1989; Bjorkerud & Bjorkerud, 1996). La población estudiada cursó con un promedio de 9 años de manifestaciones clínicas de DM. Las células musculares lisas que forman, junto con el colágeno tipo I, la cubierta fibrosa de la placa ateromatosa muestran muy poca replicación. La apoptosis, aún en niveles bajos, llevaría a la pérdida de las células que sintetizan las fibras de colágeno intersticial facilitando la ruptura de la placa.

Si las células apoptóticas no son removidas pueden generar calcificaciones. Más aún, la exposición de fosfatidilserina sobre la superficie de la célula apoptótica en presencia de factores V y VII puede llevar a la formación de trombina e iniciar una trombosis (Munro & Cotran, 1988).

De lo expuesto se deduce que la remoción de las células apoptóticas por los macrófagos u otras células musculares lisas vasculares es importante para la estabilidad de la placa. En la placa ateromatosa los macrófagos son responsables de la fractura del colágeno, demostrándose que mueren también por apoptosis. En un primer momento se pensó que la estrategia terapéutica de inducir la apoptosis de estas células en la placa favorecería su estabilización. Luego, al conocerse los efectos perjudiciales de la falta de remoción de las células apoptóticas, este enfoque debió ser

replanteado. Los pacientes con aterosclerosis avanzada presentan macrófagos deficientes en su función fagocítica.

La pérdida de la integridad en el endotelio vascular es un factor determinante en el desarrollo de aterosclerosis. En las células endoteliales que desarrollan placa ateromatosa se observa un incremento del recambio celular, posiblemente secundario al incremento de células apoptóticas. Se ha demostrado que varios de los factores de riesgo para la aterosclerosis como el estrés oxidativo, angiotensina II, glucosa elevada y oxidación de LDL, estimulan la apoptosis de las células endoteliales (Lutgens *et al.*, 1999).

Como lo describen Kockx y Herman (2000), a través de la enzima cNOS (sintasa de óxido nítrico constitutiva) la célula endotelial produce normalmente bajos niveles de NO que la protegen contra estímulos apoptóticos. Los mecanismos descritos para esta protección son dos: uno, mediado por GMPc que involucra la activación de proteínas kinasas, y otro, independiente de GMPc, por S-nitrosilación de las caspasas. La situación es totalmente diferente en las células de la placa ateromatosa en la cual la gran producción de NO a través de la iNOS (sintasa de óxido nítrico inducible) en un ambiente de estrés oxidativo determina que el mismo NO o los peroxinitritos lleven a la muerte apoptótica a las células de la placa y provoquen su desestabilización.

Además, la muerte por apoptosis participa en la lesión aguda de la pared vascular. En modelos animales la lesión por balón induce dos olas de apoptosis. La primera ocurre en la primera hora y produce una marcada disminución de la celularidad en la capa media de la pared vascular (Perlman *et al.*, 1997). Se ha supuesto que la liberación de citocinas por las células en vías de apoptosis aumentaría la respuesta proliferativa de reparación. La segunda ola de muerte celular programada se produce días o semanas después del daño y se localiza en las células vasculares musculares lisas de la neoíntima, siendo menor el número de células afectadas. El balance entre la respuesta proliferativa y la apoptótica en ese momento limitaría el crecimiento de la zona afectada (Walsh, Smith & Kim, 2000).

CONCLUSIONES:

1. Los resultados de este trabajo apoyan la hipótesis propuesta.
2. En todos los casos estudiados se identificaron células en apoptosis asociadas a daño vascular.
3. Posiblemente la hipoxia induce apoptosis y esta a su vez se asocia a inestabilidad de la placa ateromatosa, lo que condiciona la obstrucción aguda.
4. La identificación de apoptosis pudiera reforzar, en conjunto con los hallazgos mediante Doppler vascular, la toma de decisiones quirúrgicas ante la presencia de un pie diabético infectado.

PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO

- 1.- Determinar las vías de apoptosis implicadas.
- 2.- Determinar el tiempo transcurrido entre el estímulo y la fragmentación del DNA.
- 3.- Definir si la apoptosis en los eventos vasculares como epifenómeno o mecanismo que contribuye a la disminución de la funcionalidad.

Anexo I

Clasificación de Arteriopatía periférica: según la OMS,

Estadio 0

Existencia de vasculopatía asintomática, solo demostrable por la exploración.
(Tensión transcutánea de O₂ superior a 60 mmHg).

Estadio I

Claudicación intermitente (Tensión transcutánea de O₂ entre 30 y 60 mmHg).

Estadio II

Dolor de reposo. (Tensión transcutánea de O₂ entre 20 y 30 mmHg).

Estadio III

Necrosis o gangrena. (Tensión transcutánea de O₂ entre 20 y 30 mmHg).

CLASIFICACION DE WAGNER: PIE DIABETICO

(Wagner *et al.*, 1995)

| GRADO | LESIÓN | CARACTERÍSTICAS |
|-------|---|--|
| 0 | no-úlceras, pie en riesgo (deformidad óseas y lesiones pre-ulcerativas). | Callos gruesos, cabezas de metatizanos prominentes, dedos en garra, deformidades óseas |
| I | úlceras superficiales, no-infección clínica | Destrucción del espesor total de la piel |
| IIA | úlceras profundas que afectan ligamentos, tendones, articulación y/o huesos | Afección de piel, grasa y ligamentos sin llegar al hueso, infección |
| IIB | similar a lo anterior más infección, celulitis | |
| IIIA | abscesos profundos más celulitis | Úlceras extensas y profundas, secreción, Mal olor. |
| IIIB | osteomielitis más celulitis | |
| IV | gangrena localizada. | Necrosis de una parte del pie o de los dedos, talón, planta |
| V | gangrena extensa, del pie completo | Afección de todo el pie. Efectos sistémicos |

Anexo II

EVALUACIÓN DEL RIESGO PARA EL PIE DIABÉTICO MEDIANTE LA MEDIDA DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA POR Doppler EN EL BRAZO Y EL TOBILLO.

MÉTODO:

- 1.- La PAS (Presión arterial sistólica) se midió en ambos brazos, utilizando la sonda de Doppler. Se utilizó la medida más alta de las dos.
- 2.- Se mantuvo al paciente en reposo (decúbito supino) al menos 5 minutos antes de la determinación de la PAS.
- 3.- El transductor de Doppler se colocó en ángulo de 60° con respecto a la arteria que fue testada, para obtener mejor la señal. La prueba se realizó sobre la arteria pedia dorsal o la tibial posterior.
- 4.- El manguito fue insuflado al menos 20 mmHg por encima de la PAS obtenida en el brazo, para asegurarse el completo colapso de las arterias pedia y tibial posterior. Se infló para ocluir el pulso tibial posterior y después se deshinchó suavemente.
- 5.- La PAS fue obtenida en el punto donde el Doppler detectó el retorno de flujo. El deshinchado se realizó lentamente (2 mmHg/seg) para asegurar el punto exacto.
- 6.- Se dividió la presión sistólica obtenida en el tobillo por la mas alta de las dos PAS obtenidas en el brazo para obtener el **índice tobillo/braquial (ITB)**.

Interpretación de los resultados: Calcificación arterial

- La PAS del tobillo es superior a 300 mmHg
- La PAS del tobillo es superior en 75 mmHg a la obtenida en el brazo
- La relación T/B es >1'3.

INSUFICIENCIA ARTERIAL

| RELACIÓN T/B | ALTERACIÓN |
|--------------|---|
| <0'5 | Enfermedad vascular grave (afectación multisegmentaria) |
| >0'5 y < 0'8 | Enfermedad vascular moderada (afectación segmentaria) |
| <0'9 | Sospecha de enfermedad vascular |
| >0'9 y <1'3 | Rango aceptable |

Anexo III
HOJA DE RECOLECCION DE DATOS
Prueba Doppler

Hospital de Infectología CMR
Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología

Nombre del Paciente: _____

Sexo _____ **Edad** _____

Afiliación _____ **Fecha de estudio** _____

Antecedentes: Diabetes Mellitus () **Tiempo de evolución** _____

Claudicación () **Amputaciones previas ()**

Glucosa _____

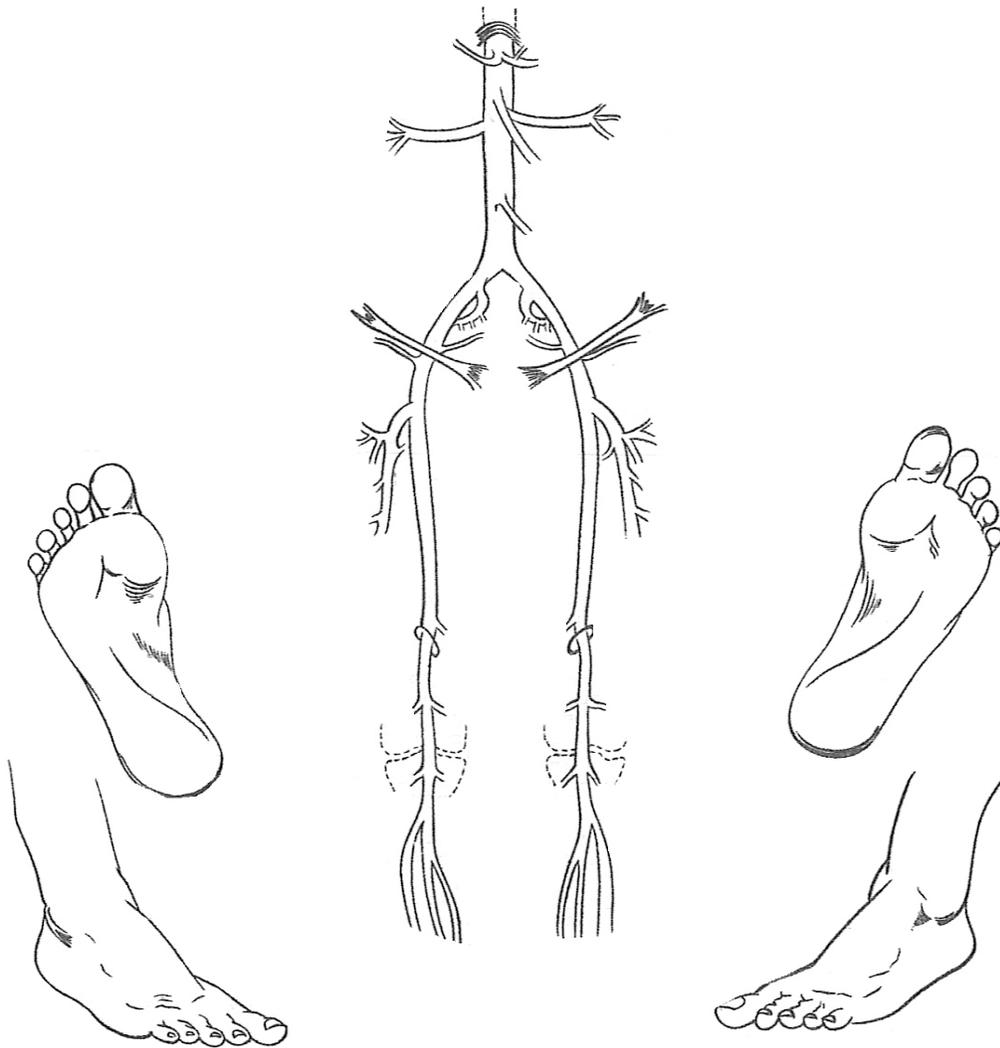
Datos clínicos:

Diagnóstico clínico: _____

Diagnóstico vascular: _____

| <i>Prueba vascular. Doppler</i> | <i>Valores Anormales</i> | <i>Valores Paciente</i> |
|---|--------------------------------------|-----------------------------|
| <i>Medición transcutánea de O2</i> | <i>Menos de 40 mmHg</i> | |
| <i>Índice tobillo-braquial (brazo)</i> | <i>Menos de 0.80: bajo lo normal</i> | |
| <i>Presión sistólica absoluta del pie</i> | <i>Menos de 0.45</i> | |

Anexo IV
HOJA DE RECOLECCION DE DATOS (Exploración anatómica)



Segmentación vascular y delimitación anatómo-vascular del proceso isquémico

Anexo V

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

No. Progresivo () Nombre: _____

No. Afiliación. _____

1.-Edad: <50años () ≥50 años () 2.-Sexo: Masc () Fem ()

3.- Superficie Corporal afectada: 1-10% () 11-30% () 31-50% () >50% ()

4.- Área Corporal afectada

Extremidad distal () Extremidad proximal () Pie dorsal () ventral () Arterios () _____ Periné ()
región lumbosacra ()

5.-Tiempo de evolución de la Diabetes mellitus _____ Neuropatía () Retinopatía () Angiopatía ()

Tipo _____ 6.-FC _____ FR _____ TA _____ Gasometría _____

7.-Biometría hemática: hb _____, _____ hto _____ eritrocitos _____ leucocitos _____ Vel. Sed. Glob _____

diferencial (neutrófilos (), eosinófilos (), basófilos (), linfocitos (), monocitos, 8.- ()

plaquetas _____ 9- tiempo de protrombina (tp) _____ tiempo parcial de tromboplastina (tpp) _____ 10.-

Fibrinógeno _____ 11. Na _____ K _____ Cl _____ Calcio _____ 12.Creatínfosfoquinasa _____ 13.- Prot C

React _____ 14.- Albúmina _____ 15.- Prot. Totales _____ 16.-Glucosa _____ 17.-hb glucosilada _____ 18.-Creatinina _____

19. Urea _____ 20.-AST _____ 21.-ALT _____ 22.-FA _____ 23.-BT _____ 24.-BD _____ 25.-

BI _____ 18.Apoptosis : 5cm _____ 10 _____ 15 _____ 19.- iNOS _____

26.- LDH _____ 27.-Doppler _____

28.- Fecha de ingreso _____ 29.- Fecha de egreso _____

30.- Días de estancia hospitalaria _____ 31.- Motivo de egreso: Defunción () Mejoría ()

32.- Tiempo de evolución previo al ingreso: _____

33.-Procedimientos quirúrgicos _____ ()

34.-Procedimientos anestésicos _____ ()

35-Morbilidad:

a) Hemorragia _____ mls.

b) Infección nosocomial: NO () SI () Cuál: _____

• Infección de herida quirúrgica: SI () NO ()

c) Dismetabolismo: SI () NO ()

36.- Germen aislado: SI () NO () Tipo: _____ Lugar de la toma:

37.-Antibióticos _____ 37.-Antibiograma _____ 38.- Tipo de infección

Se deberá anexar Historia clínica completa: FC.....FR.....TEMP.....TA.....

Gasometría arterial

APACHE

CONSENTIMIENTO DE INFORMADO DEL PACIENTE

NOMBRE DEL PACIENTE

Por favor usar MAYÚSCULAS

Estoy de acuerdo en participar en el estudio clínico intitulado: **PAPEL DE LA APOPTOSIS EN ENDOTELIO VASCULAR Y DAÑO TISULAR DEL PIE DIABÉTICO INFECTADO.**

Mismo que me ha sido explicado y se me han respondido todas las preguntas que tenía. Se me ha informado sobre el objetivo del estudio, tratamientos alternos, efectos colaterales potenciales, así como la posibilidad de retirarme del estudio en cualquier momento sin detrimento alguno para mí.

Estoy de acuerdo en que durante el procedimiento quirúrgico que sea requerido realizarme para mejorar mi estado de salud, se tomen biopsias a 15cm del sitio afectado para determinación de apoptosis, realización de doppler vascular, así como los datos médicos que se obtengan de este estudio sean utilizados por los investigadores. Los estudios mencionados son parte del diagnóstico oportuno y favorecen un tratamiento integral de mi enfermedad. Para mostrar la precisión de los datos, los expertos y/o autoridades regulatorias pueden inspeccionar los datos en presencia del investigador.

Asimismo estoy de acuerdo que los datos anónimos se transmitan a investigadores responsables, así como autoridades regulatorias para mantener la seguridad del paciente en estudios clínicos.

Se seguirán las leyes de protección de datos.

Lugar y fecha

Firma del paciente

Y/o nombre del representante legal _____

Lugar y fecha

Firma del investigador

Testigo
Nombre.....
Firma.....
Dirección.....
Fecha.....
Relación con el paciente.....

BIBLIOGRAFIA

- ADVANI,A., MARSHALL,S.M. & THOMAS,T.H. (2004) Impaired neutrophil store-mediated calcium entry in Type 2 diabetes. *Eur.J.Clin.Invest* 34, 43.
- AGUILAR-SALINAS,C.A., VAZQUEZ-CHAVEZ,C., GAMBOA-MARRUFO,R., GARCIA-SOTO,N., JESUS RIOS-GONZALEZ,J., HOLGUIN,R., VELA,S., RUIZ-ALVAREZ,F. & MAYAGOITIA,S. (2001) Obesity, diabetes, hypertension, and tobacco consumption in an urban adult Mexican population. *Arch.Med Res.* 32, 446.
- ANSARI,B., COATES,P.J., GREENSTEIN,B.D. & HALL,P.A. (1993) In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *J.Pathol.* 170, 1.
- ATHANASSIOU,G., MATSOUKA,P., KALERIDIS,V. & MISSIRLIS,Y. (2000) Deformability and filterability of white blood cell subpopulations. Evaluation of these parameters in the cell line HL-60 and in type II diabetes mellitus. *Clin.Hemorheol.Microcirc.* 22, 35.
- BACHARACH,J.M., ROOKE,T.W., OSMUNDSON,P.J. & GLOVICZKI,P. (1992) Predictive value of transcutaneous oxygen pressure and amputation success by use of supine and elevation measurements *J.Vasc.Surg.* 15, 558.
- BAMRI-EZZINE,S., AO,Z.J., LONDONO,I., GINGRAS,D. & BENDAYAN,M. (2003) Apoptosis of tubular epithelial cells in glycogen nephrosis during diabetes. *Lab Invest* 83, 1069.
- BENNETT,M.R., EVAN,G.I. & SCHWARTZ,S.M. (1995) Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *J.Clin.Invest* 95, 2266.
- BILBAULT,P, LAVAUX,T, LAHLOU,A, URING-LAMBERT,B, GAUB,M.P,RATOMPONIRINA, MEYER,N., OUDET,P. & SCHNEIDER,F. (2004) Transient Bcl-2 gene down-expression in circulating mononuclear cells of severe sepsis patients who died despite appropriate intensive care. *Intensive Care Med.* 30, 408.
- BJORKERUD,S. & BJORKERUD,B. (1996) Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. *Am.J.Pathol.* 149, 367.
- BROWNLEE,M. (1992) Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care* 15, 1835.
- BROWNLEE,M. (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813.
- CAI,L., LI,W., WANG,G., GUO,L., JIANG,Y. & KANG,Y.J. (2002) Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: mitochondrial cytochrome C-mediated caspase-3 activation pathway. *Diabetes* 51, 1938.
- CAIMI,G., SINAGRA,D., CANINO,B., SCARPITTA,A.M., MONTANA,M., BONAVENTURA,V. & LO,P.R. (2000) Polymorphonuclear leukocyte membrane fluidity before and after activation in subjects with insulin resistance. *Acta Diabetol.* 37, 9.
- CAMERON,N.E. & COTTER,M.A. (1997) Metabolic and vascular factors in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetes* 46 Suppl 2, S31.

- CARBONARI,M., CIBATI,M. & FIORILLI,M. (1995) Measurement of apoptotic cells in peripheral blood. *Cytometry* 22, 161.
- CERIELLO,A., QUAGLIARO,L., D'AMICO,M., DI FILIPPO,C., MARFELLA,R., NAPPO,F., BERRINO,L., ROSSI,F. & GIUGLIANO,D. (2002) Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat. *Diabetes* 51, 1076.
- CHU,Y., FARACI,F.M., OOBOSHI,H. & HEISTAD,D.D. (1997) Increase in TUNEL positive cells in aorta from diabetic rats. *Endothelium* 5, 241.
- COLLISON,K.S., PARHAR,R.S., SALEH,S.S., MEYER,B.F., KWAASI,A.A., HAMMAMI,M.M., SCHMIDT,A.M., STERN,D.M. & AL MOHANNA,F.A. (2002) RAGE-mediated neutrophil dysfunction is evoked by advanced glycation end products (AGEs). *J.Leukoc.Biol.* 71, 433.
- DIDENKO,V.V. & HORNSBY,P.J. (1996) Presence of double-strand breaks with single-base 3' overhangs in cells undergoing apoptosis but not necrosis. *J.Cell Biol.* 135, 1369.
- DONLEY,B.G., PHILBIN,T., TOMFORD,J.W. & SFERRA,J.J. (2001) Foot and ankle infections after surgery. *Clin. Orthop.* 391, 162.
- DORMANDY,J.A. & RUTHERFORD,R.B. (2000) Management of peripheral arterial disease (PAD). TASC Working Group. TransAtlantic Inter-Society Concensus (TASC). *J.Vasc.Surg.* 31, S1.
- ENARI,M., SAKAHIRA,H., YOKOYAMA,H., OKAWA,K., IWAMATSU,A. & NAGATA,S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43.
- ESAKI,T., HAYASHI,T., MUTO,E., KANO,H., KUMAR,T.N., ASAI,Y., SUMI,D. & IGUCHI,A. (2000) Expression of inducible nitric oxide synthase and Fas/Fas ligand correlates with the incidence of apoptotic cell death in atheromatous plaques of human coronary arteries. *Nitric Oxide* 4, 561.
- EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. Report (1997) *Diabetes Care* 20, 1183.
- FERNANDEZ-ORTIZ,A., BADIMON,J.J., FALK,E., FUSTER,V., MEYER,B., MAILHAC,A., WENG,D., SHAH,P.K. & BADIMON,L. (1994) Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *J.Am.Coll.Cardiol.* 23, 1562.
- FIORDALISO,F., LERI,A., CESSSELLI,D., LIMANA,F., SAFAI,B., NADAL-GINARD,B., ANVERSA,P. & KAJSTURA,J. (2001) Hyperglycemia activates p53 and p53-regulated genes leading to myocyte cell death. *Diabetes* 50, 2363.
- FLISS,H. & GATTINGER,D. (1996) Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ.Res.* 79, 949.
- FREUDE,B., MASTERS,T.N., ROBICSEK,F., FOKIN,A., KOSTIN,S., ZIMMERMANN,R., ULLMANN,C., LORENZ-MEYER,S. & SCHAPER,J. (2000) Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J.Mol.Cell Cardiol.* 32, 197.

- GOTTLIEB,R.A., GRUOL,D.L., ZHU,J.Y. & ENGLER,R.L. (1996) Preconditioning rabbit cardiomyocytes: role of pH, vacuolar proton ATPase, and apoptosis. *J.Clin.Invest* 97, 2391.
- GRABER,R., FARINE,J.C., FUMAGALLI,I., TATTI,V. & LOSA,G.A. (1999) Apoptosis and oxidative status in peripheral blood mononuclear cells of diabetic patients. *Apoptosis*. 4, 263.
- GRZEGORCZYK,J., KOWALSKI,M.L., PILAT,A. & IWASZKIEWICZ,J. (2002) Increased apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with perennial allergic asthma/rhinitis: relation to serum markers of apoptosis. *Mediators Inflamm*. 11, 225.
- HALICKA,H.D., SEITER,K., FELDMAN,E.J., TRAGANOS,F., MITTELMAN,A., AHMED,T. & DARZYNKIEWICZ,Z. (1997) Cell cycle specificity of apoptosis during treatment of leukaemias. *Apoptosis*. 2, 25.
- HANNON-FLETCHER,M.P., O'KANE,M.J., MOLES,K.W., WEATHERUP,C., BARNETT,C.R. & BARNETT,Y.A. (2000) Levels of peripheral blood cell DNA damage in insulin dependent diabetes mellitus human subjects. *Mutat Res*. 460, 53.
- HANSSON,G.K., JONASSON,L., SEIFERT,P.S. & STEMME,S. (1989) Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 9, 567.
- HARTZ,S., MENART,B. & TSCHOEPE,D. (2003) Leukocyte apoptosis in whole blood involves platelet-dependent coaggregation. *Cytometry* 52A, 117.
- HOTCHKISS,R.S., TINSLEY,K.W. & KARL,I.E. (2003) Role of apoptotic cell death in sepsis. *Scand.J.Infect.Dis*. 35, 585.
- ISNER,J.M., KEARNEY,M., BORTMAN,S. & PASSERI,J. (1995) Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation* 91, 2703.
- JAIN,S.K., KANNAN,K. & MCVIE,R. (1999) Effect of hyperketonemia on blood monocytes in type-I diabetic patients and apoptosis in cultured U937 monocytes. *Antioxid.Redox Signal* 1, 211.
- JEFFCOATE,W.J., MACFARLANE,R.M. & FLETCHER,E.M. (1993) The description and classification of diabetic foot lesions. *Diabet. Med*. 10, 676.
- KANG,B.P., FRENCHER,S., REDDY,V., KESSLER,A., MALHOTRA,A. & MEGGS,L.G. (2003) High glucose promotes mesangial cell apoptosis by oxidant-dependent mechanism. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 284, F455.
- KANO,H., TAKEMURA,G., MISAO,J., HAYAKAWA,Y., AOYAMA,T., NISHIGAKI,K., NODA,T., FUJIWARA,T., FUKUDA,K., MINATOGUCHI,S. & FUJIWARA,H. (1999) Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA repair. *Circulation* 99, 2757.
- KERR,J.F., WYLLIE,A.H. & CURRIE,A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer* 26, 239.
- KING,H. (1993) Diabetes and the World Health Organization. Progress towards prevention and control. *Diabetes Care* 16, 387.

- KOCKX,M.M. & HERMAN,A.G. (2000) Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? *Cardiovasc.Res.* 45, 736.
- KOWLURU,R.A. & ABBAS,S.N. (2003) Diabetes-induced mitochondrial dysfunction in the retina. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 44, 5327.
- LACH-SZYRMA,V. & BRITO-BABAPULLE,F. (1999) The clinical significance of apoptotic cells in peripheral blood smears. *Clin.Lab Haematol.* 21, 277.
- LEE,J.S., LU,M., LEE,V.S., RUSSELL,D., BAHR,C. & LEE,E.T. (1993) Lower-extremity amputation. Incidence, risk factors, and mortality in the Oklahoma Indian Diabetes Study. *Diabetes* 42, 876.
- LI,P.A., RASQUINHA,I., HE,Q.P., SIESJO,B.K., CSISZAR,K., BOYD,C.D. & MACMANUS,J.P. (2001) Hyperglycemia enhances DNA fragmentation after transient cerebral ischemia. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 21, 568.
- LLORENTE,L., DE LA,F.H., RICHAUD-PATIN,Y., ALVARADO-DE LA BARRERA,C., DIAZ-BORJON,A., LOPEZ-PONCE,A., LERMAN-GARBER,I. & JAKEZ-OCAMPO,J. (2000) Innate immune response mechanisms in non-insulin dependent diabetes mellitus patients assessed by flow cytometry. *Immunol.Lett.* 74, 239.
- LOPRESTI,R., MONTANA,M., CANINO,B., VENTIMIGLIA,G., CATANIA,A. & CAIMI,G. (1999) Diabetes mellitus: polymorphonuclear leukocyte (PMN) filtration parameters and PMN membrane fluidity after chemotactic activation. *Metabolism* 48, 30.
- LOSA,G.A. & GRABER,R. (2000) Spontaneous apoptosis, oxidative status and immunophenotype markers in blood lymphocytes of AIDS patients. *Anal.Cell Pathol.* 21, 11.
- LUTGENS,E., DE MUINCK,E.D., KITSLAAR,P.J., TORDOIR,J.H., WELLENS,H.J. & DAEMEN,M.J. (1999) Biphasic pattern of cell turnover characterizes the progression from fatty streaks to ruptured human atherosclerotic plaques. *Cardiovasc.Res.* 41, 473.
- MAK,K.H., MOLITERNO,D.J., GRANGER,C.B., MILLER,D.P., WHITE,H.D., WILCOX,R.G., CALIFF,R.M. & TOPOL,E.J. (1997) Influence of diabetes mellitus on clinical outcome in the thrombolytic era of acute myocardial infarction. GUSTO-I Investigators. Global Utilization of Streptokinase and Tissue Plasminogen Activator for Occluded Coronary Arteries. *J.Am.Coll.Cardiol.* 30, 171.
- MALLAT,Z., HUGEL,B., OHAN,J., LESECHE,G., FREYSSINET,J.M. & TEDGUI,A. (1999) Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 99, 348.
- MANDRUP-POULSEN,T. (2003) Apoptotic signal transduction pathways in diabetes. *Biochem.Pharmacol.* 66, 1433.
- MAZADE,M.A. & EDWARDS,M.S. (2001) Impairment of type III group B Streptococcus-stimulated superoxide production and opsonophagocytosis by neutrophils in diabetes. *Mol.Genet.Metab.* 73, 259.

- MCMANUS,L.M., BLOODWORTH,R.C., PRIHODA,T.J., BLODGETT,J.L. & PINCKARD,R.N. (2001) Agonist-dependent failure of neutrophil function in diabetes correlates with extent of hyperglycemia. *J.Leukoc.Biol.* 70, 395.
- MOHANTY,P., GHANIM,H., HAMOUDA,W., ALJADA,A., GARG,R. & DANDONA,P. (2002) Both lipid and protein intakes stimulate increased generation of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells. *Am.J.Clin Nutr.* 75, 767.
- MORENO,P.R., MURCIA,A.M., PALACIOS,I.F., LEON,M.N., BERNARDI,V.H., FUSTER,V. & FALLON,J.T. (2000) Coronary composition and macrophage infiltration in atherectomy specimens from patients with diabetes mellitus. *Circulation* 102, 2180.
- MOST,R.S. & SINNOCK,P. (1983) The epidemiology of lower extremity amputations in diabetic individuals. *Diabetes Care* 6, 87.
- MUCHOVA,J., LIPTAKOVA,A., ORSZAGHOVA,Z., GARAIOVA,I., TISON,P., CARSKY,J. & DURACKOVA,Z. (1999) Antioxidant systems in polymorphonuclear leucocytes of Type 2 diabetes mellitus. *Diabet.Med.* 16, 74.
- MUNRO,J.M. & COTRAN,R.S. (1988) The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Lab Invest* 58, 249.
- NAPOLI,C., DE NIGRIS,F. & PALINSKI,W. (2001) Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall. *J.Cell Biochem.* 82, 674.
- NATHAN,D.M. (1993) Long-term complications of diabetes mellitus. *N.Engl.J.Med* 328, 1676.
- OHNO,M., TAKEMURA,G., OHNO,A., MISAO,J., HAYAKAWA,Y., MINATOGUCHI,S., FUJIWARA,T. & FUJIWARA,H. (1998) "Apoptotic" myocytes in infarct area in rabbit hearts may be oncotic myocytes with DNA fragmentation: analysis by immunogold electron microscopy combined with In situ nick end-labeling. *Circulation* 98, 1422.
- OLEFSKY,J.M. & NOLAN,J.J. (1995) Insulin resistance and non-insulin-dependent diabetes mellitus: cellular and molecular mechanisms. *Am.J.Clin.Nutr.* 61, 980S.
- OLIVETTI,G., QUAINI,F., SALA,R., LAGRASTA,C., CORRADI,D., BONACINA,E., GAMBERT,S.R., CIGOLA,E. & ANVERSA,P. (1996) Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart. *J.Mol.Cell Cardiol.* 28, 2005.
- PEIRO,C., LAFUENTE,N., MATESANZ,N., CERCAS,E., LLERGO,J.L., VALLEJO,S., RODRIGUEZ-MANAS,L. & SANCHEZ-FERRER,C.F. (2001) High glucose induces cell death of cultured human aortic smooth muscle cells through the formation of hydrogen peroxide. *Br.J.Pharmacol.* 133, 967.
- PERLMAN,H., MAILLARD,L., KRASINSKI,K. & WALSH,K. (1997) Evidence for the rapid onset of apoptosis in medial smooth muscle cells after balloon injury. *Circulation* 95, 981.
- PIWOWAR,A., KNAPIK-KORDECKA,M. & WARWAS,M. (2000) Concentration of leukocyte elastase in plasma and polymorphonuclear neutrophil extracts in type 2 diabetes. *Clin.Chem.Lab Med.* 38, 1257.
- PRADHAN,A.D., MANSON,J.E., RIFAI,N., BURING,J.E. & RIDKER,P.M. (2001) C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 286, 327.

- RAMANA,K.V., FRIEDRICH,B., BHATNAGAR,A. & SRIVASTAVA,S.K. (2003) Aldose reductase mediates cytotoxic signals of hyperglycemia and TNF-alpha in human lens epithelial cells. *FASEB J.* 17, 315.
- REAVEN,G.M. (1988) Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37, 1595.
- RECCHIONI,R., MARCHESELLI,F., MORONI,F. & PIERI,C. (2002) Apoptosis in human aortic endothelial cells induced by hyperglycemic condition involves mitochondrial depolarization and is prevented by N-acetyl-L-cysteine. *Metabolism* 51, 1384.
- REIBER,G.E., PECORARO,R.E. & KOESELL,T.D. (1992) Risk factors for amputation in patients with diabetes mellitus. A case- control study. *Ann Intern Med* 117, 97.
- REN,Y., TANG,J., MOK,M.Y., CHAN,A.W., WU,A. & LAU,C.S. (2003) Increased apoptotic neutrophils and macrophages and impaired macrophage phagocytic clearance of apoptotic neutrophils in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 48, 2888.
- ROMEO,G., LIU,W.H., ASNAGHI,V., KERN,T.S. & LORENZI,M. (2002) Activation of nuclear factor-kappaB induced by diabetes and high glucose regulates a proapoptotic program in retinal pericytes. *Diabetes* 51, 2241.
- SCHMEICHEL,A.M., SCHMELZER,J.D. & LOW,P.A. (2003) Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 52, 165.
- SCHNEIDER,D.J., TAATJES,D.J., HOWARD,D.B. & SOBEL,B.E. (1999) Increased reactivity of platelets induced by fibrinogen independent of its binding to the IIb-IIIa surface glycoprotein: a potential contributor to cardiovascular risk. *J.Am.Coll.Cardiol.* 33, 261.
- SECRETARÍA DE PROGRAMACIÓN Y PRESUPUESTO. (1990) Proyecciones de población de México de las Entidades Federativas: 1980-2010 México, 56-69.
- SEGHATCHIANA,J. & DE SOUSA,G. (2003) Blood cell apoptosis/necrosis: some clinical and laboratory aspects. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1010, 540.
- SIESJO,B.K., KATSURA,K.I., KRISTIAN,T., LI,P.A. & SIESJO,P. (1996) Molecular mechanisms of acidosis-mediated damage. *Acta Neurochir.Suppl (Wien.)* 66, 8.
- SUGIYAMA,T., KOBAYASHI,M., KAWAMURA,H., LI,Q., PURO,D.G. & KOBAYASHI,M. (2004) Enhancement of P2X(7)-induced pore formation and apoptosis: an early effect of diabetes on the retinal microvasculature. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 45, 1026.
- TAGA,K., YOSHIDA,M., KANEKO,M., ASADA,M., OKADA,M., TANIHO,M. & TOSATO,G. (2000) Contribution of automated hematology analysis to the detection of apoptosis in peripheral blood lymphocytes. *Cytometry* 42, 209.
- TAKAMURA,Y., SUGIMOTO,Y., KUBO,E., TAKAHASHI,Y. & AKAGI,Y. (2001) Immunohistochemical study of apoptosis of lens epithelial cells in human and diabetic rat cataracts. *Jpn.J.Ophthalmol.* 45, 559.

- TAKEMURA,G., OHNO,M., HAYAKAWA,Y., MISAO,J., KANO,H., OHNO,A., UNO,Y., MINATOBUCHI,S., FUJIWARA,T. & FUJIWARA,H. (1998) Role of apoptosis in the disappearance of infiltrated and proliferated interstitial cells after myocardial infarction. *Circ.Res.* 82, 1130.
- TANAKA,M., ITO,H., ADACHI,S., AKIMOTO,H., NISHIKAWA,T., KASAJIMA,T., MARUMO,F. & HIROE,M. (1994) Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ.Res.* 75, 426.
- TREVANI,A.S., ANDONEGUI,G., GIORDANO,M., LOPEZ,D.H., GAMBERALE,R., MINUCCI,F. & GEFFNER,J.R. (1999) Extracellular acidification induces human neutrophil activation. *J.Immunol.* 162, 4849.
- UCHIMURA,K., NAGASAKA,A., HAYASHI,R., MAKINO,M., NAGATA,M., KAKIZAWA,H., KOBAYASHI,T., FUJIWARA,K., KATO,T., IWASE,K., SHINOHARA,R., KATO,K. & ITOH,M. (1999) Changes in superoxide dismutase activities and concentrations and myeloperoxidase activities in leukocytes from patients with diabetes mellitus. *J.Diabetes Complications* 13, 264.
- VAN HEERDE,W.L., ROBERT-OFFERMAN,S., DUMONT,E., HOFSTRA,L., DOEVENDANS,P.A., SMITS,J.F., DAEMEN,M.J. & REUTELINGSPERGER,C.P. (2000) Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on Annexin V/DiIc-1 mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell. *Cardiovasc.Res.* 45, 549.
- VERZOLA,D., BERLOLOTTO,M.B., VILLAGGIO,B., OTTONELLO,L., DALLEGRI,F., SALVATORE,F., BERRUTI,V., GANDOLFO,M.T., GARIBOTTO,G. & DEFERRARI,G. (2004) Oxidative stress mediates apoptotic changes induced by hyperglycemia in human tubular kidney cells. *J.Am.Soc.Nephrol.* 15 Suppl 1, S85.
- VINCENT,A.M., BROWNLEE,M. & RUSSELL,J.W. (2002) Oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 959, 368.
- WAGNER,F.W., Jr. (1981) The dysvascular foot: a system for diagnosis and treatment. *Foot Ankle* 2, 64.
- WAGNER,P.D., EVANS,S.D., DUNLAP,J. & BALLON-LANDA,G. (1995) Necrotizing fasciitis and septic shock caused by *Vibrio cholerae* acquired in San Diego, California. *West J.Med* 163, 375.
- WALSH,K., SMITH,R.C. & KIM,H.S. (2000) Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis, and plaque rupture. *Circ.Res.* 87, 184.
- WANG,J.Y., YANG,J.M., WANG,J.Y., TAO,P.L. & YANG,S.N. (2001) Synergistic apoptosis induced by bacterial endotoxin lipopolysaccharide and high glucose in rat microglia. *Neurosci.Lett.* 304, 177.
- WEBSTER,K.A., DISCHER,D.J., KAISER,S., HERNANDEZ,O., SATO,B. & BISHOPRIC,N.H. (1999) Hypoxia-activated apoptosis of cardiac myocytes requires reoxygenation or a pH shift and is independent of p53. *J.Clin.Invest* 104, 239.
- WILLINGHAM,M.C. (1999) Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J.Histochem.Cytochem.* 47, 1101.

- WONG,R.K., PETTIT,A.I., QUINN,P.A., JENNINGS,S.C., DAVIES,J.E. & NG,L.L. (2003) Advanced glycation end products stimulate an enhanced neutrophil respiratory burst mediated through the activation of cytosolic phospholipase A2 and generation of arachidonic Acid. *Circulation* 108, 1858.
- YAOITA,H., OGAWA,K., MAEHARA,K. & MARUYAMA,Y. (2000) Apoptosis in relevant clinical situations: contribution of apoptosis in myocardial infarction. *Cardiovasc.Res.* 45, 630.
- YI,J.M., KIM,M.S., KOO,H.N., SONG,B.K., YOO,Y.H. & KIM,H.M. (2004) Poncirus trifoliata fruit induces apoptosis in human promyelocytic leukemia cells. *Clin.Chim.Acta* 340, 179.
- ZIMMET,P.Z. (1995) The pathogenesis and prevention of diabetes in adults. Genes, autoimmunity, and demography. *Diabetes Care* 18, 1050.
- ZUANETTI,G., LATINI,R., MAGGIONI,A.P., SANTORO,L. & FRANZOSI,M.G. (1993) Influence of diabetes on mortality in acute myocardial infarction: data from the GISSI-2 study. *J.Am.Coll.Cardiol.* 22, 1788.